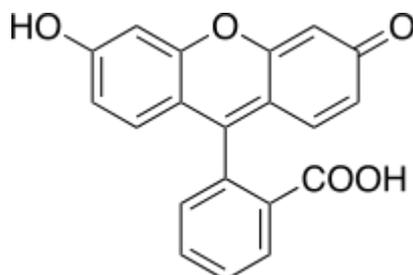


## TP 4 - Spectroscopie de Fluorescence

### Etude de la Fluorescéine

La fluorescéine est une substance dérivée du Xanthène, acide, de couleur rougeâtre vue en transparence, verte-fluo vue par réflexion de la lumière du jour, et qui émet une lumière réfléchie de fluorescence lorsqu'elle est excitée sous les ultraviolets.

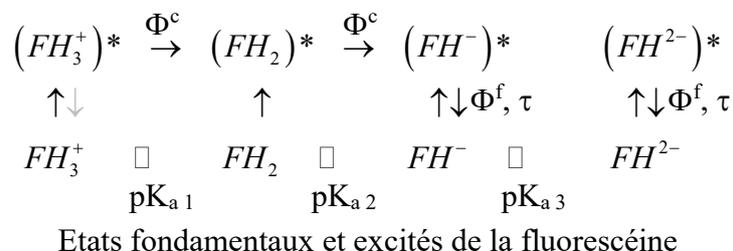


M = 332,3 g/mole

De part ses propriétés fluorescentes, elle est utilisée pour tracer les cours d'eaux souterrains, les réseaux d'eaux usées, suivre le cheminement d'évacuation d'eaux d'usines géothermiques, détecter des fuites sur les circuits hydrauliques, etc. Elle est aussi beaucoup utilisée dans le domaine médical comme marqueur extrinsèque (angiographies) ou dans certains médicaments (éosine).

Selon le pH du milieu d'utilisation de la fluorescéine, celle-ci peut être présente sous différentes formes (neutre FH<sub>2</sub>, anionique FH<sup>-</sup> et F<sup>2-</sup>, cationique FH<sub>3</sub><sup>+</sup>) chacune ayant ses propres caractéristiques physicochimiques (*R. Sjöback, J. Nygren & M. Kubista, Spectrochimica Acta, part A, 51, (1995), L7-L21*).

<b>pK<sub>a</sub> 1</b>		<b>pK<sub>a</sub> 2</b>		<b>pK<sub>a</sub> 3</b>			
2,08 en l'absence de NaCl 2,14 en présence de NaCl 1M		4,31 en l'absence de NaCl 4,20 en présence de NaCl 1M		6,43 en l'absence de NaCl 6,0 en présence de NaCl 1M			
<b>Absorption :</b>							
$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\epsilon$ (L/mole/cm)	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\epsilon$ (L/mole/cm)	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\epsilon$ (L/mole/cm)	$\lambda_{\text{abs}}$ (nm)	$\epsilon$ (L/mole/cm)
437	53000	475	3600	472	29000	490	76900
297	7100	434	11000	453	29000	322	9500
250	33000			310	700	283	14000
				273	17000	239	43000
<b>Fluorescence :</b>							
$\Phi^f \approx 0$ à pH > 1,5		$\Phi^f \approx 0$		$\Phi^f = 0,37$ $\tau = 3,0$ ns		$\Phi^f = 0,93$ $\tau = 4,1$ ns	
$\Phi^c = 0,6$		$\Phi^c = 0,8$					



## I/ Caractéristiques spectrales de la fluorescéine

Préparer une **solution A** : 30 mg de fluorescéine dans 100 mL tampon pH 7

*composition pour 200 mL de solution tampon pH 7 :*

*122 mL d'hydrogénophosphate disodique (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) M /15  
78 mL de dihydrogénophosphate de potassium (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) M /15*

puis les solutions suivantes :

**solution B** :  $V_A = 5$  mL  
tampon pH 7 : QSP 50mL

**solution C** :  $V_A = 5$  mL  
eau distillée : QSP 50mL

Mesurer leur pH. Conclusion.

Enregistrer le spectre d'absorption des solutions B et C entre 190 et 550 nm, ainsi que celui de la quinine (solution A\* TP Kardégic®), dans une cuve de 1mm. Déterminer les caractéristiques ( $\lambda_{max}$ ,  $\epsilon$ ) des bandes observées.

Enregistrer les spectres d'émission ( $\lambda_{exc} = \lambda_{max}$ ) entre  $\lambda_{max}$  et 650 nm. Pointer les maximums d'émission et intégrer les bandes observées.

Mesurer les indices de réfraction.

En déduire les déplacements de Stokes et rendements quantiques de fluorescence (voir TP Kardégic®).  
Conclusion.

## II/ Etude de différents paramètres influant sur la fluorescence des composés

### 1/ Influence du pH

Préparer les solutions ci-dessous et enregistrer leur spectre de fluorescence entre 490 et 650 nm, dans une cuve de 1cm, pour une longueur d'onde d'excitation égale au  $\lambda_{max}$  déterminé précédemment pour la bande d'absorption la plus intense. Mesurer le pH de chaque solution, les longueurs d'onde d'émission et les intensités de fluorescence.

fiolle N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10*
$V_C$	10 $\mu$ L									$V_B = 10 \mu$ L
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 mole/L ( $\mu$ L)	100	50	10	0	0	0	0	0	0	0
NaOH 0,1 mole/L ( $\mu$ L)	0	0	0	0	10	50	100	150	200	0
eau distillée	QSP 50 mL									tampon pH 7

\* Economisez la solution 10, elle sert dans plusieurs points à suivre.

Interpréter ce que vous observez et déterminer le déplacement de Stokes de la fluorescéine en solution dans de l'eau distillée et dans un tampon pH 7.

## 2/ Influence de la longueur d'onde d'excitation

Sur la solution 10, enregistrer les spectres d'émission entre 490 et 650 nm pour des longueurs d'onde d'excitation allant de 410 à 510 nm par pas de 10 nm. Mesurez les intensités de fluorescence au maximum d'émission. Interpréter ce que vous observez.

## 3/ Influence de la température

Sur la solution 10, enregistrer les spectres d'émission entre 490 et 650 nm pour une longueur d'onde d'excitation égale au  $\lambda_{\max}$  à température ambiante, après avoir refroidi la fiole dans un bain de glace, après avoir chauffé la fiole au bain marie.

## 4/ Effet du dégazage de la solution

Laisser la solution précédente revenir à température ambiante puis la passer sur le spectromètre avant et après barbotage d'azote de la solution. Interprétation.

## 5/ Influence de la concentration en fluorescéine

Préparer les solutions ci-dessous et enregistrer leur spectre de fluorescence pour mesurer leur intensité de fluorescence au maximum d'émission.

fiole N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
V <sub>B</sub> (μL)	2	4	6	8	10	12	15	20	25
tampon pH 7	QSP 100 mL								

Interpréter ce que vous observez.

## 6/ Influence de la force ionique de la solution

Une solution idéale est une solution où les interactions entre toute paire de particules (molécules ou ions) sont identiques, de la même façon que l'on définit un gaz parfait comme un gaz dans lequel il n'existe pas d'interactions entre molécules. Les électrolytes réels ne suivent qu'imparfaitement les relations établies pour les solutions idéales et ce d'autant moins que les concentrations sont élevées. Cet écart à l'idéalité est lié aux interactions d'origine électrique entre les ions. Ainsi est-on amené à introduire des coefficients d'activité qui corrigent les concentrations (coefficient d'activité < 1 ; égal à 1 si la solution est idéale).

Ces coefficients d'activités sont liés à la force ionique de la solution, notée  $I$  et exprimée en mole/L, qui dépend des charges  $z_i$  et des concentrations molaires  $C_i$  des ions présents :

$$I = \frac{1}{2} \sum_i C_i z_i^2$$

### Manipulation :

Préparer les solutions ci-dessous et enregistrer leur spectre de fluorescence pour mesurer leur intensité de fluorescence au maximum d'émission. Etudier leur évolution en fonction de I et de  $\sqrt{I}$ .

fiolle N°	1	2	3	4	5	6	7	8
V <sub>B</sub>	10 µL							
V <sub>KNO<sub>3</sub></sub> 0,1M (µL)	0	5	10	15	20	25	30	50
Eau distillée	QSP 10 mL							

### 7/ Etude du quenching de la fluorescéine par l'iodure de potassium

En présence de certaines substances, la molécule fluorescente peut perdre toute ou partie de l'énergie d'excitation de façon non radiative, l'intensité de fluorescence diminue et peut disparaître complètement. C'est l'extinction ou processus de « quenching ».

On distingue deux types de quenching :

- Quenching par collision → suite à une collision avec le quencher le fluorophore lui transfère son énergie d'excitation,

- Quenching par formation d'un complexe (quenching statique) → un complexe non fluorescent se forme entre le fluorophore et le quencher.

L'intensité de fluorescence d'un fluorophore en présence d'ions interférants (quencher) est donnée par la relation de Stern-Volmer :  $I_0 = I(1 + K_Q \tau_0 C_Q)$

où  $I_0$  est l'intensité de fluorescence en l'absence de quencher,  
I, l'intensité de fluorescence en présence de quencher,  
 $K_Q$ , le coefficient du taux de désactivation,  
 $\tau_0$ , la durée de vie de l'état excité du composé en l'absence de quencher,  
 $C_Q$ , la concentration en quencher.

Connaissant la durée de vie de fluorescence du composé, on peut en déduire la constante de vitesse de quenching.

Remarque : si le quenching se produit à la fois par collision et par formation d'un complexe, la courbe est déformée «vers le haut».

### Manipulation :

Préparer les solutions ci-dessous et enregistrer leur spectre de fluorescence pour mesurer leur intensité de fluorescence au maximum d'émission.

fiolle N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
V <sub>B</sub>	10 µL								
KI 1 M (mL)	0	0.25	0.5	0.75	1	1.25	1.5	1.75	2
tampon pH 7	QSP 10 mL								

Interpréter les résultats obtenus (pensez à tester  $y_0$  contre 1 (*modèle théorique*) si besoin) et déterminer la constante de vitesse de quenching de la fluorescéine par l'iodure de potassium.