



UE5C : Sciences Analytiques – Techniques spectrales

Spectrophotométrie électronique

Spectrométrie de Fluorescence moléculaire

**université
PARIS-SACLAY**

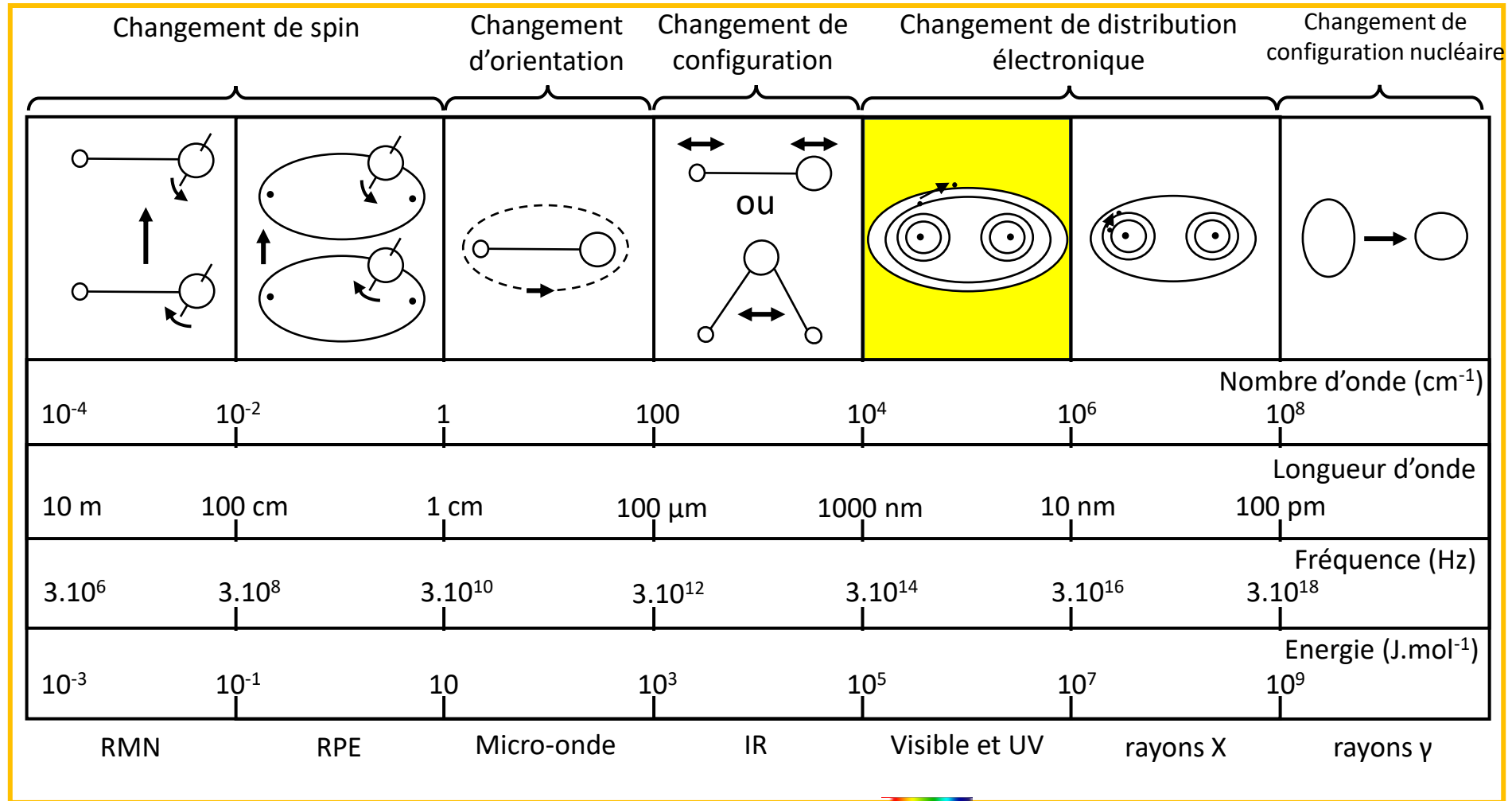
**FACULTÉ DE
PHARMACIE**

Ali TFAYLI

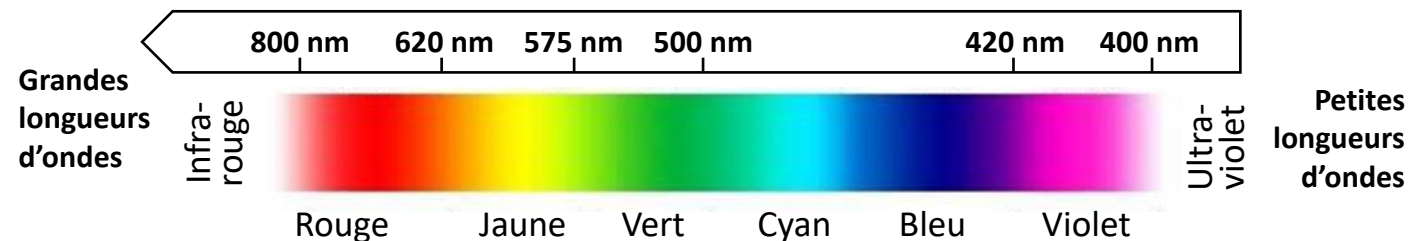
cours 2

ali.tfayli@universite-paris-saclay.fr

Spectroscopies optiques moléculaires dans l'uv-visible



C.N. Banwell, *Fundamentals of Molecular spectroscopy*, 3rd edition, New York; McGraw-Hill 1983, P7



Plan

- Introduction
 - Spectroscopies d'émission moléculaires
- Théorie de la fluorescence
- Les spectres de fluorescence
- Quantification de la fluorescence
 - Rendement quantique
 - Intensité de la fluorescence
 - Durée de vie de la fluorescence
- Effet de la structure des molécules fluorescentes
- Facteurs influençant la fluorescence
- Appareillage
- Applications

Introduction: Emission moléculaire

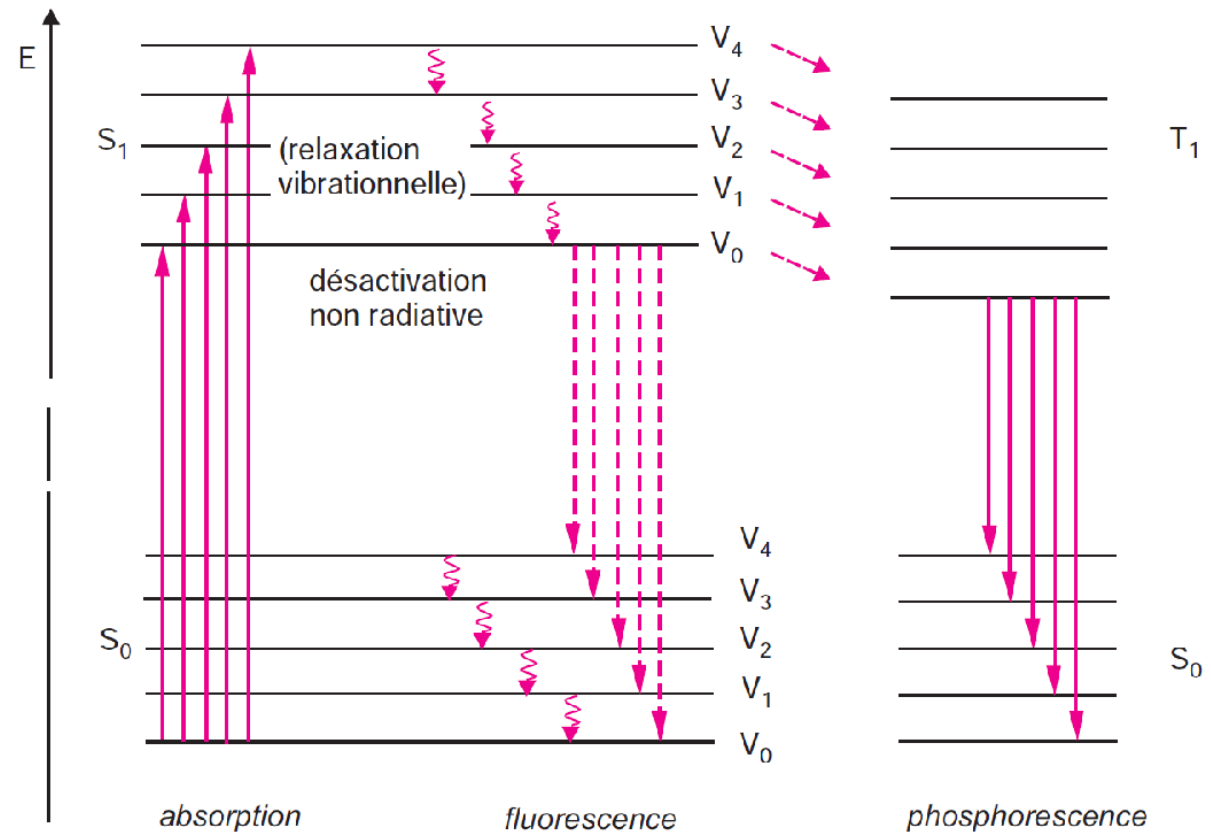
Principe général

L'émission moléculaire est un phénomène qui peut être observé quand les espèces excitées **reviennent à l'état fondamental en libérant l'excès d'énergie sous forme de photons.**

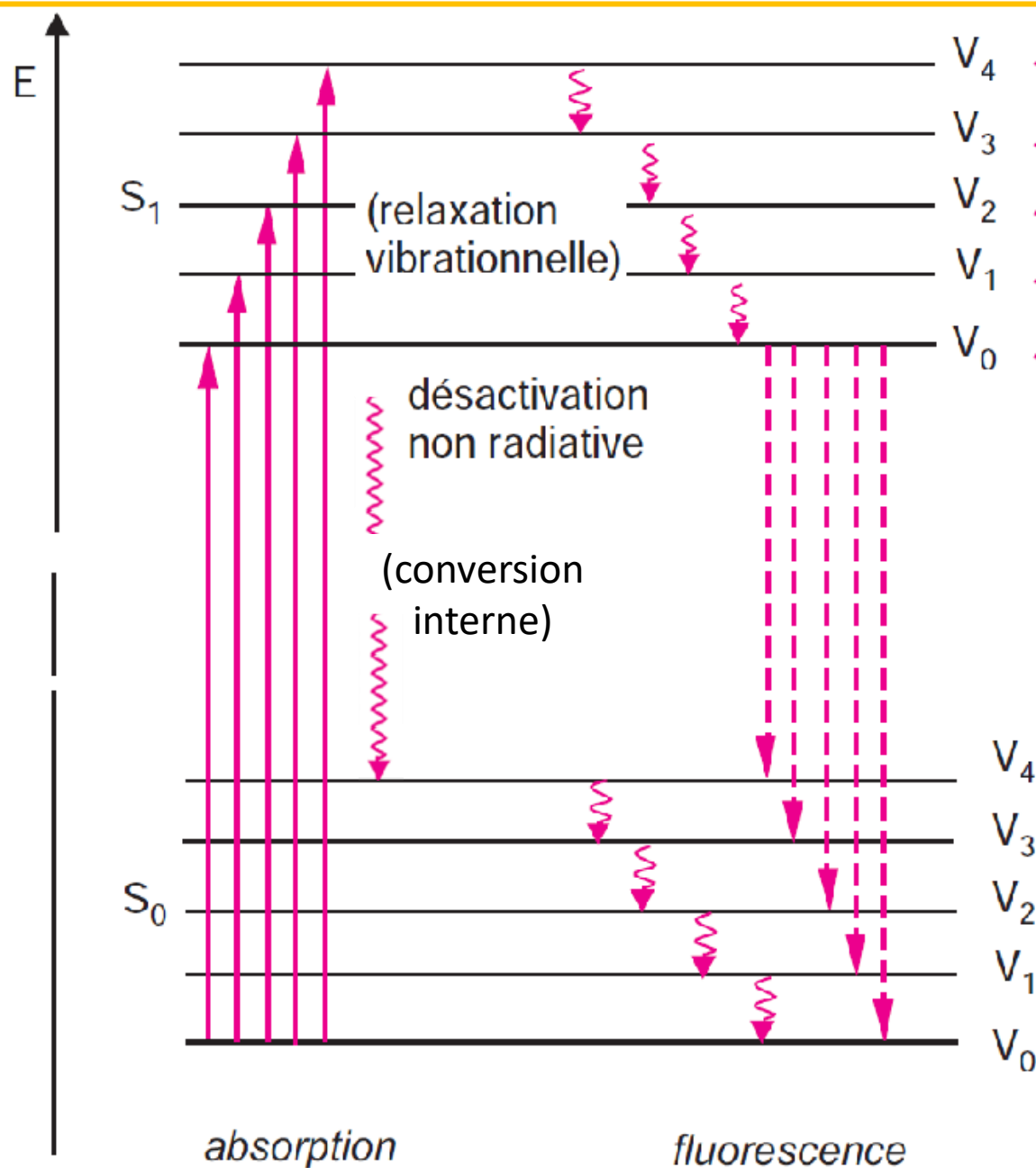
Émission = luminescence

- Photoluminescence (photons – UV visible)
 - **Fluorescence** (état singulet)
 - Phosphorescence (état triplet)

Diagramme de Jablonski



Théorie de la fluorescence

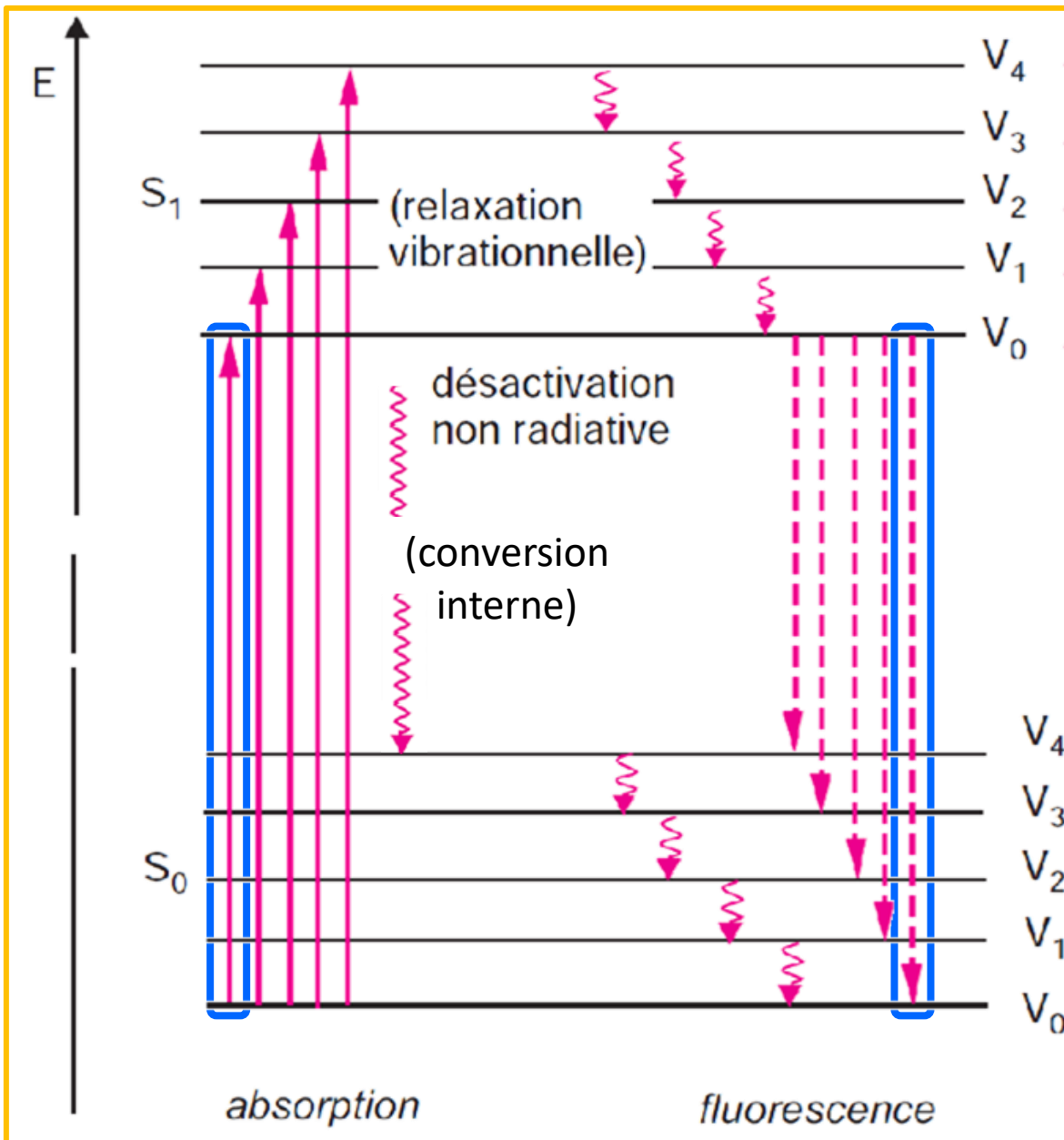


$S_0 \rightarrow S_1$: absorption (uv-visible): 10^{-15} s

$S_1 \rightarrow S_0$:

- Désactivation non-rayonnante
 - Relaxation vibrationnelle: 10^{-12} à 10^{-10} s
 - Conversion interne: 10^{-9} à 10^{-6} s
- Fluorescence:
 - V_0 de S_1 vers S_0
 - 10^{-11} à 10^{-6} s

Théorie de la fluorescence

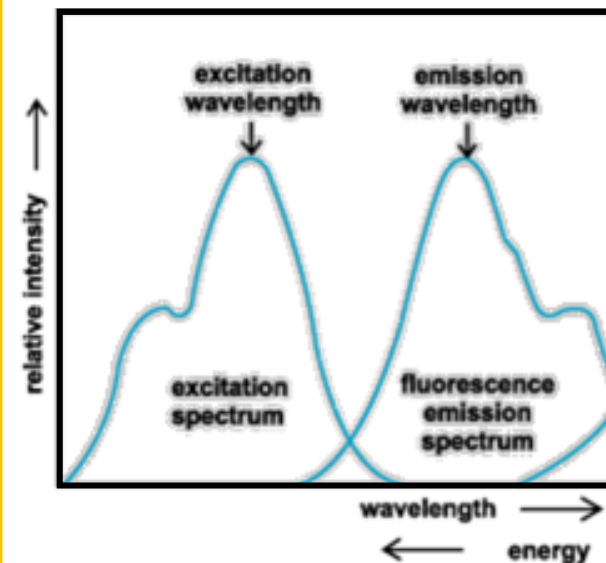


Absorption vs fluorescence

- Fluorescence: ΔE max : V_0 de S_1 vers V_0 de S_0
- Absorption: ΔE min : V_0 de S_0 vers V_0 de S_1

déplacement des bandes de fluorescence vers des énergies inférieures donc **longueurs d'ondes supérieures**

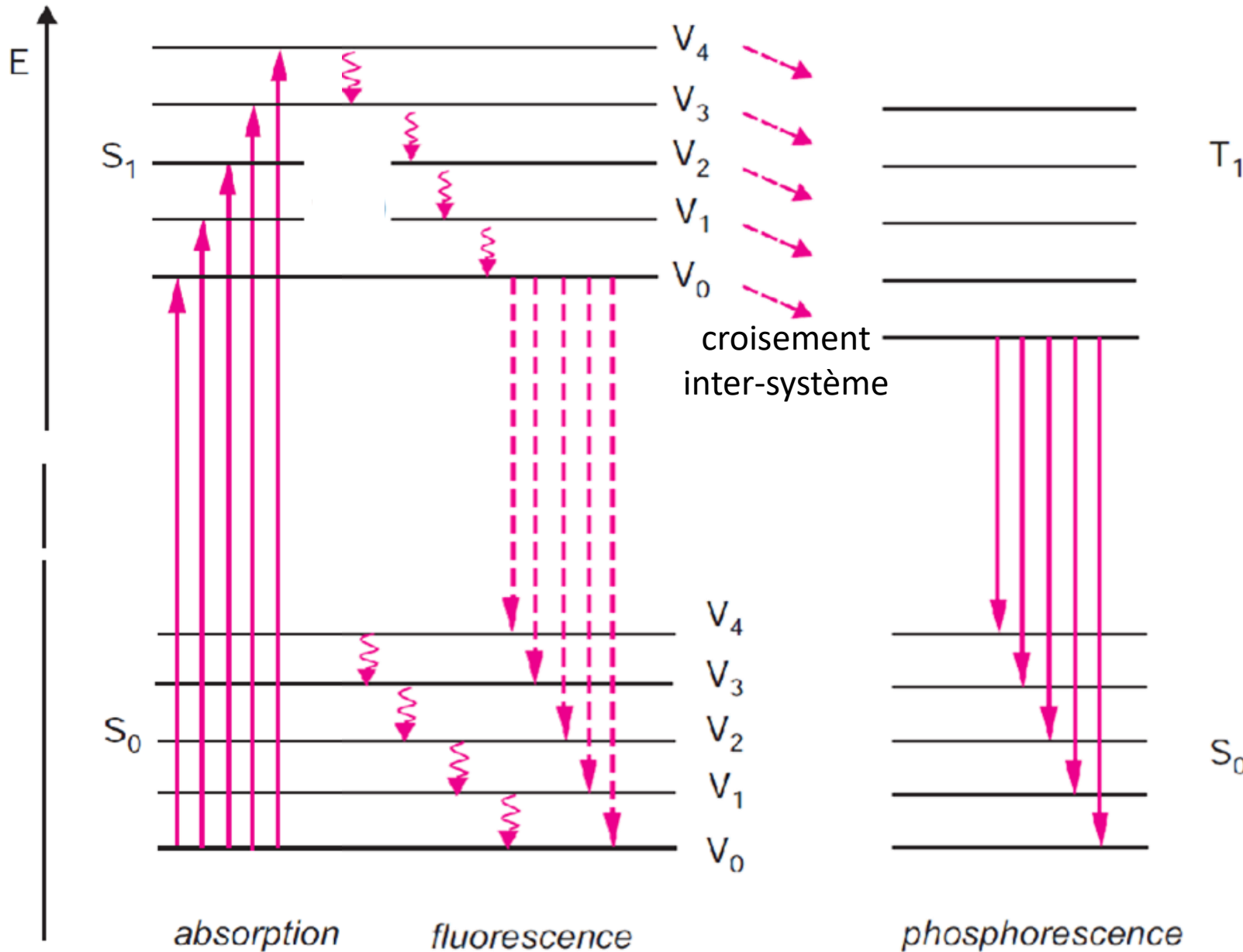
Déplacement de Stokes



- λ_{exc} et λ_{em} : spécificité
- **Image en miroir**
- **Loi de Stokes : $\lambda_{em} > \lambda_{exc}$**
- Déplacement de Stokes

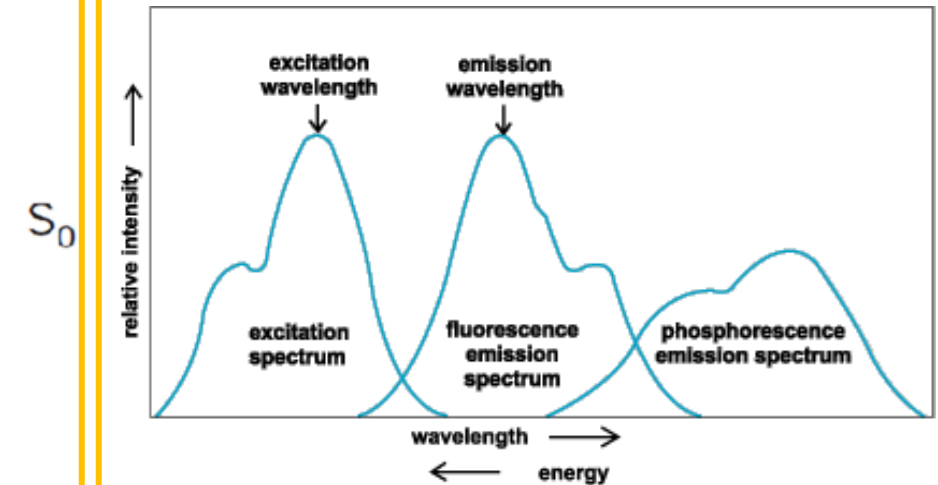
$$\Delta\nu = 1/\lambda_{exc \max} - 1/\lambda_{em \max}$$

Théorie de la fluorescence



Phosphorescence vs fluorescence

- Passage à l'état triplet: croisement inter-système:
- Phosphorescence: de V_0 de T_1 vers S_0
- Fluorescence: ΔE max : V_0 de S_1 vers V_0 de S_0
- Phosphorescence: ΔE max : V_0 de T_1 vers V_0 de S_0



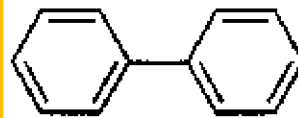
Effet de la structure moléculaire

Un chromophore qui se désexcite en fluorescent est un **fluorophore**

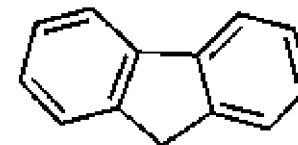
- Pour qu'une molécule soit fluorescente, elle doit absorber les photons de UV-visible
- Elle doit contenir des **chromophores insaturés à électrons π délocalisés** (transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ d'énergie faible)
- Molécules cycliques, rigides possédant des électrons π .
- La fluorescence est augmentée par les groupements électro-donneurs et diminuée par les électro-attracteurs.
- La présence d'atome lourds interne diminue la fluorescence (Br, I...)

- La **rigidité**, la **planéité** et la **conjugaison** augmentent la fluorescence

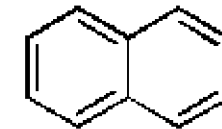
Rendement de fluorescence relatif au fluorène.



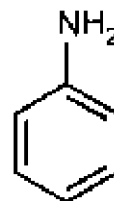
biphényle (0,2)



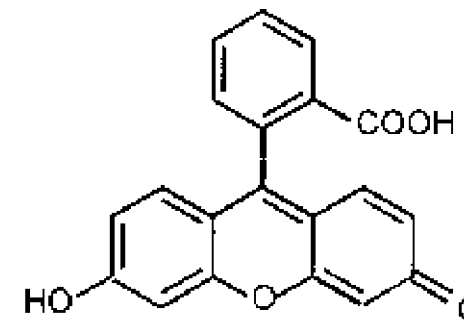
fluorène (1)



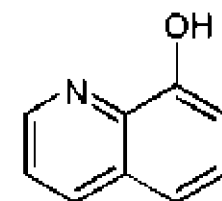
naphthalène (0,55)



aniline (0,6)



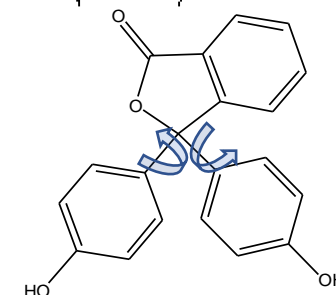
fluorescéine (0,92 dans NaOH 0,1 M et 0,65 à pH = 7)



8-hydroxyquinoléine

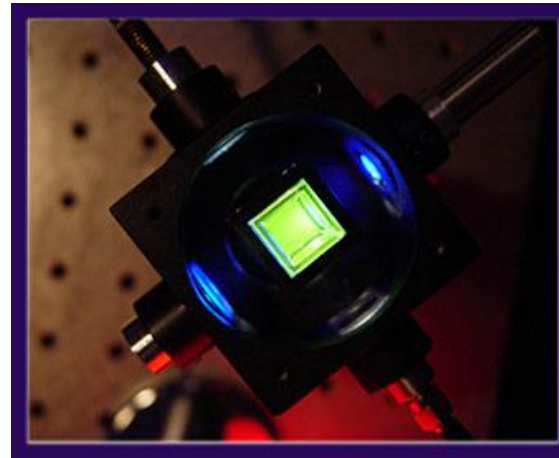
La 8HQ forme des complexes fluorescents avec le fer

Les rotations internes = voies de désexcitation non radiative



Phénolphtaléine (0)

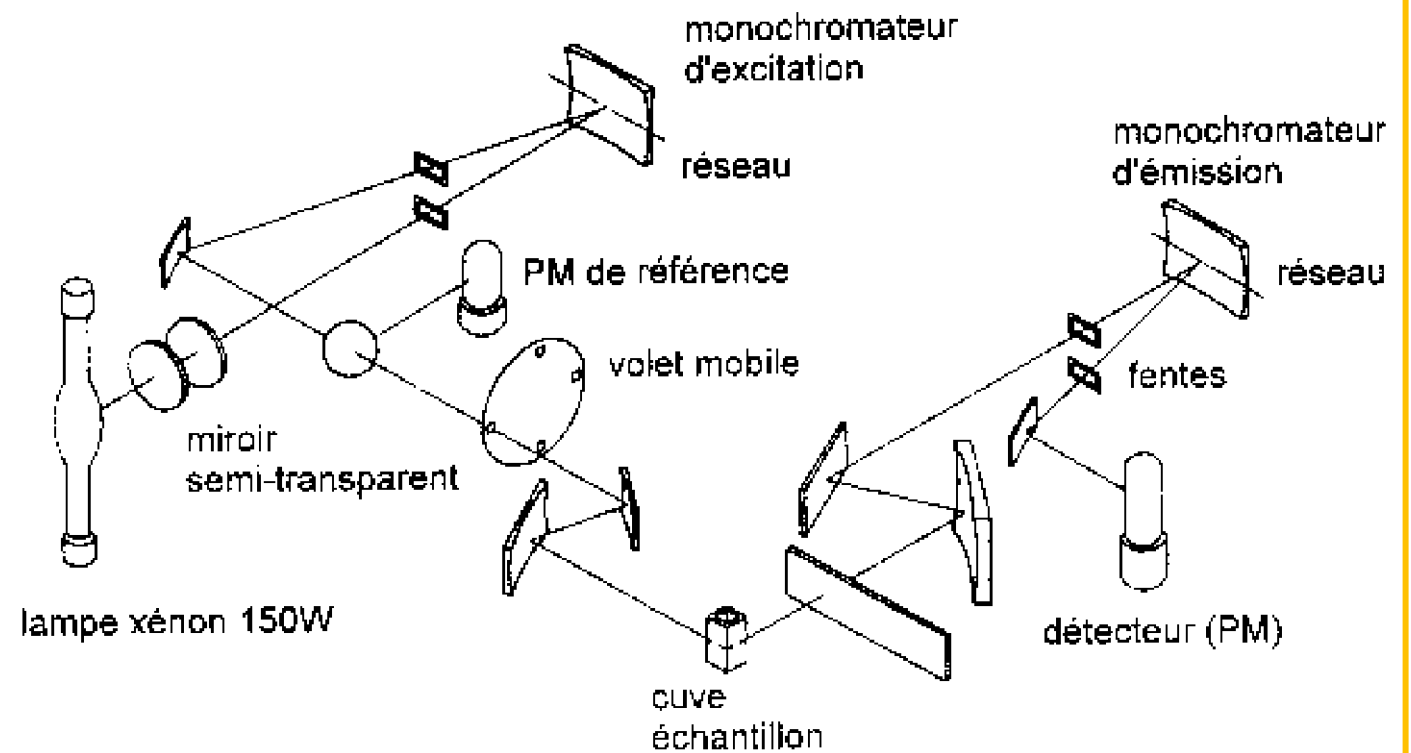
La mesure de l'intensité de fluorescence s'effectue perpendiculairement au faisceau incident



Spectrofluorimètre

- Sources lumineuses
 - Lampes à spectre continu (Xénon...)
 - Laser: - Intensité élevée : sensibilité \nearrow
- Radiation monochromatique

Les appareils de fluorescence sont équipés de deux monochromateurs, un pour l'excitation, l'autre pour l'émission



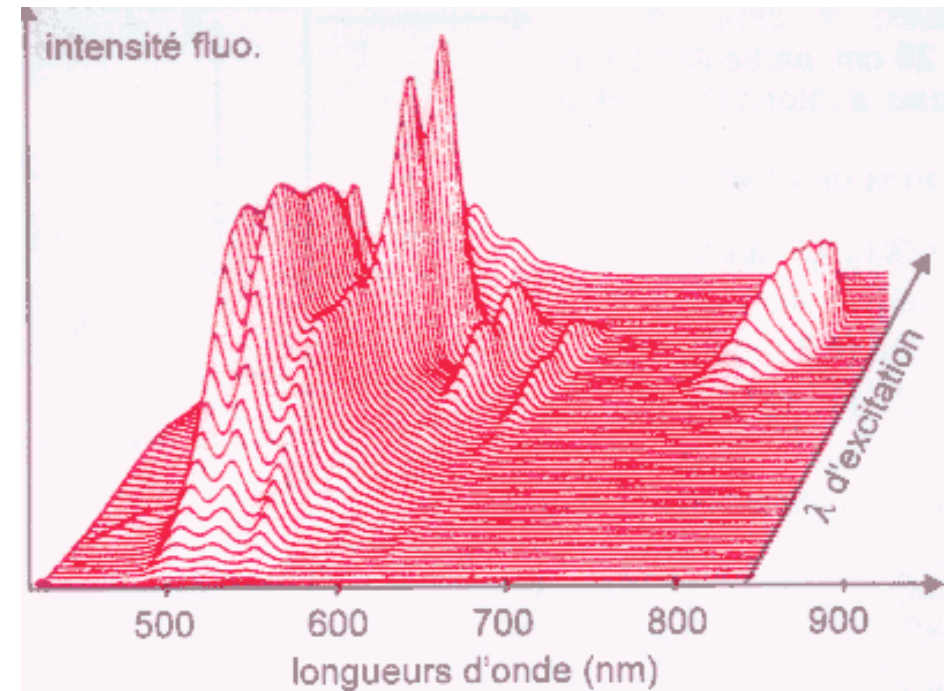
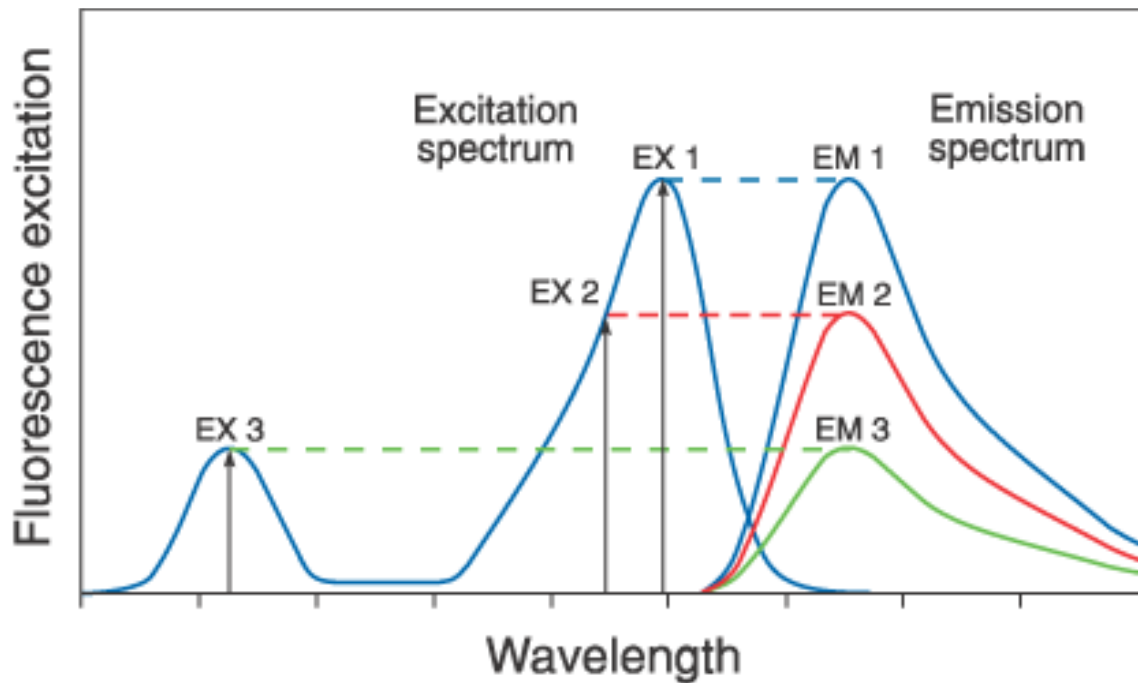
Les spectres de fluorescence

Spectre d'excitation et spectre d'émission

Le **spectre d'excitation** s'apparente au spectre d'absorption de la molécule. Il est obtenu en balayant les longueurs d'ondes d'excitation (λ_{ex}) et en maintenant fixe la longueur d'onde d'émission (λ_{em})

Le **spectre d'émission** correspond à la lumière réémise par les molécules. Il est obtenu en fixant la longueur d'onde d'excitation et en balayant les longueurs d'onde d'émission (λ_{em})

Les spectres se recouvrent faiblement c'est l'effet « anti-Stokes » les électrons peuvent retourner a un niveau d'énergie plus faible que le niveau de départ (d'où $\lambda_{em} < \lambda_{exc}$)



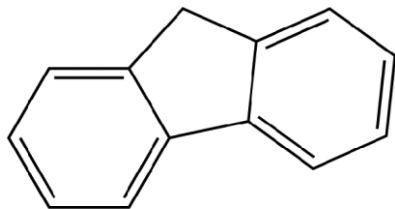
Quantification de la fluorescence

Rendement quantique

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

- $0 < \Phi_F < 1$
- Sans dimension
- Le rendement quantique dépend de la structure de la molécule et de son micro-environnement

Rendement de fluorescence relatif au fluorène



Fluorene

$$\Phi_F = 1$$

Intensité de la fluorescence

$$I_F = I_A \cdot \Phi_F$$

Φ_F : rendement quantique de fluorescence (dépend de la molécule)

I_A : Intensité absorbée (dépend de l'appareil)

$$I_A = I_0 - I_t$$

Or, pour relier I_F à la **concentration c** des molécules fluorescentes

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I_t}\right) = \epsilon lc$$

$$I_t = I_0 \cdot 10^{-A} = I_0 \cdot 10^{-\epsilon lc}$$

$$I_F = \Phi_F \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-\epsilon lc})$$

Quantification de la fluorescence

Intensité de la fluorescence

$$I_F = \Phi_F \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-\varepsilon l c}) = \Phi_F \cdot I_0 \cdot (1 - e^{-2,3\varepsilon l c})$$

Développement en série de Mac Laurin

$$e^{-x} = 1 - x + \frac{x^2}{2!} - \frac{x^3}{3!} + \dots$$

Or si x est petit (c.-à-d. si **A < 0,05**)

$$e^{-x} = 1 - x$$

$$e^{-2,3\varepsilon l c} = 1 - 2,3\varepsilon l c$$

Donc si **A < 0,05**) :

→ Pour une λ donnée:

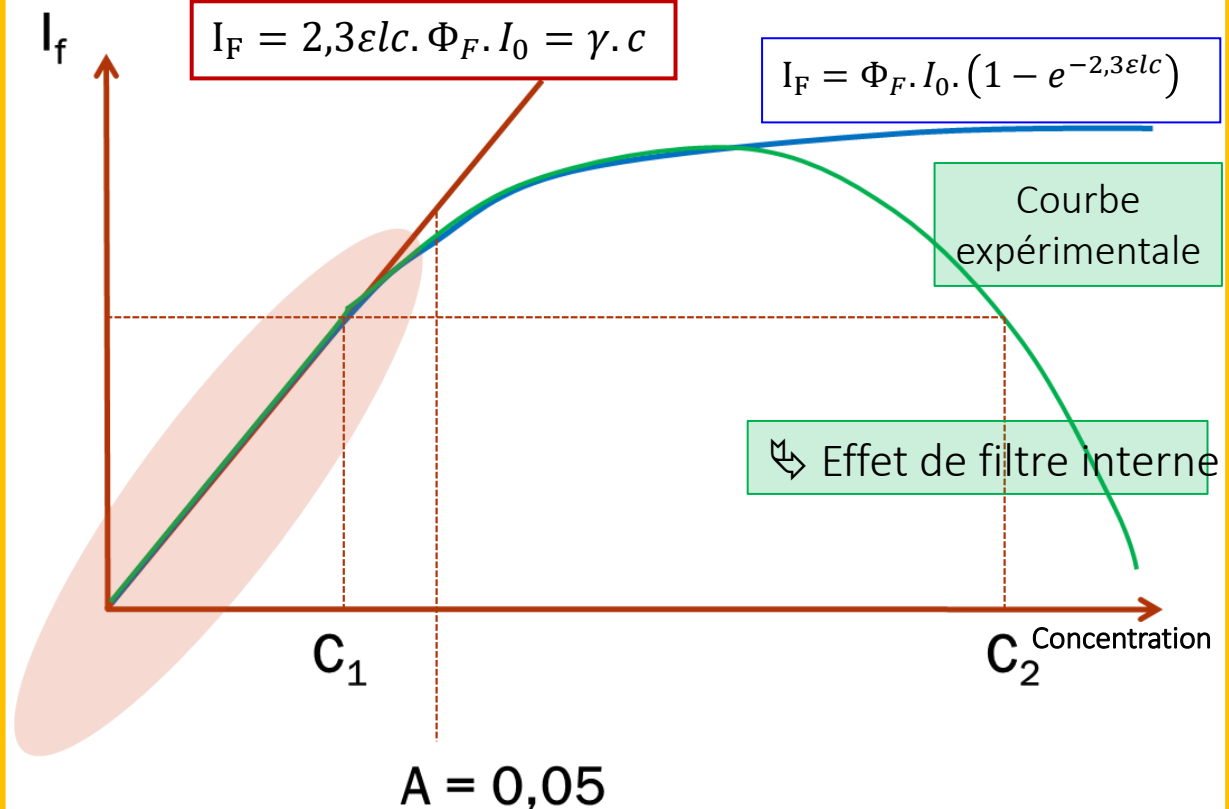
$$I_F = \gamma \cdot c$$

($2,3\varepsilon l \cdot K \cdot \Phi_F \cdot I_0 = cste = \gamma$)

$$I_F = 2,3\varepsilon l c \cdot \Phi_F \cdot I_0$$

→ **I_f dépend de I_0**

Validité limitée aux faibles concentrations: aux fortes concentrations, le rayonnement émis est absorbé par les molécules de solutés : effet de «filtre interne» ou «quenching»



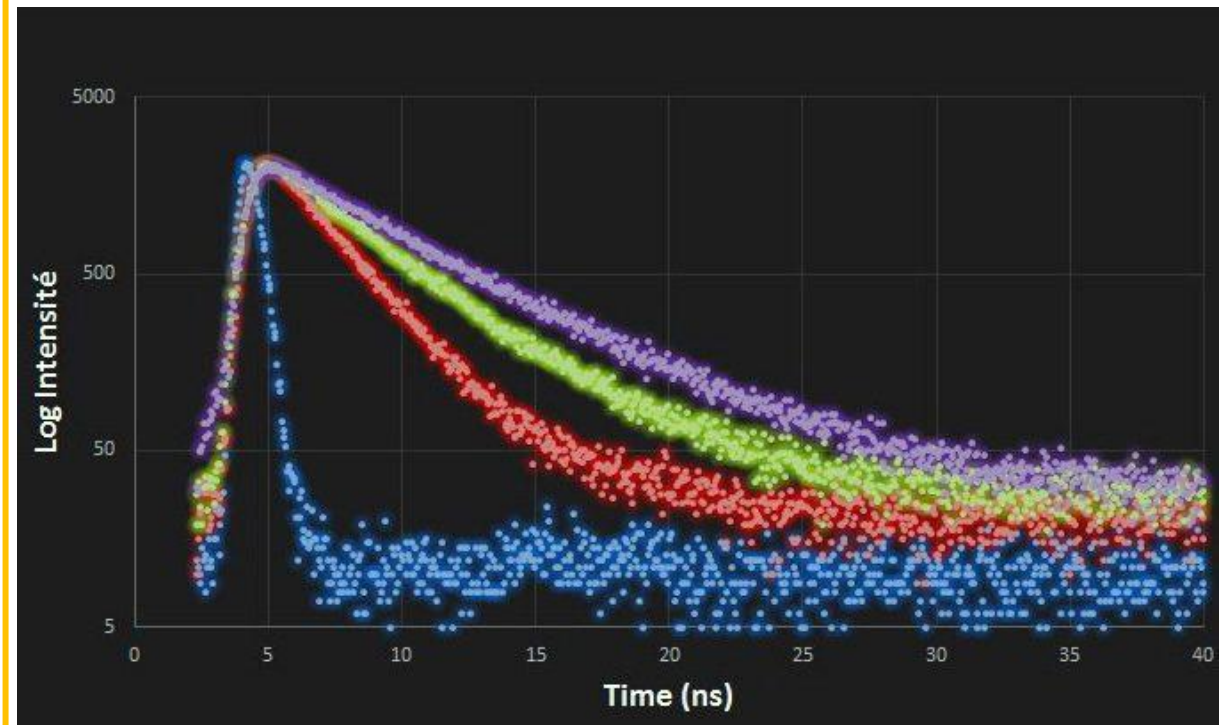
Durée de vie de fluorescence

Durée de vie de fluorescence

Si l'on envoie sur l'échantillon un «flash» de lumière (lasers pulsés). Après l'excitation, l'intensité de fluorescence décroît selon une loi exponentielle.

$$I_f = I_0 \cdot e\left(-\frac{t}{\tau}\right)$$

La durée de vie τ de fluorescence est de l'ordre de la nanoseconde celle de la phosphorescence est de l'ordre de la seconde



Spectroscopie de fluorescence résolue en temps

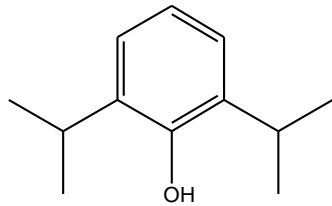
Applications biologiques:
Ex: indicateur de l'activité métabolique cellulaire

Applications

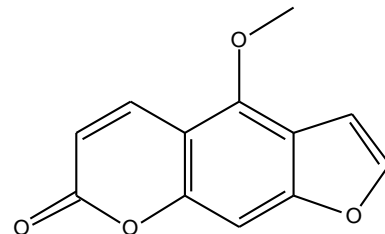
- $I_F \nearrow \nearrow \nearrow$, permet des analyses de traces
- Spécificité $\nearrow \nearrow \nearrow$

Molécules d'intérêts

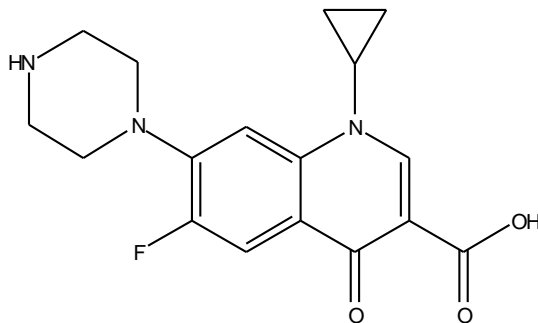
- **10 % environ des molécules d'intérêt pharmaceutique sont fluorescentes**



PROPOFOL (DIPRIVAN®)



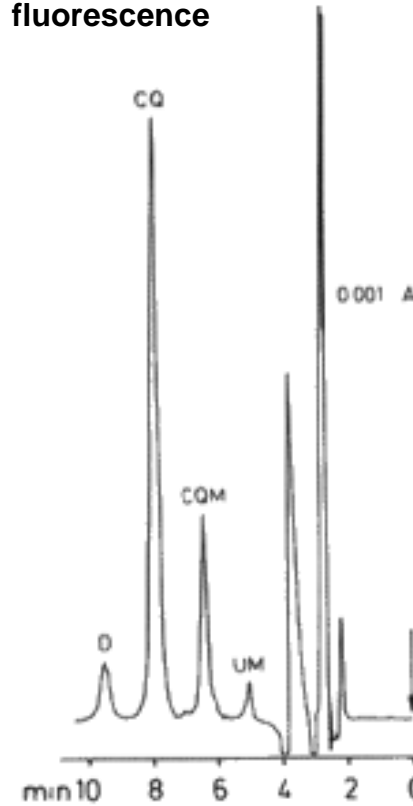
5-methoxy psoralen
5MOP (PSORADERM®)



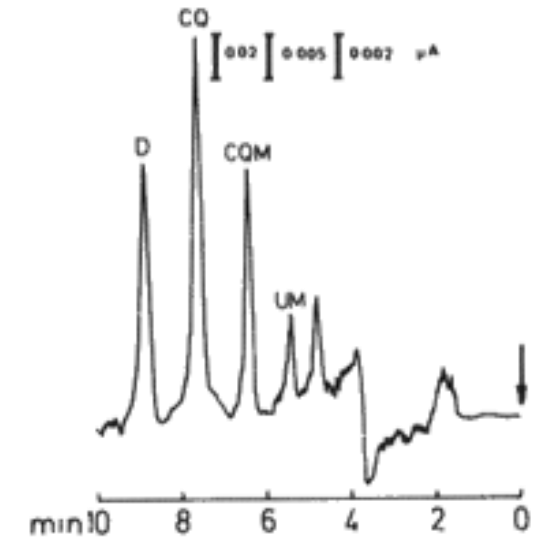
CIPROFLOXACINE (CIFLOX®)

Dosage de la chloroquine et de son metabolite la desethylchloroquine dans le plasma et l'urine par CLHP

plasma,
82nmol/l CQ,
16nmol/l CQM,
fluorescence



urine,
8.5µmol/l CQ,
3.1µmol/l CQM, UV



Applications

Analyses quantitatives

- **Méthodes d'analyses directes, indirectes ou couplées à des techniques séparatives (HPLC ou EC)**
 - **Analyse d'ions inorganiques** : réaction avec un fluorophore
 - Cations formant des chélates fluorescents (applications limitées)
 - Inhibition de fluorescence par la présence des anions (très utilisée)
 - **Composés organiques**
 - Composés ayant une fluorescence native
 - Composés non fluorescents après dérivatisation chimique et greffage d'un groupement chromophore
 - **Immunodosages**
 - Polarisation d'immunofluorescence (FPIA) ex: pour le dosage de la digoxine dans le plasma

Résumé

- La fluorescence peut être observée quand les espèces excitées **reviennent à l'état fondamental en libérant l'excès d'énergie sous forme de photons**

- Les longueurs d'ondes d'émission de fluorescence sont supérieures aux longueurs d'ondes d'absorption (Déplacement de Stokes)

- Fluorophore: chromophore qui se désexcite en fluorescent
 - doit contenir des **chromophores insaturés à électrons π délocalisés**
 - I_f augmente avec: rigidité, planéité, conjugaison

- Analyses quantitatives pour des faibles concentrations
- I_f dépend de:
 - concentration, - I_0 ,
 - coefficient d'absorption, - pH du solvant,
 - température, - viscosité,
 - polarité du solvant ...

- Nombre de molécules qui fluorescent limité

- Sélectivité élevée ↗ ↗ ↗

- Limites de détection jusqu'à 1000 fois inférieurs aux limites de l'absorption: sensibilité ↗ ↗ ↗

Spectrométrie de Fluorescence

- Chimie analytique: Skoog, West, Holler, Crouch. De BOECK, 3^{ème} édition, ISBN: 9782804190712, Juin 2015
- Techniques de l'ingénieur, Spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible, Dominique DI BENEDETTO, Philippe BREUIL, Réf : P2795 v2
- Pharmacopée Européenne 7.0 (Tomes 1 & 2)
- Chimie analytique, méthodes spectrales et analyse organique. M. Hamon, F. Pellerin, M. Guernet, G. Mahusier, Masson, 2^{ème} édition, ISBN 2-225-83507
- Analyse chimique: Méthodes et techniques instrumentales, F. Rouessac, A. Rouessac, 8^{ème} édition. ISBN 978-2-10-074688-0
- Chimie générale, John W. Hill et al. 2^{ème} édition, ERPI, ISBN 978-2-7613-2434-2