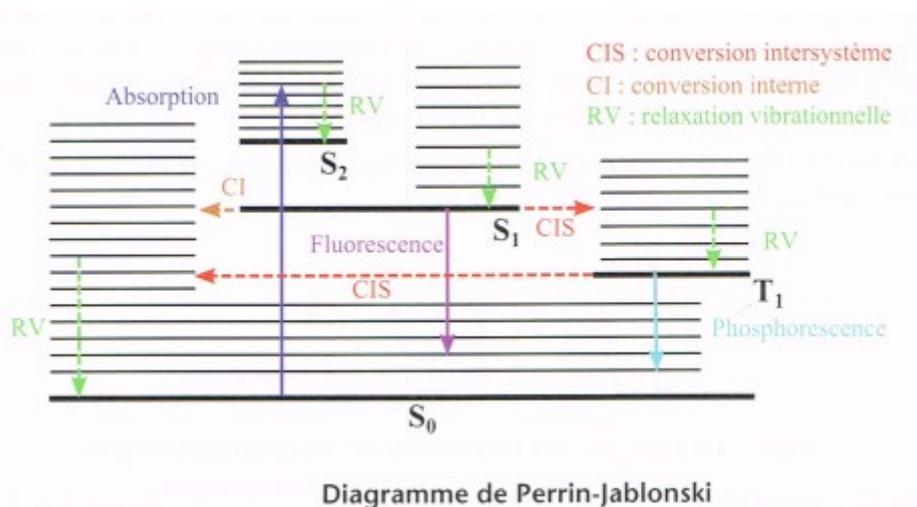


## TP 3 - Spectroscopie de Fluorescence

### *Etude de l'aspirine*

#### I/ Rappels sur la Spectroscopie de Fluorescence

Les spectroscopies UV-visible et de fluorescence sont des spectroscopies électroniques, c'est à dire que la molécule change d'état électronique lors de son interaction avec le rayonnement électromagnétique. Son évolution peut être décrite à l'aide du diagramme de Perrin-Jablonski ci-dessous.



Dans le cas de la spectroscopie UV-visible, l'absorption d'un photon provoque la transition de la molécule d'un état électronique fondamental (noté  $S_0$ ) vers un état électronique excité (notés  $S_1$  et  $S_2$ ). Ces états excités sont généralement peu stables, et la molécule retourne à l'état fondamental. Elle dispose pour ce faire de plusieurs voies de désexcitation, dont certaines sont radiatives, c'est à dire qu'elles provoquent l'émission d'un photon. Lorsque cette émission a lieu à partir d'un état électronique de même symétrie que l'état fondamental (états  $S_1$  et  $S_2$  sur la figure), on parle de fluorescence (spectroscopie d'émission). La longueur d'onde ré-émise par la molécule excitée peut être de même longueur d'onde (fluorescence de résonance) ou de longueur d'onde plus grande. Le fait que la longueur d'onde d'émission soit plus grande provient du fait que, dans les milieux liquides en particulier, la molécule retourne à l'état fondamental à partir du niveau de vibration le plus bas de l'état excité. Cette différence est appelée déplacement de Stokes.

La désexcitation peut également se faire par voie non radiative (conversion interne - CI) ou via un état électronique de symétrie différente de celle de l'état fondamental (état  $T_1$ , croisement intersystème - CIS). Une fois la molécule dans l'état  $T_1$ , une désexcitation radiative donne lieu au phénomène de phosphorescence qui suppose lui aussi l'émission d'un photon.

L'absorption se produit en général en  $10^{-15}$ s. La conversion interne est aussi très rapide ( $10^{-12}$ s), alors que les durées de vie de fluorescence sont généralement comprises entre  $10^{-10}$  à  $10^{-5}$ s.

La fluorescence est donc l'un des nombreux mécanismes par lequel une molécule revient à l'état fondamental après avoir été excitée par absorption d'un rayonnement. Toutes les molécules absorbantes sont donc potentiellement fluorescentes, mais la plupart ne le sont pas car leur structure est telle que la relaxation non rayonnante se produit plus rapidement que l'émission de fluorescence. Le rendement quantique de fluorescence moléculaire est le rapport entre le nombre de molécules fluorescentes et le nombre total de molécules excitées, ou le rapport entre les photons émis et les photons absorbés. Des molécules très fluorescentes comme la fluorescéine ont des rendements quantiques proches de l'unité dans certaines conditions. Le rendement quantique des molécules non fluorescentes est pratiquement nul.

Les composés qui contiennent des noyaux aromatiques produisent l'émission de fluorescence la plus intense et donc la plus utilisée. Certains composés carbonylés et aliphatiques et alicycliques, ainsi que des structures à nombreuses doubles liaisons conjuguées, sont aussi fluorescents, mais ils sont beaucoup moins nombreux que les molécules qui contiennent des systèmes aromatiques. Les expériences montrent que la fluorescence est particulièrement favorisée dans les molécules rigides et le rendement quantique augmente avec le nombre de cycles. De plus, la substitution affecte souvent l'efficacité de la fluorescence. Enfin, dans la plupart des molécules, le rendement quantique de fluorescence diminue lorsque la température augmente parce que l'accroissement de la fréquence des collisions à température élevée augmente la probabilité de relaxation par collision. La diminution de viscosité du solvant conduit au même résultat.

## II/ Manipulation

**Attention ! : Sujets allergiques à l'aspirine, manipulez avec des gants !!!**

### PARTIE I :

#### *Détermination du rendement quantique de fluorescence de l'aspirine*

Les rendements quantiques sont habituellement mesurés par comparaison avec un composé standard, c'est à dire un composé dont le rendement quantique est parfaitement connu dans la littérature. Nous choisirons ici le sulfate de quinine pour lequel  $\phi_F = 0,546$  à 20°C dans une solution d'acide sulfurique à 0,5 mole/L.

Afin de minimiser les erreurs expérimentales, il est préférable de choisir un standard excitable à la même longueur d'onde que le composé étudié et dont le spectre d'émission couvre une zone de longueurs d'onde comparable.

Les spectres de fluorescence du composé et du standard référent doivent être enregistrés pour des solutions relativement diluées ( $A < 0,1$ ) de sorte à minimiser les risques de réabsorption de la lumière, ce qui fausserait les résultats expérimentaux, et dans des conditions expérimentales identiques (même cuve

en quartz, même longueur d'onde d'excitation, mêmes largeurs de fentes d'excitation et d'émission, même température, etc).

Si les solvants utilisés pour le composé et le standard sont différents, il est nécessaire d'introduire une correction d'indice de réfraction :

$$\frac{\phi_F}{\phi_{F_{ref}}} = \frac{n^2 \int_0^\infty F(\lambda_F) d\lambda_F}{n_{ref}^2 \int_0^\infty F_{ref}(\lambda_F) d\lambda_F}$$

avec  $\phi_F$  le rendement quantique du composé étudié,  
 $n$  l'indice de réfraction du milieu,  
 $F(\lambda_F)$  la variation d'intensité de fluorescence par unité de longueur,  
 $ref$  l'indice qui se réfère à la solution de référence.

Or l'intensité de fluorescence  $I_f$  s'exprime selon l'expression suivante

$$I_f = k F(\lambda_F) I_0(\lambda_E) [1 - 10^{-A(\lambda_E)}]$$

avec  $\lambda_E$  la longueur d'onde d'excitation,  
 $\lambda_F$  la longueur d'onde d'émission,  
 $I_0$  l'intensité de la lumière incidente pénétrant dans l'échantillon,  
 $A(\lambda_E)$  l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation.

En remplaçant  $F(\lambda_F)$  par son expression, on obtient l'équation suivante

$$\phi_F = \phi_{F_{ref}} \frac{n^2 \int_0^\infty I_F d\lambda_F}{n_{ref}^2 \int_0^\infty I_{F_{ref}} d\lambda_F} \frac{1 - 10^{-A_{ref}(\lambda_E)}}{1 - 10^{-A(\lambda_E)}}$$

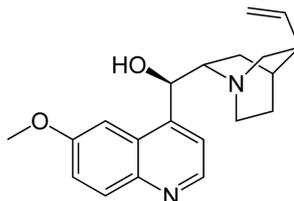
où  $\int_0^\infty I_F d\lambda_F$  représente l'aire sous la courbe de fluorescence.

Il convient de remarquer que la précision dans la détermination d'un rendement quantique de fluorescence peut difficilement être meilleure que 5-10% en raison de l'accumulation de petites erreurs et artéfacts inévitables.

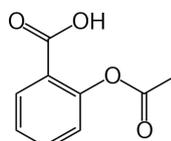
## Enregistrement des spectres

Deux solutions aqueuses vous sont fournies :

- solution A\* : sulfate de quinine ( $2,55 \cdot 10^{-5}$  mole/L) dans de l'acide sulfurique à 0,5 mol/L



- solution B\* : acide acétylsalicylique ( $5,55 \cdot 10^{-5}$  mole/L ;  $M = 180,06$  g/mole) dans de la soude à 0,1 mol/L



\* 100 mg dans 100 mL puis dilution au 1/100<sup>ème</sup>.

1) Réaliser et superposer les spectres UV de ces deux solutions entre 260 et 420 nm dans des cuves de 1 cm. Pointer les maxima et le point d'intersection à l'aide de "label cursor".

2) Réaliser et superposer les spectres de fluorescence de ces deux solutions dans les conditions suivantes :

- cuve en quartz de 1 cm
- longueur d'onde d'excitation : environ 310 nm (celle du point d'intersection notée précédemment)
- gamme d'émission : 320 - 650 nm
- largeur de fente d'excitation : 10
- largeur de fente d'émission : 0
- vitesse de balayage : 500 nm/mn.

Superposer les deux spectres et pointer les maxima à l'aide de "label peak" et mesurer l'aire sous les courbes à l'aide de "arithmetic".

3) Mesurer les indices de réfraction des deux solutions à 20°C.

### **Exploitation des mesures**

1) Déterminer les déplacements de Stokes,  $\lambda_{\max}$  et  $\epsilon_{\max}$  de ces deux composés et la nature des transitions observées.

2) Déterminer le rendement quantique de fluorescence de l'aspirine (acide acétylsalicylique) à 20°C.  
Conclusion.

## **PARTIE II :**

### ***Dosage de l'aspirine dans un sachet de Kardégic® par étalonnage externe***

L'aspirine, ou acide acétylsalicylique, utilisée depuis plus d'un siècle, est le médicament le plus vendu au monde. C'est un antalgique (diminution de la douleur), antipyrétique (diminution de la fièvre), anti-inflammatoire non stéroïdien, et un antiagrégant plaquettaire (empêche la coagulation du sang).

Elle est présente dans le Kardégic® est sous la forme d'acétylsalicylate de lysine, dont 1,8 g équivaut à 1 g d'acide acétylsalicylique.

Préparer les solutions suivantes :

- solution B (fournie) : 100 mg d'acide acétylsalicylique dissouts dans 100 mL de soude à 0,1 mol/L.
- solution C : un seul binôme se charge de préparer la solution C pour toute la séance. Peser précisément le contenu du sachet de Kardégic® fourni puis le dissoudre dans une fiole de 100 mL avec une solution aqueuse de soude à 0,1 mol/L,

puis les mélanges suivants :

fiolle N°	1	2	3	4	5	6	7	8
volume de solution B ( $\mu\text{L}$ )	10	20	30	40	50	60	70	-
volume de solution C ( $\mu\text{L}$ )	-	-	-	-	-	-	-	40
volume de soude à 0,1 mol/L	QSP 10 mL							

### **Enregistrement des spectres**

Enregistrer et superposer les spectres de fluorescence de ces solutions (faire 3 enregistrements de la fiole N°8) dans les conditions suivantes :

- cuve en quartz de 1 cm
- longueur d'onde d'excitation : 310 nm
- gamme d'émission : 320 - 600 nm
- largeur de fente d'excitation : 10
- largeur de fente d'émission : 0
- vitesse de balayage : 500 nm/mn,

et mesurer l'intensité de fluorescence au maximum d'émission.

### **Exploitation des mesures (seuil de risque des différents tests statistiques : 5%)**

1) Ecrire les réactions de dissolution de l'aspirine et du Kardégic® en solution aqueuse basique. Justifier la correspondance annoncée en introduction de cette partie du TP.

2) Dresser un tableau des résultats des mesures d'intensité de fluorescence en fonction de la masse d'acide acétylsalicylique dans les fioles. Détailler un calcul.

3) Tracer la courbe correspondante sur papier millimétré et en déduire la valeur de la concentration correspondant à la limite supérieure du domaine de linéarité (LL) si cela est possible.

4) A partir des valeurs appartenant au domaine de linéarité, vérifier l'existence d'une corrélation linéaire entre la teneur en aspirine et l'intensité de fluorescence.

5) A l'aide des tests statistiques appropriés, montrer si le modèle de régression est une RLS/MMCC ou une RLS/MMCF(0,0) puis déterminer l'équation de la droite de régression.

6) Déterminer les équations des droites d'incertitude, les tracer sur le graphe précédent et dire s'il existe ou non des points aberrants. Rectifier l'équation précédente si nécessaire.

7) Déterminer les limites de détection (LD) et de quantification (LQ).

8) Déterminer la teneur en aspirine provenant du Kardégic® (en  $\mu\text{g/mL}$ ) dans la fiole ainsi que la précision sur ce résultat au niveau de confiance de 95%. Vérifier que ces valeurs soient bien au-dessus de la LQ.

9) En déduire la masse d'aspirine dans le sachet de Kardégic<sup>®</sup> ainsi que la masse de Kardégic<sup>®</sup> correspondante. Comparer la masse d'aspirine à celle indiquée sur le sachet (160 mg) et la masse de Kardégic<sup>®</sup> à la pesée initiale.