

# SPECTROMETRIE DE FLUORESCENCE MOLECULAIRE

La spectrométrie de fluorescence moléculaire étudie l'**émission** de lumière par des **molécules**, en solution après **excitation** par des **photons** appartenant au domaine du **visible** ou du **proche ultraviolet**.

## PARTIE I : PHENOMENE DE FLUORESCENCE

### I. TERMINOLOGIE :

#### 1. Luminescence :

La luminescence est une émission de rayonnements électromagnétiques visible ou proche ultraviolet sans dégagement de chaleur.

*Remarque : L'incandescence est une émission de lumière chaude.*

Selon la source de l'énergie excitatrice, on distingue plusieurs phénomènes de luminescences :

Phénomène de luminescence	Source de l'énergie excitatrice
Chimiluminescence	Réaction chimique
Bioluminescence	Réaction enzymatique
Thermoluminescence	Radioactivité - chaleur
Electroluminescence	Courant électrique
<b>Photoluminescence</b>	Absorption de <b>photons</b>

#### 2. Photoluminescence :

La photoluminescence est un phénomène de luminescence due à l'absorption de photons. Selon la durée de la luminescence, on distingue :

- a. **La phosphorescence** ; de longue durée (plusieurs minutes voir plusieurs heures).
- b. **La fluorescence** ; de courte durée (quelques nanosecondes).

#### 3. Fluorimétrie :

La fluorimétrie regroupe deux techniques analytiques distinguées comme suit :

	Analyte	Domaine énergétique
<b>Spectrométrie de fluorescence moléculaire</b>	Molécule	Visible et proche UV
Spectrométrie de fluorescence atomique ou spectrométrie de fluorescence X	Atome	Rayons X

## II. ORIGINE DE LA PHOTOLUMINESCENCE :

### 1. Domaine du spectre électromagnétique :

Proche ultraviolet : 200 à 400 nm

Visible : 400 à 800 nm

### 2. Domaine énergétique :

Energies électronique et vibrationnelle.

### 3. Transitions électroniques :

$n \rightarrow \pi^*$

$\pi \rightarrow \pi^*$

*Remarques :*

✓ *En fluorescence : Les transitions électroniques se font entre deux états énergétiques de même multiplicité.*

✓ *En phosphorescence : Les transitions électroniques se font entre deux états énergétiques de multiplicités différentes.*

## III. REGLE DE MULTIPLICITE :

### 1. Nombres quantiques électroniques

Chaque électron est caractérisé par les nombres quantiques :

- Principal «  $n$  »

- Secondaire «  $l$  »

- Magnétique (spin) «  $m$  » ( $m = \pm \frac{1}{2}$ )

### 2. La multiplicité

La multiplicité  $M$  définit deux états électroniques : SINGULET ou TRIPLET

**$M = 2S + 1$**  Avec  $S$  = Somme de «  $m$  » des électrons d'une orbitale moléculaire

Etat SINGULET :  $M = 1$

Etat TRIPLET :  $M = 3$

On distingue ainsi les états électroniques suivants :

**a. Etat électronique fondamental SINGULET :** Les électrons appariés sont de spins opposés ou antiparallèles ( $\uparrow\downarrow$ )

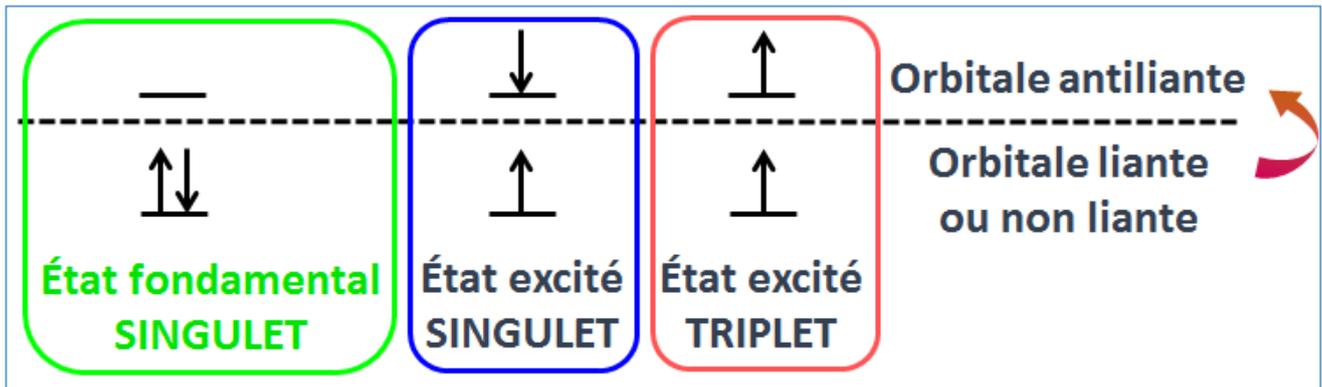
$$M = 2 \left[ \left( +\frac{1}{2} \right) + \left( -\frac{1}{2} \right) \right] + 1 \Rightarrow M = 1$$

**b. Etat électronique excité SINGULET :** Les électrons non appariés sont de spins opposés ou antiparallèles ( $\uparrow\downarrow$ )

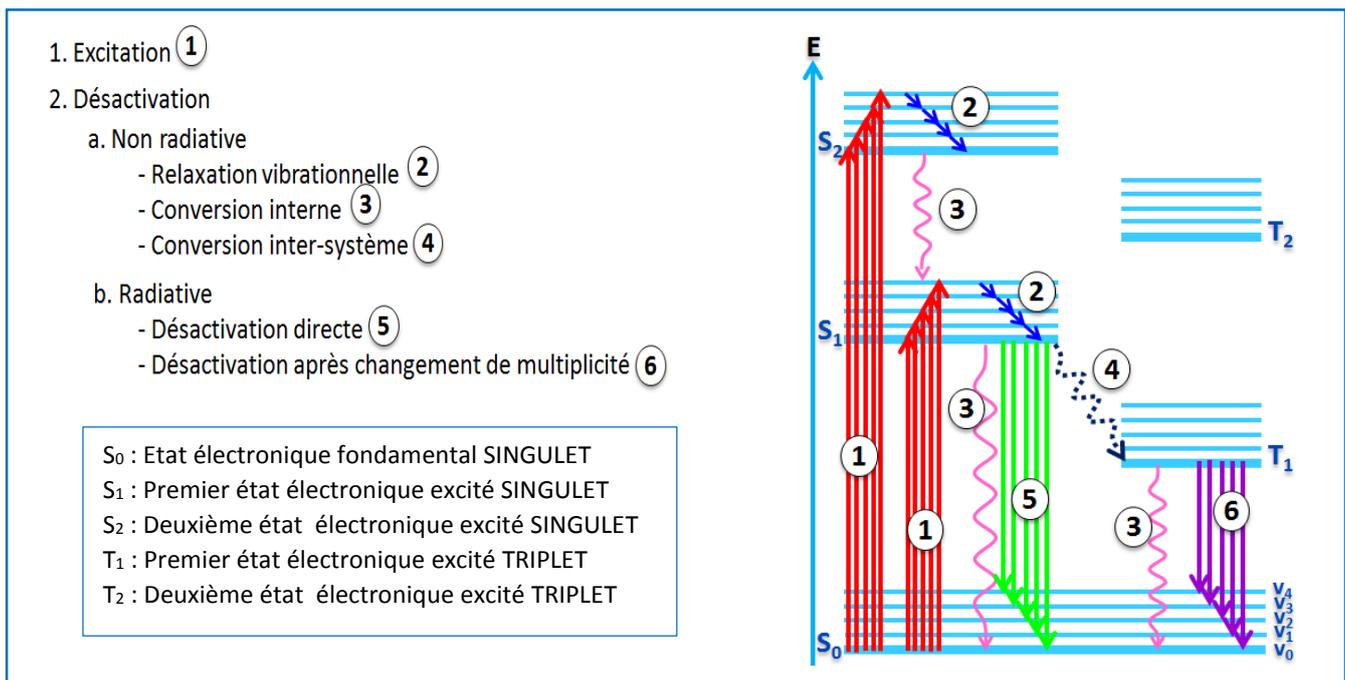
$$M = 2 \left[ \left( +\frac{1}{2} \right) + \left( -\frac{1}{2} \right) \right] + 1 \Rightarrow M = 1$$

**c. Etat électronique excité TRIPLET :** Les électrons non appariés sont de spins parallèles ( $\uparrow\uparrow$ )

$$M = 2 \left[ \left( +\frac{1}{2} \right) + \left( +\frac{1}{2} \right) \right] + 1 \Rightarrow M = 3$$



#### IV. DIAGRAMME DE JABLONSKI :



##### 1. Excitation :

Absorption d'un quantum d'énergie fournie par une source lumineuse externe permettant le passage d'électrons de l'état fondamental à un état excité.

##### 2. Désactivation

###### a. Désactivation non radiative :

Dissipation de l'énergie sous forme de chaleur.

###### - Relaxation vibrationnelle :

Transfert de l'énergie au niveau vibrationnel le plus bas du même niveau énergétique excité.

###### - Conversion interne :

Transfert de l'énergie du niveau vibrationnel le plus bas d'un état excité à un état électronique inférieur.

###### - Conversion externe :

Transfert de l'énergie au solvant ou à la matrice.

###### - Conversion inter-système :

Changement de multiplicité nécessitant un retournement de spin et évolution d'un état excité SINGULET S<sub>1</sub> à un état excité TRIPLET T<sub>1</sub> d'énergie voisine et de durée de vie plus longue.

## b. Désactivation radiative :

Retour à l'état fondamental avec émission de radiations.

### - Désactivation directe :

Transition entre l'état excité SINGULET  $S_1$  et l'état fondamental SINGULET  $S_0$ .

- L'énergie restituée **est plus faible** que l'énergie absorbée.
- La radiation émise a une durée de vie de  $10^{-9}$  et  $10^{-7}$  sec.

Il s'agit de la **FLUORESCENCE**

### - Désactivation après changement de multiplicité :

Passage d'un état excité TRIPLET  $T_1$  à l'état fondamental SINGULET  $S_0$ .

- Désactivation par émission de lumière de longueur d'onde plus grande que celle de la lumière initialement absorbée ou celle émise par fluorescence.

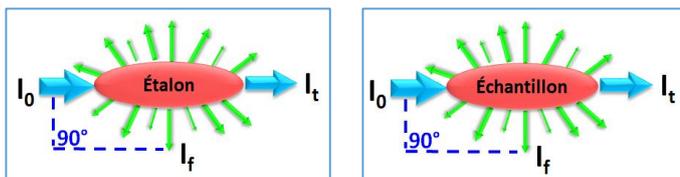
Il s'agit de la **PHOSPHORESCENCE**

## PARTIE II : SPECTROMETRIE DE FLUORESCENCE MOLECULAIRE

### I. ASPECTS QUALITATIFS

#### 1. Principe

La spectrométrie de fluorescence moléculaire utilise la mesure de l'intensité de lumière fluorescente émise ( $I_f$ ) par la substance à examiner par rapport à celle émise par un étalon déterminé.



*Remarque : La fluorescence est mesurée à un angle de  $90^\circ$  par rapport au trajet optique du rayonnement incident ( $I_0$ ) afin de différencier la lumière fluorescente de la lumière transmise ( $I_t$ ).*

#### 2. Spectres d'émission et d'excitation de fluorescence

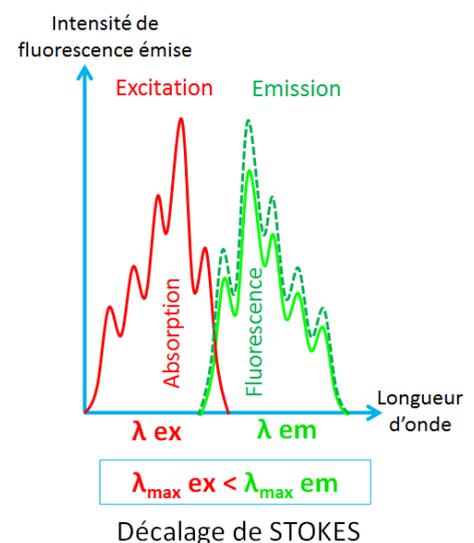
##### a. Spectre d'émission de fluorescence :

L'intensité de fluorescence émise est mesurée sur une plage de longueurs d'onde en excitant la molécule à une longueur d'onde fixe.

##### b. Spectre d'excitation de fluorescence :

L'intensité de fluorescence émise est mesurée sur une longueur d'onde fixe en excitant la molécule à des longueurs d'ondes variées.

*Remarque : Dans un milieu optiquement transparent, le spectre d'émission est une image inversée (effet miroir) du spectre d'excitation.*



## II. ASPECTS QUANTITATIFS :

### 1. Rendement quantique de fluorescence « $\Phi_f$ » :

Le rendement quantique de fluorescence détermine l'efficacité d'une molécule à fluorescer.

$$\Phi_f = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}} = \frac{I_f}{I_a}$$

$I_f$  : Intensité de fluorescence  
 $I_a$  : Intensité absorbée

$$0 < \Phi_f < 1 \quad \left\{ \begin{array}{l} \Phi_f = 0 \Rightarrow \text{Absence de fluorescence} \\ \Phi_f = 1 \Rightarrow \text{Fluorescence maximale} \end{array} \right.$$

$\Phi_f$  dépend :

- ✓ Des propriétés physiques de la molécule
- ✓ De l'environnement: *Concentration, polarité, pH, température ...*

$\Phi_f$  ne dépend pas:

- ✓ De l'intensité de la source lumineuse  $I_0$
- ✓ De la longueur d'onde d'excitation

### 2. Intensité de fluorescence « $I_f$ » :

$$I_f = \Phi_f \cdot I_a = \Phi_f (I_0 - I_t)$$

$$I_f = \Phi_f \cdot I_0 \cdot \left(1 - \frac{I_t}{I_0}\right)$$

$$I_f = \Phi_f \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-A})$$

$$10^{-A} = 1 - 2,303A + \frac{(2,303A)^2}{2!} - \dots + \dots$$

$I_f$  = Intensité de fluorescence  
 $I_a$  = Intensité du rayonnement absorbé  
 $I_0$  = Intensité du rayonnement incident  
 $I_t$  = Intensité du rayonnement transmis  
 $A$  = Absorbance ( $A = \log I_0/I_t = \epsilon \cdot l \cdot c$ )

On ne mesure qu'une partie de la fluorescence à 90° => Introduction d'un facteur **k**

$$I_f = k \times \Phi_f \times I_0 \times (2,3 \cdot \epsilon \cdot l \cdot c)$$

↓  
**K'**

$$I_f = K' C$$

*Remarques :*

- ✓ Le facteur **K'** regroupe les paramètres propres au composé et à l'appareillage. En pratique, ces paramètres sont fixes.
- ✓ La linéarité de la fonction  $I_f = f(C)$  n'est vérifiée que pour les solutions très diluées ( $< 10^{-4}M$ ).

L'intensité de fluorescence  $I_f$  dépend de :

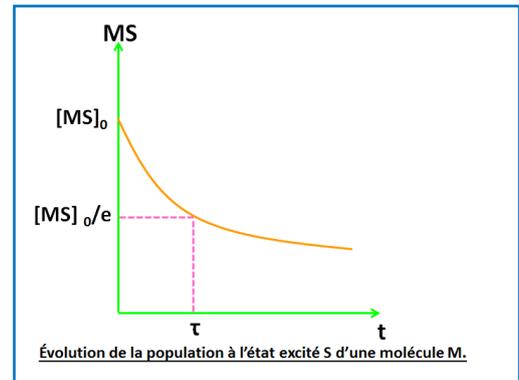
- ✓ L'intensité  $I_0$  de la source
- ✓ L'appareillage
- ✓ La longueur d'onde d'excitation
- ✓ La concentration de la solution fluorescente
- ✓ L'environnement, la nature du solvant, la température et le pH.

### 3. Temps de vie de fluorescence « $\tau$ » :

Le temps de vie radiatif est caractéristique de chaque espèce moléculaire fluorescente, il est de 1 à 100 ns.

$$\text{Pour } t = \tau \\ [MS] = [MS]_0/e = [MS]_0/2,718$$

$MS$  : Nombre de molécules excitées au temps  $t$   
 $MS_0$  : Nombre de molécules initialement excitées  
 $\tau$  : temps de vie radiatif  
 $e = 2,718$  (base des logarithmes népériens)

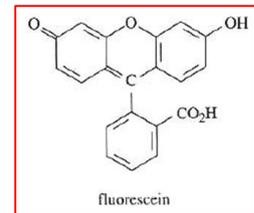
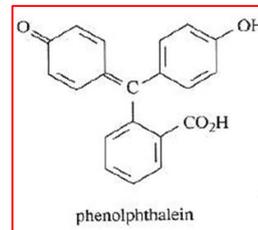


- ✓ Plus  $\tau$  est court, meilleure sera la fluorescence.
- ✓ La sensibilité de la spectrofluorimétrie est inversement proportionnelle à  $\tau$
- ✓  $\tau$  varie en fonction de l'environnement : Solvant, pH ...

### III. LES ESPECES FLUORESCENTES (FLUOROPHORES) :

Ceux sont généralement des composés organiques aromatiques qui répondent aux critères suivants:

- ✓ Absorption dans le **visible** ou le **proche ultraviolet**
- ✓ Coefficient d'extinction molaire  $\epsilon_{\max}$  important
- ✓ Fort rendement quantique (**0.8 - 0.9**)
- ✓ Très courte durée de vie de fluorescence ( $\approx$  ns)
- ✓ Grand décalage de **STOKES**

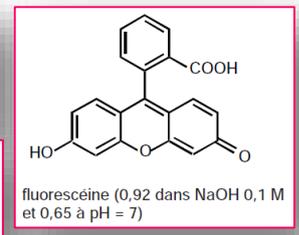
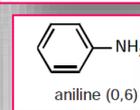
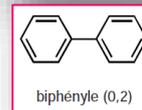
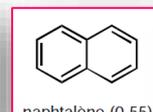
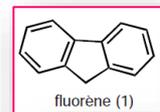


### IV. FACTEURS INFLUENÇANT LA FLUORESCENCE

#### 1. Facteurs liés à la molécule :

La fluorescence est privilégiée par les molécules:

- ✓ Cycliques
- ✓ Rigides
- ✓ Possédant des liaisons  $\pi$



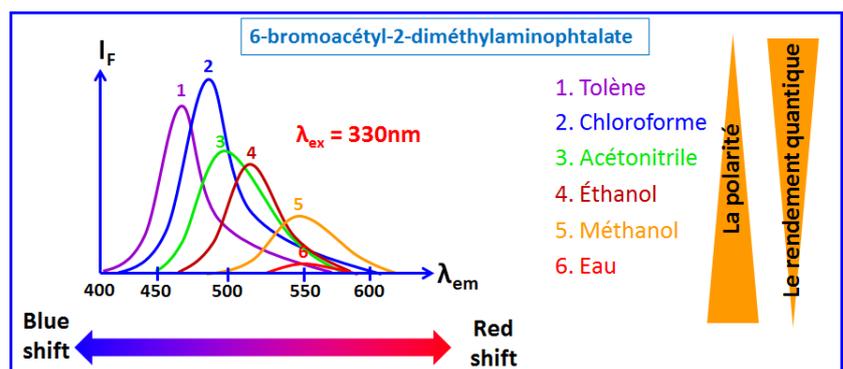
Entre parenthèses sont indiqués les rendements quantiques de fluorescence

La fluorescence est augmentée par la présence de groupements électrodonneurs (OH, NH<sub>2</sub>, R ...) et est diminuée par la présence de groupements électroattracteurs (NO<sub>2</sub>, COOH, X ...)

#### 2. Facteurs liés au solvant:

##### a. Effet de la polarité :

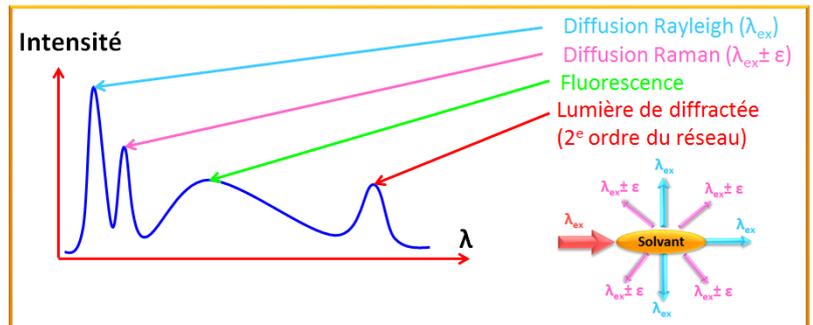
Une augmentation de la polarité, diminue  $I_f$  et augmente  $\lambda_{\text{émission}}$ .



## b. Effets des lumières parasites

- **Diffusion de Rayleigh:** Diffusion à la même longueur d'onde d'une petite fraction de la lumière excitatrice.

- **Diffusion Raman:** Diffusion d'une fraction plus petite de la lumière excitatrice à des longueurs d'onde plus grandes par perte de l'énergie sous forme de vibrations.



- **Raie du 2<sup>e</sup> ordre :** Positionnée à deux fois la longueur d'onde maximale d'excitation, il s'agit d'un phénomène purement optique dû à la diffraction de la lumière sur les réseaux de l'appareillage.

## 3. Facteurs liés à l'environnement:

Une augmentation de la température et/ou une diminution de la viscosité entraînent une accélération des mouvements browniens qui augmentent les chocs entre les molécules favorisant la relaxation non radiative ce qui entraîne une diminution du rendement quantique de fluorescence.

## 4. Facteurs internes d'inhibition:

### a. Influence de la concentration:

La linéarité de la fonction  $I_f = f(C)$  n'est vérifiée qu'aux faibles concentrations.

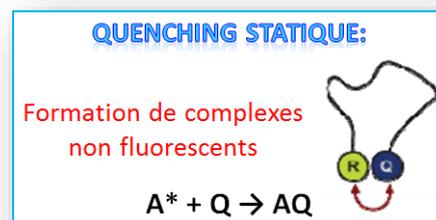
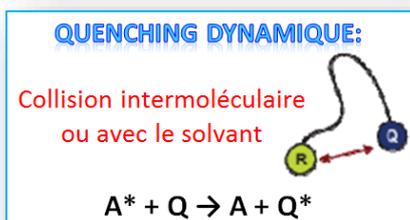
### b. La photo-décomposition :

Diminution de l'émission de fluorescence après un temps d'excitation prolongé due à la destruction du fluorophore par la lumière excitatrice.

## 5. Facteurs externes d'inhibition:

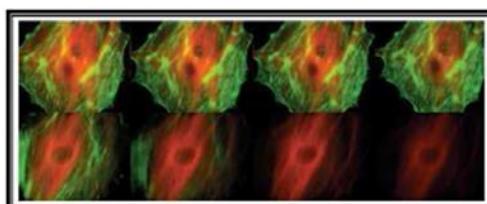
### a. Quenching de fluorescence:

Diminution du rendement quantique par transfert d'énergie



### b. Photobleaching (photoblanchiment):

Destruction irréversible d'un fluorophore excité par la lumière en présence d'oxygène.



<= En absence d'oxygène

<= En présence d'oxygène

**c. Effet du pH:**

Exemple d'acide faible **Ha** de concentration initiale **C<sub>0</sub>** :



✓ Cas où la forme acide est fluorescente

$$I_f = K \frac{C_0 \cdot [\text{H}_3\text{O}^+]}{K_a + [\text{H}_3\text{O}^+]}$$

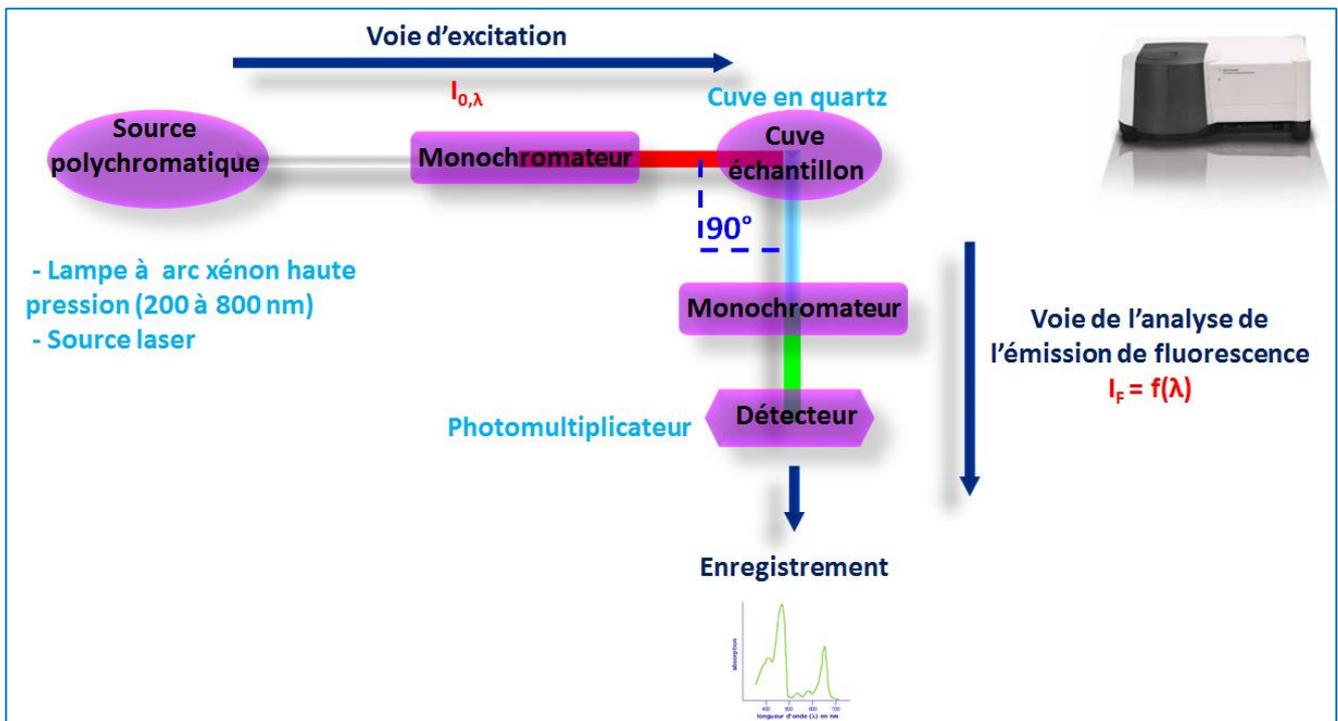
pH ↑ ⇒ [H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>] ↓ ⇒ I<sub>f</sub> ↓  
 pH ↓ ⇒ [H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>] ↑ ⇒ I<sub>f</sub> ↑

✓ Cas où la forme basique est fluorescente

$$I_f = K \frac{K_a \cdot C_0}{K_a + [\text{H}_3\text{O}^+]}$$

pH ↑ ⇒ [H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>] ↓ ⇒ I<sub>f</sub> ↑  
 pH ↓ ⇒ [H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>] ↑ ⇒ I<sub>f</sub> ↓

**V. APPAREILLAGE :**



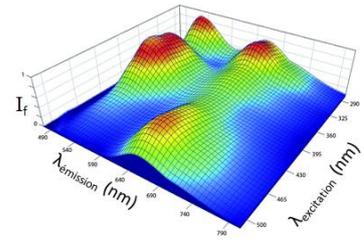
**VI. APPLICATIONS ANALYTIQUES :**

**1. Domaines d'application:**

- ✓ Médicament
- ✓ Biologie
- ✓ Environnement
- ✓ Toxicologie ...

## 2. Applications en analyse qualitative :

- ✓ Un spectre de fluorescence obtenue en 3D (trois dimensions)  $I_f = f(\lambda_{\text{émission}}, \lambda_{\text{excitation}})$  est une signature de la molécule d'où la sélectivité de la spectrofluorimétrie.
- ✓ Grâce à des bases de données, il est possible d'identifier les substances chimiques fluorescentes.



## 3. Applications en analyse quantitative :

La spectrofluorimétrie est 10 à 1000 fois plus sensible que la spectrophotométrie d'absorption UV-Visible.

**a. Analyse directe :** Mesure de la fluorescence des molécules naturellement fluorescentes.

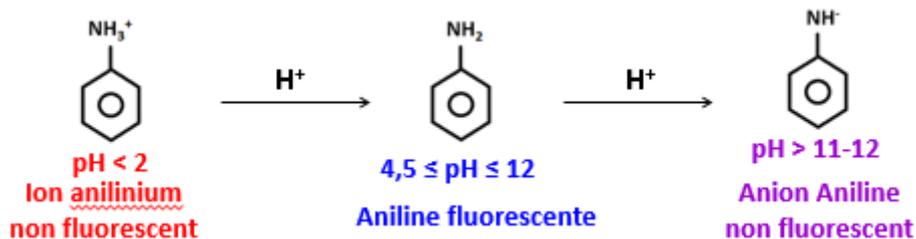
Exemple : Quinine et dérivés.

**b. Analyse fondée sur le phénomène d'inhibition :** Mesure de l'atténuation de la fluorescence.

**c. Analyse après modification:** Il est possible d'analyser les substances chimiques non fluorescentes naturellement par:

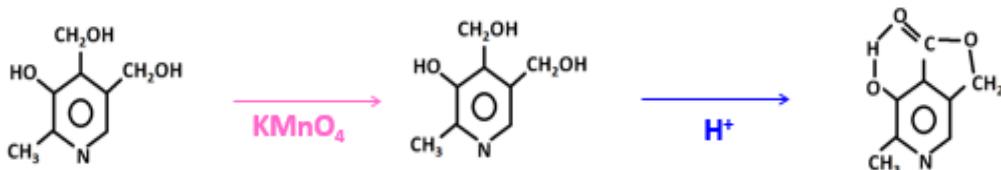
- **Modification de la structure chimique sous l'influence du pH:**

Exemple : L'aniline



- **Réaction de cyclisation:**

Exemple: Oxydation de la vitamine B<sub>6</sub>



- **Dérivatisation de fluorescence:** Greffer sur un analyte non fluorescent un fluorophore.

Exemple: Utilisation de l'hydroxyméthyl-9 anthracène (9HMA) marqueur fluorescent des acides à courte chaîne.

