



**HAL**  
open science

# Intérêt de la méthode des ajouts dosés en spectroscopie UV-Visible d'absorption et d'émission : application aux boissons Tonic - Partie 2 : limites de la méthode de la droite d'étalonnage externe

Jonathan Piard

## ► To cite this version:

Jonathan Piard. Intérêt de la méthode des ajouts dosés en spectroscopie UV-Visible d'absorption et d'émission : application aux boissons Tonic - Partie 2 : limites de la méthode de la droite d'étalonnage externe. Le Bulletin de l'Union des Professeurs de Physique et de Chimie, 2022. hal-03929491

**HAL Id: hal-03929491**

**<https://hal.science/hal-03929491>**

Submitted on 26 Apr 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Intérêt de la méthode des ajouts dosés en spectroscopie UV-Visible d'absorption et d'émission : application aux boissons Tonic

## Partie B : Limites de la méthode de la droite d'étalonnage externe

Gif-sur-Yvette : 1 septembre 2021

par Jonathan PIARD et Srivaidehi SRIPATHY

Département de Chimie, ENS Paris-Saclay,  
4 avenue des Sciences 91190 Gif-sur-Yvette

[jonathan.piard@ens-paris-saclay.fr](mailto:jonathan.piard@ens-paris-saclay.fr)

[srivaidehi.sripathy@universite-paris-saclay.fr](mailto:srivaidehi.sripathy@universite-paris-saclay.fr)

*Cette étude a pour but de mettre en exergue la pertinence de l'utilisation de la méthode des ajouts dans le cas du dosage de la quinine dans des boissons Tonic et permettre de discuter avec les étudiant-e-s des effets de la matrice et des conditions de préparations de l'échantillon sur l'exactitude de la valeur obtenue pour la concentration en quinine. Pour cela, il est proposé d'analyser les résultats du dosage de plusieurs boissons Tonic par les méthodes de la droite d'étalonnage externe et des ajouts dosés tant en spectroscopie d'absorption que d'émission sans dilution des échantillons. Cet article constitue la deuxième partie de l'étude. Il consiste en la détermination des conditions opératoires optimales pour l'analyse des échantillons sans dilution et la discussion des effets de matrice sur les mesures en absorption et en émission.*

### 1. MÉTHODE DE LA DROITE D'ÉTALONNAGE EXTERNE

La méthode de la droite d'étalonnage externe est une méthode de dosage<sup>1</sup> d'une espèce chimique en solution. Un des critères pour que ces méthodes puissent être utilisées est l'existence d'une relation de linéarité entre le signal S (la réponse) et la concentration C (ou entre une fonction f(S) du signal et la concentration) :

$$S = kC \text{ (ou } f(S) = k'C)$$

Avec k et k' des constantes de proportionnalité.

Il arrive souvent que cette relation de linéarité ne soit valable que pour une gamme donnée de concentrations ou pour une gamme d'intensités du signal.

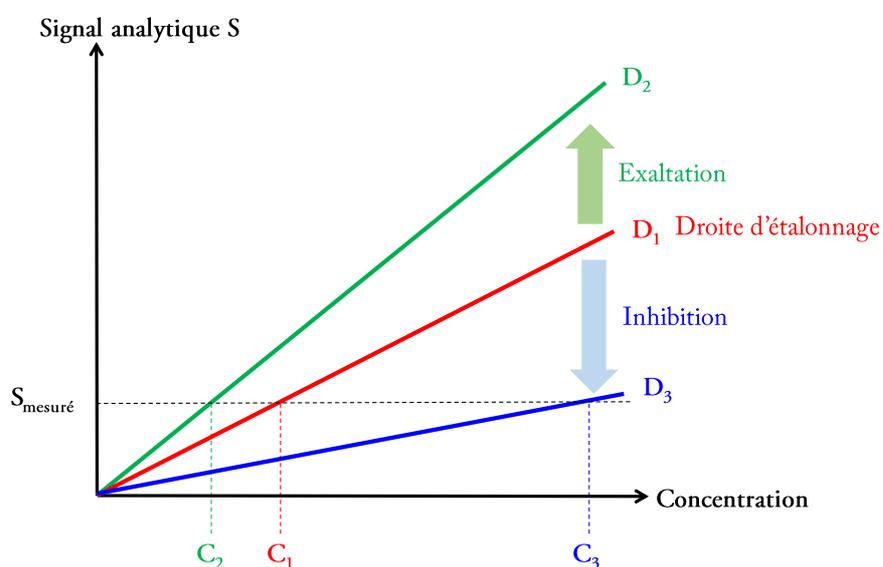
Pour effectuer un dosage par étalonnage externe en spectrophotométrie (respectivement spectrofluorimétrie), on réalise une droite d'étalonnage à la longueur d'onde du maximum d'absorption  $\lambda_{\max}$  (respectivement maximum d'émission  $\lambda'_{\max}$ ) à partir de la solution étalon à différentes concentrations de l'espèce d'intérêt ou analyte (que l'on souhaite doser) :  $A(\lambda_{\max}) = f(C)$  (respectivement  $I_f(\lambda'_{\max}) = f(C)$ ). Connaissant la valeur de l'absorbance au maximum d'absorption de l'échantillon  $A_{\text{éch}}(\lambda_{\max})$

---

<sup>1</sup> En chimie des solutions, on parle généralement de dosage lorsque le but de l'expérience consiste en la détermination de la concentration **exacte** d'une espèce chimique en solution. Le terme de dosage est dans ce cas utilisé au sens large et englobe la notion de titrage. Ce dernier constitue alors un cas particulier de dosage. Toutefois, dans un souci de rigueur, il est important de distinguer ces deux notions car celles-ci correspondent en réalité à de profondes différences d'approches et d'analyses. En effet, pour un **dosage**, on détermine la concentration d'un soluté par une **méthode non destructive** alors que pour un **titrage**, le soluté est **détruit** par une réaction chimique. Cette distinction sera effectuée dans cet article. A ce titre, la méthode des ajouts dosés au même titre que la méthode d'étalonnage constitue donc des méthodes de dosage.

(respectivement l'intensité de fluorescence  $I_{f_{\text{éch}}}(\lambda'_{\text{max}})$ ), il est possible de déterminer la concentration de l'espèce d'intérêt dans celui-ci.

La présence d'espèces physico-chimiques autres que l'espèce d'intérêt dans son environnement aussi appelé « matrice »<sup>2</sup> peut entraîner une modification notable (augmentation ou diminution) du signal  $S$  ( $A$  ou  $I_f$ ) donné par l'analyte en comparaison de celui obtenu lorsque celui-ci se trouve seul dans une solution étalon. Ceci conduit donc à un changement de la pente de la droite d'étalonnage et par voie de conséquence de la sensibilité de la méthode.<sup>3</sup> En effet, plus la pente est élevée et plus il sera facile de distinguer deux échantillons de concentrations voisines : la méthode est plus sensible. On parle d'effet « multiplicatif ». Si de telles perturbations existent, la droite  $D_1$  (Figure 1) issue de la méthode de la droite d'étalonnage n'est alors plus pertinente. L'environnement autour de l'analyte pour les solutions utilisées pour réaliser la droite d'étalonnage n'est plus représentatif de celui de l'échantillon étudié et la pente de la courbe est erronée. De plus lorsque la constitution de la matrice est inconnue (ou mal connue) ou très complexe, il est impossible pour l'expérimentateur de la reproduire et par conséquent de tracer une droite d'étalonnage qui prendrait en compte ses effets. Il apparaît alors que les perturbations induites par la matrice peuvent influencer sur la droite d'étalonnage et donc la valeur de la concentration mesurée par étalonnage inverse (Figure 1). Si tel est le cas, la méthode des ajouts dosés est alors la méthode de choix.



**Figure 1** - Influence d'une exaltation et d'une inhibition du signal sur la valeur de concentration mesurée.

Remarque :

Pour que cette méthode soit pertinente et tienne compte pleinement des effets de matrice, il ne faut pas que le milieu de mesure en l'absence d'analyte donne un signal. Il s'agirait alors d'un effet de matrice dit « additif », qui correspond à une translation verticale de la droite d'étalonnage. Cet effet n'est malheureusement ne peut être pris en compte que ce soit par la méthode de la droite d'étalonnage ou la méthode des ajouts dosés.

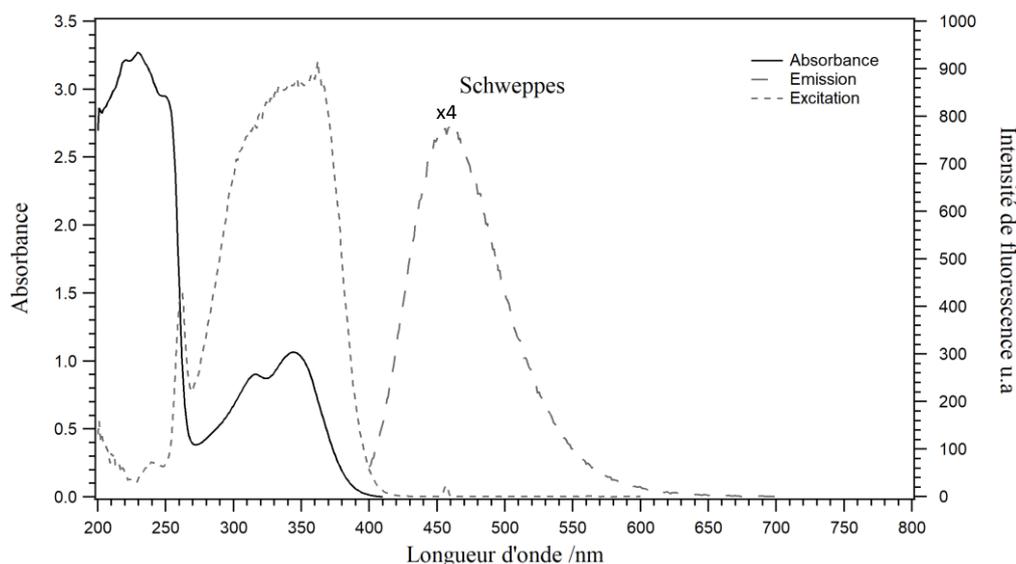
<sup>2</sup> Le terme de « matrice » se rapporte à l'ensemble de tous les constituants présents dans l'échantillon dont l'analyte.

<sup>3</sup> Si la courbe d'étalonnage n'est pas une droite, la sensibilité à une concentration donnée sera définie comme la pente de la tangente à la courbe à cette concentration.

## 2. ÉCHANTILLONS ANALYSÉS

### 2.1 Schweppes® non dilué

Les spectres d'absorption, d'émission de fluorescence et d'excitation<sup>4</sup> d'une solution de Schweppes® non dilué (ie issu directement de la bouteille) sont donnés sur la Figure 2. On retrouve les spectres d'absorption et d'émission de la quinine obtenue en pH acide dans la partie I de cet article. Le maximum d'absorption est situé à 345 nm et le maximum d'émission à 460 nm. On note donc un faible effet de la matrice sur la position et l'allure des spectres par rapport au sulfate de quinine notamment en émission. Le spectre d'excitation est situé au même endroit (bande entre 250 et 400 nm) que le spectre d'absorption (même si son allure est un peu différente à cause de l'effet de filtre interne en excitation)<sup>5</sup>. Ceci montre que la fluorescence du Schweppes® est uniquement due à la molécule de quinine. Le pH de la solution de Schweppes® est de 2,3 si bien qu'à ce pH, la quinine est à 100 % sous la forme  $\text{QH}_2^{2+}$  (cf partie A).



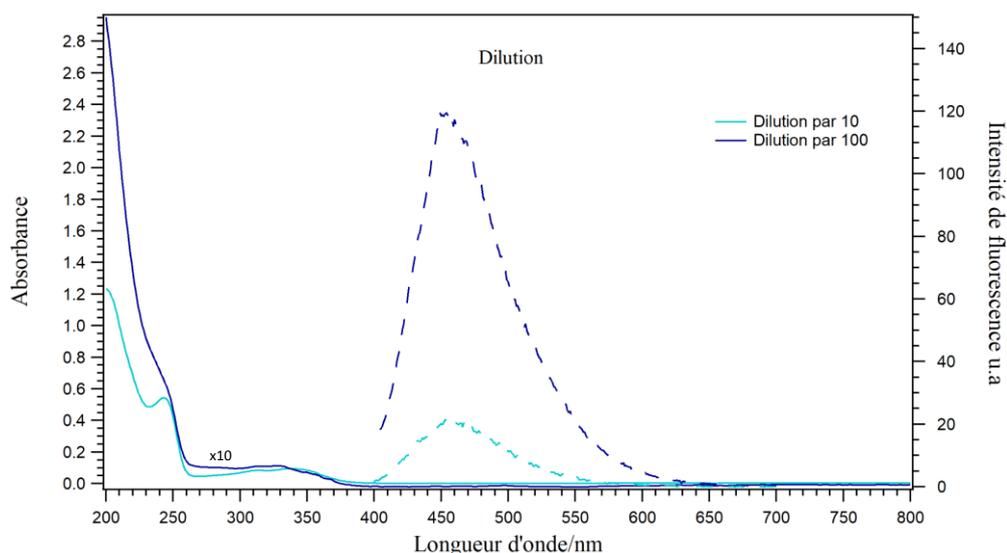
**Figure 2** - Spectres d'absorption, d'émission de fluorescence (x 4) et d'excitation d'une solution de Schweppes® non diluée ( $\lambda_{\text{exc}} = 390 \text{ nm}$  ; fente 2,5 nm /2,5 nm ; Détecteur 650 V pour le spectre d'émission -  $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$  pour le spectre d'excitation).

### 2.2 Schweppes® dilué dans l'eau

Les spectres d'absorption et d'émission de fluorescence de solutions de Schweppes® diluées par 10 et 100 dans l'eau distillée sont donnés sur la Figure 3. On retrouve les spectres d'absorption et d'émission de la quinine obtenus précédemment mais les pH respectifs de ces solutions à 2,9 et 3,6 permettent de montrer que la quinine est à 100 % sous la forme  $\text{QH}_2^{2+}$  selon le diagramme de distribution donné dans la partie A (98 % selon la courbe théorique) dans la solution diluée par 10 et à 90 % sous la forme  $\text{QH}_2^{2+}$  et 10 % sous la forme  $\text{QH}^+$  pour la solution diluée par 100. On note donc que dans le cas des solutions diluées (notamment pour une dilution importante), la proportion non négligeable de forme  $\text{QH}^+$  peut conduire à des propriétés d'émission différentes de celles des solutions étalons (quinine dans  $\text{H}_2\text{SO}_4$  notamment) et fausser un éventuel dosage (cf ci-après). On note d'ailleurs que le spectre d'absorption dans le cas de la solution diluée par 100 est légèrement différent de celui pour la solution diluée par 10 à cause de la présence de l'espèce  $\text{QH}^+$ .

<sup>4</sup> Pour en savoir plus sur les spectres d'excitation, se référer à l'article N°961 de février 2014 publié dans ce même magazine ou la partie D de cette étude.

<sup>5</sup> La partie en dessous de 250 nm n'est pas exploitable en excitation car l'effet de filtre interne est trop important.

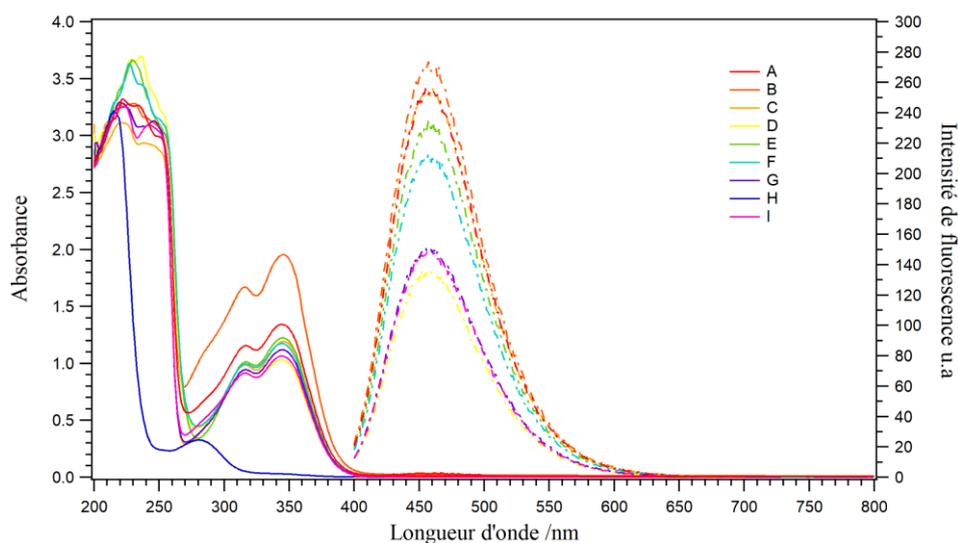


**Figure 3-** Spectres d'absorption, d'émission de fluorescence et d'excitation d'une solution de Schweppes® diluée par 10 ( $\lambda_{exc} = 390 \text{ nm}$  ; fente 2,5 nm / 2,5 nm ; Détecteur 650 V pour le spectre d'émission) et par 100 ( $\lambda_{exc} = 390 \text{ nm}$  ; fente 10 nm / 5 nm ; Détecteur 630 V pour le spectre d'émission) dans l'eau distillée. Les valeurs d'absorbance pour le spectre d'absorption pour la solution diluée par 100 sont multipliées par 10.

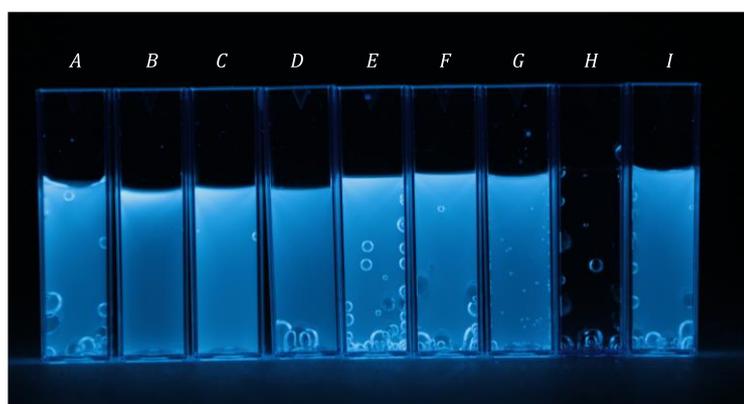
### 2.3 Autres boissons Tonic

Afin d'étendre notre étude à d'autres boissons Tonic que le Schweppes®, les Tonic A à I ont été analysés. Les marques et pH pour ceux-ci sont reportés dans le Tableau 1 et leurs spectres d'absorption et d'émission de fluorescence sont donnés sur la Figure 4. On retrouve les spectres d'absorption et d'émission de la quinine obtenus précédemment pour le Schweppes® (qui correspond également à la boisson Tonic A) sauf pour la boisson H. Les pH respectif de ces solutions vont de 2,3 à 2,5 ce qui permet de montrer que la quinine est à 100 % sous la forme  $QH_2^{2+}$  (cf partie A). Des images de la fluorescence (sous UV à 365 nm) sont données sur la Figure 5. On note une fluorescence bleue caractéristique de la forme  $QH_2^{2+}$  sauf pour la boisson H qui ne semble pas émettre de lumière. Dans le cas des boissons A à C, il s'agit de canettes si bien que, si le dosage est réalisé quelques jours après l'ouverture, cela peut induire des variations de la concentration en quinine par évaporation de l'eau<sup>6</sup>. Dans cette étude, les mesures pour les boissons A à G ont été réalisées 6 h après ouverture de la canette ou la bouteille puis deux semaines après. Les spectres donnés sur la Figure 4 et l'image de la Figure 5 correspondent aux échantillons deux semaines après ouverture.

<sup>6</sup> Les canettes ont été laissées à l'air libre pour laisser s'échapper le  $CO_2$  de la canette et évaluer l'influence sur l'analyse d'une évaporation de l'eau liée à la non-conservation du Tonic dans un récipient fermé.



**Figure 4** - Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence ( $\lambda_{exc} = 390 \text{ nm}$  ; fente 2,5 nm /2,5 nm ; Détecteur 650 V) des différentes boissons Tonic étudiées (2 semaines après ouverture de la canette ou la bouteille).



**Figure 5** - Image sous UV (365 nm) des différentes boissons tonic A à I.

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
Marque	Schweppes®	Fever-Tree Tonic Water	Original Tonic Water (Lidl)	Fresh Tonic (Carrefour)	Look zéro Tonic (Intermarché)
pH	2,3	2,3	2,4	2,5	2,4
	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>	
Marque	Schweppes® zéro	Soda Tonic (Auchan)	La French (le tonic à la française)	Boisson Tonic (Gilbert)	
pH	2,3	2,5	2,3	2,3	

**Tableau 1** - Marque et pH des différentes boissons Tonic étudiées.

Dans la suite, nous proposons de mettre en exergue la notion de filtre interne en excitation qui peut conduire à une perturbation des mesures d'intensité de fluorescence.

### 3. NOTION D'EFFET DE FILTRE INTERNE EN EXCITATION

#### 3.1 Principe [1]

Pour qu'il existe une relation de linéarité entre l'intensité de fluorescence et la concentration en espèces fluorescentes, il est nécessaire que les solutions soient faiblement absorbantes ( $A < 0,1$ ) afin d'éviter qu'une partie du faisceau d'excitation ne soit absorbée ce qui conduirait à une diminution de l'intensité de fluorescence. On parle alors **d'un effet de filtre interne en excitation** (Figure 6).

Remarque :

Une solution trop absorbante peut également conduire à une ré-absorption de la fluorescence émise et par conséquent à une diminution de l'intensité de fluorescence (effet de filtre interne en émission, Figure 6). Toutefois un tel effet n'est rencontré que pour des espèces ayant un faible déplacement de Stokes<sup>7</sup>. Les spectres d'absorption et d'émission possèdent alors un domaine de longueur d'onde commun. Ce n'est pas le cas pour la quinine. Seul un effet de filtre interne en excitation peut être observé.

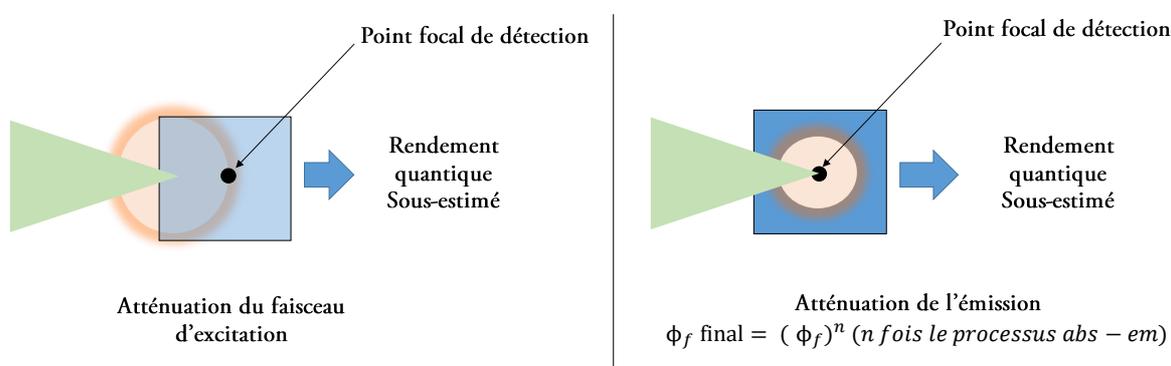


Figure 6 - Effet de filtre interne en excitation et en émission [1].

#### 3.2 Détermination du rendement quantique

Le rendement quantique de fluorescence d'un composé  $B_i$  est mesuré par rapport à une référence  $B_0$  dont le rendement quantique est connu. Il faut savoir que les mesures concernant  $B_i$  et  $B_0$  doivent être strictement faites dans les mêmes conditions expérimentales : longueur d'onde d'excitation, bande passante des monochromateurs, gain de l'appareil etc. Les rendements quantiques des deux composés  $B_i$  et  $B_0$  sont reliés par la relation suivante :

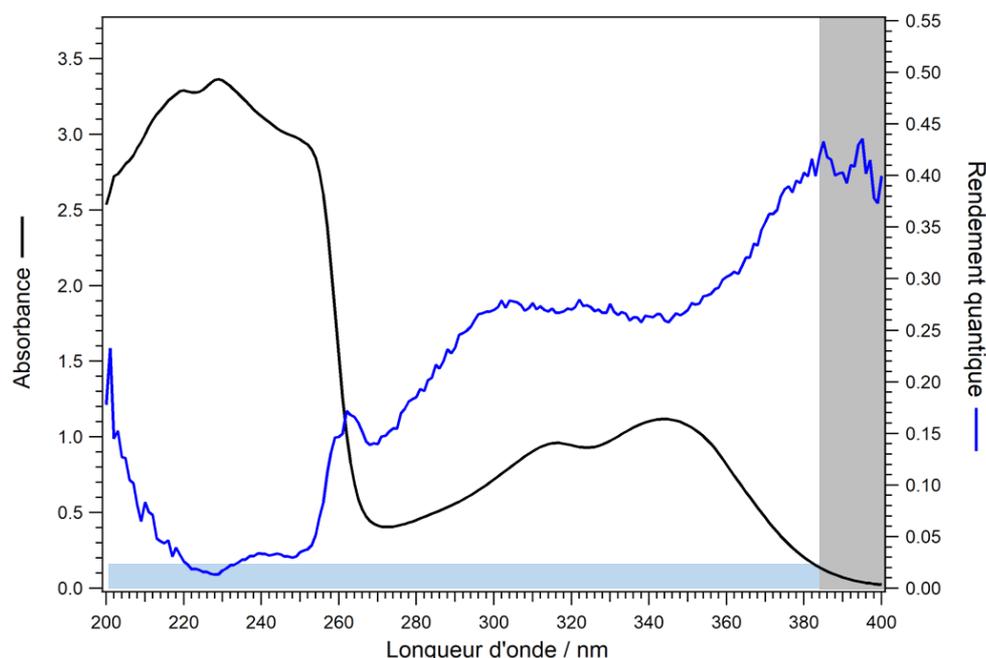
$$\varphi_{f,i} = \varphi_{f,0} \times \frac{1 - 10^{-A_0} S_1^f \left(\frac{n_1^r}{n_0^r}\right)^2}{1 - 10^{-A_i} S_0^f}$$

avec  $\varphi_{f,i}$  et  $\varphi_{f,0}$  les rendements quantiques du composé  $B_i$  et de la référence  $B_0$ ,  $A_i$  et  $A_0$  les absorbances du composé  $B_i$  et de la référence  $B_0$  à  $\lambda_{exc}$ ,  $S_1^f$  et  $S_0^f$  les intégrales de la bande d'émission du composé  $B_i$  et de la référence  $B_0$ ,  $n_1^r$  et  $n_0^r$  les indices de réfraction des solvants dans lesquels sont dissous le composé  $B_i$  et de la référence  $B_0$ . Pour le sulfate de quinine dans une solution de  $H_2SO_4$  à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ , le rendement quantique vaut 0,546.

#### 3.3 Mise en œuvre expérimentale

<sup>7</sup> Le déplacement de Stokes correspond à l'écart en  $\text{cm}^{-1}$  entre le maximum d'absorption et le maximum d'émission.

À partir des spectres d'excitation et d'absorption obtenue sur la Figure 2 et ceux pour une solution de sulfate de quinine peu concentrée dans  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  réalisée dans les mêmes conditions, il est possible d'avoir accès à l'évolution du rendement quantique en fonction de la longueur d'onde d'excitation dans le cas du Schweppes® (Figure 7). En effet, dans l'expression du rendement quantique donnée dans la partie A de cette étude,  $\varphi_{f,0}$  est pris à 0,546 [2]–[4], les couples de valeurs d'intensité de fluorescence du spectre d'excitation et d'absorption à la même longueur d'onde du sulfate de quinine sont utilisés comme  $I_{f_0}^8$  et  $A_0$ . Les couples de valeurs d'intensité de fluorescence du spectre d'excitation et d'absorption à la même longueur d'onde du Schweppes® sont utilisés comme  $I_{f_i}$  et  $A_i$ . On remarque que le rendement quantique est le plus élevé lorsque l'absorbance à la longueur d'onde d'excitation est inférieure à 0,1. Dès que l'absorbance dépasse cette valeur, on note une diminution du rendement qui s'avère d'autant plus importante que l'absorbance est élevée. Ceci montre expérimentalement la présence d'un effet de filtre interne en excitation. **Dans la suite, afin de minimiser ce dernier tout en évitant de diluer la solution de Schweppes, la longueur d'onde d'excitation a été choisie à 390 nm et l'absorbance à cette longueur d'onde prise comme inférieure à 0,1.**



**Figure 7** - Évolution du rendement quantique en fonction de la longueur d'onde d'excitation dans le cas du Schweppes® et spectre d'absorption du Schweppes®.

## 4. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

### 4.1 Mode opératoire

Pour réaliser les **droites d'étalonnage** des solutions dans  $\text{H}_2\text{SO}_4$  et  $\text{HCl}$  à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  ont été utilisées pour les courbes d'étalonnage de la quinine en milieu acide. Pour un étalonnage en milieu neutre ou quasi-neutre, de l'eau distillée (pH 6,3) et de l'eau du robinet (pH 7,8) ont été utilisées. Le volume initial de solvant est pris égal à 2,5 mL (prélevé au moyen d'une micropipette) et ajouté dans une cuve spectrophotométrique à 4 faces transparentes (pour pouvoir réaliser à la fois les mesures en absorbance et fluorescence simultanément). Des ajouts de 20  $\mu\text{L}$  d'une solution à  $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  en sulfate de quinine

<sup>8</sup> Il est possible de remplacer  $S_0$  par  $I_{f_0}$  car il s'agit dans le cas des deux échantillons (Schweppes et sulfate de quinine dans  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) du même composé (la quinine). Seul l'intensité des spectres d'émission est modifiée et pas sa forme ou sa position (cf paragraphe 2.1).

(39 mg dans 25 mL de solvant;  $M = 391,47 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) dans le solvant sont réalisés<sup>9</sup>. Les concentrations en quinine ( $M = 324 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) sont comprises entre 0 et  $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $130 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).<sup>10</sup> Après chaque ajout (ie pour chaque concentration en quinine), un spectre d'absorption entre 200 et 800 nm a été enregistré ainsi qu'un spectre d'émission ( $\lambda_{\text{exc}} = 390 \text{ nm}$ ; fente  $2,5 \text{ nm} / 2,5 \text{ nm}$ ; Détecteur 650 V) entre 400 et 700 nm. Les droites d'étalonnage en absorption et fluorescence ont été respectivement tracées à 345 nm ( $A(345 \text{ nm}) = f(C)$ ) et 455 nm ( $I_f(455 \text{ nm}) = f(C)$ ).

Dans la suite **les expériences dans  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  seront considérées comme les expériences de référence** car c'est dans ce solvant que la valeur du rendement quantique de la quinine (0,546) est connu et que seule une espèce acido-basique est présente :  $\text{QH}_2^{2+}$ .

## 4.2 Droite d'étalonnage en absorption

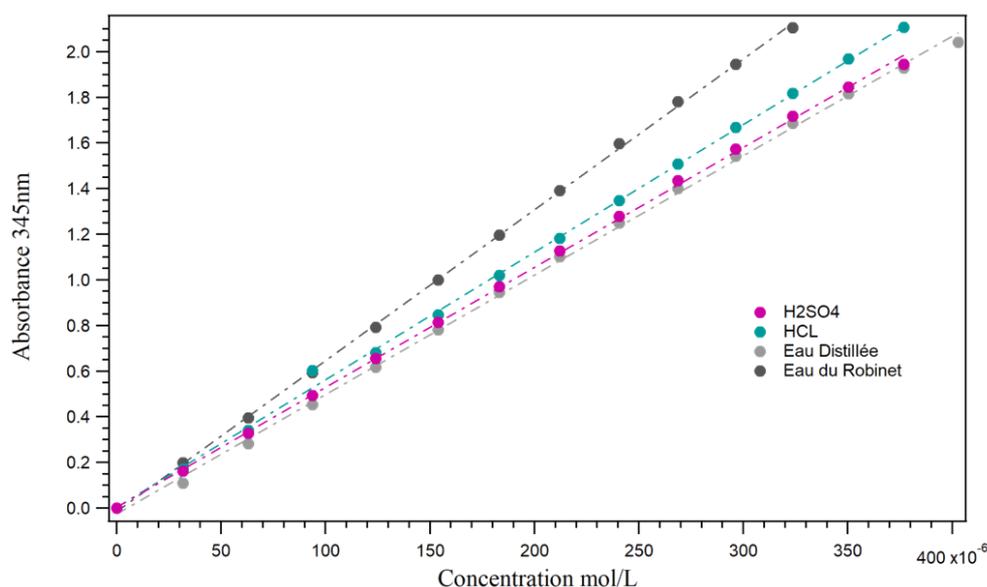
Les droites d'étalonnage en absorption obtenues en suivant le protocole donné au paragraphe précédent dans le cas des solvants  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , HCl à  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , eau distillée (pH 6,3) et eau du robinet (pH 7,8) sont représentées sur la Figure 8. Les courbes représentées sur cette figure sont données à titre d'exemple. En effet, ces droites ont été réalisées plusieurs fois dans le cas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (3 fois), HCl à  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (3 fois) et eau distillée (2 fois). Les coefficients d'absorption obtenus sont reportés dans le Tableau 2. Dans tous les cas, l'ajustement numérique présente un coefficient de corrélation  $R^2$  de 0,999. On note une influence du milieu sur les propriétés d'absorption avec des valeurs de coefficients d'absorption molaire allant de  $5235 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$  (pour  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) à  $6611 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$  (pour l'eau du robinet) ce qui correspond à un écart relatif de 26,3 % (loin d'être négligeable en chimie analytique). **Si les variations des propriétés d'absorption entre  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  avec HCl (1,3 % d'écart relatif) sont relativement mesurées, elles semblent nettement plus marquées avec l'eau du robinet (26,3 % d'écart relatif) et l'eau distillée (5,8 % d'écart relatif au maximum).** Dans le cas de l'eau distillée, il apparaît d'une part que l'ajout de quinine dans  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , même faible, conduit dès le départ à une diminution du pH notable (pH 2,40 après le premier ajout et un pH proche de 1,0 à la fin de l'expérience) et la présence unique de la forme  $\text{QH}_2^{2+}$ .<sup>11</sup> D'autre part, on observe une grande variation des valeurs de coefficient d'absorption molaire entre les différentes eaux distillées ou du robinet utilisées qui s'explique par des variations de pH et certainement de composition notables entre celles-ci. L'écart entre  $\text{H}_2\text{SO}_4$  et HCl est uniquement dû à l'influence de l'acide et reste relativement faible en absorption. La matrice a donc une influence sur les propriétés d'absorption et un effet hyperchrome dans le cas de HCl et l'eau par rapport à  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

---

<sup>9</sup> Dans le cas des solvants eau distillée et eau du robinet, la quinine n'étant pas soluble dans ceux-ci, une solution à  $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  en sulfate de quinine dans  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  a été utilisée.

<sup>10</sup> Si l'on ne souhaite pas utiliser des micropipettes, il est possible de préparer des solutions de concentrations croissantes entre 0 et  $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

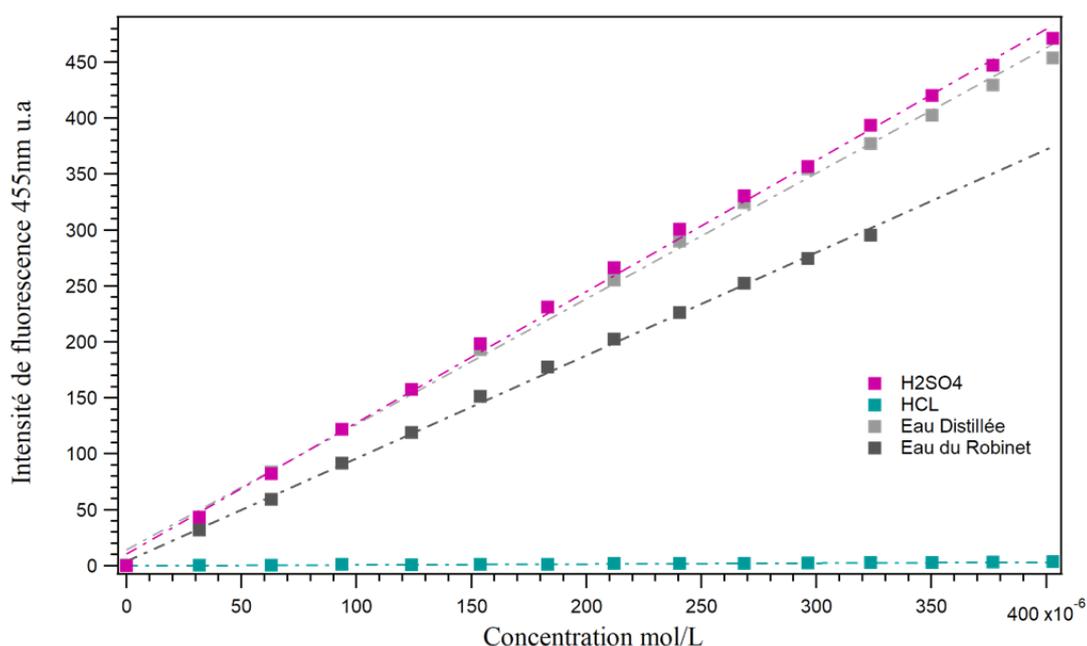
<sup>11</sup> Un ajout de quinine de concentration à  $4,0 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  préparée dans l'eau distillée et non  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  aurait montré des propriétés d'absorption différentes car seul la forme  $\text{QH}^+$  serait alors présente. Son spectre d'absorption est très différent et le coefficient d'absorption molaire à 345 nm nettement plus faible que pour  $\text{QH}_2^{2+}$ . Néanmoins, la préparation d'une solution de quinine dans l'eau distillée est rendue difficile à cause de la faible solubilité de la quinine dans celle-ci. Une solubilisation dans un minimum de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  puis une dilution dans l'eau est toutefois envisageable.



**Figure 8** - Droite d'étalonnage en absorbance pour le sulfate de quinine dans différents solvants. Le suivi a été réalisé à 345 nm. Les courbes en pointillés correspondent aux meilleurs ajustements trouvés. Les spectres correspondant à ces droites sont donnés en annexe.

#### 4.3 Droite d'étalonnage en émission

Les droites d'étalonnage en émission de fluorescence obtenues en suivant le protocole donné au paragraphe précédent dans le cas des solvants H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 1 mol.L<sup>-1</sup>, HCl à 1 mol.L<sup>-1</sup>, eau distillée (pH 6,3) et eau du robinet (pH 7,8) sont représentées sur la Figure 9. Les courbes représentées sur cette figure sont données à titre d'exemple. En effet, ces droites ont été réalisées plusieurs fois dans le cas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 1 mol.L<sup>-1</sup> (3 fois), HCl à 1 mol.L<sup>-1</sup> (2 fois) et eau distillée (2 fois). Les coefficients d'absorption obtenus sont reportés dans le Tableau 2. Dans le cas des ajustements numériques, ceux-ci présentent un coefficient de corrélation R<sup>2</sup> moyen de 0,997 pour H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 1 mol.L<sup>-1</sup>, 0,978 pour HCl à 1 mol.L<sup>-1</sup> et 0,998 pour les différentes eaux. La faible valeur pour HCl s'explique par le fait que dans les conditions d'acquisition de la fluorescence, l'intensité est très faible. Les valeurs manquent donc de justesse. **On note une influence importante du milieu sur les propriétés d'émission avec des valeurs des écarts relatifs avec la pente pour H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 1 mol.L<sup>-1</sup> allant de 2,6 % (pour l'eau distillée) à 99 % pour HCl.** Dans ce dernier cas, on note une forte inhibition de la fluorescence (inhibition dynamique) comme reporté dans la littérature [3], [4]. Pour l'eau, comme en absorbance, des variations importantes entre les différentes eaux utilisées est observables. Il apparaît néanmoins qu'une inhibition du milieu a lieu dans 2 des 3 cas avec un écart relatif de 20 % (loin d'être négligeable en chimie analytique). Pour éviter tout effet de filtre interne en excitation, la longueur d'onde d'excitation de 390 nm paraît bien choisie puisque l'absorbance ne dépasse pas la valeur de 0,1.



**Figure 9** - Droite d'étalonnage en émission de fluorescence pour le sulfate de quinine dans différents solvants ( $\lambda_{exc} = 390 \text{ nm}$  ; fente 2,5 nm /2,5 nm ; Détecteur 650 V). Le suivi a été réalisé à 455 nm. Les courbes en pointillés correspondent aux meilleurs ajustements trouvés. Les courbes correspondantes à ces droites sont données en annexe 5.

#### 4.4 Tableau récapitulatif

Solvant	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	HCl	Eau distillée	Eau du robinet
<b>Absorption</b>				
$\epsilon$ (345 nm) / mol <sup>-1</sup> .L.cm <sup>-1</sup>	5235*	5300*	5234 ± 45 5540 ± 35	6611 ± 38
$\epsilon$ (345 nm) / mol <sup>-1</sup> .L.cm <sup>-1</sup>	5147-5303*	4940-5644*	5234 ± 45 5540 ± 35	6611 ± 38
Écart relatif avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> en %	-	1,3	0,02 5,8	26,3
R <sup>2</sup>	0,999*	0,999*	0,999 0,999	0,999
<b>Fluorescence – <math>\lambda_{exc} = 390 \text{ nm}</math> - Fentes (2,5 nm -2,5 nm) – Détecteur 650 V</b>				
k(455 nm)	1,15 ± 0,01 × 10 <sup>6</sup> *	7,74 ± 0,1 × 10 <sup>3</sup> §	1,12 ± 0,02 × 10 <sup>6</sup> 9,10 ± 0,05 × 10 <sup>5</sup>	9,20 ± 0,1 × 10 <sup>5</sup>
Écart relatif avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> en %	-	99	2,6 21	20
R <sup>2</sup>	0,997	0,977	0,997 0,999	0,998

**Tableau 2** - Tableau récapitulatif des valeurs obtenues dans le cas des droites d'étalonnage en absorption et en émission. Lorsque l'expérience a été réalisée plusieurs fois, les valeurs indiquées correspondent à un intervalle correspondant aux valeurs extrêmes des moyennes issues de § 2 expériences ou \*3 expériences. Dans le cas de la réalisation d'une seule expérience, la valeur moyenne et son incertitude sur celle-ci sont indiquées.

Il apparaît donc tant en absorption qu'en émission, qu'il existe un effet de matrice qui ne peut être négligé dans le cas d'un dosage de la quinine. **Le solvant de référence reste H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 1 mol.L<sup>-1</sup> tant en absorption qu'en fluorescence** car l'utilisation de l'eau ou de HCl conduirait à des valeurs aberrantes de la concentration en quinine dans le Schweppes ® comme nous le verrons dans la suite.

## 4.5 Influence de la matrice sur le rendement quantiques

Dans tous les cas, les indices de réfraction pour les solvants aqueux et les Tonic ont été mesurés par réfractométrie. Les valeurs obtenues pour  $\left(\frac{n_i}{n_{eau}}\right)^2$  permettent dans le cas de l'ensemble des boissons tonic de négliger l'influence de l'indice de réfraction sur l'émission de fluorescence et le rendement quantique. Il en va de même pour les solutions de  $H_2SO_4$  et  $HCl$  à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ .

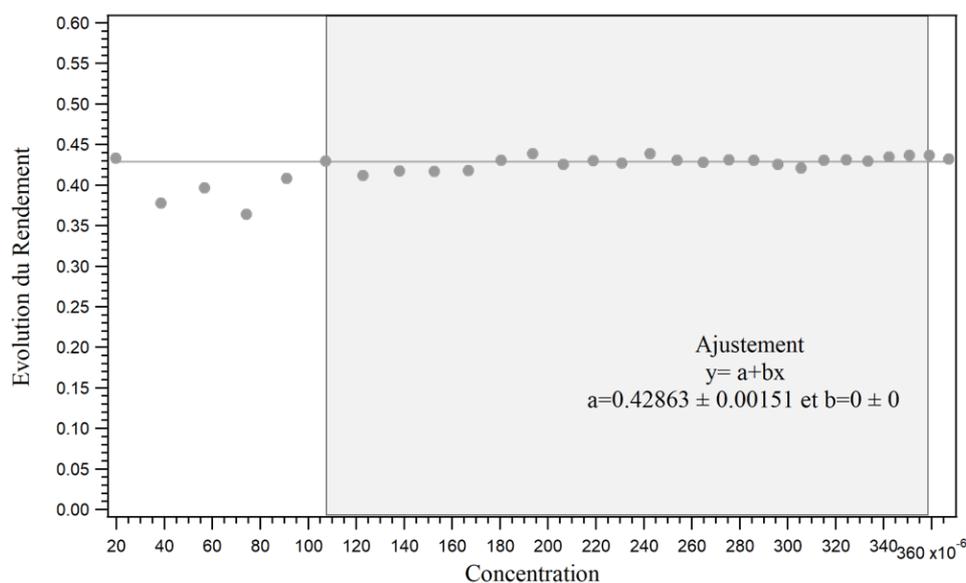
### 4.5.1 Rendement quantique de la quinine dans $HCl$ et l'eau.

Pour la détermination du rendement quantique de la quinine, dans le cas de  $HCl$  et l'eau, parmi l'ensemble des couples spectre d'absorption – spectre d'émission (à la même concentration) obtenu pour l'étalonnage de la quinine dans  $H_2SO_4$  à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ , le couple conduisant au rendement quantique le plus grand a été choisi comme référence ( $A_0$  et  $S_0$  dans l'expression du paragraphe 3.2). Tous les couples de spectres absorption-émission pour toutes les concentrations en quinine dans  $HCl$ , l'eau distillée et l'eau du robinet sont alors considérés comme des composés  $B_i$ . On obtient alors autant de valeur du rendement quantique que de points pour les droites d'étalonnage (Figure 8 et Figure 9). Seuls les rendements pour une absorbance  $A_i$  supérieure à 0,05 sont conservés car en dessous de l'exactitude du spectrophotomètre d'absorption n'est pas garantie. L'absorbance ne dépasse par ailleurs pas la valeur de 0,1. On obtient alors une valeur moyenne du rendement quantique de 0,003 pour la quinine dans  $HCl$  et 0,43 dans l'eau. La valeur dans  $HCl$  s'explique comme précédemment par une inhibition de la fluorescence par inhibition dynamique des ions  $Cl^-$  [3], [4]. Dans le cas de l'eau, on note une faible inhibition de la fluorescence qu'il est important de considérer lors d'un dosage. Cette inhibition pourrait s'expliquer par la présence de forme  $QH^+$  (de rendement quantique plus faible que  $QH_2^{2+}$ ), toutefois les spectres d'absorption ne permettent pas d'aller dans ce sens car seul  $QH_2^{2+}$  semble présent. Seul un effet de milieu permet donc d'expliquer ces différences.

### 4.5.2 Rendement quantique de la quinine dans le Schweppes®

Dans le cas des boissons Tonic, l'ensemble des couples de spectres absorption-émission pour toutes les concentrations en quinine dans  $H_2SO_4$   $1 \text{ mol.L}^{-1}$  sont pris comme composé référence  $B_0$  et la quinine présente dans les boissons Tonic comme composé  $B_i$ . On obtient alors autant de valeur du rendement quantique que de points pour les droites d'étalonnage avec  $H_2SO_4$  à  $1 \text{ mol.L}^{-1}$  (Figure 8 et Figure 9). L'évolution du rendement en fonction de la concentration est donnée sur la Figure 10 dans le cas du Schweppes® (Tonic A). On obtient alors une valeur moyenne du rendement quantique pour chaque Tonic (Tableau 3). Seuls les rendements pour une absorbance  $A_0$  supérieure à 0,05 sont conservés car en dessous la justesse du spectrophotomètre d'absorption n'est pas garantie. L'absorbance ne dépasse par ailleurs pas la valeur de 0,1. On observe que pour l'ensemble des points pour lesquelles  $A_0$  est supérieur à 0,05 (zone en gris), le rendement quantique est constant autour d'une valeur de 0,43. L'absence de variation de la valeur montre qu'il n'y a pas d'effet de filtre interne en excitation notable. **La valeur, inférieure à 0,546, montre une inhibition de la fluorescence due à la matrice.**

Il apparait que la matrice des boissons Tonic conduit à une inhibition de la fluorescence de 12 à 30 % selon les boissons (21 % pour le Schweppes®). Le cas du Tonic H est différent car il semble que celui-ci ne contienne pas de quinine au vue des spectres d'absorption et d'émission (Figure 4) : ceci était prévisible au vue de la Figure 5 puisque le Tonic H n'émet pas de lumière sous UV.



**Figure 10** - Évolution du rendement quantique en fonction de la concentration en quinine dans le cas du Schweppes® après ouverture de la canette. La zone en bleu indique l'ensemble des points utilisés pour l'ajustement numérique ( $A_0 > 0,05$ ).

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
n	<b>1,343</b>	1,357	1,347	1,340	1,334
$\left(\frac{n_i}{n_{eau}}\right)^2$	<b>1,015</b>	1,036	1,020	1,010	1,002
$\overline{\varphi_{f,l}}$ (après ouverture)	0,43	0,36	0,37	0,35	0,36
$\overline{\varphi_{f,l}}$ (2 semaines après ouverture)	0,33	0,26	0,43	0,25	0,41
	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>H</b>	<b>I</b>	<b>Eau</b>
n	1,333	1,344	1,343	1,344	1,333
$\frac{n_i}{n_{eau}}$	1,000	1,016	1,015	1,016	-
$\overline{\varphi_{f,l}}$ (après ouverture)	0,43	0,27	0,08	0,28	
$\overline{\varphi_{f,l}}$ (2 semaines après ouverture)	0,37	0,27	-	-	

**Tableau 3** - Indice de réfraction, valeur de  $\left(\frac{n_i}{n_{eau}}\right)^2$  et rendement quantique moyen des différentes boisson Tonic étudiées après ouverture et 2 semaines après.

Dans le cadre d'un dosage de la quinine par étalonnage externe par fluorescence dans ces boissons, il est nécessaire soit de tenir compte de cette inhibition (ce qui n'est pas chose aisée mais reste possible si on détermine le rendement quantique de la quinine dans la boisson Tonic pour évaluer la perte de fluorescence liée à la matrice) ou alors d'utiliser la méthode des ajouts dosés (cf partie C).

## 4.6 Cas des solutions diluées avec de l'eau distillée

Il est intéressant de noter qu'une dilution par 10 ne conduit pas à une division par 10 de l'absorbance à 345 nm de la solution non diluée (tout comme celle à 100 ne conduit pas à division par 100 de l'absorbance de la solution non diluée). Ceci est dû au fait que le pH de la solution augmente lorsque l'on dilue avec de l'eau distillée. La proportion de forme  $\text{QH}^+$  augmente alors (cf partie A). Cette dernière absorbant nettement moins à 345 nm que  $\text{QH}_2^{2+}$  (cf partie A), il s'ensuit une diminution plus importante que prévue lors de la dilution dans l'eau (par 13 au lieu de 10). Cette diminution est d'autant plus marquée lors de la dilution par 100 car le pH est de 3,6. La solution est constituée à 90 % de forme  $\text{QH}_2^{2+}$  et 10 % de forme  $\text{QH}^+$  (cf partie A). Une dilution par 100 conduit à une division de l'absorbance initiale par 164 au lieu de 100. Sachant que le milieu n'est plus constitué uniquement de la forme  $\text{QH}_2^{2+}$ , les valeurs d'absorbance à 345 nm ne peuvent plus être utilisées pour déterminer la concentration en quinine avec justesse. Dans ces cas, puisque l'absorbance est plus faible que prévue, il s'ensuit une sous-évaluation de la concentration de la quinine. Dans le cas de la méthode de la droite d'étalonnage en émission, les résultats s'avèrent similaires dans leur tendance à ceux obtenus en absorption. Une dilution par 10 dans l'eau de la solution de Schweppes ® conduit à une faible sous-évaluation car le pH augmente et la proportion de forme  $\text{QH}^+$  moins fluorescente que la forme  $\text{QH}_2^{2+}$  (cf partie A) augmente. La dilution par 100 fausse pour sa part drastiquement la valeur obtenue car l'intensité de fluorescence est plus sensible que l'absorbance au changement de pH.

Ces mesures permettent de mettre en exergue l'importance du pH du milieu de l'échantillon à analyser lors de la réalisation du dosage par la méthode de la droite d'étalonnage. En effet, si les matrices de la quinine pour la droite d'étalonnage et l'échantillon à analyser sont différentes alors la méthode de la droite de l'étalonnage ne devient plus juste. Dans le cas de la quinine, il est ainsi important que le pH soit inférieur à 2,5 (cf partie A) d'où l'utilisation généralement de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 1 mol.L<sup>-1</sup>.

Remarque :

Si la méthode de la droite d'étalonnage n'est pas pertinente pour les solution diluées par 10 et 100 dans l'eau, la méthode des ajouts peut en revanche être utilisées avec des ajouts de Schweppes dans l'eau.

## CONCLUSION

Cette deuxième partie a permis de mettre en évidence d'une part l'importance du choix de la longueur d'onde d'excitation pour permettre une analyse sans dilution de l'échantillon et d'autre part les limites de la méthode de la droite d'étalonnage en absorption et en émission dans le cas du dosage de la quinine dans une boisson Tonic. Il apparait ainsi que l'influence du milieu est loin d'être négligeable tout comme la dilution de l'échantillon. On observe en effet une variation notable des pentes selon le milieu en absorption et en émission. La détermination du rendement quantique de fluorescence de la quinine dans le Schweppes ® montre également une inhibition de la fluorescence due à la matrice. Celle-ci est difficile à évaluer. Tous ces résultats justifient l'utilisation de la méthode des ajouts dosés qui fait l'objet de la partie C.

## REMERCIEMENTS

Nous tenions à remercier Fabienne Bonnamy et Odile Marcombes pour leur relecture attentive de ce manuscrit et les nombreuses discussions que nous avons pu avoir avec elles qui ont permis de nourrir notre réflexion et d'améliorer grandement la qualité de cet article.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. Piard, *Chimie générale expérimentale: tout pour réussir les TP aux concours*. 2018.
- [2] "<http://www.photochemcad.com/>."
- [3] B. Valeur, *Invitation à la fluorescence moléculaire*. Bruxelles: De Boeck, 2005.
- [4] J. R. Lakowicz, *Principles of fluorescence spectroscopy*, 3. ed. (corr. at 4. print.). New York: Springer, 2010.