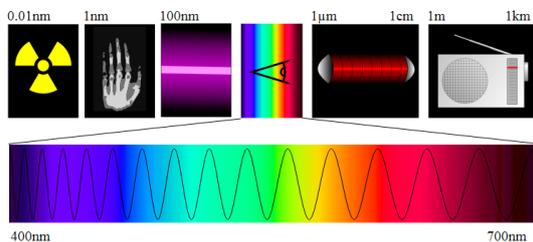


# Méthodes et Techniques Instrumentales



Dr. Lynda IDJOUADIENE

Université A. Mira de Bejaia

Faculté des Sciences Exactes

Département de Chimie

Email : lynda.  
idjouadiene@univ-bejaia.dz

1.0

Avril 2022

# Table des matières

<b>Objectifs</b>	<b>3</b>
<b>I - Chapitre II : Méthodes d'analyses spectrométriques</b>	<b>4</b>
1. Introduction aux méthodes spectrométriques .....	
2. Instruments pour la spectrométrie optique .....	
3. Spectrométrie d'absorption moléculaire .....	
4. La spectroscopie Raman .....	
5. La spectrométrie de fluorescence moléculaire .....	4
5.1. Aspects qualitatifs .....	4
5.2. Aspects quantitatifs .....	6
5.3. Les espèces fluorescentes (fluorophores) .....	8
5.4. Facteurs influençant la fluorescence .....	8
5.5. Instrument .....	9
5.6. Applications analytiques .....	10

# Objectifs

Ce cours a pour objectif de familiariser l'étudiant avec les notions théoriques nécessaires à la maîtrise d'un certain nombre de techniques courantes instrumentales.

Par ailleurs:

- Familiariser les étudiants avec les différentes techniques instrumentales.
- Savoir régler les instruments pour optimiser la qualité des spectres.
- Réussir à identifier des signaux réels du bruit.
- Appliquer les lois arithmétique sur les spectres et réduction de données (identification des pics, des bandes et des éléments et structures moléculaires correspondantes).

Ce cours est adressé aux étudiants de Master I en Chimie Analytique. Il leur permet de connaître les différentes techniques instrumentales spectroscopiques utilisés dans les laboratoires de Chimie afin d'approfondir leur connaissance sur le matériel à utiliser et savoir interpréter les résultats obtenus.

# I Chapitre II : Méthodes d'analyses spectrométriques

## 1. La spectrométrie de fluorescence moléculaire

La spectrométrie de fluorescence moléculaire étudie l'émission de lumière par des molécules, en solution après excitation par des photons appartenant au domaine du visible ou du proche ultraviolet.

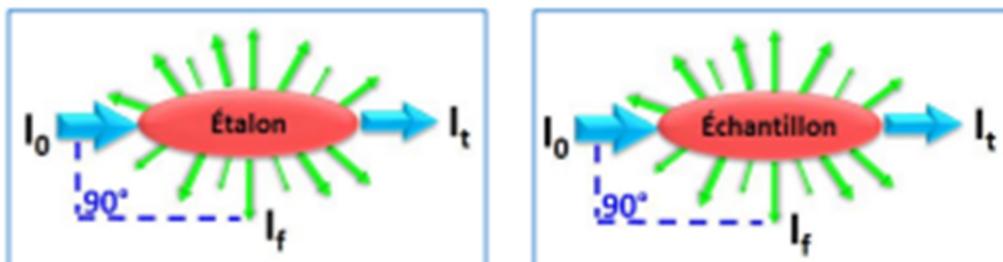
### 1.1. Aspects qualitatifs

#### *Principe*

La spectrométrie de fluorescence moléculaire utilise la mesure de l'intensité de lumière fluorescente émise ( $I_f$ ) par la substance à examiner par rapport à celle émise par un étalon déterminé.

#### *Remarque*

La fluorescence est mesurée à un angle de  $90^\circ$  par rapport au trajet optique du rayonnement incident ( $I_0$ ) afin de différencier la lumière fluorescente de la lumière transmise ( $I_t$ ). (voir schéma suivant)



#### *Spectres d'émission et d'excitation de fluorescence*

##### *a. Spectre d'émission de fluorescence :*

L'intensité de fluorescence émise est mesurée sur une plage de longueurs d'onde en excitant la molécule à une longueur d'onde fixe.

**b. Spectre d'excitation de fluorescence :**

L'intensité de fluorescence émise est mesurée sur une longueur d'onde fixe en excitant la molécule à des longueurs d'ondes variées.

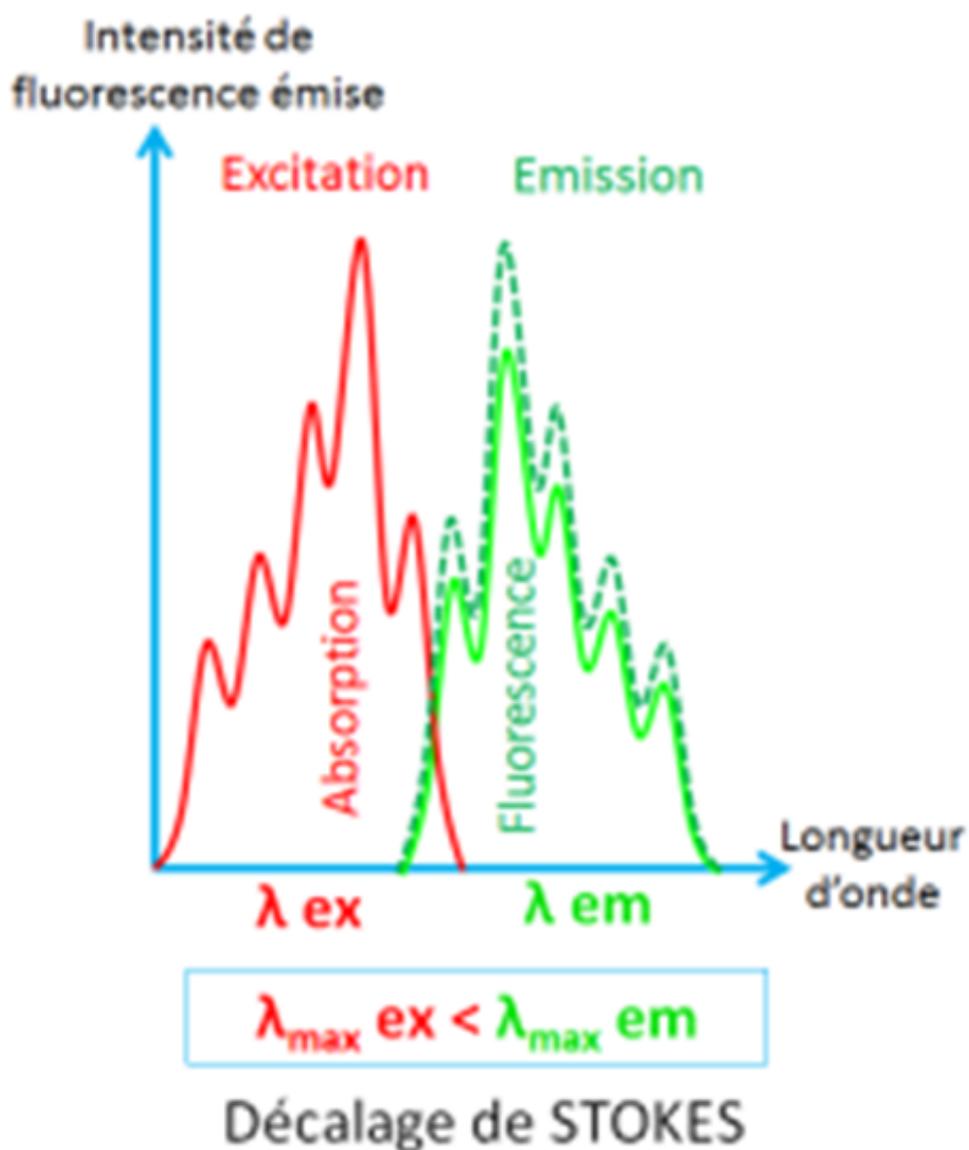


Figure 39 : Décalage des stocks pour l'excitation et l'émission

**Remarque**

Dans un milieu optiquement transparent, le spectre d'émission est une image inversée (effet miroir) du spectre d'excitation. figure 39.

## 1.2. Aspects quantitatifs

### a. Rendement quantique de fluorescence « $\Phi_f$ »

Le rendement quantique de fluorescence détermine l'efficacité d'une molécule à fluorescer.

$$\Phi_f = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés}} = \frac{I_f}{I_a}$$

Avec:

$I_f$  : Intensité de fluorescence

$I_a$  : Intensité absorbée

- $0 < \Phi_f < 1$   
si  $\Phi_f = 0 \rightarrow$  Absence de fluorescence  
et si  $\Phi_f = 1 \rightarrow$  Fluorescence maximale
- Sachant que:  
 **$\Phi_f$  dépend :**
  - Des propriétés physiques de la molécule
  - De l'environnement: Concentration, polarité, pH, température ...
- $\Phi_f$  ne dépend pas:**
  - De l'intensité de la source lumineuse  $I_0$
  - De la longueur d'onde d'excitation

### b. Intensité de fluorescence « $I_f$ »

Elle dépend de la longueur d'onde d'excitation  $\lambda_{\text{ex}}$  alors que l'allure du spectre de fluorescence est indépendante de cette dernière.

On a :

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

Avec raisonnement mathématique suivant :

$$I_f = \Phi_f \cdot I_0 \cdot \left(1 - \frac{I_t}{I_0}\right)$$

$$I_f = \Phi_f \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-A})$$

$$10^{-A} = 1 - 2,303 \cdot A + \frac{(2,303 \cdot A)^2}{2!} - \dots + \dots$$

D'où on conclut l'équation suivante :

$$I_f = 2,3 \cdot \Phi_f \cdot I_0 \cdot \varepsilon_\lambda \cdot l \cdot C$$

Avec:

$I_f$  = Intensité de fluorescence

$\Phi_f$  = Rendement quantique de fluorescence

$I_0$  = Intensité du rayonnement incident

$I_t$  = Intensité du rayonnement transmis

A = Absorbance ( $A = \log I_0/I_t = \varepsilon \cdot l \cdot C$ )

*c. Durée de vie à l'état excité :*

C'est la durée caractéristique pendant laquelle la molécule reste à l'état excité avant de retourner à l'état fondamental. (voir figure 40)

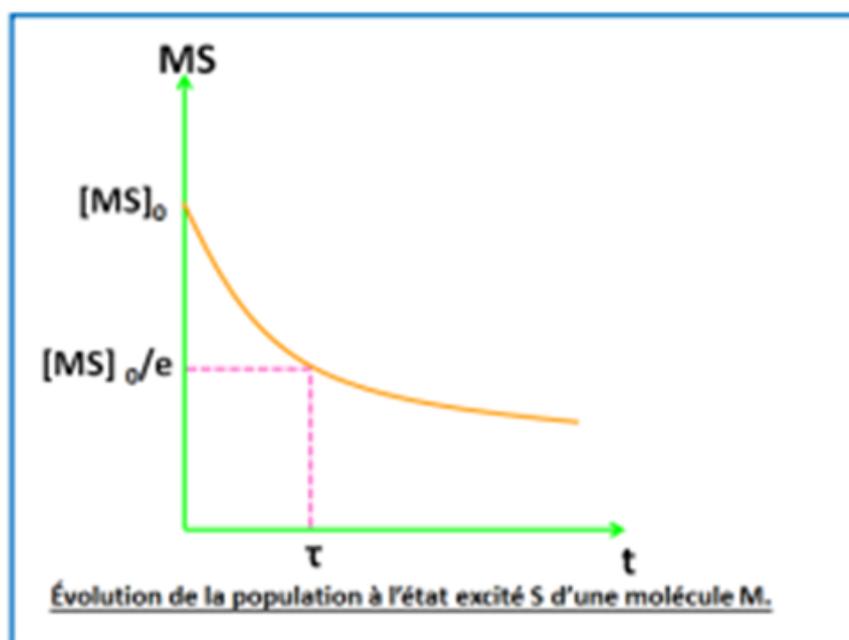


Figure 40 : diagramme de durée de vie de l'évolution à un état excité d'une molécule M.

Pour

$t = \tau$

$$[MS] = [MS]_0 / e = [MS]_0 / 2,718$$

Avec :

- MS : Nombre de molécules excitées au temps t
- $MS_0$  : Nombre de molécules initialement excitées
- $\tau$  : temps de vie radiatif

- e = 2,718 (base des logarithmes népériens)

### 1.3. Les espèces fluorescentes (fluorophores)

Ceux sont généralement des composés organiques aromatiques qui répondent aux critères suivants:

- Absorption dans le visible ou le proche ultraviolet
- Coefficient d'extinction molaire  $\epsilon_{\max}$  important
- Fort rendement quantique (0.8 - 0.9)
- Très courte durée de vie de fluorescence
- Grand décalage de STOKES

### 1.4. Facteurs influençant la fluorescence

La fluorescence est **augmentée** par la présence de groupements **électro-donneurs** (OH, NH<sub>2</sub>, R ...) et est **diminuée** par la présence de groupements **électro-attracteurs** (NO<sub>2</sub>, COOH, X ...).

Il existe plusieurs facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la fluorescence. La figure 41, résume ces derniers.

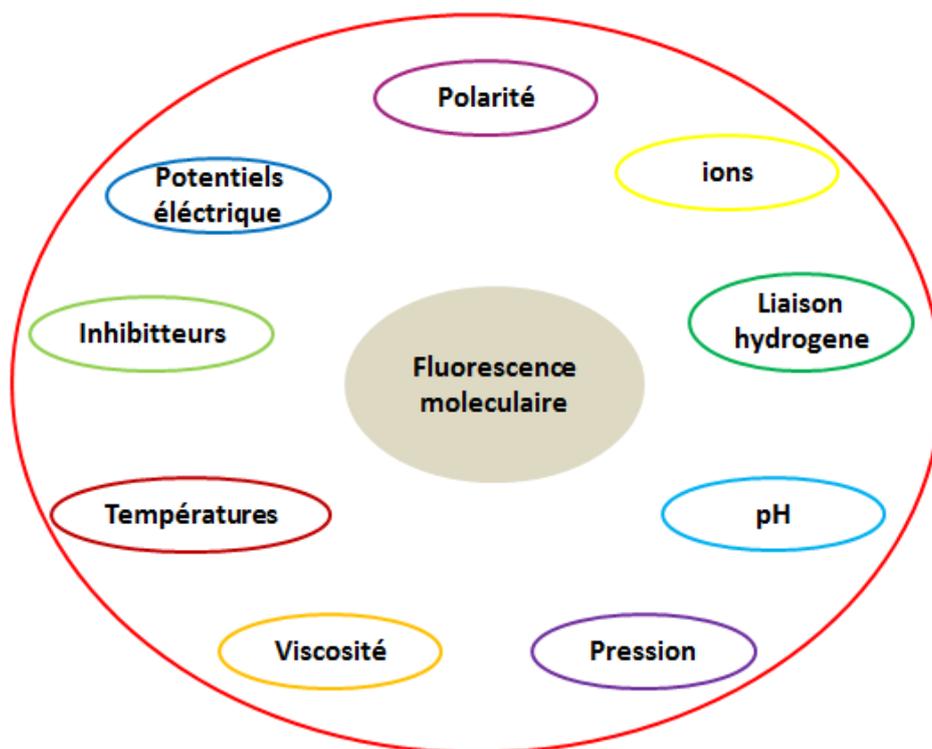


Figure 41 : Représentation schématique des différents facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la fluorescence.

#### a. Facteurs liés à la molécule :

La fluorescence est privilégiée par les molécules:

- Cycliques
- Rigides

- Possédant des liaisons  $\pi$

### b. Facteurs liés au solvant :

- Effet de la polarité :

Une augmentation de la polarité, diminue  $I_f$  et augmente  $\lambda_{\text{émission}}$ .

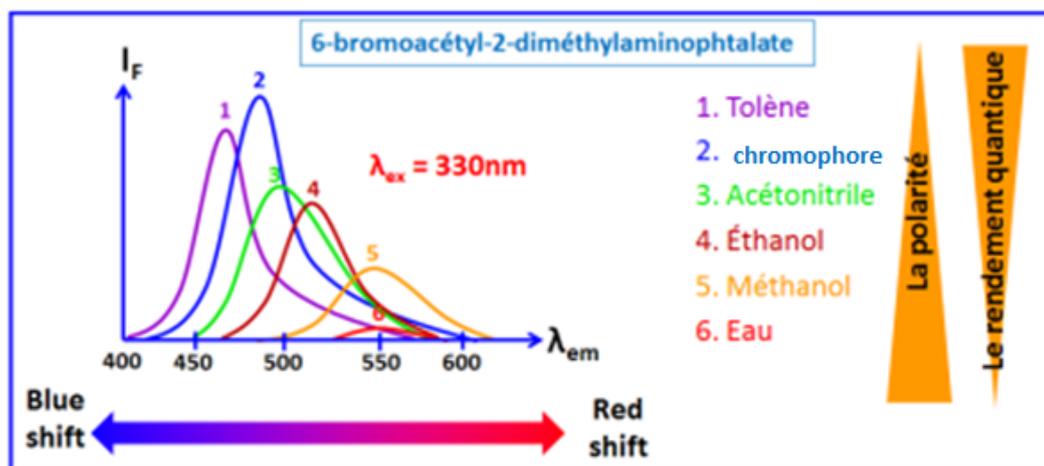


Figure 42 : Exemple de l'effet de polarité et du rendement quantique de certains composants d'un produit.

- Effets des lumières parasites

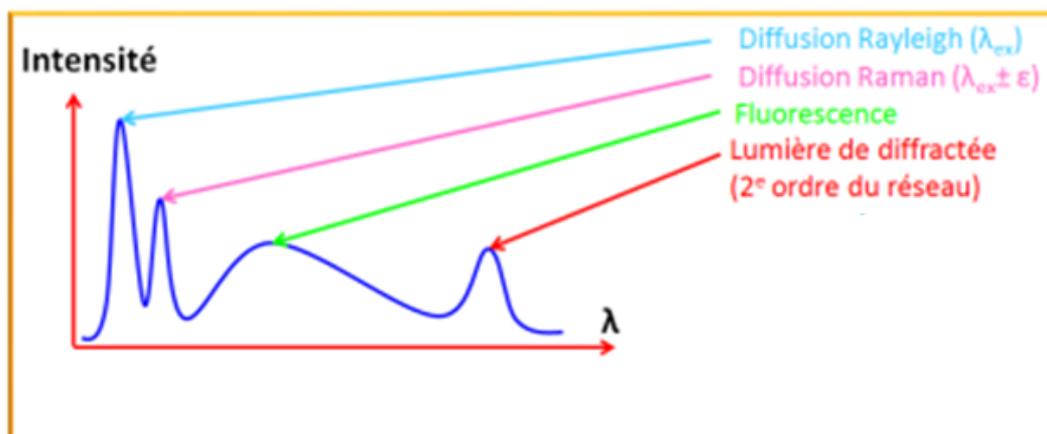


Figure 43 : Schéma résumant les différents effets des lumières parasites.

- **Diffusion de Rayleigh**: Diffusion à la même longueur d'onde d'une petite fraction de la lumière excitatrice.
- **Diffusion Raman**: Diffusion d'une fraction plus petite de la lumière excitatrice à des longueurs d'onde plus grandes par perte de l'énergie sous forme de vibrations.
- **Raie du 2e ordre** : Positionnée à deux fois la longueur d'onde maximale d'excitation, il s'agit d'un phénomène purement optique dû à la diffraction de la lumière sur les réseaux de l'appareillage.

## 1.5. Instrument

La composition de la spectrométrie de fluorescence moléculaire est décrite dans la figure 44 :

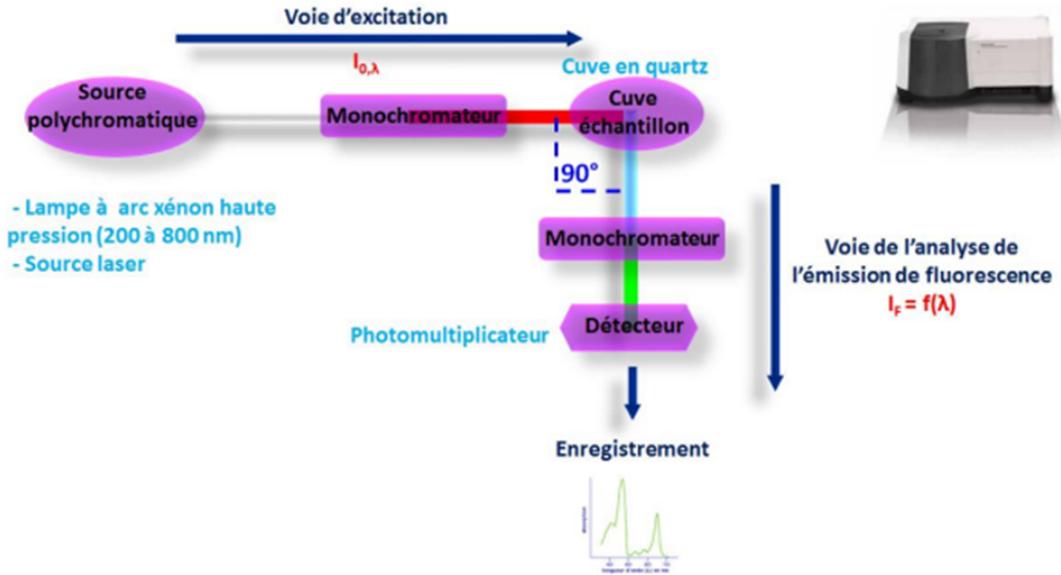


Figure 44 : Schéma détaillant les différents composants de la spectrométrie de fluorescence moléculaire

## 1.6. Applications analytiques

### Domaines d'application

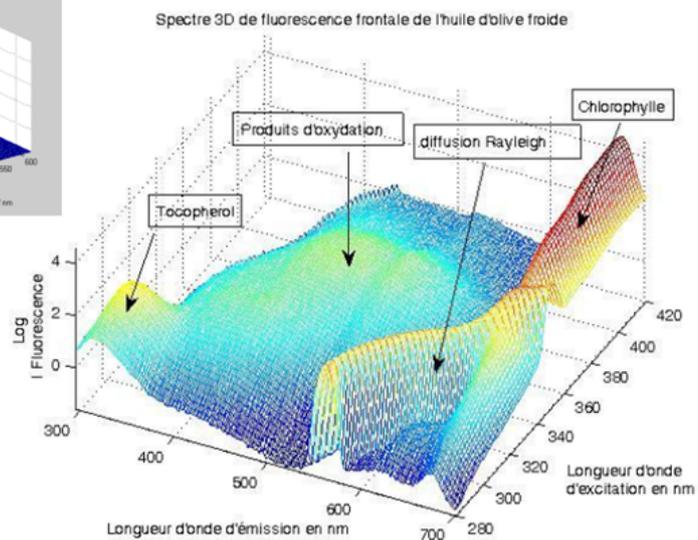
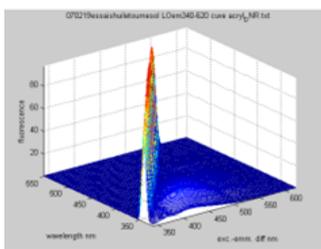
- Médicament
- Biologie
- Environnement
- Toxicologie ...

### Applications en analyse qualitative

- Un spectre de fluorescence obtenue en 3D (trois dimensions)

$I_f = f(\lambda_{\text{émission}}, \lambda_{\text{excitation}})$  est une **signature de la molécule** d'où la sélectivité de la spectrofluorimétrie.

- Grâce à des bases de données, il est possible d'identifier les substances chimiques fluorescentes.



*Figure 45 : Exemple de spectre de fluorescence obtenue en 3D*

### *Applications en analyse quantitative*

La spectrofluorimétrie est 10 à 1000 fois plus sensible que la spectrophotométrie d'absorption UV-Visible.