SPECTROSCOPIE de FLUORESCENCE MOLECULAIRE

ÉCOLE TECHNIQUE SUPÉRIEURE DU LABORATOIRE

95, rue du Dessous des Berges, 75013 PARIS

http://ligodin.free.fr

godin.lionel@orange.fr

Licence des Industries Pharmaceutiques, Cosmétologiques, et de Santé : gestion, production et valorisation.

Option CDA - Année 2024/2025

SOMMAIRE

- I - Théorie de la fluorescence moléculaire
  - 1) Les processus de relaxation
    - 1.1 Raies de résonance et déplacement de Stokes
    - 1.2 Quel signal ? Deux types de spectres
  - 2) Les espèces fluorescentes
    - 2.1 Fluorescence et structure
    - 2.2 Effet de la rigidité
    - 2.3 Effet de température et de solvant

- II - Effet de la concentration sur l’intensité de fluorescence
- III - Les appareils de fluorescence
- IV - Applications des méthodes de fluorescence
  - 1) Méthodes utilisées pour les espèces inorganiques
  - 2) Les méthodes pour les espèces organiques et biochimiques

I- Théorie de la spectrofluorimétrie

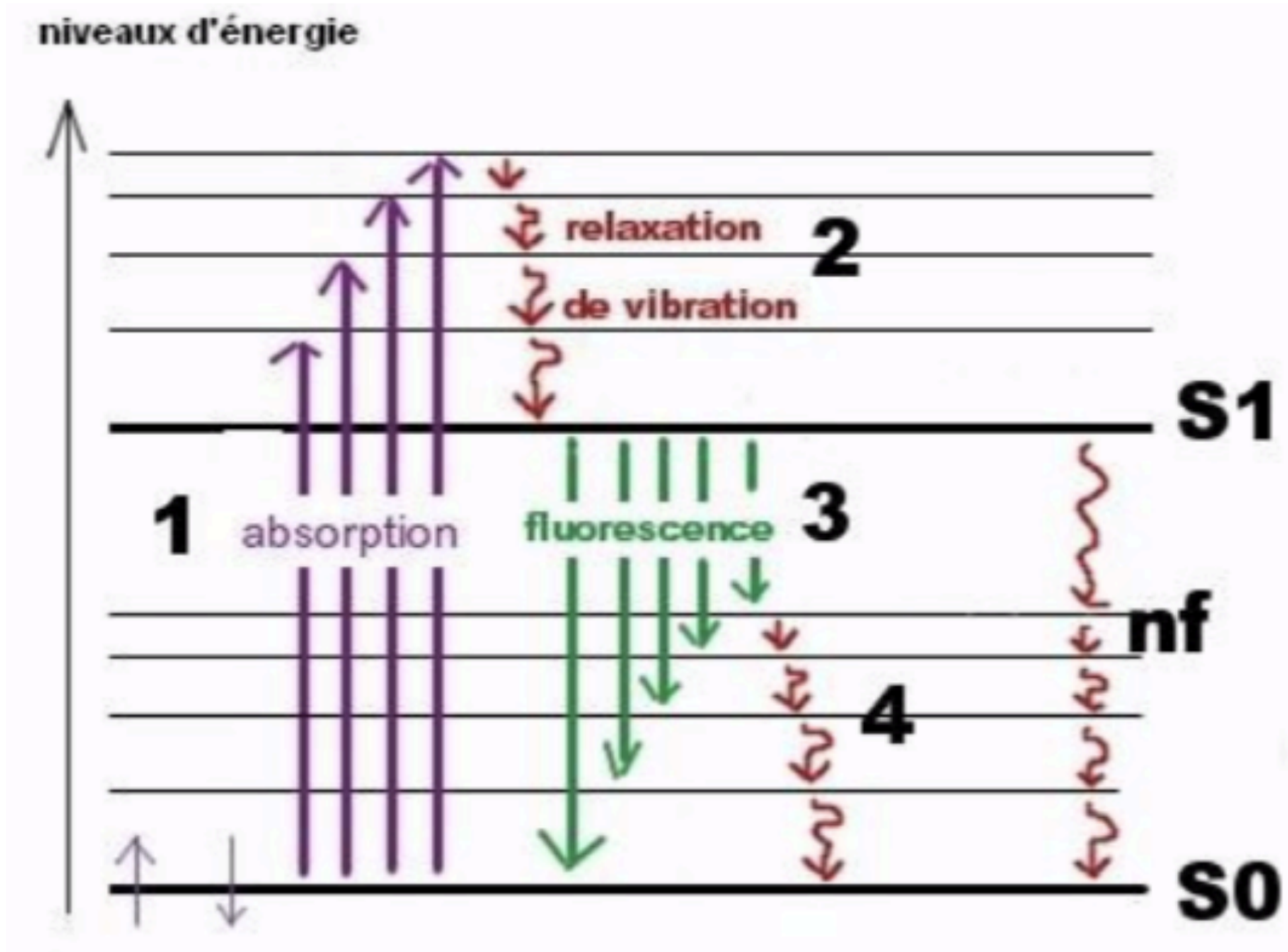


Figure 1 : diagramme partiel des niveaux d'énergie d'une espèce moléculaire hypothétique appelé diagramme de Jablonsky.

1 - La molécule est irradiée et absorbe une certaine quantité d'énergie. La molécule « passe » du niveau fondamental S_0 à des niveaux vibrationnels appartenant au premier état excité électronique.

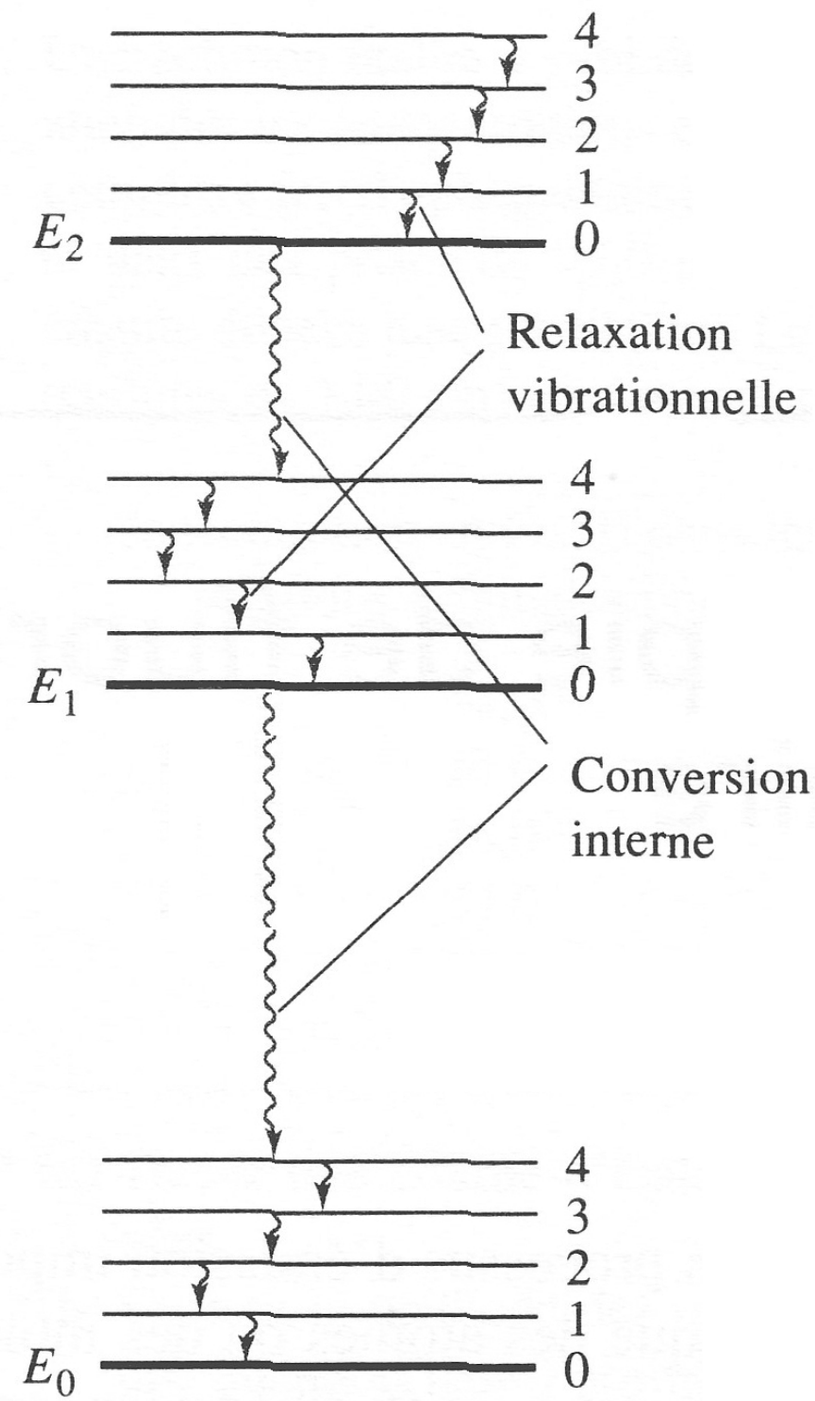
1) Les processus de relaxation

La vie d'une espèce excitée est brève. Deux des mécanismes les plus importants, la relaxation non rayonnante et la relaxation par fluorescence, sont illustrés par les figures (b) et (c).

Deux types de relaxation non rayonnante :

2 - La désactivation ou relaxation vibrationnelle (petites flèches ondulées) se produit lors de collisions entre des molécules excitées et des molécules de solvant. Au cours de ces collisions, l'excès d'énergie vibrationnelle est transféré aux molécules de solvant en une série d'étapes, comme l'indique la figure ci-contre
Le gain en énergie du solvant se traduit par une très légère ↗ de la température du milieu.

1/ La relaxation vibrationnelle est un processus efficace : estimer la durée de vie moyenne d'un état vibrationnel excité :



(b) Relaxation non rayonnante

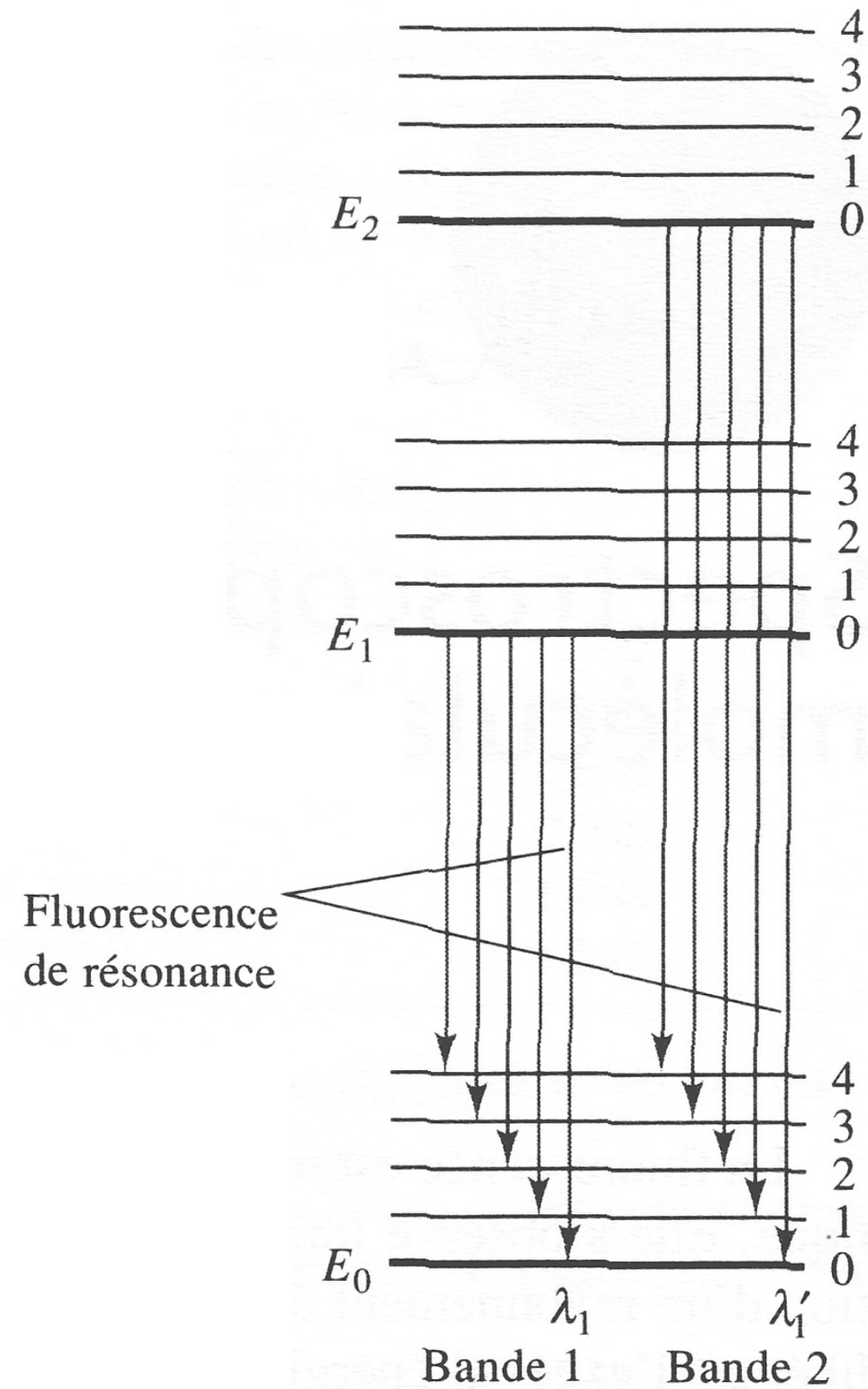
• La conversion interne non fluorescente (longues flèches ondulées) est beaucoup moins efficace que la relaxation vibrationnelle.

2/ Estimer, à nouveau, la durée de vie moyenne d'un état électronique excité :

Remarque : les mécanismes responsables de ce type de relaxation ne sont pas parfaitement compris, mais l'effet global est une ↗ de la température du milieu.

La relaxation rayonnante par fluorescence (figure (c)) se traduit par des bandes de rayonnement parce que les molécules excités électroniquement peuvent revenir à n'importe quel niveau vibrationnel de l'état électronique fondamental.

Remarque : comme les bandes d'absorption moléculaire, les bandes de fluorescence moléculaire sont constituées d'une multitude de raies accolées dont la résolution est souvent difficile.

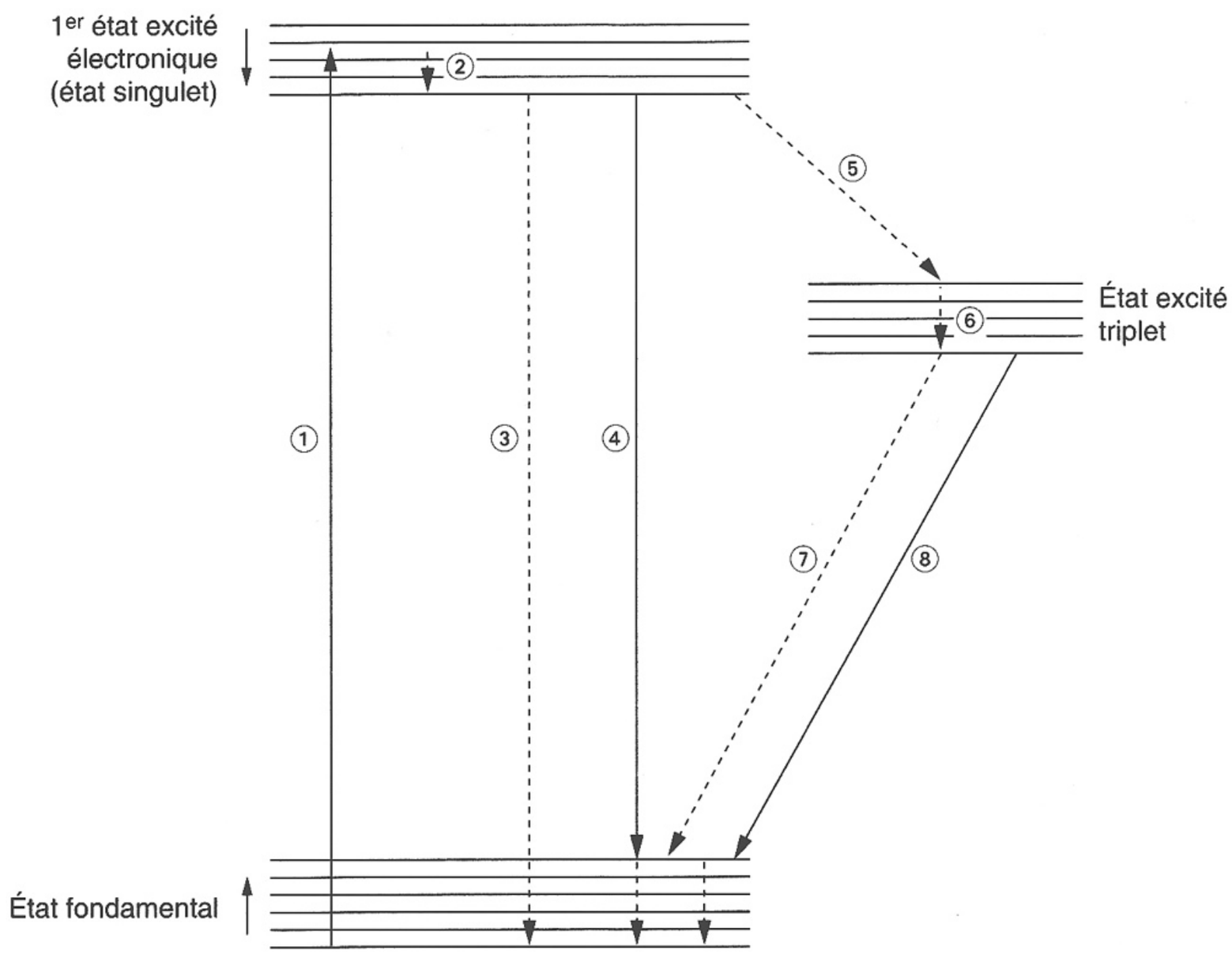


(c) Fluorescence

☛ **Avec certains dérivés, un autre phénomène appelé conversion intersystème peut se produire.**

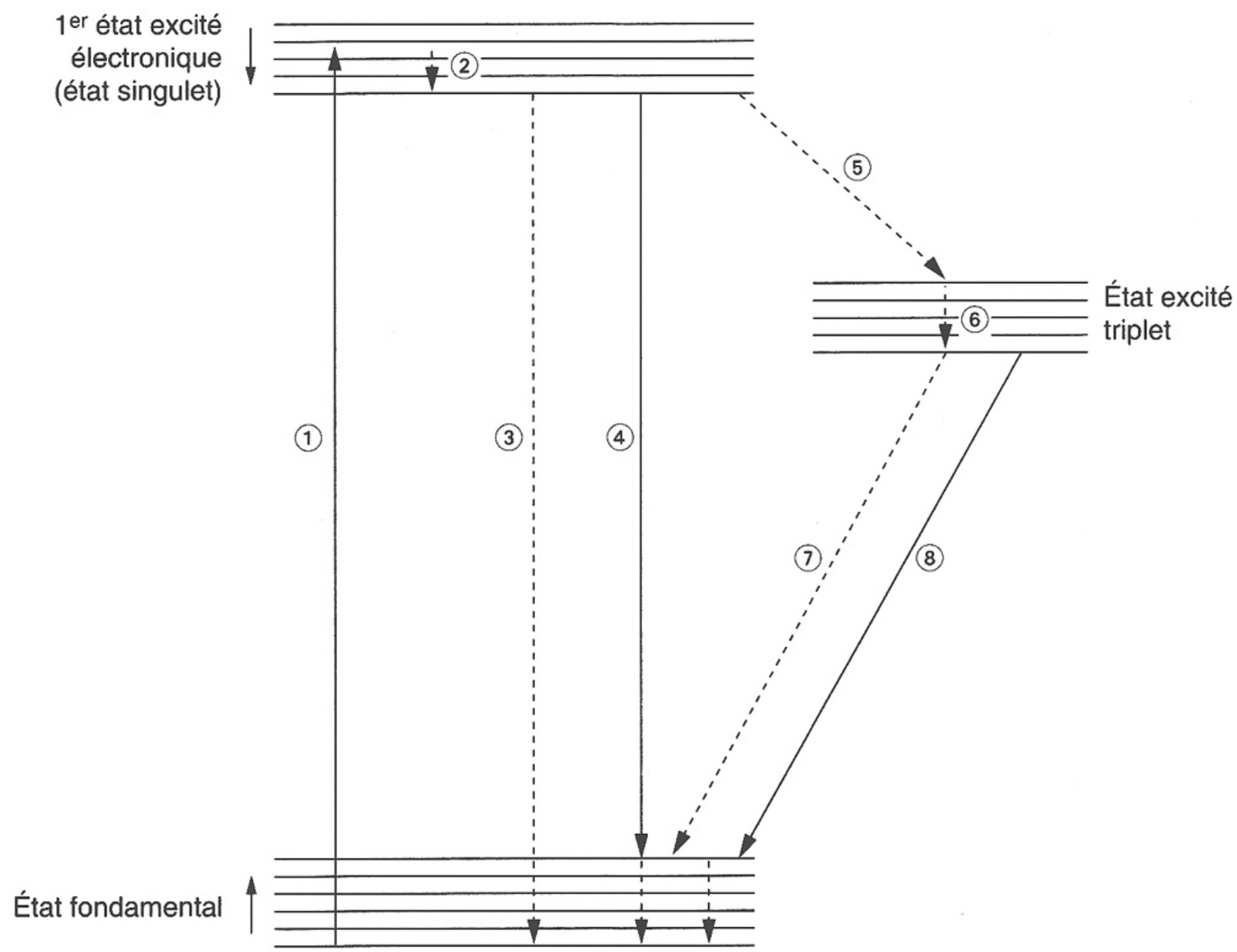
☛ **Une molécule dans l'état vibrationnel le plus bas de l'état excité (état singulet c.a.d qu'il n'y a pas eu de retournement de spin au cours de l'absorption) passe dans un état triplet, état possédant un niveau d'énergie intermédiaire entre les états fondamental et excité.**

3/ Donner un nom au processus ① à ④ :



■ Représentation simplifiée de Jablonski.

4/ Donner un nom au processus ⑤ à ⑥ :



■ Représentation simplifiée de Jablonski.

L'état triplet a une durée de vie beaucoup plus élevée que l'état singulet précédent (usuellement de 10^{-4} s à qqs min). La molécule peut alors revenir dans son état fondamental par émission d'une radiation (processus ⑧).

☛ Ce type de luminescence s'appelle phosphorescence.
La phosphorescence peut donc être définie comme étant une émission d'une radiation d'un état triplet excité à un état fondamental singulet.
☛ Le passage de l'état triplet excité à l'état singulet fondamental peut se réaliser aussi sans émission de lumière (processus ⑦).

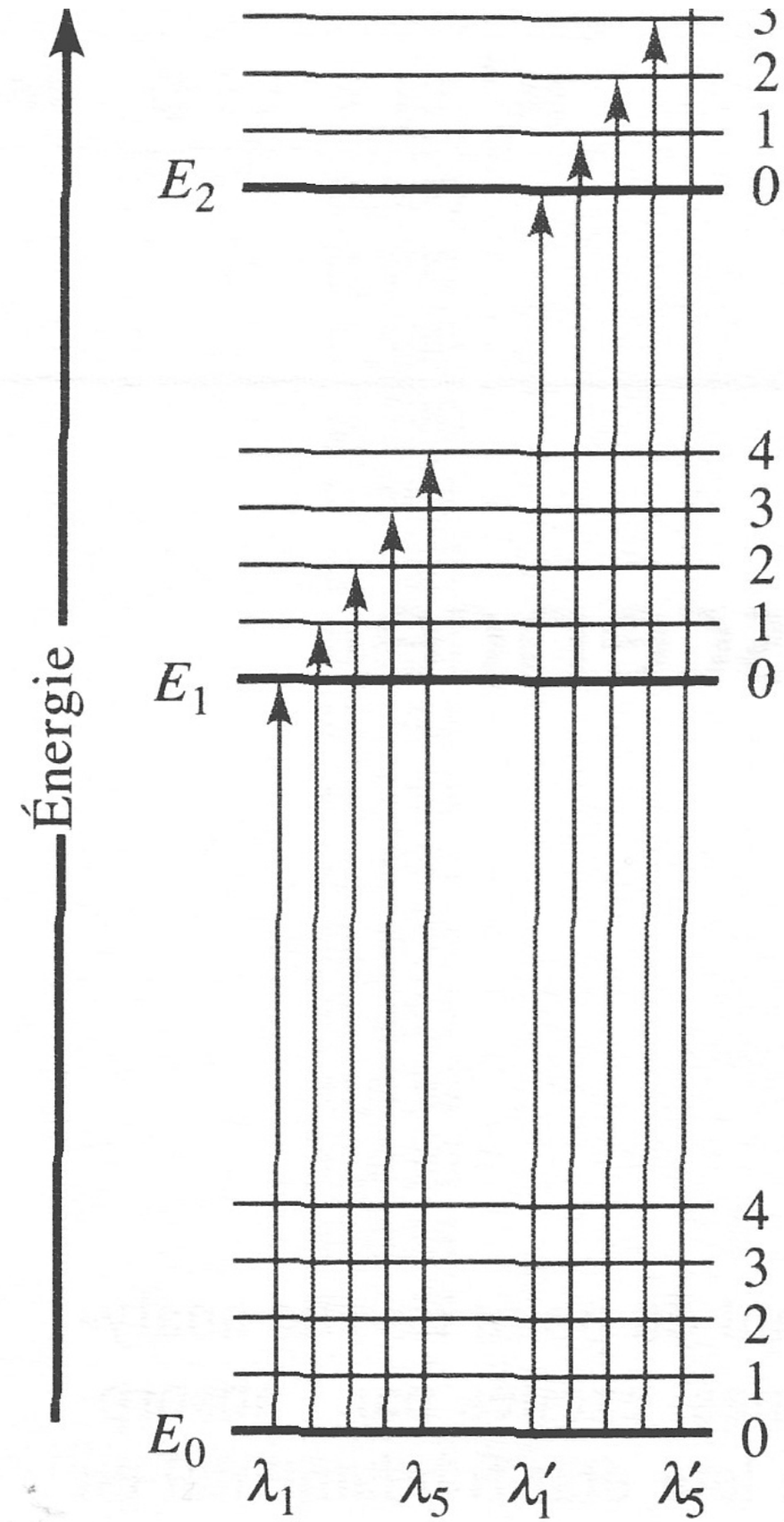
1.1 raies de résonance et déplacement de Stokes

➥ **Les raies qui limitent les deux bandes de fluorescence du côté des petites l.o (λ_1 et λ'_1), ou des grandes énergies, ont la même énergie que les deux raies λ_1 et λ'_1 du diagramme d'absorption (fig. (a)).**

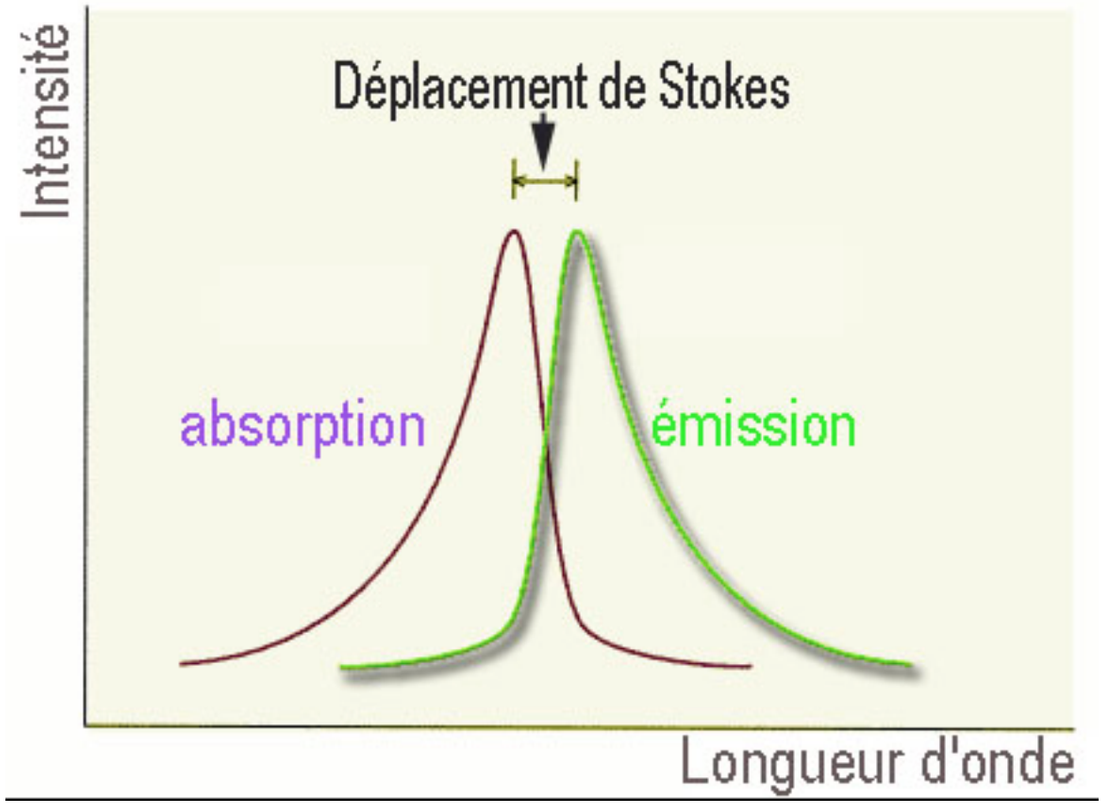
Ces raies sont appelées des <u>raies de résonance</u> parce que les l.o. de fluorescence et d'absorption sont identiques (fig. (c)).

➥ **Les bandes de fluorescence moléculaire sont essentiellement constituées de raies dont la l.o. est plus grande, ou l'énergie plus faible, que celle de la bande de rayonnement absorbé responsable de leur excitation.**

1/ En faire la démonstration mathématique :

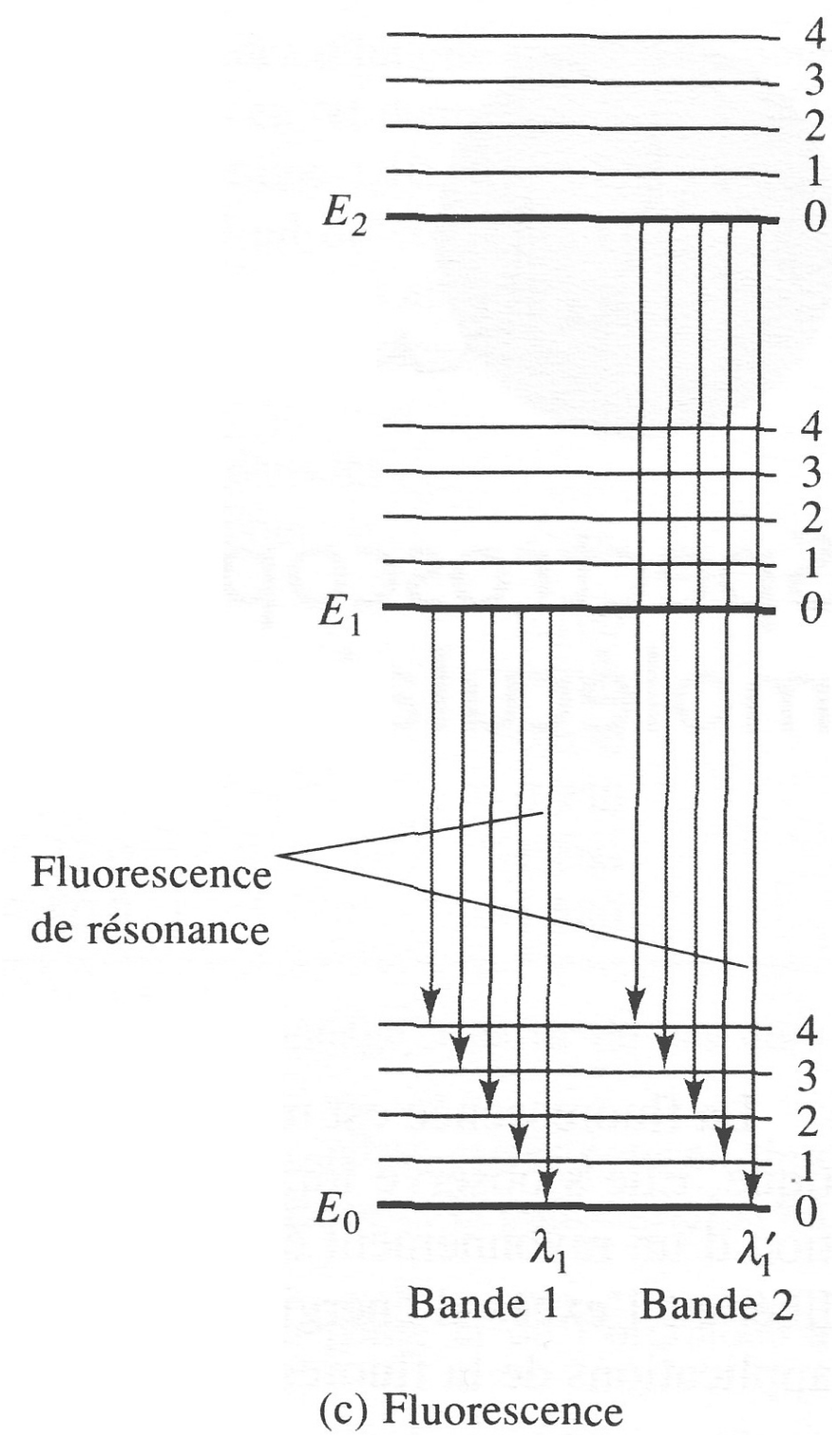


☛ **Le déplacement vers de plus grandes longueurs d'onde est appelé <u>déplacement de Stokes</u>.**



<u>Exemple</u> : L'absorption d'un rayonnement de longueur d'onde λ'_5 excite un e^- au niveau vibrationnel 4 du 2nd état électronique excité E_2.

2/ Rappeler la durée de la relaxation vibrationnelle qui permet de faire passer la molécule vers le niveau 0 de l'état E_2 :



(c) Fluorescence

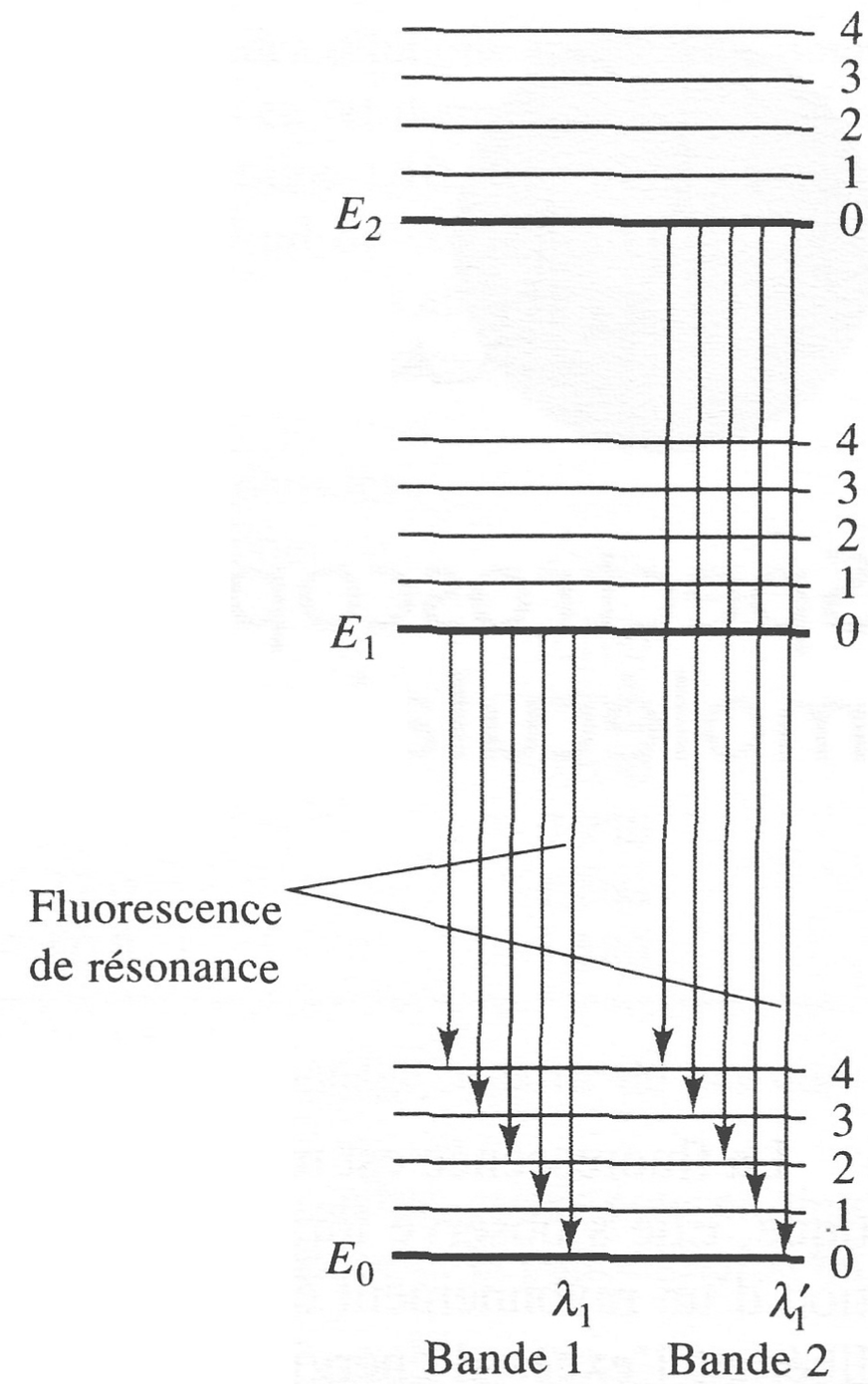
A partir de ce moment-là, 2 cas de figure peuvent avoir lieu :

➥ Dans le cas de la <u>relaxation rayonnante</u>, le retour vers n'importe lequel des niveaux vibrationnels de l'état fondamental se traduit par l'émission d'une bande de rayonnement (la bande 2).
Toutes les raies qui constituent cette bande ont des énergies inférieures, ou des longueurs d'onde supérieures, à celles de la raie d'excitation λ'_5.

➥ **Dans le cas de la conversion interne. À nouveau, la relaxation ultérieure peut suivre une voie non rayonnante ou rayonnante jusqu'à l'état fondamental. Dans ce dernier cas, on obtient la bande de fluorescence 1.**

Remarque 1 : le déplacement de Stokes se fait de l'UV vers le visible.

Remarque 2 : la bande 1 peut résulter non seulement du mécanisme qui vient d'être décrit mais également de l'absorption d'un rayonnement visible de longeurs d'onde comprises entre λ_1 et λ_5.

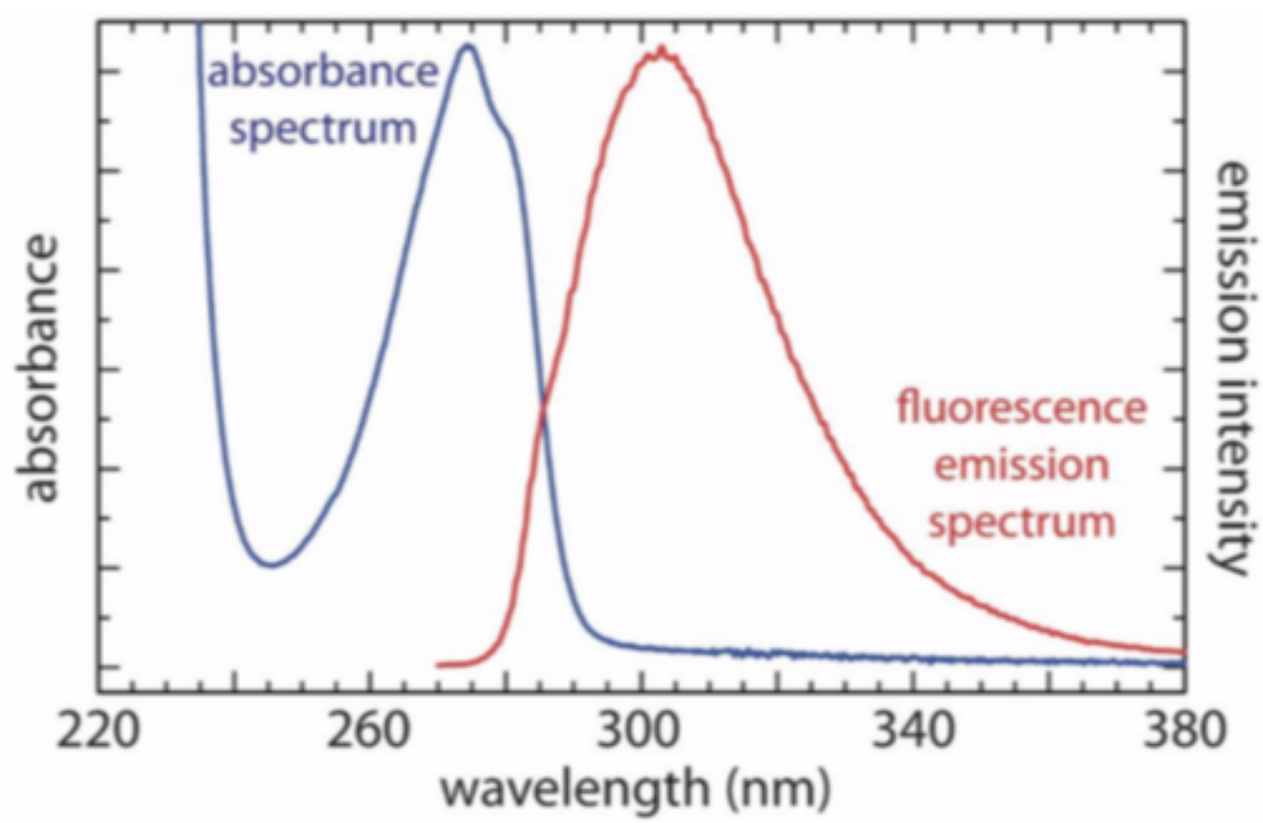


(c) Fluorescence

1.2 Quel signal ? Deux types de spectres

Spectre d'émission (ou de fluorescence) : balayage de la longueur d'onde d'émission λ_{em} en fixant la longueur d'onde d'excitation λ_{exc}.

Spectre d'excitation (ou d'absorption) : balayage de la longueur d'onde d'excitation λ_{exc} en fixant la longueur d'onde d'émission λ_{em}.



2) Les espèces fluorescentes

☛ La fluorescence est l'un des mécanismes par lequel une molécule revient à son état fondamental après avoir été excitée par l'absorption d'un rayonnement. On pourrait dès lors penser que toutes les molécules absorbantes doivent être fluorescentes.

☛ En fait, la plupart ne le sont pas, car leur structure est telle que la relaxation non rayonnante peut se produire plus rapidement que l'émission fluorescente.

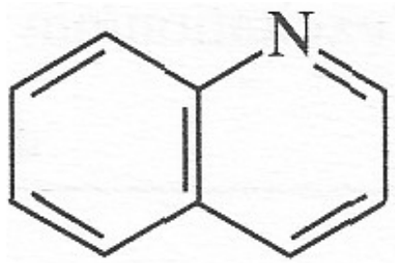
☛ Le rendement quantique de fluorescence moléculaire Φ est le rapport entre le nombre de molécules fluorescentes et le nombre totale de molécules excitées (ou le rapport entre les photons émis et les photons absorbés). Des molécules très fluorescentes comme la fluorescéine, ont des rendements quantiques proches de 1. Le rendement quantique des espèces non fluorescentes est pratiquement nul.

2.1 Fluorescence et structure

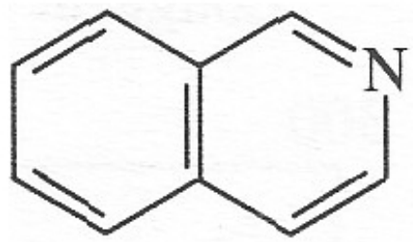
☞ **Les composés qui contiennent des noyaux aromatiques produisent l'émission fluorescente moléculaire la plus intense et donc la plus utilisée.**

☞ **La plupart des hydrocarbures aromatiques non substitués sont fluorescents en solution et le rendement quantique ↗ avec le nombre de cycles et leur degré de condensation (on parle de condensation chimique, lorsque 2 molécules se lient pour n'en former qu'une. Elle permet de constituer de grandes molécules ou polymères).**

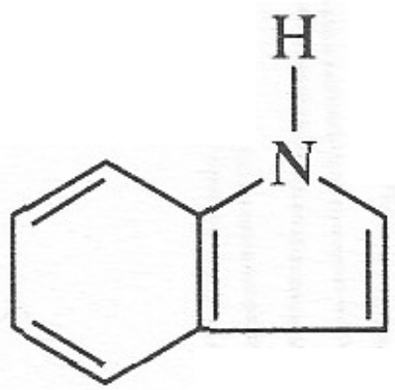
☞ **Les hétérocycles simples présentés ci-contre ne présentent pas de fluorescence, mais les structures à cycles accolés contenant ces hétérocycles fluorescent la plupart du temps.**



quinoléine

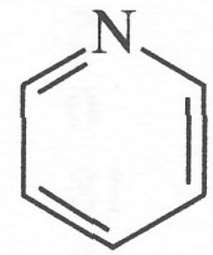


isoquinoléine

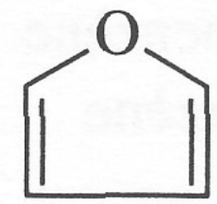


indole

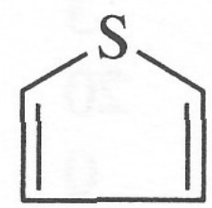
Quelques exemples de molécules aromatiques qui sont fluorescentes.



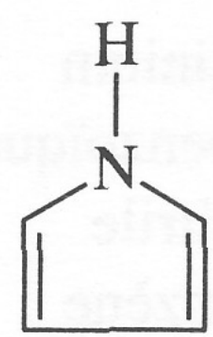
pyridine



furane



thiophène



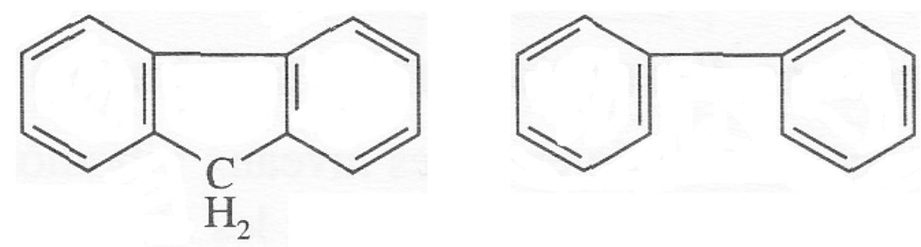
pyrrole

Quelques exemples de molécules aromatiques qui ne sont pas fluorescentes.

2.2 Effet de la rigidité

☛ **On a constaté expérimentalement que la fluorescence est particulièrement intense si la molécule est rigide.**

Exemple ci-contre, cette différence de comportement est due pour l'essentiel à l'↗ de rigidité qui résulte du pontage par le groupement méthylène dans le fluorène.



fluorène
$\Phi \rightarrow 1$

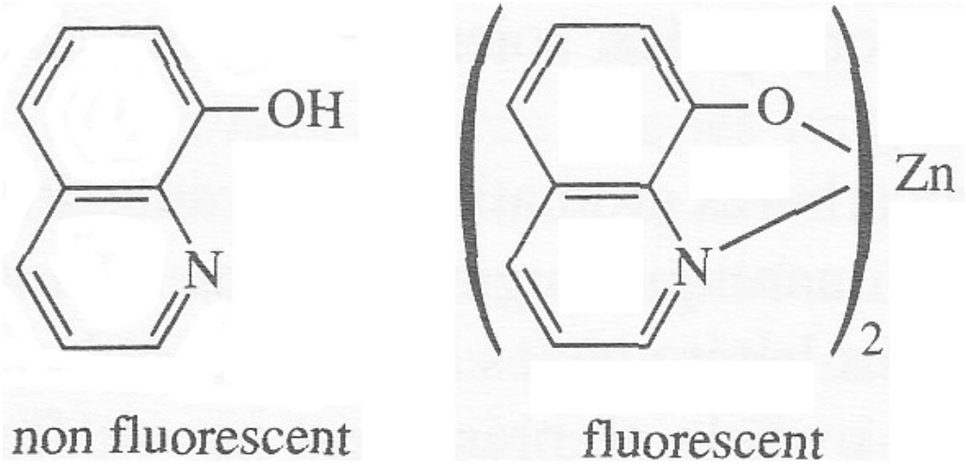
biphényle
$\Phi \rightarrow 0{,}2$

Effet de la rigidité sur le rendement quantique

☛ **Cette rigidité ↘ la vitesse de relaxation non rayonnante au point que la relaxation par fluorescence à le temps de se produire.**

☛ **On peut citer de nombreux exemples semblables. L'émission ↗ souvent lorsque le colorant fluorescent est adsorbé sur une surface solide ; la rigidité supplémentaire imposée par le solide peut ici aussi expliquer l'effet observé.**

☛ **Le facteur rigidité a également été invoqué pour expliquer l'↗ de fluorescence de certains agents chélatants organiques après qu'ils aient formé un complexe avec un ion métallique.**



C'est ainsi que l'intensité de fluorescence de l'hydroxy-8-quinoléine est beaucoup plus faible que celle de son complexe avec le zinc.

Effet de la rigidité sur la fluorescence.

2.3 Effet de température et de solvant

1/ Expliquer pourquoi lorsque la température du milieu ↗, le rendement quantique ↘.

2/ Que se passe-t-il si la viscosité du solvant ↘ ?

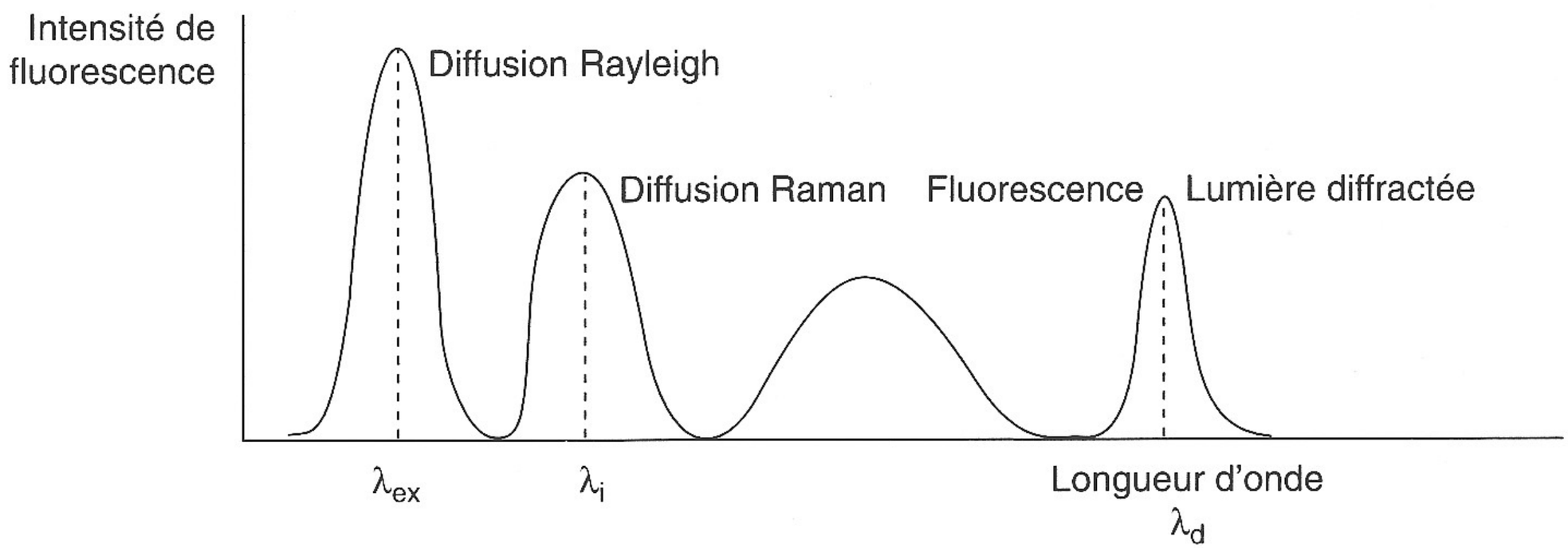
☛ Le solvant peut aussi :

• absorber le rayonnement incident et ↘ l'intensité I_0;
• absorber la radiation de fluorescence (effet de filtre interne);

☛ Le solvant peut aussi :

• diffuser la lumière incidente :

➥ l'irradiation d'un solvant par une lumière monochromatique excitatrice provoque des interactions entre les photons et les e^- des molécules de solvant. Elles se traduisent par l'émission d'une lumière diffuse polychromatique (figure ci-dessous) :



■ Spectre de fluorescence [la diffraction de la lumière sur les réseaux est à l'origine de la raie de longueur d'onde $\lambda_d = 2\ \lambda_{ex}$ (harmonique ou raie du 2e ordre)].

➥ d'une raie intense de même longueur d'onde que la lumière excitatrice, c.a.d que les photons diffusés par les e^- des molécules de solvant ont la même énergie que les photons du rayonnement incident : on parle alors de diffusion Rayleigh (choc élastique);

➥ d'une série de raies moins intenses (10 à 1000 fois plus faibles que la raie Rayleigh) dont la fréquence correspond à $v_i = v_{ex} \pm \Delta v$. Ce phénomène, appelé diffusion Raman, chiffre la différence d'énergie entre les photons absorbés et les photons réémis par le solvant.

Dans la diffusion Raman, la lumière incidente peut avoir une fréquence quelconque. Les raies $v_i = v_{ex} \pm \Delta v$ perturbent le spectre de fluorescence surtout si celle-ci est faible. Pour limiter l'interférence de la diffusion Raman, il convient d'avoir un déplacement de Stokes le plus élevé possible.

Remarque : la détermination des longueurs d'onde des émissions Rayleigh et Raman constitue un test de sensibilité en fluorimétrie.

Par exemple, dans l'eau si l'excitation a lieu à 254 nm, le pic Raman se situe à 278 nm.

II - Expression de l'intensité de fluorescence en fonction de la concentration

Si $A = \varepsilon.b.C < 0,05$ l'intensité de fluorescence F s'écrit :

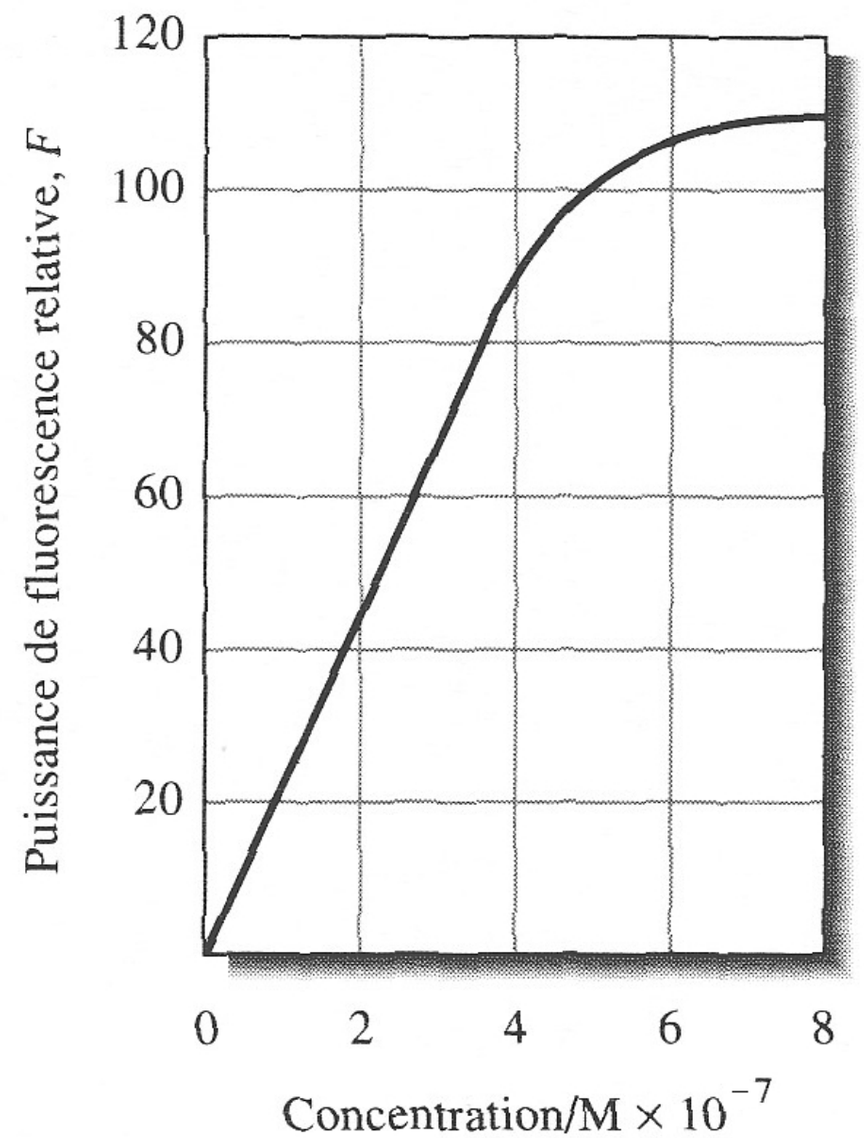
$$F = 2,3.K'.P_0.\varepsilon.b.C \quad \text{ou, à } P_0 \text{ constant,} \quad F = K.C$$

La constante K' dépend du rendement quantique de la fluorescence.
On rappelle que P_0 est la puissance lumineuse incidente fournie par la source lumineuse ;
ε est le coefficient d'absorption molaire, b le chemin optique et C la concentration de la molécule fluorescente dans le milieu.

☛ Le graphique F = f(C) est linéaire aux faibles concentration. Lorsque C devient assez grand pour que A ≥ 0,05 (Ou T ≤ 95 %), la relation cesse d'être linéaire et F est inférieur aux valeurs tirées de la droite extrapolée.

☛ Cet effet résulte de l'auto-désactivation (self-quenching).

☛ C'est un phénomène où des molécules absorbent la fluorescence émise par d'autres; il arrive même que F atteigne un maximum et se mette ensuite à ↘ à mesure que C ↗.

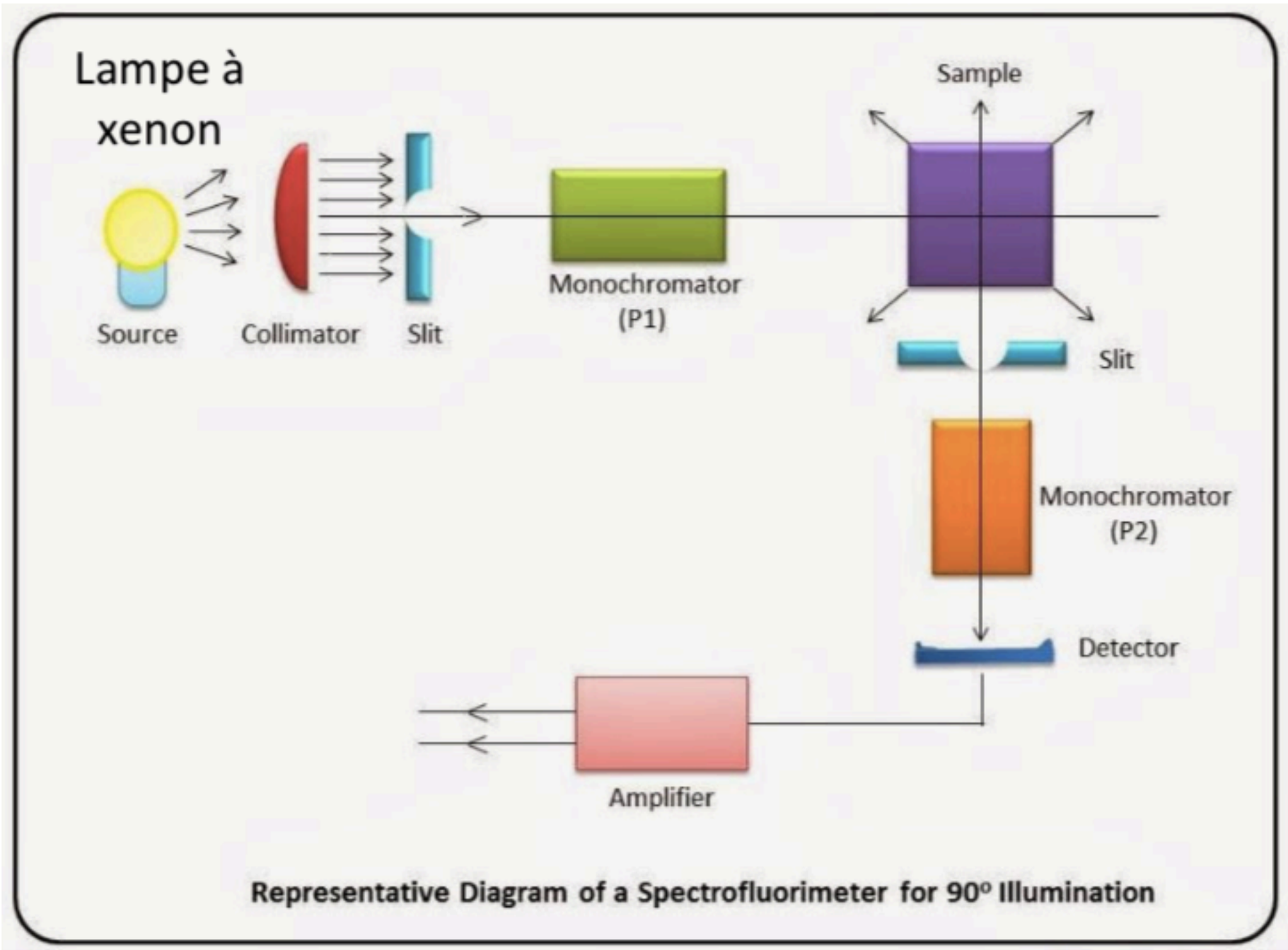


Courbe d'étalonnage pour le dosage spectrofluorimétrique du tryptophane dans les protéines solubles extraites du cristallin d'un œil de mammifère.

III - Les appareils de fluorescence

☛ **Un fluorimètre, tout comme un photomètre, utilise des filtres comme sélecteur de longueurs d'onde.**

☛ **Synoptique d'un spectrofluorimètre**



☛ **Le faisceau de l'échantillon traverse d'abord un monochromateur primaire P_1 (monochromateur d'excitation) qui transmet le rayonnement qui provoque la fluorescence.**

Le rayonnement fluorescent est émis par l'échantillon dans toutes les directions, mais il s'observe le plus facilement perpendiculairement au faisceau incident ; aux autres angles, l'↗ de la diffusion lumineuse par la solution et par les parois de la cellule peut conduire à des erreurs importantes sur la mesure de l'intensité.

☛ **Le rayonnement émis atteint un détecteur photoélectrique après avoir traversé un monochromateur secondaire P_2 (monochromateur d'émission) qui isole le pic de fluorescence sélectionné par la mesure.**

☛ **La complexité, les performances et le coût des fluorimètres et des spectrofluorimètres diffèrent autant que ceux des appareils équivalents utilisés pour les autres méthodes.**

IV - Applications des méthodes de fluorescence

☛ Les méthodes de fluorescence sont 10 à 1000 fois plus sensibles que les méthodes d'absorption, parce que la sensibilité de la fluorimétrie peut être accrue en ↗ la puissance du rayonnement d'excitation et en amplifiant le signal du détecteur.

☛ Par contre, aucune de ces options n'améliore la sensibilité des méthodes d'absorption parce que le paramètre lié à la concentration est un rapport :

$$C = k.A = k.\log(P_0/P)$$

☛ L'↗ de P_0 ↗ proportionnellement P et n'a donc aucun effet sur la sensibilité. De même, le taux d'amplification du signal issu du détecteur affecte les 2 quantités mesurées de manière identique, ce qui n'entraîne aucun avantage.

1) Méthodes utilisées pour les espèces inorganiques

Ion	Réactif	Longueur d'onde/nm		Sensibilité /$\mu g \cdot ml^{-1}$	Interférence
		Absorption	**Fluorescence**		
Al^{3+}	Rouge d'alizarine R	470	500	0,007	Be, Co, Cr, Cu, F^-, NO_3^-, Ni, PO_4^{3-}, Th, Zr
F^-	Complexe d'Al du rouge d'alizarine R (désactivation)	470	500	0,001	Be, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, PO_4^{3-}, Th, Zr
$B_4O_7^{2-}$	Benzoïne	370	450	0,04	Be, Sb
Cd^{2+}	(*o*-Hydroxyphényl)-2-benzoxazole	365	bleu	2	NH_3
Li^+	Hydroxy-8-quinoléine	370	580	0,2	Mg
Sn^{4+}	Flavanol	400	470	0,1	F^-, PO_4^{3-}, Zr
Zn^{2+}	Benzoïne	–	vert	10	B, Be, Sb, ions colorés

*D'après *Handbook of Analytical Chemistry*, L. Meites, Ed. p. **6**-178 à **6**-181. New York : McGraw-Hill, 1963.

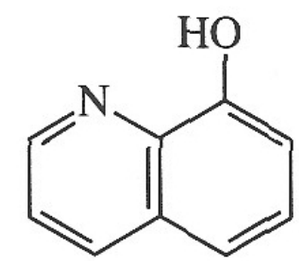
Elles sont de 2 types :

- **Méthodes directes : elles sont basées sur la réaction de l'analyte avec un agent chélatant pour former un complexe fluorescent.**

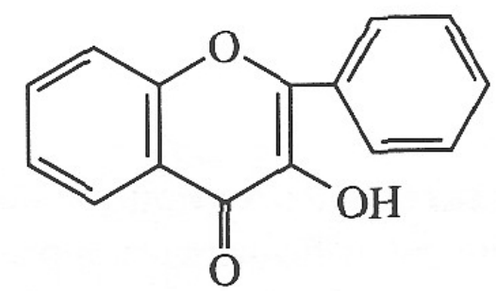
• **Méthodes indirectes : elles dépendent de la ↘ ou désactivation (quenching) de la fluorescence d'un réactif causée par sa réaction avec l'analyte. La désactivation est surtout utilisée pour le dosage des anions.**

☛ **Les meilleurs réactifs fluorimétriques disponibles pour doser les cations sont des composés aromatiques qui possédent au moins 2 groupements fonctionnels donneurs permettant de former un chélate avec l'ion métallique, comme, par ex., l'hydroxy-8-quinoléine.**

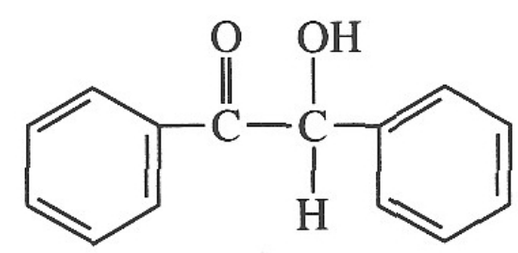
Remarque : La relaxation non rayonnante des chélates des métaux de transition est tellement efficace que ces espèces sont rarement fluorescentes. Il faut souligner que la plupart de ces métaux absorbent par contre dans l'UV ou le visible. Pour cette raison, la fluorimétrie et la spectrophotométrie sont souvent complémentaires en tant que méthodes de dosage des cations.



hydroxy-8-quinoléine
(réactif de Al, Be et d'autres ions métalliques)



flavanol
(réactif de Zr et Sn)



benzoïne
(réactif de B, Zn, Ge et Si)

Quelques réactifs fluorimétriques de cations.

2) Méthodes utilisées pour les espèces organiques et biochimiques

☛ **Le nombre d'applications des méthodes fluorimétriques au dosage de substances organiques est impressionnant.**

<u>Exemple</u> :

- **l'adénine, l'acide anthranilique, des hydrocarbures polycycliques aromatiques, la cystéine, la guanidine, l'indole, des naphtols, des protéines, l'acide salicylique, le scatole, le tryptophane, l'acide urique et le warfarin.**

- **Des produits médicaux tels que l'adrénaline, l'alkylmorphine, la chloroquine, la digitaline, la diéthylamide de l'acide lysergique (LSD), la pénicilline, le phénolbarbital, la procaïne et la réserpine.**

<u>Remarque</u> : Les applications principales de la fluorimétrie concernent surtout l'analyse des produits alimentaires, des produits pharmaceutiques, des prélèvements médicaux et des produits naturels. La sensibilité et la sélectivité de la méthode en font un outil particulièrement bien adapté à ces domaines.