

Chapitre II

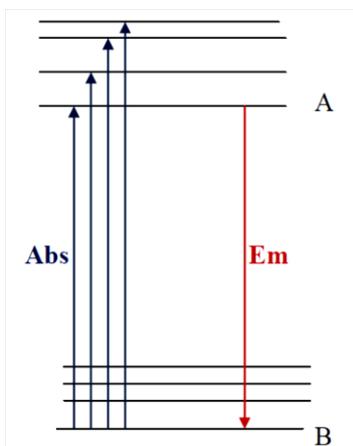
PHÉNOMÈNES RADIATIFS: PROPRIÉTÉS D'EMISSION

Compte tenu des règles de sélection une émission peut être observée si un gap d'énergie important existe entre l'état fondamental et un des états excités du centre considéré.

Après excitation du centre dans un niveau situé au dessus du gap le centre retourne à l'état fondamental par émission d'un photon.

II-1- PROBILITE DE DESEXCITATION RADIATIVE

Soit un centre susceptible d'absorber une certaine énergie pour passer de l'état B à l'état A.



Si par excitation on maintient N_A atomes dans le niveau A. Le nombre de photons émis par seconde et par unité de volume s'écrit:

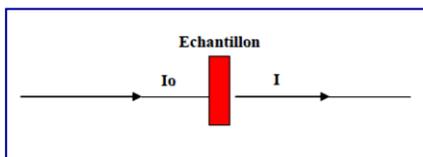
$$n_{\text{photons émis/cm}^3\text{s}} = N_A P_{AB}$$

La probabilité d'émission spontanée ou coefficient d'Einstein d'émission spontanée P_{AB} est donnée par la relation:

$$P_{AB} = \frac{8 \Pi^2 e^2}{mC^3} \nu_{AB}^2 f_{AB}$$

f_{AB} : la force d'oscillateur de la transition $A \rightarrow B$.

Mesurable expérimentalement à partir du spectre d'absorption:



$$f_{AB} = \frac{mC^2}{\Pi e^2} \beta \frac{1}{N} \int k(\nu) d\nu$$

$$\beta = \frac{(n^2 + 2)^2}{9n} \text{ pour les transitions DE}$$

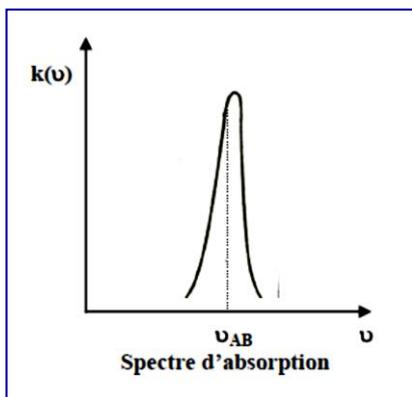
$$\beta = n \text{ pour les transitions DM}$$

n : indice de réfraction du milieu

$$k(\nu) = \log \frac{I_0}{I}$$

ν : fréquence d'excitation

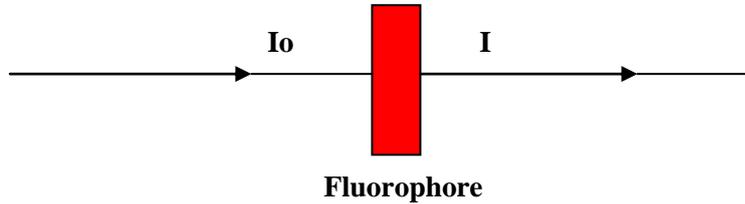
N : nombre d'ions par cm^3 sur le parcours du faisceau lumineux



II-2- CARACTERISTIQUES D'UN FLUOROPHORE

II-2-1- Spectre d'absorption

Dans le cas d'un verre, d'un cristal ou d'une solution liquide les mesures se font en transmission:



$$I(\lambda) = I_0(\lambda) \exp(-\alpha(\lambda) l)$$

l = épaisseur traversée par le faisceau

$\alpha(\lambda)$ = coefficient d'absorption (en cm^{-1})

Dans le cas des poudres les mesures se font en réflexion diffuse.

L'appareillage de mesure est un spectrophotomètre à double faisceau qui donne la transmittance T ou la densité optique D en fonction de la longueur d'onde d'excitation:

- Transmittance : $T = I/I_0$

- Opacité: $Op = 1/T = I_0/I$

- Densité optique: $D = \log Op = \log I_0/I = \epsilon C l$

C : concentration molaire du fluorophore (en mole/l).

l : Trajet optique (en cm)

ϵ : coefficient d'extinction molaire. Il représente le degré d'atténuation de la lumière incidente I_0 par mole/l. Il correspond à la capacité d'absorption par le fluorophore de l'énergie apportée par le photon d'excitation à une longueur d'onde donnée.

Le spectre d'absorption représente la densité optique ou absorbance en fonction de la longueur d'onde d'excitation.

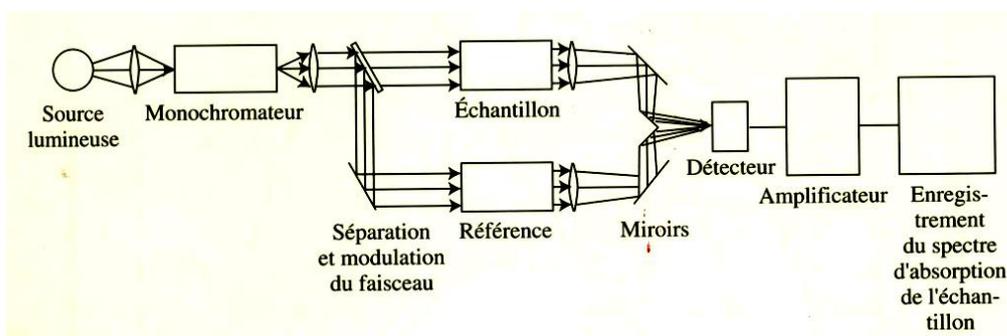


Fig.II-1 Schéma d'un spectrophotomètre

II-2-2- Spectre d'excitation

Le spectre d'excitation d'un fluorophore représente la variation de l'intensité d'émission en fonction de la longueur d'onde d'excitation pour une longueur d'onde d'émission donnée. Il permet d'évaluer le rendement de la conversion énergie incidente \rightarrow énergie émise (rendement de luminescence externe).

Pr. N. EL JOUHARI,

Master Chimie fondamentale et appliquée - Option: Chimie Physique Analytique et Matériaux (CPAM),

Cours: « Spectrofluorimétrie », Chapitre II

UNIVERSITÉ MOHAMMED V, FACULTE DES SCIENCES, DEPARTEMENT DE CHIMIE, RABAT-MAROC

II-2-3- Spectre d'émission

Le spectre d'émission d'un centre émetteur donne la variation de l'intensité de l'émission en fonction de la longueur d'onde d'émission pour une longueur d'onde d'excitation donnée. Le spectre d'émission est en général décalé vers les basses énergies par rapport au spectre d'excitation: c'est le décalage de Stokes.

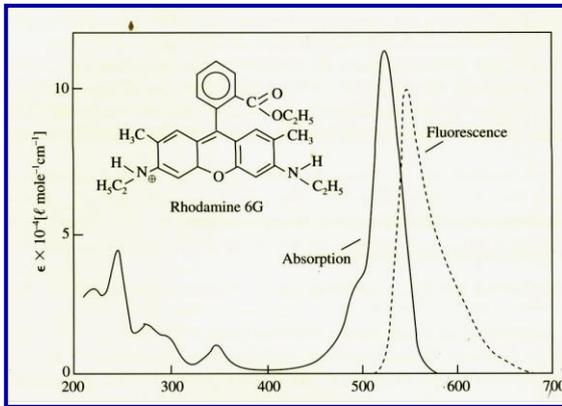


Fig. II-2 Spectres d'absorption et de fluorescence de la rhodamine 6G

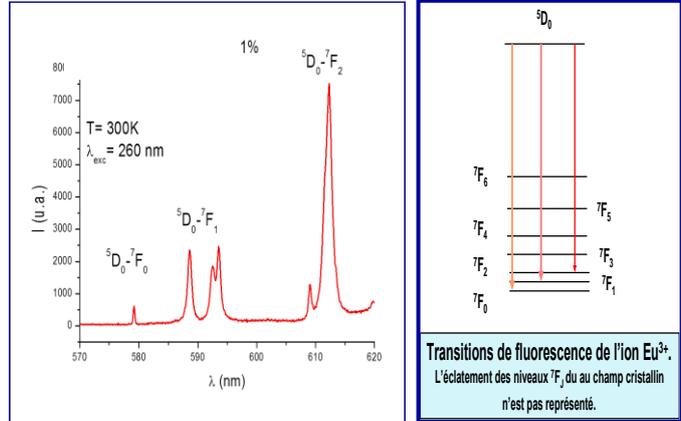


Fig. II-3 Spectre d'émission de $\text{Li}_6\text{Y}(\text{BO}_3)_3: \text{Eu}^{3+}$

Les spectres d'excitation et d'émission représentent la signature de la structure énergétique du fluorophore.

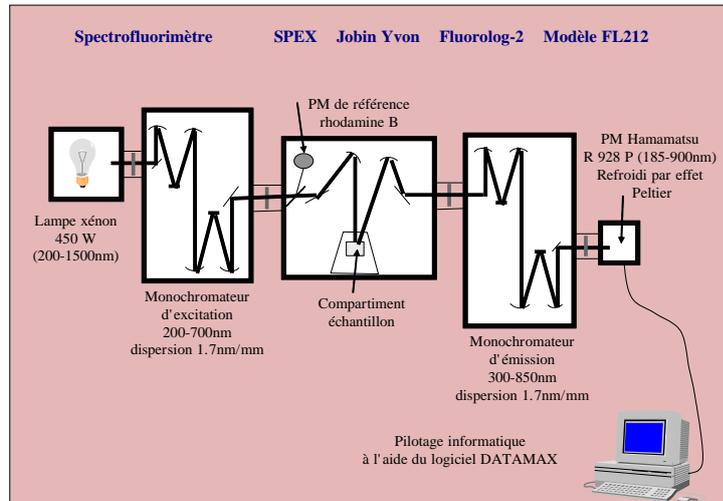


Fig. II-4 Schéma d'un spectrofluorimètre industriel

L'appareillage de mesure est un spectrofluorimètre avec deux monochromateurs: un en émission et en excitation. Le rôle des monochromateurs est d'isoler une radiation monochromatique (de longueur d'onde donnée) de la lumière incidente ou de la lumière émise par le fluorophore.

Pr. N. EL JOUHARI,

Master Chimie fondamentale et appliquée - Option: Chimie Physique Analytique et Matériaux (CPAM),
Cours: « Spectrofluorimétrie », Chapitre II

UNIVERSITE MOHAMMED V, FACULTE DES SCIENCES, DEPARTEMENT DE CHIMIE, RABAT-MAROC

II-2-4- Cinétique de luminescence

Les courbes de déclin mesurent la variation de l'intensité d'émission en fonction du temps à la suite d'une excitation brève.

En l'absence de phénomènes non radiatifs les déclin varient exponentiellement en fonction du temps: $\Phi(t) = \Phi_0 \exp(-t/\tau)$.

τ : durée de vie de l'état excité du centre émetteur.

En présence des processus non radiatifs, les déclin des centres excités ne sont plus exponentiels, ils deviennent plus rapides. Leur variation dépend de la nature et de l'importance des phénomènes non radiatifs présents.

Les phénomènes non radiatifs sont des phénomènes qui entraînent la perte de l'énergie d'excitation sans émission.

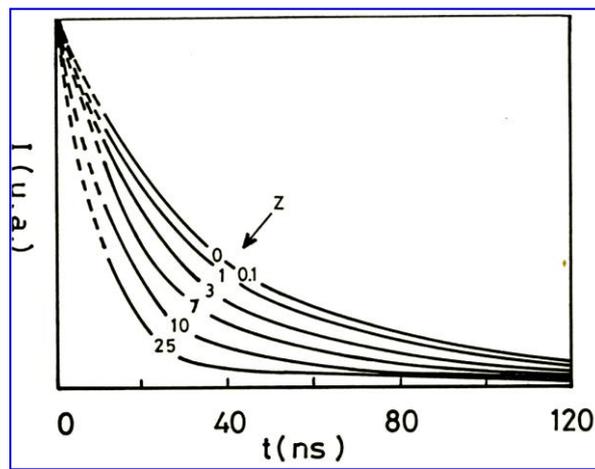
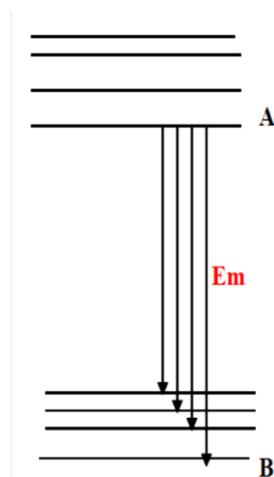


Fig.II-5 Evolution des courbes de déclin de l'émission de l'ion Ce^{3+} dans les verres $LaMgB_5O_{10}: 0.1Ce, ZMn$

* Constante de déclin

La constante de déclin ou durée de vie de l'état excité représente le temps de séjour moyen du fluorophore dans son état excité.

La durée de vie radiative τ_{rad} de l'état excité A dépend des probabilités de transition P_{Ai} vers tous les niveaux i d'énergies inférieures du centre émetteur.



$$1/\tau_{rad} = \sum_i P_{Ai}$$

La durée de vie de l'état excité est mesurable à partir de la courbe de déclin de l'émission $\Phi(t)$ après cessation de l'excitation.

On définit τ_e et τ_m :

τ_e est la racine de l'équation: $\Phi(t) = \Phi_0/e$

$$\tau_m = \frac{\int t\Phi(t) dt}{\int \Phi(t) dt}$$

Dans le cas des transitions permises l'émission étant forte les durées de vie sont très courtes (\approx dizaines de nanosecondes). C'est le cas par exemple pour les transitions $4f^{n-1}5d \rightarrow 4f^n$ de Ce^{3+} et Eu^{2+} : $10^{-9} \leq \tau \leq 10^{-7}$ s. Ce type de centres est très important pour la réalisation d'écrans cathodiques destinés à l'observation de phénomènes rapides (sans persistance de l'image).

Dans le cas des transitions interdites, l'émission est relativement faible et les durées de vie longues de l'ordre de la milliseconde (10^{-4} – 10^{-2} s). C'est le cas par exemple des transitions $4f \rightarrow 4f$ et $3d \rightarrow 3d$. Ce type de centres est important pour la réalisation d'écrans radars qui nécessite des luminophores à forte persistance (rémanence).

Lorsque des modes de désexcitation autres que l'émission interviennent on définit la probabilité de désexcitation totale P_{tot} par la relation:

$$P_{tot} = P_r + P_{nr}$$

$$1/\tau_{obs} = 1/\tau_{rad} + 1/\tau_{nr}$$

$P_r = 1/\tau_{rad}$: probabilité de désexcitation radiative

$P_{nr} = 1/\tau_{nr}$: probabilité de désexcitation non radiative

τ_{obs} : durée de vie observée

τ_{rad} : durée de vie des phénomènes radiatives

τ_{nr} : durée de vie des phénomènes non radiatives

Les phénomènes cristallins affectent la durée de vie: le rapport τ_{cal}/τ_{obs} évalue les pertes non radiatives cad la désexcitation du niveau par des processus internes au cristal tels que par exemple la session de phonons aux modes vibrationnels du réseau ou aux groupements chimiques ayant des fréquences de vibrations élevées.

II-2-5-Rendement de luminescence

Le rendement d'émission caractérise la capacité du fluorophore à restituer l'énergie absorbée sous forme de lumière. Il représente le rapport de la probabilité des phénomènes radiatifs (P_r) à la somme des probabilités des phénomènes radiatifs (P_r) et des phénomènes non radiatifs (P_{nr}):

$$\text{Rendement d'émission} = \frac{P_r}{P_r + P_{nr}}$$

On définit le rendement énergétique interne (η_{int}) et le rendement quantique interne (η_{int}) par les rapports:

$$\eta_{int} = \text{énergie émise/énergie absorbée}$$

$$\eta_{int} = \text{nbre de photons émis / nbre de photons absorbés}$$

On définit aussi le rendement énergétique externe (η_{ext}) et le rendement quantique (η_{ext}) par les rapports:

$$\eta_{ext} = \text{énergie émise/énergie incidente}$$

$$\eta_{ext} = \text{nbre de photons émis / nbre de photons incidents}$$

La qualité d'un luminophore est d'autant meilleure que le rendement d'émission est grand.

Pr. N. EL JOUHARI,

Master Chimie fondamentale et appliquée - Option: Chimie Physique Analytique et Matériaux (CPAM),

Cours: « Spectrofluorimétrie », Chapitre II

UNIVERSITE MOHAMMED V, FACULTE DES SCIENCES, DEPARTEMENT DE CHIMIE, RABAT-MAROC

II-2-6-Coordonnées trichromatiques

Les coordonnées trichromatiques x , y et z d'un centre émetteur représentent la couleur de l'émission. Elles sont calculées à partir du spectre d'émission du fluorophore et des courbes de réponse de l'œil humain pour les trois types de stimulation rouge, vert et bleu auxquels il est sensible.

L'œil humain est muni de trois types distincts de récepteurs dotés de maxima de sensibilité situés dans le rouge, le vert et le bleu:

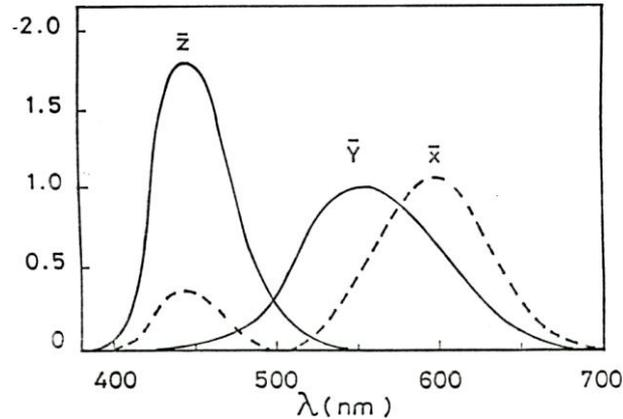


Fig. II-6 Courbes de réponse de l'œil humain aux trois types de stimulation (rouge, vert et bleu) auxquels il est sensible.

Pour toute lumière colorée caractérisée par sa répartition spectrale $E(\lambda)$ (spectre d'émission), on définit trois composantes trichromatiques (X , Y , Z):

$$X = \int E(\lambda) \bar{X} d\lambda \quad Y = \int E(\lambda) \bar{Y} d\lambda \quad Z = \int E(\lambda) \bar{Z} d\lambda$$

Les intégrales sont étendues à tout le spectre visible. Les coordonnées trichromatiques x , y et z sont données par:

$$x = \frac{X}{X+Y+Z} \quad y = \frac{Y}{X+Y+Z} \quad z = \frac{Z}{X+Y+Z} \quad x+y+z=1$$

La détermination des coordonnées trichromatiques est importantes pour certaines applications comme l'éclairage fluorescent. Ces coordonnées permettent de placer les luminophores dans le diagramme de chromaticité établi par la Commission Internationale de l'Eclairage (CIE). L'éclairage fluorescent utilise des luminophores situés dans le domaine du blanc le plus proche possible du blanc idéal ($x=y=z=1/3$).

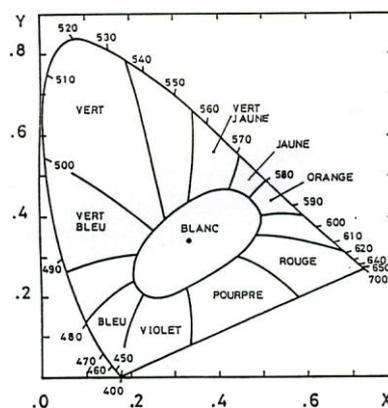


Fig. II-7 Diagramme de chromaticité

Pr. N. EL JOUHARI,

Master Chimie fondamentale et appliquée - Option: Chimie Physique Analytique et Matériaux (CPAM),
Cours: « Spectrofluorimétrie », Chapitre II

UNIVERSITÉ MOHAMMED V, FACULTE DES SCIENCES, DEPARTEMENT DE CHIMIE, RABAT-MAROC

II-3- MODELE UTILISE POUR INTERPRETER LES PROPRIETES D'ABSORPTION ET DE FLUORESCENCE

II-3-1-Rappels

Les niveaux d'énergie représentent les états caractéristiques d'une molécule. Les propriétés de ces états sont en relation avec l'identité des molécules, la structure moléculaire et les processus énergétiques et chimiques que les molécules peuvent subir.

L'énergie totale d'une molécule est la somme de plusieurs énergies:

$$E(\text{total}) = E(\text{translation}) + E(\text{rotation}) + E(\text{vibration}) + E(\text{électronique}) +$$

$$E(\text{orientation électronique de spin}) + E(\text{orientation nucléaire de spin})$$

L'énergie électronique est l'énergie de mouvement des électrons au sein de la liaison moléculaire.

L'absorption d'un photon induit le passage d'un électron d'une orbitale moléculaire (n, σ ou π) à une autre (σ^* ou π^*) d'énergie supérieure. Lors de cette transition électronique, il y a déplacement de charges après passage des électrons de l'orbitale de l'état fondamental à l'orbitale de l'état excité. L'ampleur de ce mouvement est reflétée par le dipôle électrique de transition. Un dipôle de transition absorbe une radiation en oscillant par résonance avec la radiation appliquée dans la même direction.

Si l'angle entre la direction de l'onde appliquée et le moment de transition est θ , le moment de transition est proportionnel à $\cos\theta$ et la probabilité de transition est proportionnelle à $\cos^2\theta$. Donc en général, la probabilité d'absorption d'une lumière par une solution est: égale à 100% pour $\theta = 0$ et 0% pour $\theta = 90^\circ$.

II-3-2- Courbe de Morse

Soit une molécule diatomique. Si on assimile le système à un oscillateur harmonique l'énergie potentielle de la molécule serait une fonction de second ordre de la distance internucléaire:

$$E = 1/2 k (r - r_0)^2$$

k: constante de force

r-ro: variation internucléaire entre une position quelconque et la position d'équilibre.

La courbe d'énergie potentielle serait alors une parabole. Or les molécules réelles n'obéissent pas aux lois des oscillateurs harmoniques et la courbe d'énergie potentielle est plus complexe que celle d'un oscillateur harmonique simple.

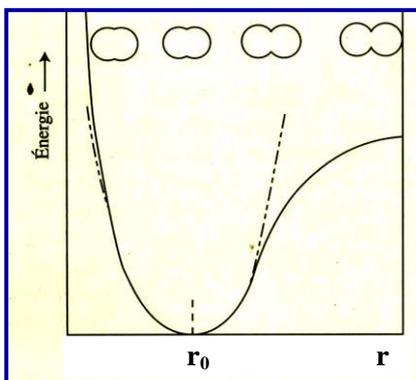


Fig. II-8 Courbe d'énergie potentielle d'une molécule diatomique.

r_0 =longueur de la liaison chimique.

La parabole représente l'énergie potentielle d'une molécule idéale qui subit des oscillations harmoniques autour de r_0 .

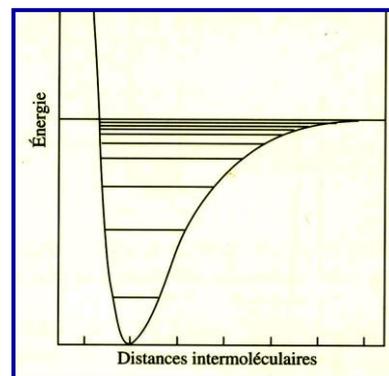


Fig. II-9 Courbe d'énergie potentielle d'une molécule: Oscillations anharmoniques.

Les lignes horizontales représentent les énergies de vibration.

Pr. N. EL JOUHARI,

Master Chimie fondamentale et appliquée - Option: Chimie Physique Analytique et Matériaux (CPAM),

Cours: « Spectrofluorimétrie », Chapitre II

UNIVERSITE MOHAMMED V, FACULTE DES SCIENCES, DEPARTEMENT DE CHIMIE, RABAT-MAROC

Les distributions électroniques d'une molécule à l'état fondamental et à l'état excité sont différentes, il est donc nécessaire de représenter l'état excité par une courbe de Morse différente de celle représentant l'état fondamental.

Dans le gaz les molécules sont supposées isolées les unes des autres. Les interactions sont faibles, presque inexistantes. Le décalage de Franck – Condon nul: la transition se fait sans déplacement du noyau.

En solution, l'interaction entre les molécules déplace la position du minimum par rapport à l'état fondamental. La distance entre les atomes est plus grande dans l'état excité.

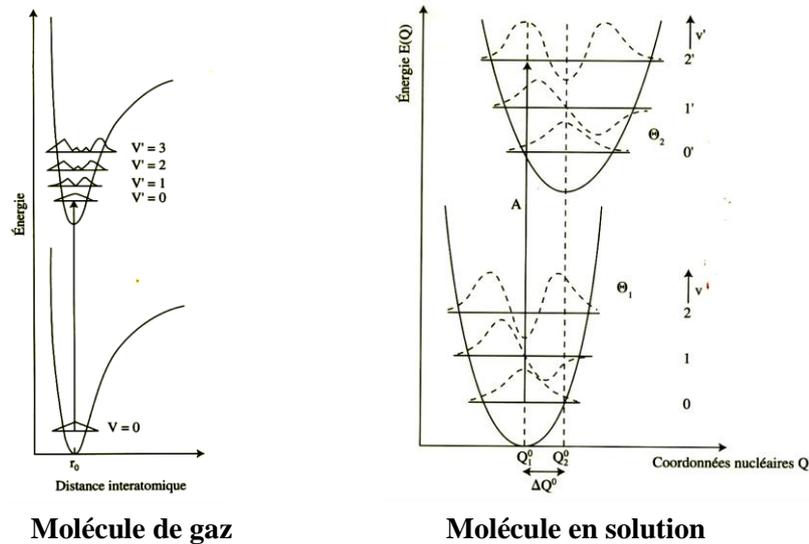


Fig. II-10 Courbes de Morse

Les ondes représentent la probabilité de présence du noyau en une position bien déterminée. Le maximum de l'onde représente la position où le noyau a le plus de chance de se trouver.

Le maximum de l'onde se trouve à r_0 pour le niveau vibrationnel le plus bas ($v=0$). Lorsque l'énergie vibrationnelle du noyau croît ($v=1, 2, 3 \dots$) la probabilité de trouver le noyau autour de plusieurs positions augmente, d'où la représentation de 2 ondes ($v=1$) ou de plusieurs ondes.

Pour les états vibrationnels élevés, la probabilité de trouver le noyau aux extrémités de l'énergie potentielle est plus importante que la probabilité de le trouver à r_0 .

D'après le principe de Franck – Condon, la transition se fait sans déplacement du noyau, d'où sa représentation par une ligne verticale.

Le spectre d'absorption est le reflet des transitions électroniques mises en jeu.

L'aspect d'une bande d'absorption dépend de la position relative du minimum d'énergie potentielle et de la distribution de la probabilité de la séparation nucléaire dans les différents états vibrationnels.

L'intensité d'une bande d'absorption dépend en partie de la population de l'état excité: probabilité d'une transition vibrationnelle liée à une transition électronique.

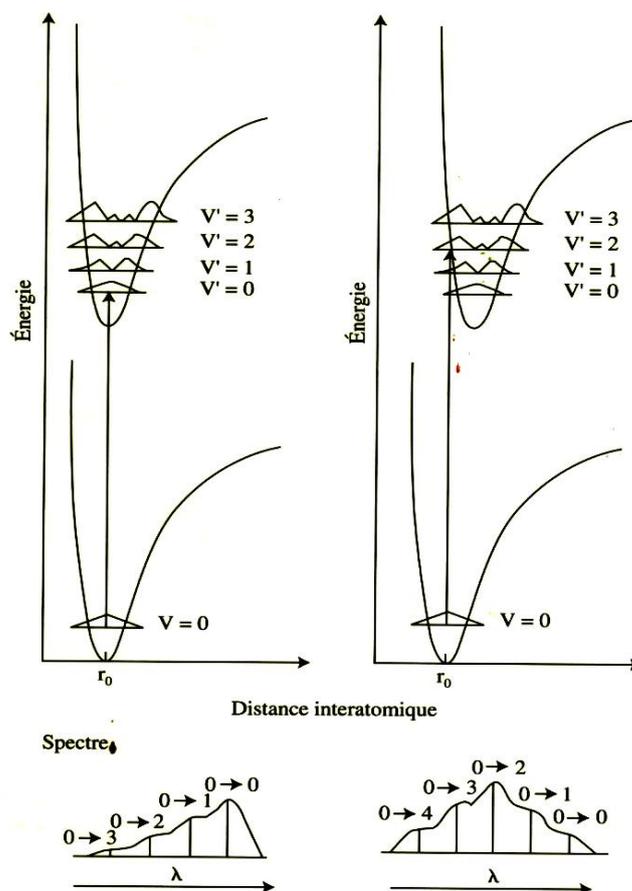
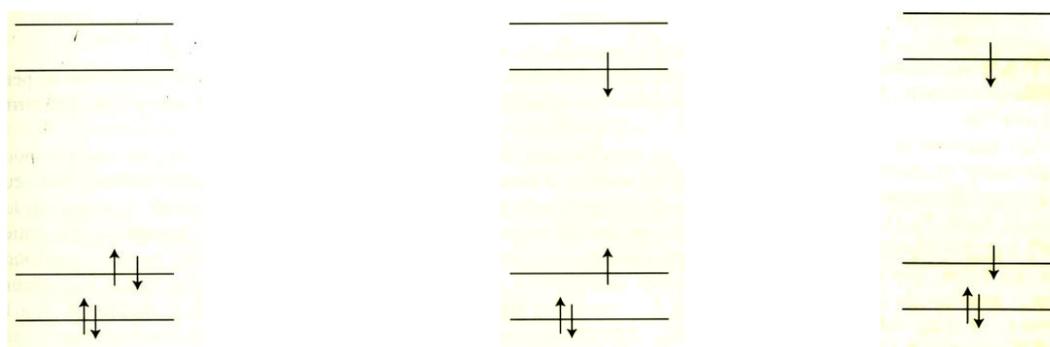


Fig. II-10 : Relation entre courbes d'énergie potentielle et spectre d'absorption d'une molécule diatomique.

II-3-3-Diagramme de Jablonski: diagramme des transitions électroniques

Une molécule caractérisée par son diagramme énergétique possède un état fondamental S_0 et des états excités S_n ($n \geq 1$). Chaque état possède plusieurs niveaux vibrationnels V_n ($n=0, 1, 2, \dots$)



Etat fondamental S_0
Singlet:
 Spin total = 0
 Multiplicité = $2S+1=1$

Etat excité S_n
Singlet:
 Spin total = 0
 multiplicité = 1

Etat excité T_1
Triplet:
 Spin total = 1
 multiplicité = 3

Fig. II-11 Etats singlets et triplet d'une molécule

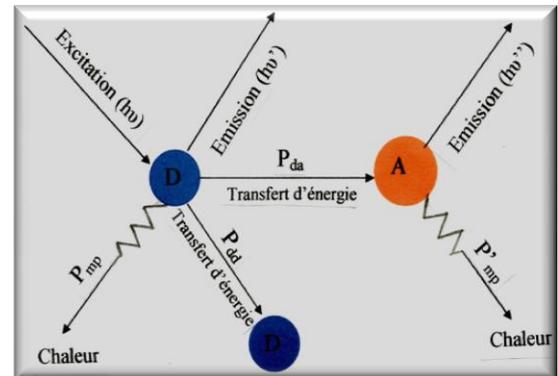
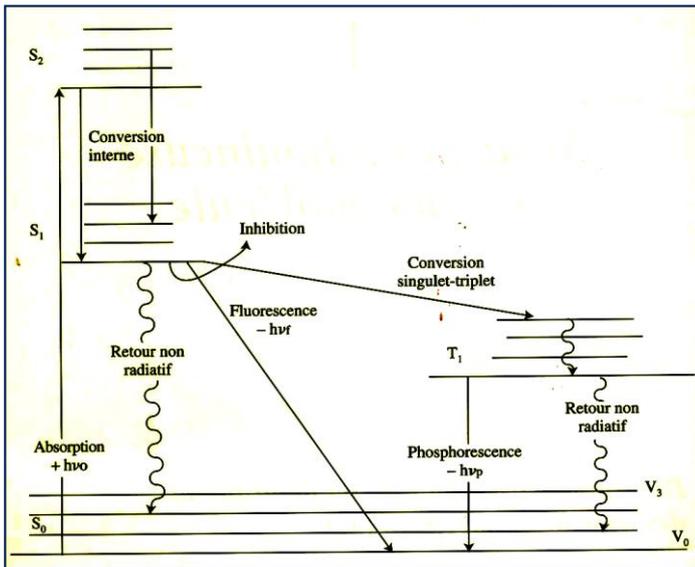


Fig. II-12 Diagramme de Jablonski

L'absorption de photons par une molécule provoque une transition électronique du niveau fondamental singulet S₀ à un état excité singulet S_n (n≥1).

Le retour à l'état S₀ se fait en deux étapes:

- retour à l'état S₁ ;
- retour de S₁ à S₀.

Différents processus compétitifs peuvent intervenir pour désexciter l'état S₁:

- * émission de photons avec une constante de vitesse k_r, c'est la fluorescence.
- * l'énergie absorbée est dissipée dans le milieu sous forme d'énergie non radiative, avec une constante k_i.
- * cession de l'énergie absorbée à d'autres molécules situées à proximité, avec une vitesse k_q (inhibition par collision), ou avec une constante k_t (transfert d'énergie à distance).
- * passage transitoire à un niveau excité triplet T₁ situé entre S₁ et S₀ (k_{isc}) puis retour à partir de T₁ à S₀ par:
 - émission de photons avec une constante k_p, c'est la phosphorescence.
 - Dissipation non radiative de l'énergie restante avec une constante k'_i.
 - transfert d'énergie à distance (k'_t) ou par collision (k_q).

Les passages S→T ou T→S sont dits « intersystem crossing ».

Les processus S→S ou T→T sont appelés conversion interne, « internal conversion ».

Les transitions décrites dans ce diagramme ont lieu au sein de molécules chimiques. Ce sont les électrons des molécules qui vont absorber et émettre l'énergie: ce sont donc des transitions électroniques.

II-4- FACTEURS AGISSANT SUR LES PARAMETRES DE LA FLUORESCENCE

- Effet de la photo décomposition: photo blanchiment (photobleaching),
- Effet de la température, la concentration et des impuretés,
- Effet de l'environnement,
- Effet des phénomènes non radiatifs,
- Facteurs liés à l'instrumentation.

Pr. N. EL JOUHARI,

Master Chimie fondamentale et appliquée - Option: Chimie Physique Analytique et Matériaux (CPAM),

Cours: « Spectrofluorimétrie », Chapitre II

UNIVERSITE MOHAMMED V, FACULTE DES SCIENCES, DEPARTEMENT DE CHIMIE, RABAT-MAROC

II-4-1- La photodécomposition: photo blanchiment (photobleaching)

La photodécomposition est le phénomène de décomposition des fluorophores suite à une exposition lumineuse. Cette photodécomposition peut provoquer une diminution ou une augmentation de l'intensité de l'émission. Si les produits obtenus ne fluorescent pas l'intensité de fluorescence décroît au cours du temps. Si les produits obtenus fluorescent plus que le produit de départ, l'intensité d'émission augmente.

Lorsque la molécule fluorescente est à l'état excité, il existe une certaine probabilité pour qu'elle participe à des réactions chimiques (réactions photochimiques), en particulier avec l'oxygène sous forme de radicaux libres. Le fluorochrome perd alors ses propriétés de fluorescence. Autrement dit, quand on excite une solution de molécules fluorescentes, une certaine proportion d'entre elles est détruite à chaque instant.

Le phénomène de photo blanchiment peut être gênant pour plusieurs méthodes de mesures de spectroscopie utilisant la fluorescence notamment en microscopie de fluorescence. Il est néanmoins mis à profit pour mesurer la mobilité moléculaire (vitesses de diffusion ou de transport d'une molécule) par la méthode de redistribution de fluorescence après photo blanchiment (FRAP) ou par la méthode de perte de fluorescence au cours d'un photo blanchiment local (FLIP).

II-4-2- Effet de la température, concentration et impuretés

La température, la concentration et la présence d'impuretés peuvent influencer le rendement d'émission.

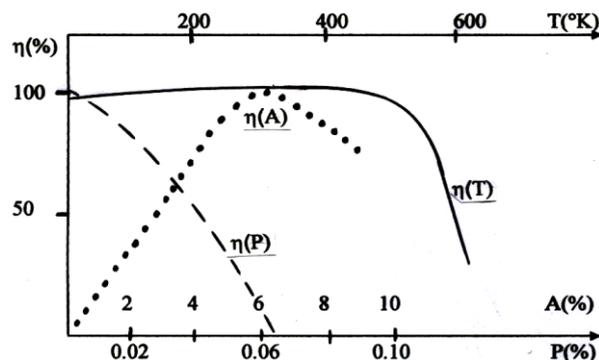


Fig. II-13- Evolution du rendement de conversion avec la concentration en activateur (A), la température (T) et le taux d'impureté (P)

* La concentration

La concentration en activateur joue un rôle important: une forte concentration peut conduire à l'extinction de l'émission. Lorsque la concentration augmente la distance entre les centres fluorescents diminue et les interactions augmentent favorisant les phénomènes non radiatifs pouvant conduire à la perte de l'énergie d'excitation: l'intensité d'émission croît jusqu'à un maximum puis diminue jusqu'à l'extinction totale de l'émission.

* La température

Une augmentation de la température intensifie le mouvement brownien des molécules. Le nombre de collisions entre les molécules du fluorophore et le solvant augmente, la dissipation d'énergie sous forme de chaleur suite aux mouvements des molécules et suite aux chocs moléculaires devient très importante.

Pr. N. EL JOUHARI,

Master Chimie fondamentale et appliquée - Option: Chimie Physique Analytique et Matériaux (CPAM),
Cours: « Spectrofluorimétrie », Chapitre II

UNIVERSITE MOHAMMED V, FACULTE DES SCIENCES, DEPARTEMENT DE CHIMIE, RABAT-MAROC

De même, l'augmentation de la température favorise le passage des molécules aux niveaux vibrationnels supérieurs de l'état S_1 , la probabilité de la conversion singulet-triplet augmente. Les constantes cinétiques k_i et k_{isc} augmentent, ce qui entraîne une diminution du rendement quantique de fluorescence.

Ainsi lorsque la température du milieu augmente, les trois paramètres de la fluorescence (intensité, rendement quantique et durée de vie) diminuent. A la limite la température peut aussi induire l'extinction de l'émission: c'est l'étouffement thermique de l'émission.

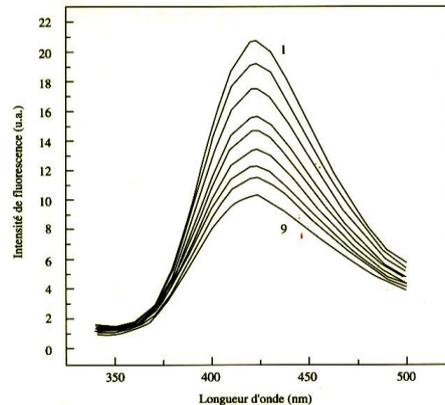


Fig. II-14- Spectre de fluorescence de TNS en fonction de T. $\lambda_{exc} = 320\text{nm}$.
(spectres 1 à 9: T= 6.5, 9.5, 12, 15, 17.8, 20.4, 23, 26, 30°C)

* Le degré de pureté du matériau

Les impuretés autres que les molécules fluorescentes constituent des poisons pour l'émission et peuvent conduire à son extinction en absorbant l'énergie d'excitation.

II-4-3- Effet de l'environnement

* Interactions moléculaires ou ioniques (Réactions chimiques)

L'état électronique du chromophore peut être perturbé par les autres molécules de même espèce qui l'entourent. Cette perturbation peut aussi provenir des molécules du solvant ou d'autres composés dissous dans la même solution. Ces actions sont très variables. Elles vont de la simple orientation et de l'association entre molécules à la réaction chimique proprement dite. Les effets peuvent aller du simple déplacement des bandes d'absorption et d'émission à la modification des répartitions spectrales avec variations des intensités d'absorption et d'émission.

La polymérisation de certains composés organiques peut s'accompagner de l'apparition de nouvelles bandes d'émission.

* Effet de l'environnement sur le spectre d'émission

L'émission d'un fluorophore est très sensible à l'environnement dans lequel il se trouve: en effet les chromophores et les molécules du solvant polaire s'associent par leurs dipôles. A l'état fondamental et en absence de perturbations externes, leurs dipôles associés sont dans des configurations énergétiques les plus faibles.

Lorsque le chromophore est excité, la distribution de ses électrons est perturbée induisant une réorientation du dipôle associé. L'ensemble chromophore excité-molécules des solvants associés va se réorganiser dans une autre configuration. Ce mécanisme nécessite de l'énergie. Cette énergie est généralement cédée par le chromophore, d'où une énergie plus faible associée au niveau S_1v_0 .

Pr. N. EL JOUHARI,

Master Chimie fondamentale et appliquée - Option: Chimie Physique Analytique et Matériaux (CPAM),
Cours: « Spectrofluorimétrie », Chapitre II

UNIVERSITE MOHAMMED V, FACULTE DES SCIENCES, DEPARTEMENT DE CHIMIE, RABAT-MAROC

L'énergie cédée par le chromophore est d'autant plus grande que le solvant est polaire. Par conséquent, dans un milieu polaire l'émission se produit à une énergie plus faible et le spectre d'émission se déplace vers le rouge.

La réorientation des molécules du solvant s'appelle relaxation (solvent relaxation).

Si les molécules du solvant n'ont pas le temps de s'orienter (milieu rigide ou visqueux) l'émission se produit avant la relaxation à partir d'un niveau énergétique plus élevé: le pic d'émission se trouve alors dans les courtes longueurs d'onde (pas ou peu de déplacement vers le rouge).

Si le milieu ou solvant est apolaire l'émission se produit également vers les grandes énergies sans déplacement du pic d'émission.

Que le solvant soit polaire ou non, le retour à l'état fondamental suite à l'émission induit un système fluorophore/solvant (S_0^*) énergétiquement plus élevé que le système avant excitation (S_0).

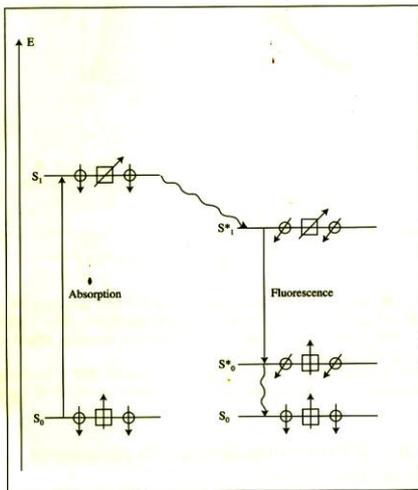


Fig. II-15- Relation entre émission et interaction dipôles solvant - dipôles soluté

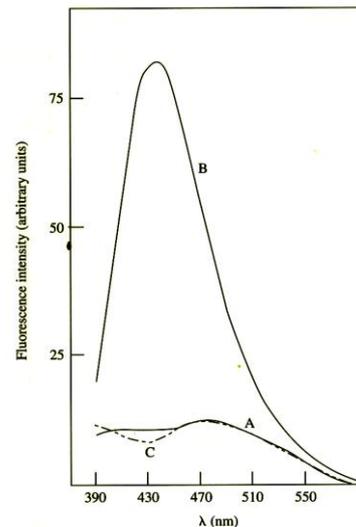


Fig. II-16- Spectres de fluorescence du TNS: (A) dans l'eau (B) dans un milieu de polarité inférieure

Dans un milieu fluide le spectre d'émission d'un fluorophore reste inchangé quelle que soit la longueur d'onde d'excitation. C'est une caractéristique d'une émission à partir d'un milieu relaxé.

Dans le cas où le milieu est rigide ou visqueux, le spectre d'émission varie avec la longueur d'onde d'excitation.

La variation du spectre d'émission en fonction de la longueur d'onde d'excitation indique que le fluorophore n'est pas très mobile.

* Effet de l'environnement sur la durée de vie de fluorescence

Un fluorophore peut avoir un ou plusieurs temps de vie de fluorescence. Ceci dépend de plusieurs facteurs:

- une hétérogénéité de l'état fondamental due à la présence d'un équilibre entre différents conformères rigides. Chaque conformère présente un temps de vie de fluorescence spécifique ;
- différents états non relaxés de l'émission du fluorophore ;
- présence dans le milieu étudié de deux ou plusieurs microenvironnements différents de la molécule fluorescente (ex: cas des protéines).
- mouvement continu du fluorophore étudié. Ce mouvement change le microenvironnement de la molécule fluorescente, ce qui donne différents temps de vie.

II-4-4- Effet des phénomènes non radiatifs

Les processus non radiatifs provoquent un déclin des molécules excitées plus rapide que prévu. La constante de dépeuplement (k) de l'état excité est la somme des constantes de vitesse de tous les processus compétitifs: $k = k_r + k_i + k_{isc}$

$$\eta = \frac{\text{nbre de photons émis}}{\text{nbre de photons absorbés}}$$

$$\eta = \frac{Pr}{Pr + Pnr} = \frac{k_r}{k_r + k_i + k_{isc}}$$

* Détermination expérimentale du rendement de fluorescence

Le rendement de fluorescence η d'un fluorophore est obtenu en comparant l'intensité de sa fluorescence (F) à celle (F_{st}) d'un standard dont le rendement (η_{st}) est connu:

$$\eta = \frac{\text{nbre de photons émis}}{\text{nbre de photons absorbés}} \quad \Leftrightarrow \quad \eta = \frac{F}{I_o \varepsilon C l} \quad \eta_{st} = \frac{F_{st}}{I_o \varepsilon_{st} C_{st} l}$$

$$\frac{F}{F_{st}} = \frac{I_o \varepsilon C l \eta}{I_o \varepsilon_{st} C_{st} l \eta_{st}} = \frac{D}{D_{st}} \frac{\eta}{\eta_{st}}$$

Pour déterminer η il suffit donc de mesurer les densités optiques des deux solutions à la même longueur d'onde d'excitation et la somme des intensités de fluorescence le long des spectres d'émission:

$$\eta = \eta_{st} \frac{D_{st} \sum F}{D \sum F_{st}}$$

Pour la fiabilité du résultat, il est important de travailler à de faibles densités optiques pour éviter des corrections de l'intensité de fluorescence, travailler dans les mêmes conditions expérimentales et techniques (température, intensité de la lumière d'excitation) et utiliser le même solvant pour les deux produits. Si les solvants sont différents, il est nécessaire de faire des corrections dues à l'indice de réfraction.

II-4-5- Facteurs liés à l'instrumentation

Contrairement à la spectroscopie UV/visible, des standards à spectres indépendants du matériel utilisé ne sont pas facilement obtenus. De nombreux facteurs liés à l'instrumentation influencent et distordent les spectres d'émission. Il est donc nécessaire de les prendre en compte et les corriger afin d'obtenir les spectres « vrais » des fluorophores:

- L'efficacité en transmission des monochromateurs et des filtres peut changer au cours du temps. L'efficacité en transmission des monochromateurs varie aussi selon la longueur d'onde: un détecteur de référence devrait être placé après le monochromateur ou le filtre d'excitation.
- Aucune lampe ne possède d'intensité constante pour toutes les longueurs d'onde: un séparateur de faisceau peut être utilisé après le monochromateur ou le filtre d'excitation afin de diriger une partie de la lumière sur le détecteur de référence.
- L'efficacité quantique du détecteur c'est-à-dire le pourcentage de photons détectés, varie selon les détecteurs, la longueur d'onde et le temps (puisque le détecteur vieillit).

Pour obtenir un spectre « standard », la correction de ces facteurs d'instrumentation est un procédé discutable. Il est appliqué seulement lorsqu'il est strictement nécessaire tel que par exemple lors des mesures de rendement quantique ou de la recherche de la longueur d'onde pour la plus forte intensité d'émission.

Pr. N. EL JOUHARI,

Master Chimie fondamentale et appliquée - Option: Chimie Physique Analytique et Matériaux (CPAM),
Cours: « Spectrofluorimétrie », Chapitre II

UNIVERSITÉ MOHAMMED V, FACULTE DES SCIENCES, DEPARTEMENT DE CHIMIE, RABAT-MAROC