

# LA FLUORIMETRIE

# 1- Définition et principe

La spectrométrie de fluorescence moléculaire **PHOTOLUMINESCENCE**) est une méthode qui étudie l'émission de la lumière par des molécules, en solution ou à l'état solide, après excitation par des photons appartenant au domaine du visible ou du proche ultraviolet

Une méthode à la fois sélective et très sensible 10 à 1000 fois plus sensible que les méthodes d'absorption mais elle a un champ d'application étroit (peu d'espèces chimiques présentent une fluorescence)

01/2008:20221

## 2.2.21. FLUORIMÉTRIE

La fluorimétrie est une méthode qui utilise la mesure de l'intensité de lumière fluorescente émise par la substance à examiner par rapport à celle émise par un étalon déterminé.

## 2- Origine du phénomène de fluorescence

**Les transitions électroniques qui donnent naissance au phénomène de la fluorescence :**



Les différents états énergétiques possibles des électrons d'une molécule donnée sont discrets, quantifiés.

Les états électroniques moléculaires sont quantifiés. Les différences d'énergie entre les états électroniques moléculaires varient de 150 à 600 kJ.mol<sup>-1</sup>. On rappelle que les orbitales moléculaires résultent de la combinaison d'orbitales atomiques d'électrons d'atomes liés dans la molécule considérée.

A chaque état électronique correspond plusieurs niveaux vibrationnels quantifiés (les différences d'énergie entre les états vibrationnels varient de 4 à 40 kJ.mol<sup>-1</sup>).

A chaque état vibrationnel correspond plusieurs niveaux rotationnels quantifiés (les différences d'énergie entre les états rotationnels sont inférieurs à 0,5 kJ.mol<sup>-1</sup>).

Lorsqu'une molécule donnée présente la propriété de fluorescence c'est que :

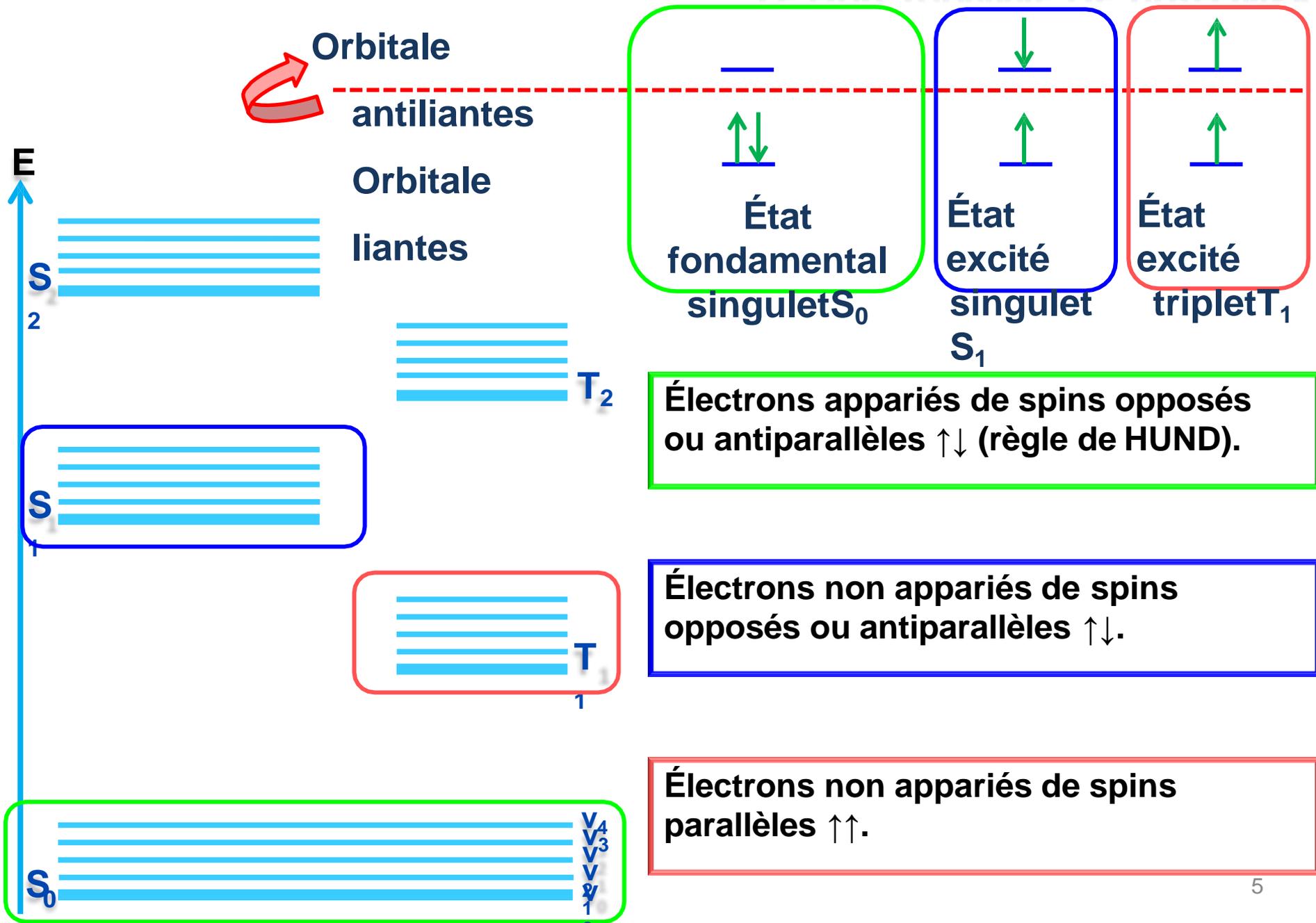
- on a réalisé une excitation photonique UV de la molécule.

Lorsqu'une molécule donnée est excitable à la longueur d'onde UV  $\lambda$ , c'est que  $\lambda$  correspond à une énergie permettant le transfert d'un électron depuis une orbitale moléculaire à l'état fondamental de plus basse énergie vers une autre orbitale moléculaire d'énergie plus élevée correspondant à un état dit excité.

- Lors de la désactivation, on assiste dans un premier temps au retour à l'état vibrationnel de moindre énergie de l'état excité (relaxation, durée type =  $10^{-12}$ s). Puis le retour vers l'état fondamental se fera sur un niveau vibrationnel quelconque de l'état électronique fondamental de moindre énergie avec émission d'un photon (durée de vie à l'état excité de l'ordre de  $10^{-9}$ s). La durée de l'ensemble du processus est de l'ordre de  $10^{-9}$  à  $10^{-8}$ s pour une molécule. La longueur d'onde d'émission est toujours supérieure à la longueur d'onde d'excitation puisque  $\Delta E = h\nu = hc/\lambda$ . Quand  $\Delta E$  diminue,  $\lambda$  augmente.

# 2. origine de la fluorescence

# LE DIAGRAMME DE JABLONSKI

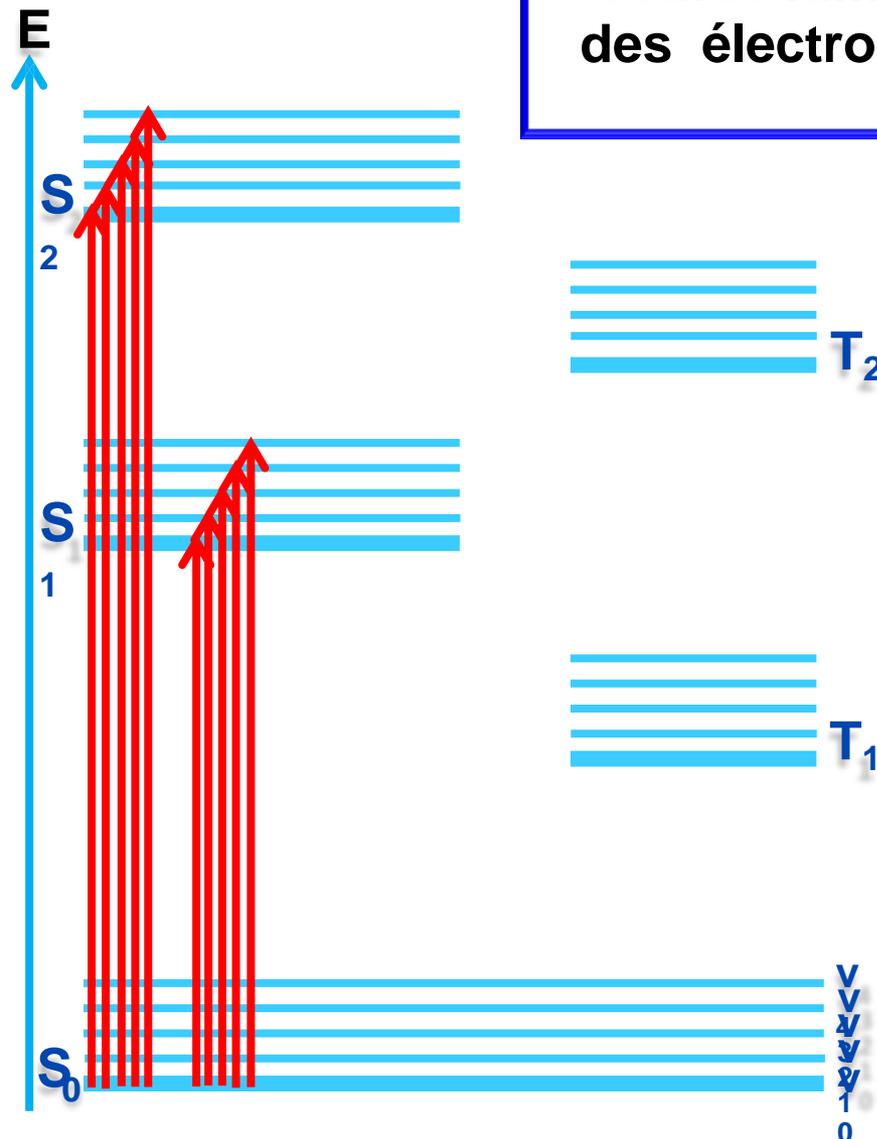


# 2. origine de la fluorescence

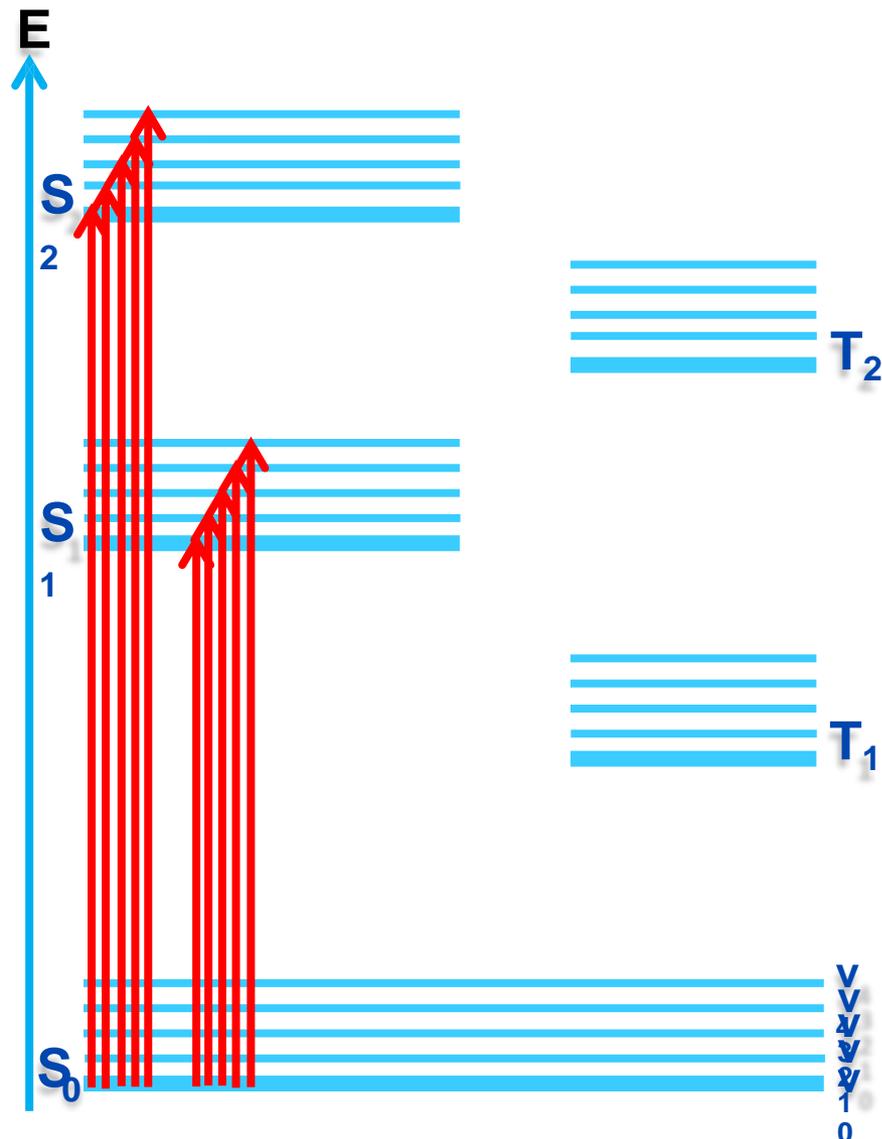
# LE DIAGRAMME DE JABLONSKI

## 1- L'excitation

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



## 2- Les processus de désactivation



### ↳ Transitions non radiatives

- La relaxation vibrationnelle.
- Conversion interne (CI).
- Conversion externe (CE).
- Croisement inter-système (CIS).

### ↳ Transitions radiatives

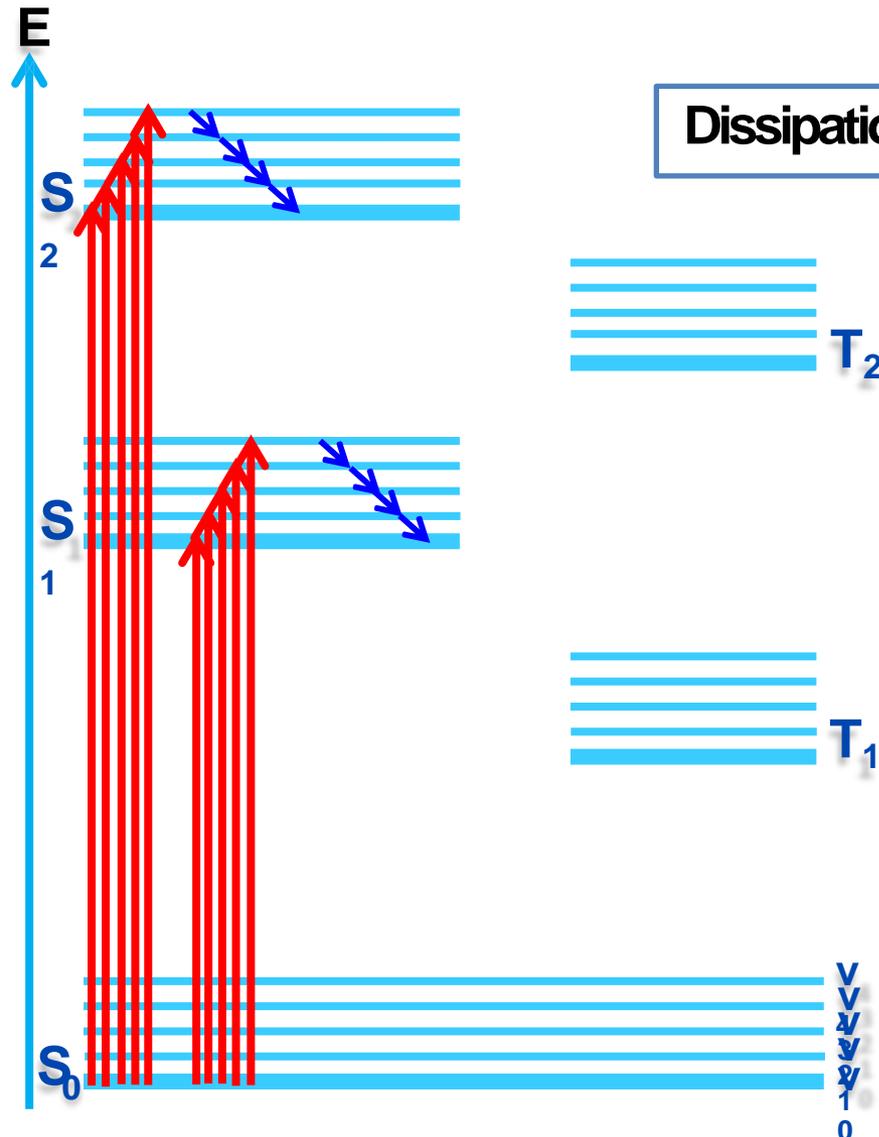
- Désactivation directe\*
- Désactivation après changement de multiplicité\*.

# 2. origine de la fluorescence

# LE DIAGRAMME DE JABLONSKI

## 2- Les processus de désactivation

↳ Transitions non radiatives



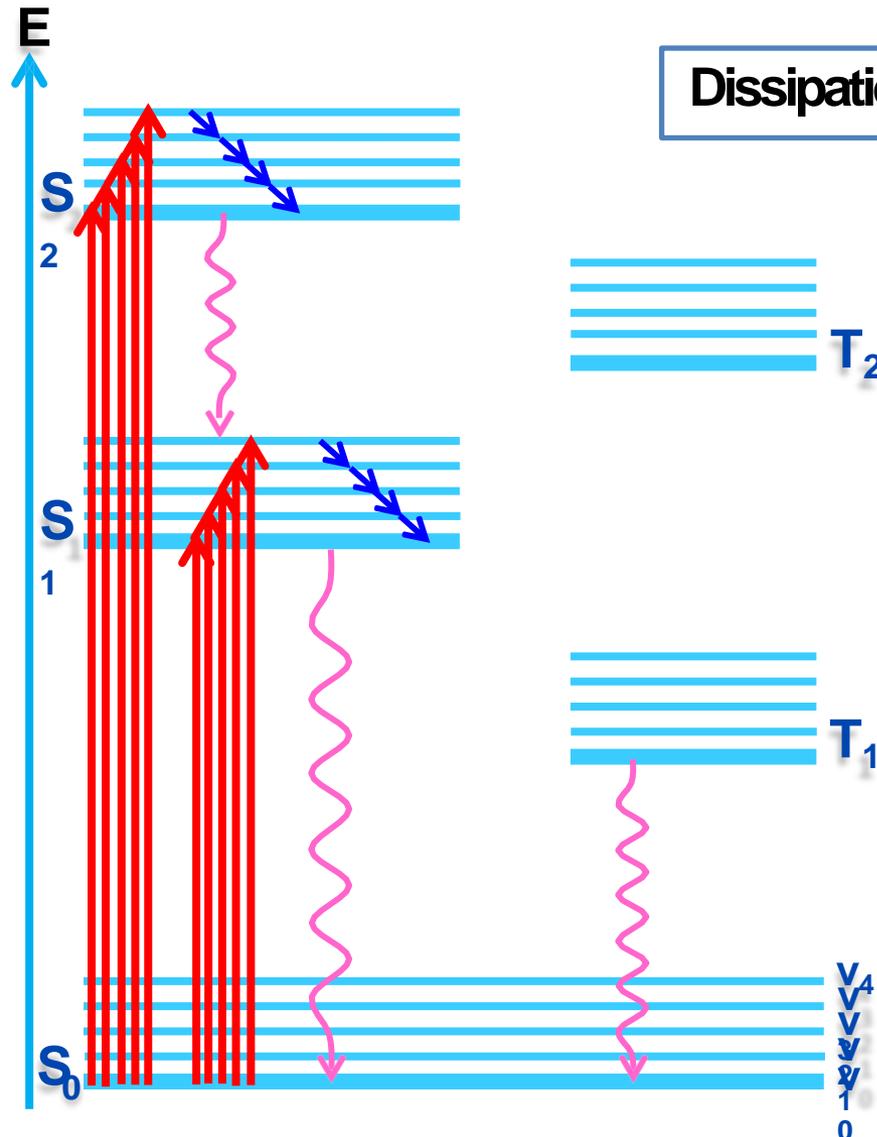
Relaxation vibrationnelle

Transfert de l'énergie au niveau vibrationnel le plus bas d'un *état excité*.

Elle se produit en  $10^{-11}$ - $10^{-10}$ s.  
(collision avec le solvant).

## 2- Les processus de désactivation

↳ Transitions non radiatives



Dissipation de l'énergie sous forme de chaleur

### Conversion interne

Transfert d'énergie du niveau vibrationnel le plus bas d'un état excité à un état électronique inférieur, *très rapide* ( $10^{-12}$ s). (processus intermoléculaire)

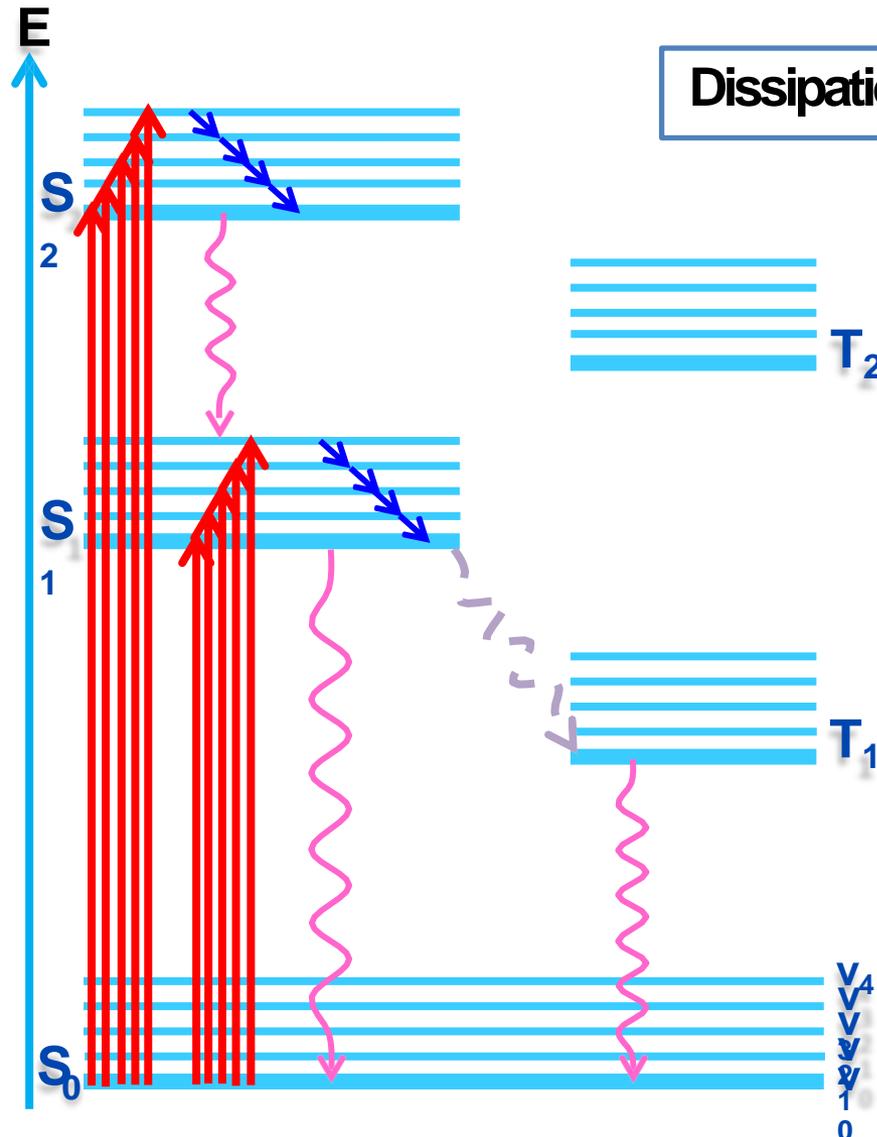
### Conversion externe

Désactivation d'un état électronique excité par collision avec le solvant. (*collisional quenching*)

## 2- Les processus de désactivation

↪ Transitions non radiatives

Dissipation de l'énergie sous forme de chaleur



Croisement inter-système

Un changement de multiplicité nécessitant un retournement de spin.

Évolution d'un état excité singulet  $S_1$  à un état excité triplet  $T_1$  d'énergie voisine et de durée de vie plus longue.

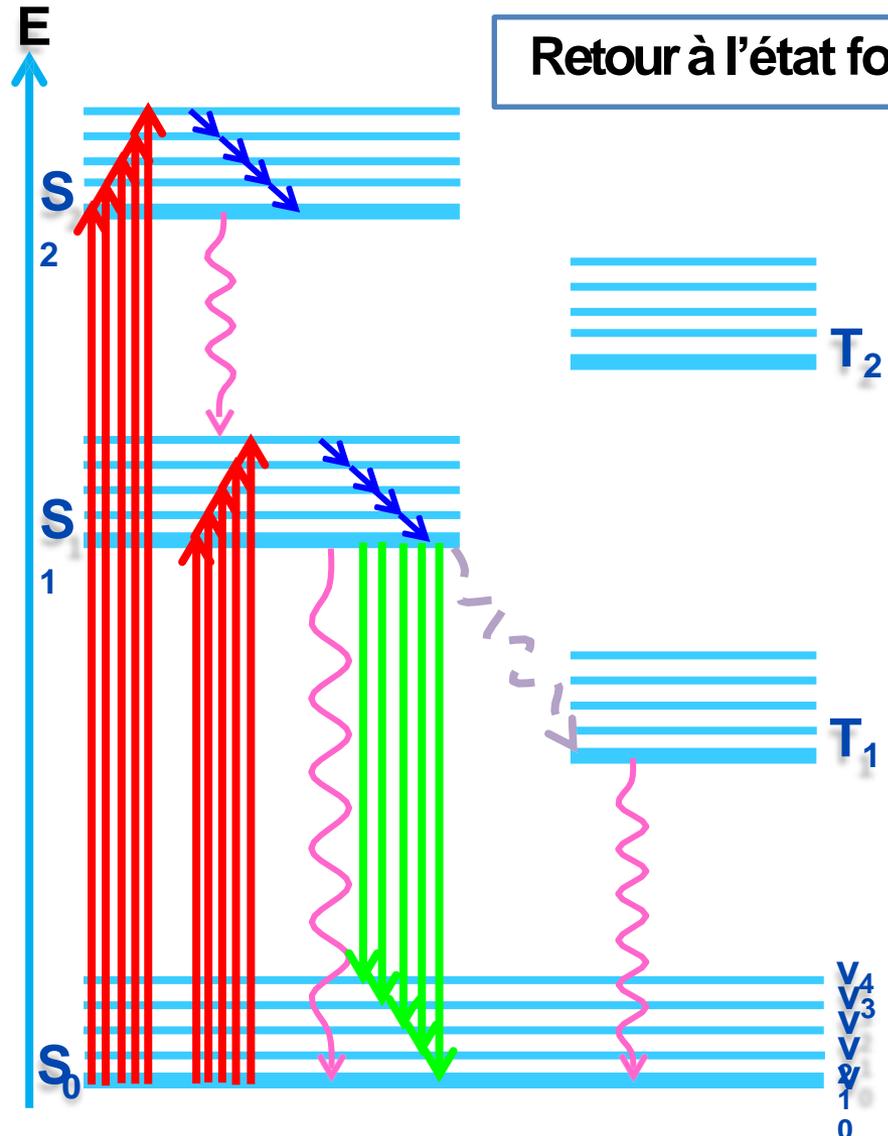
# 2. origine de la fluorescence

# LE DIAGRAMME DE JABLONSKI

## 2- Les processus de désactivation

↳ Transitions radiatives

Retour à l'état fondamental avec émission de radiations



**Désactivation directe**  
Transition entre l'état excité singulet S<sub>1</sub> et l'état fondamental S<sub>0</sub>.

- L'énergie restituée est plus basse que l'énergie absorbée.
- La radiation émise a une durée de vie de 10<sup>-10</sup> et 10<sup>-5</sup> sec.

↳ **La fluorescence**

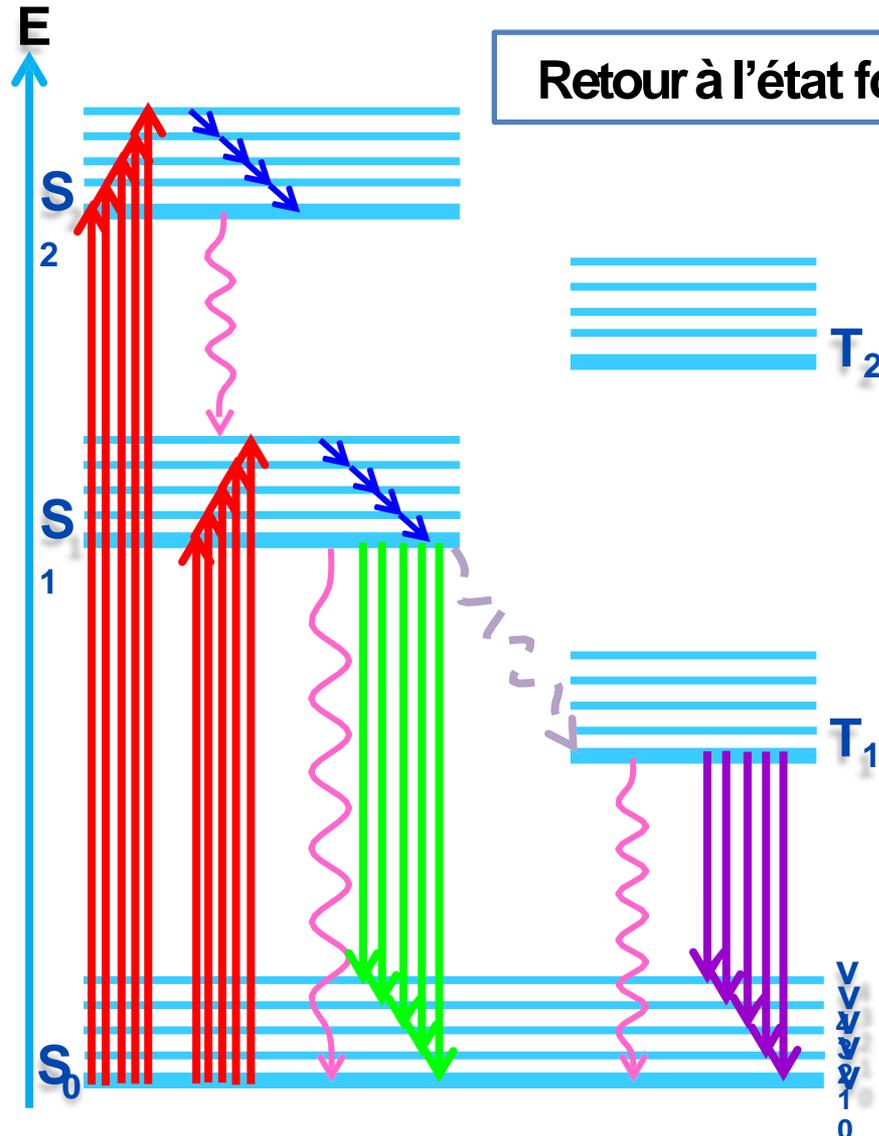
La fréquence de la radiation  $\nu_2 < \nu_1$   
(sauf fluorescence anti-stokes\*<sub>11</sub>)

# 2. origine de la fluorescence

# LE DIAGRAMME DE JABLONSKI

## 2- Les processus de désactivation

↳ Transitions radiatives



Retour à l'état fondamental avec émission de radiations

Désactivation après changement de multiplicité

Passage d'un l'état excité triplet  $T_1$  à un état singulet fondamental  $S_0$ .

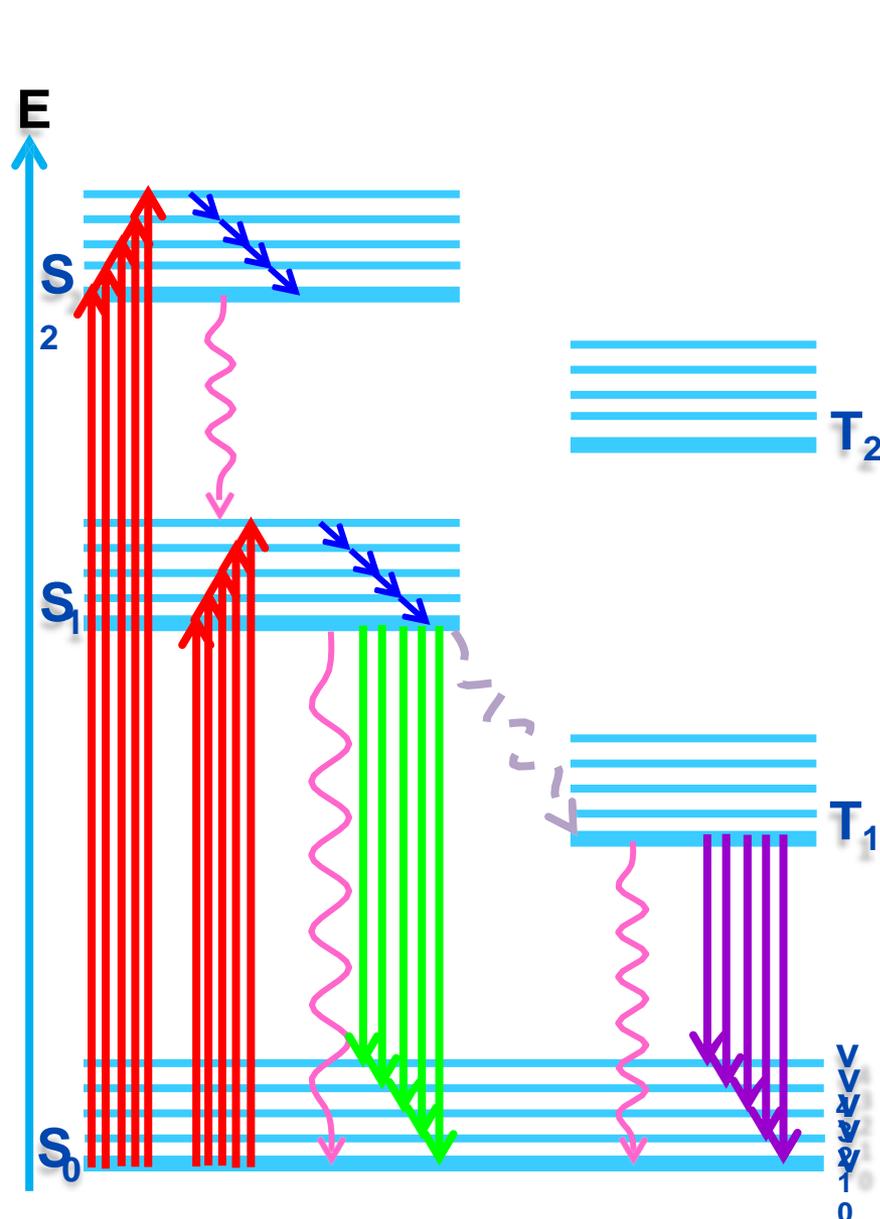
- Désactivation par émission de lumière de longueur d'onde plus grande que celle de la lumière *initialement absorbée* ou celle *émise par fluorescence*.

La phosphorescence

## 2. origine de la fluorescence

## LE DIAGRAMME DE JABLONSKI

### Comparaison entre la fluorescence et la phosphorescence



#### Fluorescence

- Transfert d'énergie entre deux états singulets.
- Sa probabilité est très grande.
- Désexcitation très rapide  $<10^{-5}$ s.

#### Phosphorescence

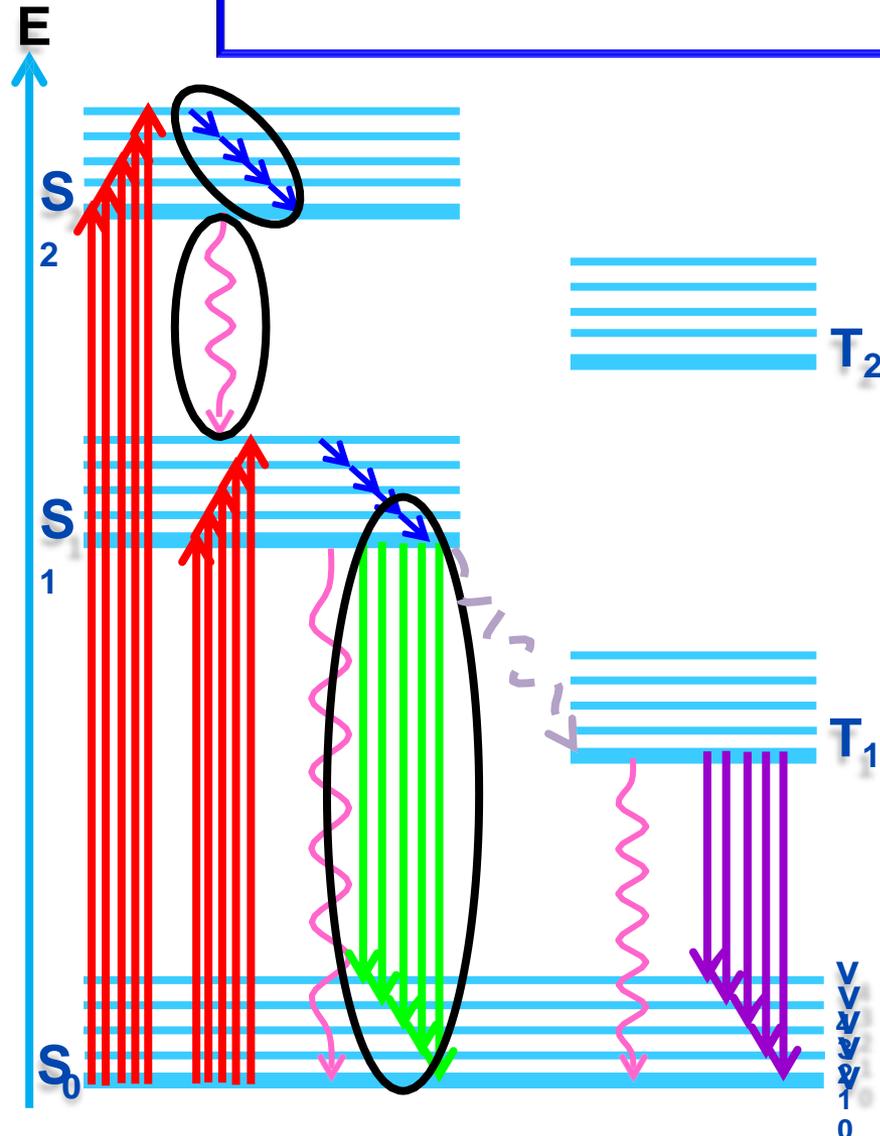
- Transfert d'énergie entre un état triplet excité et un état singulet fondamental.
- Elle est moins probable.
- Désexcitation très longue ( $10^{-4}$  et  $10^4$ s).

## 2. origine de la fluorescence

## LES ESPÈCES FLUORESCENTES

La fluorescence nécessite des particularités structurales qui\*:

- *Ralentissent* la relaxation non rayonnante
- *Accélèrent* la relaxation par fluorescence



### Composés minéraux

- Les lanthanides
- Certaines terres rares:  
(Europium, samarium ...)

### Composés organiques

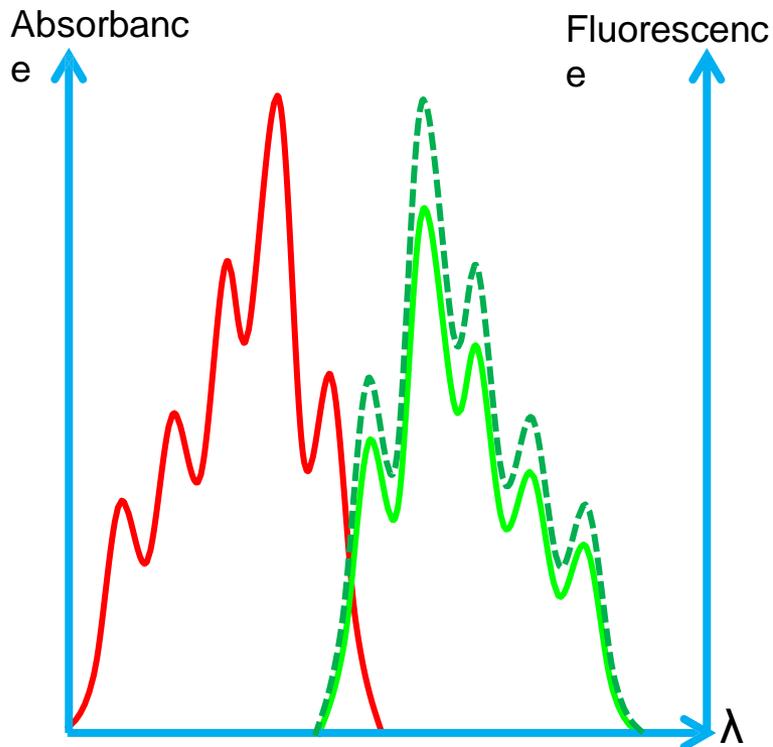
- Hydrocarbures aromatiques non substitués.
- Les systèmes à noyau condensé non linéaire (phénanthrène)
- La fluorescence est rare chez les composés aliphatiques.

### 3. Spectres d'excitation et d'émission

Chaque molécule fluorescente présente *deux spectres caractéristiques\**

SPECTRE D'EXCITATION

SPECTRE D'ÉMISSION



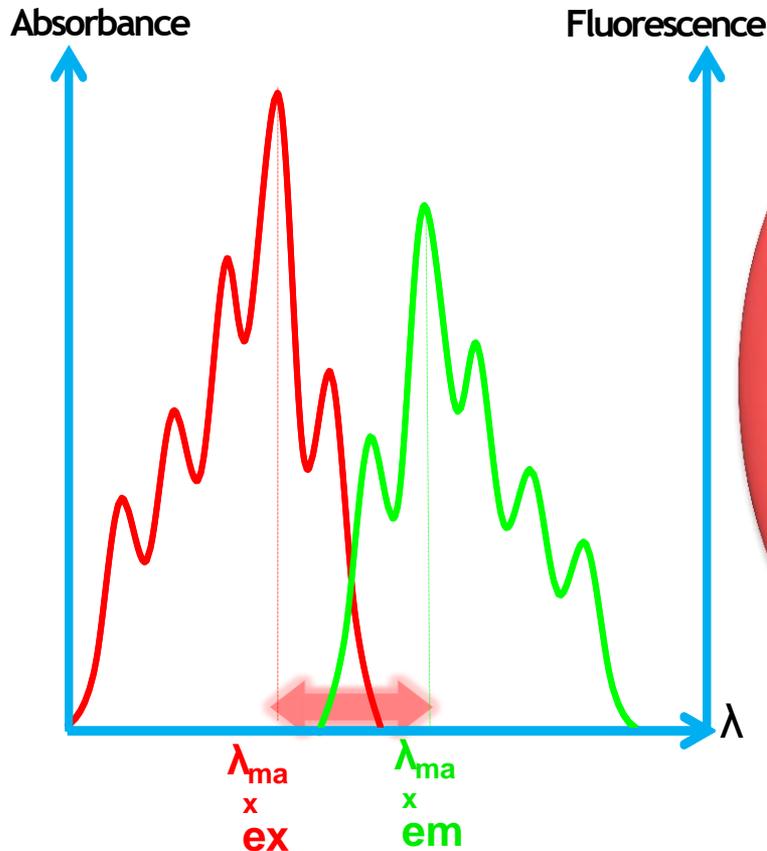
Dans un milieu optiquement transparent le spectre d'émission est une image inversée (*effet miroir*) du spectre d'excitation.

### 3. Spectres d'excitation et d'émission

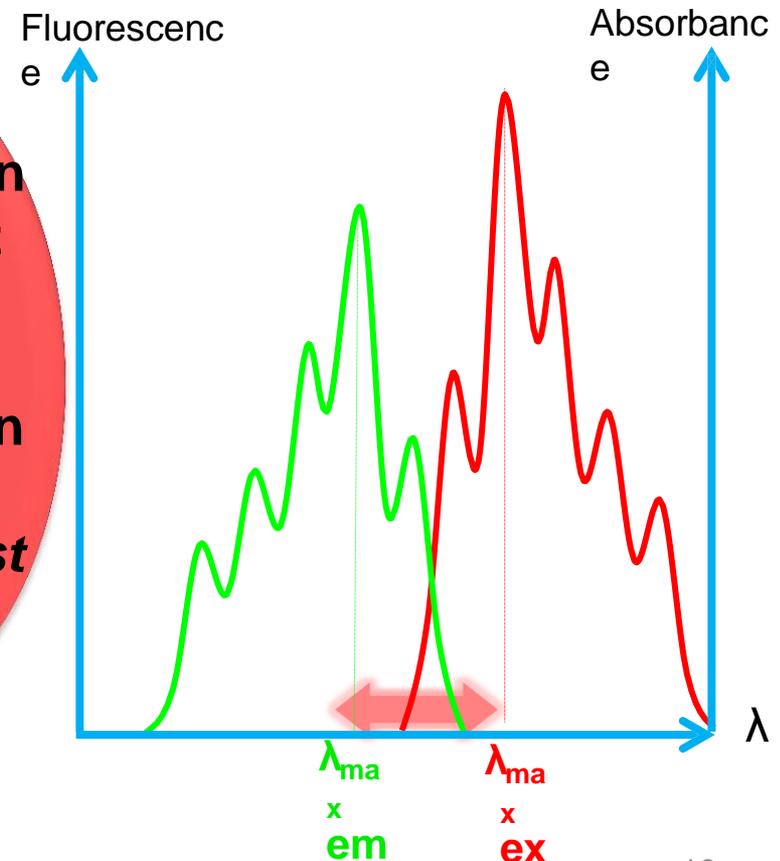
Par dissipation de l'énergie:

- L'énergie émise est *plus faible* que l'énergie excitatrice
- La fluorescence est caractérisée par  $\lambda_F > \lambda_A$

Déplacement de Stokes  
(Stokes shift)



Fluorescence anti-stokes\*



La détection est d'autant plus facile que le déplacement de Stokes est grand.

# 4- Durée de vie de fluorescence

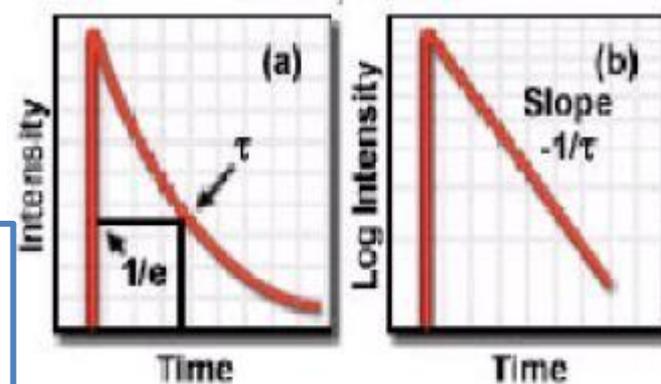
Pratiquement la durée de vie de l'état S1 est très brève ( ordre de qq ns )

On définit pour chaque espèce « le temps de vie radiatif »  $\tau$

Fonction exponentielle indépendante de la concentration

La durée de vie de l'état excité correspond au temps nécessaire pour que la fluorescence soit égale:

$$I = I_0 * \frac{1}{e} = I_0 * e^{-1} = 0,36 I_0$$



$$I(t) = I(0) e^{(-t/\tau)}$$

$I(t)$  = Intensité de fluorescence mesurée au temps  $t$

$I(0)$  = Intensité de fluorescence observée immédiatement après excitation

$\tau$  = Durée de vie du fluorochrome

# **5- Relation entre intensité de la fluorescence et concentration**

# 1. Rendement quantique de fluorescence $\phi_f$

Rapport entre le nombre de molécules fluorescentes et le nombre total de molécules excités.

$\phi_F =$  nombre de photon émis / nombre de photons absorbés =  $I_f / I_a$

$I_f$ : intensité de fluorescence

$I_a$ : intensité d'absorption

$\phi = 0$  : Substances non fluorescente

$\phi \uparrow$

Fluorescence  $\uparrow$

$\phi = 1$  : Substances très fluorescentes

Dépend de la nature de la molécule, du solvant, du pH et de la  $T^\circ$ .

Ne dépend ni de  $\lambda_{ni}$  de l'intensité de la source lumineuse.

# 1. Rendement quantique de fluorescence $\phi_f$

## ↳ Rendement quantique relatif\*

$$\phi_x / \phi_{st} = (I_{fx} / I_{fst}) \cdot (A_{st} / A_x) \cdot \left( \frac{n_x}{n_{st}} \right)^2$$

$\phi_x$ : Rendement quantique de la fluorescence de la molécule

étudiée  $\phi_{st}$ : Rendement quantique de la fluorescence du standard

$I_{fx}$ : intensité de fluorescence de la molécule

$I_{fst}$ : intensité de fluorescence du standard

$A_{st}, A_x$ : absorbance de standard et de molécule étudiée respectivement

$n$ : indices de réfraction la ou les substances sont dissoutes

Déterminé par rapport à un standard qui est une substance très fluorescente dont le rendement de fluorescence est constant (*quelle que soit  $\lambda$* ).

## 2. Intensité de fluorescence $I_F$

$I_F$  est proportionnelle à  $I_A$  et à  $\varphi_F$

$$I_f = I_A \varphi_F = \varphi_F (I_0 - I)$$

$I$  est donnée par la loi de Beer-Lambert

$$I_f = \varphi_F I_0 (2,3 \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c)$$

On ne mesure qu'une partie de la fluorescence

$$I_F = K[\varphi_F I_0 (2,3 \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot c)]$$

$I_f$ : intensité de fluorescence

$I_F$ : intensité de fluorescence mesurée

$I_0$ : intensité d'excitation

$I_A$ : intensité absorbée après excitation

$I_t$ : intensité transmise

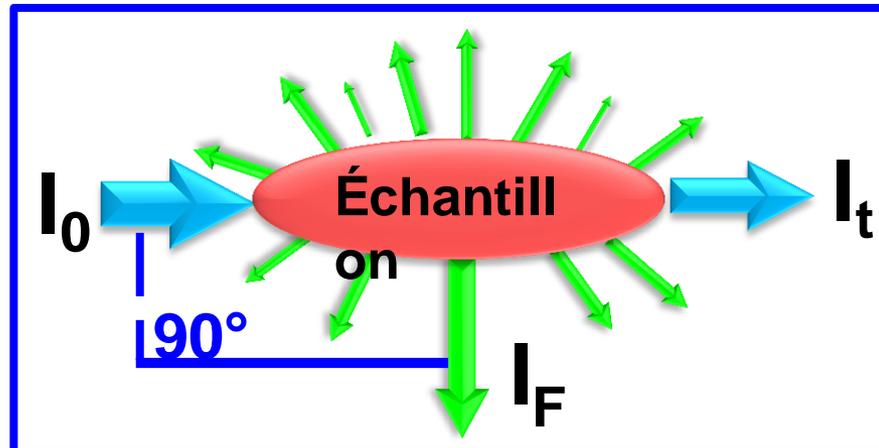
$\varphi_F$ : rendement quantique de la fluorescence  
A: Absorption molaire à  $\lambda$

l: Longueur du trajet optique

C: Concentration de l'échantillon (M)

$\varepsilon_\lambda$ : Absorption molaire à  $\lambda$

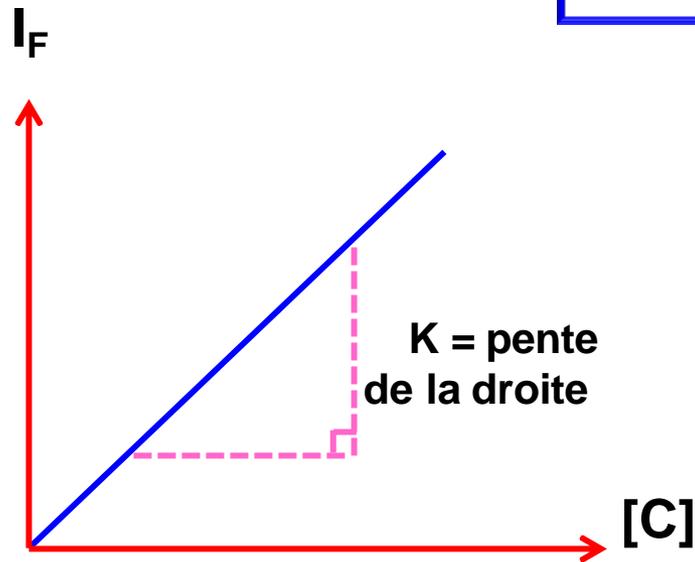
$$I_F = K C$$



## 2. Intensité de fluorescence $I_F$

↪ Conditions de la linéarité

$$I_F = K C$$



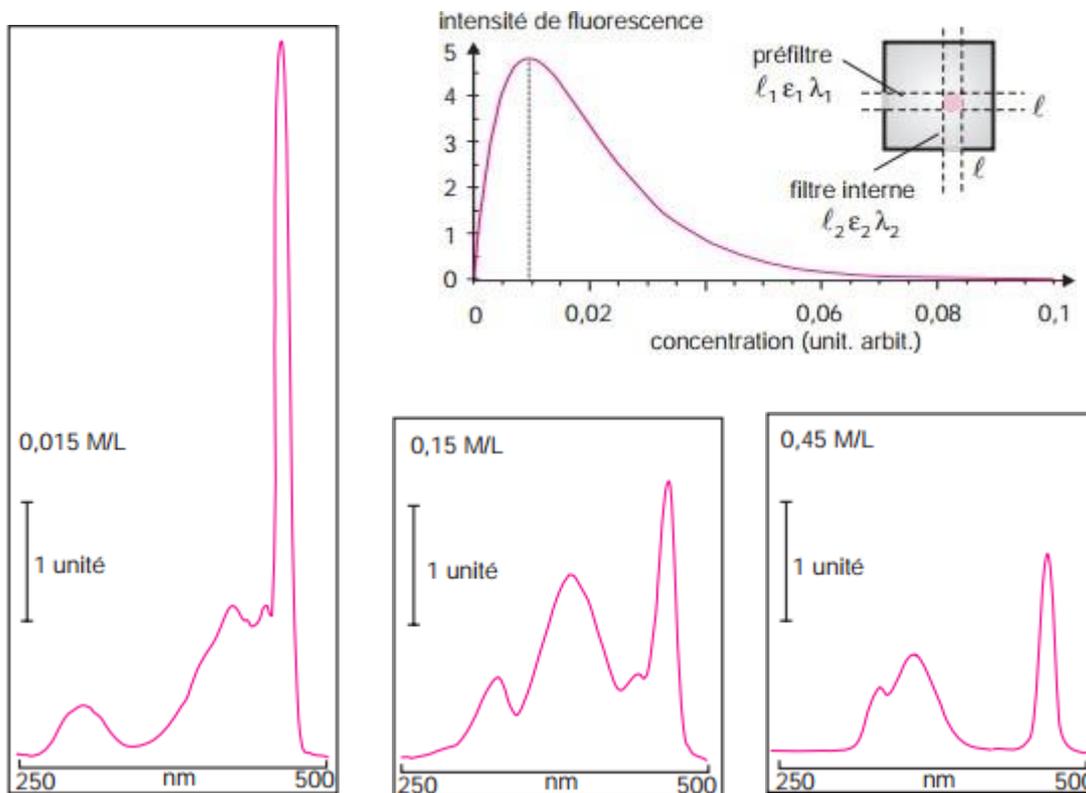
**Linéarité vérifiée:**

- Solutions diluées ( $A < 0,05$ )
- $\lambda_{ex}$  et  $\lambda_F$  du standard proches de celles de l'analyte.

## 2. Intensité de fluorescence $I_F$

### ↳ Conditions de la linéarité

Plus la solution est concentrée, plus faible est la fluorescence  
sorte de roll over ou de self quenching.



# 6- Facteurs influençant la fluorescence

## a- Augmentation de la fluorescence

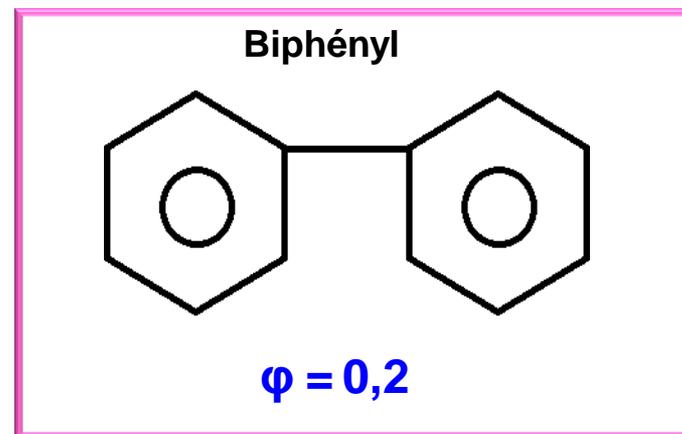
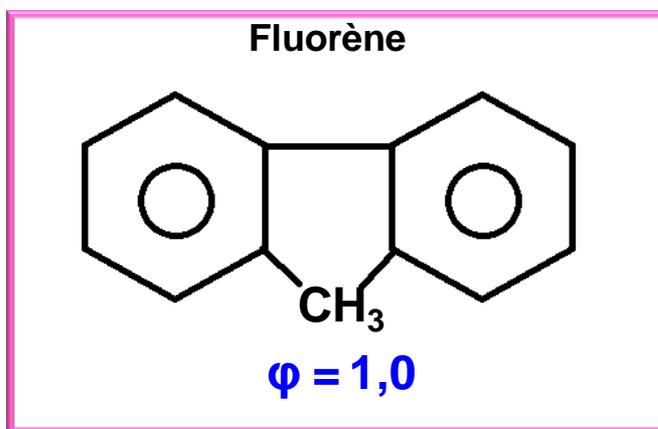
### 1- Les impuretés

- Dans **les solvants**, donc ils doivent être purs.
- Les **résidus de détergents**.
- Les **agents plastifiants**.

## 2- Effet de la rigidité structurale

La rigidité structurale augmente l'intensité de la fluorescence en:

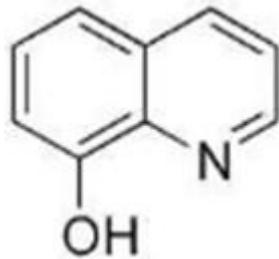
- *Diminuant* la relaxation non rayonnante et en
- *Facilitant* la relaxation par fluorescence.



### 3- La complexation

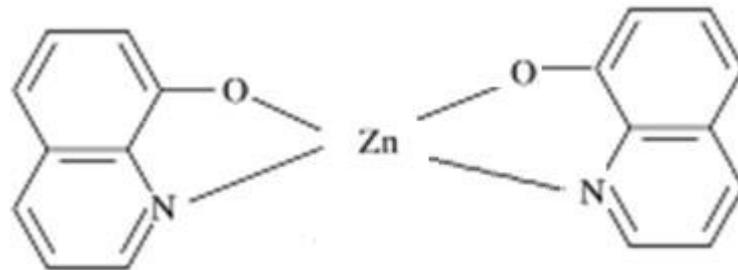
- **Tétracycline et  $Al^{3+}$**
- **8-hydroxy quinoléine et  $Zn^{2+}$**

8-hydroxy quiniléine



**Non fluorescent**

Complexe 8-hydroxy quiniléine



**Fluorescent**

# 6- Facteurs influençant la fluorescence

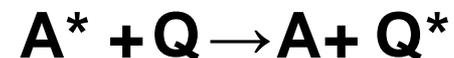
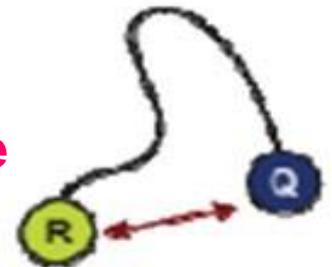
## b- Diminution de la fluorescence ou quenching

### 1- Le quenching d'origine chimique

Quenching de collision\*.

Les agents quenchant  
comportent des grpmts  
halogénés ou oxygénés

Collision  
intermoléculaire



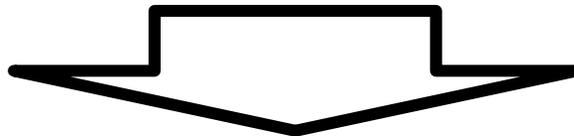
# 6- Facteurs influençant la fluorescence

## b- Diminution de la fluorescence ou quenching

### 1- *Le quenching d'origine chimique*

Quenching par changement de structure.

## Effet du pH



# Effet du pH

**Les acides et les bases faibles** ont des caractéristiques différentes, selon qu'ils soient **ionisés** ou **non ionisés**.

## Influence du pH sur L'intensité de la fluorescence

$$[HA] = \frac{C \cdot [H_3O^+]}{K_a + [H_3O^+]}$$
$$I_F = K [HA]$$
$$I_F = K \frac{C \cdot [H_3O^+]}{K_a + [H_3O^+]}$$

Si HA est fluorescent:  
 $I_F \downarrow$  quand le pH  $\uparrow$   $I_F$   
 $\uparrow$  quand le pH  $\downarrow$

# 6- Facteurs influençant la fluorescence

## b- diminution de la fluorescence ou quenching

### 1- Le quenching d'origine chimique

Quenching par changement de structure.

### Effet du pH

*Exemple* une base aniline

pH < 2 ion anilium  $C_6H_5NH_3^+$  non fluorescent

pH = 4,5 fluorescence moitié de sa valeur maximale [  $C_6H_5NH_2$  ]

augmente

7,5 < pH < 8 fluorescence maximale

11 < pH < 12 fluorescence constante puis elle diminue formation de

$C_6H_5NH^-$  **N O N F L U O R E S C E N T**

# 6- Facteurs influençant la fluorescence

## b- diminution de la fluorescence ou quenching

### 2- *Le quenching d'origine physique*

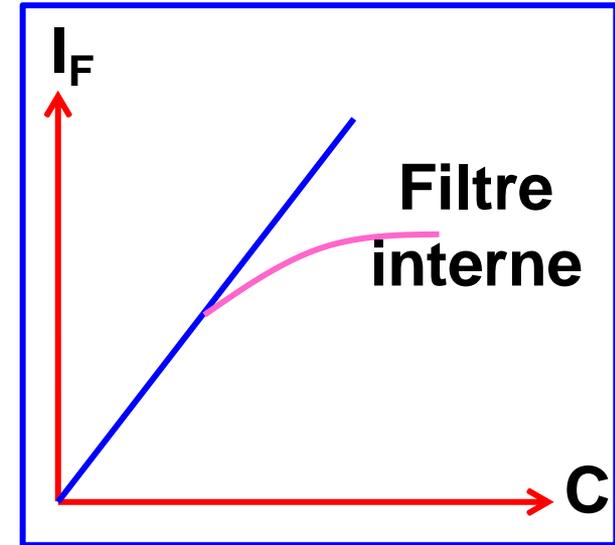
**Il est dû à l'absorption de la radiation émise par la substance elle-même ou self-quenching ce qui diminue le rendement quantique.**

**Il est possible d'éliminer ce phénomène en *diluant l'échantillon.***



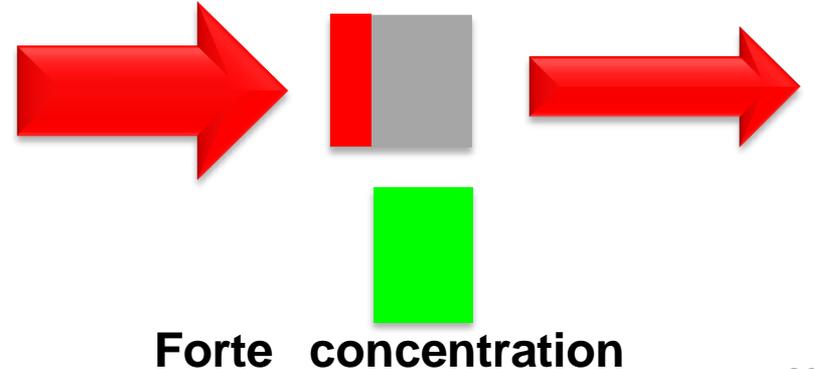
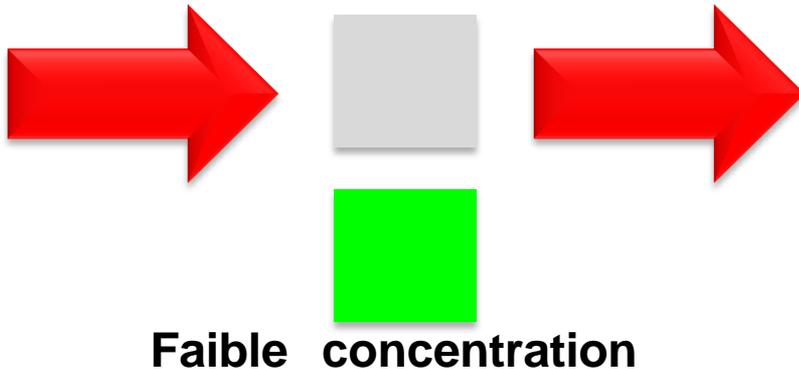
## L'effet du filtre interne

Réduction de l'intensité de la fluorescence par augmentation de l'épaisseur de la solution traversée par la radiation excitatrice.



Origines:

- Absorption de la lumière excitatrice.
- Absorption de la lumière d'émission (self absorption).



### **3- La photo-décomposition**

**Résulte de la prolongation de la durée d'excitation.**

**Favorisé par:**

- Faibles concentrations des solutions.**
- Forte intensité des sources lumineuses.**

**Phénomène réduit en:**

- Effectuant des mesures rapides.**
- Evitant la répétition des lectures sur le même échantillon.**
- Faisant un compromis entre les concentrations et intensité d'excitation.**

#### 4- Les substances inhibitrices

La présence d'oxygène moléculaire entraîne une diminution de la fluorescence mesurée.  
Évité par barbotage de l'**azote** dans la solution.

Les cations des métaux de transition colorés absorbent de l'énergie et inhibent la fluorescence.

L'effet inhibiteur des halogènes augmente avec l'augmentation de leurs poids atomique.

## ***5- L'influence de la température***

**Une augmentation de la  $T^\circ$  = augmentation du mouvement thermique des molécules (favorisant les pertes d'énergie par collisions (relaxation non rayonnante))**



**Une Diminution de rendement quantique et donc l'intensité de fluorescence**

# 6- Facteurs influençant la fluorescence

## b- Diminution de la fluorescence ou quenching

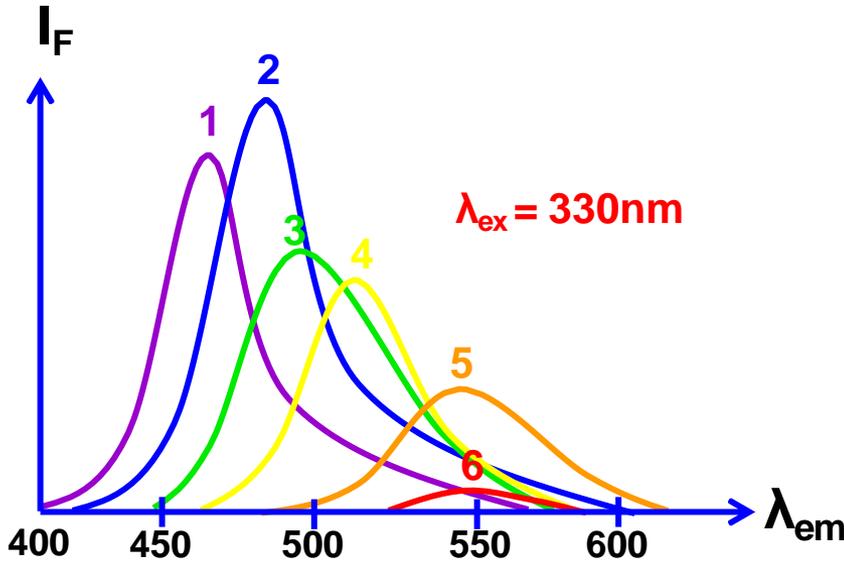
### *6- influence de solvant*

#### **La viscosité**

**La diminution de la viscosité conduit à une diminution de rendement quantique.**

## 6- influence de solvant

### Effet de la polarité du solvant

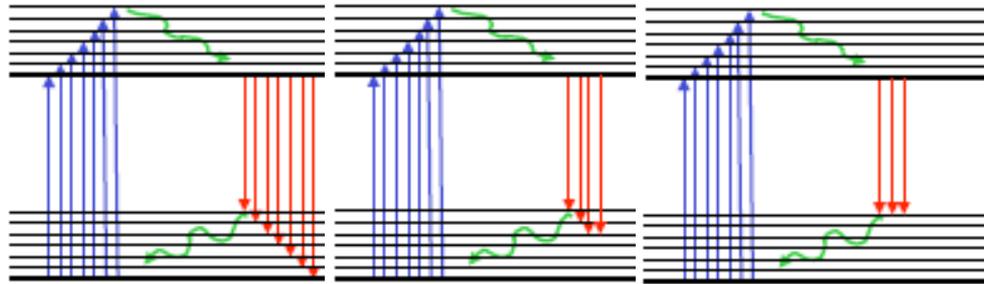


La polarité

Le rendement quantique

Blue shift

Red shift



Fluorescence du 6-bromoacétyl-2-diméthylaminophthalate dans différents solvants

Quand la polarité diminue, l'intensité de fluorescence augmente et  $\lambda$  diminue.

# 6- Facteurs influençant la fluorescence

## b- diminution de la fluorescence ou quenching

### 6- influence de solvant

Le solvant peut:

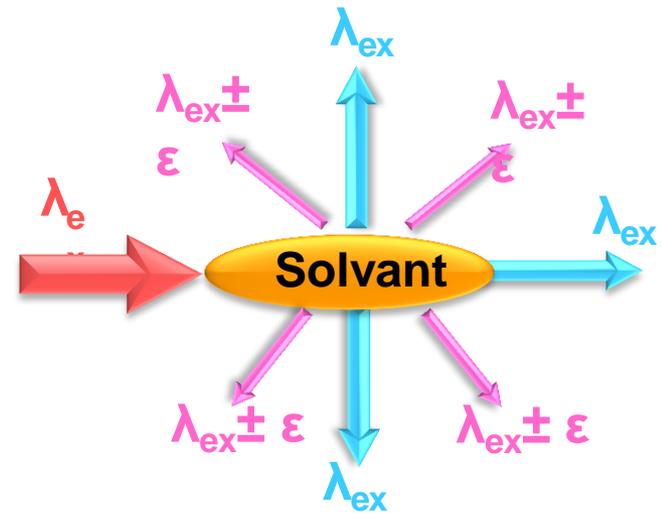
- Absorber le rayonnement incident et diminuer  $I_0$
- Absorber de la radiation fluorescente.
- Diffuser la lumière incidente:

Diffusion Raylight, diffusion Raman, lumière diffractée.

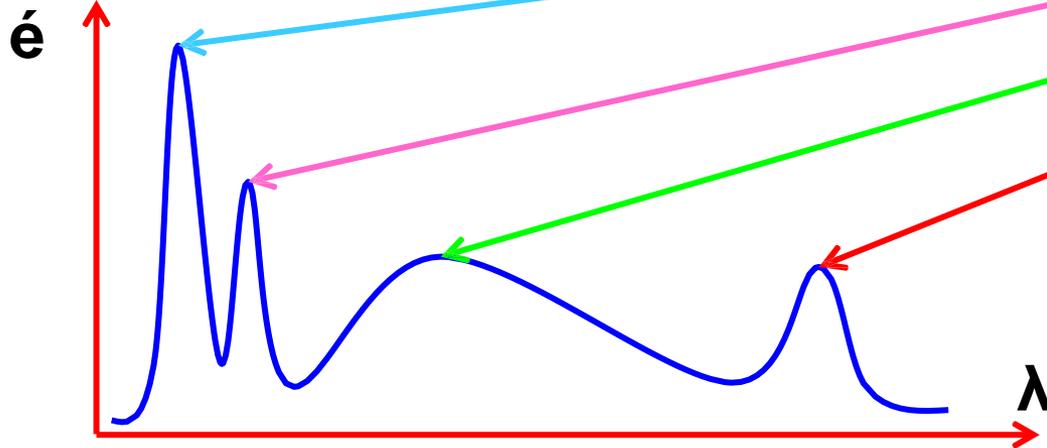
Effet de  
filtre  
intere

## 6- influence de solvant

La diffusion Raman de l'eau sert de test de sensibilité des fluorimètres. Celui-ci consiste à mesurer le rapport signal/bruit du pic Raman avec une cellule remplie d'eau.



Intensité



Diffusion Rayleigh ( $\lambda_{ex}$ )

Diffusion Raman ( $\lambda_{ex} \pm \epsilon$ )

Fluorescence

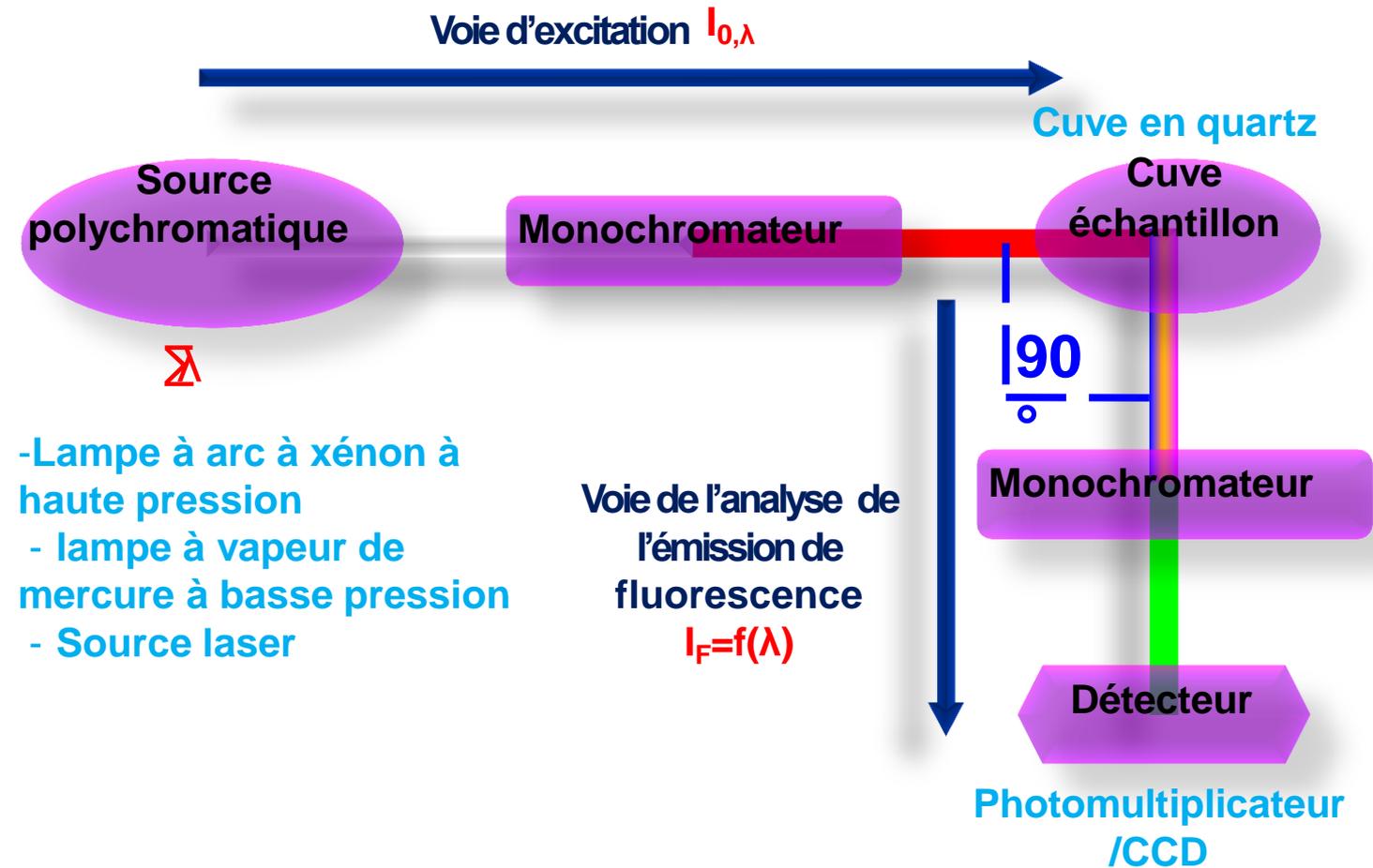
Lumière diffractée

(2<sup>e</sup> ordre du réseau)

En plus: Diffusion par effet Tyndall  
(présence de particules solides)

Manifestation  
lorsque les  $\lambda$   
d'excitation  
et d'émission sont  
proches

# 7- instrumentation



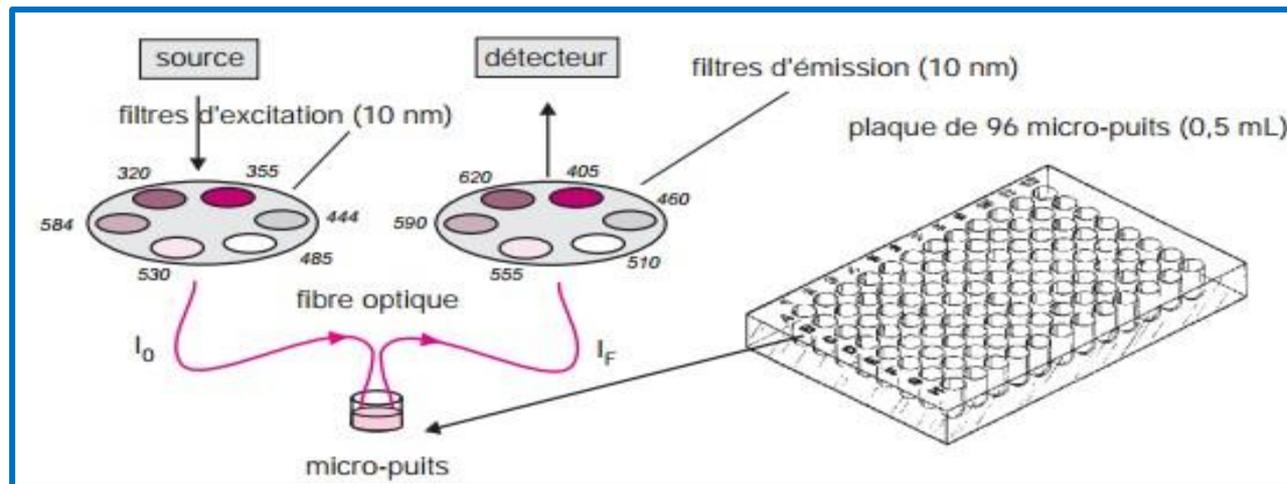
# 7- Instrumentation

Deux catégories d'appareils sont proposées par les constructeurs:

- les fluorimètres à rapport de fluorescence,
- les spectrofluorimètres.

Ces appareils sont de type monofaisceau.

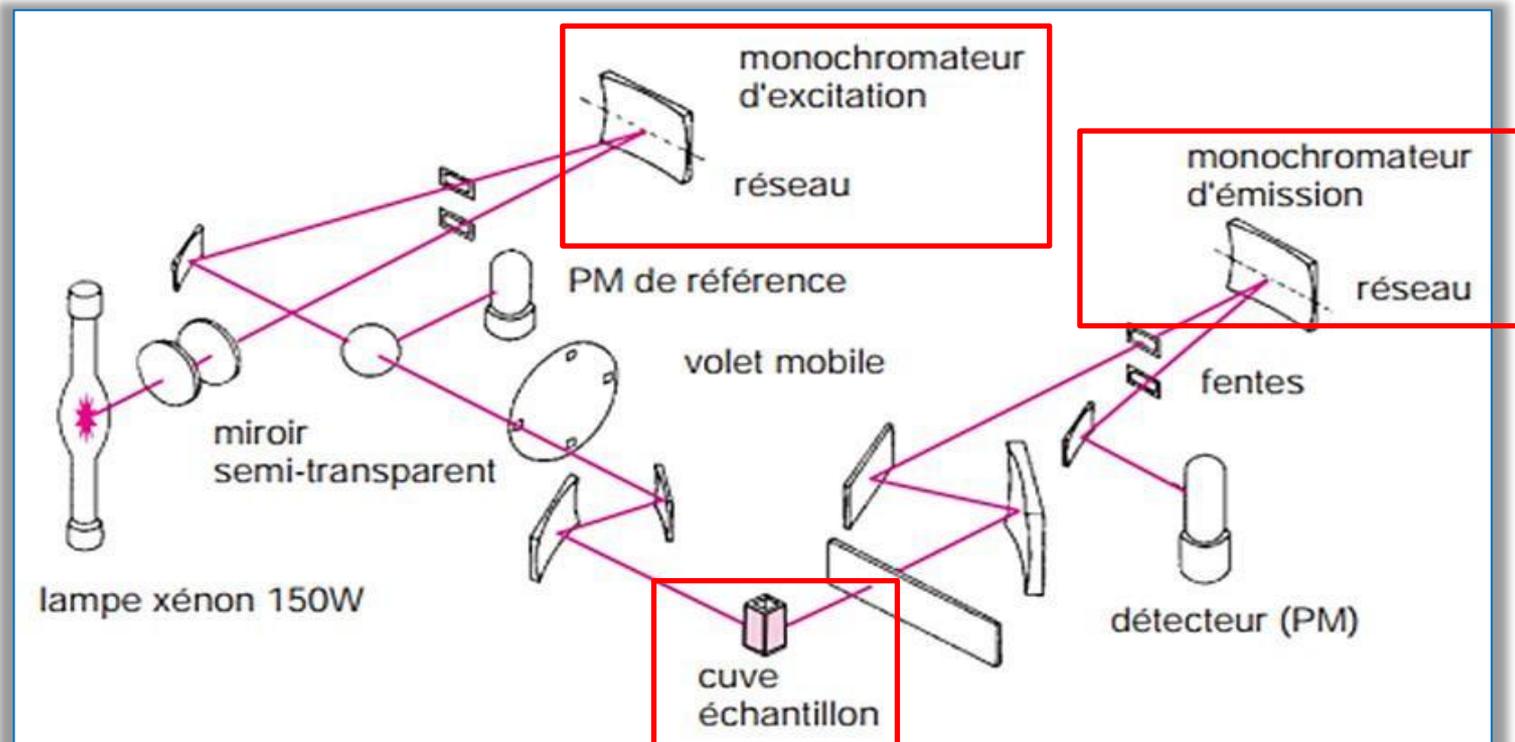
Le système mesure l'intensité de la fluorescence émise par les échantillons, par les étalons et par les standards de fluorescence (sulfate de quinine, de rhodamine B ou de 2-aminopyridine) ce qui élimine les fluctuations de la lampe et un bon nombre de paramètres de réglage de l'appareil.



# 7- Instrumentation

## Les spectrofluorimètres

Permettent l'étude plus complète des composés fluorescents, par l'enregistrement de leurs spectres **d'émission** et **d'excitation\***.



# 8- Applications

## a- Applications qualitatives

**Spectres intensité de la fluorescence en fonction de  $\lambda_{excitation}$ ,  $\lambda_{emission}$ , durée de vie de l'état excité)**

**L'étude porte sur:**

- $\lambda_{max}(ex, em)$
- $\phi$  le rendement quantique
- Le déplacement de ces maxima en relation avec les modifications moléculaires

# 8- Applications

## b- Applications quantitatives

### 1- Domaine pharmaceutique

**Alcaloïdes, vitamines (vit A, vit B), antibiotique (tetracycline), glucosides cardiotoniques (digoxine, digitoxine) adrénaline, pénouthiazine, méthotrexate, imipramine**

### 2- Applications biochimiques

**Salicylates dans le sang: qui produisent une fluorescence bleue après précipitation des protéines par l'acide tungstique et alcalinisation de l'échantillon ( exc 370 nm em 460 nm)**

# 8- Applications

## b- Applications quantitatives

### 3- Études des substances végétales

**Chlorophylles, huiles.**

### 4- Environnement

**Dosage des HPA dans les eaux de consommation par HPLC  
(seuil de détection très bas)**

### 5- Méthodes indirectes: couplage de marqueurs fluorescents

**OPA (orthophtaldéhyde) le marqueur le plus utilisé forme des complexes fluorescent avec amikacine, nitrazepam et certains AA aromatiques (tryptophane, tyrosine ou phenylalanine)**

# Transformation des composés non fluorescents

## Cas des composés inorganiques

**Les éléments métalliques combinés avec des réactifs organiques forment des composés de chélation fluorescents.**

Ion	Réactif	Fluorescence	Interférences
Al <sup>3+</sup> F <sup>-</sup>	Rouge d'alizarine R d'Aluminium du	500 500	Be, Co, Cr, Cu, F <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , Ni... Be, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ...
B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup>	rouge d'alizarine R (désactivation) Benzoïne	370	Be, Sb
Cd <sup>2+</sup>	(o-hydroxyphényl)-2- benzoxazole	Bleu	NH <sub>3</sub>
Li <sup>+</sup>	Hydroxy-8-quinoléine	580	Mg
Sn <sup>4+</sup>	Flavanol	470	F <sup>-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , Zr
Zn <sup>2+</sup>	Benzoïne	Vert	B, Be, Sb, ions colorés

**Réactifs fluorescents peu sélectifs**

# 8- Applications

## Sensibilité

La prise d'essai est de l'ordre de qlq microgrammes.

## Spécificité :

Sélection d'une longueur d'onde d'excitation et d'une longueur d'onde d'émission.

# 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.**

**Ce qui justifie son incorporation dans les différentes pharmacopées majeures ainsi que son utilisation autant que détecteur pour les différents instruments analytiques.**