

DOSAGE DES CAROTENOÏDES DE LA MACROFAUNE BENTHIQUE PAR SPECTROMÉTRIE RAMAN DE  
RESONANCE - COMPARAISON AVEC LES DOSAGES PAR SPECTROMÉTRIE D'ABSORPTION VISIBLE.

MERLIN J.C.\* , NOEL P.\*\* , LAFAGE-SZYDLOWSKI N.\* , PETIT-COSSI G.\* , WALLART F.\*

## 1. INTRODUCTION

Les méthodes généralement utilisées pour le dosage des caroténoïdes extraits d'un milieu naturel sont basées sur la spectrophotométrie d'absorption visible (1). Ces méthodes peuvent être relativement précises mais nécessitent alors une préparation relativement longue de l'échantillon à analyser. En effet, à cause des autres pigments souvent présents dans les échantillons analysés et extraits en même temps que les caroténoïdes, l'analyse est peu précise sur l'extrait acétonique brut, les chlorophylles en particulier sont souvent gênantes. Une saponification et différents modes d'extraction sont alors nécessaires pour purifier la solution, ce qui amène inévitablement une perte de caroténoïdes donc une erreur dans le dosage.

La spectrométrie Raman de résonance a été utilisée avec succès pour la détection et l'identification d'algues ou de bactéries dans l'eau (2-3) et pour déterminer la concentration en caroténoïdes dans le phytoplancton marin (4). Nous nous proposons de généraliser cette méthode à d'autres espèces, en particulier des espèces de la macrofaune benthique et de comparer les résultats à ceux obtenus à partir de la spectrométrie d'absorption.

## 2. PRINCIPE DE LA METHODE

En excitant le spectre Raman d'un caroténoïde à l'intérieur de sa bande d'absorption visible (transition  $\pi \rightarrow \pi^*$  de la chaîne polyénique), une très forte augmentation de l'intensité des raies attribuables à la chaîne polyénique est observée; elle peut être de  $10^6$ . Le spectre Raman ainsi obtenu est caractéristique des seuls caroténoïdes présents dans la solution. En effet dans ces conditions l'intensité des raies Raman caractéristiques des espèces non absorbantes ou des autres pigments sont beaucoup trop faibles pour être détectées. L'analyse directe et spécifique des caroténoïdes à l'intérieur d'un système aussi complexe qu'une solution obtenue après extraction est alors possible.

L'intensité des raies Raman de résonance est, pour une longueur d'onde d'excitation donnée, proportionnelle à la concentration du pigment. Une substance de référence en solution avec les caroténoïdes (ou le solvant lui-même) sert

\* Laboratoire de Spectrochimie Infrarouge et Raman. C.N.R.S. - Université de Lille I - Bât. C5 - 59655 Villeneuve d'Ascq Cédex - France.

\*\* Laboratoire de Zoologie, Université de Paris 6 - Place Jussieu - 75230 Paris Cédex 05 - France.

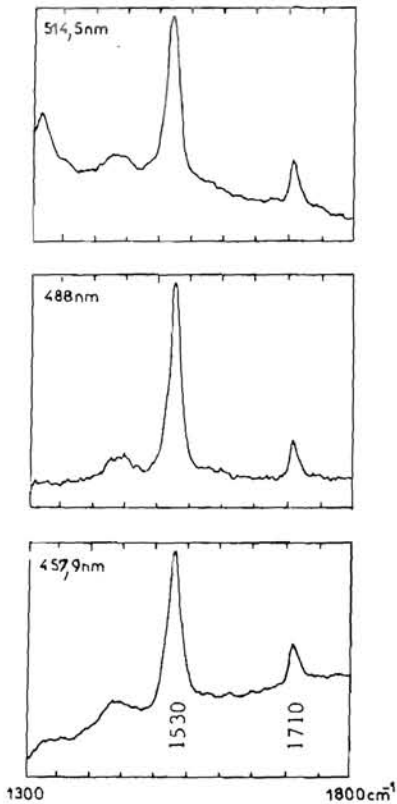


Fig.1: Spectres Raman de résonance des caroténoïdes extraits de *Carcinus maenas*. Influence de la radiation excitatrice

- l'absorption visible n'est pas suffisamment sélective et des pigments autres que les caroténoïdes peuvent modifier la densité optique mesurée ;

- chaque caroténoïde possède son propre profil d'excitation (variation du coefficient d'exaltation en fonction de la longueur d'onde d'excitation) et, dans le cas d'un mélange de concentration donnée l'intensité mesurée varie en fonction de la proportion relative des constituants.

La même mesure a été effectuée pour le  $\beta$ - carotène et l'astaxanthine (Fig.3): nous voyons donc que si la méthode de dosage par Raman de résonance donne de bons résultats, conformes à ceux obtenus par absorption visible pour des caroténoïdes purs en solution, de grandes disparités entre les deux méthodes apparaissent si on étudie des mélanges.

### 3. ETUDE D'UN MELANGE SYNTHETIQUE

Afin de mieux comprendre les différents facteurs influençant les mesures, des mélanges binaires de  $\beta$ - carotène et d'astaxanthine ont été étudiés simultanément en absorption visible et en Raman de résonance. Notre choix s'est porté sur ces deux caroténoïdes car ils sont représentatifs des pigments présents dans la macrofaune et possèdent des spectres d'absorption et des profils d'excitation suffisamment différents (Fig. 4).

#### 3.1. Quantification des erreurs

En absorption visible, la densité optique d'un mélange binaire est donnée

d'étalon interne. Le rapport de l'intensité d'une raie de caroténoïde à l'intensité d'une raie du solvant conduit par l'intermédiaire d'un étalonnage préalable à la concentration en caroténoïde dans la solution.

Nous présentons sur la Figure 1 les spectres Raman de résonance de l'extrait acétonique de *Carcinus maenas* enregistrés avec trois radiations excitatrices différentes; ils sont caractéristiques des seuls caroténoïdes présents dans la solution. La bande intense observée vers  $1530\text{ cm}^{-1}$  est attribuée à l'élongation des doubles liaisons C = C de la chaîne polyénique (5). Les raies caractéristiques des groupements terminaux sont faibles et les différents caroténoïdes possèdent donc des spectres Raman très voisins, souvent indiscernables. On utilise l'intensité de la raie  $1530\text{ cm}^{-1}$  rapportée à celle de l'acétone à  $1710\text{ cm}^{-1}$  pour déterminer la concentration.

Les spectres d'absorption visible des extraits acétoniques sont représentés sur la Figure 2. La densité optique mesurée à  $450\text{ nm}$  est utilisée pour calculer la concentration. En considérant que chacune des mesures (Intensité Raman et densité optique) est proportionnelle à la concentration, une relation linéaire doit exister entre les résultats de ces deux techniques. Or en portant, pour cette série d'échantillons, la densité optique en fonction de l'intensité relative de la raie  $1530\text{ cm}^{-1}$  (Fig.3) une forte disparité des points est relevée. Elle ne provient pas seulement des erreurs sur les mesures mais peut être expliquée par les deux phénomènes suivants :

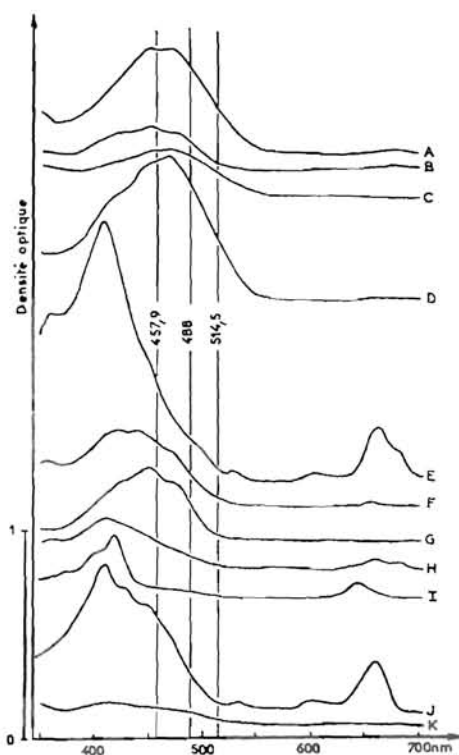


Fig.2: Spectres d'absorption visible d'extraits acétoniques des espèces répertoriées dans le tableau 1

gramme de la Figure 4 montre que l'erreur commise en spectrométrie Raman de résonance est très grande par rapport à celle obtenue en spectrométrie d'absorption et peut même conduire à des résultats totalement erronés. Nous voyons que les choix du composé de référence et de la radiation excitatrice sont de très grande importance.

### 3.2. Dosage d'un mélange de carétonoïdes

Le profil d'excitation propre à chaque caroténoïde, qui est la source d'erreur principale de cette méthode, peut être mis à profit pour déterminer le composé majoritaire dans un mélange et ainsi réduire considérablement l'erreur occasionnée par un mauvais choix de référence. Dans le tableau 1 sont présentés les résultats obtenus à partir de mélanges synthétiques de  $\beta$ -carotène et d'astaxanthine dans des proportions variables. Trois radiations excitatrices différentes encadrant la bande d'absorption ont été utilisées et les concentrations sont calculées en prenant le

par D.O. =  $(\epsilon_1 c_1 + \epsilon_2 c_2) \cdot l$ . Pour calculer une concentration totale ( $c_t$ ) en prenant l'un des composés comme référence on utilise les relations D.O. =  $\epsilon_1 \cdot c_t \cdot l$  ou D.O. =  $\epsilon_2 \cdot c_t \cdot l$ . La formulation de l'erreur commise en fonction de la fraction molaire  $x_1$  :

$$\left(1 - \frac{\epsilon_2}{\epsilon_1}\right) - x_1 \left(1 - \frac{\epsilon_2}{\epsilon_1}\right) \text{ si 1 est pris}$$

comme référence

$$x_1 \left(1 - \frac{\epsilon_1}{\epsilon_2}\right) \text{ si 2 est pris comme référence}$$

montre qu'elle est d'autant plus importante que les coefficients d'extinction molaire  $\epsilon$  sont différents. Dans le cas d'un mélange  $\beta$ -carotène - astaxanthine, elle ne dépasse pas 20%.

En spectrométrie Raman de résonance, des équations analogues peuvent être obtenues en considérant que l'intensité relative d'une raie est égale à  $I = \alpha \cdot c$ ;  $\alpha$  fait intervenir la section efficace du caroténoïde à la longueur d'onde utilisée et les conditions expérimentales (solvant, chaîne de mesure). Ces équations appliquées au système  $\beta$ -carotène, astaxanthine montrent qu'avec les radiations excitatrices 488 et 457,9 nm la concentration calculée ( $c_t$ ) est sous estimée avec le  $\beta$ -carotène comme référence et surestimée avec l'astaxanthine. La situation est inversée avec la radiation 514,5 nm. Le dia-

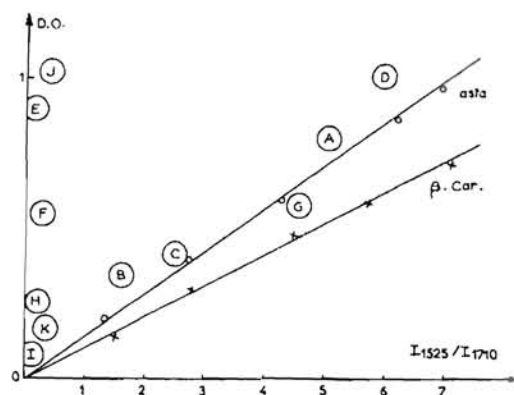


Fig.3 : Relation entre densité optique et intensité relative (exc.488 nm) pour des solutions acétoniques de caroténoïdes. A à C extractions à partir des espèces mentionnées dans le tableau 1

TABLEAU 1.- Présentation des mesures et du calcul des concentrations.

Les intensités relatives $I_{1530}/I_{1710}$ mesurées pour trois longueurs d'onde d'excitation différentes. Les concentrations sont calculées en prenant le $\beta$ -carotène ( $\beta$ -car.) puis l'astaxanthine (asta) comme référence.		Volume total d'extraction (ml)	D.O. à 450 nm	514,5 nm			488,0 nm			457,9 nm			$C(10^{-6}M)$ Réf. $\beta$ car.	$C(10^{-6}M)$ Réf. asta.	Concentrations calculées ( $10^{-6}M$ )			
				$I_{1530}/I_{1710}$	$C(10^{-6}M)$ Réf. $\beta$ ar.	$C(10^{-6}M)$ Réf. Asta.	$I_{1530}/I_{1710}$	$C(10^{-6}M)$ Réf. $\beta$ Car.	$C(10^{-6}M)$ Réf. Asta.	$I_{1530}/I_{1710}$	$C(10^{-6}M)$ Réf. $\beta$ Car.	$C(10^{-6}M)$ Réf. Asta.			$C(10^{-6}M)$ Réf. $\beta$ car.	$C(10^{-6}M)$ Réf. asta.	Raman	Visible
<b>MELANGES SYNTHETIQUES</b>																		
$\beta$ Car. + asta. = $4,5 \cdot 10^{-6}M$ (3 : 1)			0,56	1,5	<u>6,2</u>	2	4,9	<u>3,9</u>	5,6	3,2	<u>4,1</u>	5,4	<u>4,7</u>	4,3	4,7	4		
$\beta$ Car. + asta. = $5,1 \cdot 10^{-6}M$ (1 : 1)			0,61	2,5	10,4	<u>3,2</u>	5,5	4,5	<u>6,3</u>	3,5	4,7	<u>5,9</u>	6,5	<u>5,1</u>	5,1	4,4		
$\beta$ Car. + asta. = $4,8 \cdot 10^{-6}M$ (1 : 3)			0,56	3	12,5	<u>3,8</u>	4,6	3,8	<u>5,3</u>	3	4	<u>5,1</u>	6,8	<u>4,7</u>	4,7	4		
<b>ESPECES</b>																		
<i>Carcinus maenas</i> (crustacé)	A	66	0,80	3,75	15,6	<u>4,8</u>	5,15	4,15	<u>5,9</u>	3,9	5	<u>6,6</u>	8,3	<u>5,8</u>	6,67	6,34		
<i>Crepidula fornicata</i> (gastéropode)	B	52	0,35	0,6	<u>2,5</u>	0,78	1,6	<u>1,3</u>	1,8	0,94	<u>1,2</u>	1,6	<u>1,7</u>	1,4	1,72	2,77		
<i>Pisidia longicornis</i> (crustacé)	C	9	0,42	1,6	6,5	<u>2</u>	2,5	2	<u>2,8</u>	1,4	1,7	<u>2,3</u>	3,4	<u>2,4</u>	2,42	3,33		
<i>Pagurus bernhardus</i> (crustacé)	D	18	1,02	6	25	<u>7,7</u>	6,3	5,1	<u>7,3</u>	4,7	6	<u>8</u>	12	<u>7,7</u>	8,11	8,72		
<i>Littorina littorea</i> (gastéropode)	E	27	0,90	0,1	0,45	<u>0,14</u>	0,18	0,14	<u>0,2</u>	0,08	0,1	<u>0,14</u>	0,23	<u>0,16</u>	0,16	7,13		
<i>Mytilus edulis</i> (lamellibranche)	F	94	0,55	0,13	0,53	<u>0,16</u>	0,25	0,20	<u>0,29</u>	0,05	0,06	<u>0,09</u>	0,26	<u>0,18</u>	0,19	4,35		
<i>Pinnotheres pisum</i> (crustacé)	G	22	0,58	0,8	<u>3,3</u>	1	4,4	<u>3,5</u>	5	2,5	<u>3,2</u>	4,2	<u>3,3</u>	3,4	3,4	4,59		
<i>Cultellus pellucidus</i> (lamelli-branche)	H	19	0,26	0,11	0,48	<u>0,15</u>	0,14	0,11	<u>0,16</u>	0,25	0,31	<u>0,42</u>	1,3	<u>0,24</u>	0,24	2,06		
<i>Owenia fusiformis</i> (Annélide)	I	7,5	0,08	0,05	0,22	<u>0,07</u>	0,05	0,04	<u>0,06</u>	0,05	0,06	<u>0,09</u>	1,11	<u>0,07</u>	0,07	0,63		
<i>Abra alba</i> (lamellibranche)	J	28,5	1,03	0,15	0,6	<u>0,19</u>	0,21	0,17	<u>0,24</u>	0,26	0,33	<u>0,44</u>	0,37	<u>0,29</u>	0,32	8,16		
<i>Nassarius reticulatus</i> (gastéropode)	K	13	0,16	0,11	0,45	<u>0,14</u>	0,23	<u>0,18</u>	0,26	0,23	<u>0,29</u>	0,38	<u>0,31</u>	0,26	0,32	1,27		

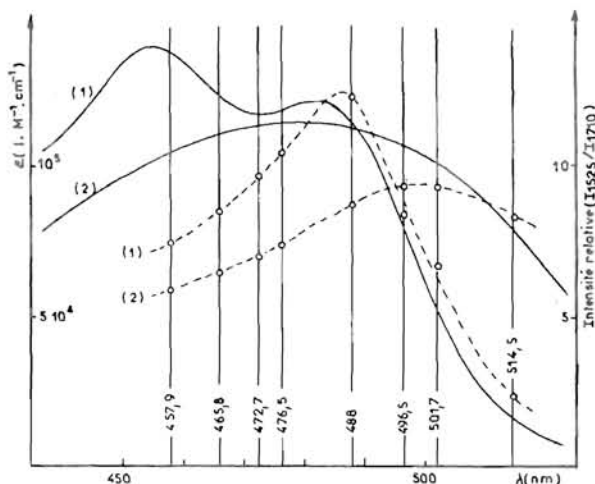


Fig. 4 : Spectres d'absorption visible (-) et profils d'excitation (...) du  $\beta$ -carotène (1) et de l'astaxanthine (2). ( $c = 10^{-6}M$ ) d'après (6)

$\beta$ -carotène puis l'astaxanthine comme référence. Nous pouvons remarquer une grande disparité des résultats pour les concentrations calculées, mais la moyenne des résultats présentant la plus faible disparité (donc en accord avec le profil d'excitation de l'un des composants) est très proche de la concentration initialement introduite. Cette approximation semble donc justifiée et peut être utilisée dans cette méthode de dosage.

#### 4. APPLICATION A DES ESPECES DE LA MACROFAUNE BENTHIQUE

Cette méthode a été appliquée à différentes espèces présentes en Baie de Seine. Les spécimens prélevés en novembre 84 ont été débarassés le cas échéant de leur tube ou de leur coquille, puis broyés dans

l'acétone. Le résidu a été repris plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'un surnageant incolore. Les différents surnageants ont été réunis; les solutions ainsi obtenues ont été étudiées par absorption visible et par Raman de résonance; les résultats sont regroupés dans le tableau 1. Comme pour les mélanges synthétiques on observe une dispersion des concentrations calculées à partir de différentes longueurs d'onde excitatrices et à l'aide de différentes références. N'ont été prises en considération pour le calcul de la concentration globale en caroténoïdes que les valeurs présentant la plus faible dispersion (chiffres soulignés); pour ceci nous avons considéré le rapport de la concentration la plus élevée sur la concentration la plus faible. Dans le calcul de la concentration globale nous avons pris en compte la correction due à l'existence d'une certaine quantité d'eau dans la solution, eau provenant du matériel humide lorsqu'il a été placé dans l'acétone.

La comparaison avec les mesures par absorption visible montre qu'un accord satisfaisant existe pour cinq espèces (A, B, C, D et G); pour les six autres (E, F, H, I, J et K) la spectrophotométrie d'absorption donne des résultats beaucoup plus élevés. Ces écarts s'expliquent facilement en considérant le spectre d'absorption visible des solutions (Fig. 2), en effet l'observation de bandes d'absorption vers 410- 420 nm et vers 675 nm dans les spectres E, F, H, I, J et K indique la présence d'autres pigments que les caroténoïdes, ce qui augmente considérablement la densité optique mesurée. La spectrométrie Raman de résonance qui ne met en évidence que les caroténoïdes avec les longueurs d'onde d'excitation utilisées est insensible à ce phénomène.

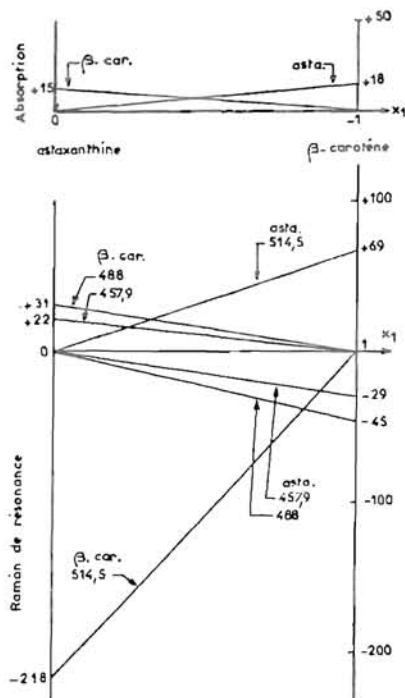


Fig. 5: Erreur relative  $\frac{(c_1 + c_2) - c_t}{c_1 + c_2}$  (%) obtenue pour le dosage d'un mélange binaire  $\beta$ -carotène et astaxanthine, d'après (6)

La disparité des mesures entre l'intensité Raman de résonance et la densité optique relevée dans la Figure 3 peut être ainsi expliquée. Nous résumons dans le tableau 2 l'origine des erreurs commises par l'application de chacune des méthodes.

	Causes d'erreur	Spectrométrie Raman	Spectrométrie visible
INITIALES	Caroténoïdes non extractibles à l'acétone		0 - 10%
	Erreurs sur les volumes et pertes lors des préparations de la solution à doser		0 - 1%
LORS DES MESURES	Influence des pigments autres que les caroténoïdes avant saponification	0%	0 - 200%
	après saponification	0%	0 - 10%
	Caroténoïdes exogènes (parasites, épibiontes, contenu du tube digestif ...)		0 - 5%
	Teneur en H <sub>2</sub> O de la solution acétonique	5 - 12%	0 - 1%
	Coefficients d'extinction molaire		0 - 20%
	Profils d'excitation des caroténoïdes	0 - 200%	
	Corrections d'absorption pour les solutions trop concentrées	0 - 20%	1%
	Volumes et concentrations possibles pour le dosage	0,01ml 10 <sup>-5</sup> à 10 <sup>-7</sup> M	1 ml 10 <sup>-5</sup> à 10 <sup>-6</sup> M
Influence de la radiation d'analyse	dégradation possible	nulle	

Tableau 2.: Estimation comparative des causes d'erreur lors des dosages quantitatifs des caroténoïdes en spectrométries visible et Raman de résonance

## 5. CONCLUSION

La spectrométrie Raman de résonance, comme la spectrométrie d'absorption visible, permet de réaliser des analyses quantitatives de caroténoïdes. Cette méthode possède certains avantages dont le plus important est de pouvoir analyser une solution non purifiée sans interférence avec les autres constituants du mélange. Cependant les choix de la longueur d'onde d'excitation et du composé de référence sont très importants et peuvent conduire, s'ils ne sont pas adaptés au problème, à des valeurs arbitraires.

- (1) ISLER O. (1971) - Caroténoïds, Birkhauser Verlag
- (2) HOWARD JR W.F., NELSON W.H. and SPERRY J.F. (1980) - A resonance Raman method for the rapid detection and identification of bacteria in water, Appl.Spectrosc. 34 (1), P.72- 75
- (3) BRAHMA S.K., HARGRAVES P.E., HOWARD JR W.F. and NELSON W.H. (1983)- A resonance Raman method for the rapid detection and identification of algae in water, Appl.Spectrosc. 37 (1), p.55- 58
- (4) HOSKINS L.C. and ALEXANDER V. (1977)- Determination of carotenoïd concentrations in marine phytoplankton by resonance Raman spectrometry, Anal.Chem., 49 (6), p.695- 697
- (5) RIMAIL L., HEYDE M.E. and GILL D. (1973)- Vibrational spectra of some caroténoïds and related linear polyenes. A Raman spectroscopic study, J.Amer.Chem.Soc., 95 (14), p.4493- 4501
- (6) LAFAGE- SZYDŁOWSKI N. (1984).- Apport de la spectrométrie Raman de résonance à l'étude qualitative et quantitative de mélange de caroténoïdes. Thèse Docteur - Ingénieur, Université de Lille I