

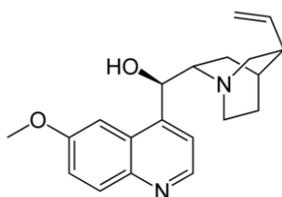
Manipulation I

Analyse de la fluorescence et dosage par fluorimétrie directe de la quinine dans une boisson gazeuse

La quinine est un principe actif extrait de l'écorce du quinquina. Formule chimique: $C_{20}H_{24}N_2O_2$. (R)-(6-methoxyquinolin-4-yl) ((2S,4S,8R) -8 vinylquinuclidin-2-yl)methano:



Ecorce de quinquina



$C_{20}H_{24}N_2O_2$



Fluorescence sous irradiation UV

C'est un alcaloïde naturel qui a des propriétés antipaludique et analgésique. Elle était utilisée pour la prévention du paludisme avant d'être supplantée par ses dérivés, quinacrine, chloroquine, et primaquine. La quinine peut toujours être utilisée pour traiter la malaria résistante et les crampes nocturnes des jambes. Cependant, elle est toxique pour le système nerveux, c'est pourquoi on a cherché à synthétiser des analogues n'ayant pas ce défaut tel que la chloroquine. Le seuil de toxicité se situe autour de 15 mg/L. Au-delà de cette limite, elle provoque des troubles du rythme ventriculaire, parfois fatals. L'effet le plus connu est le cinchonisme, réaction qui associe acouphènes, vertiges, nausées, troubles de la vision et baisse aiguë de l'acuité auditive.

La quinine est présente dans certaines boissons gazeuses comme le Schweppes et autres « sodas » portant la mention « Tonic ». Elle est à l'origine du goût amer de ces boissons et d'une fluorescence sous irradiation UV.

Ce TP comprend deux parties:

- i- L'analyse des spectres d'émission et d'excitation de la quinine dans une boisson gazeuse.
- ii- Le dosage de la quinine par fluorimétrie directe et comparaison avec les normes en rigueur.

I- Technique d'analyse par fluorimétrie directe

Les techniques d'analyse qui utilisent la spectroscopie de fluorescence sont nombreuses. Le choix de la technique à utiliser dépend du problème qui se pose et de la nature de la substance à analyser.

La spectroscopie de fluorescence ou fluorimétrie est l'analyse de la fluorescence d'un échantillon sous excitation par un rayon UV ou visible.

La fluorimétrie est une méthode très sensible pour la mise en évidence et le dosage de composés fluorescents à l'état de traces (très faibles concentrations). Le seuil de détection est 1000 fois plus faible qu'en absorption UV-Visible.

Comme le spectre d'absorption, le spectre de fluorescence d'un composé est une caractéristique aussi spécifique qu'un diagramme de diffraction RX.

La fluorimétrie est une technique d'analyse très utilisée dans différents domaines en particulier:

- En industrie minière.
- En industrie pharmaceutique: pour le dosage des vitamines entre autres ;
- En médecine pour le contrôle et la prévention (Cancers).

Pr. N. EL JOUHARI, Pr. M. BOUZIANE.

UNIVERSITE MOHAMMED V-AGDAL, FACULTE DES SCIENCES, DEPARTEMENT DE CHIMIE

Master: Chimie Fondamentale et Environnement. TP: « Fluorimétrie ».

- En immuno-analyse pour le dosage des anticorps et antigènes couplée aux techniques de marquage immunologique;
- En agro-alimentaire pour le diagnostic nutritionnel des végétaux: composition en fer, azote, magnésium, manganèse, calcium, bore, potassium...

1- Loi fondamentale de la fluorimétrie

Pour les solutions faiblement absorbantes: la loi de Bér Lambert étant valable pour l'absorption de rayonnement incident d'intensité I_0 on peut montrer que la fluorescence F est une fonction linéaire de la concentration C de l'espèce fluorescente:

$$F = K I_0 C \quad K: \text{constante}$$

Dans la majeure partie des cas, les intensités sont mesurées en unités arbitraires (u.a.), ce qui permet après un étalonnage de faire des analyses précises.

Validité de cette loi et effet quenching

Cette expression n'est valable que pour des solutions faiblement absorbantes. Les traces de substances étrangères interviennent énormément par absorption ou inhibition: 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 suivante:

$$F_0 = F (1 + K_Q C_q)$$

F_0 : intensité de fluorescence en l'absence de quencher,

F : intensité de fluorescence en présence de quencher,

K_Q : constante de quenching,

C_q : concentration en quencher.

K_Q est le coefficient directeur de la droite $F_0/F=f(\text{concentrations en quencher})$.

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

2- Appareillage de mesure

L'appareil de mesure utilisé dans ce TP est un spectrofluorimètre Shimadzu RF-5301PC SERIES.

- Source d'excitation: lampe au xénon 150W, elle émet un spectre de rayonnement continu entre 220 et 750 nm.

- Monochromateur: réseau de diffraction holographique concave blazé (pour l'excitation et pour l'émission $F/2.5$) 1300 lignes/mm.

- Détecteur photomultiplicateur pour la photométrie et le contrôle photométrie: R3788-02, contrôle: R212-14.

Pr. N. EL JOUHARI, Pr. M. BOUZIANE.

UNIVERSITE MOHAMMED V-AGDAL, FACULTE DES SCIENCES, DEPARTEMENT DE CHIMIE

Master: Chimie Fondamentale et Environnement. TP: « Fluorimétrie ».

II- Dosage de la quinine

Compte tenu de l'ordonnance sur les denrées alimentaires (ODAI) 1^{er} mars 1995 (état 27 juillet 2004), la teneur des boissons en quinine ne doit pas dépasser 80mg/L calculée en hydrochlorure de quinine ($C_{20}H_{24}N_2O_2$, HCl, $2H_2O$).

La quinine étant une molécule fluorescente. On peut donc la doser par spectrofluorimétrie. Elle est fournie sous forme de sulfate de quinine ($C_{40}H_{48}N_4O_4$, H_2SO_4 , $2H_2O$).

1- Principe du dosage

Excitées par un rayonnement UV, les solutions de quinine deviennent très fluorescentes. La mesure de l'intensité d'émission ou fluorescence F à 450 nm est un moyen idéal pour doser la quinine dans les boissons gazeuses.

Des solutions étalons dont les concentrations se situent dans le domaine où la fluorescence est pratiquement linéaire seront préparées. La boisson à analyser sera diluée de façon à ce que la fluorescence se trouve dans ce même domaine.

Les solutions de quinine doivent être préparées quotidiennement et gardées à l'obscurité lorsqu'elles ne sont pas utilisées.

2- Mode opératoire

a) Préparation d'une solution F de quinine

Une solution M de concentration (0,1g /L) en quinine vous sera fournie.

Mettre 5ml (pipette) de la solution M dans une fiole jaugée de 500 ml, compléter au trait de jauge avec HNO_3 (0,01M). Bien agiter pour homogénéiser et garder à l'abri de la lumière.

- Calculer la concentration molaire C_M de la solution M.
- En déduire la concentration molaire C_F de la solution F.

b) Préparation des solutions étalons

A partir de la solution F préparer 10 solutions étalons. Pour cela mettre un volume V_F (ml) de la solution F dans une fiole jaugée de 100ml, compléter au trait de jauge avec HNO_3 (0,01M). Bien agiter les 10 fioles pour homogénéiser. Laisser reposer 30min à l'abri de la lumière.

NB: utiliser 2 burettes, une pour mesurer V_F et l'autre pour compléter avec HNO_3 (0,01M)

Pour éviter les confusions, numéroter les fioles comme indiqué au tableau I.

Tableau I

Etalon N° :	Blanc	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V_F (ml)	0	0,7	1,6	3,3	4,9	6,6	9,8	13,2	19,6	26,2	32,8
$C_{\text{étalon}}$ ($10^{-7}M$)											
F (u.a.)											

HNO_3 (0,01M) sera utilisé comme blanc pour le zéro de fluorescence.

Calculer la concentration en quinine $C_{\text{étalon}}$ des différents étalons et compléter le tableau I.

c) Préparation de la solution à doser

Diluer la boisson gazeuse avec HNO_3 (0,01M) de manière à ce que l'intensité de fluorescence se situe dans le domaine optimal, pour cela:

- mettre 10ml (**pipette**) de la boisson dans une fiole jaugée de 250ml,
- compléter avec HNO_3 (0,01M). Bien agiter pour homogénéiser: c'est la solution G,
- mettre 10ml de la solution G dans une fiole jaugée de 100ml,
- compléter avec HNO_3 (0,01M). Bien agiter pour homogénéiser: c'est la solution X,
- laisser reposer 30min à l'abri de la lumière.

d) Mesures de fluorescence

➤ Mise en marche de l'appareil

*** Note importante:** n'utilisez l'appareil qu'en présence de votre enseignant. C'est l'enseignant qui va le mettre en marche, il vous expliquera et vous assistera pour les réglages et les mesures.

Une fois les mesures terminées c'est l'enseignant qui va arrêter l'appareil.

➤ Analyse des spectres d'émission et d'excitation de la quinine

Spectres d'émission et d'excitation de la quinine (étalon n°10)

Spectre d'émission

☞ Mettre la solution étalon n°10 dans une cuve en quartz (4 faces transparentes), sécher les faces externes de la cuve et la placer dans le compartiment échantillon. Fermer le compartiment échantillon.

- Activer le mode spectrum,
- Configurer et enregistrer les paramètres du spectre d'émission,
- Visualiser l'acquisition du spectre d'émission,
- Enregistrer l'acquisition du spectre d'émission dans un fichier.

☞ Mettre le blanc (HNO_3 0.01N) dans une 2^{ème} cuve, sécher les faces externes de la cuve et la placer dans le compartiment échantillon. Fermer le compartiment échantillon.

- Faire auto zéro,
- Vérifier que la configuration des paramètres est identique à celle de l'acquisition précédente,
- Visualiser l'acquisition du blanc,
- Enregistrer le spectre du blanc dans le même fichier.

☞ Replacer la cuve contenant l'étalon n°10 et refaire l'acquisition du spectre d'émission: c'est le spectre d'émission corrigé de l'étalon n°10.

Spectre d'excitation

- Configurer et enregistrer les paramètres du spectre d'excitation,
- Visualiser l'acquisition du spectre d'excitation,
- Enregistrer l'acquisition du spectre d'excitation dans un fichier.

Spectres d'émission et d'excitation de la boisson gazeuze

Spectres d'excitation

☞ Rincer la cuve et la remplir avec la solution X, sécher les faces externes de la cuve et la placer dans le compartiment échantillon. Fermer le compartiment échantillon.

- Configurer les paramètres du spectre d'excitation,
- Visualiser l'acquisition du spectre d'excitation,
- Enregistrer le spectre d'excitation de la solution X.

Spectres d'émission

- Configurer les paramètres du spectre d'émission,
- Visualiser l'acquisition du spectre d'émission,
- Enregistrer l'acquisition du spectre d'émission de la solution X.

➤ **Analyse de la fluorescence des étalons en fonction de la concentration $C_{\text{étalon}}$**

- Activer le mode quantitative,
- Ajuster la longueur d'onde d'excitation à 365 nm,
- Ajuster la longueur d'onde d'émission à 450 nm,
- Mesurer la fluorescence F des différents étalons et compléter le tableau I.
- Mesurer la fluorescence F_X de la solution X, refaire la mesure en vidant et remplissant de nouveau la cuve avec la solution X.

III- Résultats

- 1- Représenter les spectres d'émission et d'excitation sur la même figure et imprimer.
- 2- Comparer et discuter les spectres d'émission et d'excitation de la quinine et de la boisson analysée.
- 3- Tracer la courbe représentant la fluorescence F des étalons en fonction de la concentration $C_{\text{étalon}}$.
- 4- Déterminer graphiquement la concentration molaire C_X en quinine de la solution X.
- 5- Calculer la concentration molaire C_G en quinine de la solution G.
- 6- Calculer la concentration molaire C_{boisson} en quinine de la boisson.
- 7- Calculer la concentration massique C'_{boisson} de la boisson en hydrochlorure de quinine dihydraté.
- 8- Comparer la valeur trouvée à celle indiquée par l'ordre sur les denrées alimentaires.

Tableau II

Solution analysée	X	
F_X (u.a.)		
C_X [M]		
C_G [M]		
C_{boisson} [M]		
C'_{boisson} [mg/L]		
C''_{boisson} [mg/L]		

Masses molaires

La quinine ($C_{20}H_{24}N_2O_2$): $M=324,4168$ g /mole.

L'hydrochlorure de quinine dihydraté ($C_{20}H_{24}N_2O_2$, HCl, $2H_2O$): $M=396,91$ g/mole

Pr. N. EL JOUHARI, Pr. M. BOUZIANE.

UNIVERSITE MOHAMMED V-AGDAL, FACULTE DES SCIENCES, DEPARTEMENT DE CHIMIE

Master: Chimie Fondamentale et Environnement. TP: « Fluorimétrie ».