

Ch 4 :

Spectroscopie d'émission moléculaire

Généralités

Domaine spectral : 190 à 900 nm

Méthode d'analyse moléculaire

Pr émettre un ryt, une molécule doit auparavant avoir été excitée par absorption d'un ryt électromagn par ex. il s'agit dc nécessairement d'espèce moléculaire pouvant absorber (possédant un chomophore).

Seuls st observables les transitions d'absorption.

$\pi \rightarrow \pi^*$

$n \rightarrow \pi^*$

Ils est intéressant de remarquer que le spectre d'absorption est le même que spectre d'excitation.

On a tt intérêt à exciter une λ proche du max d'absorption. Une λ située ds le spectre d'excitation (d'absorption) permet d'observer un signal de fluorescence.

Une lampe à valeur d'Hg (spectres de raies) permet de faire des études de fluorescence si une des raies de Hg se situe ds le spectre d'absorption du composé.

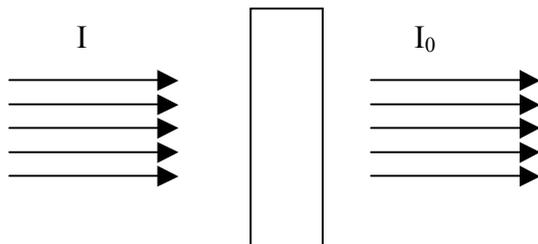
Spectre d'émission d'énergie moins différent qu'absorption (due à émission non radiative = relaxation)

Sauf si on peut de $E_{0v1} \rightarrow E_{1v0}$

Emission = $E_{1v0} \rightarrow E_{0v0} = +$ énergétique

Analyse quantitative

$$I_{\text{abs}} = I_0 - I = I_0 - I_0 \cdot 10^{-\epsilon c L} = I_0 (1 - 10^{-\epsilon c L})$$



I_{fluo} est proport à I_{abs}

$$I_{\text{fluo}} = \varphi \cdot I_{\text{abs}}$$

$$I_{\text{fluo}} = \varphi \cdot I_0 (1 - 10^{-\epsilon c L})$$

ac φ : rendement quantique (coef de proportionnalité)

Développement limité :

$$1 - 10^{-\epsilon c L} = 2,3 \cdot \epsilon c L = (-2,3 \cdot \epsilon c L / 2!) - (-2,3 \cdot \epsilon c L / 3!) - \text{etc} \dots$$

$$A = \epsilon c L < 0,05$$

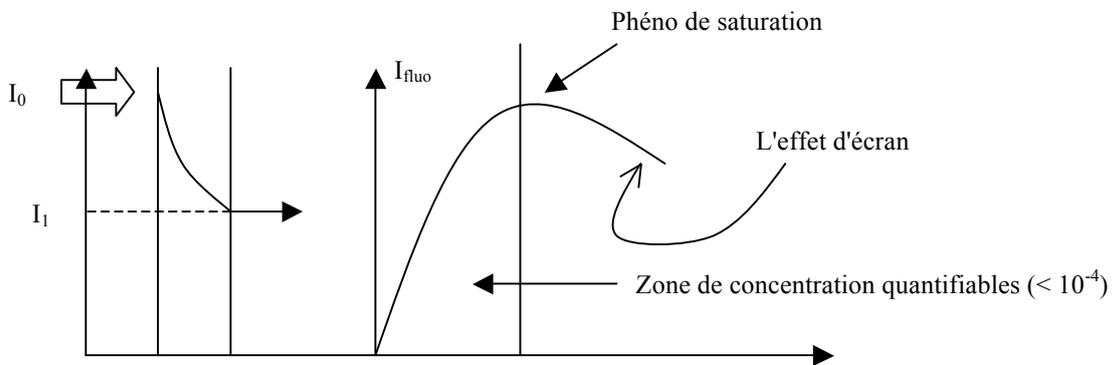
$$I_{\text{fluo}} \approx 2,3 \cdot \phi I_0 \cdot \epsilon c L$$

Travailler donc :

- source d'excitation très intense (I_0 élevée)
- analytes qui absorbe bcp (ϵ élevé)
- des cellules ayant un trajet optique long (en pratique 1cm)
- des analytes qui présentent un rendement quantique élevé

$I_{\text{fluo}} = 2,3 \cdot \phi I_0 \cdot \epsilon c L$ est une approximation, mais pas $I_{\text{fluo}} = 2,3 \cdot \Phi I_0 \cdot \epsilon c L$ (pr des concentrations faibles). En réalité, $I_{\text{fluo}} = \Phi \cdot I_0 (1 - 10^{-\epsilon c L})$

Tous les fluorophores ne répondent pas pareil car pas éclairés ac la même intensité (si concentration trop élevée).



Interaction moléculaire des composés entre eux.

→ ne mesure que des solutions diluées.
Le signal doit diminuer de façon proportionnelle à la dilution.

Effet de la température

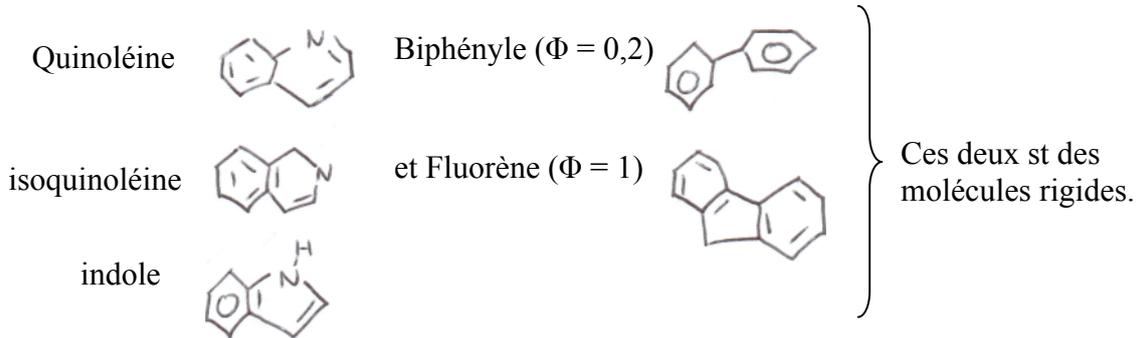
- $\Delta T > 0$ → augmentation des collisions
- échanges d'énergie non radiatifs
- $\Delta I_{\text{fluo}} < 0$

L'effet du solvant

- $\Delta(\text{viscosité}) < 0 \rightarrow \Delta I_{\text{Fluo}} < 0$
- pH doit être contrôlé
- inhibiteurs de fluorescence
 - absorption $\text{inh} + h\nu \rightarrow \text{inh}^*$
 - émission $\text{inh}^* \rightarrow \text{inh} + h\nu$
 - inhibition $\text{inh}^* + Q \rightarrow \text{inh} + Q^* \rightarrow \text{inh} + Q + \text{chaleur}$

C'est pourquoi la fluorescence n'a pas d'unité.

Espèces fluorescentes



Espèces non fluo : pyridine, pyrrole, furane, thiophène

INSTRUMENTATION

▪ Les sources

- Vapeur de Hg : raies très intenses (253,7 ; 366,3 ; 435,8 ; 546 nm) ; très stables ms les bandes st discontinues. UV-Visible : pas mal!!!
- Vapeur de Xe à très hte pression (5 atm) émission continue de 250 à 800 nm. Il y a décharge électrique!
- Laser (source très intense monochromatique)

▪ Les cuves

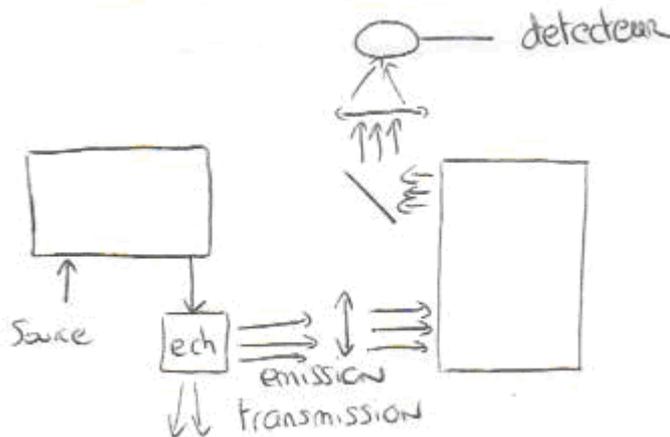
Cette fois, les 4 côtés sont transmissibles.

▪ Le spectrofluorimètre

Il sépare les λ , les sélectionne ac une fente. Angle de 90° car phéno de diffraction des ryts sinon!

Deux critères de sélectivité :

- excitation : à λ csique de l'échantillon
- émission : à une certaine λ , qui sera sélectionnée par fente + monochromateur



▪ Applications

- La molécule est naturellement fluorescente :
Pyridoxine (B₆), riboflavine (B₂), Folates (B₉), tryptophane, adrénaline, chloroquinine, digitaline, pénicilline, certains alcaloïdes.
- Test de pureté
- La molécule n'est pas naturellement fluo, on la rend fluo (dérivation ou dérivatization)
 - en la complexant ac une molécule fluorescente
 - en oxydant le composé (par bromure de cyanogène)
 - en cyclisant la molécule
 - en lui greffant des gpements fluorescents

