

Fluorimétrie

Introduction

La fluorescence est définie comme l'émission de lumière par des molécules sans dégagement de chaleur.

A ce phénomène s'associe toute une terminologie caractérisant l'émission (fluorescence, phosphorescence) ou l'excitation (chimiluminescence, bioluminescence, radioluminescence, cathodo-luminescence, photoluminescence, thermoluminescence).

Les fluorochromes ou fluorophores sont des substances chimiques capables d'émettre de la lumière de fluorescence après excitation.

La fluorimétrie 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 de l'UV selon la nature du fluorophore.

1. Principe (aspect qualitatif)

Pour bien comprendre le phénomène de fluorescence, il est utile d'étudier le diagramme de Jablonski (figure 1). C'est un diagramme énergétique comparant les phénomènes de retour à l'équilibre par fluorescence et phosphorescence.

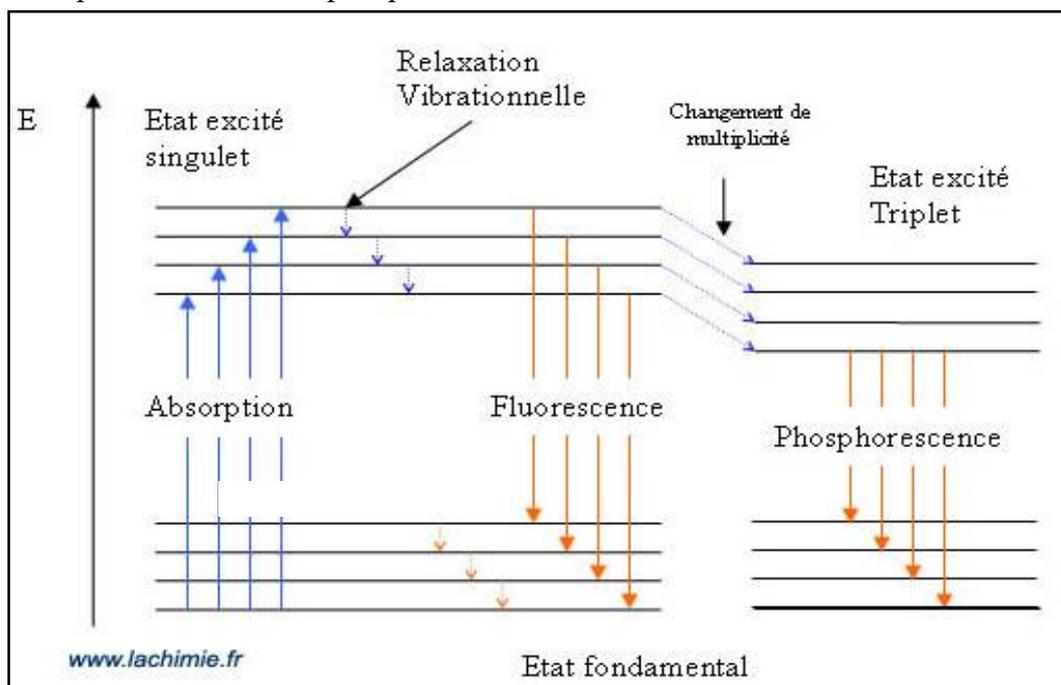


Figure 1. Le diagramme de Jablonski.

Lorsque la molécule se trouve dans un état excité suite à l'absorption d'un photon, elle retourne au plus bas niveau d'énergie de l'état excité par relaxation (transfert d'énergie avec le solvant suite notamment à des collisions). La durée de vie de ces relaxations vibrationnelles non radiatives est de l'ordre de 10^{-12} seconde.

La molécule revient ensuite dans l'état fondamental soit par conversion interne (retour direct à l'état fondamental) ou externe (choc avec d'autres molécules) soit par émission de lumière. Cette émission lorsqu'elle a lieu s'appelle la fluorescence.

En effet, L'énergie émise est en général inférieure à l'énergie d'excitation. Cela provient du fait que le centre retourne à l'état fondamental à partir du niveau de vibration le plus bas de l'état excité. Cette différence est appelée déplacement de Stokes.

Le spectre d'émission (intensité d'émission de fluorescence en fonction de la longueur d'onde du photon émis) dépend de la nature de la molécule fluorescente et des interactions mises en jeu entre cette molécule et son voisinage.

Remarque: La phosphorescence passe par une étape supplémentaire l'état triplet ou 'il y a retournement de spin. L'émission lumineuse dure donc beaucoup plus longtemps.

2. Aspect quantitatif

La fluorimétrie est une méthode de dosage utilisant la propriété de certaines molécules d'être fluorescente. On mesure la fluorescence qui est proportionnelle à la concentration.

2.1. Rendement quantitatif de fluorescence

On définit le rendement quantique de fluorescence comme étant le rapport de l'intensité de fluorescence émise sur l'intensité absorbée.

$$\Phi_f = I_f/I_a = I_f/(I_0 - I) = I_f \cdot I_0 \cdot (1 - I/I_0)$$

Soit : Φ_f : le rendement quantique de fluorescence (sans unité)

I_f : l'intensité de fluorescence

I_a : intensité absorbée

I_0 : l'intensité incidente

I : l'intensité transmise

Φ_f : est compris entre 0 (absence de fluorescence) et 1 (fluorescence maximale).

Φ_f dépend de la molécule, du solvant, du pH et de la T° . Il ne dépend pas de l'intensité de la source lumineuse et de la longueur d'onde d'excitation (seuls les photons absorbés sont pris en compte).

2.2. Intensité de fluorescence

L'intensité de fluorescence, à longueur d'onde λ , est proportionnelle à l'intensité lumineuse absorbée et au rendement quantique de fluorescence.

$$I_f = \Phi_f \cdot I_a = \Phi_f \cdot (I - I_0)$$

L'intensité absorbée, I_a , est donnée, par la loi de Beer Lambert, l'intensité de fluorescence devient alors :

$$I_f = \Phi_f \cdot I_0 \cdot (2.3. \epsilon \cdot l \cdot c)$$

Or l'appareil ne capte qu'une partie de la fluorescence, on a donc :

$$I'_f = k(\Phi_f \cdot I_0 \cdot (2.3. \epsilon \cdot l \cdot c)) = K \cdot c$$

k = constant de l'appareillage

L'intensité est exprimée en Einstein par seconde (1einstein = 6.1023 photons). Elle dépend de la T° , I_0 de la source, de la concentration en solution fluorescente, de l'appareillage, la λ d'excitation et la nature du solvant et du pH.

2.3. Expression des spectres

Le spectre d'excitation d'une substance est obtenu en mesurant la fluorescence émise à une longueur d'onde fixe et en laissant varier la longueur d'onde d'excitation.

Le spectre d'émission d'une substance est obtenu en mesurant la fluorescence émise aux différentes longueurs d'onde d'émission en excitant avec une longueur d'onde fixe.

4. Molécules concernées

Pour que la fluorescence se manifeste, plusieurs caractéristiques sont nécessaires :

- Absorption dans l'UV et le visible.
- Forte probabilité maximale d'absorption (ϵ_{\max}).
- Faible énergie de transition électronique.
- Absence d'atomes ou de groupements favorisant les phénomènes non radiatifs dans la molécule.

5. Appareillage

5.1. Une source lumineuse

- Lampes à arc au xénon : émission continue entre 220 et 700 nm. Leur énergie varie en fonction de la longueur d'onde. Ce sont les plus performantes.
- Les lampes à vapeur de mercure : n'émettent qu'un spectre discontinu (raies entre 254 et 366 nm).
- Les sources lasers : apparition récente, encore peu utilisées.

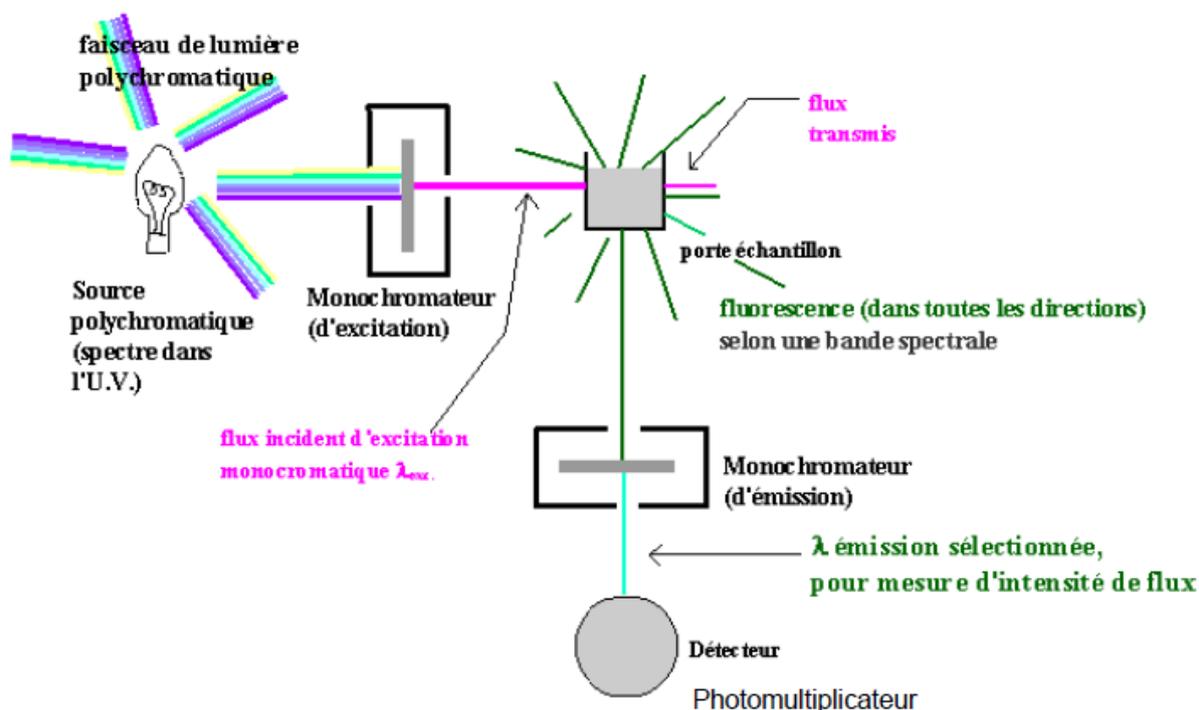
5.2. Un monochromateur d'excitation (prisme ou réseau)

5.3. Une cuve en quartz

5.4. Un monochromateur d'émission : permet la sélection d'une bande étroite de longueur d'onde d'émission (car après excitation l'échantillon émet dans toutes les directions)

5.5. Un photomultiplicateur : transforme la lumière émise en courant électrique.

5.6. Un système de lecture du signal



6. Applications

6.1. Applications qualitatives

- Méthode sensible (identification de traces) et spécifique.
- Détermination du spectre d'absorption d'une substance dans les conditions où la spectrométrie UV-VIS est inadaptée.
- Permet de tracer le spectre d'excitation d'une molécule à très faible concentration ou en présence de substances absorbantes interférentes.

6.2. Application quantitatives

- Analyse des médicaments ou de substances naturelles à concentration souvent faible dans les milieux biologiques.
- Analyse après excitation à une longueur d'onde déterminée.
- Analyse directe de substances naturellement fluorescentes (ex: quinine et quinidine).
- Les molécules peu fluorescentes sont amplifiées par hétérocyclisation.
- Les molécules non fluorescentes peuvent être rendues fluorescentes par dérivation de fluorescence. Parmi ces composés de dérivation, la fluoescamine et la bromométhoxy-coumarine.
- La fluorimétrie est également utilisable dans le cadre des méthodes immunologiques en phase homogène ou hétérogène, le traceur étant constitué par la molécule à doser marquée par un fluochrome.