

TRAVAUX PRATIQUES

Fluorescence

Léonard AYKAN
Carla DE VITO
Léa ENGLER

Première année du master Sciences Analytiques pour les Bio-Industries

Enseignants

Frederic MELIN
Youssef EL KHOURY
Quentin RAFFY

Année : 2023 - 2024

But du Tp : Le but du TP est d'étudier par fluorescence une solution X inconnue contenant simultanément le naphthalène et l'anthracène.

I. Matériels et méthodes :

- Spectrophotomètre : Jasco FP-8200 de DutscherCuve : deux lampes xénon et mercure
- Cuve en quartz Suprasil Hellma TO 10mm (utilisation de cuve en quartz car elle n'absorbe pas dans le domaine d'étude)
- Logiciel : SpectraManager
- Solution étalon de naphthalène à 400 µg/mL (fournie)
- Solution étalon d'anthracène à 400µg/mL (fournie)
- Solution X contenant du naphthalène et de l'anthracène (fournie)
- Solution d'éthanol (solvant employé)
- Fiole de 10 mL ± 0,04 mL
- Pipette graduée de 10 mL ± 0,075 mL

Les composés étudiés au cours de ce TP sont l'anthracène et le naphthalène. Leurs caractéristiques sont décrites dans le tableau 1. Ces 2 composés sont des hydrocarbures aromatiques polycycliques présentant des cycles aromatiques absorbant dans le domaine des UV.

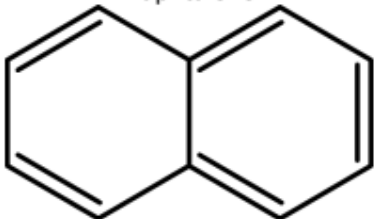
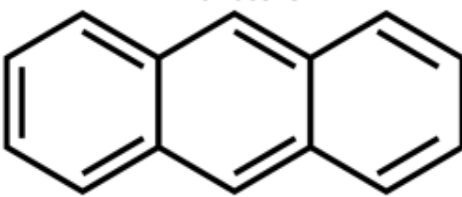
Noms	Naphtalène	Anthracène
		
Formule	C ₁₀ H ₈	C ₁₄ H ₁₀
Masse molaire (g/mol)	128,17	150,218
Longueur d'onde max (nm)	276 Solubilité : Peu soluble dans l'eau, soluble dans l'éthanol	357 Solubilité : Très peu soluble dans l'eau, soluble dans les solvants organiques comme l'éthanol.

Tableau 1 : Caractéristiques des composés hydrocarbures aromatiques étudiés

II. Principe :

La fluorimétrie est une méthode de quantification d'un composé qui exploite sa capacité à émettre de la fluorescence. Ainsi, la quantité de fluorescence émise par le composé mesuré est directement proportionnelle à sa concentration. En spectroscopie de fluorescence, on examine les états vibratoires et électroniques des molécules. La fluorescence des molécules est enregistrée après excitation. Les molécules fluorescentes, appelées fluorophores, absorbent des longueurs d'onde spécifiques (λ d'excitation), ce qui élève les électrons à des niveaux d'énergie supérieurs, induisant une instabilité atomique. Pour retrouver leur stabilité, les électrons reviennent à leur état

fondamental en émettant des photons, produisant de la fluorescence à une longueur d'onde caractéristique appelée λ d'émission.

La capacité d'une molécule à émettre de la fluorescence découle de son aptitude à absorber des longueurs d'onde d'excitation, provoquant le passage de ses électrons d'un niveau d'énergie stable à un niveau instable. Une fois excitée, la molécule cherche à retrouver sa stabilité en libérant l'énergie accumulée sous forme de photons à une longueur d'onde spécifique (caractéristique de la molécule). Les photons émis dans ce processus constituent la fluorescence.

Cette fluorescence émise peut ensuite être mesurée dans le but d'identifier ou de quantifier un composé dans une matrice donnée. En effet, son intensité est directement proportionnelle à la concentration du composé. Cette intensité est influencée par les états vibratoires et électroniques des molécules. Ainsi, cette technique analytique est applicable uniquement aux molécules fluorochromes, c'est-à-dire à celles capables de générer de la fluorescence après irradiation.

Emission et absorption

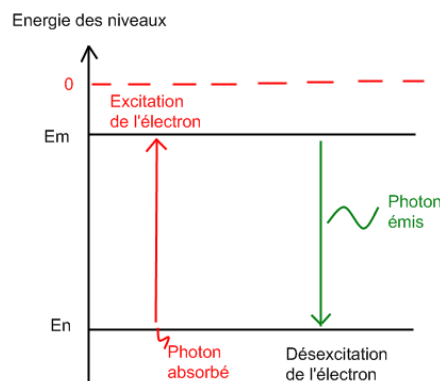


Figure 1 : Schéma du principe de la fluorescence

Le spectrofluorimètre se compose d'une source de lumière polychromatique, généralement une lampe située derrière un monochromateur à réseau. Ce monochromateur permet de sélectionner la longueur d'onde spécifique des photons qui vont exciter les molécules présentes dans l'échantillon. L'échantillon lui-même est placé dans une cuve fluorimétrique avec quatre côtés translucides pour permettre une excitation à 90°.

Pour détecter les photons émis par l'échantillon, un second monochromateur est positionné à 90° par rapport à l'échantillon afin de sélectionner la longueur d'onde d'émission. Enfin, un photomultiplicateur est utilisé pour convertir le signal lumineux en impulsions électriques, lesquelles sont ensuite amplifiées. Ce signal est ensuite transmis à un ordinateur pour analyse et traitement des données

III. Résultats et discussions :

- Choix du solvant d'analyse

Il est nécessaire que le solvant d'analyse qu'on va employer pour réaliser le blanc de l'appareillage ainsi que les dilutions des différents composés n'absorbe pas dans l'UV-visible. On a donc réalisé un balayage

des longueurs d'onde de l'UV-visible sur de l'éthanol. Le solvant présente une faible absorbance, à la plupart des longueurs d'onde dans la gamme UV-visible. Cela assure que notre solvant n'interfère pas avec la mesure d'absorbance du Naphtalène et de l'anthracène. De plus, en tant que solvant polaire, l'éthanol est capable de dissoudre plus facilement nos composés et permet une analyse plus fiable et plus précise.

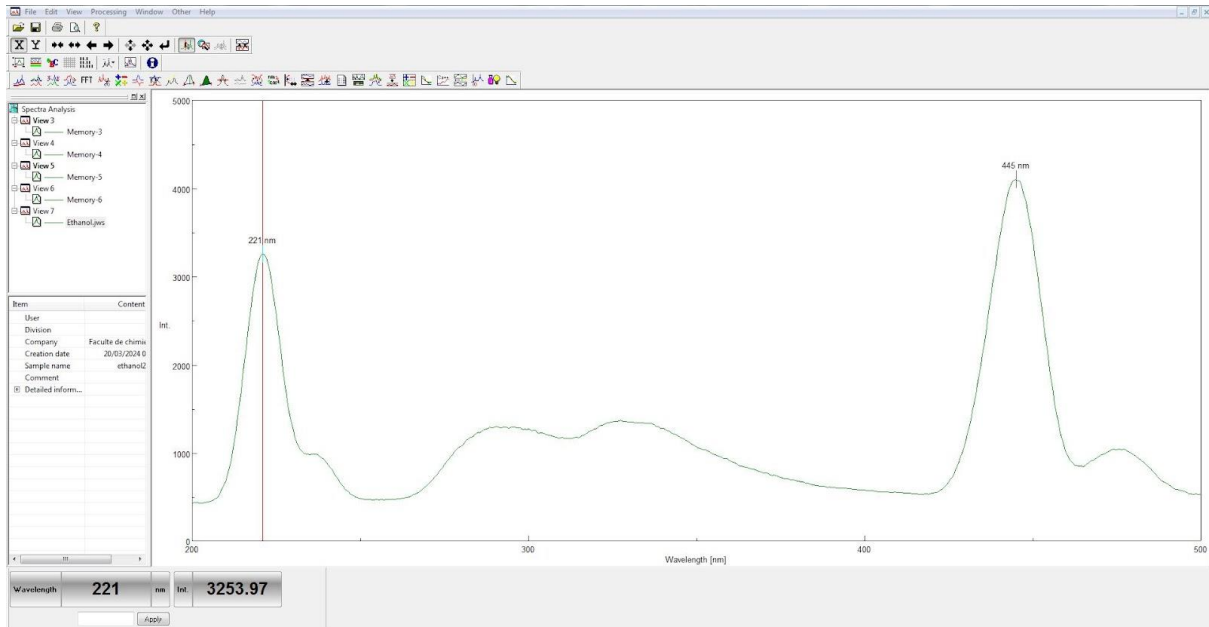


Figure 2 : Spectre de l'éthanol à une longueur d'onde d'excitation à 221 nm

On observe 2 pics : 221 nm et 450 nm. Ceux-ci sont dus à la diffusion de Rayleigh et le deuxième correspond à un harmonique. En effet, on étudie la lumière émise, on a donc une diffusion élastique. Cette diffusion sera retrouvée dans tous les spectres mais ne sera pas pris en compte pour la suite.

- Choix des longueurs d'onde d'analyse pour les deux composés étudiés

Le choix des longueurs d'onde a déjà été faite au préalable au cours du TP UV-visible or on sait que la longueur d'onde d'absorption en UV correspond à longueur d'onde d'émission en fluorimétrie.

- λ_{\max} (Naphtalène) = 276 nm

- λ_{\max} (Anthracène) = 357 nm

- Gamme d'étalonnage naphtalène

On a travaillé à longueur d'onde d'absorption de 276nm et d'émission 322 nm.

Solution mère à une concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	0	2	2	4	6	8	10
Volume de la solution mère à prélever (mL)	/	0.5	1	2	3	4	/
Volume final (mL)	10	10	10	10	10	10	10

Tableau 2 : Gamme d'étalonnage de l'anthracène réalisé à partir de la solution mère à 10mg/L

Concentration $\mu\text{g/mL}$	Intensité
1	330,881
2	625,205
4	1172,78
6	1507,57
8	1866,87
10	2119,96

Tableau 3 : Résultats obtenus pour le naphthalène

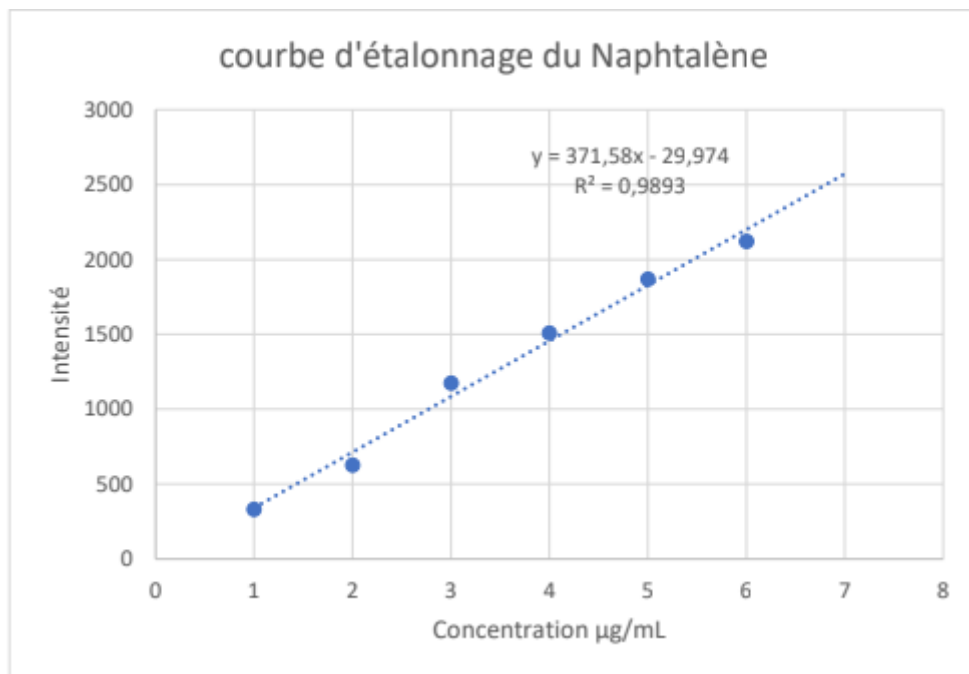


Figure 3 : Courbe d'étalonnage de l'anthracène

- Gamme d'étalonnage anthracène

On a travaillé à longueur d'onde d'absorption de 357 nm et d'émission 379 nm.

Solution mère à une concentration de 8 $\mu\text{g/mL}$

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	0	1	2	3	4	6	8
Volume de la solution mère à prélever (mL)	/	0.5	1	1.5	2	3	/
Volume final (mL)	10	10	10	10	10	10	10

Tableau 4 : Gamme d'étalonnage de l'anthracène réalisé à partir de la solution mère à 10mg/L

Concentration en µg/mL	Intensité
1	1796,49
2	3224,35
3	4806,12
4	6032,9
6	8030,82
8	8987,62

Tableau 5 : Résultats obtenus pour l'antracène

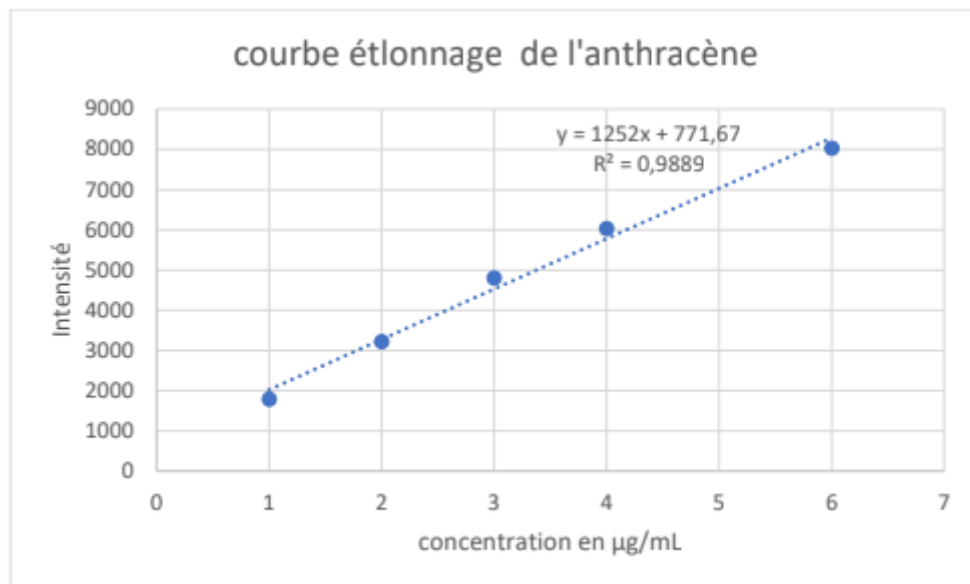


Figure 4 : Courbe d'étalonnage de l'antracène

- Analyse de la solution X inconnue préalablement diluée par 2 car étant donné qu'elle était trop concentrée, le pic saturait sur le spectre.

Solution X	Excité à 276 (Naphtalène)	Excité à 357 (Antracène)
	Pic d'émission à 322 nm	Pic d'émission à 379nm
Dilution par 2	743.103	9331.6

Tableau 6 : Résultats obtenus pour la solution X

Calcul de la concentration en Naphtalène dans la solution X inconnue :

$$y = ax + b$$

$$x = \frac{y - b}{a} \times fd$$

$$x = \frac{743,103 + 29,974}{371,58} \times 2 = 4,16 \mu\text{g/mL}$$

Calcul de la concentration en Anthracène dans la solution X inconnue :

$$x = \frac{9331.6 - 771.67}{1252} \times 2 = 13,67 \mu\text{g/mL}$$

Incertitude avec le matériel utilisé :

$$\Delta c = \sqrt{\left(\frac{\Delta V \text{ fiole}}{V \text{ fiole}}\right)^2 + \left(\frac{\Delta V \text{ pipette}}{V \text{ prélevé}}\right)^2} \times c$$

$$\Delta c = \sqrt{\left(\frac{0,04}{10}\right)^2 + \left(\frac{0,05}{5}\right)^2} \times 4,16 = 0,045 \mu\text{g/mL}$$

$$\Delta c = \sqrt{\left(\frac{0,04}{10}\right)^2 + \left(\frac{0,05}{5}\right)^2} \times 13,67 = 0,15 \mu\text{g/mL}$$

IV. Conclusion :

Grâce à la fluorimétrie, la concentration en naphthalène et en anthracène de la solution X inconnue a été déterminée. Selon les résultats du TP, la concentration en naphthalène est estimée à $4,16 \pm 0,045 \mu\text{g/mL}$ et en anthracène à $13,67 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$. Théoriquement, nous aurions dû trouver une concentration de $5.5 \mu\text{g/mL}$ pour le naphthalène et de $19 \mu\text{g/mL}$ pour l'anthracène. Les rendements obtenus sont de 75 % pour le naphthalène et de 72 % pour l'anthracène, ce qui s'éloigne pas énormément des prédictions théoriques.

En comparant ces valeurs avec celles obtenues lors du TP UV-visible, il est observé que les concentrations des deux composés sont plus faibles Ceci peut-être dû à des erreurs de manipulation, notamment lors de la préparation des échantillons.