

**2015-2016**

**APPAREILLAGE**

**Chimie analytique**

**– UE 7: –**

Suite cours Appareillage

<b>Semaine</b> : n°14 (du 07/12/15 au 11/12/15) <b>Date</b> : 10/09/2013	<b>Heure</b> : de 9h00 à 10h00	<b>Professeur</b> : Pr. Goossens
<b>Binôme</b> : n°B44		<b>Correcteur</b> : B43
<b>Remarques du professeur</b> : « La fluorescence est au programme de l'internat, sera revu en 4 <sup>e</sup> année »		

## **PLAN DU COURS**

### **I) La Fluorescence**

***A) Fluorescence moléculaire – Fluorescence X (pour atomique)***

***B) Phénomène radiatif cyclique ; Diagramme de Jablonski***

***C) Notion de fluorescence et phosphorescence***

***D) Spectrofluorométrie ; appareillage***

***E) Caractéristique de l'émission de fluorescence***

***1) Déplacement de Stokes***

***1) Forme du spectre d'émission***

***1) Intensité du spectre d'émission***

***1) Fluorophores***

C'est 2 évènements :

- Absorption d'énergie (photons) ; le composé doit absorber l'énergie, possible pour des atomes et des molécules.
- Émission de fluorescence (photons) ; retour à l'état fondamentale.

## **A) Fluorescence moléculaire – Fluorescence X (pour atomique)**

Les rayons X sont utilisés pour la fluorescence atomique, car on a besoin d'énergie beaucoup plus importante pour exciter les atomes.

## **B) Phénomène radiatif cyclique ; Diagramme de Jablonski**

Définition ;

- radiatif ; émettre de la lumière.
- cyclique ; se reproduit très rapidement, nombreuses fois au cours d'une seconde.

L'absorption moléculaire et l'émission moléculaire sont liées aux électrons qui se trouvent sur les liaisons covalentes (C-C ; C-O ; C-N ; C-P), c'est l'état doublet car un électron d'un atome et un électron d'un autre atome qui se mettent ensemble de façon antiparallèle (tête en haut pour l'un, tête en bas pour l'autre) et forment la liaison covalente.

Quand l'état doublet est soumis à une radiation électromagnétique, on a absorption, et l'électron va vers un état supérieur (ex ;  $3S \rightarrow 3P$ ) et est capable aussi d'une double excitation vers une couche plus haut (ex ;  $3D$ ). Ce sont des états dit singuliers car les 2 électrons sont isolés (2 singuliers).

Schéma ;

On a 4 flèches bleues car chaque état électronique est composé d'état vibrationnelle, rotationnelle (On a des sous-états).

Cela explique ce spectre dit de bande qui symbolise plein de possibilités de transition électronique.

- La courbe rouge du spectre est centrée sur la longueur d'onde maximale. Et de part et d'autre de cette longueur d'onde maximale on a d'autres possibilités d'absorption.

La Fluorescence c'est quoi ?

Prenons pour exemple un état excité en  $S_2$ . Deuxième étape, la molécule va rendre l'énergie pour forcément aller en  $S_1$ , l'énergie est rendue sous forme de chaleur et de mouvement (rotation).

La fluorescence ne s'observera qu'entre  $S_1$  et  $S_0$  !! Qu'entre l'état excité 1er et l'état fondamental.

A droite du spectre d'excitation, quand on regarde les flèches bleues, l'énergie d'excitation est forcément supérieure (ou égale) à l'énergie d'émission (flèche verte).

La loi statistique montre qu'on a plus de chance d'envoyer l'électron célibataire dans des états excités autre que  $S_1$ . L'énergie d'excitation est supérieure à l'énergie d'émission.

Si l'énergie d'excitation est supérieure à l'énergie d'émission, comme cette énergie est inversement proportionnelle à la longueur d'onde ( $E = hc/\lambda$ ), le  $\lambda$  d'émission est forcément supérieur à la longueur d'onde d'excitation.

Le spectre de fluorescence ne s'observe qu'à droite du spectre d'absorption.

## C) Notion de fluorescence et phosphorescence

L'œil humain est incapable de voir la fluorescence ! C'est la phosphorescence que l'on voit.

- Il faut un appareillage pour voir la fluorescence.

Phosphorescence ; à partir de S1, passage de S1 à T1, passage d'un état singulier à un état triplet, il s'est passé un changement au niveau de l'électron le plus bas, il a retourné son spin, les électrons sont sous un état triplet.

Rappels ;

- Etat singulier ; quand l'un est à un état supérieur sans changer son spin
- Etat triplet ; changement de spin.

L'état doublé ne peut pas passer vers un état triplet, transition interdite par PAULI.

La fluorescence est cyclique et radiatif, le timing de l'excitation à réguler est beaucoup trop rapide,  $10^{-9}$  seconde [ non visualisable par l'œil humain.

La phosphorescence avec son étape supplémentaire est beaucoup plus longue 0,1-1s et est donc visible pour l'œil.

On parle de chimio luminescence lorsqu'on a excité une molécule et regardé le retour à l'état fondamental, il existe d'autres types de luminescence (ex ; pour la luciole c'est la bioluminescence) Excitation par réaction dite chimique ou par onde électromagnétique.

## D) Spectrofluorométrie ; appareillage

Source au moins perpendiculaire au détecteur car sinon le détecteur serait perturbé par la source.

Monochromateur ; filtre la lumière, la fluorescence va être une valeur supérieure à 250 nm.

Les filtres coupent la longueur d'onde (ex ; toutes en dessous de 250 nm)

Le monochromateur laisse passer une gamme de 10 nm de part et d'autre de 250 nm.

## E) Caractéristique de l'émission de fluorescence

### 1) Déplacement de Stokes :

La longueur d'onde stokes ; c'est la différence entre la longueur d'onde maximale d'absorption et celle d'émission. Distance ou déplacement en nm.

$$E_2 < E_1 \Rightarrow \lambda_{em} > \lambda_{abs}$$

$$D_{stockes} = \lambda_{em} - \lambda_{abs}$$

### 2) Forme du spectre d'émission

C'est une courbe en cloche, un spectre en bande, si c'est de la fluorescence que l'on observe et bien cette courbe sera indépendante de la longueur d'onde d'excitation.

Schéma ;

On a enregistré 3 spectres de fluorescence :

- le 1er (plus grand spectre)  $\lambda_1$ ,  $\lambda_2$  pour l'intermédiaire et  $\lambda_3$  pour le plus petit. Et quel que soit la longueur d'onde choisie, on n'a pas de variation sur la longueur d'onde maximale.

La forme du spectre (cloche) est toujours centrée sur la même longueur d'onde quel que soit la longueur d'onde d'excitation.

Car forcément la fluorescence se fait entre S1 et S0.

La forme du spectre est indépendante de la longueur d'onde.

Diffusion ; phénomène interférent dans la fluorescence, la formes des spectres se déforme.

### **3) Intensité du spectre d'émission**

C'est la hauteur du spectre qui varie en fonction de la longueur d'onde, on en tire parti pour les mesures de paramètres comme dans les solutions biologiques, doser le pH dans les solutions, la viscosité, les forces ioniques, la fluorescence varie en fonction de la force ionique.

La technique de fluorescence a depuis 10-15 ans remplacée l'utilisation de produits plus nocifs, produits radioactifs, remplacés par la fluorescence.

### **4) Fluorophores**

Composé capable de fluorescence :

- Au moins 2 doublets
- liaison  $\pi$  conjuguée
- les aromatiques
- plus ils sont rigide mieux c'est (limitation des rotations inter-liaison)

Ex ; Le fluoren

- empêcher la libre rotation.
- Additionner des structures ; ajouter des électrons.

Ces composés sont très utilisé pour :

- Mesurer le pH d'une solution,
- la quinine (composé naturel) est dosable par fluorescence, avec ses électrons  $\pi$  en résonance.

Exemple ; les composés naturellement fluorescent ;

- Les protéines formés d'AA (le tryptophane, la tyrosine, le NAD) ceux sont des fluorophores intrinsèques car ils font partis des biomolécules naturelles.

On peut ajouter des structures, pour augmenter la fluorescence, pour mieux détecter les traces.

Les fluorophore extrinsèques ; Fluorescéine

Les acides nucléiques ; bases puriques et pyrimidiques, toutes les bases de l'ADN, on a cette double hélices, ce qui provoque un fort rapprochement et donc néfaste a la fluorescence. Mais la fluorescence augmente quand les 2 brins sont dissociés.

Fluorophore extrinsèque ; ex ; le bromure d'éthidium (pénètre l'ADN, attention dangereux car il dissocie les brins).