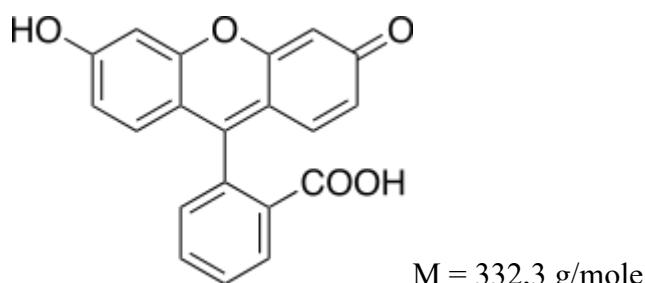


TP 4 - Spectroscopie de Fluorescence

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.



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_2 , anionique FH^- et F^{2-} , cationique FH_3^+) chacune ayant ses propres caractéristiques physicochimiques (*R. Sjöback, J. Nygren & M. Kubista, Spectrochimica Acta, part A, 51, (1995), L7-L21*).

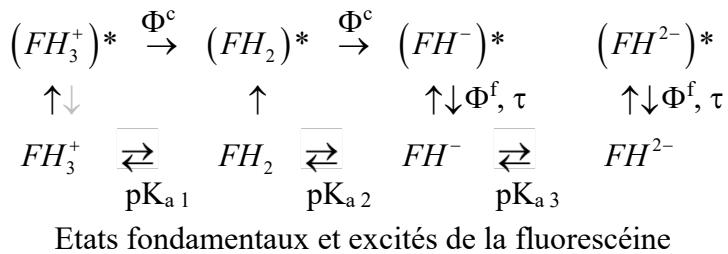
$\text{pK}_{\text{a}1}$ 2,08 en l'absence de NaCl 2,14 en présence de NaCl 1M	$\text{pK}_{\text{a}2}$ 4,31 en l'absence de NaCl 4,20 en présence de NaCl 1M	$\text{pK}_{\text{a}3}$ 6,43 en l'absence de NaCl 6,0 en présence de NaCl 1M	

Absorption :

λ_{abs} (nm)	ϵ (L/mole/cm)	λ_{abs} (nm)	ϵ (L/mole/cm)	λ_{abs} (nm)	ϵ (L/mole/cm)	λ_{abs} (nm)	ϵ (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

Fluorescence :

$\Phi^{\text{f}} \approx 0$ à $\text{pH} > 1,5$	$\Phi^{\text{f}} \approx 0$	$\Phi^{\text{f}} = 0,37$ $\tau = 3,0 \text{ ns}$	$\Phi^{\text{f}} = 0,93$ $\tau = 4,1 \text{ ns}$
$\Phi^{\text{c}} = 0,6$	$\Phi^{\text{c}} = 0,8$		



I/ Caractéristiques spectrales de la fluorescéine

Préparer une **solution A** : 30 mg de fluorescéine dans 100 mL de soude à 0,1 M

puis la solution **solution B** : $V_A = 1 \text{ mL}$ dans 50 mL d'eau distillée

Mesurer le pH de la solution B et les indices de réfraction de la solution B et de la quinine (solution A* TP Kardégic®).

Enregistrer les spectres d'absorption entre 190 et 550 nm des solutions B (cuve 1 mm) et A* (cuve 1 cm).

Déterminer les caractéristiques (λ_{\max} , ϵ) des bandes observées.

Noter également les absorbances aux longueurs d'ondes par pas de 10 nm pour la solution B.

Enregistrer les spectres d'émission ($\lambda_{\text{exc}} = \lambda_{\max}$) entre λ_{\max} et 650 nm dans une cuve de 1 cm. Jouer sur les ouvertures de fentes d'excitation et/ou d'émission pour obtenir des spectres optimum simultanément pour les deux produits. Pointer les maximums d'émission et intégrer les bandes observées.

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

Faire attention aux absorbances mesurées sur les spectre UV à utiliser pour le calcul du rendement quantique de fluorescence. Conclusion.

II/ Etude de quelques paramètres influant sur la fluorescence des composés

De nombreux paramètres expérimentaux influent sur l'intensité de fluorescence des composés : la concentration du soluté, la nature du solvant, le pH de la solution, le dégazage ou non de la solution, la température de la solution, la force ionique de la solution, la présence ou non de quencheur, la longueur d'onde d'excitation, etc. Seuls certains d'entre eux seront étudiés ici.

Les spectres d'émission seront enregistrés entre λ_{\max} de la fluorescéine et 650 nm. Jouer sur les ouvertures de fentes d'excitation et/ou d'émission pour obtenir un spectre optimum pour la solution supposée être la plus intense. Enregistrer les autres spectres dans les conditions expérimentales trouvées précédemment.

1/ Influence de la longueur d'onde d'excitation

Après avoir réajuster les paramètres d'enregistrement avec la solution précédente, 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.

Sur un même graphique, superposer les spectres d'absorption et d'émission reconstitués : intensité ou absorbance = $f(\lambda)$. Interpréter ce que vous observez et déterminer le déplacement de Stokes de la fluorescéine en solution dans de l'eau distillée.

2/ 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 λ_{max} déterminé initialement.

Mesurer les pH de chaque solution, les longueurs d'onde d'émission et les intensités de fluorescence.

fiole N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
V _B	200 µL								
H ₂ SO ₄ 1 mole/L (µL)	100	50	10	0	0	0	0	0	0
NaOH 0,1 mole/L (µL)	0	0	0	0	10	50	100	150	200
eau distillée	QSP 50 mL								

Faire le graphique intensité = $f(pH)$. Interpréter ce que vous observez.

3/ 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 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,
 τ_0 , la durée de vie de l'état excité du composé en l'absence de quencheur,
 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.

fiole N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9
V _B	10 µL								
KI 1 M (mL)	0	0.25	0.5	0.75	1	1.25	1.5	1.75	2
Eau distillée	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.