

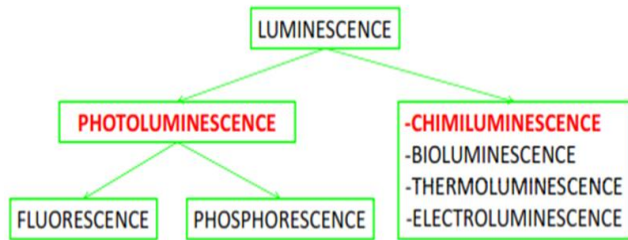
FLUORESCENCE

Plan

Introduction I. Définition II. Principe III. Aspect du spectre IV. Caractéristiques de l'émission de fluorescence V. Les espèces fluorescentes VI. Phénomènes d'inhibition VII. Appareillage VIII. Applications Conclusion

INTRODUCTION

La luminescence est la propriété qu'ont certaines substances de restituer sous forme de photons (UV-VIS-IR) d'origine non thermique (l'incandescence = lumière chaude) une partie de l'énergie absorbée au cours d'une excitation de type divers. Il s'agit donc de la désactivation d'une molécule excitée vers un état énergétique moins élevé



I. DEFINITION

La fluorescence est un processus important du point de vue analytique. Elle s'observe lorsque des atomes ou des molécules, excités par l'absorption d'un rayonnement électromagnétique (visible ou du proche ultraviolet), reviennent à leur état fondamental en libérant l'excès d'énergie sous forme de photons

➤ **Fluorescence atomique (de résonance):**

-atomes en phase gazeuse

$$\lambda_A = \lambda_F$$

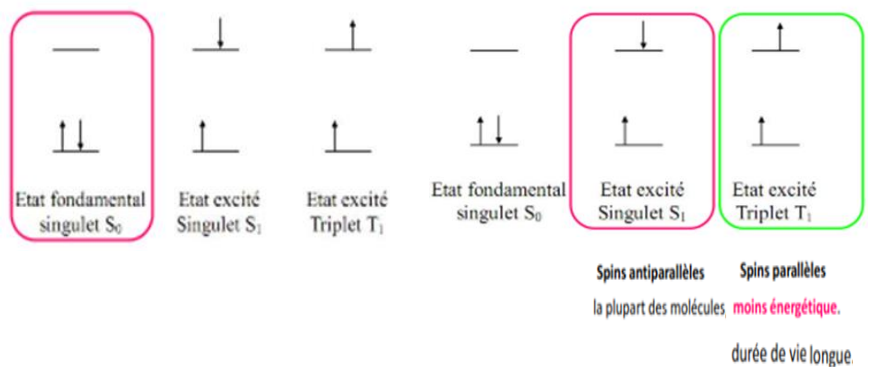
-analyse de traces de métaux dans, l'eau de mer, les substances biologiques ou les échantillons agricoles: particulièrement sensible à la présence de zinc, de mercure et de sélénium.

➤ **Fluorescence moléculaire:** $\lambda_A < \lambda_F$

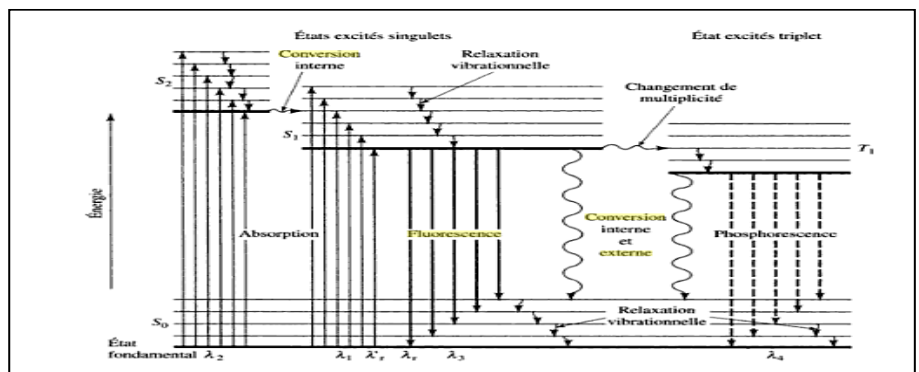
II. PRINCIPE

-Selon le principe de Pauli les électrons doivent se différencier par leur état de spin

-A l'état excité il y a deux possibilités d'orientation des spins



-Cet état est instable et l'E de molécule diminue pour retourner l'état fondamental.



Transitions non radiatives:

1) Relaxation vibrationnelle: collision entre molécules excitées et molécules du solvant (chaleur) 10^{-12} - 10^{-10} s

2) Conversion interne: transition entre deux états électroniques de même multiplicité. Elle se fait entre le niveau vibrationnel inférieur de S2 et un niveau vibrationnel supérieur de S1 (chaleur) 10^{-11} - 10^{-9} s

3) Conversion externe: chocs de la molécule excitée avec les molécules du solvant ou autres molécules (diminuée par la viscosité et T°)

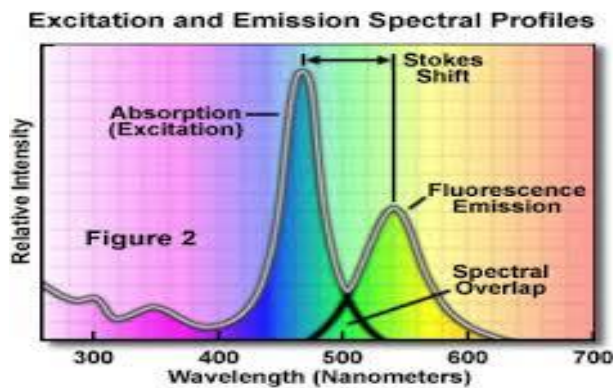
4) Conversion intersystème: la transition non radiative d'un état singulet vers un état triplet: le spin de l'électron excité est inversé. 10^{-10} - 10^{-8} s

III. Aspect du spectre:

-Le spectre d'excitation d'un fluorophore:

Correspond aux longueurs d'ondes pour lesquelles un fluorochrome excité réémet une partie de cette énergie sous forme de lumière. En général le spectre est centré sur un pic qui correspond à la longueur d'onde optimale pour exciter le fluorochrome.

Expérimentalement on mesure la variation de l'intensité d'émission en fonction de la longueur



Transitions radiatives:

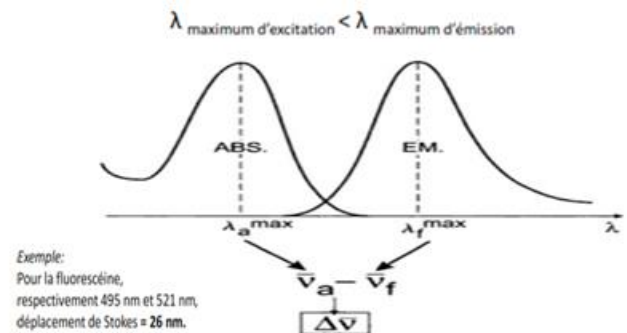
1) fluorescence: les molécules retournent dans un des états vibrationnels de l'état S0 initial en émettant des photons

Seules les transitions $\pi \rightarrow \pi^*(+++)$ et $n \rightarrow \pi^*$ donnent lieu à une fluorescence

2) phosphorescence: si la relaxation vibrationnelle est assez lente, le retournement de spin de l'électron conduit à un état T1 un peu plus stable (état triplet). De ce fait, le retour ultérieur au niveau fondamental est ralenti puisqu'il implique un nouveau retournement du spin de cet électron. Les durées de vies peuvent dépasser plusieurs minutes

-Le spectre d'émission d'un centre émetteur donne la variation de l'intensité de l'émission en fonction de la longueur d'onde d'émission pour une longueur d'onde d'excitation donnée. Le spectre d'émission est en général décalé vers les basses énergies par rapport au spectre d'excitation: c'est le décalage de Stokes.

La différence entre le maximum d'excitation et d'émission est appelée le déplacement de Stokes



IV. Caractéristiques de l'émission de fluorescence

Rendement quantique (efficacité de fluorescence):

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

$$\Phi_f = \frac{k_f}{k_f + k_{isc} + k_d}$$

Rendement quantique relatif:

Le rapport entre le rendement quantique de la molécule étudiée et celui du sulfate de quinine en milieu acide ($\phi_q = 0,55$).

$$\frac{\phi_x}{\phi_q} = \frac{I_{Fx}}{I_{Fq}}$$

Intensité de fluorescence :

$$I_f = 2,3 \cdot \Phi_f \cdot I_0 \cdot A \quad \text{soit} \quad I_f = 2,3 \cdot \Phi_f \cdot I_0 \cdot \epsilon \cdot \ell \cdot c$$

Durée de vie:

➤ Durée de vie de l'état singulet:

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_{isc} + k_d}$$

➤ Durée de vie de fluorescence:

$$\tau_f = \frac{1}{k_F}$$

$$\tau = \Phi_f \tau_f$$

V. Les espèces fluorescentes

les molécules les plus fluorescentes sont:

- Des polycycles aromatiques → structure plane et rigide (+++)

- Composés carbonylés aliphatiques et alicycliques, structures à nombreuses doubles liaisons conjuguées (--)

☐ Composés minéraux:

Minéraux à la "fluorescence intrinsèque": Scheelite; Powellite; Cérussite; Autunite...

Minéraux à "fluorescence activée": Adamite et Opale (activés par l'ion Uranyl); Halite et Calcite (activés par les ions manganèse Mn^{2+}); Rubis (activé par les ions chrome Cr^{3+})...

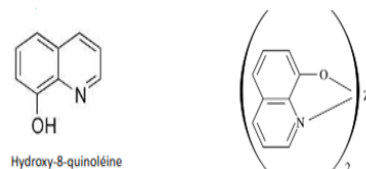
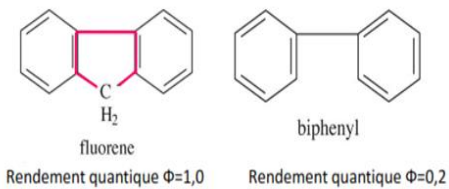
☐ Composés organiques:

Adénine, cystéine, guanidine, acide salicylique, acide urique, pénicilline, adrénaline, LSD, chlorophylle, flavonoïdes
.....

Effet de la rigidité structurale:

La fluorescence est intense si la molécule est rigide → Augmentation du pontage

↓
Diminution de la vitesse de relaxation non rayonnante et la fluorescence a le temps de se produire

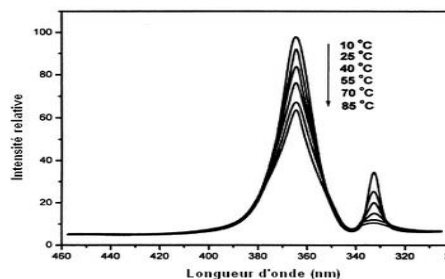


Effet de la température et la viscosité:

-T ↑ → rendement quantique ↓

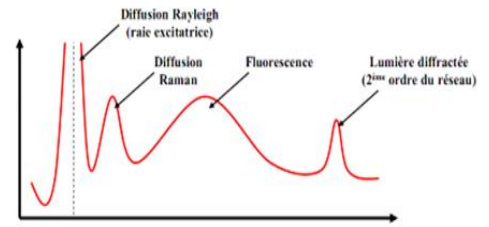
↓
Collision ↑ → relaxation par collisions ↑

- viscosité ↓ → même résultat



Effets de solvant:

- modification de la Fluo par ses caractéristiques (viscosité, IR)
- Absorber le rayon incident et diminuer I_0
- Absorber la radiation de fluo
- Diffuser la lumière incidente: Diffusion Rayleigh Diffusion Raman



VI. Phénomènes d'inhibition

1-Phénomènes internes.

1.1. Effet de filtre interne

1- L'intensité de la lumière excitatrice décroît en fonction de l'épaisseur de la solution traversée (concentration). Si la concentration est importante, l'intensité décroît et les molécules reçoivent d'autant moins d'énergie qu'elles sont plus éloignées de la face externe.

2- La lumière émise par les molécules, doit traverser une fraction de la solution. La réabsorption est d'autant plus importante que la concentration est forte : elle ne peut être négligée que dans le cas des solutions très diluées.

1.2. Photodécomposition:

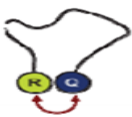
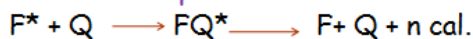
Augmenter trop fortement l'intensité (ou le temps d'irradiation) de la source excitatrice : destruction et l'intensité de fluorescence décroît.

1.3. Nature des substituants de la molécule:

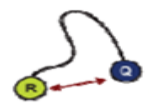
La nature des substituants peut, soit être sans effet sur la capacité de fluorescence d'une molécule, soit avoir un effet inhibiteur, soit au contraire, augmenter celle-ci

2. Phénomènes externes (Quenching) :

2.1. Inhibition par collision:

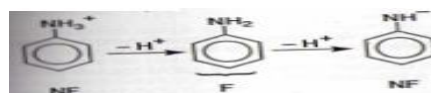


2.2. Inhibition sans collision.



2.3. Nature du solvant.

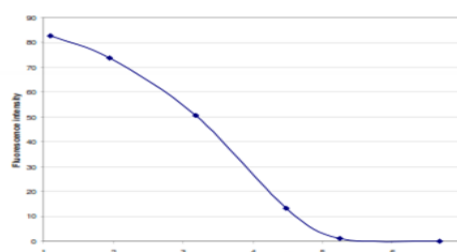
Le solvant peut avoir pour effet de modifier les niveaux énergétiques des molécules. Il peut favoriser ou au contraire inhiber la fluorescence. Par exemple la quinoléine n'est pas fluorescente en milieu apolaire alors qu'elle est fluorescente en milieu polaire



2.4. Influence du pH:

-Les acides faibles et les bases faibles sont dissociés ou non selon le pH du milieu réactionnel. La modification de structure qui résulte de la variation du pH retentit sur la fluorescence.

Effet de pH sur la fluorescence de la quinoléine

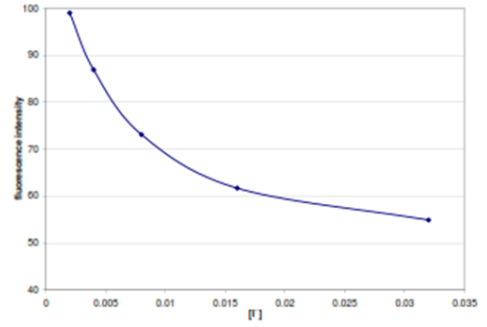


-Le graphe $IF = f(\text{pH})$ présente un aspect analogue à la courbe de neutralisation d'une base faible qui présente un point d'inflexion à la valeur $\text{pH} = \text{pK}$

Substances inhibitrices:

- Les cations correspondant aux métaux de transition qui sont en général colorés absorbent de l'énergie et inhibent la fluorescence.
- Il en est de même des ions halogènes dont l'effet inhibiteur augmente avec le poids atomique.
- Les ions sulfate et nitrate ne sont pas inhibiteurs.
- L'oxygène dissous inhibe la fluorescence (oxydation). Il est possible d'éliminer cette interférence en chassant celui-ci par barbotage d'azote

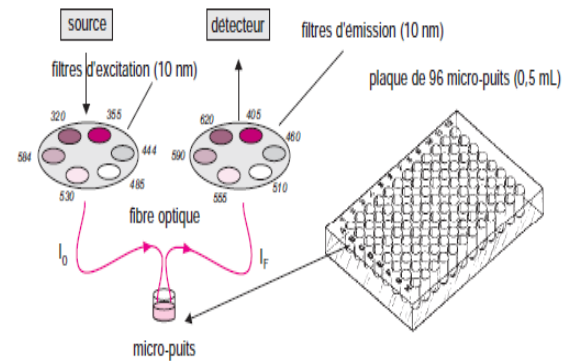
Effet de la présence d'atomes lourds sur la fluorescence de quinine



VII. Appareillage

Fluorimètres à rapport de fluorescence (méthode ratiométrique)

- La lumière émise le monochromateur d'excitation
- la fluorescence émise par le composé (partie) est captée dans une direction perpendiculaire ou parallèle (selon les modèles) au faisceau incident.
- le monochromateur d'émission sélectionne la longueur d'onde de mesure.
- appareils sont de type monofaisceau.
- compartiment à tourelle : cuves contenant les solutions étalons, l'échantillon, et standard fluorescent. (élimination des fluctuations de la lampe)
- Les standards courants : sulfate de quinine, de rhodamine B ou de 2-aminopyridine.



Spectrofluorimètres

- Disposent de deux monochromateurs motorisés pouvant balayer chacun une bande spectrale: spectre d'émission en maintenant la longueur d'onde d'excitation fixe, et spectre d'excitation en maintenant la longueur d'onde d'émission fixe.

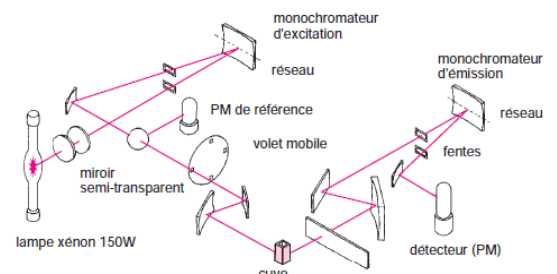


Schéma du spectrofluorimètre Shimadzu F-4500.

Source:

Spectrofluorimètre	Fluorimètre
<p>Source continue</p> <p>Lampe à arc électrique = à arc à xénon à haute pression</p> <ul style="list-style-type: none"> •200-800 nm (très intense UV) •150-800W •Durée de vie: 2000 heures 	<p>Lampe à vapeur de mercure à basse pression</p>
<p>Source laser</p>	

Cuves: en quartz synthétique

Détecteur: photomultiplicateur ou barrettes diodes

VIII. Applications

Qualitatives:

Qualitatives:

-plus précise que l'UV/VIS (superposition de spectres d'émission et d'excitation)

-sélectivité:

- une seule longueur d'onde max d'excitation et d'émission par molécule dans un solvant
- p/r à l'UV, car toutes les molécules qui absorbent ne fluorescent pas (atout en présence d'impuretés)

-fluorescence 3D (mélanges)

Quantitatives:

-la quantité de substance est de l'ordre du microgramme par prise d'essai

-limite de détection: 10^{-9} mol.l⁻¹

Etudes des substances végétales:

-chlorophylle, huiles, flavonoïdes.....

Imagerie moléculaire de fluorescence (biomédical)

-visualiser les molécules qui dépassent la limite de résolution du microscope optique

-Diag clinique : immuno, microbio, pathologie, cytogénétique

Microscopie de fluorescence résolue dans le temps

-Extraire des informations sur le fluorophore et son environnement (interactions entre protéines)

Détecteur en HPLC (seuils de détection extrêmement bas, de l'ordre de l'attomole (10^{-18} M))

- A la sortie de colonne

-Electrophorèse Cap

Analyse des produits alimentaire	Pharmacie	Biochimie
Constituants azotés/protéines, AA	Anesthésique	Enzymes
Vitamines	Analgésique	Coenzymes
Additifs/antifongiques	Neuroleptique	AA
Résidus de pesticides	Tranquillisants	Vitamines
Mycotoxine	Cardiotoniques	
	Diurétique	
	Hormones	
	Stéroïdes	
	Sulfamides	
	Antibiotiques	

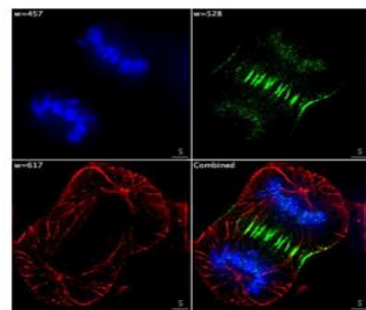
Identification des principes actifs « matières premières »:
Exemple :
A: IR
B:CCM
C:Fluorescence
D: Réaction des chlorure

IDENTIFICATION
Première identification : A, D.
Seconde identification : B, C, D.

01/2008:0651
AMILORIDE (CHLORHYDRATE D')
Amiloridi hydrochloridum

NC1=NC2=C(N1)N(C(=O)N2)C(=O)N · HCl · 2 H₂O
C₁₀H₁₄Cl₂N₄O₂ · 2H₂O [1741083-4] M, 302,1

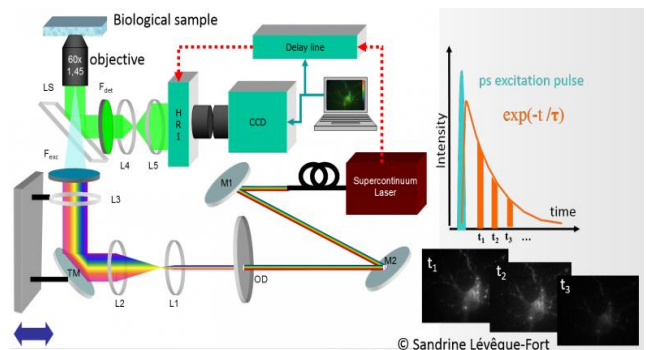
C. Dissolvez environ 10 mg de chlorhydrate d'amiloride dans 10 ml d'eau R. Ajoutez 10 ml d'une solution de citrimide R à 200 g/l, 0,25 ml de solution diluée d'hydroxyde de sodium R et 1 ml d'eau de brome R. Il apparaît une coloration jaunâtre... Ajoutez 2 ml d'acide chlorhydrique dilué R. La coloration vire au jaune foncé et la solution présente une fluorescence bleue en lumière ultraviolette à 365 nm.



Exemple : L'étude de la dynamique structurale et moléculaire des cellules vivantes.

La microscopie en fluorescence est également importante pour identifier les minéraux, contaminants et impuretés fluorescents dans la science des matériaux, la géologie, l'inspection des semi-conducteurs et la protection de l'environnement.

Une mise en évidence observée au microscope à épifluorescence grâce à différents fluorochromes (l'ADN en bleu, la tubuline en rouge et une protéine centromérique en vert). © F. Lamion, CC by-sa 3.0



Conclusion

La spectrofluorimétrie est une méthode sensible et spécifique qui est utilisée, aussi bien dans le contrôle de qualité, qu'en biochimie, ou dans l'étude du métabolisme des médicaments.