

Synthèse et caractérisation de fluorophores issus du NBD-Cl

La ville



Sur la fluorescence...

- Étude du phénomène de fluorescence aux **XIXe** (Stokes) et **XXe siècles** (Jablonski)
- Fluorophore = **molécules conjuguées** émettant des **photons** d'une fréquence plus faible que celle de ceux absorbés lors de l'excitation
- Déplacement de Stokes

Applications :

- Traceur en milieu biologique (exemple : sonde au NBD, histologie)
- Traceur pour les canalisations (exemple : fluorescéine)



Fig 1 : Fluorescéine commerciale
(<https://monument-tools.com>)

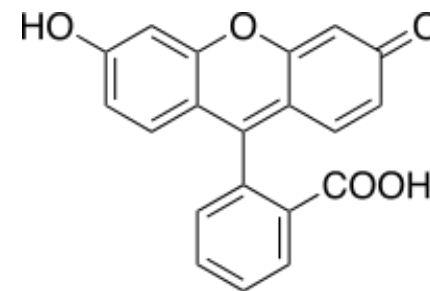


Fig 2 : Fluorescéine

Problématique :

- Comment **synthétiser** un fluorophore et le **caractériser**?
- Comment **quantifier la fluorescence** ?

Plan de la présentation

I. Synthèse du fluorophore

I.1 Synthèse

I.2 Purification **Objectif**

II. Caractérisations

II.1 Banc Kofler

II.2 Spectroscopie UV-Visible

II.3 Spectrophotométrie IR

II.4 Étude en RMN **Objectif**

II.5 Fluorimétrie **Objectif**

I. SYNTHÈSE DU FLUOROPHORE

Bilan et tableau d'engagement

Fig 3 : Équation bilan de la réaction

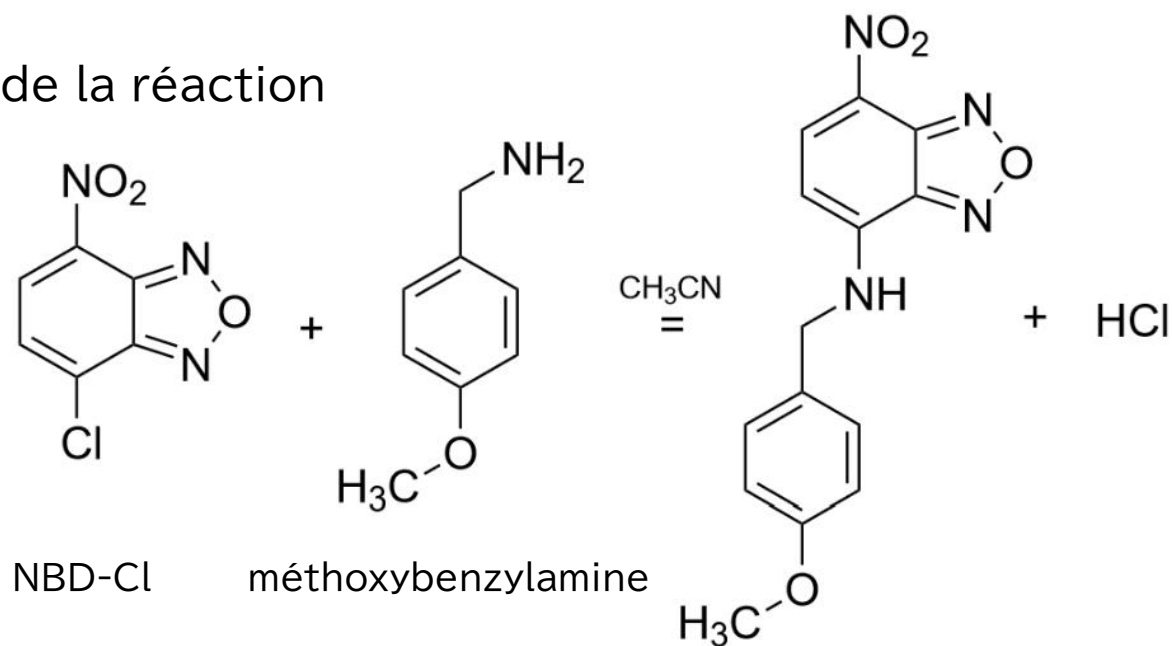


Fig 4 : Tableau d'engagement

	Volume / Masse	Masse molaire (g/mol)	Quantité de matière (mol)	Equivalent
NBD-Cl*	300 mg	199,55	$1,53 \times 10^{-3}$	1
4-méthoxybenzylamine	200 μ L	137,18	$1,53 \times 10^{-3}$	1

*NBD-Cl = 4-chloro-7-nitro-1,2,3-benzoxadiazole

Montage de la synthèse

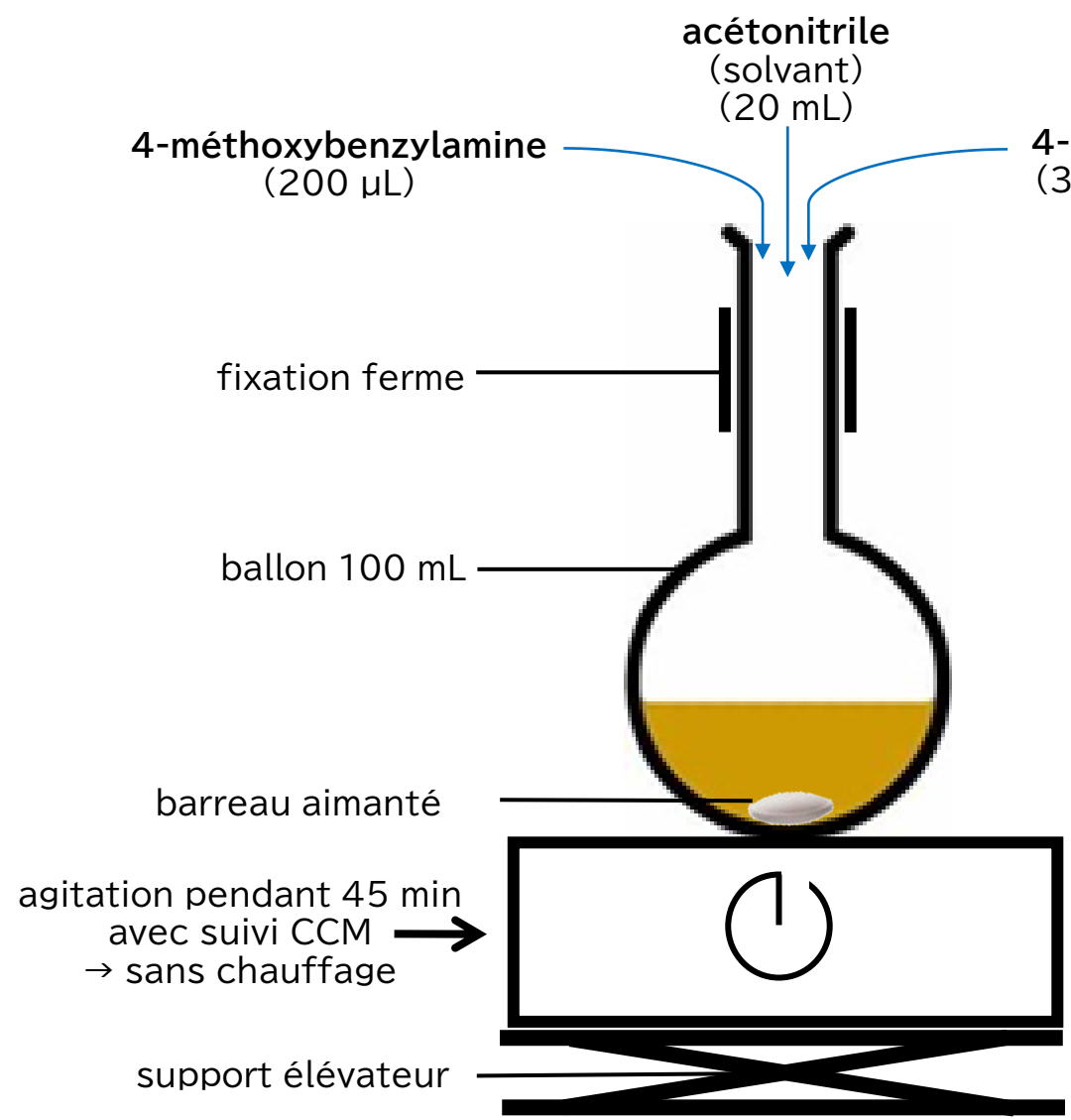
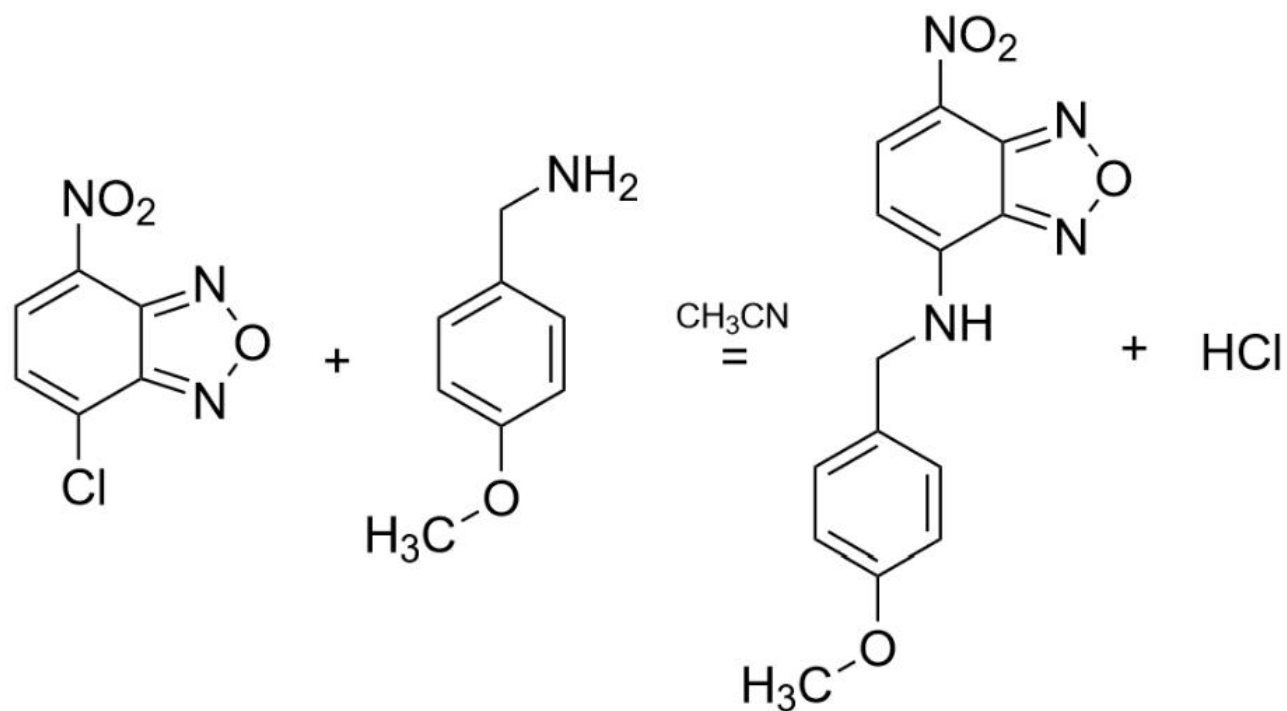


Fig 5 : Photo de la synthèse

Fig 6 : Schéma du montage de la synthèse

Suivi CCM de la réaction

Fig 7 : Équation bilan de la réaction

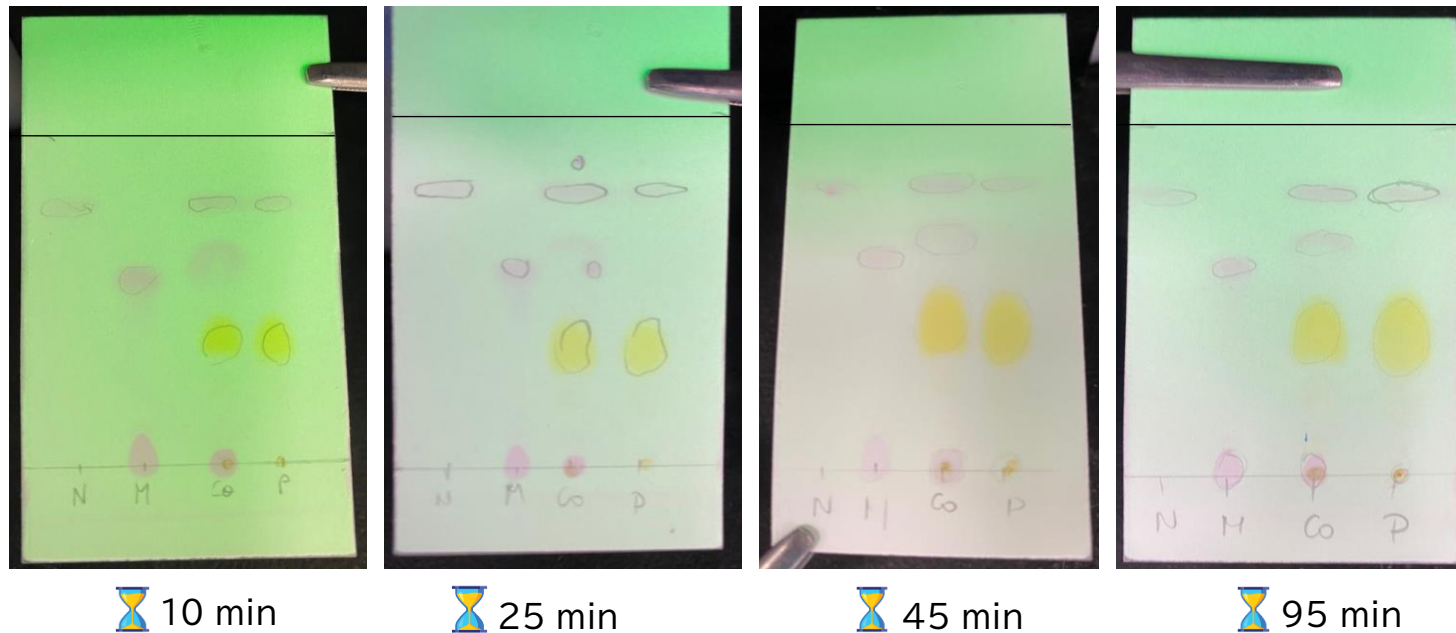


- CCM sur plaque de silice
- éluant : dichlorométhane (CH₂Cl₂)
- révélation sous UV à 365 nm

Suivi CCM de la réaction



Fig 8 : Cuve CCM



Légende:
N = NBD-Cl
M = 4-méthoxybenzylamine
Co = Co-dépôt
P = Produit

Fig 9 : CCM à $t = 10$ min, $t = 25$ min, $t = 45$ min et $t = 95$ min

Durée litt. : 25 minutes

Mais présence de NBD-Cl dans milieu jusqu' à $t = 95$ min

- ⇒ Réaction terminée
- ⇒ 4-méthoxybenzylamine dégradé ?

Bilan :

- reste de NBD-Cl dans le milieu réactionnel
- Masse obtenue : $m_{\text{exp}} = 0,403$ g
- rendement : $\rho = 88$ %
- présence d'impuretés → Purification

Purification : colonne chromatographique

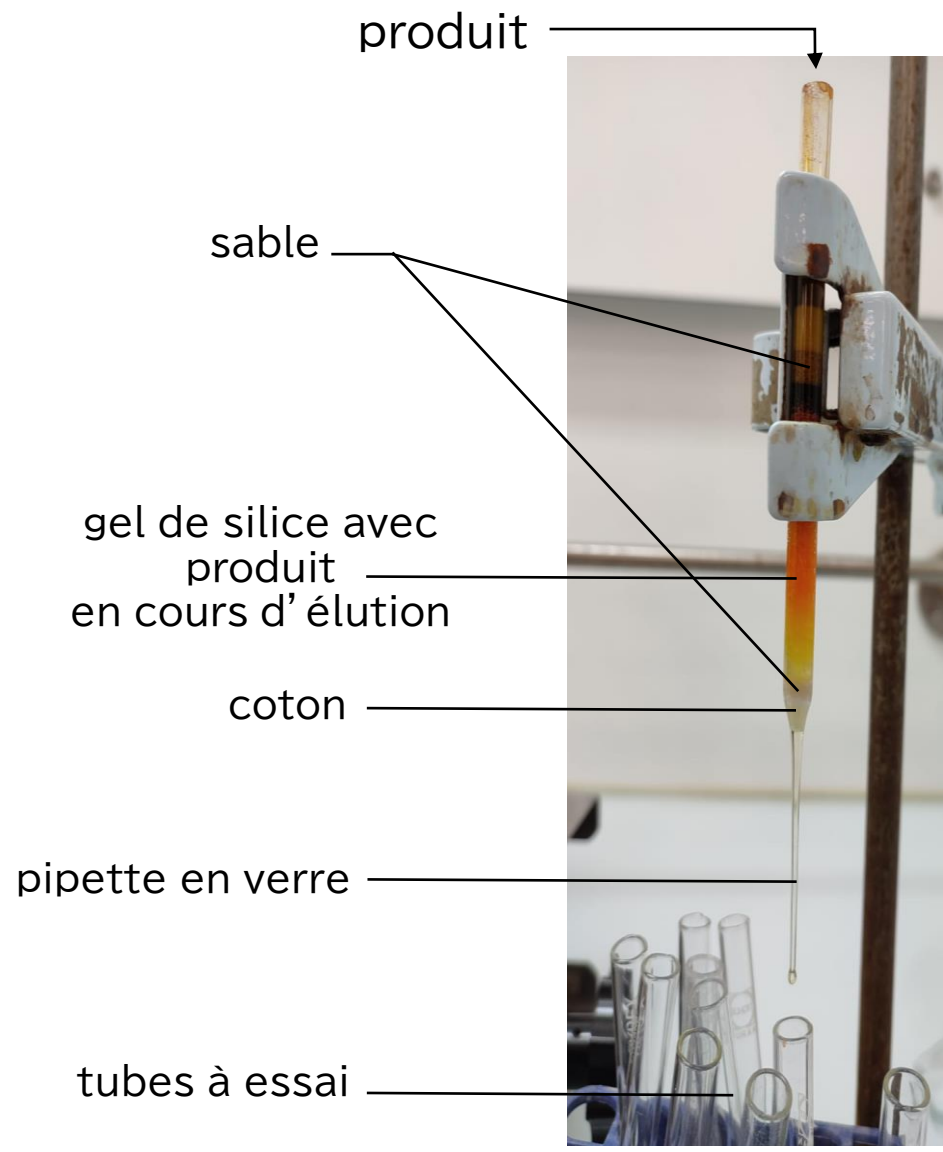


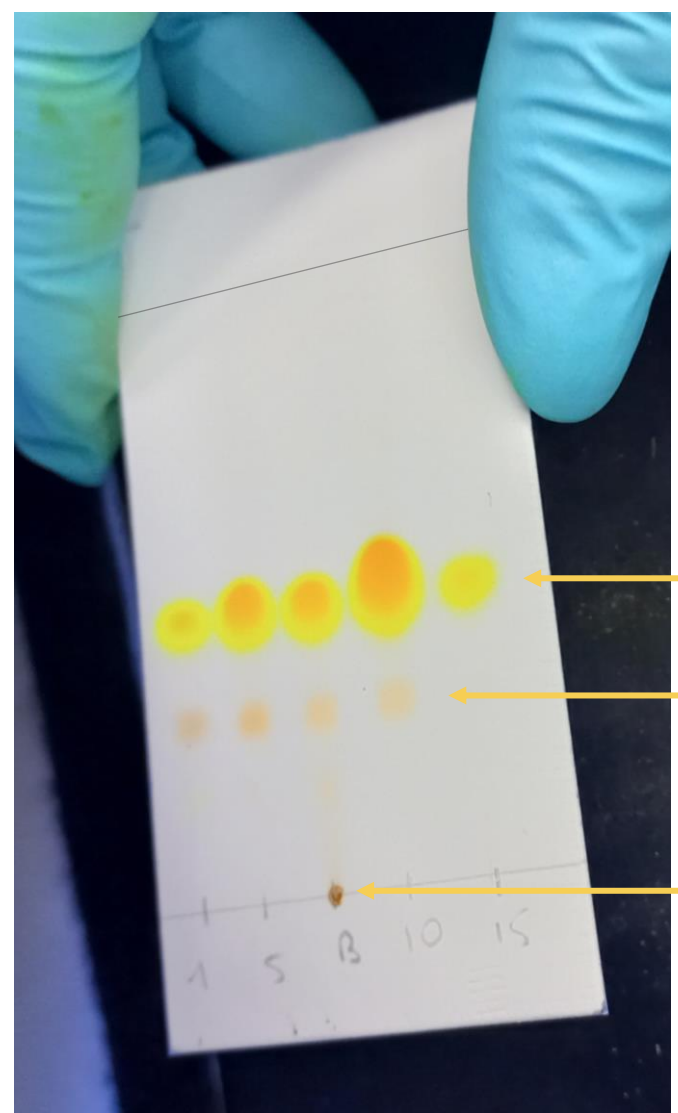
Fig 10 : Colonne chromatographique

Éluant : CH_2Cl_2



Fig 11 : Tubes en sortie de colonne

Suivi CCM des fractions en sortie de colonne



BILAN :

- 'Première impureté' éliminée
- Présence restante de certaines impuretés: à éliminer avec un éluant différent

fluorophore

impureté toujours présente

'Première impureté' bien éliminée par la colonne

Éluant : CH_2Cl_2

Fig 12 : Tubes 1, 5, 10, 15 et produit avant purification au centre

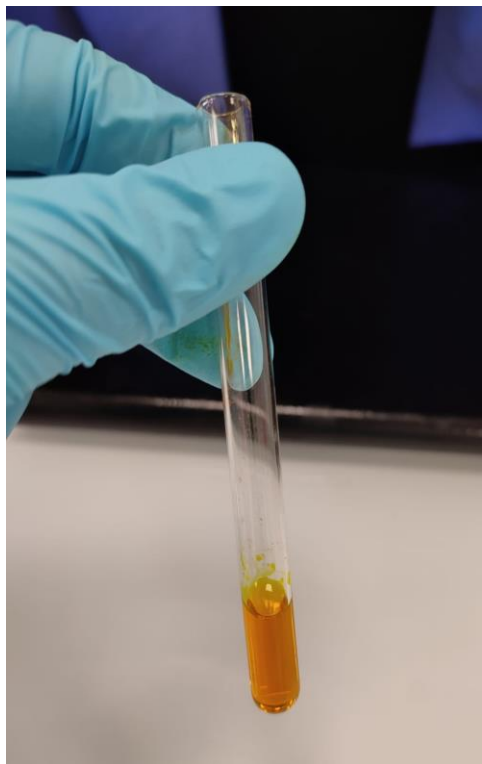


Fig 13 : Tube de sortie de colonne produit purifié + CH_2Cl_2

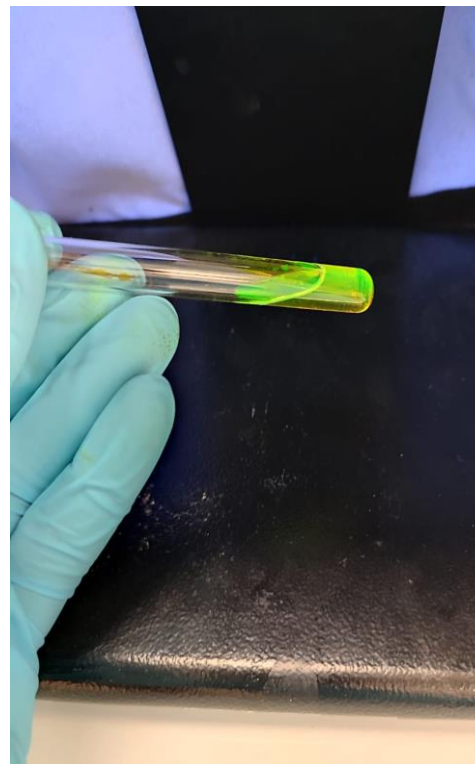


Fig 14 : Fluorescence sous lampe UV à 365 nm
→ présence du composé d'intérêt

Les fractions contenant le composé fluorescent purifié sont rassemblées

Purification : colonne chromatographique

→ Évaporation du solvant (CH_2Cl_2) à l'évaporateur rotatif



Conditions opératoires :

→ bain à 40°C

→ pression à 50 mbar

Fig 15 : Évaporateur rotatif : évaporation du CH_2Cl_2

$T_{\text{ébullition}}(\text{CH}_2\text{Cl}_2) = 40^\circ\text{C}$

Purification : colonne chromatographique

→ Masse obtenue : $m_{\text{exp}} = 0,099 \text{ g}$

→ Rendement : $\rho = 43 \%$

→ Analyse du rendement :

- Pertes lors des transferts de verrerie (synthèse/évaporateur rotatif/tubes à essai)
- Pertes dues à la détérioration du 4-méthoxybenzylamine (NBD-Cl restant dans le milieu réactionnel)



Fig 16 : Mise sous atmosphère inerte d'argon (conservation du produit)



Fig 17 : Produit après purification

II. CARACTERISATION DU FLUOROPHORE

Plan de la présentation

I. Synthèse du fluorophore

I.1 Synthèse

I.2 Purification

II. Caractérisations

II.1 Banc Kofler

II.2 Spectrophotométrie IR

II.3 Étude en RMN

II.4 Spectroscopie UV-Visible

II.5 Fluorimétrie

- I. Synthèse du fluorophore
- II. Caractérisation
 - II.1 Banc Kofler
 - II.2 IR
 - II.3 RMN
 - II.4 UV-Visible
 - II.5 Fluorimétrie

Mesure de la température de fusion avec un banc Kofler

Fig 18 : Banc Kofler



$$T_{\text{commercial}} = 179 \pm 1^{\circ}\text{C} > T_{\text{exp}} = 164 \pm 1^{\circ}\text{C}$$

Valeur tabulée : 178 °C → Confirmation de la présence d'une impureté restante

- I. Synthèse du fluorophore
- II. Caractérisation
 - II.1 Banc Kofler
 - II.2 IR
 - II.3 RMN
 - II.4 UV-Visible
 - II.5 Fluorimétrie

Spectrophotométrie infrarouge : produit

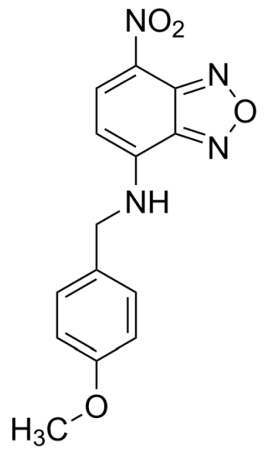


Fig 19: Structure du fluorophore



Fig 21 : Spectrophotomètre infrarouge

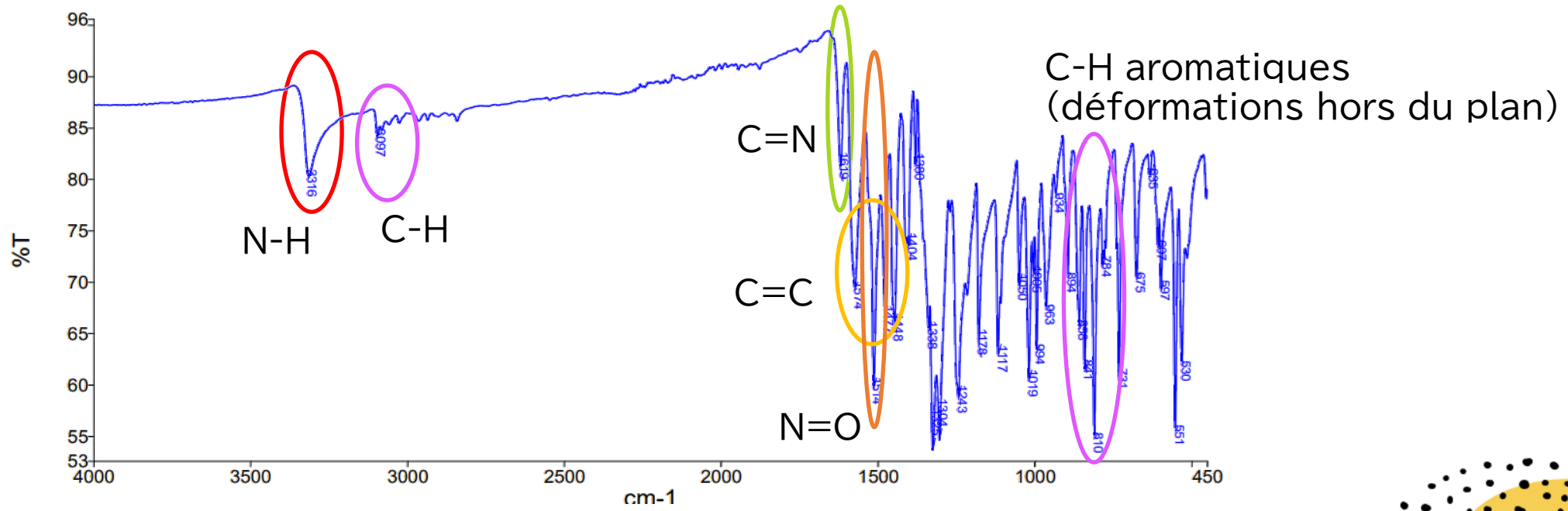


Fig 20 : Spectre IR du fluorophore

- I. Synthèse du fluorophore
- II. Caractérisation
 - II.1 Banc Kofler
 - II.2 IR
 - II.3 RMN
 - II.4 UV-Visible
 - II.5 Fluorimétrie

Spectrophotométrie infrarouge : 4-méthoxybenzylamine

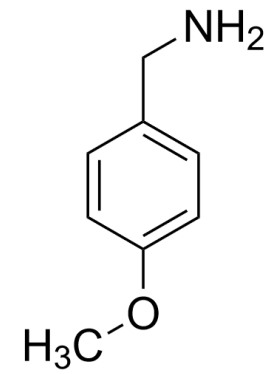


Fig 22 : Structure du 4-méthoxybenzylamine

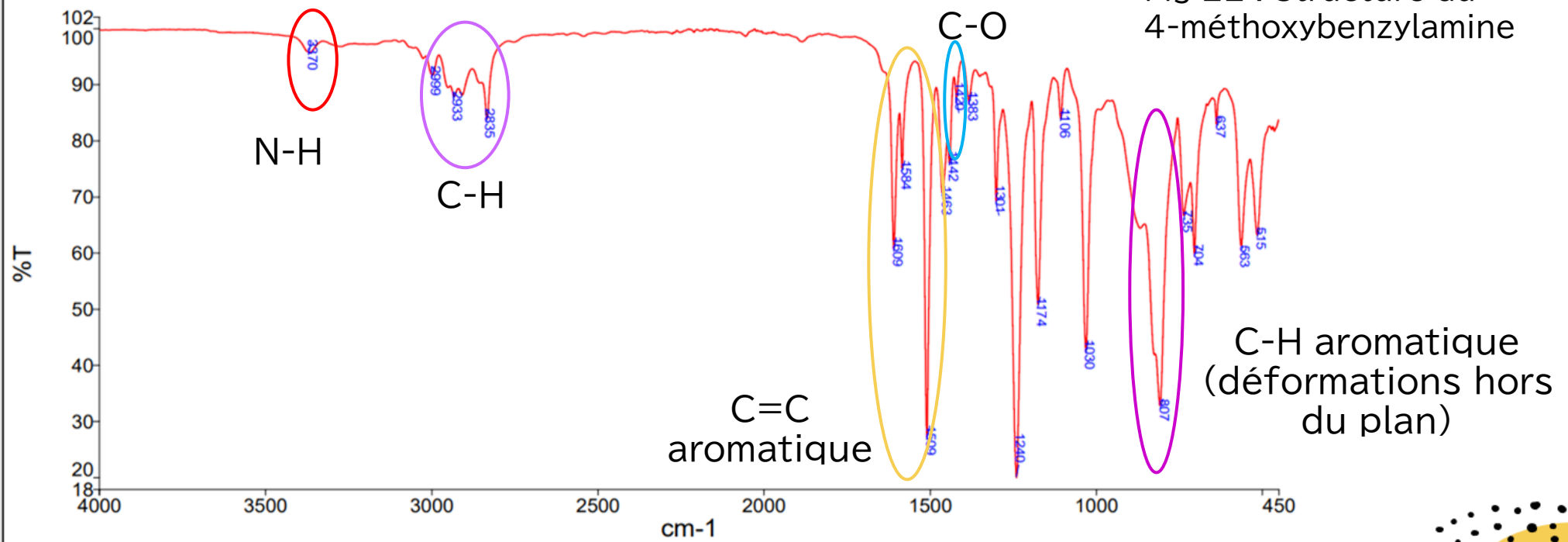


Fig 23 : Spectre IR du 4-méthoxybenzylamine

- I. Synthèse du fluorophore
- II. Caractérisation
 - II.1 Banc Kofler
 - II.2 IR
 - II.3 RMN
 - II.4 UV-Visible
 - II.5 Fluorimétrie

Spectrophotométrie infrarouge : NBD-Cl

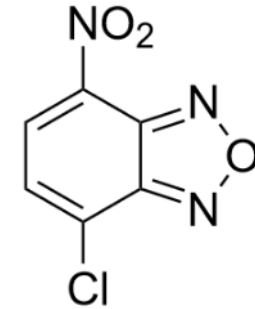


Fig 24 : Structure du NBD-Cl

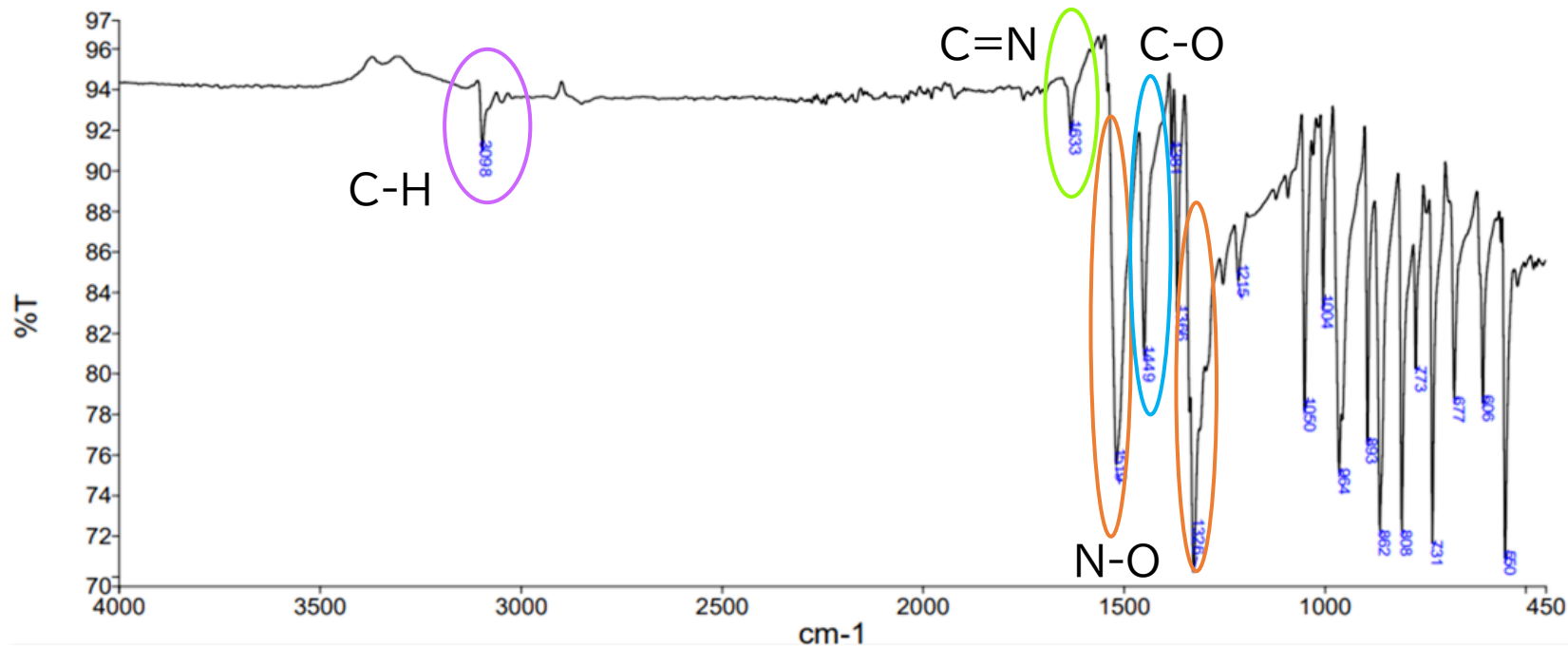


Fig 25 : Spectre IR du NBD-Cl

- I. Synthèse du fluorophore
- II. Caractérisation
 - II.1 Banc Kofler
 - II.2 IR
 - II.3 RMN
 - II.4 UV-Visible
 - II.5 Fluorimétrie

Analyse en RMN ^1H

Fig 26 : Spectre RMN ^1H et structure du fluorophore

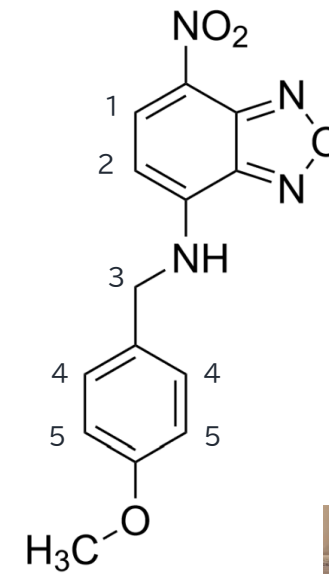
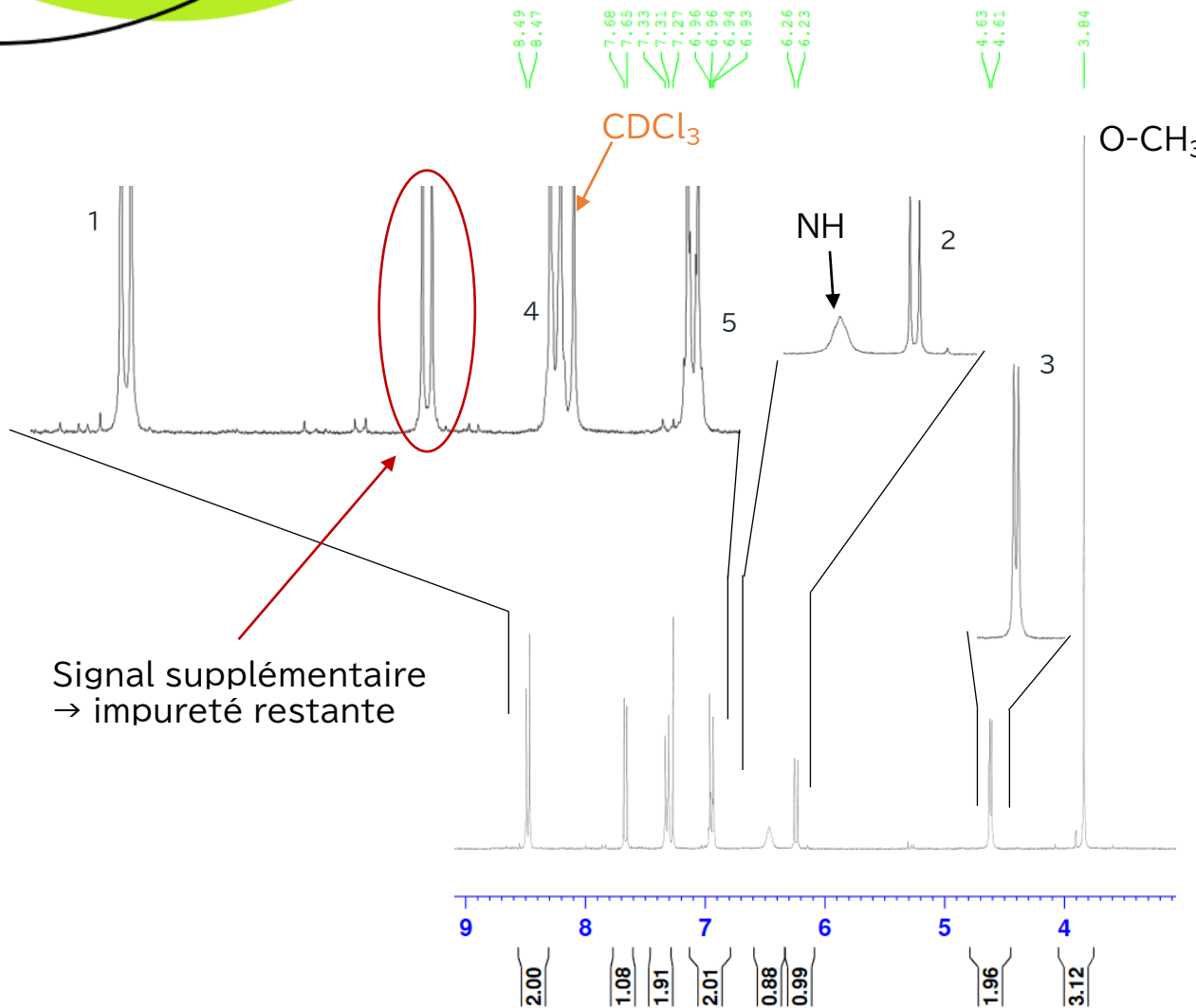


Fig 27 : Spectromètre RMN

- I. Synthèse du fluorophore
- II. Caractérisation
 - II.1 Banc Kofler
 - II.2 IR
 - II.3 RMN
 - II.4 UV-Visible
 - II.5 Fluorimétrie

Analyse en RMN ¹³C

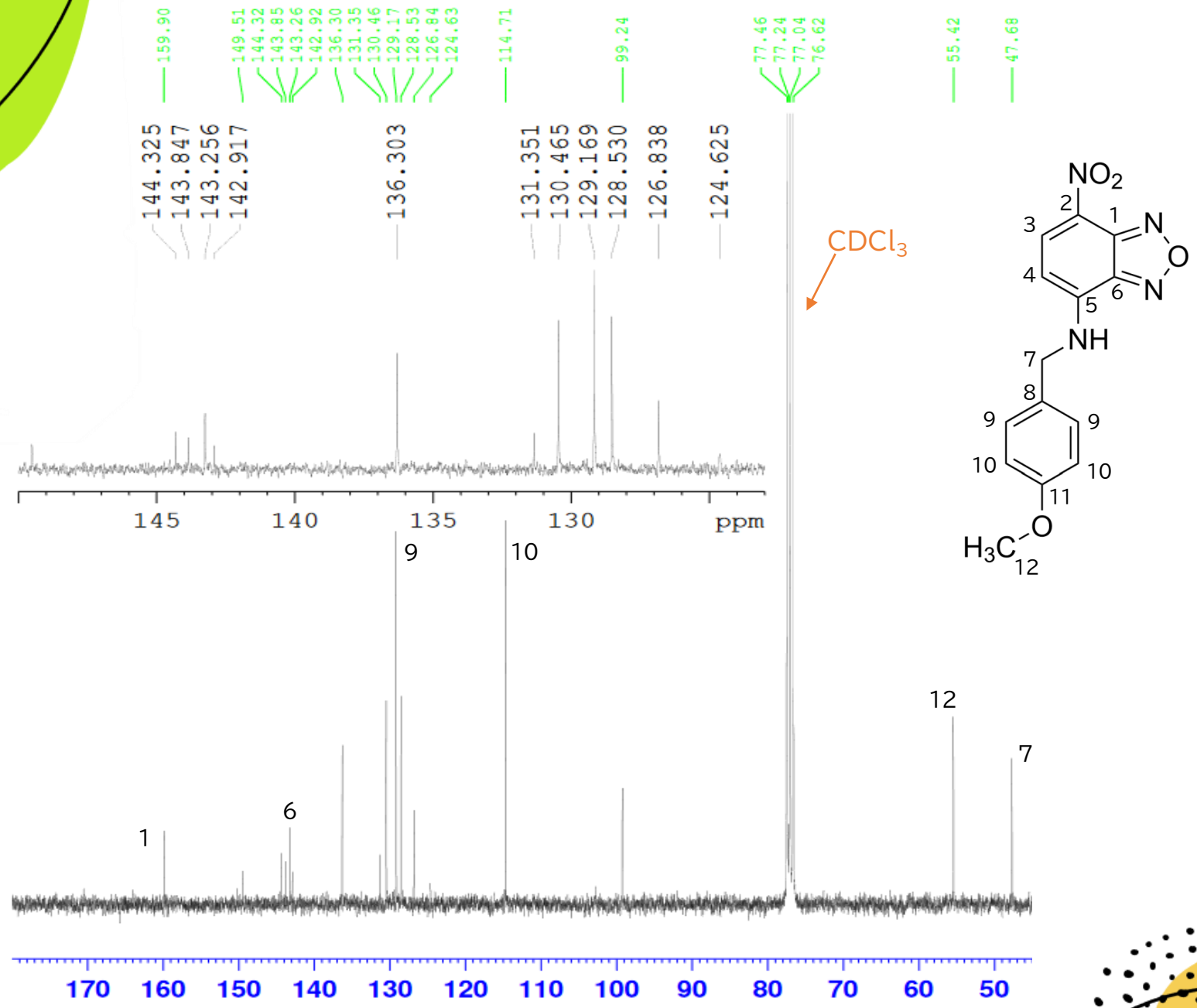


Fig 28 : spectre en RMN ¹³C du fluorophore

- I. Synthèse du fluorophore
- II. Caractérisation
 - II.1 Banc Kofler
 - II.2 IR
 - II.3 RMN
 - II.4 UV-Visible
 - II.5 Fluorimétrie

Analyse en spectroscopie UV-Visible

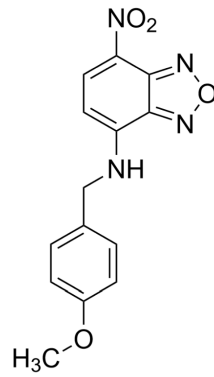


Fig 29 : structure du fluorophore synthétisé

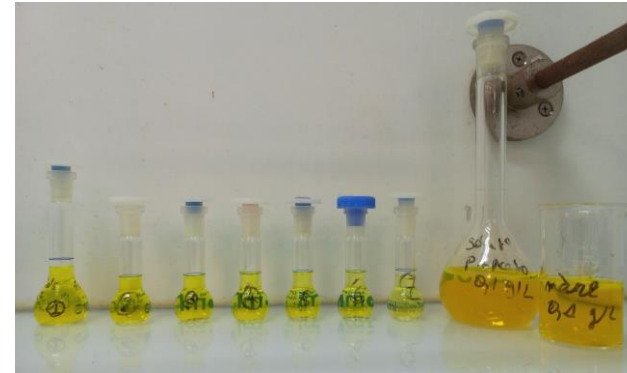
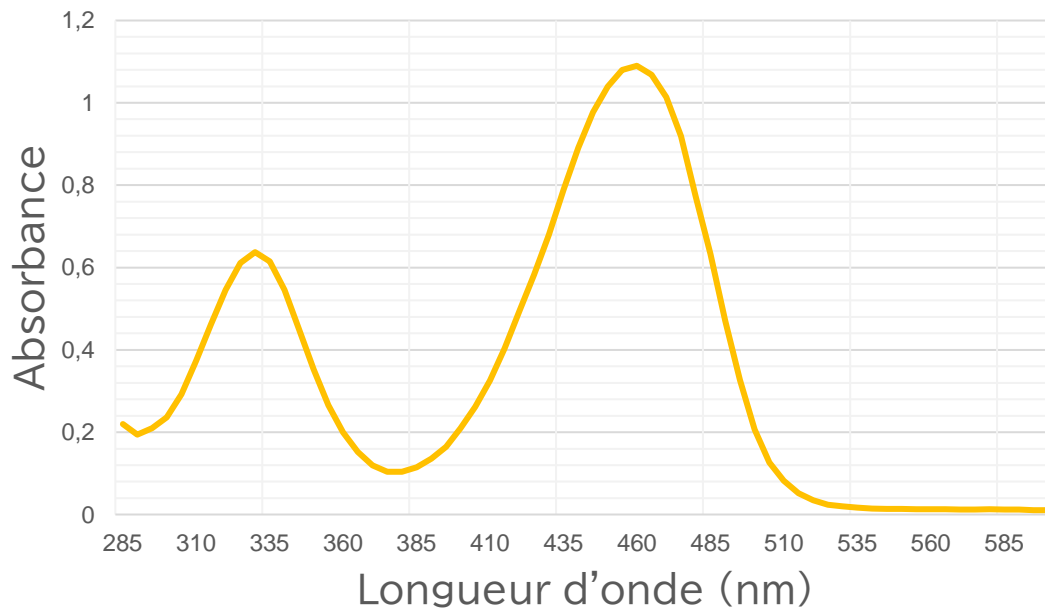


Fig 31 : Solutions étalons

Fig 30 : Spectre d'absorption du fluorophore dans l'acétonitrile à 0,02 g/L



→ Solvant : acétonitrile

→ Préparation d'une gamme d'étalonnage

→ $\lambda_{\text{travail}} = \lambda_{\text{max}} = 330 \text{ nm}$

→ Tracé d'une droite d'étalonnage :

$$A_{330 \text{ nm}} = l \times \epsilon \times c$$

→ Coefficient d'absorption molaire

ϵ = coefficient directeur de la droite

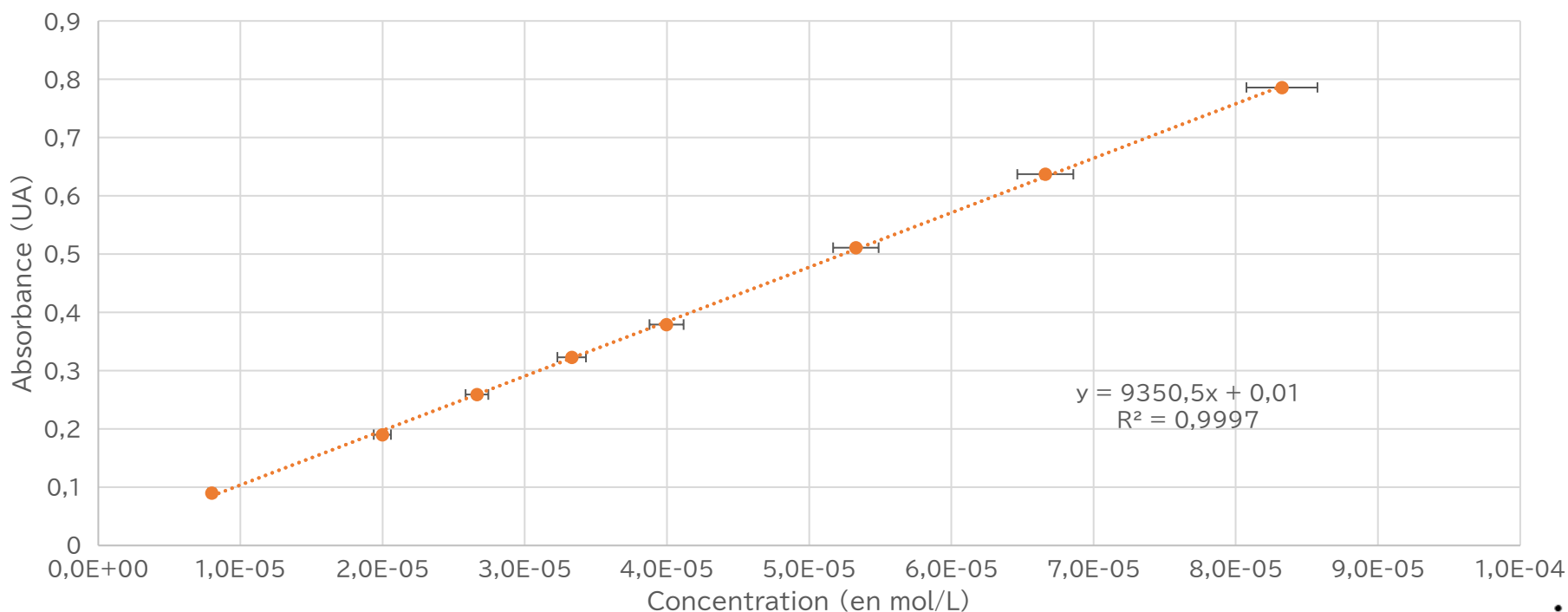
- I. Synthèse du fluorophore
- II. Caractérisation
 - II.1 Banc Kofler
 - II.2 IR
 - II.3 RMN
 - II.4 UV-Visible
 - II.5 Fluorimétrie

Détermination du coefficient d'absorption molaire à $\lambda = 330 \text{ nm}$

Loi de Beer-Lambert : $A = l \times \epsilon \times c$

Coefficient d'absorption molaire : $\epsilon = (9350,5 \pm 388) \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$
à $\lambda = 330 \text{ nm}$

Fig 32 : Absorbance à $\lambda = 330 \text{ nm}$ en fonction de la concentration en fluorophore dans l'acétonitrile



- I. Synthèse du fluorophore
- II. Caractérisation
 - II.1 Banc Kofler
 - II.2 IR
 - II.3 RMN
 - II.4 UV-Visible
 - II.5 Fluorimétrie

Étude en fluorimétrie



Fig 33 : Fluorimètre

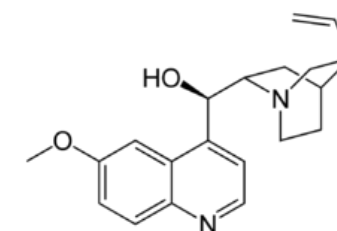


Fig 34 : Quinine

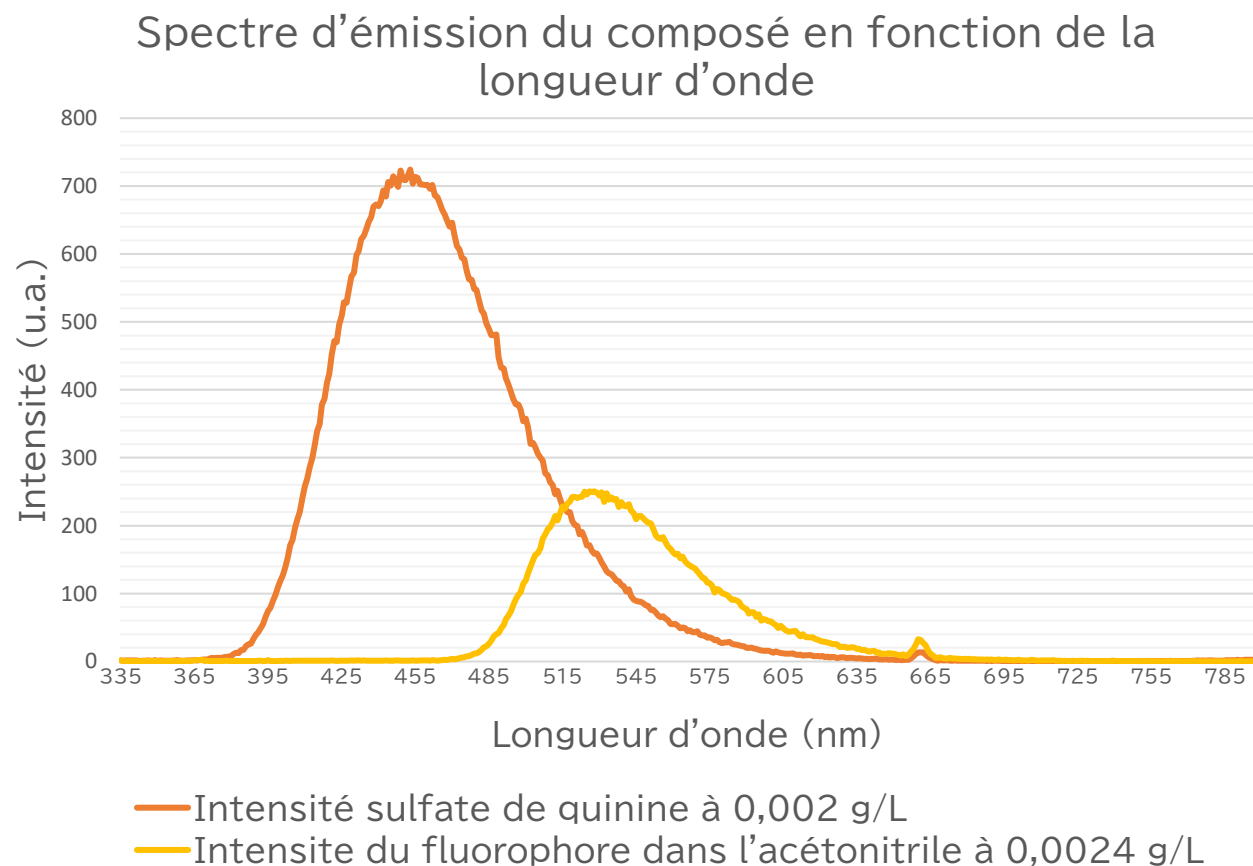


Fig 35 : Spectres d'émission du produit et de la sulfate de quinine

Intégration de l'aire sous les courbes avec le logiciel du fluorimètre :

$$\int_0^{+\infty} I_F \times d\lambda_F = 20\,004$$

$$\int_0^{+\infty} I_{Fref} \times d\lambda_F = 64\,993$$

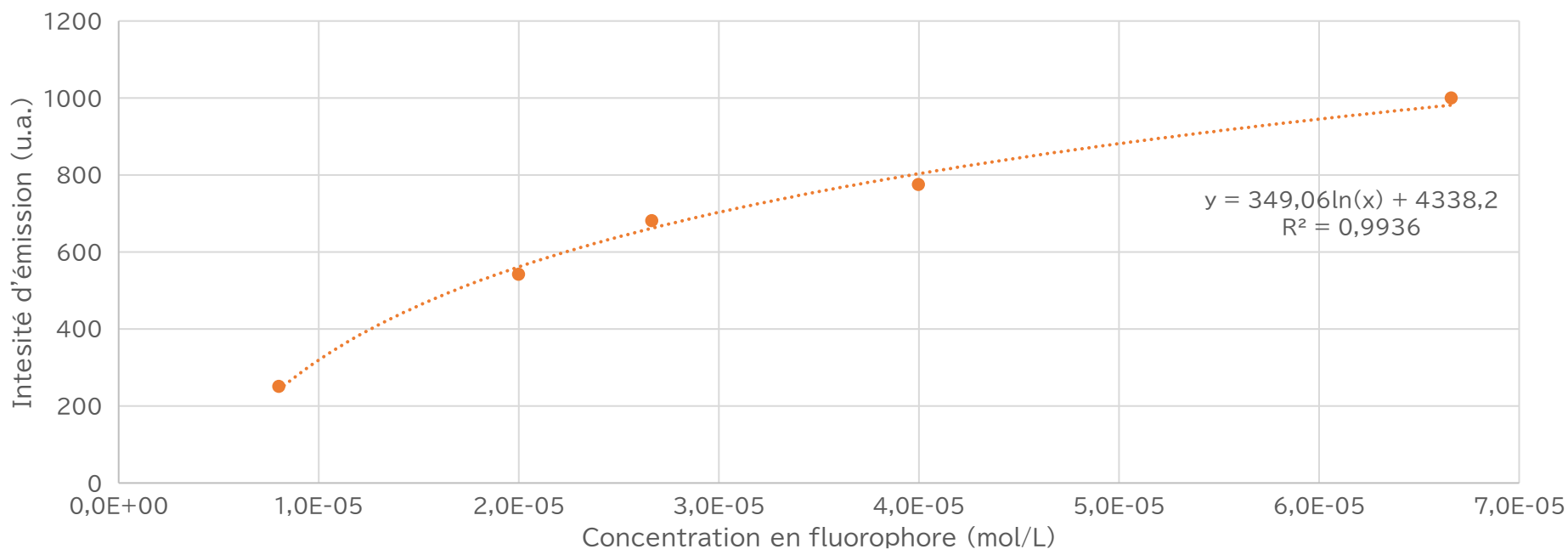
- I. Synthèse du fluorophore
- II. Caractérisation
 - II.1 Banc Kofler
 - II.2 IR
 - II.3 RMN
 - II.4 UV-Visible
 - II.5 Fluorimétrie

Étude en fluorimétrie : influence de la concentration sur la fluorescence

→ Tracé pour I maximal ($\approx \lambda = 526 \text{ nm}$) à différentes concentrations
 → Evolution logarithmique cohérente avec la définition du rendement quantique:

$$I_f = \phi_f I_0 (1 - 10^{-A}) \quad \text{où } A = l \epsilon c$$

Fig 36: Évolution de l'intensité maximale d'émission en fluorescence en fonction de la concentration



→ L'intensité émise augmente avec la concentration en fluorophore

Rendement quantique : quantification du phénomène de fluorescence

$$\Phi = \frac{\text{nombre de photons émis}}{\text{nombre de photons absorbés par le fluorophore}}$$

Où :

Φ est la probabilité du fluorophore à émettre un photon (efficacité d'émission)

$\Phi > 0,1 \rightarrow$ composé considéré comme « assez fluorescent »

Rendement quantique de fluorescence **mesuré par rapport à une référence standard** (sulfate de quinine dans l'acide sulfurique) dans les **mêmes conditions** (longueur d'onde d'excitation, largeur de fente)

Lien entre la mesure effectuée et la solution de référence :

$$\frac{\Phi_F}{\Phi_{Fref}} = \left(\frac{n_{solvant}}{n_{ref}} \right)^2 \times \frac{\int_0^{+\infty} F(\lambda_F) \times d\lambda_F}{\int_0^{+\infty} F_{ref}(\lambda_F) \times d\lambda_F}$$

- I. Synthèse du fluorophore
- II. Caractérisation
 - II.1 Banc Kofler
 - II.2 IR
 - II.3 RMN
 - II.4 UV-Visible
 - II.5 Fluorimétrie

Rendement quantique : quantification du phénomène de fluorescence

→ Avec les courbes précédentes, calcul du rendement quantique pour $\lambda_{\text{excitation}} = \lambda_E = 330 \text{ nm}$

Expression du rendement quantique:

$$\Phi_F = \Phi_{F_{ref}} \times \left(\frac{n_{\text{acétonitrile}}}{n_{\text{H}_2\text{SO}_4}} \right)^2 \times \frac{\int_0^{+\infty} I_F \times d\lambda_F}{\int_0^{+\infty} I_{F_{ref}} \times d\lambda_F} \times \frac{1 - 10^{-A_{ref}(\lambda_E)}}{1 - 10^{-A(\lambda_E)}}$$

Rendement quantique de la quinine (litt. : $\Phi_{F_{ref}} = 0,546$)

Indice de réfraction du milieu

$$\begin{aligned} n_{\text{acétonitrile}} &= 1,345 \\ n_{\text{H}_2\text{SO}_4} &= 1,334 \end{aligned}$$

Aires sous les courbes de fluorescence

$$\begin{aligned} \int_0^{+\infty} I_F \times d\lambda_F &= 20\,004 \\ \int_0^{+\infty} I_{F_{ref}} \times d\lambda_F &= 64\,993 \end{aligned}$$

Valeur de l'absorbance en spectroscopie UV pour $\lambda_E, < 0,1$

$$\begin{aligned} A_{ref}(\lambda_E) &= 0,066 \\ A(\lambda_E) &= 0,09 \end{aligned}$$

Application numérique : $\Phi_F = 0,13 > 0,1$

Brillance: $B = \epsilon \times \Phi_F = 1215,5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

– CONCLUSION –

→ Synthèse et vérification du structure :

- Caractéristiques en accord avec les valeurs tabulées.
- Analyse de structures grossières (température de fusion) et plus fines (IR, RMN)

→ Étude de caractéristiques du fluorophore et de son efficacité :

- Mesure expérimentale du coefficient d'absorption molaire
- Le rendement quantique est satisfaisant mais reste faible.
- La brillance du fluorophore est en bon accord avec les applications de la molécule en imagerie médicale.

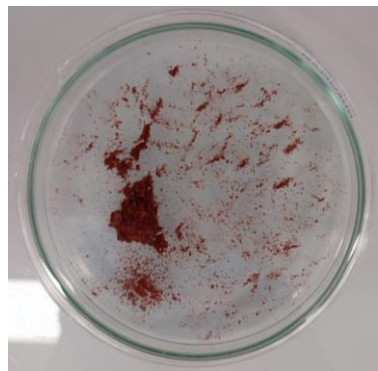
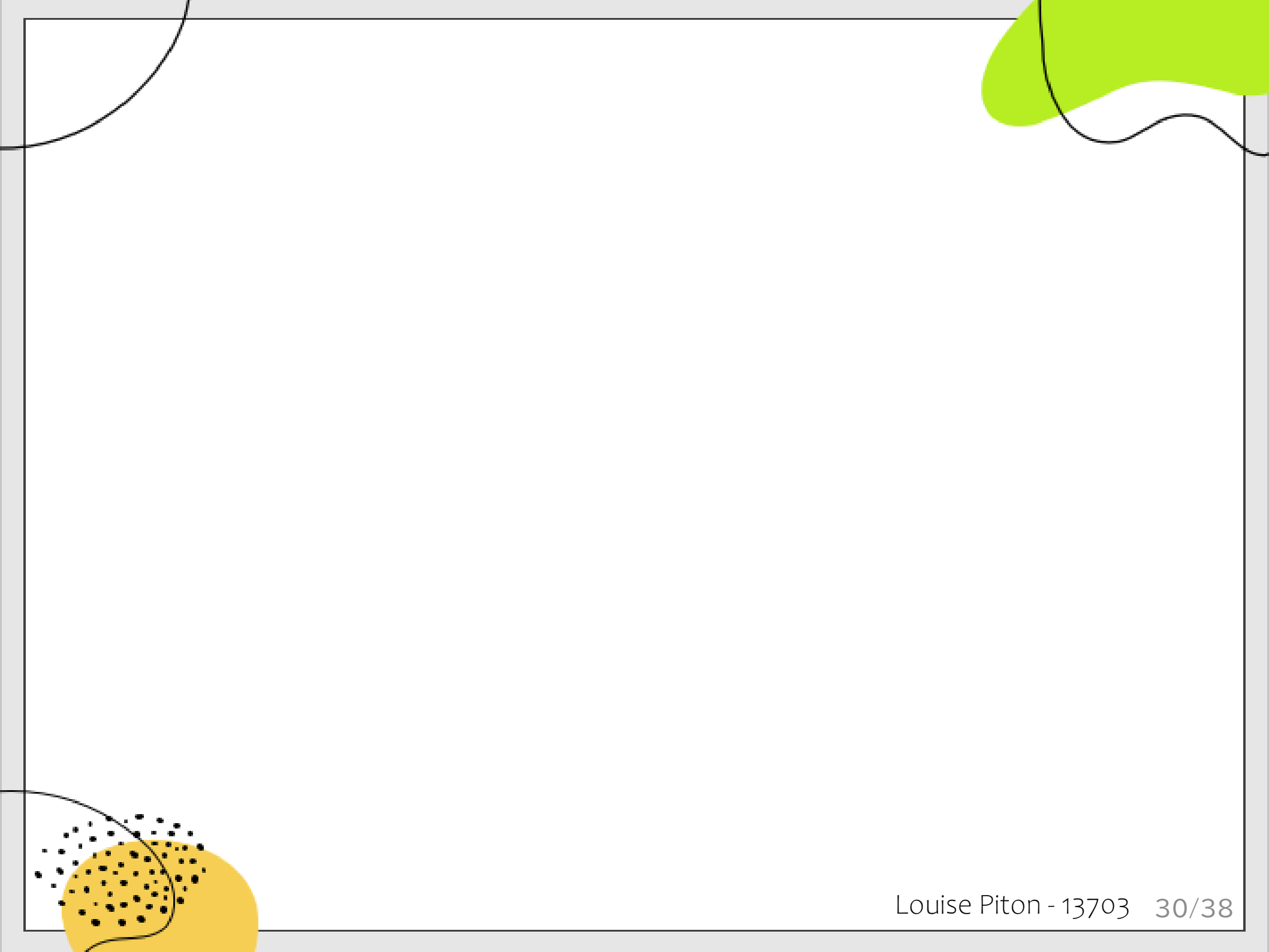
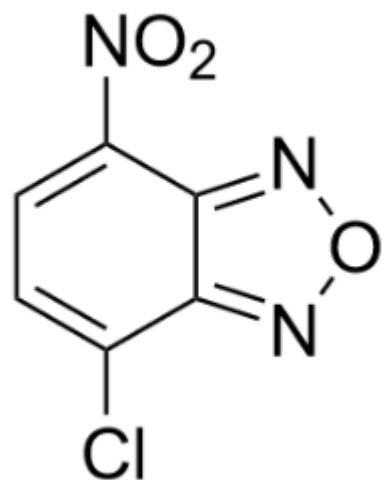


Fig 37: (gauche) fluorophore après purification, (droite) fluorophore dans acétonitrile sous UV ($\lambda=365$ nm)

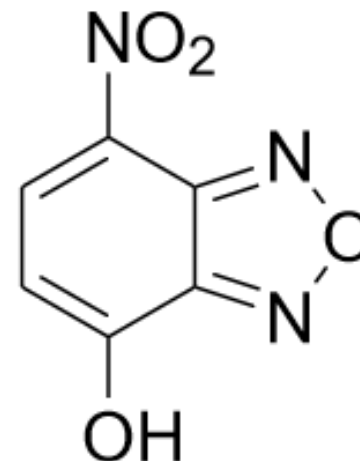


Hypothèse de structure de l'impureté observée



NBD-Cl

Passage sur silice
(milieu acide)



Structure possible de
l'impureté observée

Calcul du rendement de la synthèse

- Rendement de la synthèse (avant purification) :

Masse obtenue : $m_{\text{exp}} = 0,403 \text{ g}$ $\rightarrow n_{\text{exp}} = \frac{m_{\text{exp}}}{M_{\text{produit}}} = \frac{0,403}{300,27} = 1,34 \times 10^{-3} \text{ mol}$

Qté de matière théorique : $n_{\text{th}} = \frac{\rho_{\text{eau}} d_{\text{méthoxy}} V_{\text{méthoxy}}}{M_{\text{méthoxy}}} = \frac{1,05 \times 200 \times 10^{-6} \times 10^3}{137,18} = 1,53 \times 10^{-3} \text{ mol}$

Rendement : $\rho = \frac{n_{\text{exp}}}{n_{\text{th}}} = 0,876 = 88 \%$

- Rendement de la synthèse (après purification) :

Masse obtenue : $m_{\text{exp}} = 0,099 \text{ g}$ $\rightarrow n_{\text{exp}} = 3,29 \times 10^{-4} \text{ mol}$

Qté de matière théorique : $n_{\text{th, colonne}} = \frac{n_{\text{th}}}{2} = 7,65 \times 10^{-4} \text{ mol}$

Rendement : $\rho = \frac{n_{\text{exp}}}{n_{\text{th, colonne}}} = 1,22 = 43 \% \leq \rho_{\text{litt}} = 93\%$

Calcul des incertitudes

Sur la masse : $u(m) = \frac{\Delta}{\sqrt{3}} = \frac{0,001/2}{\sqrt{3}} = 2,9 \times 10^{-4} \text{ g}$

Sur la concentration de la solution mère (dissolution) :

$$u(c_{\text{mère}}) = c_{\text{mère}} \times \sqrt{\left(\frac{u(m)}{m}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{\text{fiolle}})}{V_{\text{fiolle}}}\right)^2} \text{ g/L}$$

Sur les concentrations des solutions filles (dilutions) :

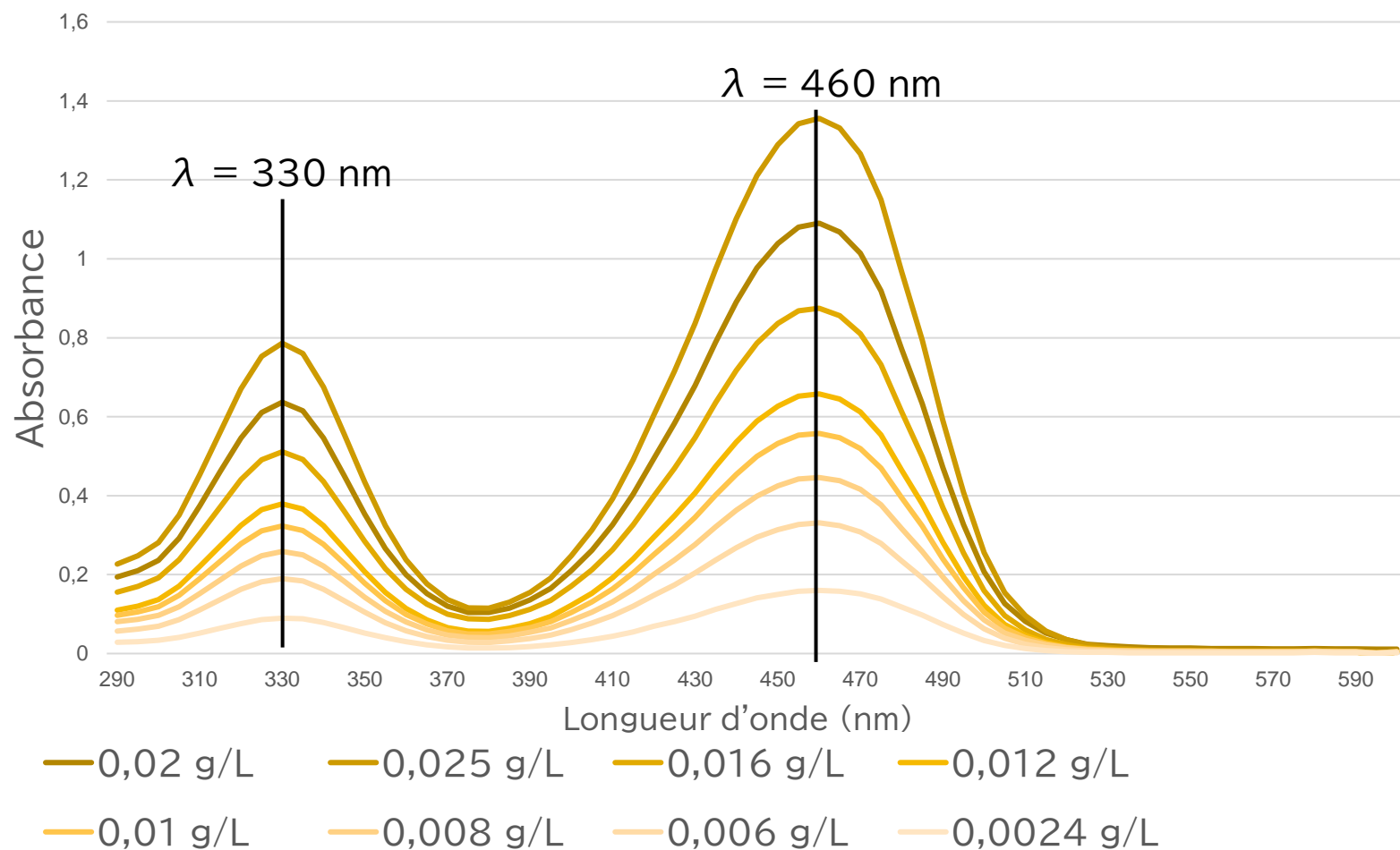
$$c_{\text{mère}} \times V_{\text{mère}} = c_{\text{fille}} \times V_{\text{fille}} \quad \rightarrow \quad u(c_{\text{fille}}) = c_{\text{fille}} \times \sqrt{\left(\frac{u(c_{\text{mère}})}{c_{\text{mère}}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{\text{mère}})}{V_{\text{mère}}}\right)^2 + \left(\frac{u(V_{\text{fiolle}})}{V_{\text{fiolle}}}\right)^2} \text{ g/L}$$

Sur l'absorbance : $u(A) = \frac{0,001/2}{\sqrt{3}} = 2,9 \times 10^{-4}$

Sur la longueur d'onde : $u(\lambda) = \frac{5/2}{\sqrt{3}} = 1,4 \text{ nm}$

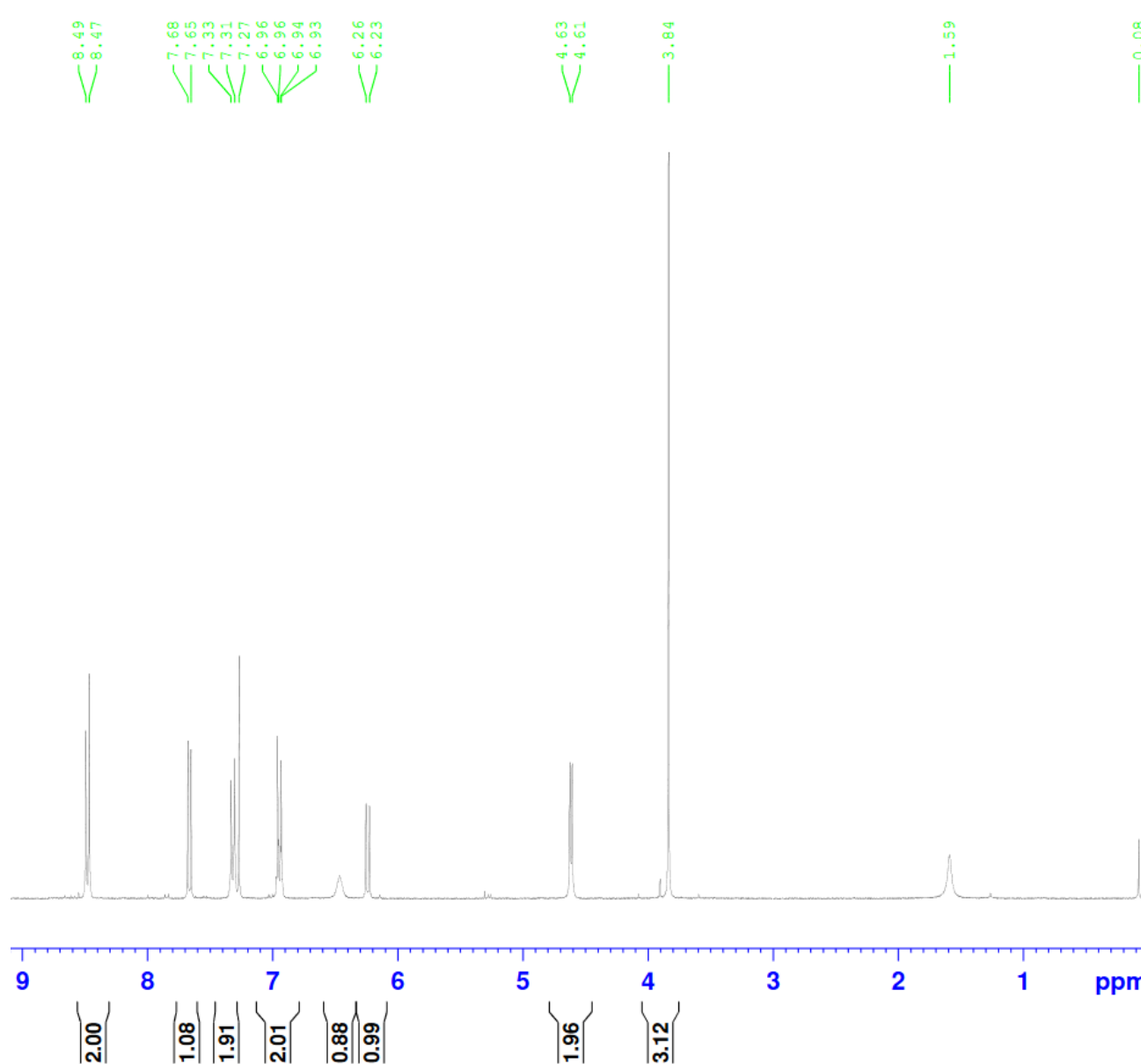
Mesure de l'absorbance du composé en spectrophotométrie UV-visible entre 290 et 600 nm

Fig 38 : Spectre d'absorption du fluorophore pour différentes concentrations dans l'acétonitrile



ANNEXES

Spectre en RMN 1H du produit



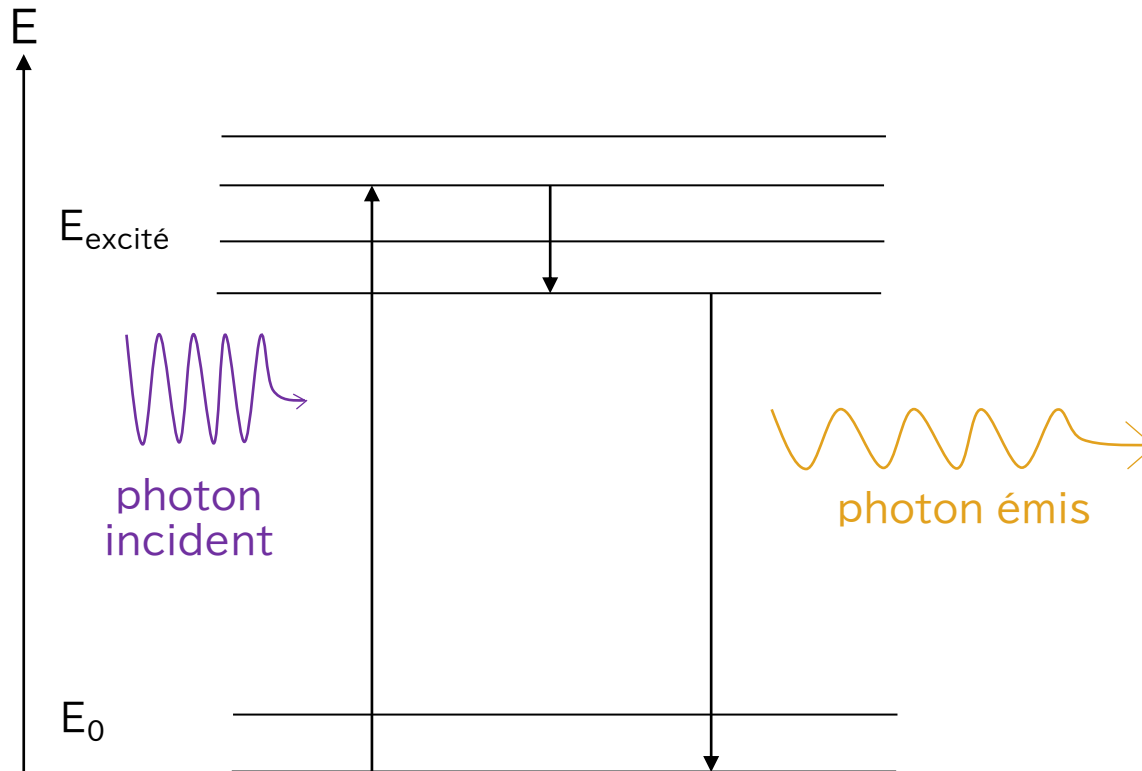
```
Current Data Parameters
NAME      fluorophore-NBD-Cl
EXPNO     10
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20221130
Time      21.24
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO BB-
PULPROG   zg30
TD         16384
SOLVENT   CDC13
NS         16
DS         2
SWH        4194.631 Hz
FIDRES     0.256020 Hz
AQ         1.9529728 sec
RG         574.7
DW         119.200 usec
DE         6.50 usec
TE         298.3 K
D1         1.00000000 sec
TD0        1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
P1        14.70 usec
PL1       2.00 dB
PL1W      9.50935936 W
SFO1      300.1319508 MHz

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         300.1300096 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         0.30 Hz
GB         0
PC         1.00
```

Phénomène de fluorescence : absorption et émission de photon



Relation de Planck-Einstein : $\Delta E = \frac{hc}{\lambda}$

Fig 39 : Schéma illustrant la relation de Planck-Einstein

Calcul du rendement avec la méthode Monte Carlo

```

rendement Monte Carlo.py
1  ## Importation des bibliothèques utiles
2  import numpy as np
3  import numpy.random as rd
4
5  ## Saisie des mesures et demi-étendues
6  m_ini = 0.300/2      # masse initiale de NBD-Cl en g pour purification colonne chromato
7  u_m_ini = 0.001/2    # incertitude sur la masse initiale de NBD-Cl
8
9  m_exp = 0.099        # masse finale du fluorophore en g obtenu en sortie de colonne chromato
10 u_m_exp = 0.001/2    # incertitude sur la masse initiale de fluorophore
11
12 M_NBDCl = 199.55     #masse molaire du NBD-Cl en g.mol^-1
13 M_fluorophore = 300.27 #masse molaire du fluorophore en g.mol^-1
14
15
16 ## Simulation MC (Monte Carlo)
17 nbMC = 10000000
18
19 # Calcul de nbMC quantité de matières théoriques (initiale) aléatoires dans l'intervalle d'incertitude
20 m_ini_MC = m_ini + rd.uniform(-u_m_ini, u_m_ini, nbMC)
21 n_ini_MC = m_ini_MC/M_NBDCl
22
23 # Calcul de nbMC quantité de matières expérimentales aléatoires dans l'intervalle d'incertitude
24 m_exp_MC = m_exp + rd.uniform(-u_m_exp, u_m_exp, nbMC)
25 n_exp_MC = m_exp_MC/M_fluorophore
26
27 ηMC = (n_exp_MC/n_ini_MC)      # calcul de nbC η aléatoires avec Monte Carlo
28
29 η = np.mean(ηMC)              # calcul du η moyen
30
31 u_ηMC = np.std(ηMC, ddof = 1)  # écart-type sur η où ddof=1 impose racine(NMC-1) au dénominateur
32
33 #Résultat
34 print("Valeur de η : {}".format(η))
35 print("Incertitude-type sur η : {}".format(u_ηMC))
36 print("η = {:.3f} ± {:.3f}".format(η,u_ηMC)) # affichage avec 3 décimales

```

```

Shells
Python
>>> (executing cell "Importation des b...
" (line 2 of "rendement Monte Carlo.py"))

>>> (executing cell "Saisie des mesure...
" (line 6 of "rendement Monte Carlo.py"))

>>> (executing cell "Simulation MC (Mo...
" (line 17 of "rendement Monte Carlo.py")
)
Valeur de η : 0.43861567750548597
Incertitude-type sur η : 0.00153224767294
76345
η = 0.439 ± 0.002

>>>

```

Fig 40 : Programme Monte Carlo

Mesure de l'indice de réfraction du solvant



$$T_{\text{ambiante}} = 22^{\circ}\text{C}$$

$$n_{\text{acétonitrile}} = 1,345$$

$$n_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 1,334 \text{ (H}_2\text{SO}_4 \text{ à } 0,5 \text{ mol.L}^{-1}\text{)}$$

Fig 41 : Réfractomètre d' Abbe