



Dr Mireille LE GUENNEC

2 rue de la Houssinière
Département de Chimie
BP 92 208
44 322 Nantes Cedex 3

☎ 02 51 12 54 25

✉ mireille.le-guenec@univ-nantes.fr



www.univ-nantes.fr

Licence Professionnelle – Métrologie Chimique et Nucléaire

- XLP5CE043 - Fluorescence – Phosphorescence (5h)

Comprendre :

- Les aspects théoriques sur l'absorption et l'émission spontanée en fluorescence et en phosphorescence, le principe de Franck-Condon.
- Le fonctionnement d'un spectromètre de fluorescence et l'interprétation du spectre d'absorption et d'émission, le rendement quantique de fluorescence Q_{fluor} .
- Le principe et la méthodologie du dosage spectrofluorimétrique, les effets de l'environnement (quenching) et l'interprétation des spectres, l'identification des artefacts.
- L'introduction à la scintillation liquide utilisée en « nucléaire » et la spectrofluorimétrie LASER.
- La microscopie de fluorescence comme méthode d'imagerie.

Savoir :

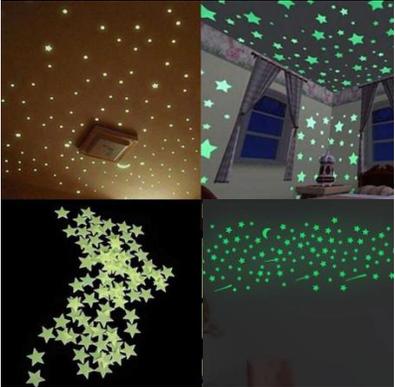
1. Proposer une méthode de mesure permettant un dosage d'une espèce fluorescente.
2. Distinguer une espèce moléculaire fluorescente ou non.
3. Interpréter des spectres de fluorescence.



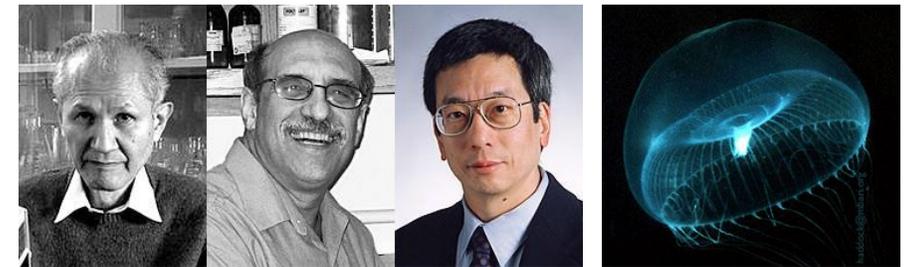
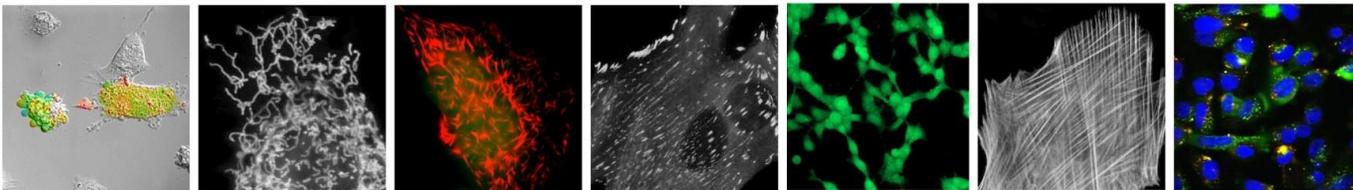
Deux phénomènes de PHOTOLUMINESCENCE :

FLUORESCENCE : propriété à absorber de la lumière et à la réémettre **jusqu'à l'arrêt de l'illumination.**

PHOSPHORESCENCE : propriété à absorber de la lumière et à la réémettre **pendant un temps plus long après l'arrêt de l'illumination.**

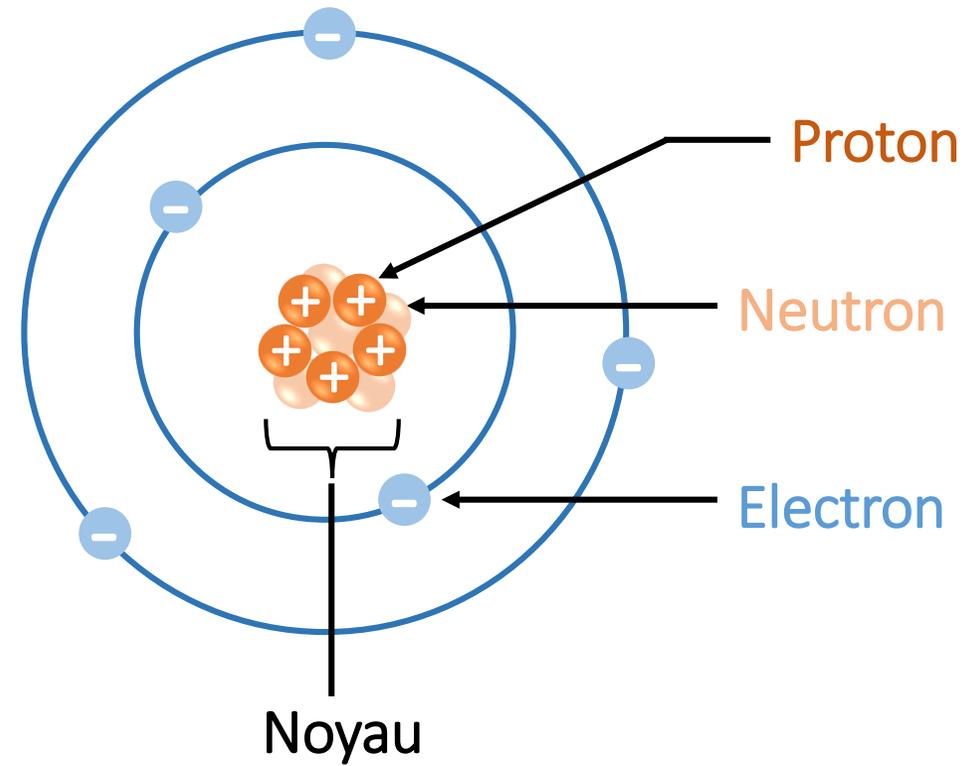


A la base de nombreux dosages très sensibles !!
(détection et identification molécules, marquage, etc...)

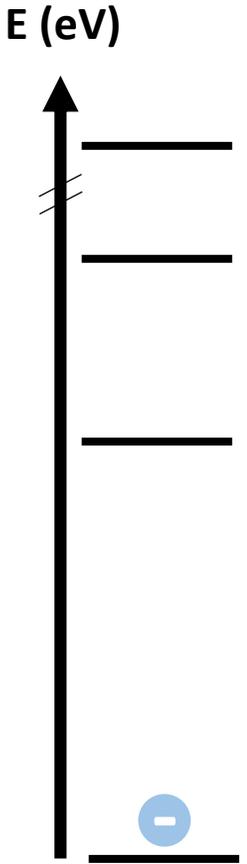


O. Shimomura, M. Chalfie et R.Y. Tsien
Lauréats du Prix Nobel de Chimie 2008
Green fluorescent proteins (GFP)

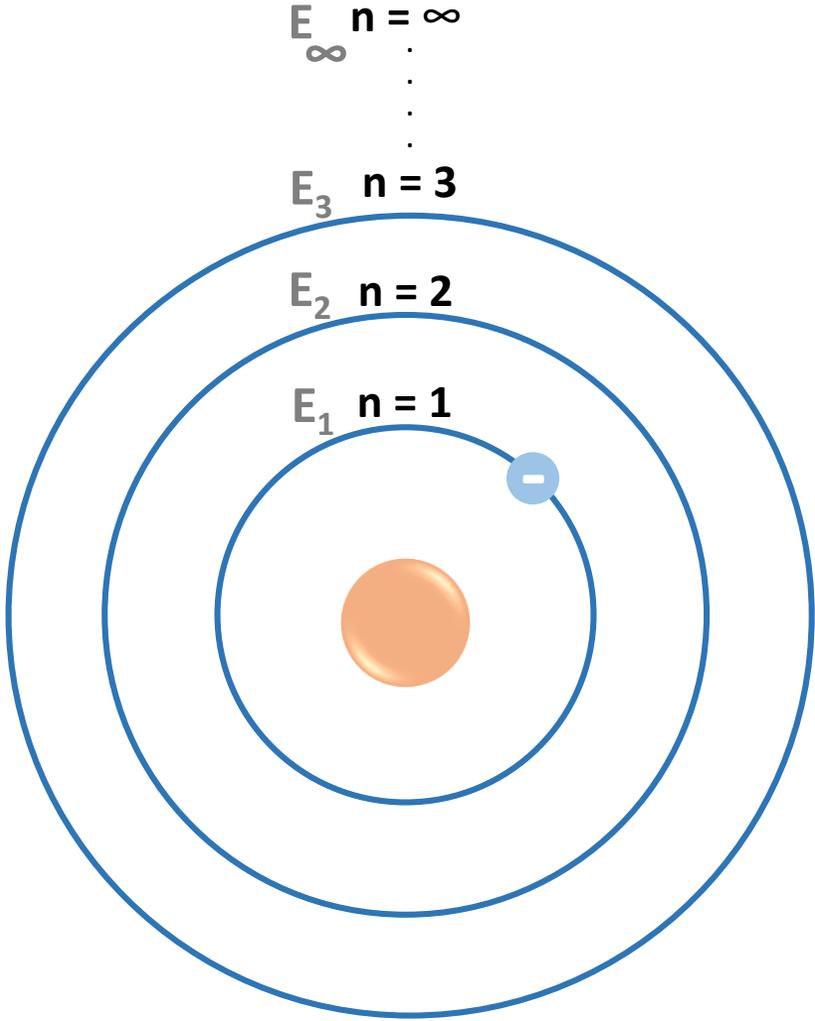
Schéma de la structure d'un atome :



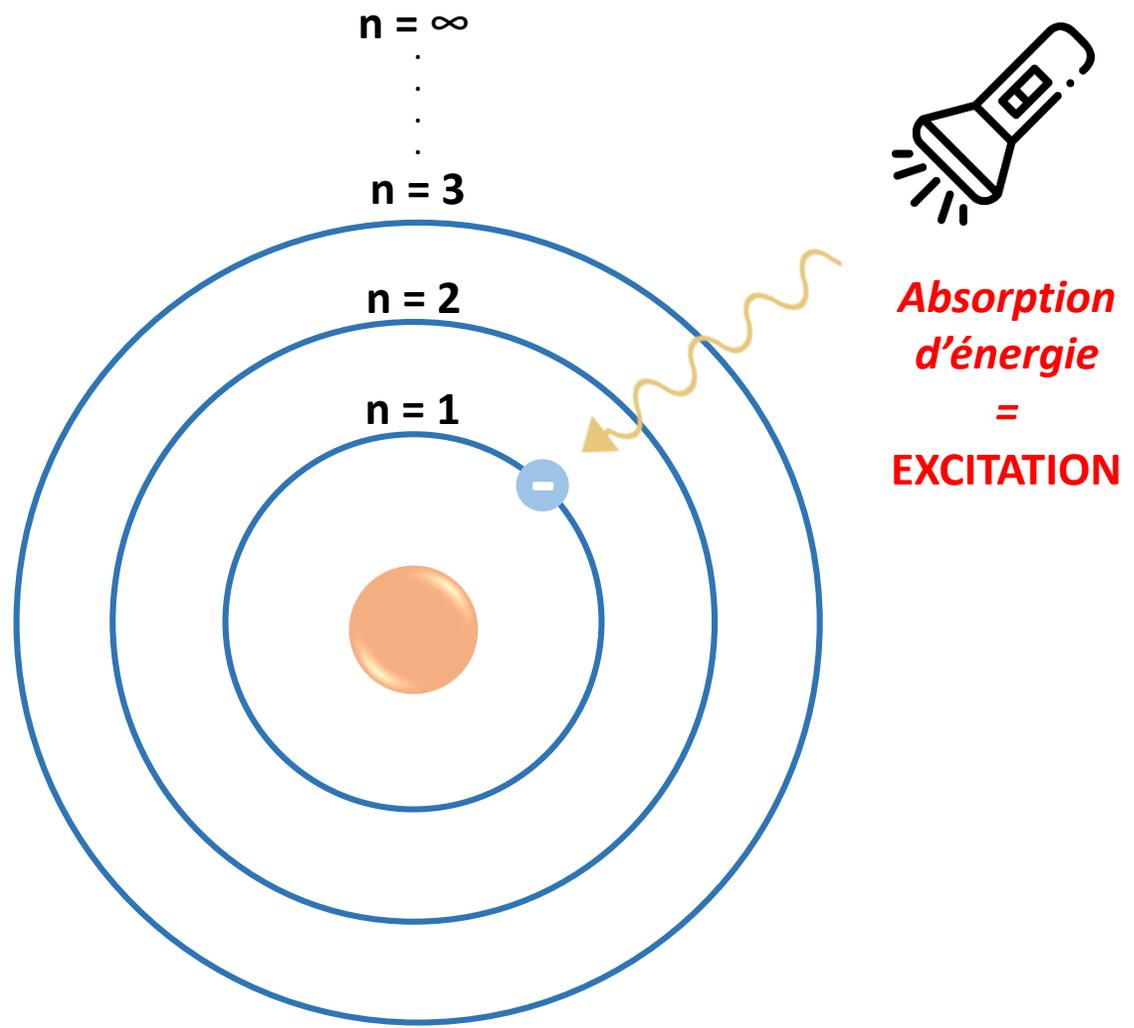
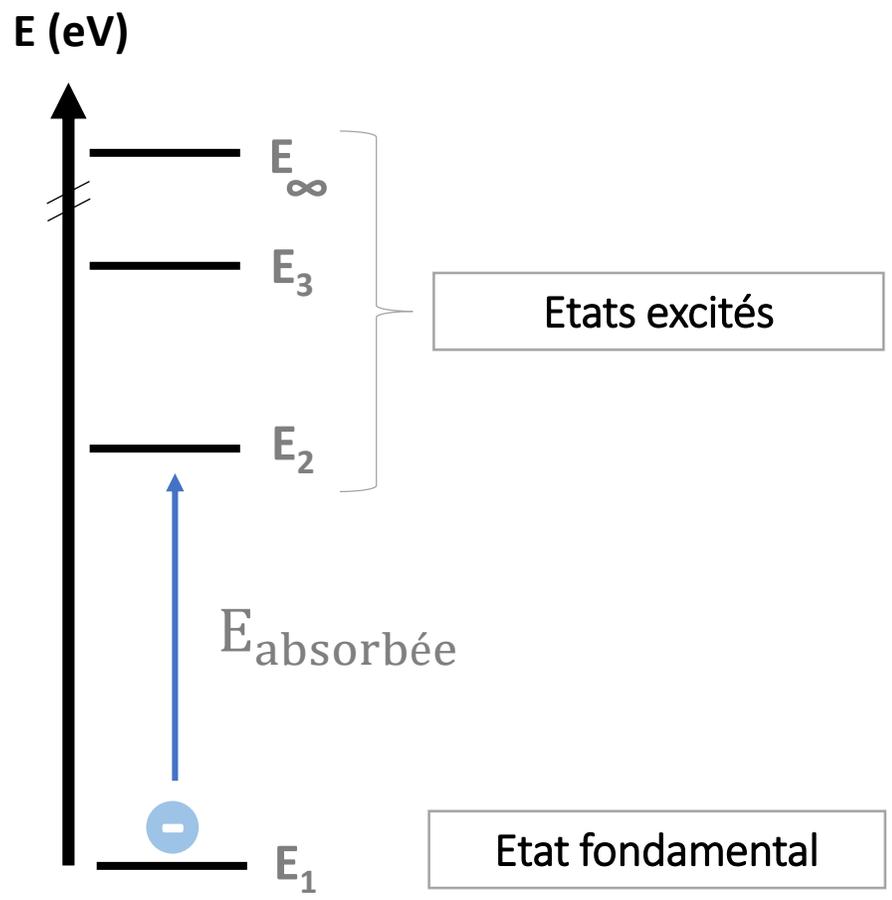
1. Rappel sur l'atome et le lien entre énergie et longueur d'onde



Etat fondamental

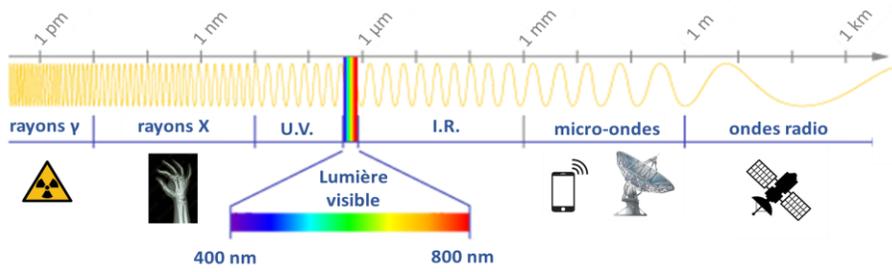


1. Rappel sur l'atome et le lien entre énergie et longueur d'onde



PRINCIPE – Quelques rappels

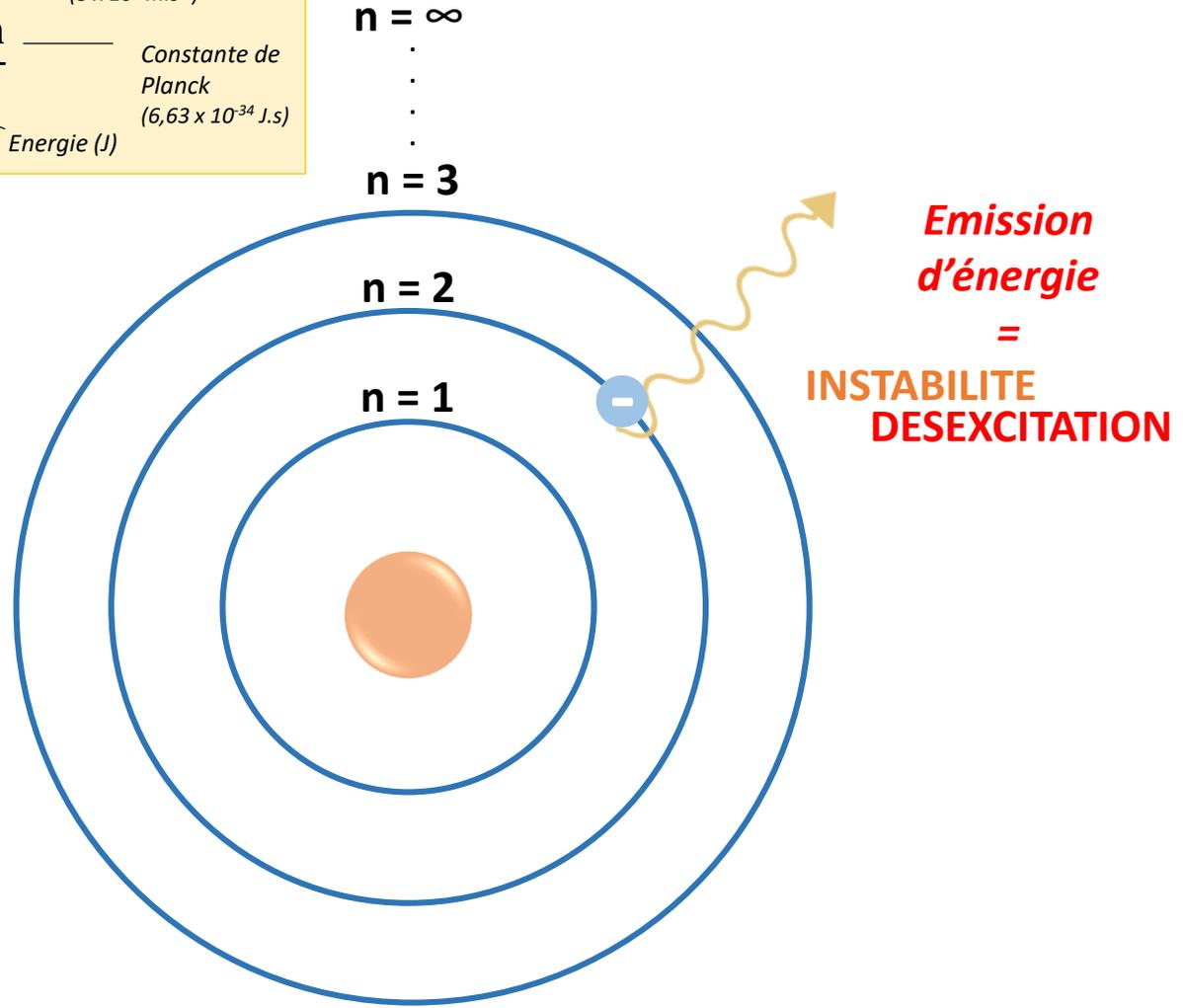
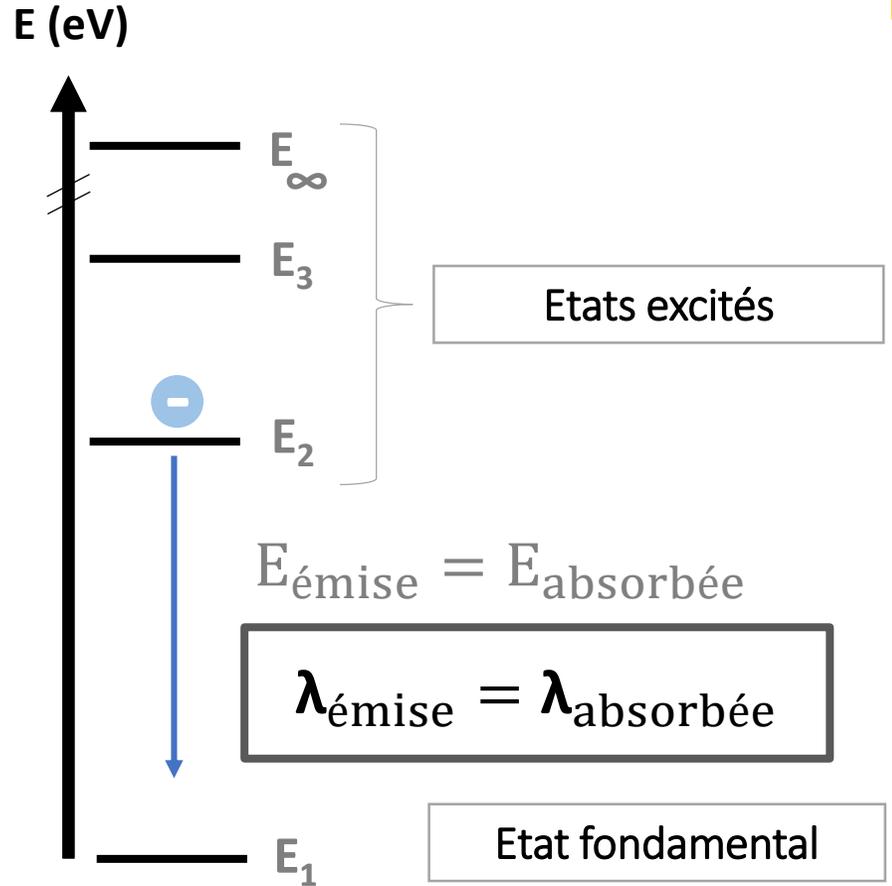
1. Rappel sur l'atome et le lien entre énergie et longueur d'onde



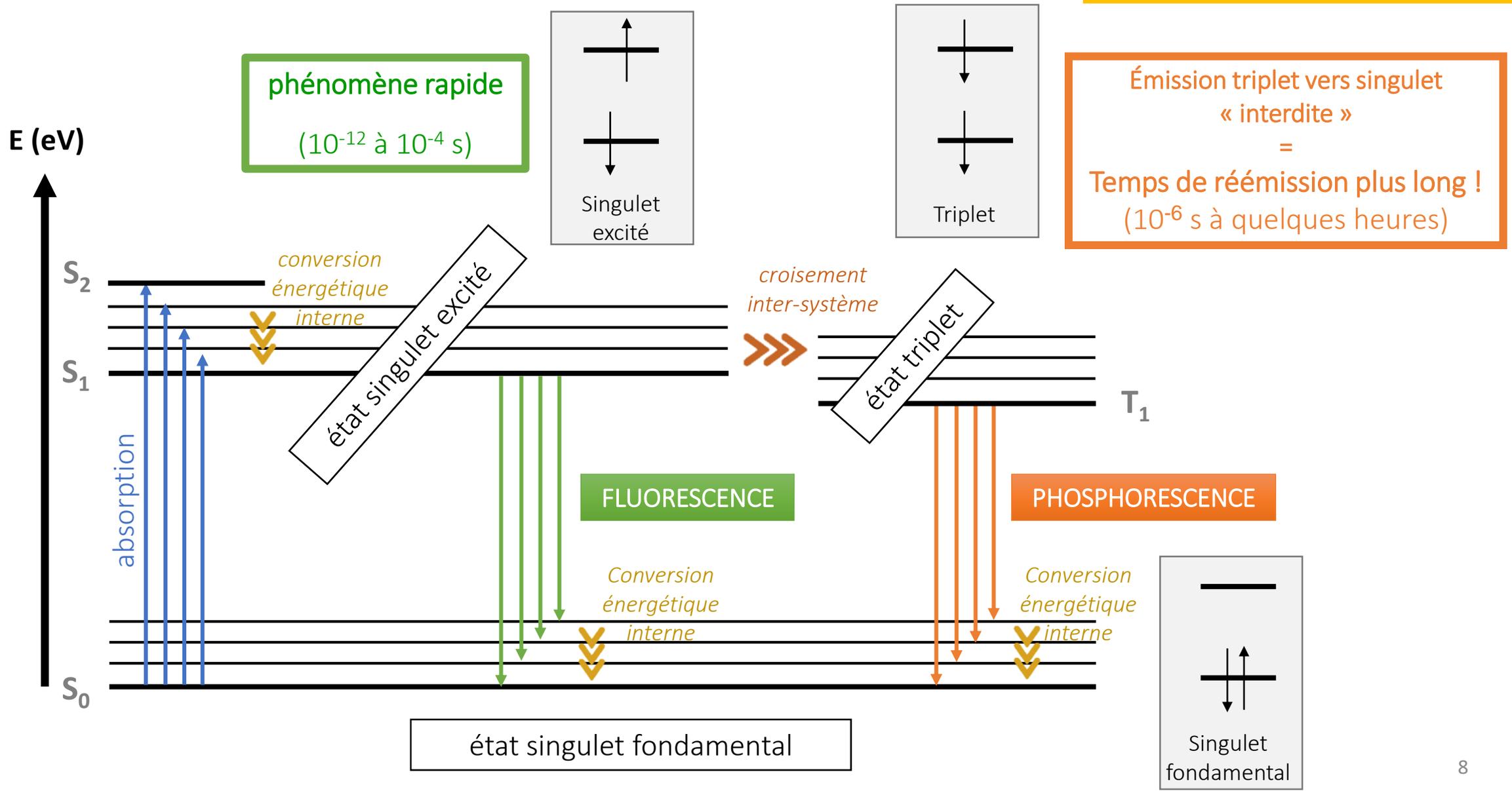
longueur d'onde λ Relation de Planck – Einstein :

$$\lambda = \frac{c \times h}{E}$$

λ : Longueur d'onde (m)
 E : Energie (J)
 c : Célérité ($3 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$)
 h : Constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J.s}$)



2. Diagramme de Perrin-Jablonsky



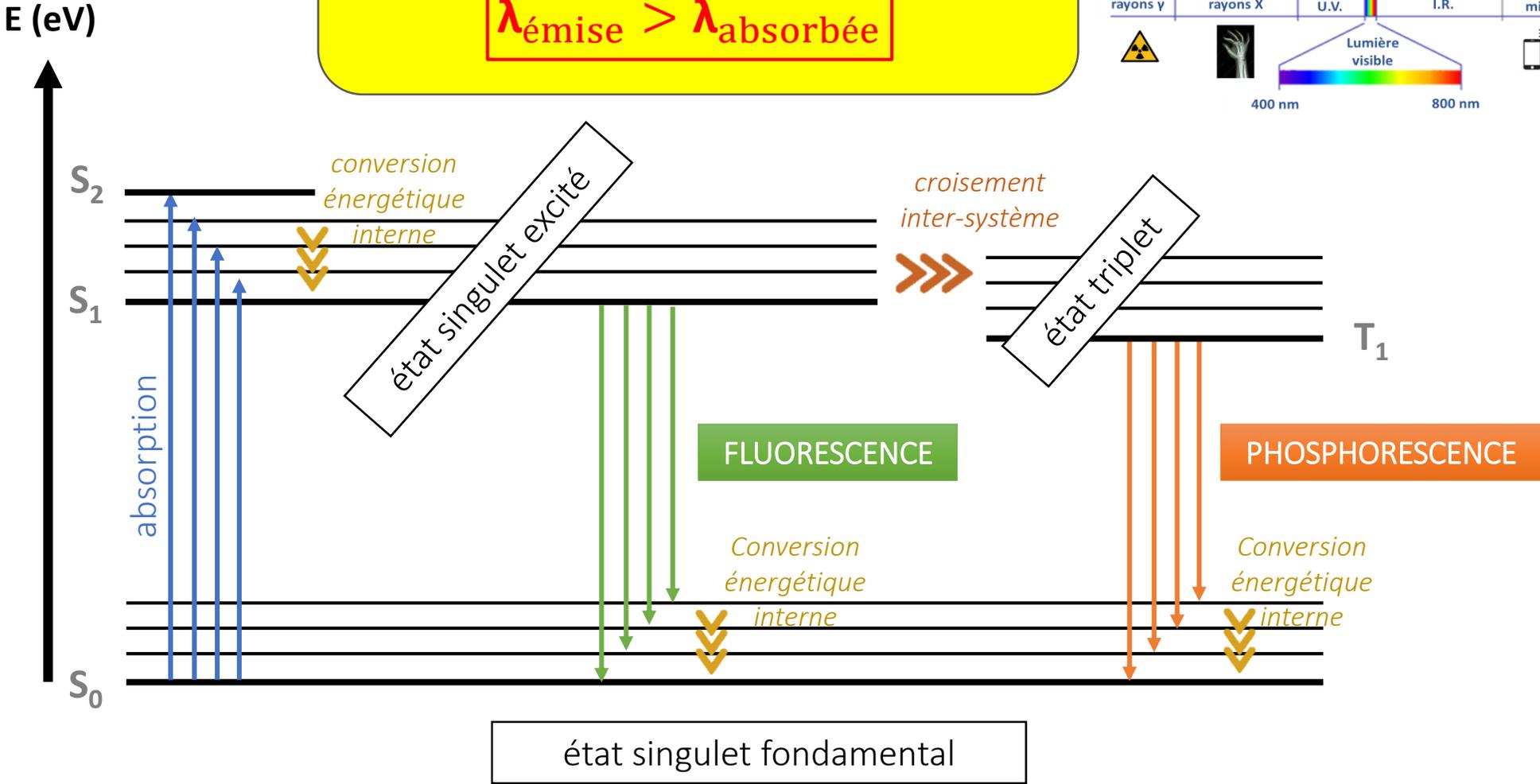
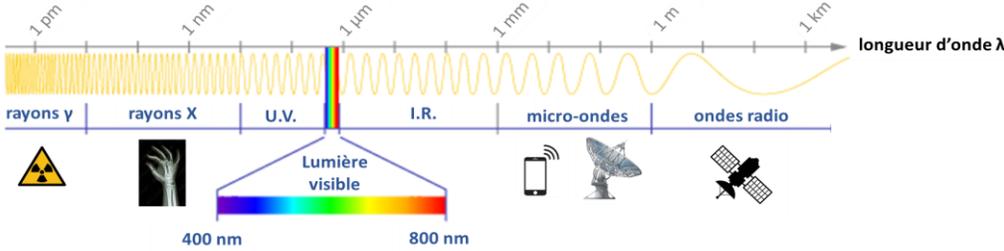
Relation de Planck – Einstein :

$$\lambda = \frac{c \times h}{E}$$

Célérité ($3 \times 10^8 \text{ m.s}^{-1}$)
Constante de Planck ($6,63 \times 10^{-34} \text{ J.s}$)
Longueur d'onde (m)
Energie (J)

Pour la fluorescence et la phosphorescence :

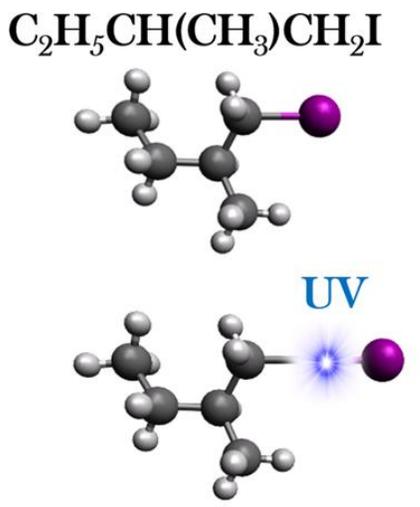
$E_{\text{émise}} < E_{\text{absorbée}}$
 $\lambda_{\text{émise}} > \lambda_{\text{absorbée}}$



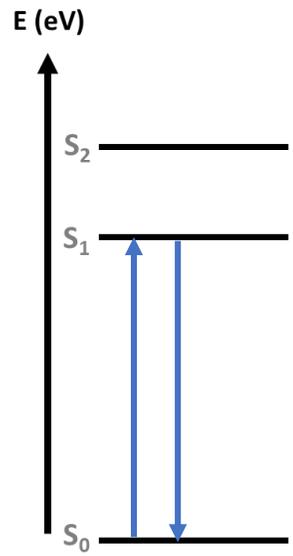
3. Les voies de désexcitation d'une molécule

Lorsqu'une molécule est portée de l'état électronique fondamental S_0 à un état excité S_1 par l'absorption d'un photon, plusieurs voies de désexcitation sont possibles :

CAS 1
Dissociation :



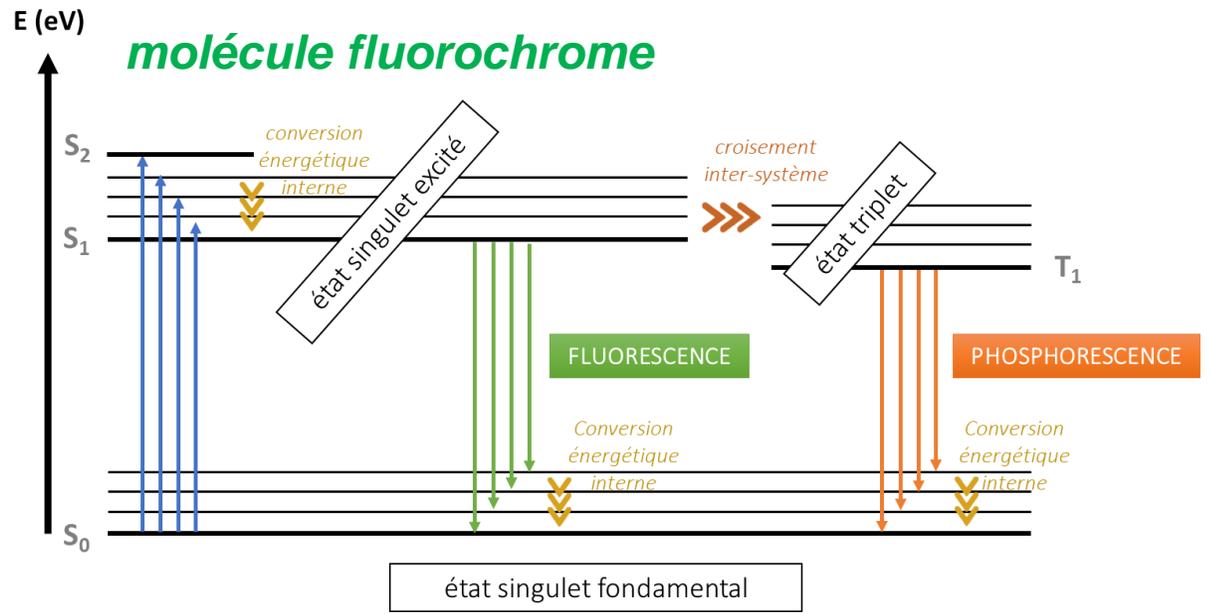
CAS 2
Réémission :



$$E_{\text{émise}} = E_{\text{absorbée}}$$

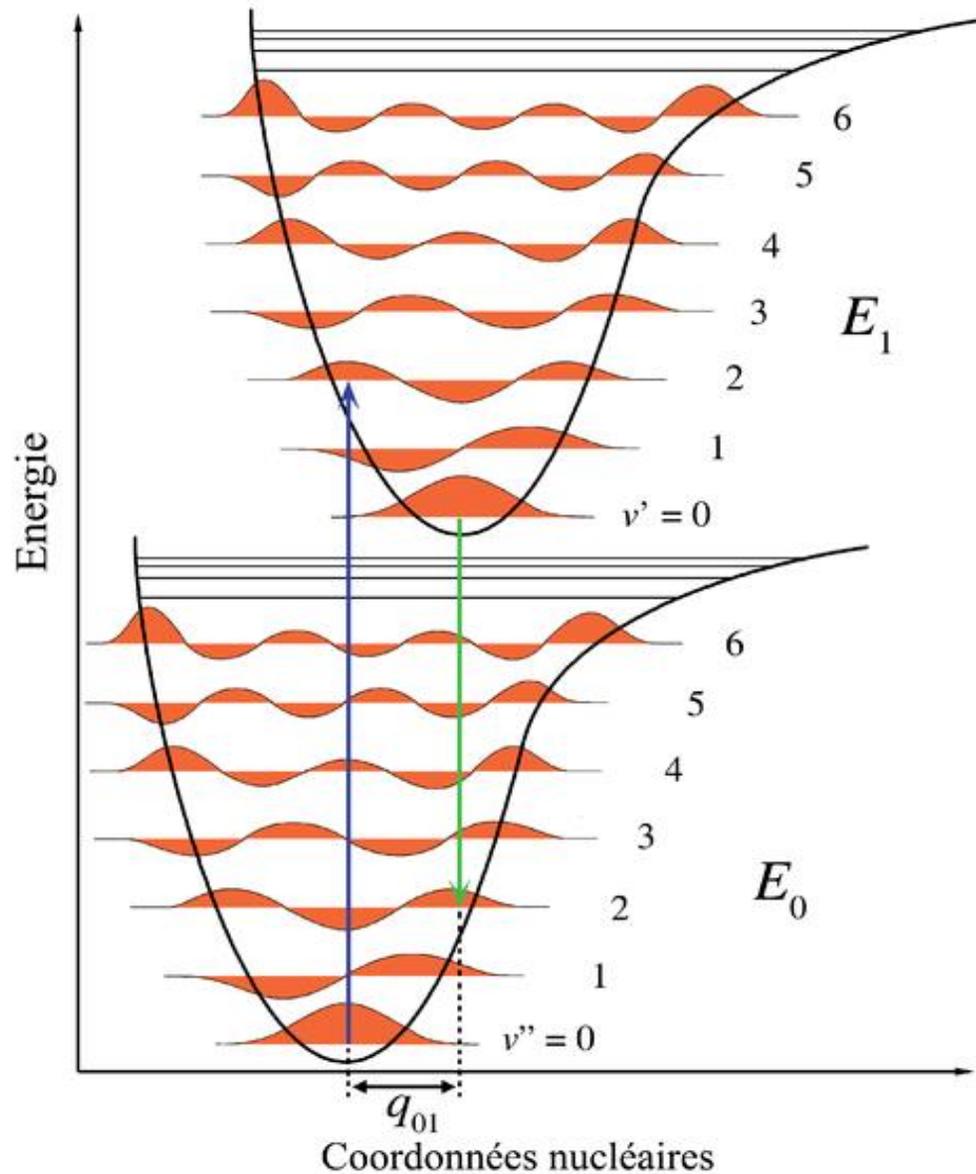
$$\lambda_{\text{émise}} = \lambda_{\text{absorbée}}$$

CAS 3
Fluorescence :



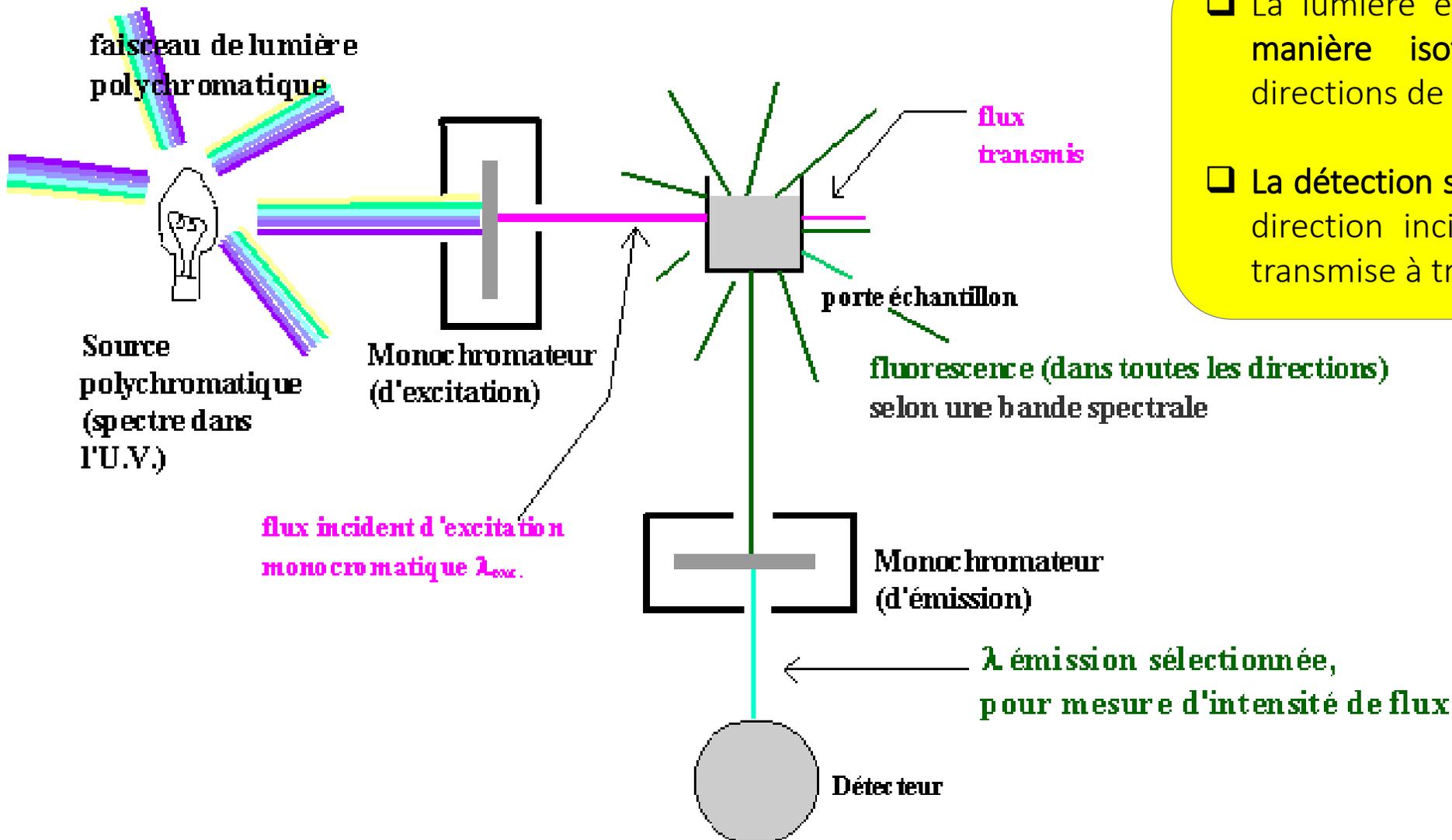
$$E_{\text{émise}} < E_{\text{absorbée}}$$

$$\lambda_{\text{émise}} > \lambda_{\text{absorbée}}$$



Principe de Franck-Condon :

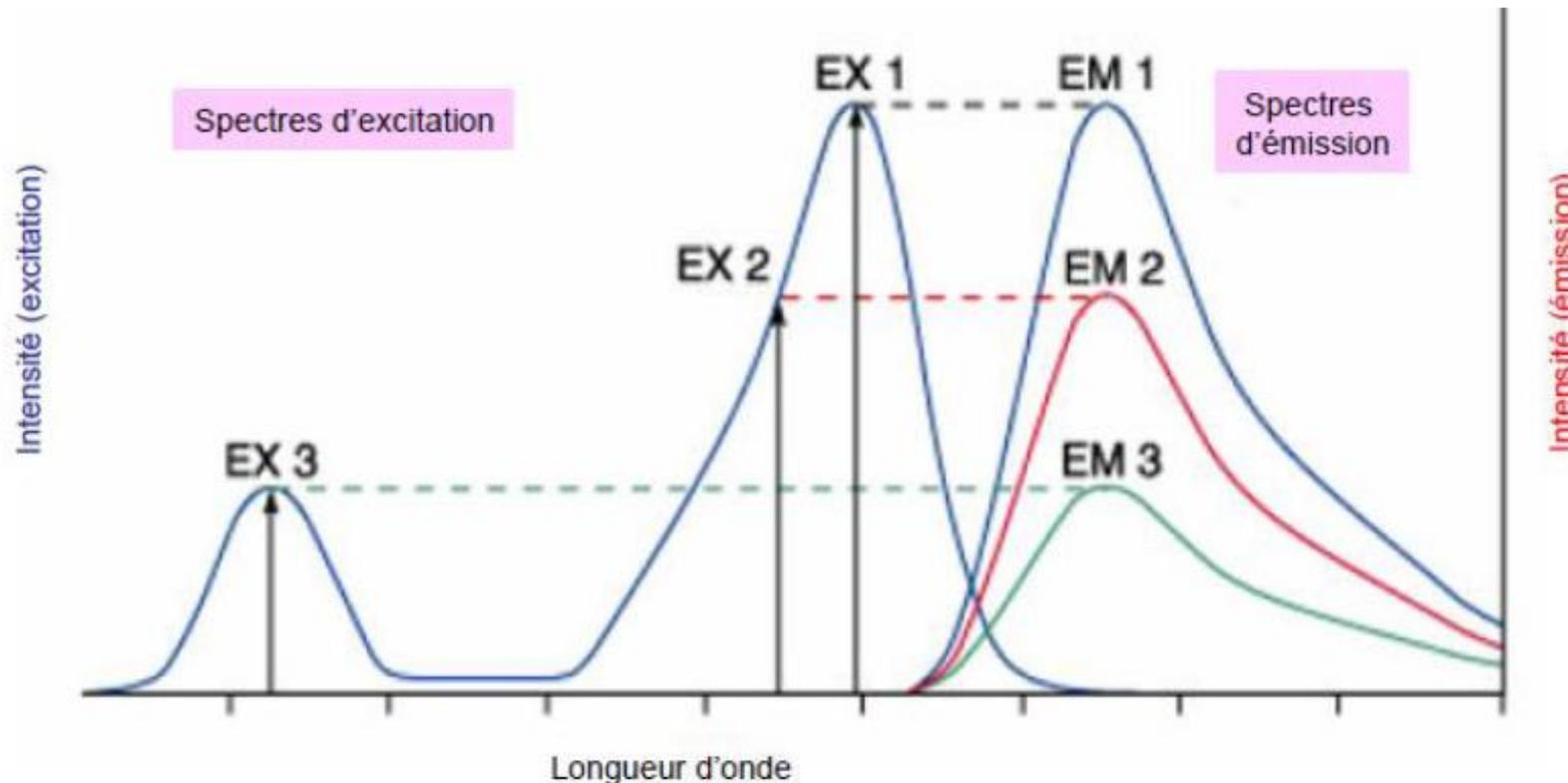
Lors du phénomène de fluorescence, les noyaux des atomes restent en place = les distances interatomiques restent figées pendant les transitions électroniques.



- ❑ La lumière est émise par fluorescence de manière isotrope (= dans toutes les directions de l'espace).
- ❑ La détection se fait généralement à 90° de la direction incidente pour éviter la lumière transmise à travers l'échantillon.

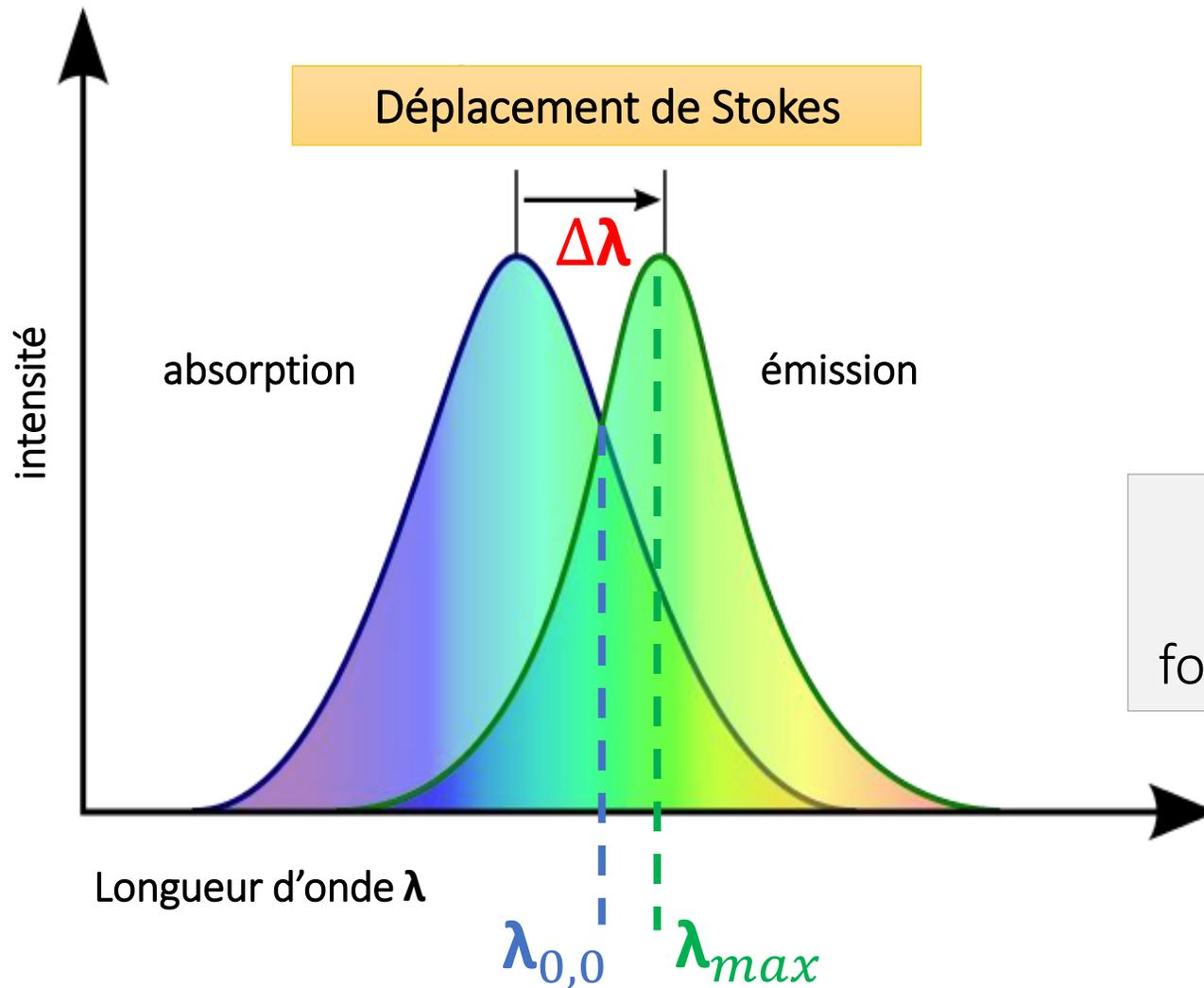
Un **spectre d'excitation** est obtenu en contrôlant l'émission à une longueur d'onde fixe tout en faisant varier la longueur d'onde d'excitation.

Dans un **spectre d'émission** une longueur d'onde d'excitation est cette fois fixe et l'intensité du rayonnement émis est mesurée en fonction de la longueur d'onde : la molécule excitée devient une source polychromatique.



➤ Permet d'obtenir pour une molécule fluorochrome :

$\lambda_{\text{excitation}}$ et **$\lambda_{\text{émission}}$**
(nécessaire pour dosage !)



Pour la fluorescence et la phosphorescence :

$$E_{\text{émise}} < E_{\text{absorbée}}$$

$$\lambda_{\text{émise}} > \lambda_{\text{absorbée}}$$

$\Delta\lambda$, λ_{max} , $\lambda_{0,0}$ changent avec l'environnement moléculaire (polarité, formation de liaisons H, complexation etc ...)

Lors de la phase de désexcitation, l'intensité du rayonnement émis décroît rapidement avec le temps de manière exponentielle selon :

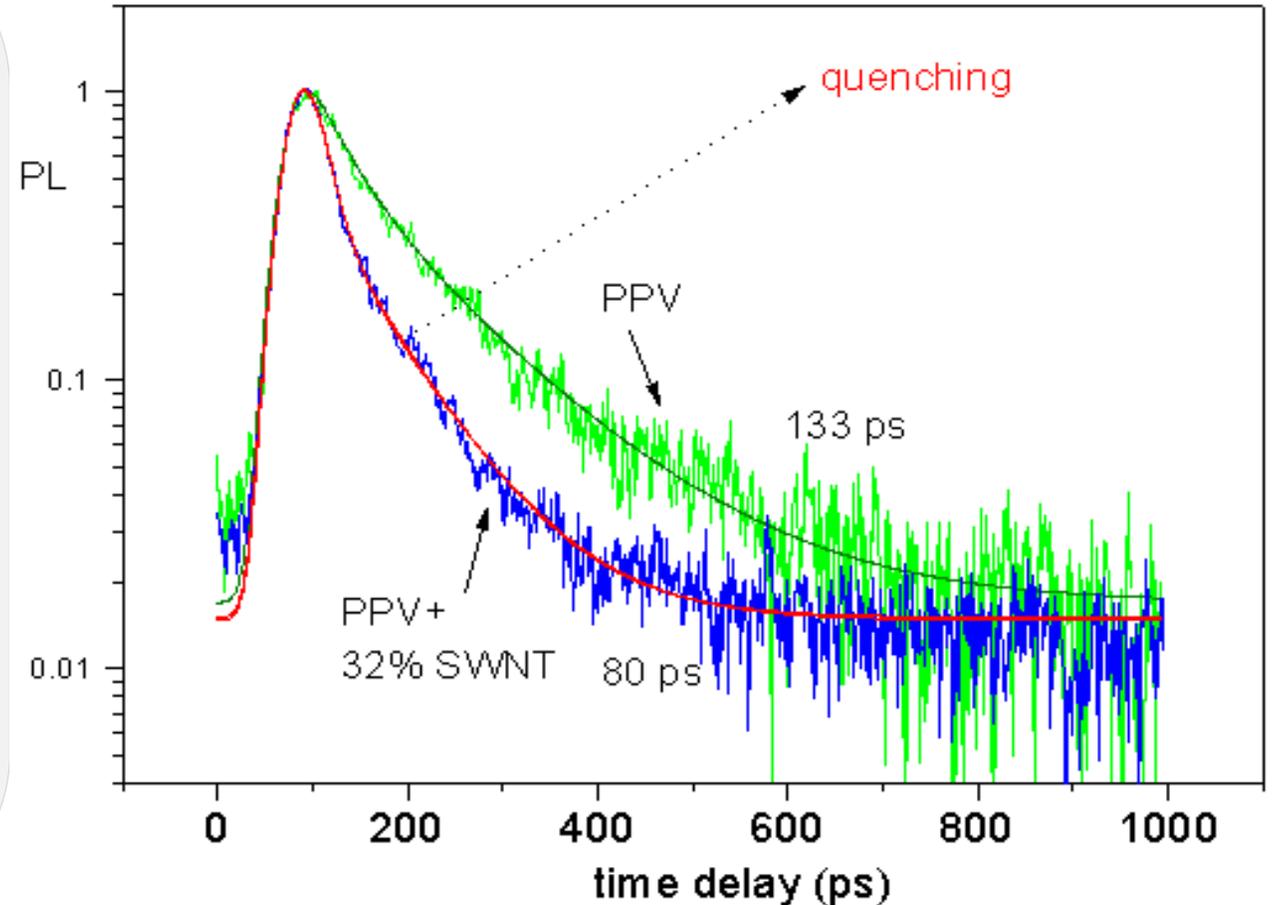
$$I_f(t) = I_f(0) \cdot e^{-kt}$$

$I_f(t)$: Intensité de fluorescence au temps t

$I_f(0)$: Intensité de fluorescence au temps $t = 0$

> Fluorescence : décroissance « instantanée » dès la suppression de l'excitation.

> Phosphorescence : décroissance plus lente.

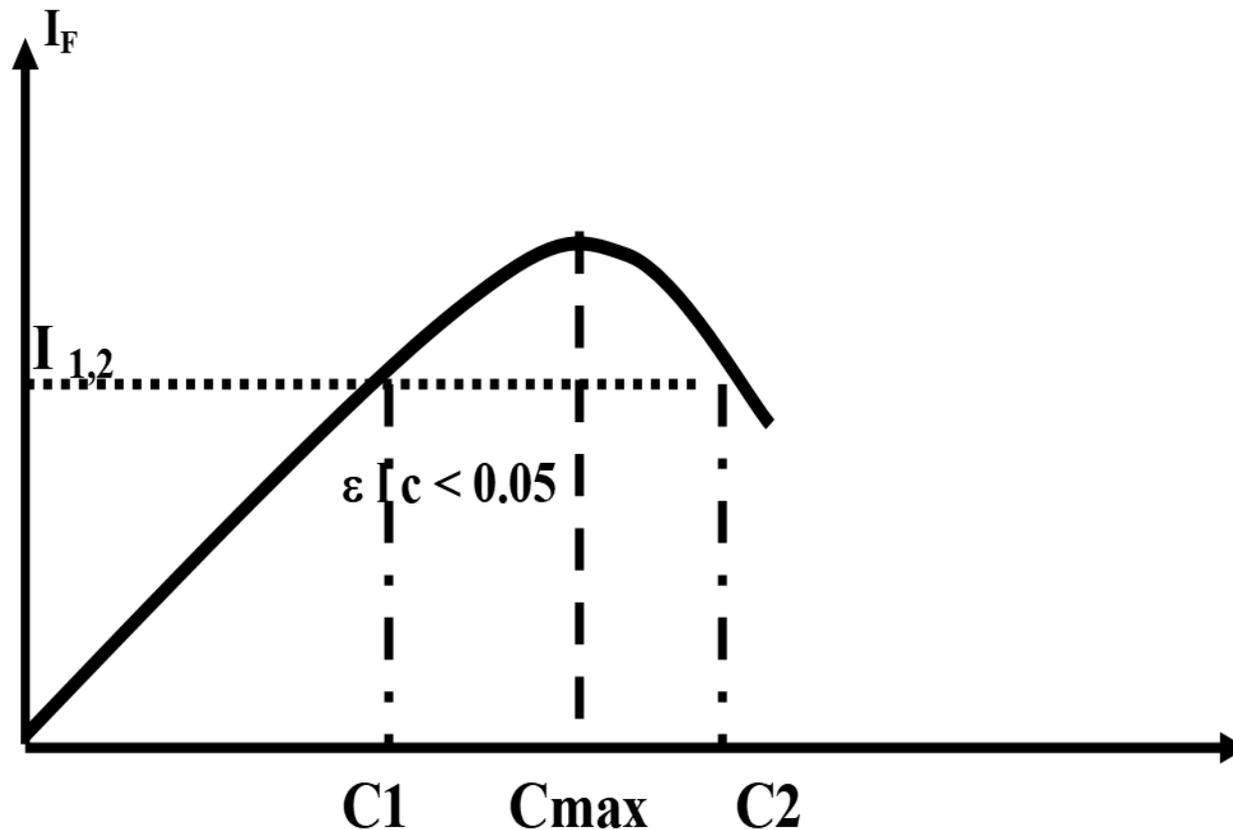


L'efficacité du processus de fluorescence d'une molécule fluorochrome est mesurée par la valeur du **rendement quantique de fluorescence** Q_{fluo} :

$$Q_{\text{fluo}} = \frac{\text{nb photons émis}}{\text{nb photons absorbés}}$$

=> Pour des conditions données (concentration du fluorochrome, solvant, pH, température, force ionique etc. ...), Q_{fluo} est une constante, avec une valeur maximale de 1.

Au préalable : Pour réaliser ces mesures, on doit connaître le couple de longueur d'onde $\lambda_{excitation}$ et $\lambda_{émission}$ (voir 5. Spectre d'excitation et d'émission).



→ L'intensité lumineuse de fluorescence pour une excitation et une émission données est proportionnelle à la concentration $[M]$ du fluorochrome **tant que $[M]$ est faible !**

$$F = k \cdot I_0 \cdot [M]$$

F : fluorescence de la solution

k : une constante

I_0 : l'intensité de la source lumineuse incidente

$[M]$: la concentration de l'espèce fluorescente M

Quenching de fluorescence

Seule une proportion donnée Q_{fluo} de la lumière incidente est réémise par fluorescence, l'énergie de l'état excité pouvant aussi être dissipée :

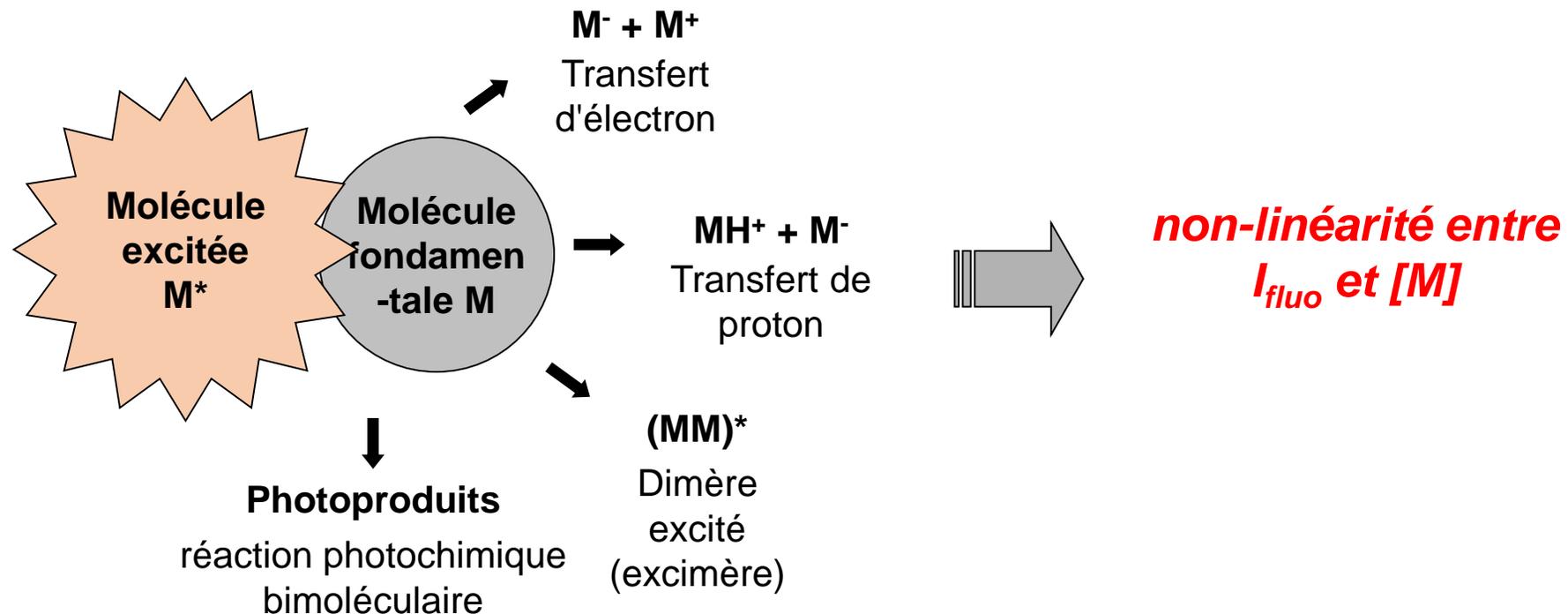
- **Thermiquement** : par chocs moléculaire
- **Par passage vers un autre état excité qui n'émet pas de fluorescence (*croisement intersystème*)**
- **Par "quenching" interne** : dû à des mouvements moléculaires de rotation-vibration de grande amplitude, il s'observe si l'état excité a une configuration moléculaire non rigide ("flexible")
- **Par quenching externe** : l'état excité M^* du fluorochrome réagit chimiquement avec une autre molécule Q dans le milieu. Cette autre molécule peut-être une seconde molécule de fluorochrome M ("*self-quenching*") ou non (par exemple, une impureté) :



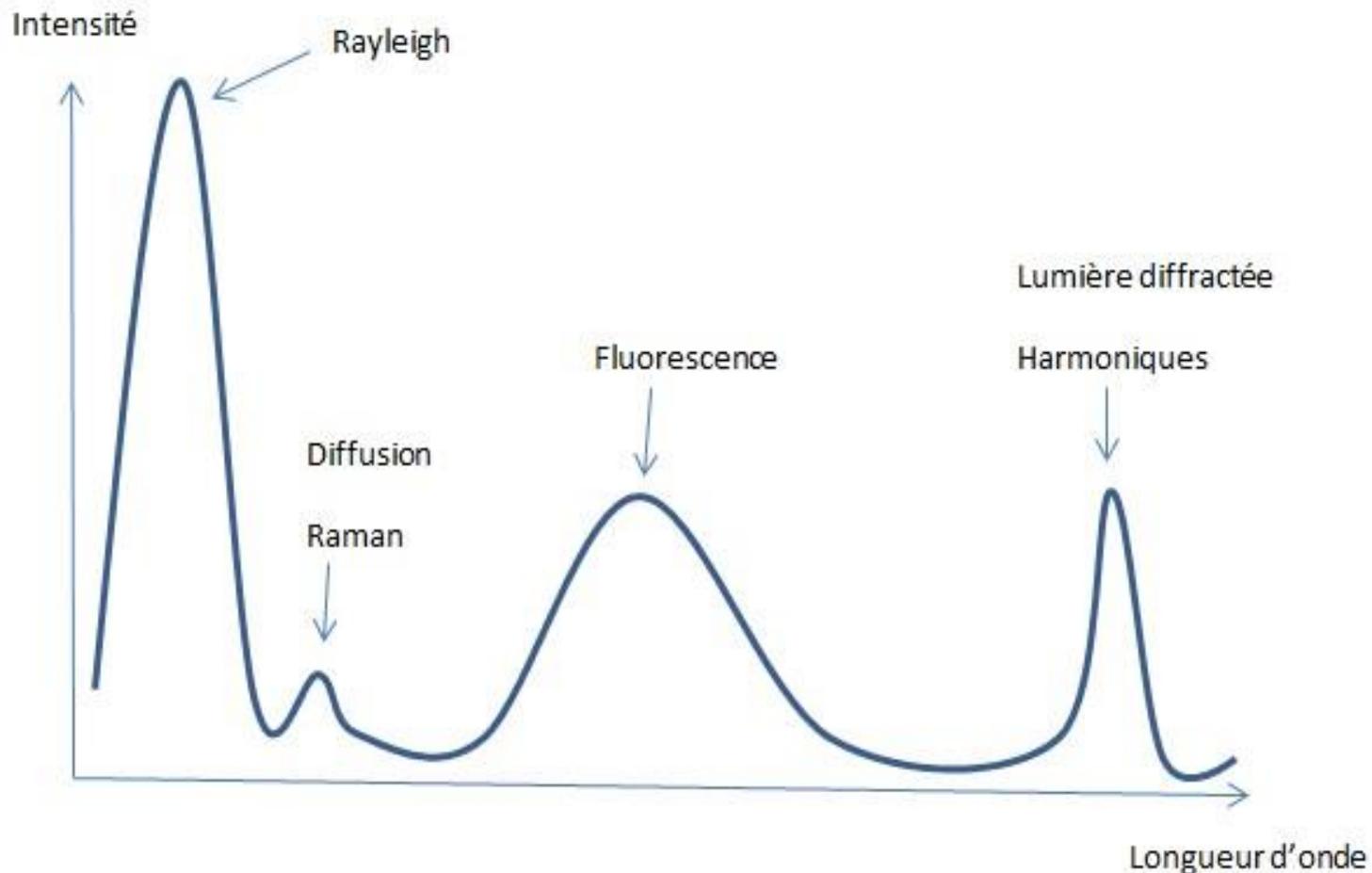
Self-quenching ("auto-inhibition")

Des molécules de fluorochrome M à l'état fondamental peuvent entrer en collision avec les molécules de fluorochrome excitées M^* et les désactiver par de nombreuses voies photophysiques (transfert d'électron, de proton ...) ou photochimiques.

C'est ce que l'on appelle le problème du "self-quenching" et **cet effet peut être évité si l'on travaille à faible concentration de fluorochrome.**



Lors de la mesure de fluorescence, plusieurs phénomènes parasites, principalement dus au solvant, se produisent. On observera plusieurs bandes d'émission en plus de celle liée à la fluorescence.



- **La diffusion Rayleigh :** le solvant réémet une partie de l'intensité incidente à la même longueur d'onde que l'excitation. Ce phénomène de diffusion élastique s'effectue sans perte d'énergie.

- **La diffusion Raman :** il y a excitation des molécules du solvant (énergie de vibration). Le retour à l'état fondamental s'effectue avec émission de photons à de plus grande longueur d'onde. Elle est beaucoup plus faible que la diffusion Rayleigh. Ce phénomène de diffusion inélastique s'effectue avec une perte d'énergie.

- Un pic lié à **la lumière diffractée.**

1– Connaitre le couple de longueur d'onde $\lambda_{\text{excitation}}$ et $\lambda_{\text{émission}}$ pour la molécule à doser.

→ permet de paramétrer le spectrofluorimètre...

(voir 5. Spectre d'excitation et d'émission)

2– Analyser un échantillon à **une faible concentration de molécule à doser [M]**.

→ sinon l'intensité n'est plus proportionnelle à [M], on doit diluer l'échantillon pour la doser ...

(voir 9. Dosage spectrofluorimétrique)

3– Prendre en compte la nature des solvants (environnement de l'échantillon) pour considérer les **phénomènes de quenching**.

→ ex : la fluorescence de la quinine est inhibée par les ions Cl^- , on ne la dose pas dans un milieu HCl ...

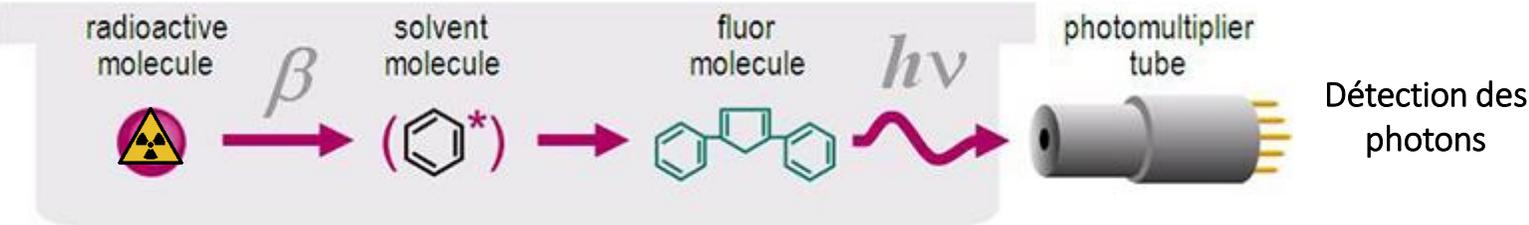
(voir 10. Effets de l'environnement – Quenching)

4– Sur le spectre, discriminer la bande d'émission associée à la fluorescence par rapport aux **bandes parasites** (artefacts).

→ permet d'identifier l'intensité de fluorescence, attention à une potentielle superposition !

(voir 11. Artefacts potentiels)

Principe de la scintillation liquide :

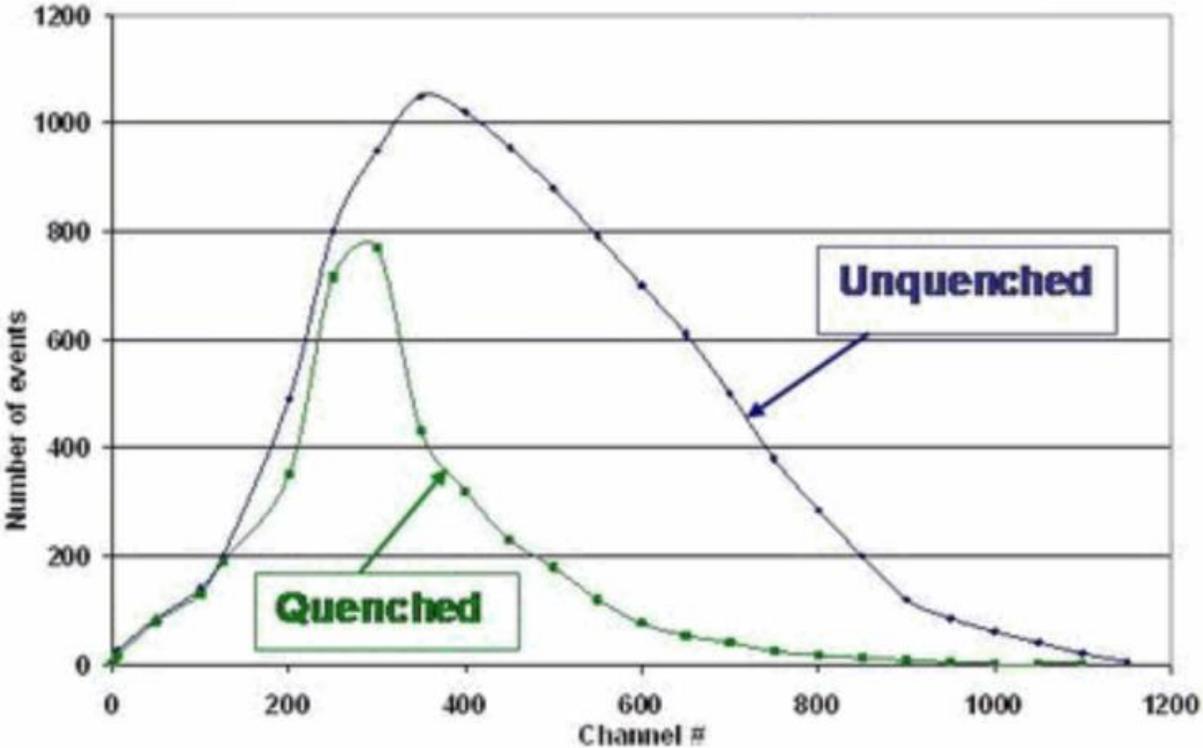


Absorption d'une énergie d'une particule subatomique

Emission d'un photon

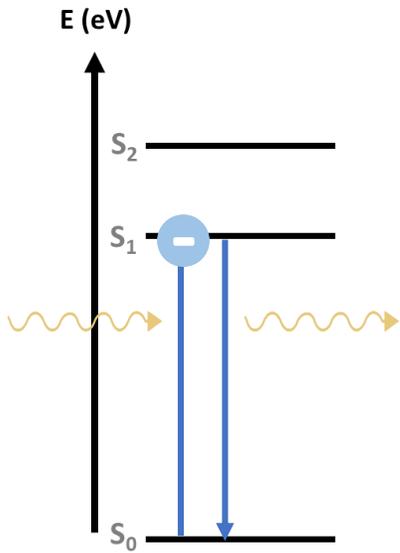


Compteur à scintillation liquide

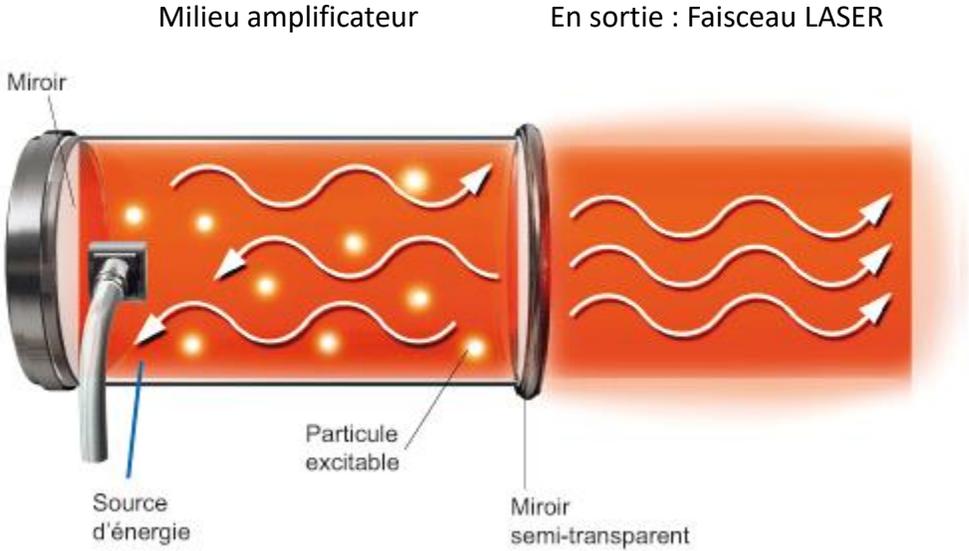
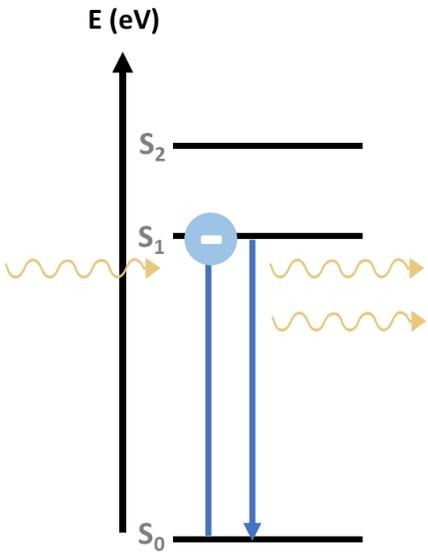


LASER : Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

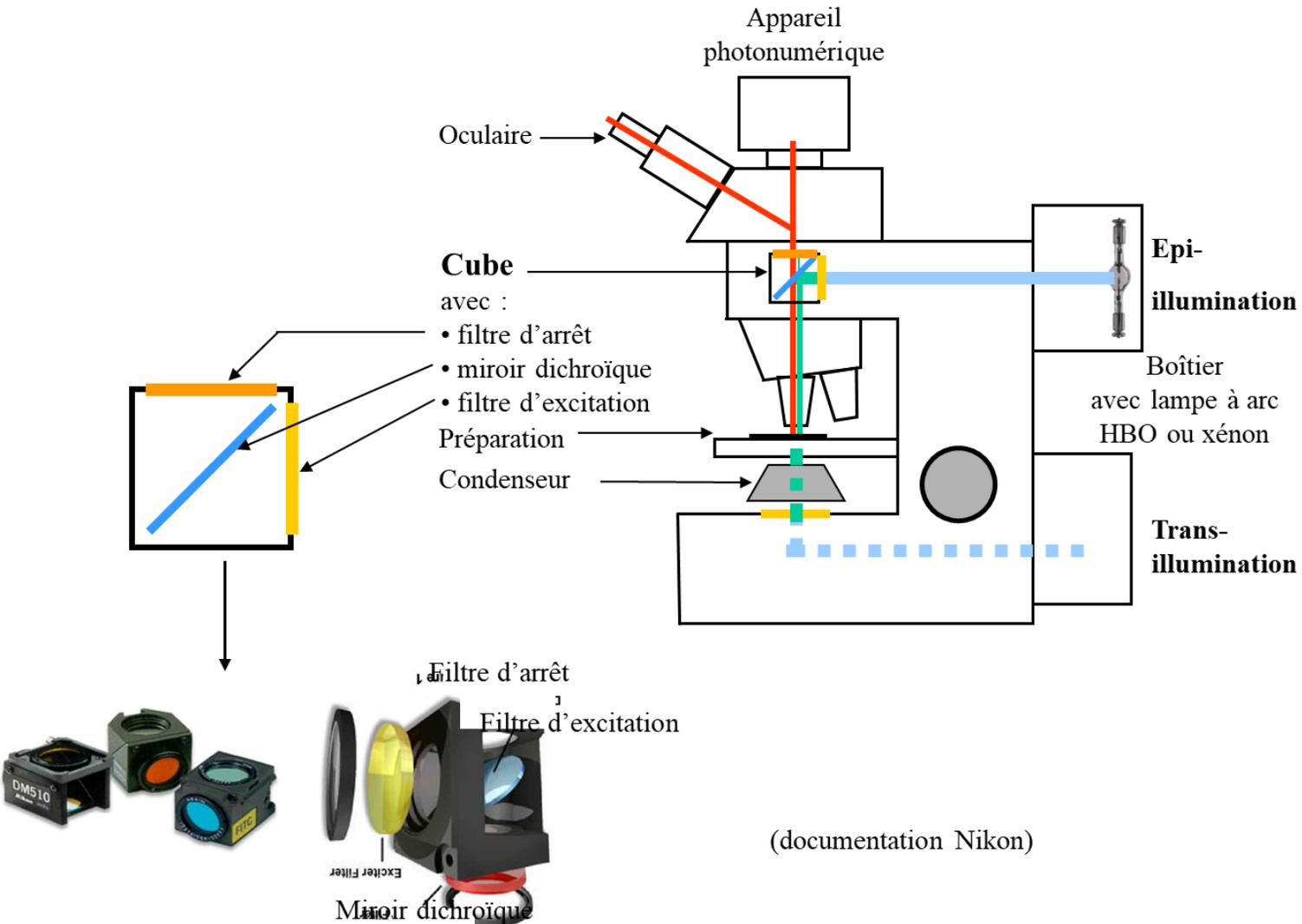
Emission spontanée



Emission stimulée



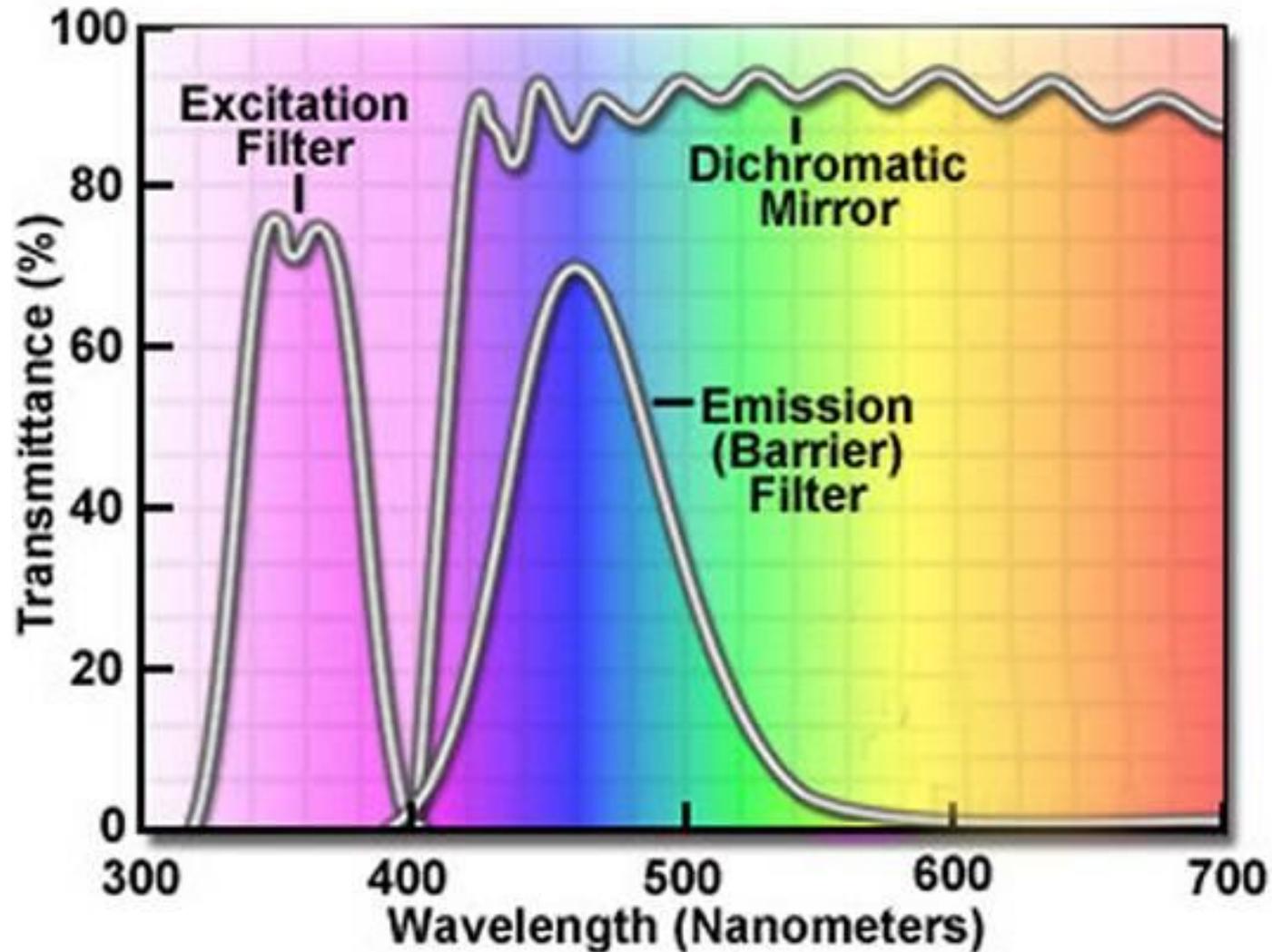
Montage du microscope



(documentation Nikon)

Microscopie de fluorescence en mode réflexion = épi-fluorescence, ou fluorescence épiscopique

L'illuminateur est conçu pour focaliser la lumière d'excitation sur l'échantillon via un premier passage dans l'objectif du microscopique. On récupère alors à 180° la fluorescence, que l'on separe de la lumière excitatrice par un filtre d'arrêt ("barrier filter").

14. Utilisation en microscopie : vers
une imagerie

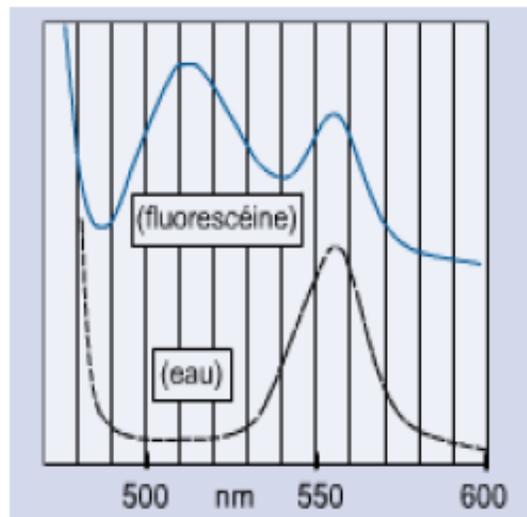
Microscopie de fluorescence en
mode réflexion =
épi-fluorescence,
ou fluorescence épiscopique

L'illuminateur est conçu pour focaliser la lumière d'excitation sur l'échantillon via un premier passage dans l'objectif du microscopique. On récupère alors à 180° la fluorescence, que l'on separe de la lumière excitatrice par un filtre d'arrêt ("barrier filter").

Exercice 1: pic Raman de l'eau

Le test classique pour évaluer la sensibilité d'un fluorimètre consiste à mesurer le rapport signal/bruit du pic de diffusion Raman avec une celle de 1cm de trajet optique remplie d'eau.

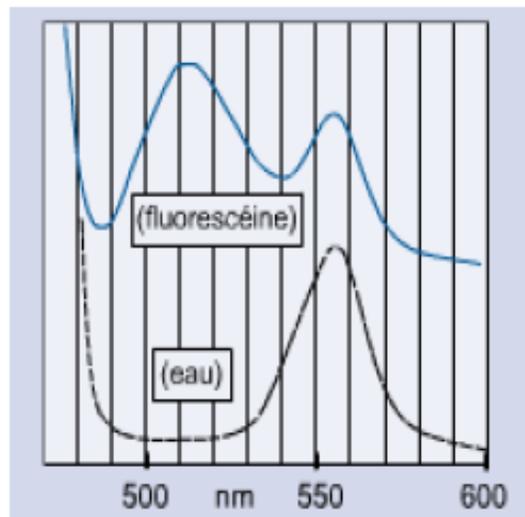
1. La longueur d'onde d'excitation étant réglée à 254nm, à quelle longueur d'onde doit-on effectuer la mesure (le décalage Raman de l'eau est de 3380cm^{-1} , vib d'élongation -OH) ?
2. Le spectre de la figure ci-dessous est celui du pic de fluorescence ($\lambda=512\text{ nm}$) de la fluorescéine 10^{-10} M , ($0,3\ \mu\text{g.L}^{-1}$) excitée par un laser de $\lambda=470\text{ nm}$. Les auteurs de ce travail attribuent le pic situé à $\lambda=554\text{ nm}$ au pic Raman de l'eau. Vérifier.



Exercice 1: pic Raman de l'eau

Le test classique pour évaluer la sensibilité d'un fluorimètre consiste à mesurer le rapport signal/bruit du pic de diffusion Raman avec une celle de 1cm de trajet optique remplie d'eau.

1. La longueur d'onde d'excitation étant réglée à 254nm, à quelle longueur d'onde doit-on effectuer la mesure (le décalage Raman de l'eau est de 3380cm^{-1} , vib d'élongation -OH) ?
2. Le spectre de la figure ci-dessous est celui du pic de fluorescence ($\lambda=512\text{ nm}$) de la fluorescéine 10^{-10} M , ($0,3\ \mu\text{g.L}^{-1}$) excitée par un laser de $\lambda=470\text{ nm}$. Les auteurs de ce travail attribuent le pic situé à $\lambda=554\text{ nm}$ au pic Raman de l'eau. Vérifier.



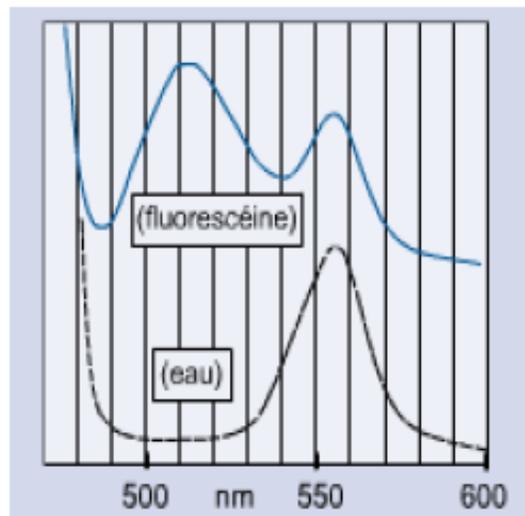
Décalage Raman Stokes : par rapport à l'excitation.

- 1^{ère} étape : mettre en nombre d'onde l'excitation monochromatique
- 2^{ème} étape : calculer le nombre d'onde absolu Raman de l'eau quand excité à 254 nm
- 3^{ème} étape : repositionner en longueur d'onde

Exercice 1: pic Raman de l'eau

Le test classique pour évaluer la sensibilité d'un fluorimètre consiste à mesurer le rapport signal/bruit du pic de diffusion Raman avec une celle de 1cm de trajet optique remplie d'eau.

1. La longueur d'onde d'excitation étant réglée à 254nm, à quelle longueur d'onde doit-on effectuer la mesure (le décalage Raman de l'eau est de 3380cm^{-1} , vib d'élongation -OH) ?
2. Le spectre de la figure ci-dessous est celui du pic de fluorescence ($\lambda=512\text{ nm}$) de la fluorescéine 10^{-10} M , ($0,3\ \mu\text{g.L}^{-1}$) excitée par un laser de $\lambda=470\text{ nm}$. Les auteurs de ce travail attribuent le pic situé à $\lambda=554\text{ nm}$ au pic Raman de l'eau. Vérifier.



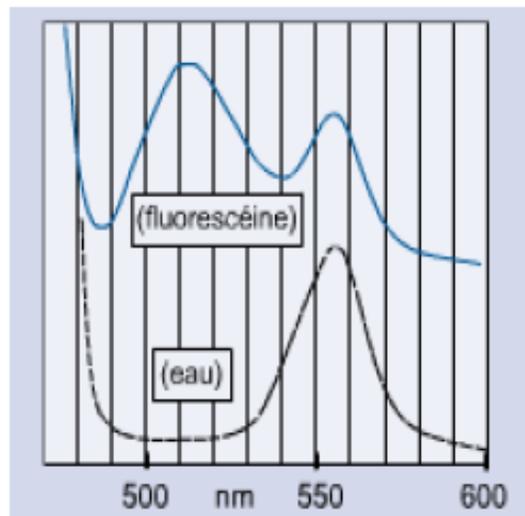
Décalage Raman Stokes : par rapport à l'excitation.

- 1^{ère} étape : mettre en nombre d'onde l'excitation monochromatique : $(1/(254 \cdot 10^{-7}\text{cm}))$
- 2^{ème} étape : calculer le nombre d'onde absolu Raman de l'eau quand excité à 254 nm
- 3^{ème} étape : repositionner en longueur d'onde

Exercice 1: pic Raman de l'eau

Le test classique pour évaluer la sensibilité d'un fluorimètre consiste à mesurer le rapport signal/bruit du pic de diffusion Raman avec une celle de 1cm de trajet optique remplie d'eau.

1. La longueur d'onde d'excitation étant réglée à 254nm, à quelle longueur d'onde doit-on effectuer la mesure (le décalage Raman de l'eau est de 3380cm^{-1} , vib d'élongation -OH) ?
2. Le spectre de la figure ci-dessous est celui du pic de fluorescence ($\lambda=512\text{ nm}$) de la fluorescéine 10^{-10} M , ($0,3\ \mu\text{g.L}^{-1}$) excitée par un laser de $\lambda=470\text{ nm}$. Les auteurs de ce travail attribuent le pic situé à $\lambda=554\text{ nm}$ au pic Raman de l'eau. Vérifier.



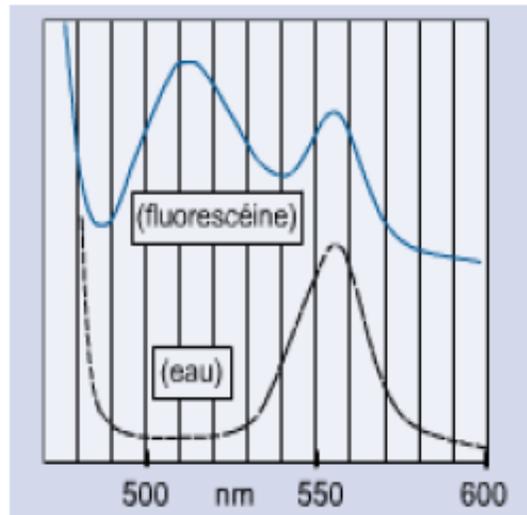
Décalage Raman Stokes : par rapport à l'excitation.

- 1^{ère} étape : mettre en nombre d'onde l'excitation monochromatique : **39370 cm^{-1}** ,
- 2^{ème} étape : calculer le nombre d'onde absolu Raman de l'eau quand excité à 254 nm
- 3^{ème} étape : repositionner en longueur d'onde

Exercice 1: pic Raman de l'eau

Le test classique pour évaluer la sensibilité d'un fluorimètre consiste à mesurer le rapport signal/bruit du pic de diffusion Raman avec une cellule de 1cm de trajet optique remplie d'eau.

1. La longueur d'onde d'excitation étant réglée à 254nm, à quelle longueur d'onde doit-on effectuer la mesure (le décalage Raman de l'eau est de 3380cm^{-1} , vib d'élongation -OH) ?
2. Le spectre de la figure ci-dessous est celui du pic de fluorescence ($\lambda=512\text{ nm}$) de la fluorescéine 10^{-10} M , ($0,3\ \mu\text{g.L}^{-1}$) excitée par un laser de $\lambda=470\text{ nm}$. Les auteurs de ce travail attribuent le pic situé à $\lambda=554\text{ nm}$ au pic Raman de l'eau. Vérifier.



Décalage Raman Stokes : par rapport à l'excitation.

- 1^{ère} étape : mettre en nombre d'onde l'excitation monochromatique : **39370 cm^{-1}** ,

- 2^{ème} étape : calculer le nombre d'onde absolu Raman de l'eau quand excité à 254 nm :

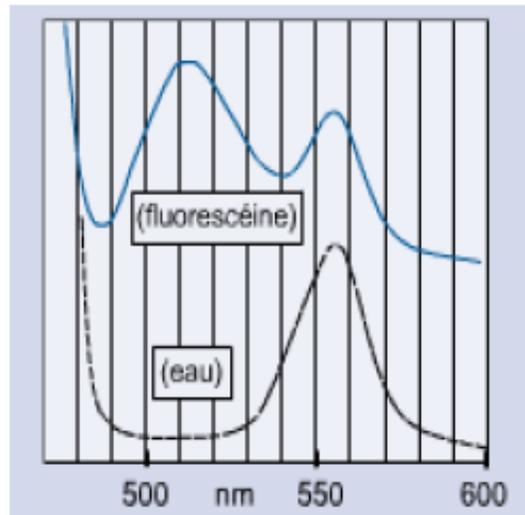
$$(39370 - 3380)\text{ cm}^{-1} = 35\ 990\text{ cm}^{-1}$$

- 3^{ème} étape : repositionner en longueur d'onde

Exercice 1: pic Raman de l'eau

Le test classique pour évaluer la sensibilité d'un fluorimètre consiste à mesurer le rapport signal/bruit du pic de diffusion Raman avec une celle de 1cm de trajet optique remplie d'eau.

1. La longueur d'onde d'excitation étant réglée à 254nm, à quelle longueur d'onde doit-on effectuer la mesure (le décalage Raman de l'eau est de 3380cm^{-1} , vib d'élongation -OH) ?
2. Le spectre de la figure ci-dessous est celui du pic de fluorescence ($\lambda=512\text{ nm}$) de la fluorescéine 10^{-10} M , ($0,3\ \mu\text{g.L}^{-1}$) excitée par un laser de $\lambda=470\text{ nm}$. Les auteurs de ce travail attribuent le pic situé à $\lambda=554\text{ nm}$ au pic Raman de l'eau. Vérifier.



Décalage Raman Stokes : par rapport à l'excitation.

- 1^{ère} étape : mettre en nombre d'onde l'excitation monochromatique : 39370 cm^{-1} ,

- 2^{ème} étape : calculer le nombre d'onde absolu Raman de l'eau quand excité à 254 nm :

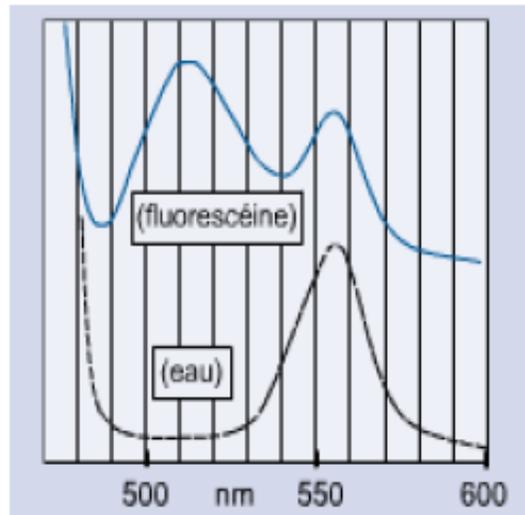
$$(39370 - 3380)\text{ cm}^{-1} = 35\ 990\text{ cm}^{-1}$$

- 3^{ème} étape : repositionner en longueur d'onde : $(1/35\ 990) \cdot 10^{-2}\text{ m} = 277,86\text{ nm}$

Exercice 1: pic Raman de l'eau

Le test classique pour évaluer la sensibilité d'un fluorimètre consiste à mesurer le rapport signal/bruit du pic de diffusion Raman avec une celle de 1cm de trajet optique remplie d'eau.

1. La longueur d'onde d'excitation étant réglée à 254nm, à quelle longueur d'onde doit-on effectuer la mesure (le décalage Raman de l'eau est de 3380cm^{-1} , vib d'élongation -OH) ?
2. Le spectre de la figure ci-dessous est celui du pic de fluorescence ($\lambda=512\text{ nm}$) de la fluorescéine 10^{-10} M , ($0,3\ \mu\text{g.L}^{-1}$) excitée par un laser de $\lambda=470\text{ nm}$. Les auteurs de ce travail attribuent le pic situé à $\lambda=554\text{ nm}$ au pic Raman de l'eau. Vérifier.



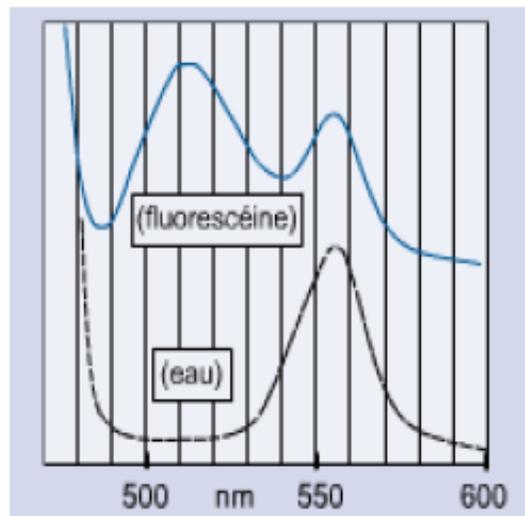
1- A 254 nm soit 39370 cm^{-1} , le nombre d'onde absolu Raman de l'eau est à $(39370 - 3380)\text{ cm}^{-1} = 35990\text{ cm}^{-1}$, soit **277,9 nm**.

2- Fluorescence maximale à 512 nm de la fluorescéine, excité à 470 nm , et pic à 554 nm attribué à l'eau : ??

Exercice 1: pic Raman de l'eau

Le test classique pour évaluer la sensibilité d'un fluorimètre consiste à mesurer le rapport signal/bruit du pic de diffusion Raman avec une celle de 1cm de trajet optique remplie d'eau.

1. La longueur d'onde d'excitation étant réglée à 254nm, à quelle longueur d'onde doit-on effectuer la mesure (le décalage Raman de l'eau est de 3380cm^{-1} , vib d'élongation -OH) ?
2. Le spectre de la figure ci-dessous est celui du pic de fluorescence ($\lambda=512\text{ nm}$) de la fluorescéine 10^{-10} M , ($0,3\ \mu\text{g.L}^{-1}$) excitée par un laser de $\lambda=470\text{ nm}$. Les auteurs de ce travail attribuent le pic situé à $\lambda=554\text{ nm}$ au pic Raman de l'eau. Vérifier.



1- A 254 nm soit 39370 cm^{-1} , le nombre d'onde absolu Raman de l'eau est à $(39370 - 3380)\text{ cm}^{-1} = 35990\text{ cm}^{-1}$, soit $277,9\text{ nm}$.

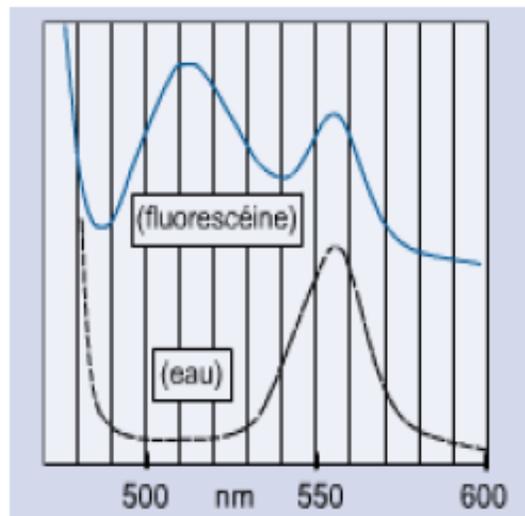
2- Fluorescence maximale à 512 nm de la fluorescéine, excité à 470 nm , et pic à 554 nm attribué à l'eau :

- 1^{ère} étape : estimer avec une excitation à 470 nm , à quelle λ sort le Raman Stokes de l'eau comme en (1)

Exercice 1: pic Raman de l'eau

Le test classique pour évaluer la sensibilité d'un fluorimètre consiste à mesurer le rapport signal/bruit du pic de diffusion Raman avec une celle de 1cm de trajet optique remplie d'eau.

1. La longueur d'onde d'excitation étant réglée à 254nm, à quelle longueur d'onde doit-on effectuer la mesure (le décalage Raman de l'eau est de 3380cm^{-1} , vib d'élongation -OH) ?
2. Le spectre de la figure ci-dessous est celui du pic de fluorescence ($\lambda=512\text{ nm}$) de la fluorescéine 10^{-10} M , ($0,3\ \mu\text{g.L}^{-1}$) excitée par un laser de $\lambda=470\text{ nm}$. Les auteurs de ce travail attribuent le pic situé à $\lambda=554\text{ nm}$ au pic Raman de l'eau. Vérifier.



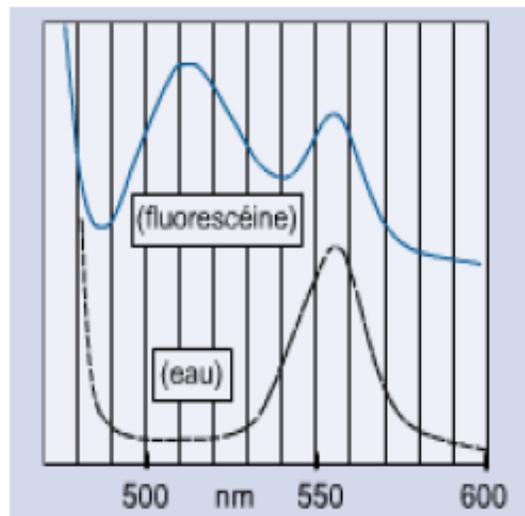
1- A 254 nm soit 39370 cm^{-1} , le nombre d'onde absolu Raman de l'eau est à $(39370 - 3380)\text{ cm}^{-1} = 35990\text{ cm}^{-1}$, soit $277,9\text{ nm}$.

2- Fluorescence maximale à 512 nm de la fluorescéine, excité à 470 nm , et pic à 554 nm attribué à l'eau :
 - 1^{ère} étape : estimer avec une excitation à 470 nm , à quelle λ sort le Raman Stokes de l'eau comme en (1): $21276 - 3380 = 17896\text{ cm}^{-1}$, soit 558 nm

Exercice 1: pic Raman de l'eau

Le test classique pour évaluer la sensibilité d'un fluorimètre consiste à mesurer le rapport signal/bruit du pic de diffusion Raman avec une celle de 1cm de trajet optique remplie d'eau.

1. La longueur d'onde d'excitation étant réglée à 254nm, à quelle longueur d'onde doit-on effectuer la mesure (le décalage Raman de l'eau est de 3380cm^{-1} , vib d'élongation -OH) ?
2. Le spectre de la figure ci-dessous est celui du pic de fluorescence ($\lambda=512\text{ nm}$) de la fluorescéine 10^{-10} M , ($0,3\ \mu\text{g.L}^{-1}$) excitée par un laser de $\lambda=470\text{ nm}$. Les auteurs de ce travail attribuent le pic situé à $\lambda=554\text{ nm}$ au pic Raman de l'eau. Vérifier.



1- A 254 nm soit 39370 cm^{-1} , le nombre d'onde absolu Raman de l'eau est à $(39370 - 3380)\text{ cm}^{-1} = 35990\text{ cm}^{-1}$, soit $277,9\text{ nm}$.

2- Fluorescence maximale à 512 nm de la fluorescéine, excité à 470 nm , et pic à 554 nm attribué à l'eau :

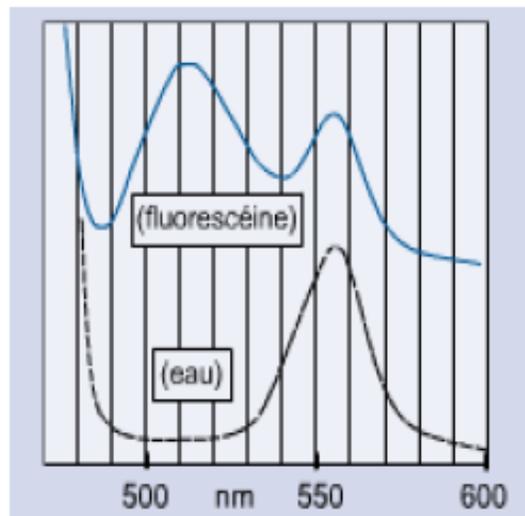
- 1^{ère} étape : estimer avec une excitation à 470 nm , à quelle λ sort le Raman Stokes de l'eau comme en (1): $21276 - 3380 = 17896\text{ cm}^{-1}$, soit **558 nm**

- sur le spectre d'eau seule : en accord avec maxi à 557 nm

Exercice 1: pic Raman de l'eau

Le test classique pour évaluer la sensibilité d'un fluorimètre consiste à mesurer le rapport signal/bruit du pic de diffusion Raman avec une celle de 1cm de trajet optique remplie d'eau.

1. La longueur d'onde d'excitation étant réglée à 254nm, à quelle longueur d'onde doit-on effectuer la mesure (le décalage Raman de l'eau est de 3380cm^{-1} , vib d'élongation -OH) ?
2. Le spectre de la figure ci-dessous est celui du pic de fluorescence ($\lambda=512\text{ nm}$) de la fluorescéine 10^{-10} M , ($0,3\ \mu\text{g.L}^{-1}$) excitée par un laser de $\lambda=470\text{ nm}$. Les auteurs de ce travail attribuent le pic situé à $\lambda=554\text{ nm}$ au pic Raman de l'eau. Vérifier.



1- A 254 nm soit 39370 cm^{-1} , le nombre d'onde absolu Raman de l'eau est à $(39370 - 3380)\text{ cm}^{-1} = 35990\text{ cm}^{-1}$, soit $277,9\text{ nm}$.

2- Fluorescence maximale à 512 nm de la fluorescéine, excité à 470 nm , et pic à 554 nm attribué à l'eau :

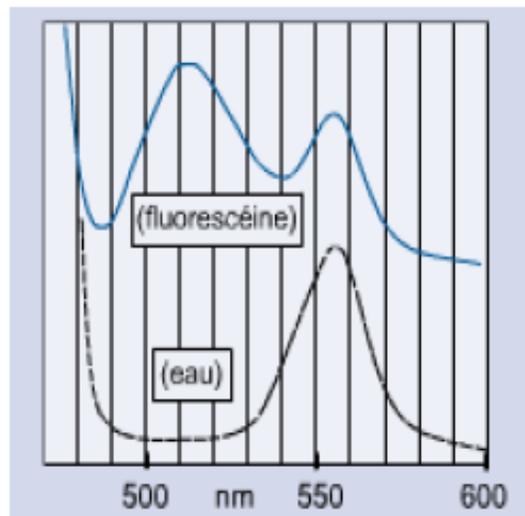
- 1^{ère} étape : estimer avec une excitation à 470 nm , à quelle λ sort le Raman Stokes de l'eau comme en (1): $21276 - 3380 = 17896\text{ cm}^{-1}$, soit 558 nm

- sur le spectre d'eau seule : en accord avec maxi à 557 nm , en présence de la forte fluorescence de la fluorescéine à 512 , le maxi de l'eau semble glisser vers 554 .

Exercice 1: pic Raman de l'eau

Le test classique pour évaluer la sensibilité d'un fluorimètre consiste à mesurer le rapport signal/bruit du pic de diffusion Raman avec une celle de 1cm de trajet optique remplie d'eau.

1. La longueur d'onde d'excitation étant réglée à 254nm, à quelle longueur d'onde doit-on effectuer la mesure (le décalage Raman de l'eau est de 3380cm^{-1} , vib d'élongation -OH) ?
2. Le spectre de la figure ci-dessous est celui du pic de fluorescence ($\lambda=512\text{ nm}$) de la fluorescéine 10^{-10} M , ($0,3\ \mu\text{g.L}^{-1}$) excitée par un laser de $\lambda=470\text{ nm}$. Les auteurs de ce travail attribuent le pic situé à $\lambda=554\text{ nm}$ au pic Raman de l'eau. Vérifier.

**3. Question supplémentaire :**

Que se passe-t-il si l'on « basifie » la solution pour avoir un pH plus haut que 4?

Pourquoi faut-il éviter une excitation à 437-440 nm pour observer la fluorescence de la fluorescéine?

1- A 254 nm soit 39370 cm^{-1} , le nombre d'onde absolu Raman de l'eau est à $(39370 - 3380)\text{ cm}^{-1} = 35990\text{ cm}^{-1}$, soit $277,9\text{ nm}$.

2- Fluorescence maximale à 512 nm de la fluorescéine, excité à 470 nm , et pic à 554 nm attribué à l'eau :

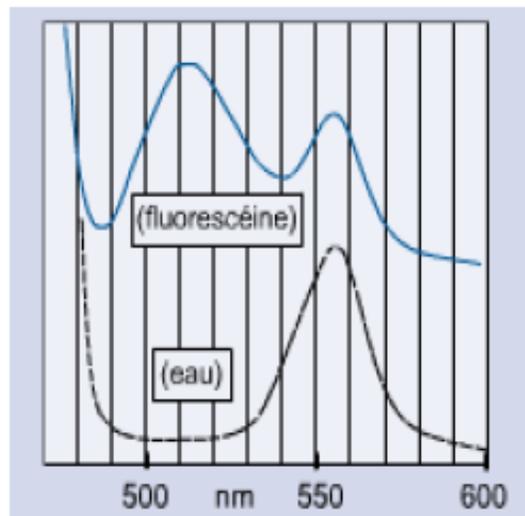
- 1^{ère} étape : estimer avec une excitation à 470 nm , à quelle λ sort le Raman Stokes de l'eau comme en (1): $21276 - 3380 = 17896\text{ cm}^{-1}$, soit 558 nm

- sur le spectre d'eau seule : en accord avec maxi à 557 nm , en présence de la forte fluorescence de la fluorescéine à 512 , le maxi de l'eau semble glisser vers 554 .

Exercice 1: pic Raman de l'eau

Le test classique pour évaluer la sensibilité d'un fluorimètre consiste à mesurer le rapport signal/bruit du pic de diffusion Raman avec une celle de 1cm de trajet optique remplie d'eau.

1. La longueur d'onde d'excitation étant réglée à 254nm, à quelle longueur d'onde doit-on effectuer la mesure (le décalage Raman de l'eau est de 3380cm^{-1} , vib d'élongation -OH) ?
2. Le spectre de la figure ci-dessous est celui du pic de fluorescence ($\lambda=512\text{ nm}$) de la fluorescéine 10^{-10} M , ($0,3\ \mu\text{g.L}^{-1}$) excitée par un laser de $\lambda=470\text{ nm}$. Les auteurs de ce travail attribuent le pic situé à $\lambda=554\text{ nm}$ au pic Raman de l'eau. Vérifier.

**3. Question supplémentaire :**

Que se passe-t-il si l'on « basifie » la solution pour avoir un pH plus haut que 4?

Pourquoi faut-il éviter une excitation à 437-440 nm pour observer la fluorescence de la fluorescéine?

1- A 254 nm soit 39370 cm^{-1} , le nombre d'onde absolu Raman de l'eau est à $(39370 - 3380)\text{ cm}^{-1} = 35990\text{ cm}^{-1}$, soit $277,9\text{ nm}$.

2- Fluorescence maximale à 512 nm de la fluorescéine, excité à 470 nm , et pic à 554 nm attribué à l'eau :

- 1^{ère} étape : estimer avec une excitation à 470 nm , à quelle λ sort le Raman Stokes de l'eau comme en (1): $21276 - 3380 = 17896\text{ cm}^{-1}$, soit 558 nm

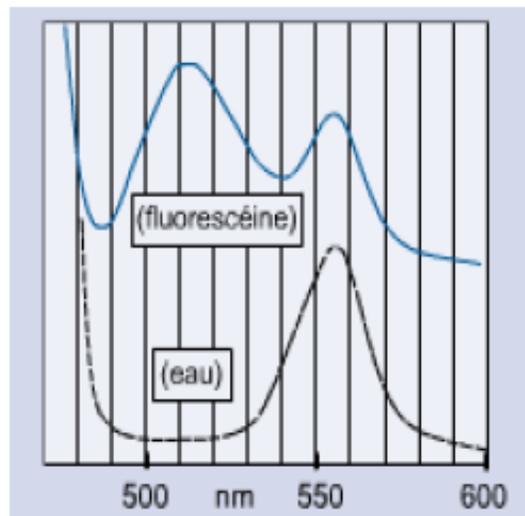
- sur le spectre d'eau seule : en accord avec maxi à 557 nm , en présence de la forte fluorescence de la fluorescéine à 512 , le maxi de l'eau semble glisser vers 554 .

3- La molécule perd un proton : fluorescence change!

Exercice 1: pic Raman de l'eau

Le test classique pour évaluer la sensibilité d'un fluorimètre consiste à mesurer le rapport signal/bruit du pic de diffusion Raman avec une celle de 1cm de trajet optique remplie d'eau.

1. La longueur d'onde d'excitation étant réglée à 254nm, à quelle longueur d'onde doit-on effectuer la mesure (le décalage Raman de l'eau est de 3380cm^{-1} , vib d'élongation -OH) ?
2. Le spectre de la figure ci-dessous est celui du pic de fluorescence ($\lambda=512\text{ nm}$) de la fluorescéine 10^{-10} M , ($0,3\ \mu\text{g.L}^{-1}$) excitée par un laser de $\lambda=470\text{ nm}$. Les auteurs de ce travail attribuent le pic situé à $\lambda=554\text{ nm}$ au pic Raman de l'eau. Vérifier.

**3. Question supplémentaire :**

Que se passe-t-il si l'on « basifie » la solution pour avoir un pH plus haut que 4?

Pourquoi faut-il éviter une excitation à 437-440 nm pour observer la fluorescence de la fluorescéine?

1- A 254 nm soit 39370 cm^{-1} , le nombre d'onde absolu Raman de l'eau est à $(39370 - 3380)\text{ cm}^{-1} = 35990\text{ cm}^{-1}$, soit $277,9\text{ nm}$.

2- Fluorescence maximale à 512 nm de la fluorescéine, excité à 470 nm , et pic à 554 nm attribué à l'eau :

- 1^{ère} étape : estimer avec une excitation à 470 nm , à quelle λ sort le Raman Stokes de l'eau comme en (1): $21276 - 3380 = 17896\text{ cm}^{-1}$, soit 558 nm

- sur le spectre d'eau seule : en accord avec maxi à 557 nm , en présence de la forte fluorescence de la fluorescéine à 512 , le maxi de l'eau semble glisser vers 554 .

3- La molécule perd un proton : fluorescence change!

Si excitation à 437 : superposition du Raman de l'eau et de la fluorescence! Problème