

Travaux pratiques de base pour une formation expérimentale à la fluorescence moléculaire

Michel Aubailly

Abstract **Basic experiments for a practical approach of molecular fluorescence**

Using salicylic acid, basic properties of molecular fluorescence are presented through simple experiments: emission and excitation spectra, Raman and Rayleigh diffusion. Application to analysis is illustrated by salicylic acid determination in pharmaceuticals.

Mots-clés

Spectres de fluorescence, dosage de l'acide salicylique, diffusion Raman.

Key-words

Fluorescence spectra, determination of salicylic acid, Raman diffusion.

Parmi les molécules absorbant la lumière UV ou visible, certaines ont la propriété de réémettre une partie de l'énergie absorbée sous forme de lumière de plus grande longueur d'onde, c'est le phénomène de fluorescence moléculaire. Ce processus est souvent décrit dans les manuels de chimie physique et de chimie organique du 2^e cycle universitaire et les ouvrages traitant de manière détaillée ses aspects théoriques sont assez faciles à trouver. Par contre, l'application de la fluorescence à l'analyse chimique est plus rarement abordée et les documents de langue française traitant cet aspect sont peu nombreux à notre connaissance [1-2]. Souvent ils resteront insuffisants pour comprendre la méthodologie de travail suivie et trouver les conditions correctes de mise en œuvre d'un dosage fluorimétrique.

Le but de cet article est de présenter de manière expérimentale les propriétés de base de la fluorescence moléculaire et d'illustrer son application par l'analyse d'une spécialité pharmaceutique. Il s'adresse avant tout aux techniciens chimistes ou biochimistes, et éventuellement aux pharmaciens et ingénieurs qui n'auraient pas reçu de formation expérimentale à cette technique d'analyse. Il pourra également intéresser les enseignants de TP de l'université.

Les manipulations qui suivent sont effectuées pour l'essentiel dans les licences professionnelles de « chimie analytique » et « protection de l'environnement (option traitement et analyse de l'eau) » à l'IUT d'Orsay (université Paris 11), dans une séance de TP de 5 heures. Cette durée est modulable en fonction de l'appareillage, du nombre d'étudiants et selon que la présentation de la technique et la rédaction du compte rendu sont incluses ou non dans la séance. On peut aussi ne faire qu'une partie des manipulations proposées.

La fluorescence et son application à l'analyse chimique

L'émission de fluorescence

La fluorescence est produite principalement par des molécules organiques, possédant un grand nombre de

double liaisons conjuguées (liaisons π). L'émission de fluorescence se produit selon le mécanisme qui suit. L'absorption de lumière provoque le passage d'un électron de la plus haute orbitale moléculaire occupée (HO), généralement de type π , vers la plus basse orbitale moléculaire vide (BV), généralement de type π^* . La molécule passe ainsi d'un état fondamental d'énergie électronique E_0 (au niveau d'énergie vibrationnelle le plus bas) à un état excité d'énergie électronique E_1 (sur un niveau d'énergie vibrationnelle quelconque). La molécule revient ensuite sur le niveau vibrationnel le plus bas de l'état excité par perte d'énergie thermique (désactivation non radiative), puis revient sur un niveau vibrationnel quelconque de l'état fondamental, soit par perte d'énergie thermique, soit par émission d'énergie lumineuse ($h\nu_F$), appelée fluorescence. Ces processus sont résumés sur le diagramme simplifié de la figure 1 (diagramme dit de Jablonski).

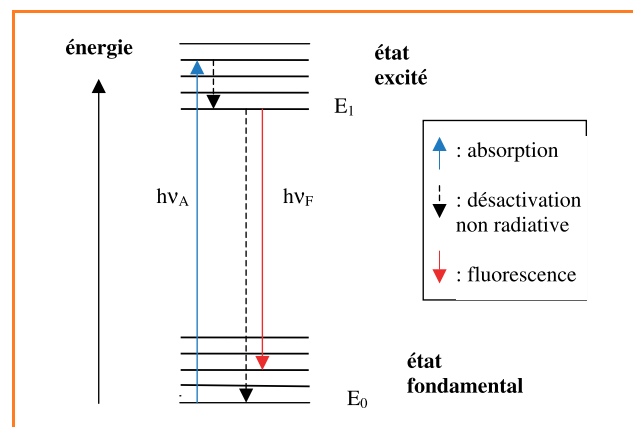


Figure 1 - Diagramme dit de Jablonski.

L'inégalité $h\nu_F < h\nu_A$ entraîne que $\lambda_F > \lambda_A$: le spectre de fluorescence est déplacé vers les grandes longueurs d'onde par rapport au spectre d'absorption (déplacement de Stokes).

L'existence de deux mécanismes de perte d'énergie de l'état excité conduit à définir un rendement quantique de

fluorescence ϕ_F . Il est égal au rapport entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés, et donc compris entre 0 et 1. Les molécules les plus fluorescentes (fluorescéine, rhodamine B) ont des rendements proches de l'unité. Notons que pour un composé donné, en solution aqueuse, ϕ_F peut dépendre du pH.

Dispositif expérimental

En général, la solution étudiée est placée dans une cuve de quartz parallélépipédique de section carrée (1 cm x 1 cm). La lumière fournie par une lampe au xénon traverse un monochromateur dit d'excitation et arrive sur la cuve avec une intensité I_0 . L'échantillon émet alors une fluorescence dans toutes les directions. Celle-ci est observée perpendiculairement à l'excitation pour ne pas être gênée par la lumière incidente transmise dont l'intensité I_t est beaucoup plus intense. Après passage dans un monochromateur dit d'émission, elle est mesurée par un photomultiplicateur. On aboutit au schéma de principe de la figure 2.

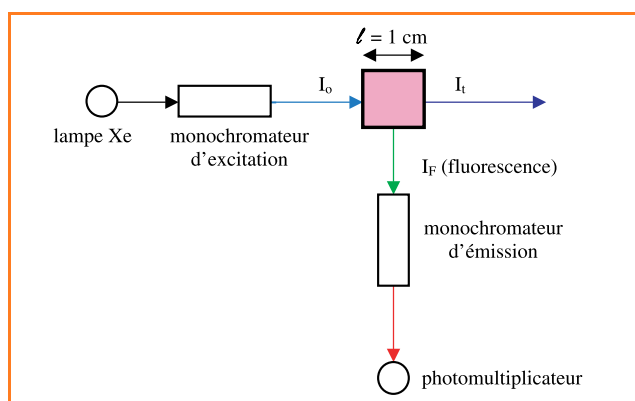


Figure 2 - Dispositif expérimental.

Intensité de fluorescence et concentration

Par définition du rendement quantique de fluorescence ϕ_F , l'intensité de fluorescence I_F est proportionnelle à l'intensité absorbée I_A .

$$I_F = \phi_F I_A = \phi_F (I_0 - I_t)$$

D'après la loi de Beer Lambert, $I_t = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon l c}$

avec $\varepsilon l c = A$ (absorbance),

ε ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$) : coefficient d'extinction molaire,

l (cm) : trajet optique,

c ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) : concentration molaire,

d'où $I_F = \phi_F I_0 (1 - 10^{-\varepsilon l c})$

Pour des solutions très diluées, $10^{-\varepsilon l c} = e^{-2,3 \varepsilon l c} \approx 1 - 2,3 \varepsilon l c$

d'où $I_F = 2,3 \phi_F I_0 \varepsilon l c$

Cette linéarité avec la concentration est observée en pratique pour des absorbances faibles, soit $A \leq 0,05$ (cf [3] et ci-après). L'intensité de fluorescence est donc proportionnelle à la concentration c de la molécule fluorescente d'où l'application à l'analyse chimique. Les lampes utilisées en fluorescence (lampe au xénon de 150 W le plus souvent) sont environ 100 fois plus puissantes que les lampes au deutérium utilisées pour l'absorption [4]. Ainsi, l'utilisation de sources lumineuses puissantes (I_0 élevé) permet de mesurer des concentrations bien plus faibles que celles déterminées par spectrophotométrie d'absorption : on peut atteindre ainsi, selon les composés, des concentrations de 2 à $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (ou ppb) [4], soit de l'ordre de $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

La lumière excitatrice, fournie par la source au xénon, traversant un monochromateur avant d'arriver sur l'échantillon, est donc sensiblement monochromatique de longueur d'onde λ_0 . L'intensité de fluorescence I_F est donc une fonction de λ_0 selon la relation :

$$I_F(\lambda_0) = 2,3 \phi_F I_0(\lambda_0) \varepsilon(\lambda_0) l c$$

Le spectre d'excitation est la représentation des variations de I_F avec λ_0 (il traduit en quelque sorte l'efficacité de λ_0 à produire la fluorescence). Il ne sera identique au spectre d'absorption (donné par ε) que dans un domaine où $I_0(\lambda_0)$ varie peu.

Quelques travaux pratiques de base illustrant les propriétés de la fluorescence et son application à l'analyse chimique

Pour cette étude, nous utiliserons l'acide salicylique (acide 2-hydroxybenzoïque) et nous terminerons par son dosage dans une spécialité pharmaceutique.

Produits et matériels

- Spectrofluorimètre Biotek Kontron SFM 25, équipé de cuves en quartz pour fluorescence,
- Spectrophotomètre UV-visible,
- Balance de précision à 0,1 mg,
- Bêchers de 50 mL,
- Fioles jaugées de 20 mL et 50 mL,
- Pipettes graduées de 1 mL et de 1 mL graduée tous les 0,01 mL (ou mieux micropipette à piston de volume réglable entre 200 μL et 1 000 μL),
- Acide salicylique 99 % (toxique), 9,6 € les 100 g,
- Tampon phosphate pH = 7,00,
- Éthanol,
- Synthol[®], 4,5 € les 225 mL (en pharmacie).

Spectre d'absorption moléculaire

On prépare d'abord une solution mère d'acide salicylique de concentration $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dans l'eau permutée (ou mieux distillée). Sachant que $M = 138 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$, on pèse 69 mg d'acide salicylique, on ajoute 1 mL d'éthanol pour dissoudre l'ensemble, puis 20 mL d'eau chaude. On laisse refroidir et on complète à 50 mL avec de l'eau dans une fiole jaugée. A partir de cette solution mère, on prépare une solution F_0 $2 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dans un tampon phosphate de concentration $0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH = 7,0). Le spectre d'absorption (figure 3) montre un maximum à 295 nm ($A \approx 0,74$) pour la première bande, ce qui conduit à choisir une longueur d'onde située dans cette zone pour produire (ou exciter) la fluorescence.

Spectre d'émission de fluorescence

Pour être dans les conditions de linéarité de l'intensité de fluorescence avec la concentration, soit $A \leq 0,05$, préparer une solution $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ d'acide salicylique dans le tampon phosphate $0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Tracer deux spectres d'émission, l'un après excitation à 310 nm et l'autre après excitation à 290 nm. Dans cette opération, le monochromateur d'excitation est fixe et c'est le monochromateur d'émission qui travaille. Qu'observe-t-on sur les spectres obtenus figure 4 ?

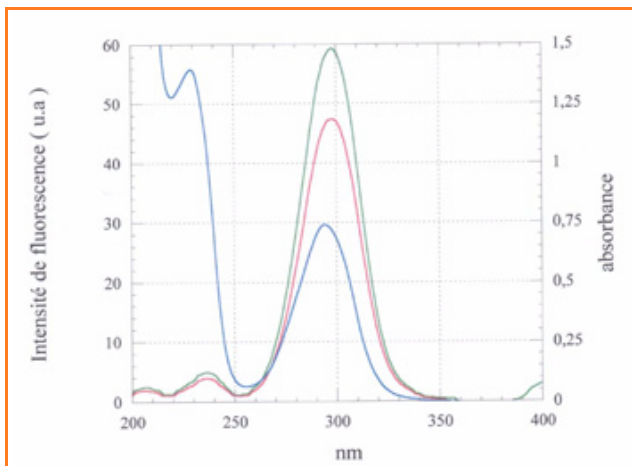


Figure 3 - Spectre d'absorption (—) de l'acide salicylique de concentration $2,10^{-4}$ mol.L $^{-1}$ (cuve d'épaisseur 1 cm). Spectres d'excitation de fluorescence de l'acide salicylique 10^{-5} mol.L $^{-1}$ (— $\lambda_{ém} = 400$ nm, — $\lambda_{ém} = 430$ nm). Intensités de fluorescence en unités arbitraires (u.a.). Milieu tampon phosphate pH = 7.

- Ils ont les mêmes caractéristiques (maximum à 409 nm et largeur à mi-hauteur de 57 nm). La forme du spectre de fluorescence ne dépend donc pas du choix de la longueur d'onde d'excitation. Cette propriété est caractéristique de la présence d'un composé fluorescent unique (différence avec un mélange ou avec la diffusion, voir ci-après). Ce résultat est tout à fait en accord avec le diagramme énergétique de Jablonski dans lequel l'émission se fait toujours à partir du niveau vibrationnel le plus bas de l'état excité.

- On vérifie bien que le spectre d'émission de fluorescence est déplacé vers les grandes longueurs d'onde par rapport au spectre d'absorption.

Spectres d'excitation de fluorescence

Avec la même solution, se placer à $\lambda_{ém} = 400$ nm et tracer le spectre d'excitation. Faire de même pour $\lambda_{ém} = 430$ nm. Cette fois-ci, le monochromateur d'émission est fixe et c'est le monochromateur d'excitation qui travaille. Quelles conclusions peut-on tirer des spectres obtenus (figure 3) ?

- La forme du spectre d'excitation ne dépend pas du choix de la longueur d'onde d'émission et ce pour la même raison que pour le tracé des spectres d'émission.

- Le spectre d'excitation présente deux maxima à 298 nm et 236 nm, qui correspondent à peu près aux maxima du spectre d'absorption (295 et 228 nm). A noter que le maximum à 236 nm a une intensité beaucoup plus faible qu'à 298 nm, alors que la situation est inverse pour le spectre d'absorption. Ce phénomène est dû à la chute rapide de l'intensité I_0 de la lampe xénon au-dessous de 270 nm [5]. Si on prend en compte les variations de I_0 , spectres d'excitation et spectres d'absorption coïncident en général [5].

Les artéfacts : diffusions Rayleigh et Raman

L'excitation du solvant *seul* produit une émission de lumière, c'est la diffusion. On l'interprète de la manière suivante : lorsque le photon incident heurte une molécule d'eau, il est renvoyé dans toutes les directions, soit avec la même énergie (c'est la diffusion Rayleigh de même longueur d'onde

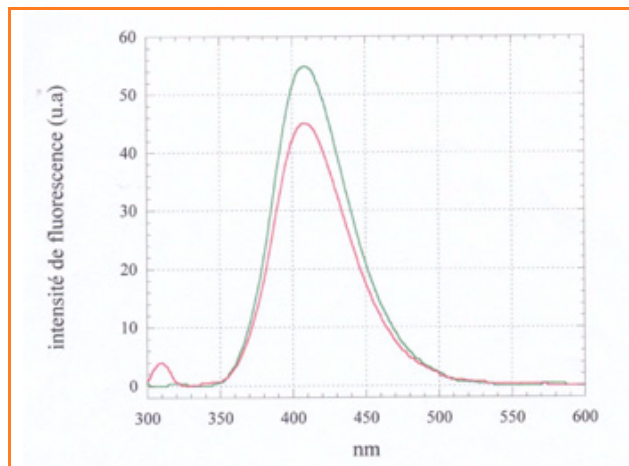


Figure 4 - Spectres d'émission de fluorescence de l'acide salicylique 10^{-5} mol.L $^{-1}$ (— $\lambda_{exc} = 290$ nm, — $\lambda_{exc} = 310$ nm). Milieu tampon phosphate pH = 7.

que la lumière incidente), soit avec une énergie plus faible (c'est la diffusion Raman de longueur d'onde plus petite que la lumière incidente). Dans ce dernier cas, la molécule d'eau a absorbé une partie de l'énergie du photon incident qui apparaît sous forme d'énergie vibrationnelle de la liaison OH. Ceci conduit à la relation :

$$h\nu_{\text{Rayleigh}} - h\nu_{\text{Raman}} = h\nu_{\text{OH}}$$

$$\text{soit } 1/\lambda_{\text{Rayleigh}} - 1/\lambda_{\text{Raman}} = \sigma_{\text{OH}}$$

Tracer les spectres de diffusion après excitation à 290 nm et 310 nm par exemple (figure 5).

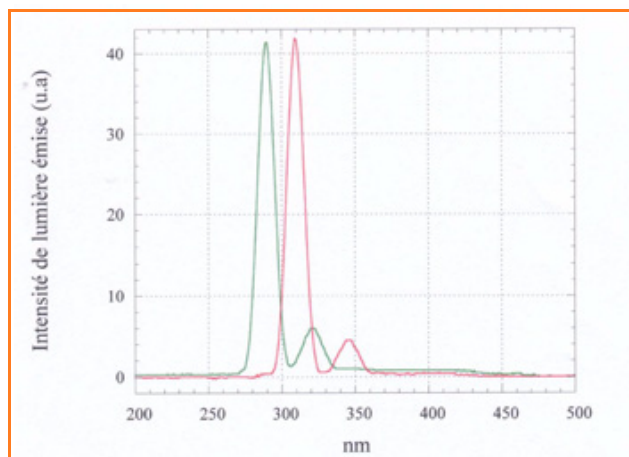


Figure 5 - Spectres d'émission de la diffusion du tampon seul (sensibilité x 10) (— $\lambda_{exc} = 290$ nm, — $\lambda_{exc} = 310$ nm).

- On observe que cette fois-ci les spectres obtenus dépendent du choix de la longueur d'onde d'excitation (ce qui les différencie de la fluorescence d'un composé pur) avec des diffusions Raman relevées à 321 nm et 346 nm respectivement.

- La diffusion Raman a une intensité nettement plus faible que la diffusion Rayleigh.

- On vérifie que $1/\lambda_{\text{Rayleigh}} - 1/\lambda_{\text{Raman}} = \text{constante}$ ($3\,343\text{ cm}^{-1} \pm 13\text{ cm}^{-1}$ dans notre cas, valeur tout à fait compatible avec la valeur moyenne admise de

$3\,380\text{ cm}^{-1}$ [5], compte tenu de l'incertitude de 1 nm environ sur les longueurs d'onde affichées).

On ne peut s'affranchir de la diffusion, et c'est elle qui limite la sensibilité de la méthode. En choisissant judicieusement la longueur d'onde d'excitation, on pourra déplacer la diffusion pour qu'elle perturbe le moins possible la fluorescence étudiée.

Dosage de l'acide salicylique dans une spécialité pharmaceutique

Pour illustrer l'utilisation de la fluorescence en analyse chimique, nous doserons l'acide salicylique dans une spécialité pharmaceutique d'usage courant, le Synthol[®]. En préliminaire, on pourra proposer aux étudiants les activités suivantes :

- Rechercher dans un catalogue de produits chimiques les formules des principaux composants que renferme le produit analysé.
- Est-ce qu'il contient d'autres substances absorbant la lumière, donc susceptibles de perturber le spectre d'absorption de l'acide salicylique ?
- Calculer leur concentration molaire à partir de la notice accompagnant le produit.
- Diluer le Synthol[®] 50 fois dans le tampon phosphate pour tracer son spectre d'absorption. Observe-t-on la présence de composants autres que l'acide salicylique et chevauchant son spectre d'absorption ? Dans l'affirmative, il peut être intéressant de doser l'acide salicylique par fluorescence.

On prépare une gamme de solutions filles F_1, F_2, F_3, F_4, F_5 , en introduisant un volume V (mL) de la solution F_0 à $2,10^{-4}\text{ mol.L}^{-1}$ dans des fioles jaugées de 20 mL et en complétant au volume avec le tampon phosphate $0,01\text{ mol.L}^{-1}$ selon le *tableau I*.

	F_1	F_2	F_3	F_4	F_5
V (mL)	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Concentration (mol.L ⁻¹)	$2\,10^{-6}$	$4\,10^{-6}$	$6\,10^{-6}$	$8\,10^{-6}$	$10\,10^{-6}$

Pour chaque solution fille, on relève l'intensité de fluorescence émise à 409 nm après excitation à 295 nm. Comme attendu, la *figure 6* montre que la courbe d'étalonnage, intensité de fluorescence = $f(c)$, est bien une droite (à noter que la relation est encore linéaire pour une concentration de $20,10^{-6}\text{ mol.L}^{-1}$, ce qui correspond à une absorbance de 0,07 ; mais pour une absorbance de 0,15, l'écart avec la linéarité atteint 11 %).

Calculer d'après l'étiquette la concentration molaire théorique de l'acide salicylique dans le produit étudié. Diluer le Synthol[®] pour que la concentration finale de l'acide salicylique se trouve dans la gamme d'étalonnage de fluorescence. Tracer le spectre de fluorescence après

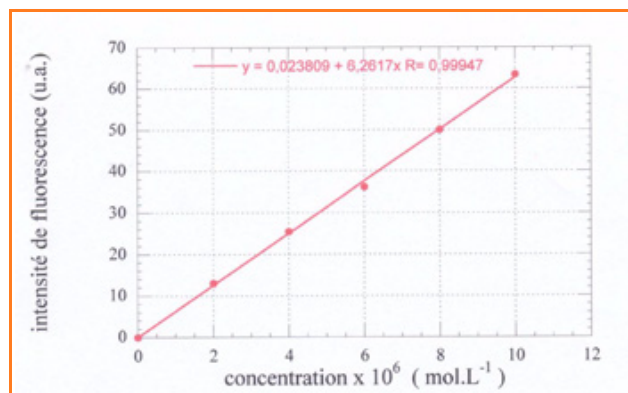


Figure 6 - Droite d'étalonnage pour le dosage de l'acide salicylique. $\lambda_{\text{exc}} = 295\text{ nm}$, $\lambda_{\text{ém}} = 409\text{ nm}$.

excitation à 295 nm et vérifier que dans la zone de mesure de la fluorescence du Synthol[®], soit 409 nm, le spectre observé est bien identique à celui de l'acide salicylique. Mesurer comme précédemment I_F , et en se reportant à la droite d'étalonnage, en déduire C . Calculer la concentration molaire, puis massique de l'acide salicylique dans le produit non dilué. Comparer à la valeur figurant sur le flacon. Conclusions.

Après avoir tenu compte de la densité de la solution ($d = 0,93$), les étudiants trouvent sur 15 mesures une valeur moyenne de $0,0107\text{ g}/100\text{ g}$ (écart type : $0,0005\text{ g}$), résultat acceptable en comparaison de la valeur affichée de $0,0105\text{ g}/100\text{ g}$ de solution.

Le même type de dosage peut être fait sur l'Eau précieuse[®].

Références

- [1] Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., *Chimie analytique* (trad. Buess-Herman C., Dauchot-Weymeers J., Dumont F.), De Boeck Université, 1997, p. 601.
- [2] Rouessac F. et A., *Analyse chimique. Méthodes et techniques instrumentales modernes* (5^e éd.), Dunod, Paris, 2000, p. 193.
- [3] Lakowicz J.R., *Principles of fluorescence spectroscopy*, Plenum press, New York, 1983, p. 44.
- [4] Guilbault G.G., *Practical fluorescence*, Marcel Dekker, New York, 1973.
- [5] Parker C.A., *Photoluminescence of solutions*, Elsevier, Amsterdam, 1968.



Michel Aubailly

est maître de conférences à l'IUT d'Orsay*.

* IUT d'Orsay, Université Paris-Sud, Plateau du Moulon, 91400 Orsay.
Tél. : 01 69 33 60 38. Fax : 01 69 33 60 33.
Courriel : michel.aubailly@wanadoo.fr

Vous avez un TP à nous proposer ?
N'hésitez pas à contacter la rédaction de L'Actualité Chimique.
Courriel : ac@sfc.fr