

## Analyse par fluorimétrie directe de la quinine dans une boisson gazeuse.

Le but de ce TP est d'utiliser la technique de fluorimétrie directe pour déterminer la quantité de quinine dans une boisson gazeuse et la comparer aux normes en vigueur.

### 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: elle permet de détecter les fluorophores à des concentrations très faibles. 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 minérale.
- En industrie pharmaceutique: pour le dosage des vitamines entre autres ;
- En médecine pour le contrôle et la prévention (Cancers).
- 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 Béer 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.

## 1- Validité de cette loi

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, par collisions avec espèces étrangères, l'intensité de fluorescence diminue et peut disparaître complètement: c'est l'extinction ou processus de « quenching » :

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

$F_0$ ,  $F$  : intensités de fluorescence en l'absence et en présence d'ions interférents

$K_Q$ : constante de quenching.

$C$  : concentration des ions interférents.

## 2- Appareillage de mesure

L'appareil de mesure utilisé dans ce TP est un fluorimètre F96.

La source d'excitation est une lampe à xénon 150W, elle émet un spectre de rayonnement continu entre 200 et 750 nm.

Un filtre adéquat interposé entre la source et l'échantillon permet d'isoler la longueur d'onde d'excitation.

Le monochromateur d'émission est un réseau à 1200 t/mm.

## II- Dosage de la quinine

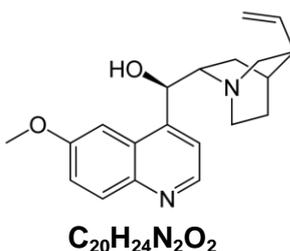
### 1- Propriétés de la quinine

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

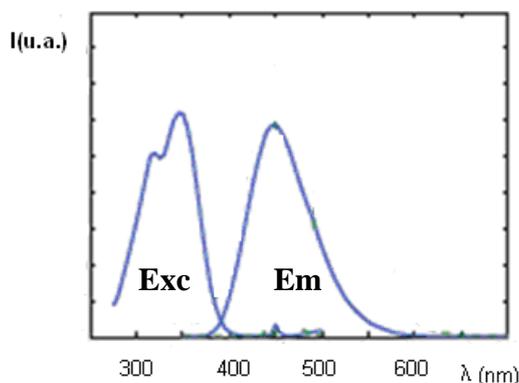


Fluorescence  
sous irradiation UV

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.



**Spectres d'émission et d'excitation du sulfate de quinine**

Compte tenu de l'ordonnance sur les denrées alimentaires (ODAI) 1<sup>er</sup> 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 ( $C_{40}H_{48}N_4O_4$ ,  $H_2SO_4$ ,  $2H_2O$ ).

## 2- 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.

## 3- Mode opératoire

### a) Préparation d'une solution B de quinine

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

Mettre 5ml (pipette) de la solution A dans une fiole jaugée de 500 ml, compléter au trait de jauge avec  $HNO_3$  (0,01M). Bien agiter pour homogénéiser: c'est la solution B.

- Calculer la concentration molaire  $C_A$  de la solution A.
- En déduire la concentration molaire  $C_B$  de la solution B.

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

## b) Préparation des solutions étalons

A partir de la solution B préparer 10 solutions étalons.

Pour cela mettre  $V_B$ (ml) de la solution B dans une fiole jaugée de 100ml, compléter au trait de jauge avec  $\text{HNO}_3$  (0,01M) (**utiliser 2 burettes**: une pour mesurer  $V_B$  et l'autre pour compléter avec  $\text{HNO}_3$  (0,01M)). Bien agiter les 10 fioles pour homogénéiser. Laisser reposer 30min.

Pour éviter les erreurs numéroter les fioles comme indiqué au tableau de mesures ci-dessous:

Etalon N° :	Blanc	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$V_B$ (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.)											

$\text{HNO}_3$  (0,01M) sera utilisé comme blanc pour régler le zéro de fluorescence.

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

## c) Préparation de la solution à doser

Diluer la boisson gazeuse avec  $\text{HNO}_3$  (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  $\text{HNO}_3$  (0,01M). Bien agiter pour homogénéiser: c'est la solution F,
- mettre 10ml de la solution F dans une fiole jaugée de 100ml,
- compléter avec  $\text{HNO}_3$  (0,01M). Bien agiter pour homogénéiser: c'est la solution X.

## d) Mesures de fluorescence

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

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

- 1- Mettre la lampe en marche en premier.
- 2- Mettre ensuite l'appareil en marche.
- 3- Attendre 30minutes avant de commencer les mesures.
- 4- Ajuster la longueur d'onde d'émission  $\lambda_{\text{Now}}$  à 450 nm: pour cela utiliser le bouton **▲/Gain** pour augmenter  $\lambda_{\text{Now}}$  et le bouton **▼/adj** pour diminuer  $\lambda_{\text{Now}}$ . Puis valider en appuyant sur  $\lambda_{\text{para}}$ .
- 5- Mettre le blanc dans une cuve en quartz (4faces transparentes), sécher les faces externes de la cuve et la placer dans le compartiment échantillon. Fermer le compartiment échantillon.
- 6- Appuyer sur le bouton **mode**: la lampe indiquant la fluorescence s'allume. Régler le zéro en appuyant sur le bouton **▼/adj**.
- 7- Mettre la solution la plus concentrée dans une 2<sup>ème</sup> cuve, sécher les faces externes de la cuve et la placer dans le compartiment échantillon. Fermer le compartiment échantillon.

- 8- Régler la sensibilité de façon à ce que la fluorescence se situe entre 20 et 50: pour cela appuyer sur le bouton **▲/Gain**. La sensibilité ou le gain peut être augmenté par pas de 0 à 7.
- 9- Refaire le réglage du zéro avec le blanc.
- 10- Mesurer la fluorescence des différents étalons, compléter le tableau de mesures.
- 11- Mesurer la fluorescence  $F_X$  de la solution X: faire 3 mesures en vidant et remplissant de nouveau la cuve avec la solution X.

### Résultats

- 1- Tracer la courbe représentant la fluorescence  $F$  des étalons en fonction de la concentration  $C_{\text{étalon}}$ .
- 2- Déterminer graphiquement la concentration molaire  $C_X$  en quinine de la solution X.
- 3- Calculer la concentration molaire  $C_F$  en quinine de la solution F.
- 4- Calculer la concentration molaire  $C_{\text{boisson}}$  en quinine de la boisson.
- 5- Calculer la concentration massique  $C'_{\text{boisson}}$  de la boisson en hydrochlorure de quinine dihydraté.

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

- 6- Comparer la valeur trouvée à celle indiquée par l'ordre sur les denrées alimentaires (ODAI).

### 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