Construction d'un spectrofluorimètre corrigé en analyse et en excitation

G. Normandin, P. Donnat, R. Journeaux

► To cite this version:

G. Normandin, P. Donnat, R. Journeaux. Construction d'un spectrofluorimètre corrigé en analyse et en excitation. *Revue de Physique Appliquée*, 1971, 6 (2), pp.147-153. 10.1051/rphysap:0197100602014700 . jpa-00243515

HAL Id: jpa-00243515

<https://hal.science/jpa-00243515>

Submitted on 1 Jan 1971

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.

CONSTRUCTION D'UN SPECTROFLUORIMÈTRE CORRIGÉ EN ANALYSE ET EN EXCITATION

par G. NORMANDIN, P. DONNAT et R. JOURNEAUX

Laboratoire de Physico-Chimie des Pigments Végétaux et des Substances Modèles
Ecole Normale Supérieure de Saint-Cloud, 92, Saint-Cloud

(Reçu le 7 janvier 1971)

Résumé. — Nous avons construit un spectrofluorimètre réalisant une correction automatique au niveau de l'excitation et de l'analyse.

L'énergie de la lumière d'excitation est maintenue constante au niveau de la cellule de fluorescence par l'utilisation d'une thermopile. Les variations de la fonction d'appareil du système d'analyse sont compensées au niveau de l'enregistrement du signal de fluorescence.

Abstract. — A spectrofluorimeter has been achieved which performs automatic corrections relatively to excitation and analysis. The excitation light falling on the fluorescence cell has an energy kept constant with a thermopile. The variations of the sensibility of analysis apparatus are compensated when recording fluorescence signal.

En Chimie et en Biologie, l'étude de la fluorescence présente un intérêt comparable aux techniques d'absorption. Mais alors que ces dernières ont conduit à l'élaboration d'appareils commerciaux permettant des mesures absolues, la plupart des fluorimètres ne possèdent aucun système de correction et ne sont utilisables que pour des expériences comparatives. Nous avons construit un appareil permettant d'effectuer automatiquement les corrections dues aux fonctions d'appareil et aux fluctuations dans le temps de la source lumineuse. D'autre part, nous avons choisi certaines composantes de façon à obtenir une sensibilité suffisante en analyse entre 6 000 et 8 000 Å, région de fluorescence des chlorophylles et de nombreux appareils photosynthétiques.

I. Etude théorique. — 1. CORRECTIONS NÉCESSAIRES EN FLUORESCENCE. — La réponse d'un fluorimètre $\rho(\nu_F)$ est le produit de deux termes ρ_1 et ρ_2 , le premier caractérisant l'excitation, le deuxième la détection de la lumière de fluorescence [1].

Ces deux termes ont comme valeur :

$$\rho_1 = \Phi(\nu_E) \cdot e^{-\varepsilon_E c a} (1 - e^{-\varepsilon_E c b})$$

$$\rho_2 = h \cdot Q(\nu_F) \cdot \nu_F \cdot T(\nu_F) \cdot R$$

$\Phi(\nu_E)$ = flux lumineux photonique arrivant sur la cuve à fluorescence de fréquence ν_E (longueur d'onde λ_E).

ε_E = coefficient d'absorption molaire de la solution pour la longueur d'onde d'excitation λ_E .

c = concentration de la substance fluorescente (on considère que la seule substance qui fluoresce est celle

qui absorbe). a et b sont les côtés délimitant les parties du faisceau (Fig. 1).

FIG. 1. — Géométrie des faisceaux lumineux dans la cuve à fluorescence.

h = facteur géométrique tenant compte du fait qu'une partie seulement de la lumière émise est analysée. Pour un appareil donné, si on néglige les aberrations chromatiques, h ne dépend que de l'ouverture des fentes du monochromateur d'analyse.

$Q(\nu_F)$ = rendement quantique de fluorescence pour la fréquence d'analyse ν_F (longueur d'onde λ_F) et pour la fréquence d'excitation ν_E .

$T(\nu_F)$ = facteur de transmission énergétique de l'ensemble d'analyse.

C'est le courant anodique du photomultiplicateur d'analyse pour un flux analysé unité.

R = résistance de charge du photomultiplicateur.

Dans cette expression on a négligé tout phénomène de réabsorption de la lumière émise.

On constate que la fonction $Q(v_F)$ qui caractérise la substance en solution n'est pas proportionnelle, quelles que soient les conditions, à la fonction expérimentale $\rho(v_F)$. Deux corrections sont donc à prévoir correspondant à chaque terme.

2. CORRECTION EN EXCITATION. — Pour une solution donnée, la correction due au terme $e^{-\varepsilon_{EC}a}(1 - e^{-\varepsilon_{EC}b})$ peut se faire par le calcul dans le cas d'un spectre d'action. Nous ne discuterons donc que le rôle de $\Phi(v_E)$. Cette quantité varie dans le temps et en fonction de v_E par suite respectivement des fluctuations de la source, de sa répartition spectrale et du pouvoir de transmission du monochromateur d'excitation. On peut maintenir constant le flux énergétique $\Phi(v_E) \cdot v_E$ par un système d'asservissement soit en agissant sur la source [2], [3] soit sur les fentes du monochromateur [4]. Une autre solution consiste à déterminer $\Phi(v_E)$ par un compteur quantique et à faire le quotient de deux tensions [5], [6], [7]. Nous avons retenu le système d'asservissement, la variation de $\Phi(v_E) \cdot v_E$ étant compensée par la variation d'absorption d'un dégradé angulaire placé à la sortie du monochromateur d'excitation.

3. CORRECTION EN ANALYSE. — Le facteur de transmission $T(v_F)$ est une fonction de la longueur d'onde d'analyse λ_F . Il est le produit de la transmission du monochromateur d'analyse $\tau(v_F)$ et du gain du photomultiplicateur $I(v_F)$, $I(v_F)$ étant le courant anodique pour un flux énergétique unité arrivant sur la photocathode. Si $\Phi_F(v_F)$ est le flux énergétique de la lumière de fluorescence entrant dans le monochromateur d'analyse, l'intensité du courant anodique vaut

$$\Phi_F(v_F) \cdot \tau(v_F) \cdot I(v_F).$$

En général, on enregistre la chute de tension aux bornes d'une résistance de charge R donc

$$\rho(v_F) = R \cdot \Phi_F(v_F) \cdot \tau(v_F) \cdot I(v_F).$$

Seul le produit $\tau(v_F) \cdot I(v_F) = T(v_F)$ est en général déterminé expérimentalement et fait l'objet de la correction soit par le calcul, soit par un moyen électronique automatique [5], [6], [8].

La méthode que nous avons choisie consiste à compenser les variations de $T(v_F)$ par une résistance de charge R variable.

II. Réalisation expérimentale. — 1. SCHÉMA DU FLUORIMÈTRE (Fig. 2). — La lumière excitatrice est fournie par un ensemble comprenant :

— Une source lumineuse (lampe quartz-iode Sylvania FAD 650 W, température de couleur 3 400 °K, ou lampe à Xénon XBF OSRAM).

Les deux lampes sont alimentées en continu.

— Un monochromateur à réseau du type Hebert Fastié, focale 480 mm, équipé d'un réseau Bausch et

Lomb de 52×52 mm, comportant 600 traits par mm et blazé à 5 000 Å.

La lumière de fluorescence est analysée par un ensemble comprenant :

— Un monochromateur type Barr et Stroud, en montage Czerny Turner, dont la première moitié seulement a été utilisée. Il est équipé d'un réseau Jobin Yvon de 56×56 mm, comportant 1 200 traits par mm et blazé à 5 000 Å.

FIG. 2. — Schéma général du spectrofluorimètre.

— Un photomultiplicateur EMI 9558 B ayant une réponse spectrale du type S 20. Le courant du photomultiplicateur est enregistré par l'intermédiaire de la tension apparaissant aux bornes d'une résistance de charge.

Les longueurs d'onde d'analyse et d'excitation d'une part, le papier de l'enregistreur d'autre part, sont entraînés linéairement en fonction du temps par des moteurs synchrones ; les enregistrements sont donc directement gradués en longueur d'onde.

Le compartiment cuve a été étudié de façon à permettre une grande variété d'utilisation (Fig. 3). Son centre est conjugué à la fois à la fente de sortie du monochromateur d'excitation et de la fente d'entrée du monochromateur d'analyse par deux condenseurs en quartz. Un jeu de miroirs permet l'observation classique à 90°, par transmission, par réflexion oblique ou normale avec des cuves à fluorescence carrées (10×10 mm). Le dernier mode a été aussi utilisé pour

des solutions très absorbantes avec une cuve à épaisseur variable (cuve Mimosi de Jobin Yvon). Enfin des enregistrements à basse température sont possibles grâce à un vase spécial (accessoire Bayonne de Jobin Yvon).

FIG. 3. — Utilisations du compartiment cuve : a) observation à 90° (avec miroir M_1 et M_2) ou par transmission (avec miroir M_3); b) observation par réflexion oblique; c) observation par réflexion normale (L = lame semi-transparente).

2. CORRECTION D'EXCITATION. — Elle consiste à contrôler le flux énergétique arrivant sur la cuve à fluorescence par un système d'asservissement (Fig. 4).

L'organe de contrôle est constitué par un disque dégradé angulaire placé à la sortie du monochromateur d'excitation, il peut être entraîné par un moteur à double sens de rotation; on obtient ainsi une absorption variable.

L'organe de commande est constitué par une thermopile recevant une fraction constante du flux arrivant

sur la cuve à fluorescence. Cette division est réalisée grâce à trois lames semi-transparentes identiques; les deux faisceaux utilisés ont donc des énergies égales quelles que soient les variations des propriétés des lames.

FIG. 4. — Contrôle du flux d'excitation : A : amplificateur d'asservissement; M : moteur d'entraînement du dégradé angulaire DA; th : thermopile.

Le courant de la thermopile est détecté grâce à un galvanomètre dont le spot est focalisé sur une cellule photorésistante différentielle utilisée dans certains suiveurs de spots (Fig. 5). Elle est constituée par deux résistances R_{p1} et R_{p2} variables avec l'éclairement

FIG. 5. — Cellule photorésistante différentielle : R_{p1} : résistance entre A_1 et B; R_{p2} : résistance entre A_2 et B.

qu'elles reçoivent. Ces deux résistances sont placées dans un pont de Wheatstone dont la tension de déséquilibre commande, par l'intermédiaire d'un amplificateur d'asservissement classique, le moteur couplé au disque dégradé (Fig. 6). Le sens de rotation du moteur dépend du sens du déséquilibre du pont, donc de la variation du rapport R_{p1}/R_{p2} , donc de la place du spot sur la cellule.

Le pont est équilibré, donc le disque est immobile, quand $R_{p1} = R_{p2}$, c'est-à-dire quand le spot du galvanomètre éclaire symétriquement la cellule photorésistante; c'est la position de repos. La cellule photorésistante étant fixe, toute variation du flux lumineux sortant du monochromateur d'excitation va provoquer un déplacement du spot du galvanomètre, donc va faire varier le rapport R_{p1}/R_{p2} ; cela va entraîner la rotation du disque dégradé dans un sens tel que la variation d'absorption compense la variation initiale du flux. Le réducteur de vitesse adapté au moteur a été choisi de façon à obtenir une réponse suffisamment rapide, tout en évitant les oscillations. Il faut également éviter les variations trop rapides de flux; en effet, si le spot quitte la cellule photorésistante, la stabilisation n'existe plus.

faudrait pour améliorer le taux d'ondulation, soit diminuer la vitesse d'exploration, soit diminuer la constante de temps du système d'asservissement. Cette dernière est relativement importante (de l'ordre de 20 s) due presque exclusivement au galvanomètre utilisé en régime amorti à cause de la faible résistance de la thermopile.

Avec la lampe quartziode, les fluctuations sont réduites à 17 % pour l'ensemble du spectre (de 3 000

à 8 000 Å). On peut constater d'autre part des zones (6 000-7 500 Å par exemple) où les fluctuations sont réduites à quelques pour cent. Ce domaine est particulièrement intéressant puisqu'il correspond à une zone d'absorption de la chlorophylle.

FIG. 9. — Spectres de la lumière d'excitation pour la lampe quartziode.

à 8 000 Å) et de 12 % de 4 200 à 8 000 Å. On peut constater d'autre part des zones (6 000-7 500 Å par exemple) où les fluctuations sont réduites à quelques pour cent. Ce domaine est particulièrement intéressant puisqu'il correspond à une zone d'absorption de la chlorophylle.

Dans les deux cas, on peut constater qu'une grande partie de l'énergie lumineuse est perdue, la régulation étant effectuée autour de l'énergie minimum dans le domaine considéré. Ici encore la lampe quartziode est préférable à l'arc au Xénon pour le visible.

2. CORRECTION EN ANALYSE. — La figure 10 représente la sensibilité énergétique du système d'analyse et la courbe inverse qui est réalisée dans la correction. On peut constater que dans la partie 6 000-8 000 Å la sensibilité varie très rapidement ; ceci est dû au fait que le réseau (blazé à 5 000 Å) et le photomultiplicateur sont dans une région d'efficacité décroissante. Ceci pourrait être amélioré soit en prenant un réseau blazé à une longueur d'onde supérieure, soit en utilisant un photomultiplicateur ayant une réponse du type S 1 (7102 RCA par exemple). Cette dernière solution présente un inconvénient car ce photomultiplicateur, outre un bruit de fond et un courant d'obscurité importants qui néces-

FIG. 10. — Courbes de sensibilité du système d'analyse et de correction.

3. APPLICATION A LA CHLOROPHYLLE. — Nous avons testé notre spectrofluorimètre avec une solution de chlorophylle a (benzène, concentration 5×10^{-6} mole/litre).

Spectre d'émission. — Les figures 11 et 12 représentent le spectre d'émission de la chlorophylle sans

FIG. 11. — Spectre d'émission d'une solution de chlorophylle a corrigé par l'instrument.

correction, avec correction, par le calcul, et avec correction automatique. On constate que l'épaule à 7 250, image de l'épaule en absorption à 6 160 (loi de Stokes) est bien présent dans le spectre corrigé [9].

FIG. 12. — Spectres d'émission d'une solution de chlorophylle a sans correction et corrigé par le calcul.

Spectre d'action. — La figure 13 montre les spectres d'action avec et sans le système de stabilisation en excitation. On peut constater une différence très importante entre les deux enregistrements ; mais il est difficile de faire une comparaison simple avec le spectre d'absorp-

FIG. 13. — Spectres d'action pour une solution de chlorophylle a avec et sans correction.

tion à cause de l'effet de filtre interne d'une part, et d'autre part, du fait que le rendement de fluorescence est un rendement quantique, alors que la stabilisation est faite en énergie.

4. SENSIBILITÉ. — Bien que non adapté pour le travail dans le proche ultra-violet en excitation, nous avons fait un test de sensibilité avec le sulfate de quinine en solution sulfurique. Les conditions étaient les suivantes :

- tension du photomultiplicateur 1 600 V ;
- alimentation de la lampe 110 V ;
- largeur des fentes en excitation : 2 mm (largeur de bande 50 Å) ;
- largeur des fentes en analyse : 1,5 mm (largeur de bande 30 Å) ;
- résistance de charge du photomultiplicateur : $10^5 \Omega$.

Le premier spectre (Fig. 14) correspond à une solution à $5 \gamma/\text{cm}^3$; la sensibilité de l'enregistreur est de 0,1 mV/cm ce qui correspond à un courant de 10^{-9} A/cm . Le signal de fluorescence a donc une amplitude maximum de $16 \times 10^{-9} \text{ A}$ pour un courant d'obscu-

FIG. 14. — Spectre d'émission du sulfate de quinine à $5 \gamma/\text{cm}^3$.

FIG. 15. — Spectre d'émission du sulfate de quinine à $0,5 \gamma/\text{cm}^3$.

rité de 5×10^{-9} A et un bruit de fond de l'ordre de 5×10^{-10} A crête à crête.

Le deuxième spectre (Fig. 15) correspond à une solution à $0,5 \text{ g/cm}^3$, pour une sensibilité de $4 \times 10^{-2} \text{ mV/cm}$,

soit 4×10^{-10} A/cm. Le signal de fluorescence a une amplitude maximum de 2×10^{-9} A pour un courant d'obscurité de 5×10^{-5} A et un bruit de fond de l'ordre de 5×10^{-10} A crête à crête.

Bibliographie

- [1] MC CARTHY (W. J.), WINEFORDNER (J. D.), In fluorescence (George G. Guilbault Ed.), DEKKER (M.), Inc. New York, 1967, 371.
 - [2] STUPP (E. H.), *Rev. Sci. Instrum.*, 1962, **33**, 1215.
 - [3] KRAUZMAN (M.), KARA (R.), *J. Phys. Appl.*, 1966, **1**, 247.
 - [4] BORRESEN (H. C.), *Acta Chem. Scand.*, 1965, **19**, 2089.
 - [5] WITHOLT (B.), BRAND (L.), *Rev. Sci. Instrum.*, 1968, **39**, 1271.
 - [6] ROSEN (P.), EDELMAN (G. M.), *Rev. Sci. Instrum.*, 1965, **36**, 809.
 - [7] HAUGEN (G. R.), MARCUS (R. J.), *App. Opt.*, 1964, **3**, 1049.
 - [8] HOWERTON (H. K.), In fluorescence (George G. Guilbault Ed.), DEKKER (M.), Inc. New York, 1967, 233.
 - [9] VERNON (L. P.), SEELY (G. R.), The chlorophylls Acad. Press, 1966.
-