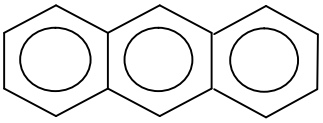
TD n° 3 : Spectroscopie UV-visible, Absorption et Fluorescence

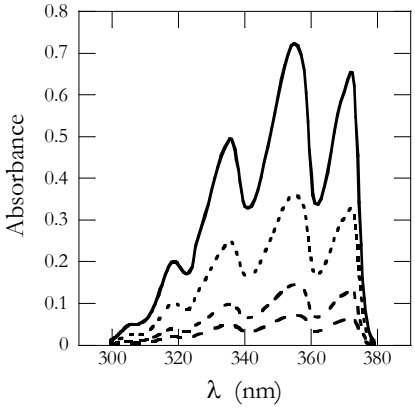
I. Loi de Beer-Lambert et effet de filtre interne

On s'intéresse à un fluorophore hydrocarboné aromatique linéaire : l'**anthracène**.

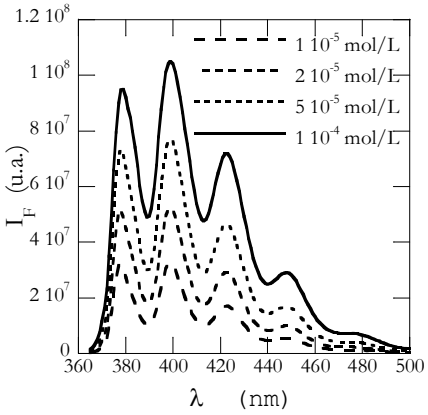


Ses spectres d'absorption et d'émission de fluorescence dans l'éthanol sont donnés ci-dessous. Les spectres d'absorption sont enregistrés pour des échantillons de différentes concentrations. La même opération est réalisée pour les spectres d'émission de fluorescence en prenant comme longueur d'onde d'excitation λ_{exc} = 355 nm, soit la longueur d'onde qui correspond au maximum d'absorption.

On donne également les valeurs des absorbances (ou densité optique) à λ = 355 nm et les valeurs des intensités de fluorescence émises à λ = 398 nm pour les différentes concentrations.



Spectres d'absorption de l'anthracène dans l'éthanol



Spectres d'émission de fluorescence de l'anthracène dans l'éthanol

Concentration (mol/L)	A à λ =355 nm	I_F (u.a.) à λ =398 nm
$3\ 10^{-6}$	0,020	$8{,}105\ 10^{6}$
$6\ 10^{-6}$	0,040	$1{,}620\ 10^{7}$
$1\ 10^{-5}$	0,070	$2{,}907\ 10^{7}$
$1{,}5\ 10^{-5}$	0,105	$4{,}255\ 10^{7}$
$2\ 10^{-5}$	0,151	$5{,}014\ 10^{7}$
$5\ 10^{-5}$	0,362	$8{,}5541 0^{7}$
$1\ 10^{-4}$	0,731	$1{,}130\ 10^{8}$
$1{,}5\ 10^{-4}$	1,120	$1{,}177\ 10^{8}$
$2\ 10^{-4}$	1,505	$1{,}180\ 10^{8}$
$2{,}5\ 10^{-4}$	1,879	$1{,}201\ 10^{8}$

1.1 Comparer les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de l'anthracène. Quelle est la particularité de la bande observée à λ = 372 nm ?

1.2 Tracer l'absorbance A à λ = 355 nm en fonction de la concentration. Qu'observe-t-on ?

1.3 Tracer l'intensité de fluorescence I_F à λ = 398 nm en fonction de l'absorbance A. Commenter.

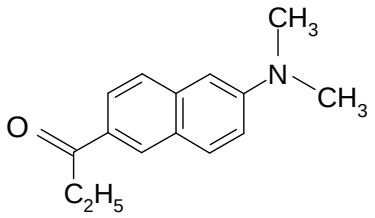
1.4 Rappeler la relation entre l'intensité de fluorescence I_F et l'absorbance A, dans le cas général et celui des faibles absorbances.

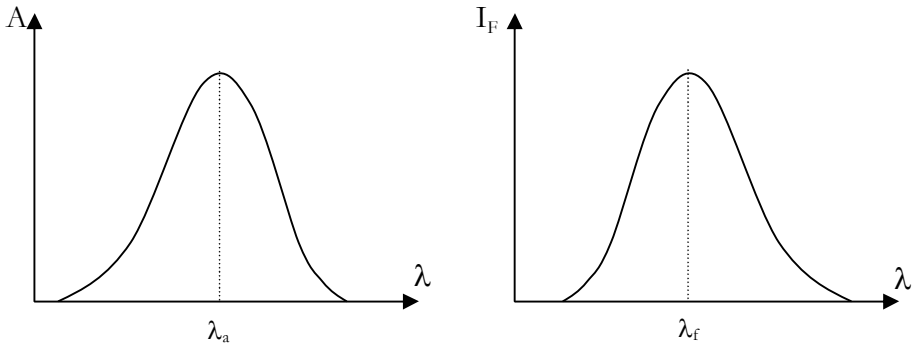
1.5 Donner une méthode pour prédire l'intensité de fluorescence à partir des valeurs d'absorbance.

1.6 Quelle est l'origine de la différence entre la variation $I_F(A)$ observée expérimentalement et la variation $I_F(A)$ obtenue par prédiction ?

II. Effet de la polarité du milieu

L'absorption UV-visible et l'émission de fluorescence d'un chromophore sont très sensibles à l'environnement dans lequel il se trouve. Certains chromophores sont particulièrement sensibles à la polarité du solvant, comme le **PRODAN**.





L'allure des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence du PRODAN est donnée au-dessus. La longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption, λ_a, est prise comme longueur d'onde d'excitation pour les spectres d'émission de fluorescence. On désignera par λ_f la longueur d'onde à laquelle l'intensité de fluorescence est maximale.

Les spectres du PRODAN sont réalisés dans des solvants de polarité différente. L'échelle de polarité choisie est celle de la polarisabilité orientationnelle Δf. Les longueurs d'onde correspondant aux maxima d'absorption et d'émission de fluorescence sont données dans le tableau suivant.

solvant	Δf	λ_a (nm)	λ_f (nm)
toluène	0,013	348	415
dioxane	0,021	351	424
chloroforme	0,149	352	429
dichlorométhane	0,219	354	437
diméthylformamide	0,275	357	447
acétonitrile	0,306	358	454
éthanol	0,290	360	488
eau	0,321	362	528

2.1 Justifier l'allure des spectres d'absorption et d'émission de fluorescence du PRODAN.

2.2 Pourquoi la polarité du solvant a-t-elle une influence plus grande sur la fluorescence comparée à l'absorption ?

2.3 Expliquer l'effet batochrome de la fluorescence avec la polarité du solvant.

2.4 Utiliser la relation de Lippert-Mataga pour déduire la différence de moment dipolaire entre l'état excité et l'état fondamental $(\mu_e - \mu_g)$:

$$\overline{\nu_a} - \overline{\nu_f} = \frac{2}{hc}\left(\mu_e - \mu_g\right)^2 a^{-3}\,\Delta f + cst$$

Pour des raisons pratiques, il est conseillé d'utiliser la conversion :

$$\overline{\nu_a} - \overline{\nu_f} = \frac{1}{0.01^2}\left(\mu_e - \mu_g\right)^2 a^{-3}\,\Delta f + cst$$

où $(\mu_e - \mu_g)$ est directement exprimé en Debye, le déplacement de Stokes $\overline{\nu_a} - \overline{\nu_f}$ est exprimé en cm^{-1}. On prendra comme rayon de cavité du soluté a = 9 Å.

2.5 Applications. Structure de la cyclodextrine

On se propose d'utiliser la sensibilité du PRODAN avec la polarité de son environnement pour sonder la structure de la cyclodextrine.

Les spectres d'absorption et de fluorescence du PRODAN sont réalisés en solution aqueuse en absence et en présence de 3 cyclodextrines (α-cyclodextrine, β-cyclodextrine et γ-cyclodextrine). Les longueurs d'onde correspondant au maximum de fluorescence sont données dans le tableau ci-dessous.

Interpréter les différences observées entre les trois cyclodextrines.

Indication. La cyclodextrine est un oligosaccharide cyclique naturel qui peut comprendre six (α-cyclodextrine), sept (β-cyclodextrine) ou huit (γ-cyclodextrine) unités de glucose. Elle a une structure d'anneau dont l'intérieur est relativement hydrophobe (présence des atomes de carbone et d'hydrogène) et l'extérieur relativement hydrophile (présence des fonctions hydroxyles des unités glucose). La taille de la cavité de la cyclodextrine dépend du nombre d'unités de glucose qui la compose.

	Diamètre de l'anneau (nm)	Profondeur de l'anneau (nm)	λ_f (nm)
α-cyclodextrine	0,45	0,67	527
β-cyclodextrine	0,70	0,80	507
γ-cyclodextrine	0,9	0,95	495