



**HAL**  
open science

## Séparation et étude des pigments des épinards par spectrofluorimétrie

Laura Nodin, Rachel Meallet-Renault, Jonathan Piard

► **To cite this version:**

Laura Nodin, Rachel Meallet-Renault, Jonathan Piard. Séparation et étude des pigments des épinards par spectrofluorimétrie. *Le Bulletin de l'Union des Professeurs de Physique et de Chimie*, 2014, 108 (961), pp.293-310. hal-04065600

**HAL Id: hal-04065600**

**<https://hal.science/hal-04065600>**

Submitted on 12 Apr 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Séparation et étude des pigments des épinards par spectrofluorimétrie

par Laura NODIN, Rachel MEALLET-RENAULT et Jonathan PIARD

Département de chimie

ENS Cachan - 94235 Cachan Cedex

[laura.nodin@ens-cachan.fr](mailto:laura.nodin@ens-cachan.fr)

[rachel.meallet@ens-cachan.fr](mailto:rachel.meallet@ens-cachan.fr)

[jonathan.piard@ens-cachan.fr](mailto:jonathan.piard@ens-cachan.fr)

**D**ANS CET ARTICLE, il est montré que l'utilisation de la fluorescence peut constituer un bon outil pour l'étude d'une expérience largement détaillée dans la littérature : la séparation des pigments d'épinards par chromatographie sur colonne. La première partie est dédiée au processus de fluorescence, de sa définition aux différentes mesures permettant de le caractériser (spectre d'émission, excitation et rendement quantique). Dans la deuxième partie, les données issues de la littérature relatives aux pigments des épinards sont exposées et les conditions expérimentales des mesures photophysiques sont détaillées. Dans une dernière partie, il est démontré qu'une quantité même infime de chlorophylle dans un échantillon peut être détectée. Les différents types de chlorophylles présentes (ici les chlorophylles a et b) peuvent être différenciés sans ambiguïté à l'aide de la fluorescence. Cette technique peut donc être utilisée pour suivre ou vérifier la composition des fractions issues d'une colonne chromatographique et pour évaluer la bonne séparation des pigments.

## 1. LE PROCESSUS DE FLUORESCENCE

### 1.1. Définition

L'interaction de la lumière avec une molécule peut conduire à l'absorption de photons : la molécule est alors excitée. L'ensemble des processus intervenant suite à l'excitation d'une molécule à partir de son état fondamental est décrit dans le diagramme de Perrin-Jablonski (cf. figure 1, page ci-après) [1-3].

La fluorescence est un processus d'émission spontanée de lumière intervenant lors du retour à l'état fondamental  $S_0$  d'une molécule à partir d'un état excité singulet  $S_1$  ( $S_1 \rightarrow S_0$ ). Elle est caractérisée par l'émission très rapide d'un photon ( $10^{-10}$ - $10^{-7}$  s), car le processus s'effectue entre deux états de même multiplicité de spin ( $\Delta S = 0$ ). L'émission de fluorescence est en compétition avec des processus non radiatifs également très rapides (cf. figure 1, page ci-après) de conversion intersystèmes (CIS) et conversion interne (CI). La fluorescence est à distinguer de la phosphorescence pour laquelle l'émission spontanée de lumière résulte du retour à l'état fondamental à partir

d'un état excité triplet ( $T_1 \rightarrow S_0$ ). Dans ce cas, l'émission est plus lente ( $10^{-6}$ -1 s) en comparaison de la fluorescence, car la multiplicité de spin n'est pas conservée lors de la transition qui est donc partiellement interdite.

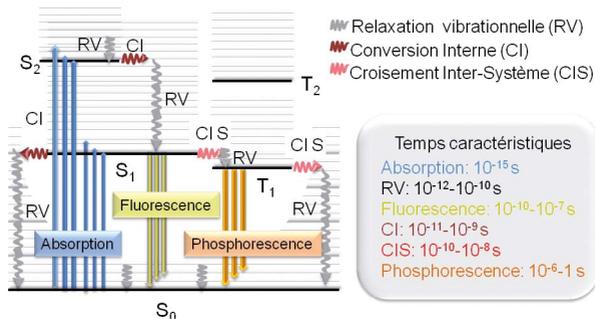


Figure 1 - Diagramme de Perrin-Jablonski [1-3].

Il est à noter que la longueur d'onde d'émission après excitation est plus grande que la longueur d'onde d'absorption. Cette différence entre les maxima des spectres d'absorption et d'émission est qualifiée de déplacement de Stokes et s'explique par le fait que le retour à l'état fondamental  $S_0$  d'une molécule s'effectue depuis l'état excité de plus basse énergie (règle de Kasha [1-3]). L'absorption d'un photon est donc généralement suivie par un processus de relaxation vibrationnelle très rapide (cf. figure 1).

## 1.2. Conditions expérimentales

L'intensité de fluorescence  $I_f$  suit l'équation suivante :

$$I_f = kI_{\text{abs}} \phi_f \quad (1)$$

où  $k$  est une constante d'appareil (sans unité),  $I_{\text{abs}}$  l'intensité absorbée et  $\phi_f$  le rendement quantique de fluorescence de la molécule (sans unité). On notera que seules les molécules ayant absorbé le faisceau lumineux sont susceptibles de donner lieu à un processus de fluorescence.

On sait par ailleurs que d'après la loi de Beer-Lambert<sup>(1)</sup> :

$$A = -\log \frac{I_t}{I_0} = \epsilon lc$$

$$I_t = I_0 10^{-\epsilon lc} = I_0 10^{-A}$$

(1) La loi de Beer-Lambert n'est valable que pour un faisceau de lumière monochromatique traversant un milieu transparent, homogène et isotrope et pour des faibles concentrations ( $A < 1$ ) afin d'éviter la formation d'agrégats et la saturation du détecteur du spectrophotomètre UV-Visible. De plus, le soluté ne doit pas réagir sous l'action de la lumière incidente.

avec  $I_t$ , l'intensité transmise,  $l$  le chemin optique (en cm),  $\varepsilon$  le coefficient d'absorption molaire (en  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) et  $C$  la concentration en fluorophores (en  $mol \cdot L^{-1}$ ). Puisque  $I_0 = I_t + I_{abs}$ , on en déduit donc que :

$$I_{abs} = I_0 (1 - 10^{-\varepsilon l c}) = I_0 (1 - 10^{-A})$$

et l'équation (1) devient :

$$I_f = k I_0 (\lambda_{exc}) \times (1 - 10^{-\varepsilon(\lambda_{exc}) l c}) \phi_f \quad (2)$$

où  $I_0$  est l'intensité du faisceau incident à la longueur d'onde d'excitation  $\lambda_{exc}$  (en u.a),  $\phi_f$  le rendement quantique de fluorescence de la molécule (sans unité),  $\varepsilon(\lambda_{exc})$  le coefficient d'absorption molaire à la longueur d'onde d'excitation  $\lambda_{exc}$  (en  $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) et  $C$  la concentration en fluorophores (en  $mol \cdot L^{-1}$ ).

Dans le cas de l'étude d'une solution très diluée en espèces fluorescentes ( $\varepsilon l c \ll 1$  donc  $A < 0,1$ ) on a :

$$I_{abs} = I_0 (1 - 10^{-\varepsilon l c}) = I_0 \ln 10 \varepsilon l c$$

L'intensité de fluorescence  $I_f$  est alors proportionnelle à la concentration de la molécule et suit l'équation (3) :

$$I_f = k' I_0 (\lambda_{exc}) \phi_f \varepsilon (\lambda_{exc}) C \quad (3)$$

Où  $k' = k \times \ln 10$ .

Il est important de faire remarquer que  $I_f$  est dépendante de l'appareil et du solvant choisi, car le rendement quantique et le coefficient d'absorption molaire sont aussi fonction du solvant (polarité, liaison hydrogène...).

Pour que cette relation de linéarité entre l'intensité de fluorescence et la concentration en espèces fluorescentes (équation (3)) puisse être valable, il est donc nécessaire que :

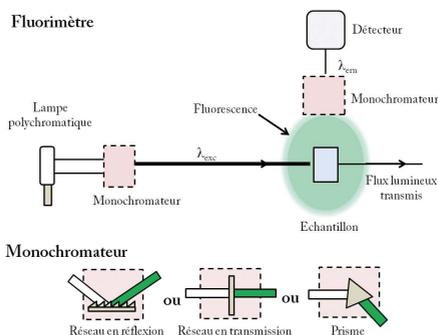
- ◆ Les solutions soient faiblement absorbantes (l'absorbance  $A$  doit être généralement inférieure à 0,1) afin d'éviter qu'une partie du faisceau d'excitation ne soit absorbée ce qui conduirait à une diminution de la fluorescence. On parle alors d'un effet de filtre interne en excitation.
- ◆ Qu'aucune espèce étrangère en concentration appréciable ne puisse venir entraîner un transfert d'énergie sous forme non radiative, ce qui conduirait également à une diminution de la fluorescence. On parle alors d'un processus d'extinction de la fluorescence.

Remarque : Une solution trop absorbante peut conduire à une ré-absorption de la fluorescence émise et par conséquent à une diminution de l'intensité de fluorescence (effet de filtre interne en émission). Toutefois, un tel effet n'est rencontré que pour des espèces ayant un faible déplacement de Stokes. Les spectres d'absorption et d'émission

possèdent alors un domaine de longueur d'onde commun. Dans le cas des chlorophylles, la seule utilisation du maximum d'émission et son fort déplacement de Stokes (environ  $6500\text{--}9100\text{ cm}^{-1}$ ) permettent de s'affranchir de la présence d'un tel effet.

### 1.3. Mesures spectrofluorimétriques

Les propriétés de fluorescence d'une molécule sont déterminées au moyen d'un spectrofluorimètre dont un schéma est donné en figure 2. Les monochromateurs utilisés sont généralement des réseaux en réflexion même si des réseaux en transmission voire des prismes sont parfois utilisés (cf. figure 2 dans le cas d'une sélection d'une longueur d'onde dans le vert).



**Figure 2** - Schéma d'un spectrofluorimètre et différentes possibilités de monochromateur dans le cas d'une sélection d'une longueur d'onde dans le vert.

Deux types de spectres de fluorescence peuvent être tracés, chacun apportant des informations différentes : les spectres d'émission et les spectres d'excitation. Dans tous les cas et comme pour un spectrophotomètre d'absorption, un rayonnement lumineux incident est envoyé sur l'échantillon. On parle ici de faisceau d'excitation et on note sa longueur d'onde  $\lambda_{exc}$ . Le processus de fluorescence étant isotrope, le rayonnement lumineux résultant de l'émission de fluorescence est récolté à  $90^\circ$  du faisceau d'excitation afin de ne pas être saturé par ce dernier. On parle de faisceau d'émission et on note sa longueur d'onde  $\lambda_{em}$ .

#### 1.3.1. Spectre d'émission

Un spectre d'émission consiste à tracer l'intensité de fluorescence  $I_f$  en fonction de la longueur d'onde d'émission :  $I_f = f(\lambda_{em})$ .

La longueur d'onde  $\lambda_{exc}$  est fixée à une valeur précise. Celle-ci est choisie au sein d'une bande d'absorption conduisant à la fluorescence et l'on pourra choisir le maximum d'absorption ( $\lambda_{max}(abs)$ ), mais cela n'est pas une obligation. Pour déterminer

les bandes d'absorption, on peut soit se référer à la littérature ou enregistrer le spectre d'absorption. On mesure alors l'intensité de fluorescence pour une gamme de  $\lambda_{em}$ .

Le détecteur n'ayant pas la même sensibilité de détection selon la longueur d'onde, une correction des spectres d'émission est réalisée. Cette correction varie selon la nature du détecteur utilisé.

Pour comparer plusieurs spectres d'émission, il est nécessaire de tenir compte de l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation. Ceci amène donc l'expérimentateur à « corriger » les spectres d'émission en divisant l'ensemble du spectre par un facteur  $1 - 10^{-A(\lambda_{exc})}$ . On trace alors  $I'_f = (\lambda_{em})$  avec :

$$I'_f = \frac{I_f}{1 - 10^{-A(\lambda_{exc})}} = kI_0 \phi_f$$

et  $I'_f$  est alors indépendant de l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation.

### 1.3.2. Spectre d'excitation

Un spectre d'excitation consiste à tracer l'intensité de fluorescence  $I_f$  en fonction de la longueur d'onde d'excitation :  $I_f = f(\lambda_{exc})$ .

La longueur d'onde  $\lambda_{em}$  est fixée. Celle-ci est choisie au sein d'une bande de fluorescence et l'on choisit généralement celle-ci au maximum de fluorescence ( $\lambda_{max}(\text{fluo})$ ). On mesure alors l'intensité de fluorescence pour une gamme de  $\lambda_{exc}$ .

Les spectres d'excitation représentent la contribution du spectre d'absorption à l'émission de fluorescence. Ceux-ci peuvent donc permettre de déterminer les bandes d'absorption conduisant à la fluorescence. Par ailleurs si l'équation (3) est vérifiée, on observe que  $I_f$  dépend de  $\varepsilon(\lambda_{exc})$ , le coefficient d'absorption molaire à la longueur d'onde d'excitation. On observe alors souvent que le spectre d'excitation correspond au spectre d'absorption. Toutefois, dans des cas plus complexes (transfert d'énergie, de protons, présence de plusieurs espèces fluorescentes...) que nous n'aborderons pas dans cette étude, les spectres d'excitation peuvent différer des spectres d'absorption.

Comme pour les spectres d'émission, une correction des spectres d'excitation est ici également nécessaire. Les spectres sont ici divisés par un facteur  $1 - 10^{-A(\lambda)}$ ,  $A(\lambda)$  représentant le spectre d'absorption.

### 1.4. La notion de rendement quantique de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence (noté  $\phi_f$ ) est défini comme le rapport du nombre de photons émis par fluorescence et le nombre de photons absorbés.

$$\phi_f = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}}$$

Il correspond à la fraction de molécules excitées à l'état  $S_1$  relaxant à l'état fondamental  $S_0$  de façon radiative en émettant un photon. Il permet de caractériser l'importance relative de l'émission de fluorescence par rapport aux autres processus de désactivation non radiatifs (cf. figure 1, en début d'article).

Expérimentalement, le rendement quantique de fluorescence d'un composé (indiqué x) est mesuré par rapport à une référence (indiquée 0) dont le rendement quantique est connu, car la constante d'appareil et l'intensité incidente sont pratiquement impossibles à déterminer, varient d'un jour à l'autre et dépendent du spectrofluorimètre utilisé. Les rendements quantiques des deux composés sont reliés par la relation suivante [4] :

$$\phi_f(x) = \phi_f(0) \frac{1 - 10^{-A_0}}{1 - 10^{-A_x}} \frac{J_x}{J_0} \left( \frac{n_x}{n_0} \right)^2 \quad (4)$$

où  $\phi_f(x)$  et  $\phi_f(0)$  sont respectivement les rendements quantiques du composé x et de la référence,  $A_x$  et  $A_0$  les absorbances du composé x et de la référence,  $J_x$  et  $J_0$  les intégrales des bandes d'émission du composé x et de la référence,  $n_x$  et  $n_0$  les indices de réfraction des solvants dans lesquels sont dissous le composé x et la référence. Les mesures concernant le composé x et la référence doivent être strictement faites dans les mêmes conditions expérimentales : longueur d'onde d'excitation, bande passante des monochromateurs, gain d'appareil...

La référence employée est choisie afin que les spectres d'absorption et d'émission se situent dans les mêmes domaines de longueur d'onde que ceux du composé d'intérêt.

## 2. SÉPARATION DES PIGMENTS D'ÉPINARDS PAR CHROMATOGRAPHIE

### 2.1. De l'intérêt de la fluorescence

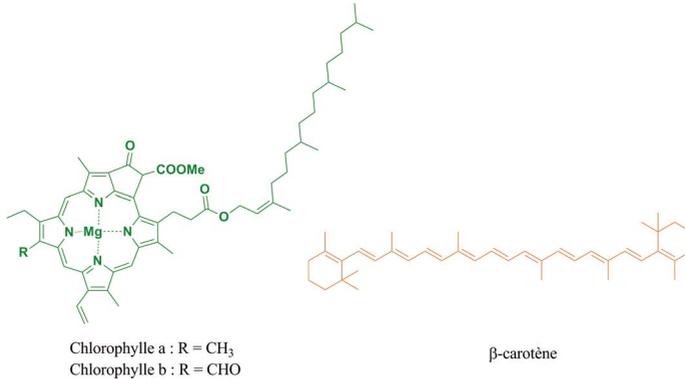
#### 2.1.1. Les différents types de chlorophylle

La chlorophylle est le principal pigment<sup>(2)</sup> présent au sein des végétaux réalisant la photosynthèse. Son nom vient du grec *khlôros* (vert) et *φύλλον* / *phúllon* (feuille). Son rôle est d'absorber l'énergie lumineuse, ce qui constitue la première étape dans la conversion de cette énergie en énergie chimique. Il existe plusieurs types de chlorophylle selon leur structure chimique :

- la chlorophylle a (cf. figure 3, page ci-contre) présente chez tous les végétaux ;
- la chlorophylle b (cf. figure 3, page ci-contre) présente chez les végétaux supérieurs

(2) Un pigment est une substance colorante qui a la capacité d'absorber les rayonnements lumineux dans le visible en suspension dans un liant. Ils sont donc insolubles dans le milieu qui les entoure et forment donc des suspensions contrairement aux colorants qui sont solubilisés dans le milieu qui les entoure.

- et les algues vertes en faible teneur ;
- les chlorophylles c ( $c_1, c_2$ ) présentes chez les algues brunes ;
- la chlorophylle d présente chez certaines cyanobactéries ;
- la chlorophylle f présente chez certains stromatolites (roches calcaires).



**Figure 3** - Structure de la chlorophylle a, de la chlorophylle b et du β-carotène.

La chlorophylle a est la forme la plus courante alors que les formes c à f sont beaucoup moins répandues. Dans les épinards, on trouve à la fois la chlorophylle a et la chlorophylle b. On ne s'intéressera donc dans la suite qu'à ces deux chlorophylles.

Un autre pigment est présent chez les végétaux : le β-carotène (cf. figure 3). Celui-ci est un antioxydant. Il absorbe l'excès d'énergie de la chlorophylle lors de la photosynthèse et évite ainsi la formation de ROS (*Reactive oxygen species* ou espèces réactives oxygénées) tels que l'ion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ), l'oxygène singulet ou l'ion hydroxyle  $HO^{\cdot}$ .

*Remarque* : D'autres pigments colorés sont présents au sein des feuilles d'épinards : les xanthophylles. On trouve plus particulièrement la violaxanthine et la néoxanthine qui sont de couleurs jaunes. Nous n'en tiendrons pas compte lors de cette étude.

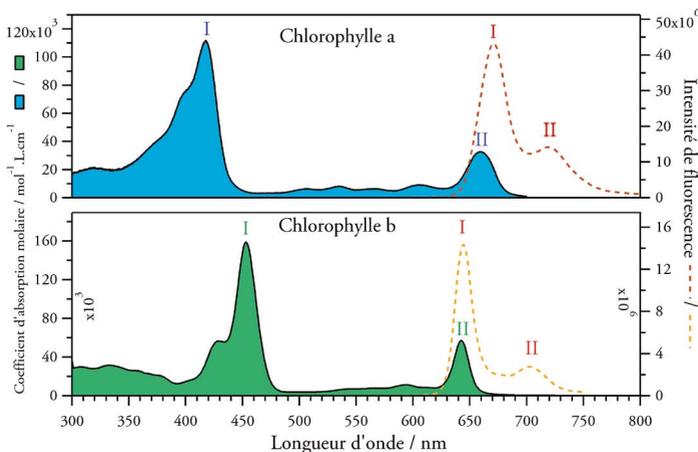
### 2.1.2. Propriétés photophysiques des chlorophylles a et b

#### ◆ Absorption

Les pigments de chlorophylle sont responsables de la couleur verte prise par la plupart des végétaux. En effet, celle-ci absorbe dans le domaine UV-Visible avec la présence de plusieurs bandes d'absorption (cf. figure 4, page ci-après) :

- La bande située autour de 400 nm (bande I, figure 4, page ci-après) est appelée « bande de Soret ». Cette bande possède un maximum à 417 nm dans le méthanol pour la chlorophylle a et à 453 nm dans le diéthyléther pour la chlorophylle b.

- Les bandes situées entre 500 et 700 nm sont quant à elles appelées « bandes Q ». Celle de plus grande intensité (bande II, figure 4) possède un maximum à 660 nm dans le méthanol pour la chlorophylle a et à 642 nm dans le diéthyléther pour la chlorophylle b. En conséquence la **chlorophylle a** est de couleur **verte-bleue** alors que la **chlorophylle b** est plutôt de **couleur jaune-verte**.



**Figure 4** - Spectre d'absorption et de fluorescence de la chlorophylle a dans le méthanol ( $\lambda_{exc} = 417$  nm) et de la chlorophylle b dans le diéthyléther ( $\lambda_{exc} = 435$  nm) [5].

Toutes ces bandes résultent d'une transition entre une orbitale à caractère  $\pi$  et une orbitale à caractère  $\pi^*$  (transition  $\pi \rightarrow \pi^*$ ). Néanmoins, pour la bande de Soret, il s'agit d'une transition entre un état excité  $S_2$  et l'état fondamental  $S_0$  alors que pour les bandes Q, l'état excité est  $S_1$ <sup>(3)</sup>.

#### ◆ Fluorescence

On observe dans les deux cas un spectre de fluorescence présentant deux bandes d'émission. Celle d'intensité la plus élevée possède un maximum à 670 nm dans le méthanol pour la chlorophylle a et à 644 nm dans le diéthyléther pour la chlorophylle b. Le déplacement de Stokes est donc plus élevé dans le cas de la chlorophylle a (253 nm,  $9055 \text{ cm}^{-1}$ ) que de la chlorophylle b (191 nm,  $6547 \text{ cm}^{-1}$ ). Par ailleurs, les rendements quantiques de fluorescence sont respectivement évalués à 0,32 et 0,12 pour la chlorophylle a dans le méthanol et la chlorophylle b dans le diéthyléther.

L'ensemble des données photophysiques pour les deux chlorophylles sont reportées dans le tableau 1 (cf. page ci-contre).

(3) La chlorophylle est réfléchissante dans le proche infrarouge (700 nm) ce qui permet d'effectuer des clichés aériens ou satellitaires et de reconnaître les essences par analyse radiométrique.

|   | Chlorophylle a<br>dans méthanol | Chlorophylle b<br>dans diéthyléther |
|---|---------------------------------|-------------------------------------|
| $\lambda_{\max}$ (bande I, abs) / nm            | 417                             | 453                                 |
| $\lambda_{\max}$ (bande II, abs) / nm           | 660                             | 642                                 |
| $\lambda_{\max}$ (bande I, fluo) / nm           | 670                             | 644                                 |
| Déplacement de Stokes / nm ( $\text{cm}^{-1}$ ) | 253 (9055)                      | 191 (6547)                          |
| $\phi_f$  | 0,32                            | 0,12                                |

**Tableau 1** - Récapitulatif des propriétés photophysiques des chlorophylles a et b [5].

## 2.2. Avantages de l'utilisation de la fluorescence

La spectroscopie de fluorescence constitue une méthode de choix, car celle-ci possède plusieurs avantages :

- ◆ Une très bonne sensibilité de détection en comparaison de la spectroscopie d'absorption (UV-Visible ou Infrarouge) ou de la RMN (Résonance magnétique nucléaire) par exemple. En conséquence, de très faibles quantités de l'espèce à étudier peuvent être détectées par spectrofluorimétrie. Dans le cas du spectrofluorimètre Cary Eclipse (Varian) utilisé pour cette étude, la limite de détection est estimée à  $10^{-12} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  par le constructeur (contre  $10^{-6}$ - $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  par spectroscopie UV-Visible par exemple). Ce point se révélera ici très important afin de détecter des traces de chlorophylle dans un mélange chlorophylle /  $\beta$ -carotène (cf. sous-paragraphe 3.3.3.). On pourra alors vérifier la bonne séparation des pigments.
- ◆ Une forte sélectivité. En effet, les propriétés de fluorescence (forme du spectre, maximum d'émission, rendement quantique de fluorescence notamment) sont propres à chaque molécule fluorescente. La connaissance *a priori* de ces informations sur une molécule (dans les conditions expérimentales de l'expérience) peut permettre d'identifier la présence sans équivoque de celle-ci dans un milieu. Une comparaison des données de la littérature permettra de distinguer deux molécules fluorescentes dans un même milieu.
- ◆ Une dépendance vis-à-vis de l'environnement entourant la molécule fluorescente. Cette caractéristique s'avère importante pour l'utilisation de la fluorescence comme sonde de pH (fluorescéine, éosine Y...) [1-4], polarité (ANS, coumarine...) [1-4] ou dans la détermination de la concentration micellaire critique (CMC) d'un tensioactif [6-7]. Dans cet article, cette propriété permettra d'expliquer les variations de propriétés de fluorescence observées entre les données de la littérature (cf. sous-paragraphe 2.1.2.) et l'expérience (cf. sous-paragraphe 3.2.). En effet, dans notre expérience, le milieu réactionnel est constitué de plusieurs espèces organiques et non du seul solvant.

- ◆ La relation linéaire entre la concentration et l'intensité de fluorescence (équation (3), sous-paragraphe 1.1.2.) peut être mise à profit pour le dosage d'espèce fluorescente comme nous l'avons montré dans un article précédent [8].

### 2.3. Conditions d'acquisition

On choisit des paramètres d'acquisition (taille des fentes, temps d'intégration) pour que l'intensité de fluorescence ( $I_f$ ) du maximum d'émission soit la plus élevée possible tout en restant inférieure au seuil de saturation (propre à chaque spectrofluorimètre). Dans le cas du Cary Eclipse, celui-ci est de mille coups par seconde (cps) qui représente le nombre de photons détectés par seconde.

Les paramètres d'acquisition utilisés dans cette étude sont les suivants :

- ◆ Pour les spectres d'émission et d'excitation :
  - fente d'excitation : 5 nm ;
  - fente d'émission : 5 nm ;
  - temps d'intégration : 0,1 s ;
  - incrément longueur d'onde d'émission : 1 nm ;
  - vitesse d'acquisition : 600 nm/min.
- ◆ Pour les spectres d'émission :
  - longueur d'onde d'excitation ( $\lambda_{exc}$ ) :  $\lambda_{max}$  d'absorption de la bande considérée ;
  - longueur d'onde d'émission ( $\lambda_{em}$ ) : 550-800 nm.
- ◆ Pour les spectres d'excitation :
  - longueur d'onde d'excitation ( $\lambda_{exc}$ ) : 400-700 nm ;
  - longueur d'onde d'émission ( $\lambda_{em}$ ) :  $\lambda_{max}$  de fluorescence de la bande considérée.

### 2.4. Produits et matériel

#### 2.4.1. Produits

Épinards frais ou surgelés ◆ Éthanol absolu ◆ Éther diéthylique ◆ Dichlorométhane.

#### 2.4.2. Matériel

Un spectrofluorimètre + cuves à quatre faces dépolis en verre ou quartz + support de cuves ◆ Évaporateur rotatif ◆ Colonne chromatographique ◆ Trois béchers de 50 mL ◆ Un erlenmeyer de 50 mL ◆ Un bécher de 100 mL ◆ Spatule ◆ Entonnoir en verre + laine ◆ Papier aluminium ◆ Pipette pasteur.

### 2.5. Mode opératoire [9]

Peser 10 g d'épinards hachés dans un bécher de 50 mL. Ajouter 12 mL d'éthanol

absolu. Agiter vigoureusement le milieu à l'aide d'une spatule jusqu'à ce que le mélange ne soit plus collant. Essorer la pâte à travers un entonnoir en verre, muni de laine, dans un bécher de 50 mL. Essorer la laine et la conserver avec la pulpe. Jeter l'éthanol extrait, qui contient de l'eau ainsi que certains sels solubles dans l'eau. Ajouter 10 mL de dichlorométhane à la pulpe et agiter pendant deux minutes. Filtrer sur un entonnoir muni d'un morceau de laine et recueillir le liquide dans un bécher de 50 mL. Évaporer le dichlorométhane à l'évaporateur rotatif sous vide :

- ◆ Conserver avec un papier d'aluminium et boucher si l'on n'effectue pas tout de suite la chromatographie (les pigments sont sensibles à la lumière<sup>(4)</sup>).
- ◆ Si l'on prévoit de continuer tout de suite la manipulation, redissoudre les pigments dans un minimum d'éluant (mélange éther de pétrole : éther diéthylique 9:1).

Effectuer la séparation des pigments d'épinards ( $\beta$ -carotène et chlorophylle) sur une colonne chromatographique de silice en choisissant comme éluant un mélange éther de pétrole : éther diéthylique (9:1). La polarité relativement faible de l'éluant entraîne une migration rapide du  $\beta$ -carotène (anneau jaune) vers le bas de la colonne alors que les pigments de chlorophylle (anneau vert) restent en haut de la colonne (cf. figures 5A et 5B). Lorsque que tout le  $\beta$ -carotène a été récupéré (fraction I) (cf. figure 5C), la polarité de l'éluant est augmentée afin de faire migrer les pigments de chlorophylle. On choisit alors comme éluant le mélange éther de pétrole : éther diéthylique (1:1). Les pigments verts sont alors récupérés en bas de colonne (fraction II).

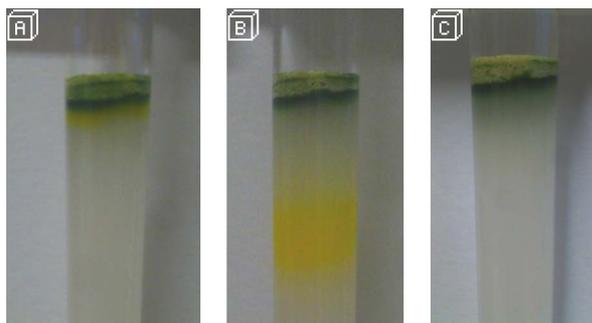
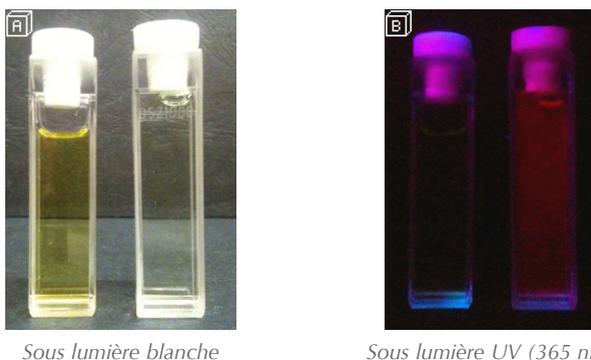


Figure 5 - Images de la colonne chromatographique.

Les fractions I et II sont alors analysées par spectrophotométrie UV-Visible et spectrofluorimétrie. Pour cette dernière, les paramètres utilisés sont ceux détaillés au sous-paragraphe 2.2.3. Une étude rapide sous lampe UV (365 nm) permet de mettre

(4) Dans la nature, la chlorophylle est située dans les chloroplastes et peut donc jouer son rôle d'absorbeur de lumière sans se dégrader. En revanche, lorsque la chlorophylle est extraite, celle-ci se trouve dépourvue de son environnement naturel et peut donc être affectée par la lumière.

en évidence une absence de fluorescence pour la fraction I et une fluorescence rouge pour la fraction II (cf. figure 6). Ces observations sont discutées dans la suite de cet article.

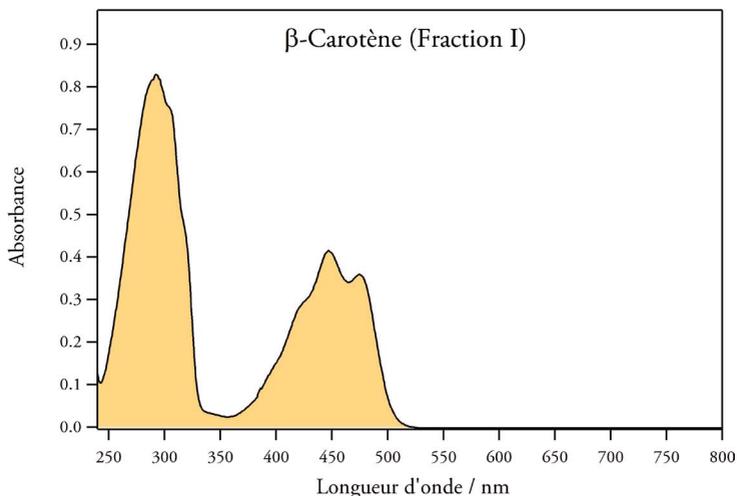


**Figure 6** - Image de cuves des fractions I ( $\beta$ -carotène) et II (chlorophylle).

### 3. RÉSULTATS

#### 3.1. Analyse de la fraction de $\beta$ -carotène (fraction I)

Le spectre d'absorption de la fraction I est donné en figure 7. Celui-ci se révèle être caractéristique du  $\beta$ -carotène [5]. Par ailleurs, aucune fluorescence n'a pu être détectée en excitant la molécule à  $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$ . Ceci est en accord avec la littérature qui mentionne un rendement quantique  $\phi_f < 0,0001$  dans l'hexane [5]. Il apparaît



**Figure 7** - Spectre d'absorption du  $\beta$ -carotène (fraction I).

donc que la fraction I est uniquement constituée de  $\beta$ -carotène. L'absence de fluorescence sous lumière UV et la couleur jaune très prononcée de la fraction I (cf. figure 6, page ci-contre) sont en accord avec les résultats photophysiques obtenus. La fraction I est uniquement constituée de  $\beta$ -carotène.

### 3.2. Analyse de la fraction de chlorophylle (fraction II)

Les spectres d'absorption, d'émissions corrigés et excitations non corrigées<sup>(5)</sup> effectués sur la fraction II sont reportés sur la figure 8 (cf. page ci-après).

#### 3.2.1. Spectre d'absorption

Le spectre d'absorption de la fraction II (cf. figure 8A, page ci-après) présente quatre bandes d'absorption notée I, II, III et IV. Ces bandes possèdent des maxima ( $\lambda_{\max}$ ) à 430 (I), 450 (II), 643 (III) et 666 (IV) nm respectivement.

#### 3.2.2. Spectres d'émission

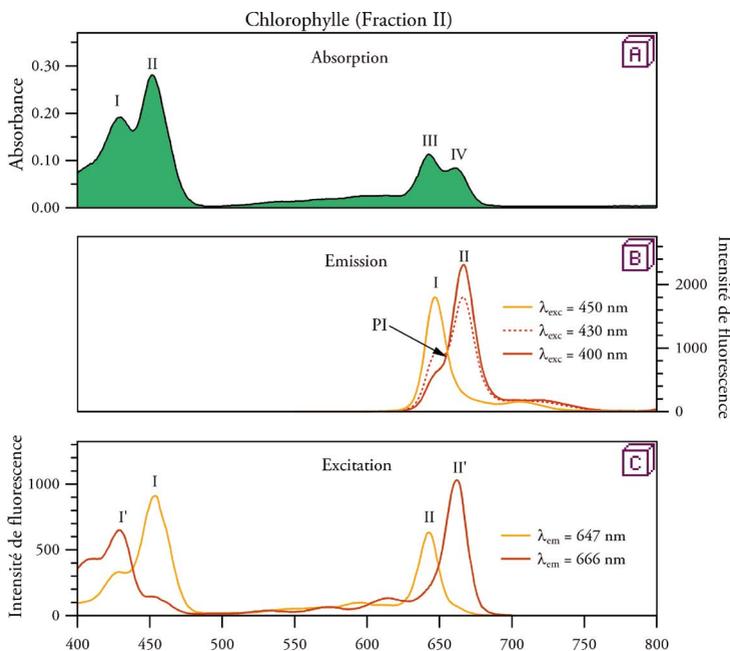
L'étude des spectres d'émission corrigés (cf. sous-paragraphe 1.3.) de la fraction II (cf. figure 8B, page ci-après) permet de mettre en évidence la présence de deux bandes de fluorescence (I et II). Selon la longueur d'onde d'excitation<sup>(6)</sup>, l'intensité relative de ces deux bandes diffère. En effet, pour  $\lambda_{\text{exc}} = 450$  nm, la bande I est uniquement présente alors que pour  $\lambda_{\text{exc}} = 400$  nm la bande II est très majoritaire et la bande I de très faible intensité. Par ailleurs, pour  $\lambda_{\text{exc}} = 430$  nm, les deux bandes sont présentes et d'intensité significative. On observe de plus un point isoémissif à 656 nm (point PI, cf. figure 8, page ci-après). Il est à noter que ce point n'est observable qu'après correction des spectres d'émission.

#### 3.2.3. Spectres d'excitation

L'étude des spectres d'excitation non corrigés de la fraction II (cf. figure 8, page ci-après) permet de mettre en évidence la présence de deux bandes pour chacune des  $\lambda_{\text{em}}$  choisies. Pour ces bandes seront notés I et II pour  $\lambda_{\text{em}} = 647$  nm et I' et II' pour  $\lambda_{\text{em}} = 666$  nm. Ces bandes possèdent des maxima ( $\lambda_{\max}$ ) respectifs à 453 (I), 631 (II), 429 (I') et 662 (II') nm.

(5) Les spectres d'excitation ne sont pas corrigés car le spectre d'absorption est ici le mélange de deux espèces (chlorophylle a et b) comme nous le verrons par la suite.

(6) Pour notre étude, seule l'excitation dans le domaine de longueur d'onde des bandes d'absorption I et II (400-450 nm) s'avère nécessaire.



**Figure 8** - **A**) spectre d'absorption de la fraction II - **B**) spectres d'émission pour différentes  $\lambda_{exc}$  : 400, 430 et 450 nm - **C**) spectres d'excitation pour  $\lambda_{em} = 647$  nm et 666 nm.

### 3.2.4. Conclusion

L'ensemble des résultats est reporté dans le tableau 2.

Comme nous l'avons vu précédemment (sous-paragraphe 2.1.2.), chacune des chlorophylles (a et b) possède deux bandes d'absorption bien distinctes et une bande d'émission. La présence de quatre bandes d'absorption (I à IV) et deux bandes d'émission (I et II) laisse donc penser que la fraction II est constituée d'un mélange de **chlorophylle a** et **chlorophylle b**.

La comparaison des  $\lambda_{max}$  d'absorption des bandes I à IV avec les valeurs théoriques (cf. tableau 1) permet d'attribuer en première approximation les **bandes I et IV d'absorption** à la **chlorophylle a** et les **bandes II et III d'absorption** à la **chlorophylle b** (cf. tableau 2, page ci-contre). Toutefois, le simple examen des spectres d'absorption ne s'avère pas suffisant notamment parce que l'éluant utilisé (éther de pétrole : éther diéthylique 1:1) est différent des solvants utilisés pour l'analyse spectroscopique théorique (sous-paragraphe 2.1.2.). Pour confirmer l'attribution de ces bandes d'absorption, il est donc nécessaire de s'appuyer sur les spectres d'émission et d'excitation.

| Type de spectres                          | Bande considérée | $\lambda_{\max}$ / nm | Type de chlorophylle |
|---|------------------|-----------------------|----------------------|
| Absorption                                | I                | 430                   | a                    |
|   | II               | 450                   | b                    |
|   | III              | 643                   | b                    |
|   | V                | 661                   | a                    |
| Émission                                  | I                | 647                   | b                    |
|   | II               | 666                   | a                    |
| Excitation $\lambda_{\text{em}} = 647$ nm | I                | 453                   | b                    |
|   | II               | 631                   | b                    |
| Excitation $\lambda_{\text{em}} = 666$ nm | I'               | 429                   | a                    |
|   | II'              | 662                   | a                    |

**Tableau 2** - Récapitulatif des résultats obtenus sur la fraction II et attribution des bandes à chacune des chlorophylles (a ou b).

Le spectre d'émission issu de l'excitation au maximum de la bande I ( $\lambda_{\text{exc}} = 400$  nm) est constitué majoritairement de la bande II de fluorescence. Au contraire, le spectre d'émission issue de l'excitation au maximum de la bande II ( $\lambda_{\text{exc}} = 450$  nm) est quant à lui constitué majoritairement (voire exclusivement) de la bande I de fluorescence. Ces observations suggèrent donc que la bande I conduit à la bande d'émission II ( $\lambda_{\text{max}} = 666$  nm) et la bande II à la bande d'émission I ( $\lambda_{\text{max}} = 647$  nm).

Afin de vérifier cette hypothèse, une étude des spectres d'excitation s'avère alors particulièrement intéressante. En effet, on observe que les spectres d'excitation sont constitués chacun de deux bandes de  $\lambda_{\text{max}}$  bien distincts. De plus, si l'on ne s'intéresse qu'au domaine de longueur d'onde compris entre 400 et 470 nm, on observe qu'une seule bande à 453 nm (respectivement 429 nm) contribue à la bande d'émission I (respectivement II).

La comparaison des valeurs des  $\lambda_{\text{max}}$  :

- ◆ des spectres d'excitation et d'absorption (cf. tableau 2, page ci-contre) permettent de montrer que la bande I (respectivement II) d'absorption contribue bien à la bande II d'émission (respectivement I) ;
- ◆ des spectres d'excitation et des spectres d'absorption théoriques (cf. tableau 1) permet de montrer que les bandes I et II d'excitation sont attribuables à la chlorophylle b et les bandes I et II d'excitation à la chlorophylle a ;
- ◆ des spectres d'émission et ses spectres d'émission théoriques (cf. tableau 1) permet de montrer que la bande I d'émission est attribuable à la chlorophylle b et la bande II d'émission à la chlorophylle a.

Tous ces résultats mettent donc en évidence la présence d'un mélange de chlorophylles ce qui est par ailleurs confirmé par la présence d'un point iso-émissif pour les spectres d'émission (cf. figure 8B, page précédente). La fluorescence « rouge » observée sous lumière UV (cf. figure 6) est en accord avec les résultats photophysiques obtenus et attribuable principalement à la chlorophylle a.

### 3.3. Rendement quantique

Afin de compléter l'analyse précédente, la détermination des rendements quantiques de fluorescence ( $\phi_f$ ) peut être entreprise en utilisant l'équation (4). Pour les chlorophylles, la tétraphénylporphyrine (notée TPP) est choisie comme référence. Son rendement quantique de fluorescence est de 0,11 dans le toluène [5].

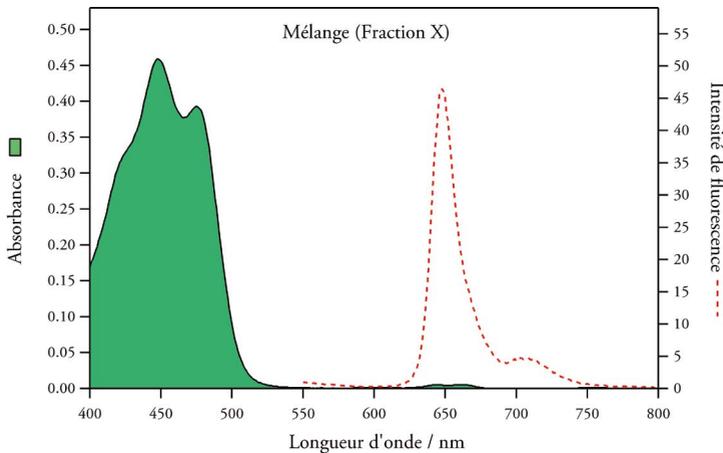
Pour la chlorophylle a (respectivement chlorophylle b), l'émission à  $\lambda_{exc} = 400 \text{ nm}$  (respectivement  $\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$ ) est utilisée pour limiter au maximum l'influence de la chlorophylle a (respectivement b). Le calcul de l'aire sous le spectre d'émission peut être réalisé au moyen du logiciel Regressi. L'indice de réfraction du toluène est de 1,4941 et celui de l'éluant de 1,3495. On trouve alors  $\phi_f = 0,24$  pour la chlorophylle a et  $\phi_f = 0,16$  pour la chlorophylle b. Ces valeurs sont cohérentes avec celles issues de la littérature (cf. tableau 1). Les différences observées sont dues à la présence d'un mélange de chlorophylles. Le rendement quantique attribuable à la chlorophylle a (respectivement chlorophylle b) est sous-évalué (respectivement surévalué).

### 3.4. Analyse d'un mélange chlorophylle : $\beta$ -carotène (fraction X)

Les spectres d'absorption et d'émission ( $\lambda_{exc} = 450 \text{ nm}$ ) d'un mélange chlorophylle :  $\beta$ -carotène (1:100) sont donnés en figure 9 (page ci-contre). On observe alors que le spectre d'absorption est majoritairement celui du  $\beta$ -carotène. La mise en évidence de la présence de chlorophylle au sein de l'échantillon par la seule prise en compte du spectre d'absorption UV-Visible apparaît donc difficile. Seule une très faible absorption autour de 650 nm peut être notée, mais cela ne s'avère pas suffisamment significatif.

Nous avons vu précédemment (sous-paragraphes 3.1. et 3.2.) que le  $\beta$ -carotène ne possède pas de propriétés de fluorescence au contraire des pigments de chlorophylle. En conséquence, l'absence de fluorescence se révèle être un bon indicateur de la présence exclusive de  $\beta$ -carotène dans la fraction analysée.

On observe alors que la fraction X fait état d'une émission de fluorescence même si celle-ci s'avère très faible ( $< 50$  coups). En conséquence, la présence même infime de chlorophylle peut être détectée au sein d'une fraction issue de la colonne chromatographique par spectrofluorimétrie. La grande sensibilité de détection de la fluorescence peut donc être mise à profit pour suivre ou vérifier la composition des fractions récupérées lors d'une colonne chromatographique.



**Figure 9** - Spectre d'absorption et d'émission à  $\lambda_{\text{exc}} = 450 \text{ nm}$  pour la fraction X (mélange chlorophylle :  $\beta$ -carotène (1:100)).

## CONCLUSION

Dans cet article, nous avons montré que la fluorescence peut être utilisée à bon escient afin de compléter une étude par spectroscopie UV-Visible en étudiant la séparation des pigments d'épinards par chromatographie sur colonne. Après une définition du processus de fluorescence et une description des différentes caractéristiques (spectre d'émission, d'excitation, rendement quantique) de ce phénomène, l'étude photophysique de différentes fractions issues de la colonne est effectuée. Il est alors démontré d'une part que la fluorescence peut permettre de différencier sans ambiguïté différentes espèces présentes dans un mélange (ici les chlorophylles a et b) et d'autre part détecter la présence même infime de chlorophylle dans un échantillon. La fluorescence peut donc être utilisée pour suivre ou vérifier la composition des fractions issues d'une colonne chromatographique et pour évaluer la bonne séparation des pigments.

## REMERCIEMENTS

Nous voudrions remercier Rémi Métivier, Cécile Dumas-Verdes et Joanne Xie pour leur aide à la rédaction de cet article.

## BIBLIOGRAPHIE ET NETOGRAPHIE

- [1] B.Valeur, *Invitation à la fluorescence moléculaire*, Bruxelles : De Boeck, 2004.

- [2] B.Valeur, *Lumière et luminescence - Ces phénomènes lumineux qui nous entourent*, Paris : Belin – Pour la Science, 2005.
- [3] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy third*, New York: Springer-Verlag, 2006.
- [4] B.Valeur, *Molecular Fluorescence - Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2002.
- [5] Oregon Medical Laser Center, mars 2012 [consulté en janvier 2013]. Disponible en accès: <http://omlc.ogi.edu/spectra/PhotochemCAD/index.html>  
Un nombre important d'informations sur les caractéristiques photophysiques (spectre d'absorption, d'émission, coefficient d'absorption molaire et rendement quantique) sont disponibles en libre accès sur ce site.
- [6] A. Domínguez, A. Fernández, N. González, E. Iglesias and L. Montenegro, "Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques", *Journal of Chemical Education*, 74, pp. 1227-1231, 1997.
- [7] A. Escalle-Lewis et J. Piard, « Détermination de la concentration micellaire critique par spectrofluorimétrie », *Bull. Un. Prof. Phys. Chim.*, vol. 107, n° 959, pp. 1181-1197, décembre 2013.
- [8] A. Escalle-Lewis et J. Piard, « Dosage spectrofluorimétrique de la quinine dans le Schweppes® », *Bull. Un. Prof. Phys. Chim.*, vol. 106, n° 944, pp. 599-610, mai 2012.
- [9] F. Daumarie, « Séparation des pigments des épinards sur colonne d'alumine », *Flo-rilège de chimie pratique*, pp. 159-163, 1999.

**Laura NODIN**

*Agrégée préparatrice (AgPr)*  
Département de chimie  
École normale supérieure (ENS)  
Cachan (Val-de-Marne)

**Rachel MEALLET-RENAULT**

*Maître de conférences*  
Département de chimie  
École normale supérieure (ENS)  
Cachan (Val-de-Marne)

**Jonathan PIARD**

*Professeur agrégé (PrAg)*  
Département de chimie  
École normale supérieure (ENS)  
Cachan (Val-de-Marne)