

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE BADJI MOKHTAR-ANNABA

FACULTE DE MEDECINE

DEPARTEMENT DE PHARMACIE

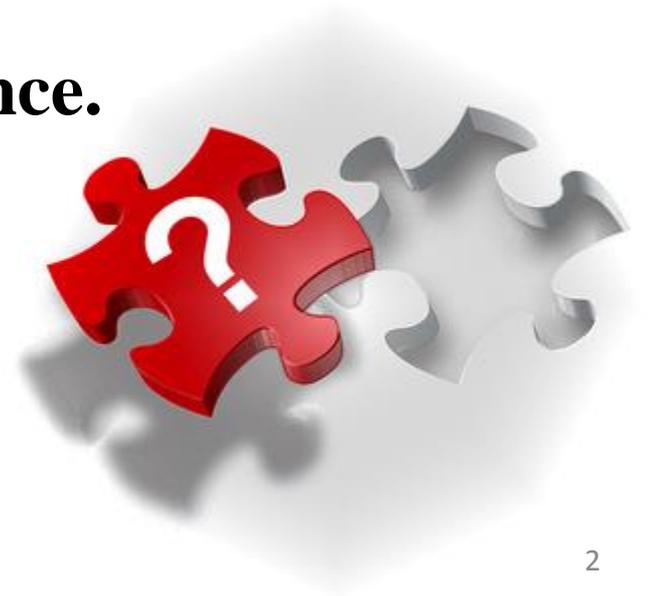
LABORATOIRE DE CHIMIE ANALYTIQUE

LA FLUORIMETRIE

Année universitaire: 2019/2020

Plan du cours

- 1- Définition et principe.**
- 2- Origine du phénomène de fluorescence.**
- 3- Spectres d'émission et d'excitation.**
- 4- La durée de vie de la fluorescence.**
- 5- Relation entre l'intensité de la fluorescence et concentration.**
- 6- Facteurs influençant la fluorescence.**
- 7- Instrumentation.**
- 8- Application.**
- 9- Conclusion.**



1- Définition et principe

La spectrométrie de fluorescence moléculaire méthode de la **(PHOTOLUMINESCENCE)** étudie **l'émission** de 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.

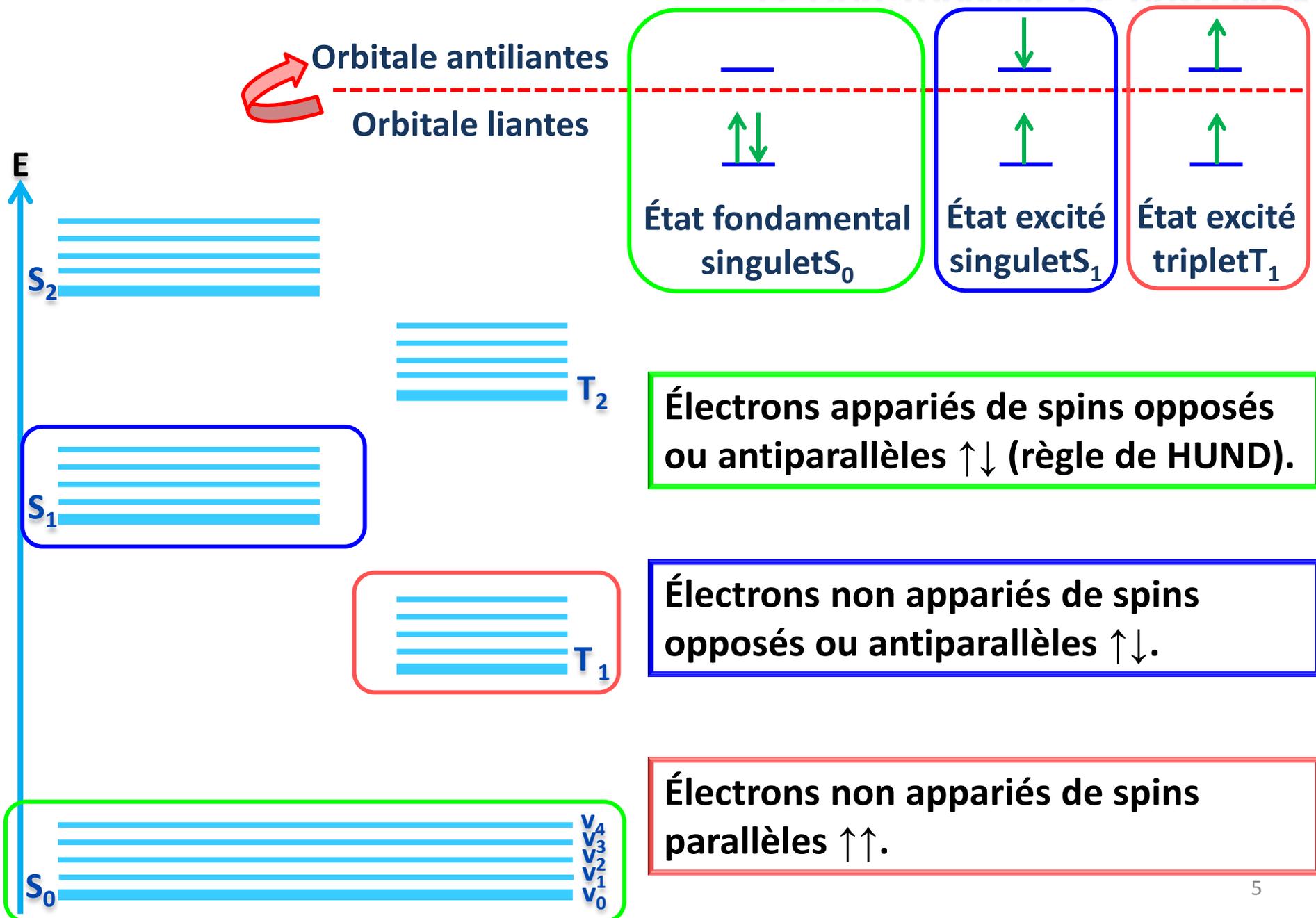
2- Origine du phénomène de fluorescence

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



2. origine de la fluorescence

LE DIAGRAMME DE JABLONSKI

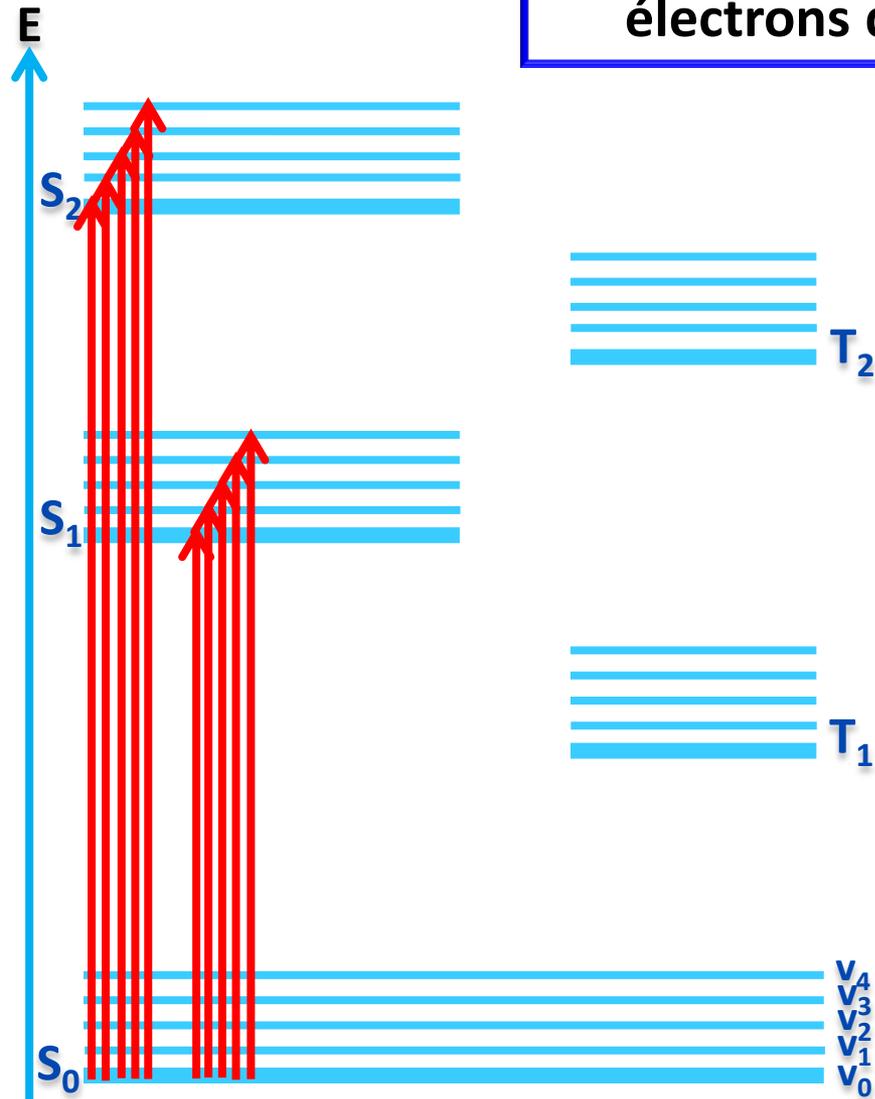


2. origine de la fluorescence

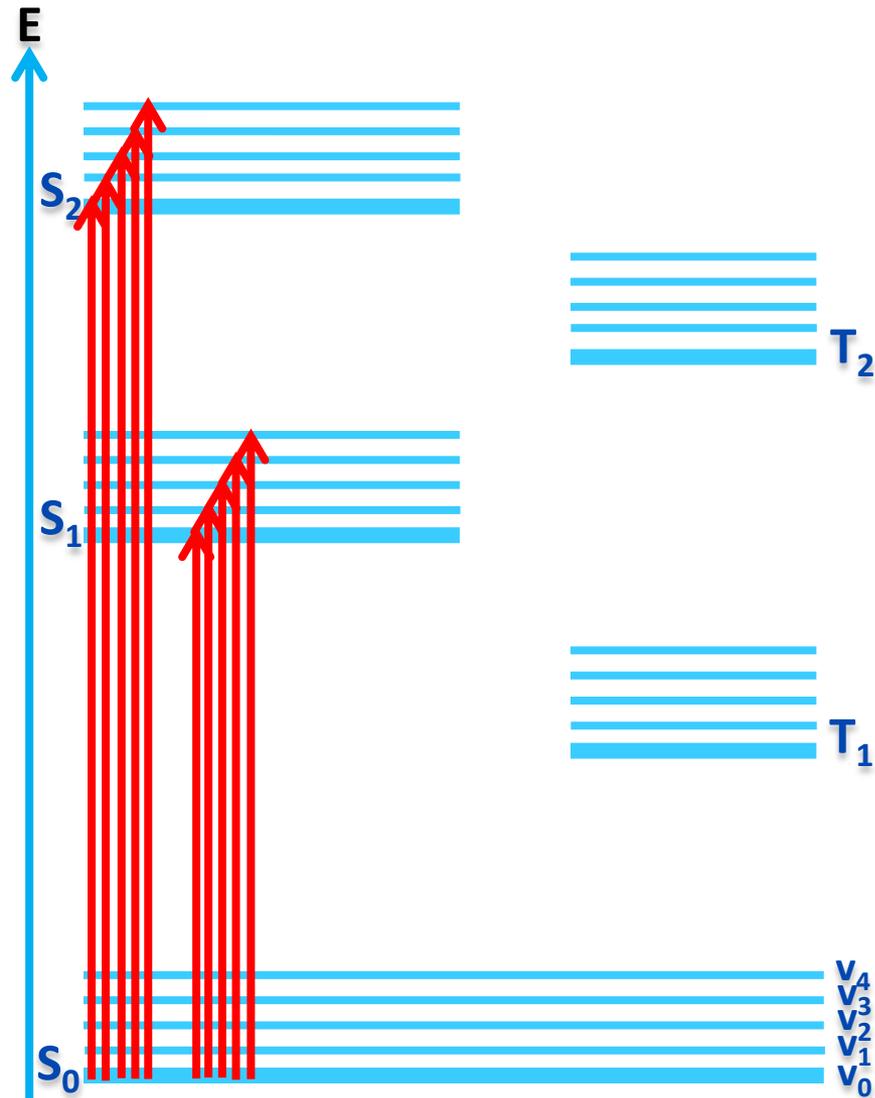
LE DIAGRAMME DE JABLONSKI

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

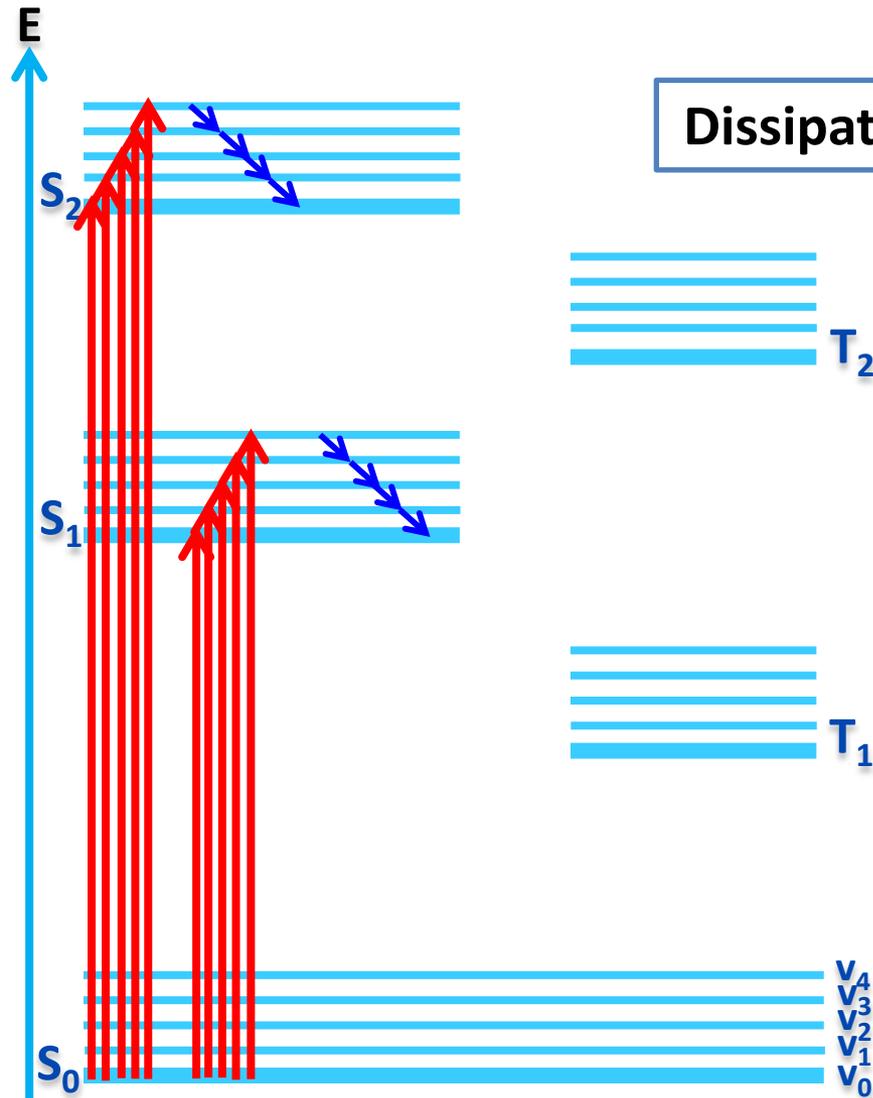
- Désactivation **directe***
- Désactivation **après changement de multiplicité***.

2. origine de la fluorescence

LE DIAGRAMME DE JABLONSKI

2- Les processus de désactivation

↳ Transitions non radiatives



Dissipation de l'énergie sous forme de chaleur

Relaxation vibrationnelle

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

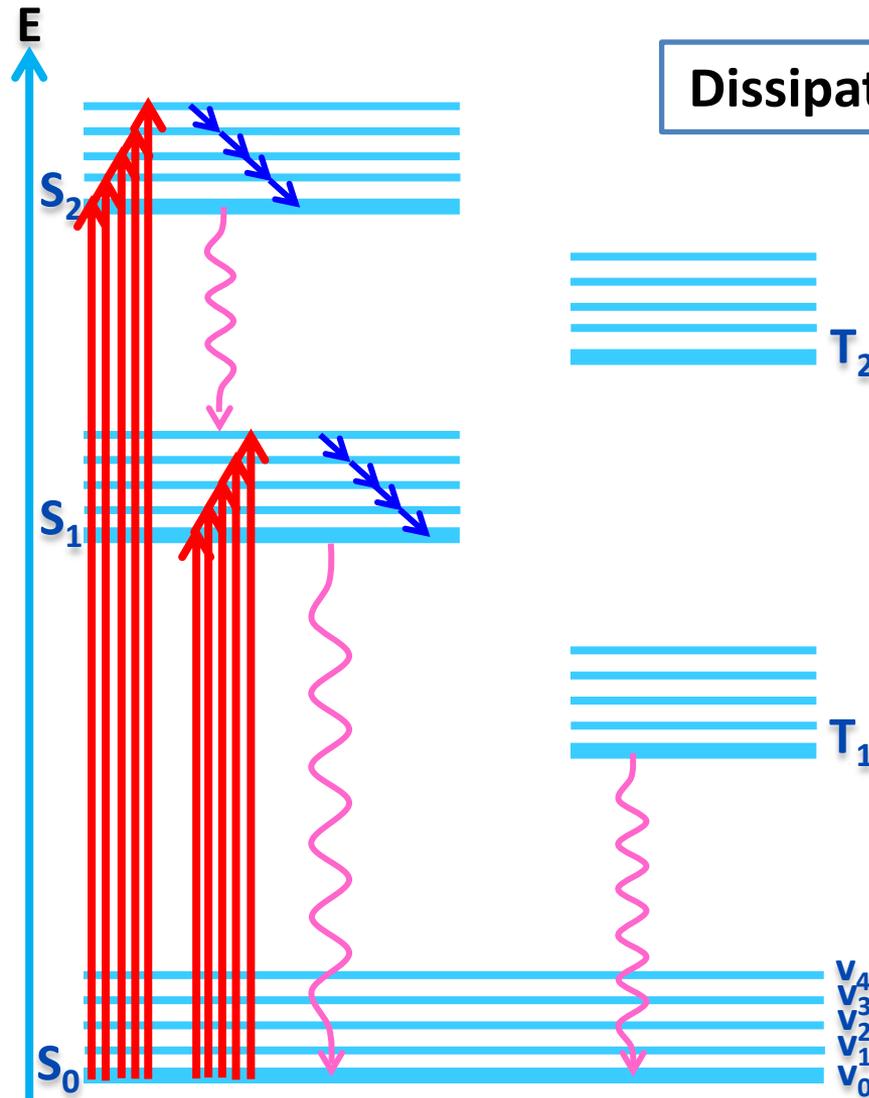
Elle se produit en **10⁻¹¹-10⁻¹⁰s.**
(collision avec le solvant).

2. origine de la fluorescence

LE DIAGRAMME DE JABLONSKI

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)

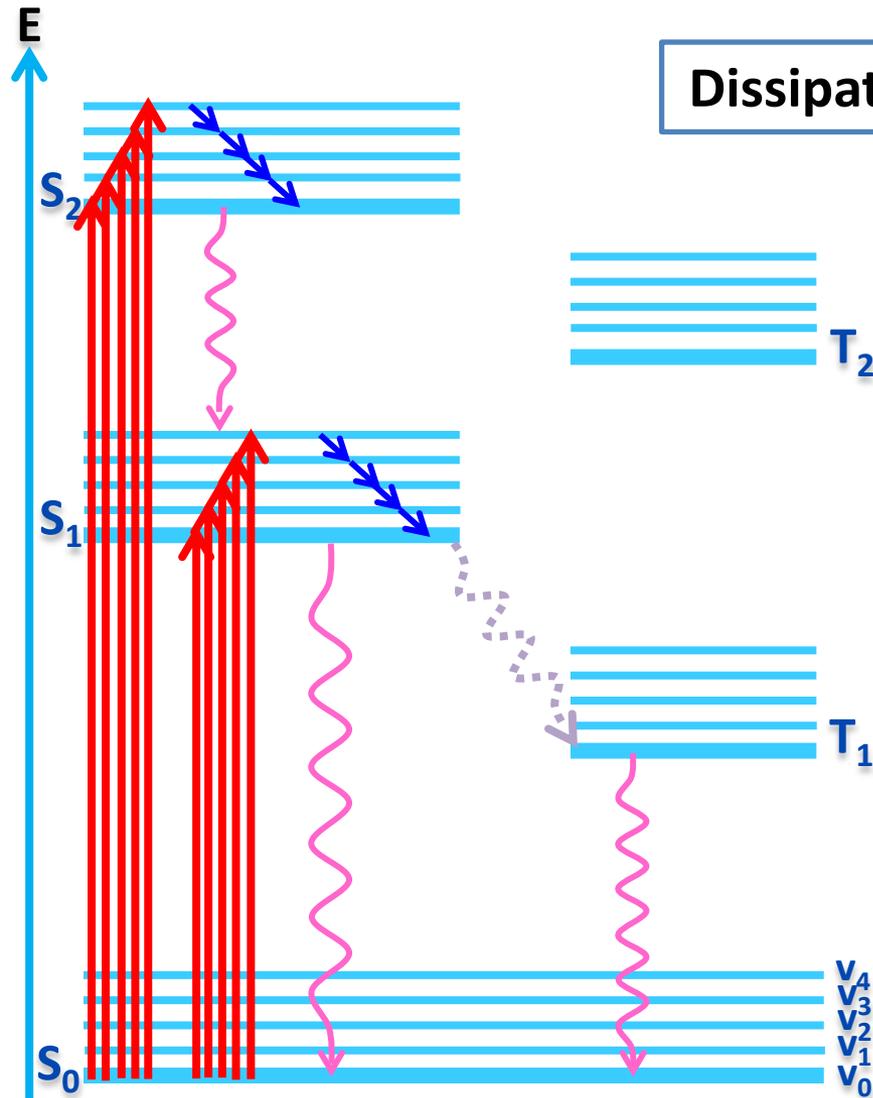
Conversion externe
Désactivation d'un état électronique excité par **collision avec le solvant**.
(**collisional quenching**)

2. origine de la fluorescence

LE DIAGRAMME DE JABLONSKI

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**.

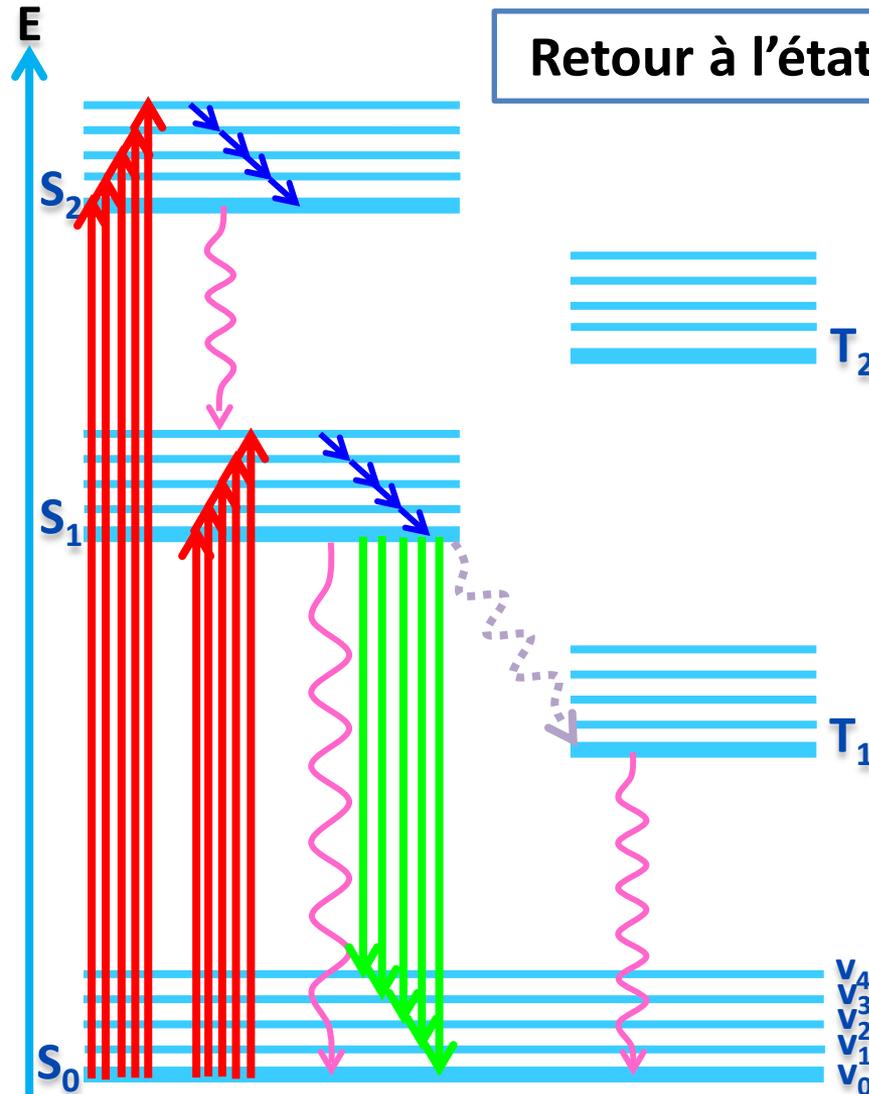
Évolution d'un état excité singulet S_1 à un état excité triplet T_1 d'énergie voisine et de **durée de vie plus longue**.

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 S₁** et l'état fondamental **S₀**.

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

↳ La fluorescence

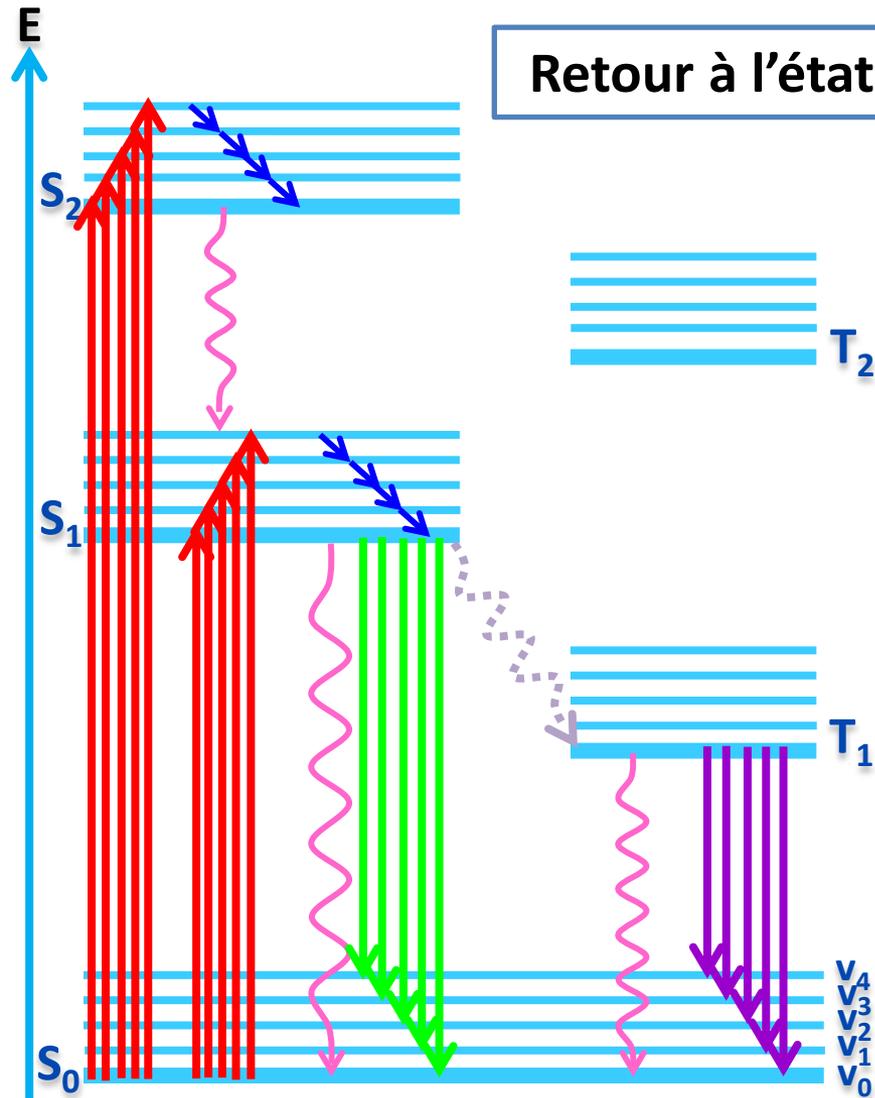
La fréquence de la radiation **v₂ < v₁** (sauf **fluorescence anti-stockes***)

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 .

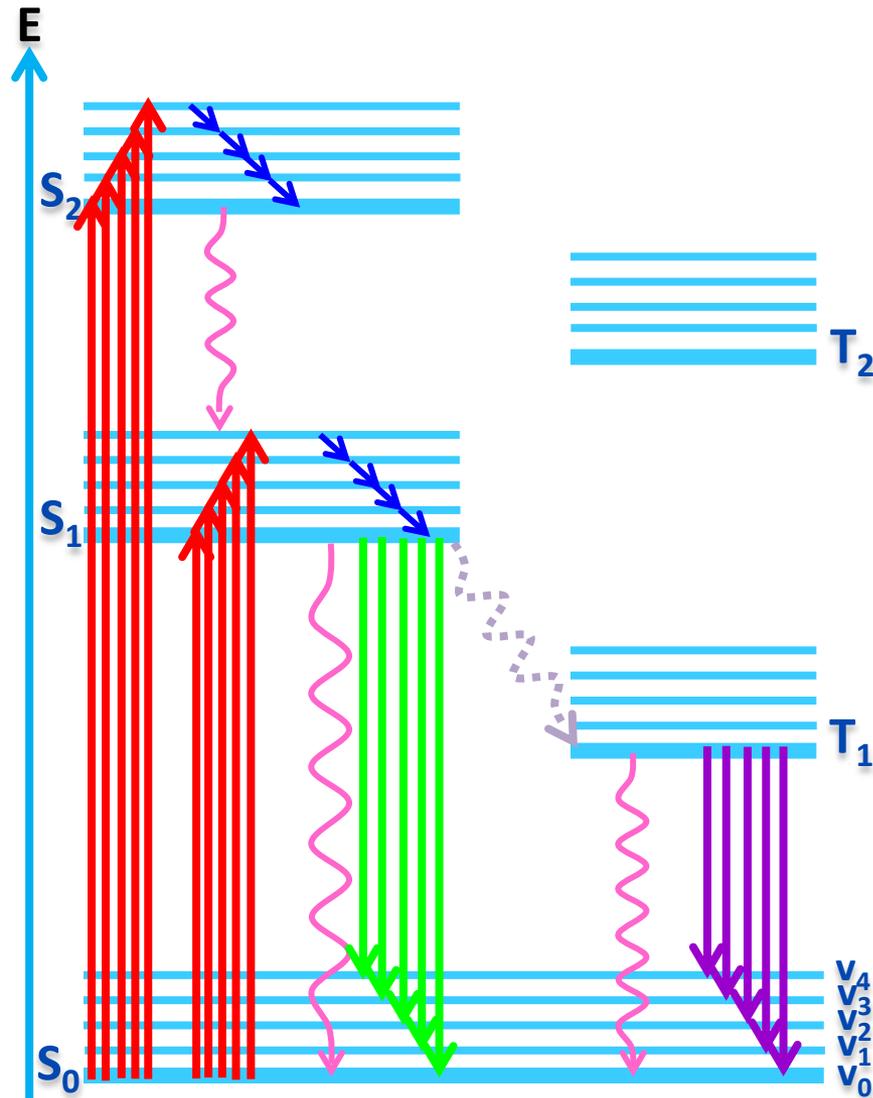
- Désactivation par émission de lumière de longueur d'onde **plus grande** que celle de la lumière initialement absorbée ou celle émise par fluorescence.

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

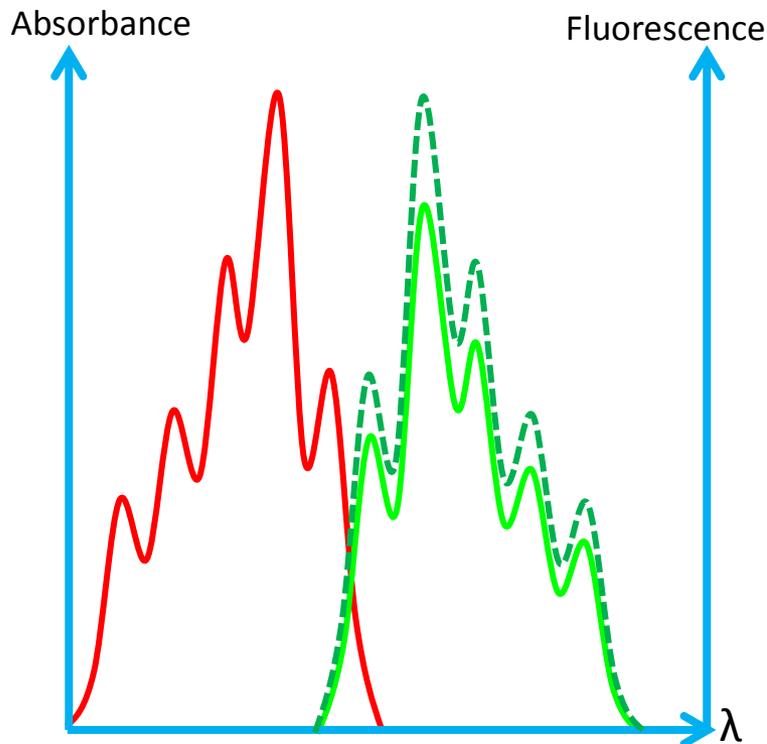
- Transfert d'énergie entre un **état triplet excité** et un **état singulet fondamental**.
- Elle est **moins probable**.
- Désexcitation **très longue** (10^{-4} et 10^4 s).

3. Spectres d'excitation et d'émission

Chaque molécule fluorescente présente *deux spectres caractéristiques**

SPECTRE D'EXCITATION

SPECTRE D'ÉMISSION

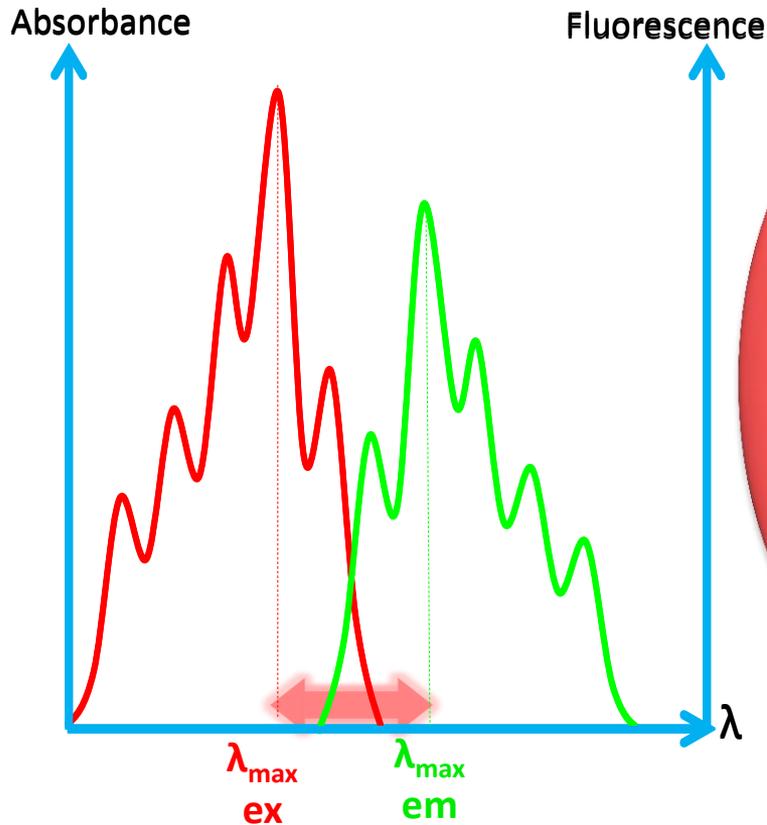


Dans un milieu optiquement transparent le spectre d'émission est **une image inversée** (*effet miroir*) du spectre d'excitation.

3. Spectres d'excitation et d'émission

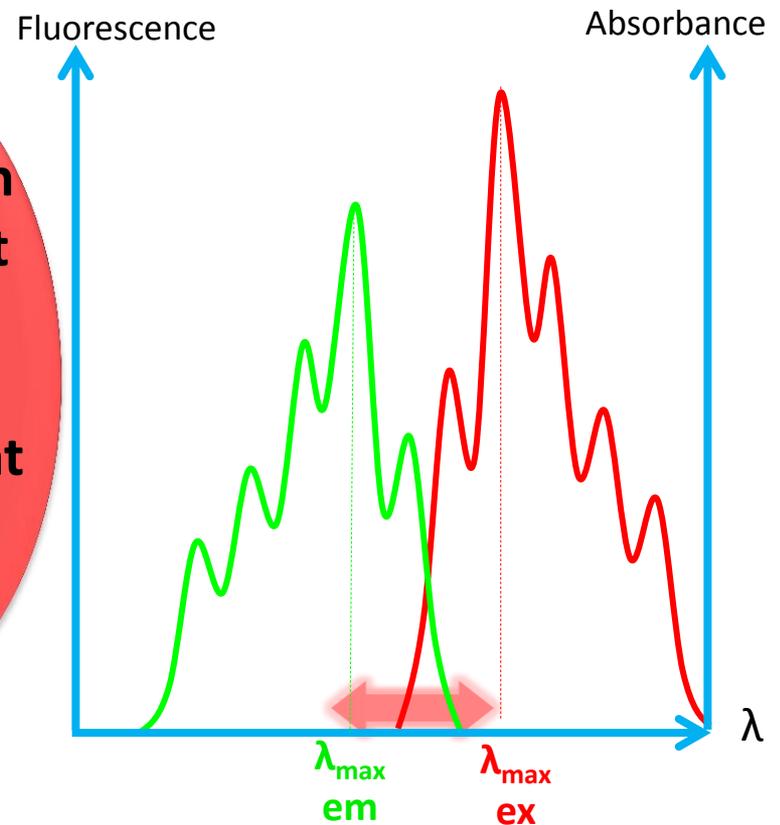
Par dissipation de l'énergie:
- L'énergie émise est *plus faible* que l'énergie excitatrice
- La fluorescence est caractérisée par $\lambda_F > \lambda_A$

Déplacement de Stokes
(Stokes shift)



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

Fluorescence anti-stokes*



4- Durée de vie de fluorescence

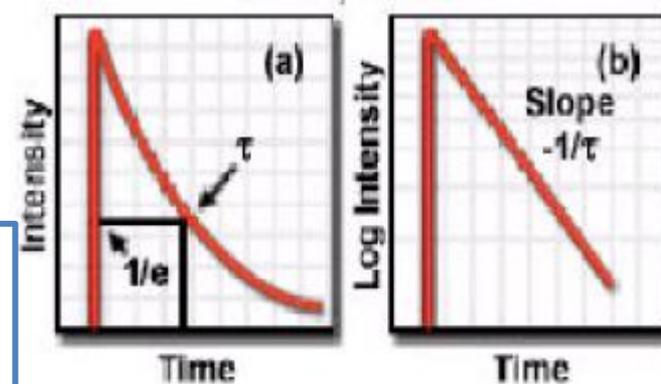
Pratiquement la durée de vie de l'état S1 est très brève (ordre de qq ns)

On définit pour chaque espèce « le temps de vie radiatif » τ

Fonction exponentielle indépendante de la concentration

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

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



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

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

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

τ = Durée de vie du fluorochrome

5- Relation entre intensité de la fluorescence et concentration

1. Rendement quantique de fluorescence ϕ_f

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

$$\phi_f = \text{nombre de photon émis} / \text{nombre de photons absorbés} = I_F / I_A$$

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°.

Ne dépend ni de λ ni de l'intensité de la source lumineuse.

1. Rendement quantique de fluorescence ϕ_f

↳ Rendement quantique relatif*

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

ϕ_x : Rendement quantique de la fluorescence de la molécule étudiée

ϕ_{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 la 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 λ*).

2. Intensité de fluorescence I_F

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
 ϕ_F : rendement quantique de la fluorescence
A: Absorption molaire à λ
 l : Longueur du trajet optique
C: Concentration de l'échantillon (M)
 ϵ_λ : Absorption molaire à λ

I_F est proportionnelle à I_A et à ϕ_F

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

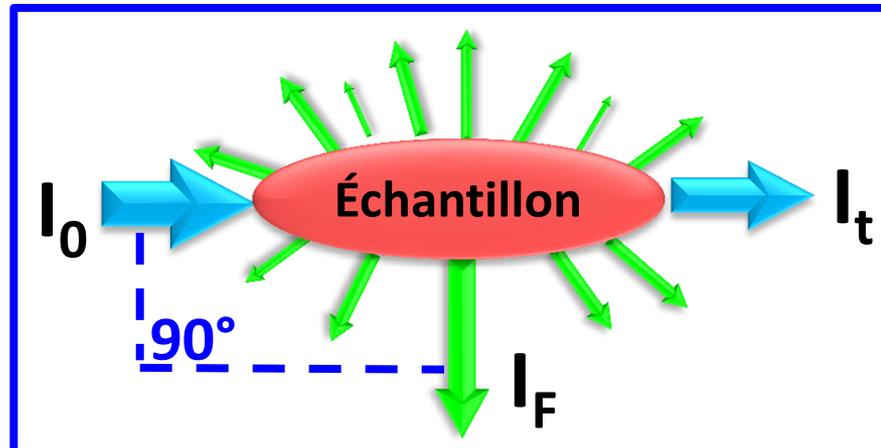
I est donnée par la loi de Beer-Lambert

$$I_f = \phi_F I_0 (2,3 \epsilon_\lambda \cdot l \cdot c)$$

On ne mesure qu'une partie de la fluorescence

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

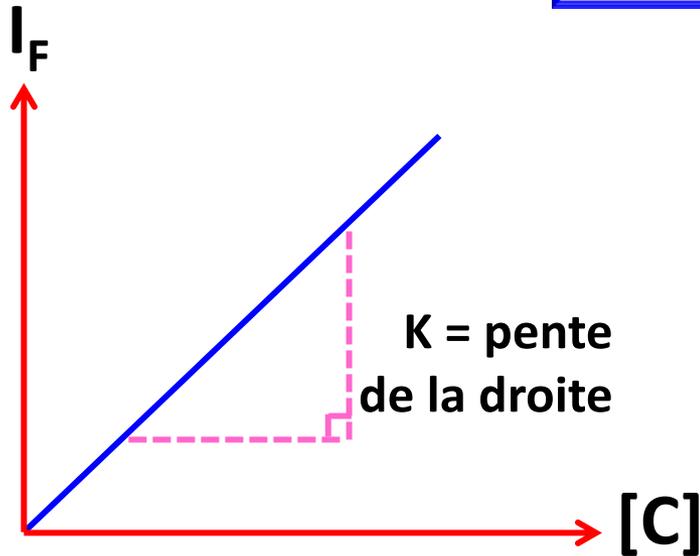
$$I_F = K C$$



2. Intensité de fluorescence I_F

↪ Conditions de la linéarité

$$I_F = K C$$



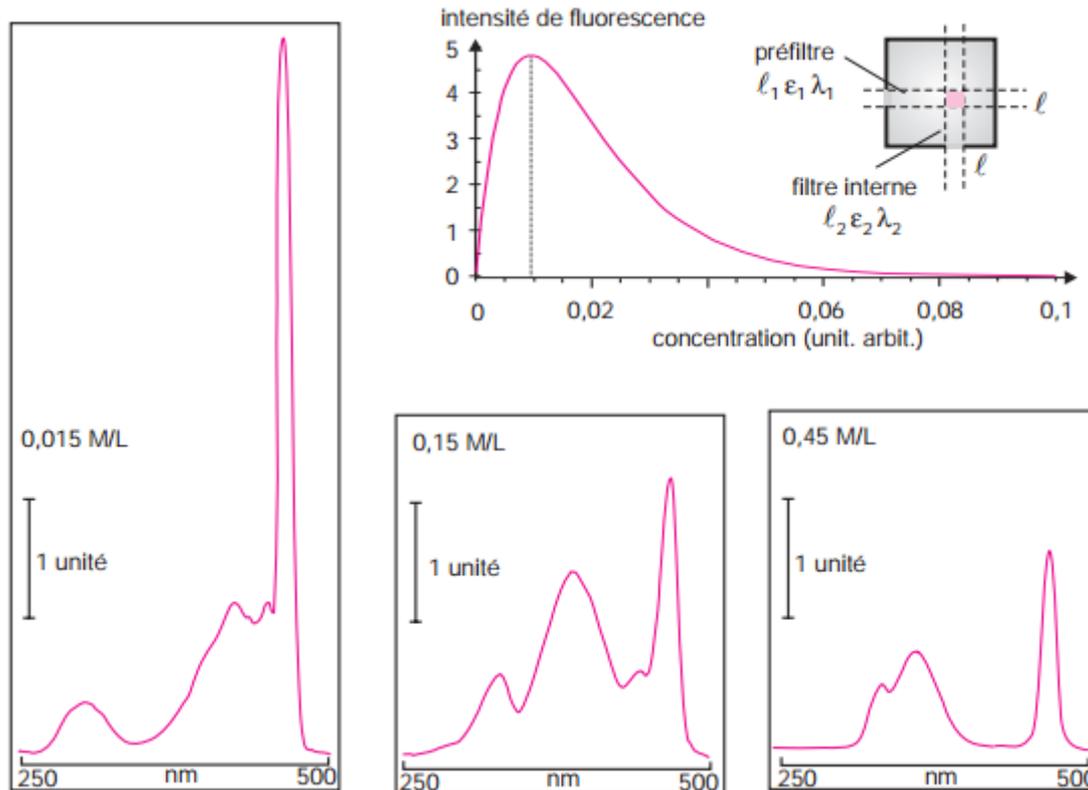
Linéarité vérifiée:

- Solutions diluées ($A < 0,05$)
- λ_{ex} et λ_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

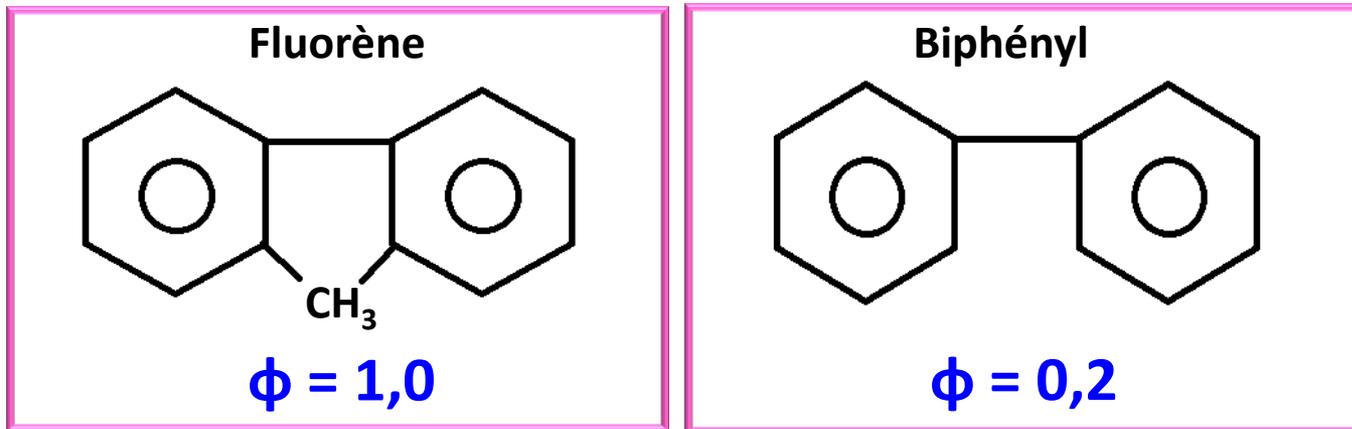
1- Les impuretés

- 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:

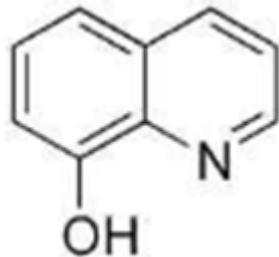
- **Diminuant** la relaxation non rayonnante et en
- **Facilitant** la relaxation par fluorescence.



3- La complexation

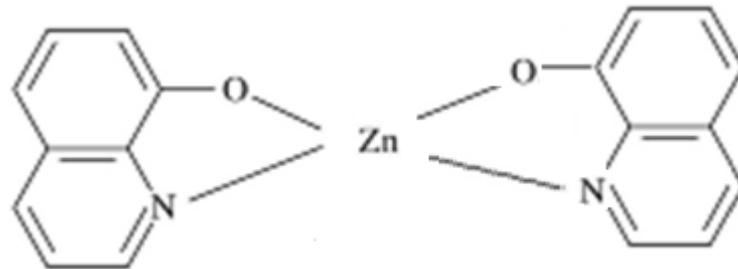
- **Tétracycline et Al^{3+}**
- **8-hydroxy quinoléine et Zn^{2+}**

8-hydroxy quinoléine



Non fluorescent

Complexe 8-hydroxy quinoléine



Fluorescent

6- Facteurs influençant la fluorescence

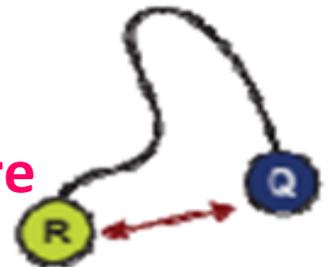
b- Diminution de la fluorescence ou quenching

1- Le quenching d'origine chimique

Quenching de collision*.

Les agents quenchant
comportent des grpmts
halogénés ou oxygénés

Collision
intermoléculaire



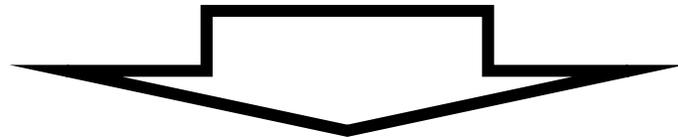
6- Facteurs influençant la fluorescence

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

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

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

$C_6H_5NH^-$ **NON FLUORESCENT**

6- Facteurs influençant la fluorescence

b- diminution de la fluorescence ou quenching

2- *Le quenching d'origine physique*

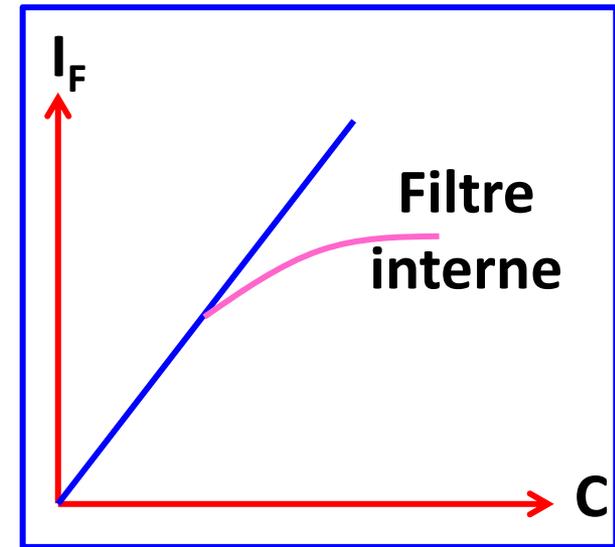
Il est dû à l'absorption de la radiation émise par la substance elle-même ou **self-quenching** ce qui diminue le rendement quantique.

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



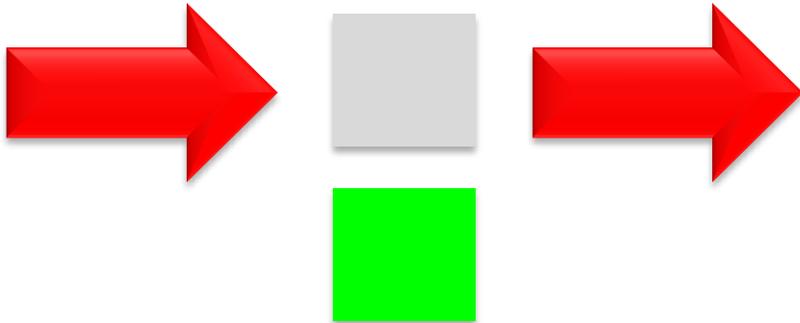
L'effet du filtre interne

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

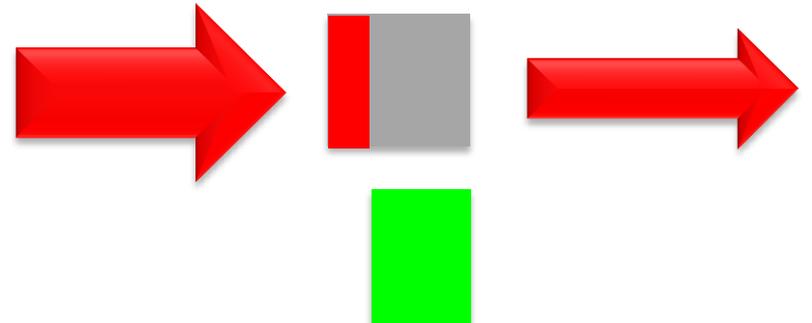


Origines:

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



Faible concentration



Forte concentration

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°** = 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

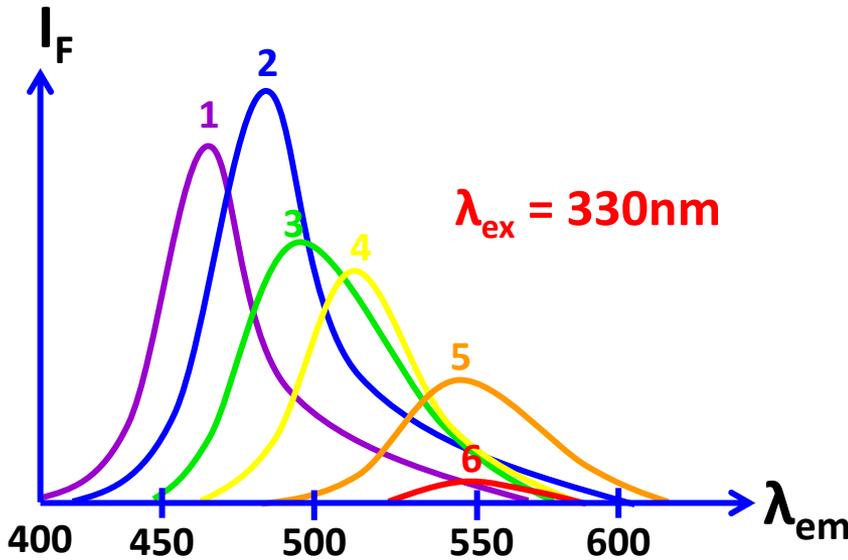
6- influence de solvant

La viscosité

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

6- influence de solvant

Effet de la polarité du solvant



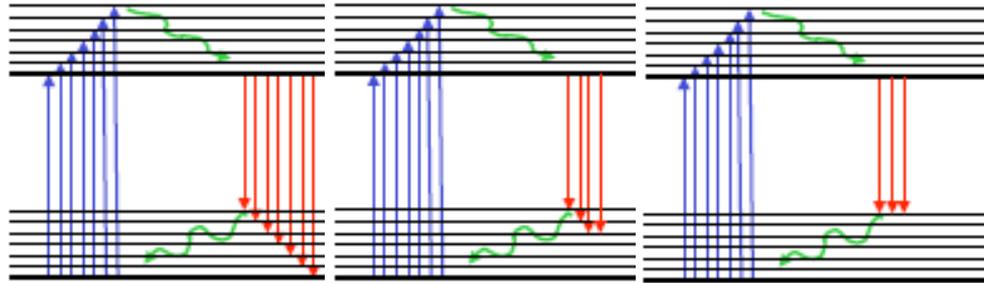
1. Tolène
2. Chloroforme
3. Acétonitrile
4. Éthanol
5. Méthanol
6. Eau

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 λ diminue.

6- Facteurs influençant la fluorescence

b- diminution de la fluorescence ou quenching

6- influence de solvant

Le solvant peut:

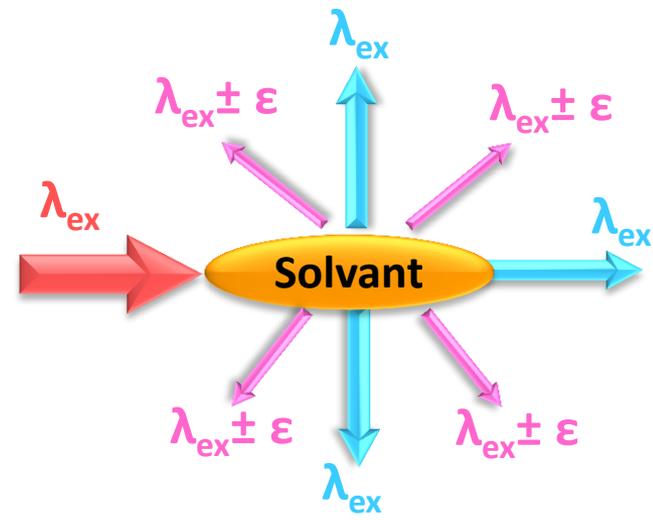
- Absorber le rayonnement **incident et diminuer I_0**
- Absorber de la radiation **fluorescente.**
- Diffuser la lumière incidente:

Diffusion Raylight, diffusion Raman, lumière diffractée.

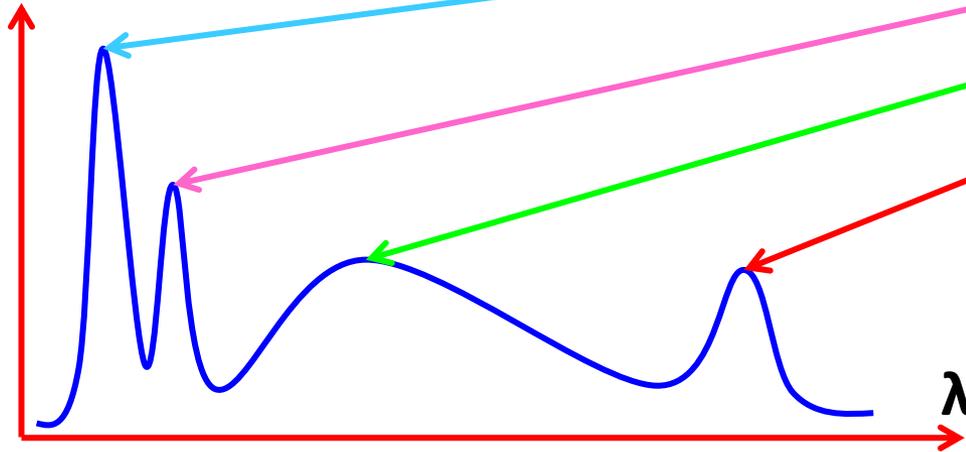
Effet de
filtre
intere

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

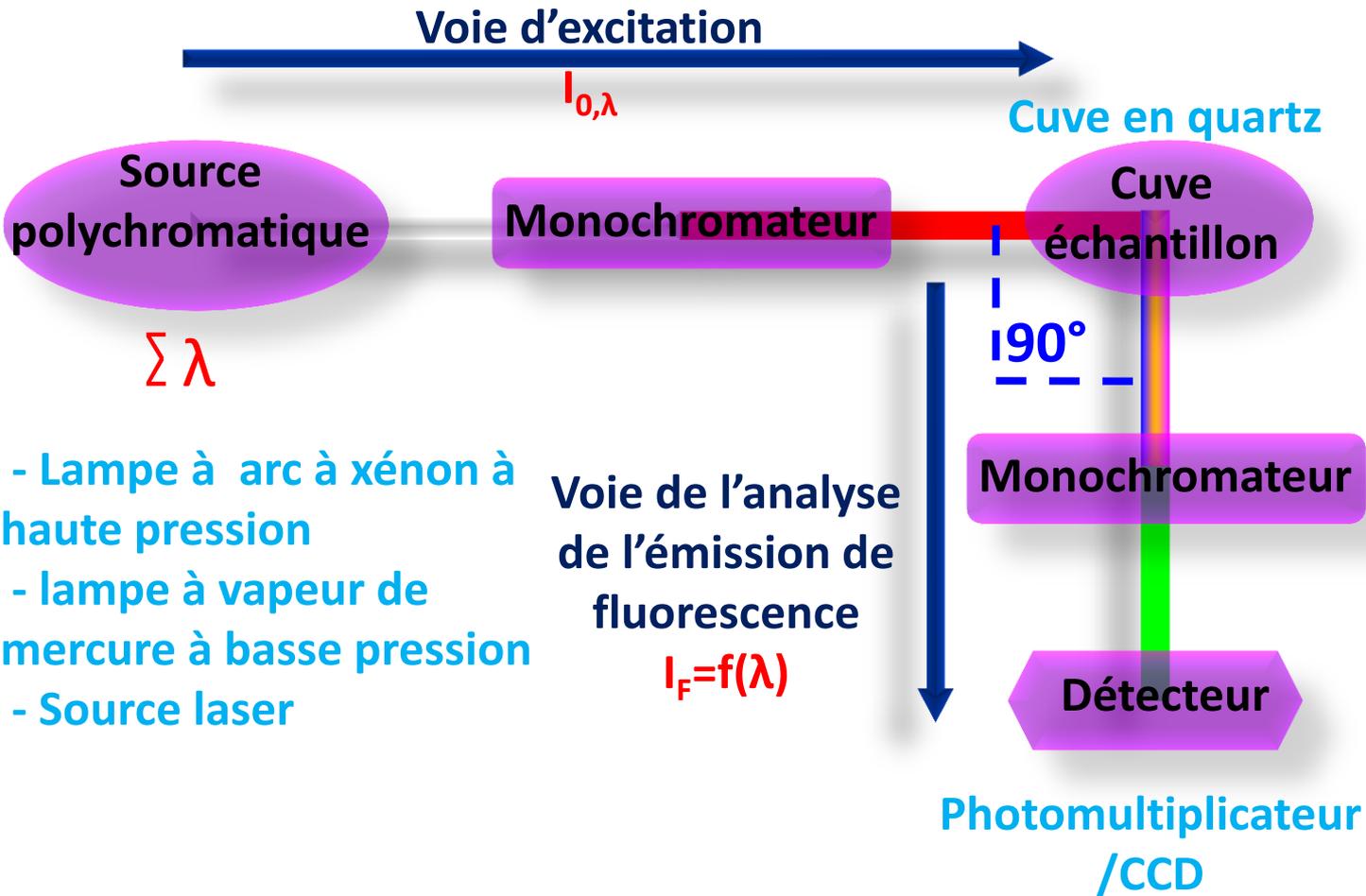


Diffusion Rayleigh (λ_{ex})
Diffusion Raman ($\lambda_{ex} \pm \epsilon$)
Fluorescence
Lumière diffractée
(2^e ordre du réseau)

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

Manifestation
lorsque les λ
d'excitation
et d'émission sont
proches

7- instrumentation



- Lampe à arc à xénon à haute pression
- lampe à vapeur de mercure à basse pression
- Source laser



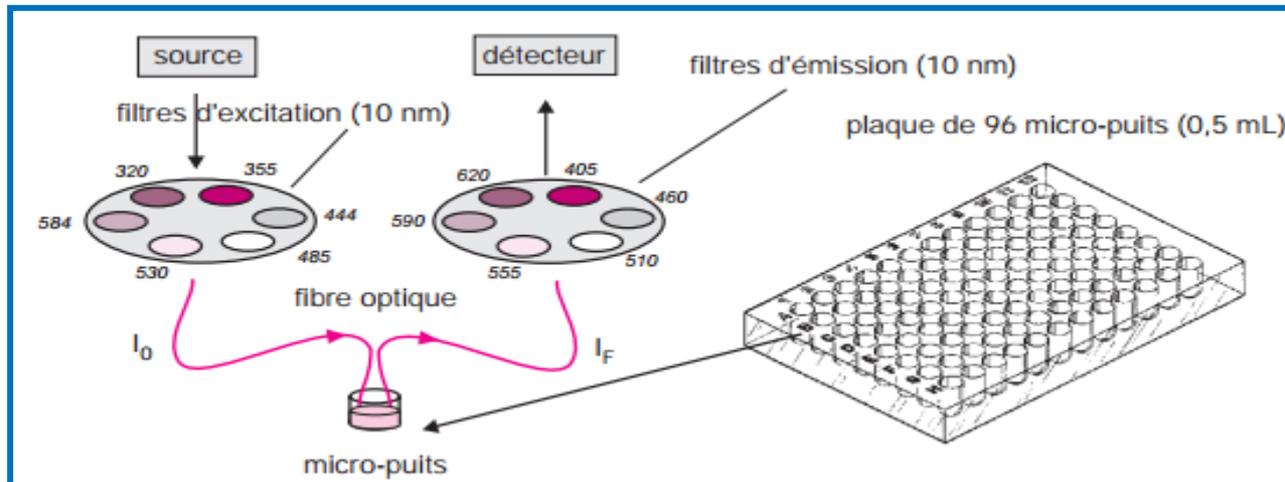
7- Instrumentation

Deux catégories d'appareils sont proposées par les constructeurs:

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

Ces appareils sont de type **monofaisceau**.

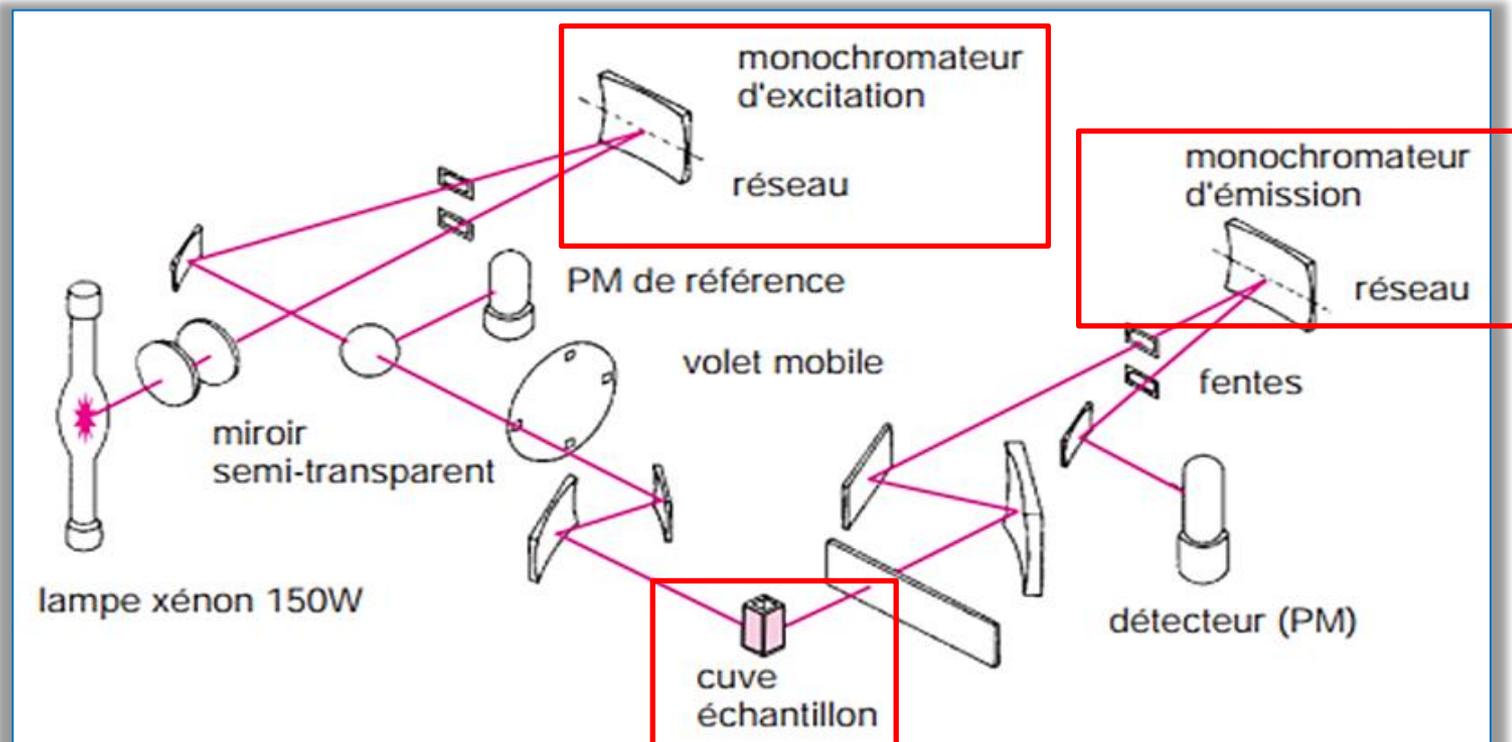
Le système mesure l'intensité de la fluorescence émise par les **échantillons**, par les **étalons** et par les **standards** de fluorescence (sulfate de quinine, de rhodamine B ou de 2-aminopyridine) ce qui élimine les **fluctuations** de la lampe et un bon nombre de paramètres de réglage de l'appareil.



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 $\lambda_{excitation,emission}$, *durée de vie de l'état excité*)

L'étude porte sur:

- $\lambda_{max}(ex,em)$
- ϕ 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, pénothiazine, 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 **certaines 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 ³⁺	Rouge d'alizarine R	500	Be, Co, Cr, Cu, F ⁻ , NO ₃ ⁻ , Ni...
F ⁻	Complexe d'Aluminium du rouge d'alizarine R (désactivation)	500	Be, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, PO ₄ ³⁻ ...
B ₄ O ₇ ²⁻	Benzoïne	370	Be, Sb
Cd ²⁺	(o-hydroxyphényl)-2-benzexazole	Bleu	NH ₃
Li ⁺	Hydroxy-8-quinoléine	580	Mg
Sn ⁴⁺	Flavanol	470	F ⁻ , PO ₄ ³⁻ , Zr
Zn ²⁺	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.