

20. Etude de quelques nouvelles Réactions fluorescentes de l'acide borique et Dosage fluorimétrique de quantités de bore de l'ordre du Nanogramme

par M. et A. Marcantonatos et D. Monnier

(4 XII 64)

On sait depuis longtemps qu'en milieu sulfurique concentré l'acide borique forme des complexes colorés avec des dérivés azoïques aromatiques et des hydroxy-anthraquinones. De nombreux réactifs appartenant à ces deux classes de colorants ont été d'ailleurs proposés pour le dosage colorimétrique du bore [1]. D'autre part il a été trouvé que l' amino-1-hydroxy-4-anthraquinone [2], la dihydroxy-1,8-anthraquinone [3] et l'acide (*o*-arsénophénylazo)-1-hydroxy-2-naphtalène-disulfonique-3,6 [4] forment avec l'acide borique, dans des conditions analogues, des complexes fluorescents permettant le dosage fluorimétrique de traces de bore.

Dans tous ces réactifs on note la présence, en position 2 par rapport à un groupement pouvant fonctionner comme donneur d'électrons, d'une fonction, le plus souvent -OH, généralement assez réactive. Il est bien possible que ces deux fonctions soient les «centres complexants» des réactifs en question [3].

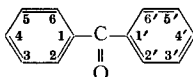
Partant de ces considérations, nous avons examiné l'action de l'acide borique, en milieu sulfurique, sur certains dérivés de la benzophénone. Avec la dihydroxy-2,4-benzophénone, nous avons déjà obtenu une réaction fluorescente que nous avons mise à profit pour le dosage de quantités de bore comprises entre 0,0034 et 0,18 $\mu\text{g/ml}$ [5]. D'autres dérivés de la benzophénone donnent aussi avec l'acide borique des réactions de fluorescence très sensibles.

L'objet de la présente recherche est l'étude systématique de ces fluorescences afin de trouver un réactif permettant le dosage de quantités de bore de l'ordre du nanogramme (10^{-3} μg).

Parmi les réactifs étudiés, l'hydroxy-2-méthoxy-4-chloro-4'-benzophénone est le plus sensible; il permet de doser avec une précision satisfaisante 0,00036 à 0,036 $\mu\text{g/ml}$ de bore dans un volume total de 3 ml.

A. Partie expérimentale

1. *Réactifs étudiés.* Nous avons examiné les dérivés suivants de la benzophénone (Maison ALDRICH):



- Hydroxy-2-méthoxy-4-chloro-4'-benzophénone (Bz_1)
- Hydroxy-2-méthoxy-4-méthyl-4'-benzophénone (Bz_2)
- Tétrahydroxy-2,2',4,4'-benzophénone (Bz_3)
- Dihydroxy-2,2'-diméthoxy-4,4'-benzophénone (Bz_4)
- Dihydroxy-2,2'-méthoxy-4-benzophénone (Bz_5)
- Dihydroxy-2,2'-*n*-octyloxy-4-benzophénone (Bz_6)
- Hydroxy-2-chloro-5-benzophénone (Bz_7)
- Hydroxy-2-méthyl-5-benzophénone (Bz_8)
- Trihydroxy-2,4,4'-benzophénone (Bz_9)

Ils ont été purifiés par double recristallisation, en présence de noir animal, dans les mélanges eau-éthanol suivants¹⁾:

Bz₁: 13% H₂O dans EtOH (V/V)

Bz₂: 10% H₂O dans EtOH (V/V)

Bz₃: 20% EtOH dans H₂O

Bz₄: 25% H₂O dans EtOH

Bz₅: 50% H₂O dans EtOH

Bz₆: 20% H₂O dans EtOH

Bz₇: 15% H₂O dans EtOH

Bz₈: 30% H₂O dans EtOH

Bz₉: 30% EtOH dans H₂O

Nous avons utilisé en outre de l'eau bidistillée dans du quartz, de l'acide sulfurique ($d = 1,84$) *p. a.* MERCK, de l'acide sulfurique ($d = 1,84$) suprapur MERCK, des solutions d'acide borique (*p. a.* MERCK) $10^{-3}M$ (10,82 μg B/ml), $10^{-4}M$ et $10^{-5}M$ dans H₂SO₄ conc., conservées dans des ballons en quartz.

2. *Appareillage.* Les mesures d'excitation et de fluorescence ont été effectuées au moyen du spectrofluorimètre ZEISS (modèle ZFM4C) à deux monochromateurs, à l'aide de la lampe au xénon ou à mercure comme source d'excitation, et avec des cuves de quartz de 1 cm d'épaisseur. Avant chaque mesure, l'appareil est calibré à l'aide de l'étalon fluorescent de la Maison ZEISS.

3. *Préparation des solutions.* Toutes les solutions ont été préparées dans des tubes à essai en quartz transparent (diamètre 14 mm, longueur 130 mm; SOCIÉTÉ ELECTROCHIMIQUE DE LA TOUR DE TRÈME²⁾). Volume total de la solution: 3 ml.

B. Spectres d'excitation et de fluorescence. – Dans les figures 1 et 2 nous reproduisons les spectres apparents d'excitation et de fluorescence des solutions de réactifs, en présence et en absence d'acide borique. Ces spectres, à l'exception de Bz₈ et Bz₉ (voir partie C, p. 197), sont établis après un temps de réaction pour lequel l'intensité de fluorescence est maximum et constante. Le rapport des concentrations molaires [réactif]/[acide borique] des solutions sulfuriques est toujours de 3. Le tableau I donne la composition exacte de ces solutions et leurs caractéristiques spectrales.

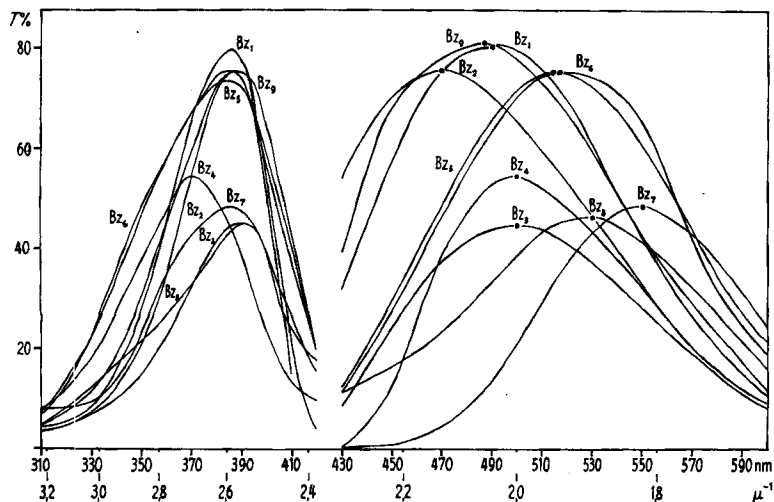


Fig. 1. Spectres apparents d'excitation et de fluorescence des solutions sulfuriques d'acide borique en présence de réactifs

¹⁾ Les dissolvants utilisés pour la recristallisation doivent être de pureté analytique.

²⁾ Les tubes à essai et les pipettes doivent être nettoyés avec du mélange sulfonitrique et rincés avec de l'eau bidistillée.

Les spectres d'excitation des différents réactifs en présence d'acide borique présentent une analogie de forme bien marquée et des maximums très voisins; ceux-ci se situent, en effet, dans un intervalle de 19 nm. On peut donc admettre une structure très semblable pour tous les complexes «Bz + BO₃H₃». Quant aux spectres de fluorescence, on observe une certaine analogie de forme mais une répartition des maximums dans une région plus étendue du spectre. Il semble, en ce qui concerne le rayonnement de fluorescence, que la composition spectrale dépend principalement de la structure de la partie organique du complexe. Il est en effet intéressant de noter (fig. 1, tableau I) que les fréquences des maximums de fluorescence sont les mêmes ou très proches lorsque les agents complexants contiennent, dans les mêmes positions, le même nombre de substituants de nature électronique semblable³⁾; c'est le cas pour les complexes de l'acide borique avec Bz₃ et Bz₄, Bz₅ et Bz₆.

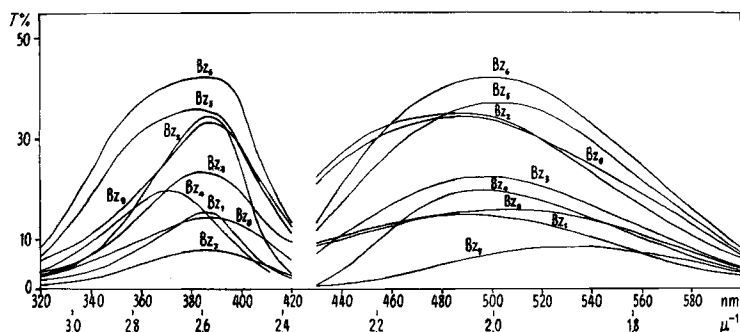


Fig. 2. Spectres apparents d'excitation et de fluorescence des solutions sulfuriques de réactifs

Tableau I. Composition des solutions, fréquences des maximums d'excitation et de fluorescence et conditions d'obtention d'une intensité maximum de fluorescence

Réactifs Bz	BO ₃ H ₃	q _{Bz}	q _B	F _{max}	l.b.e.	E _{max}	l.b.f. t	t
							(temp. amb.)	(à 70°)
Bz ₁	10,0	3,333	2,625	0,03607	2,59 (386)	0,045 2,04 (490)	0,14	35
Bz ₂	10,0	3,333	2,420	0,03607	2,58 (388)	0,056 2,13 (470)	0,13	30
Bz ₃	20,0	6,666	4,920	0,07213	2,56 (390)	0,066 2,00 (500)	0,14	50
Bz ₄	200	66,66	54,80	0,72133	2,69 (371)	0,052 2,00 (500)	0,14	15
Bz ₅	50,0	16,66	12,19	0,18030	2,60 (384)	0,11 1,94 (515)	0,15	90
Bz ₆	60,0	19,99	20,48	0,21629	2,60 (385)	0,11 1,93 (517)	0,15	90
Bz ₇	200	66,66	46,50	0,72133	2,60 (385)	0,11 1,82 (550)	0,15	35
Bz ₈	30,0	9,999	6,36	0,10819	2,56 (390)	0,11 1,89 (530)	0,15	30
Bz ₉	20,0	6,666	4,59	0,07213	2,58 (387)	0,12 2,05 (487)	0,16	30

Bz et BO₃H₃ = concentrations du réactif et de l'acide borique, en μmole/l.

q_{Bz} et q_B = concentrations du réactif et de bore, en μg/ml.

E_{max} et F_{max} = fréquences des maximums d'excitation et de fluorescence, en μ⁻¹ (entre parenthèses: λ en nm)

l.b.e. et l.b.f. = largeurs des bandes respectivement d'excitation et de fluorescence, en μ⁻¹.

t = temps en min après lequel les spectres (fig. 1 et 2) ont été établis.

³⁾ Tous les substituants (v. formules des réactifs, p. 194), à l'exception de -Cl, sont électrodonneurs.

Entre les réactifs Bz_1 et Bz_2 d'une part, Bz_7 et Bz_8 d'autre part (fig. 1) on observe un décalage caractéristique de 20 nm des maximums de fluorescence qui doit être attribué à la nature électronique très différente des groupements CH_3 et $-Cl$, nature qui a une certaine influence non seulement sur la composition spectrale de la fluorescence, mais aussi, et de façon plus marquée, sur son intensité (v. p. 200).

C. Conditions de formation des complexes. – La vitesse de formation des complexes dépend aussi de la structure électronique du réactif. A la température ordinaire, le temps nécessaire à l'établissement de l'équilibre $i BO_3H_3 + j Bz \rightleftharpoons$ complexe, varie, selon le réactif, entre 15 min et 26 h environ. Malheureusement, pour des temps de réaction relativement longs, les résultats des mesures sont incertains car les réactifs subissent des oxydations partielles en substances fluorescentes.

Pour éviter ce phénomène et accélérer l'établissement de l'équilibre, on développe la fluorescence à 70° . Les résultats sont dans ces conditions très satisfaisants, sauf pour les réactifs Bz_8 et Bz_9 qui donnent des produits d'oxydation fluorescents. Les courbes de la figure 3 représentent la variation de l'intensité de fluorescence (corrigée par rapport au blanc) en fonction du temps, à la température ordinaire et à 70° . Elles indiquent le temps qu'il faut pour atteindre l'équilibre $i BO_3H_3 + j Bz \rightleftharpoons$ complexe. La composition des solutions et les largeurs des bandes utilisées pour les mesures de fluorescence, sont indiquées au tableau I.

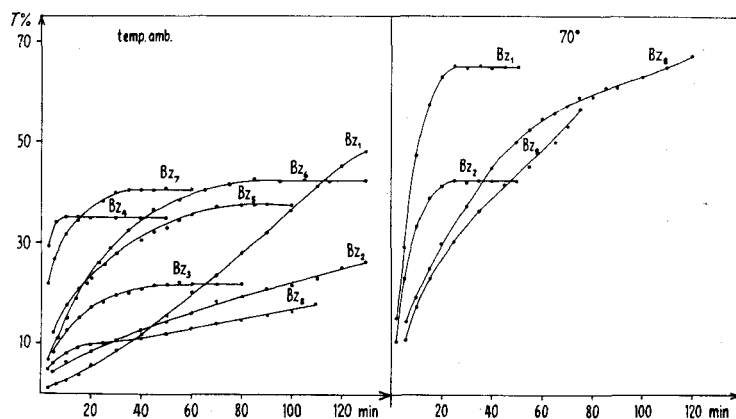


Fig. 3. Variation de l'intensité de fluorescence en fonction du temps

D. Contrôle de la validité de la loi de fluorescence. – Une série de courbes représentant la variation de l'intensité de fluorescence des réactifs décrits à la page 2 en présence de quantités croissantes d'acide borique, montrent que ces complexes obéissent à la loi de la fluorescence. Elles nous indiquent aussi les possibilités d'utilisation de différentes benzophénones comme réactifs fluorimétriques du bore. Pour éviter les phénomènes d'amortissement et réduire l'influence des effets internes de filtre, les concentrations d'acide borique et des réactifs doivent être comprises entre des limites bien déterminées. Les effets de filtre sont dus à l'absorption des radiations excitatrices par les complexes eux-mêmes, et davantage encore par les réactifs en excès. En effet, lors de la dissolution des réactifs dans l'acide sulfurique, on observe un approfondissement de la nuance qu'on peut attribuer à la protonation de la fonc-

tion $\text{=CO:} >\text{C=O} + \text{H}_2\text{SO}_4 \rightarrow [\text{C=O-H}]^+ + \text{HSO}_4^-$, favorisée par la présence de substituants électron-donneurs en position *o*- et *p*- (ou *o'*- et *p'*-). L'effet bathochrome que subissent tous les réactifs en milieu sulfurique est susceptible de les rendre absorbants dans la région du spectre utilisée pour l'excitation.

Les courbes de la figure 4 ont été établies pour un rapport $R = \text{conc. molaire du réactif}/\text{conc. molaire maximum d'acide borique} = 3$. Chaque point est la moyenne arithmétique de 5 essais parallèles. Ces courbes et le tableau II donnant les erreurs relatives sur chaque série d'essais, montrent que les propriétés fluorescentes des complexes sont rigoureusement additives, ce qui précisément permet un dosage fluorimétrique de traces de bore.

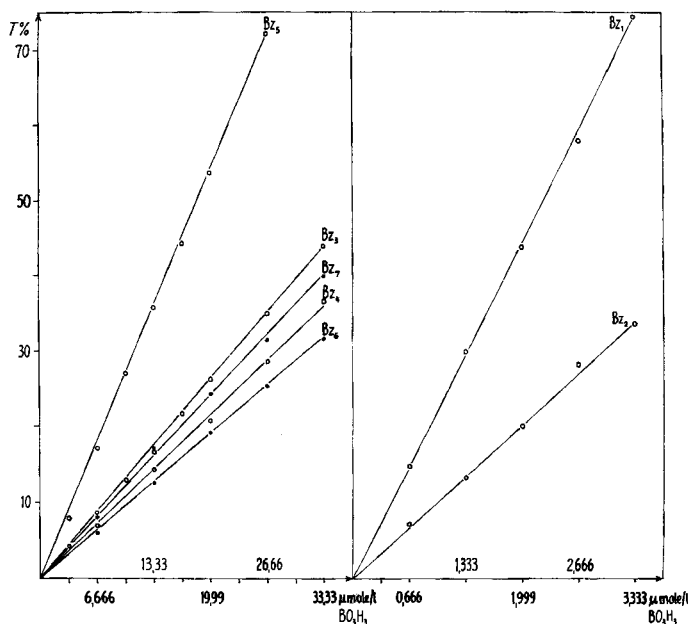


Fig. 4. Courbes d'étalonnage (lampe à Hg, filtre ~ 365 nm, volume total des solutions 3 ml, $[\text{Bz}]/[\text{BO}_3\text{H}_3]_{\text{max}} = 3$). Largeurs de la bande de fluorescence:

Bz_7 : $0,033 \mu^{-1}$ à $1,82 \mu^{-1}$

Bz_6 : $0,022 \mu^{-1}$ à $1,93 \mu^{-1}$

Bz_5 : $0,030 \mu^{-1}$ à $1,94 \mu^{-1}$

Bz_4 : $0,016 \mu^{-1}$ à $2,00 \mu^{-1}$

Bz_3 : $0,016 \mu^{-1}$ à $2,00 \mu^{-1}$

Bz_2 : $0,016 \mu^{-1}$ à $2,13 \mu^{-1}$

Bz_1 : $0,014 \mu^{-1}$ à $2,04 \mu^{-1}$

E. Sensibilité relative des réactifs. — Les courbes de la fig. 4 représentant la relation simple $R = a c l^4$ ($R = \text{réponse du dispositif de mesure à la fréquence de fluorescence maximum du complexe}$; $c = \text{concentration du complexe}$; $l = \text{épaisseur de la cuve}$), ne permettent pas de comparer les sensibilités des divers réactifs. car toutes ces courbes n'ont pas été établies avec la même ouverture de fente du monochromateur de fluorescence et avec les mêmes concentrations d'acide borique. Nous avons

⁴) $a = k \cdot K \varepsilon I_0$; $k = \text{coefficient d'efficacité}$; $K = \text{coefficient de proportionnalité}$; $\varepsilon = \text{coefficient d'extinction moléculaire du complexe}$; $I_0 = \text{intensité du rayonnement excitateur}$.

Tableau II. *Précision des résultats (fig. 4) et valeurs des témoins (blancs)*

$E\% = 100 Sm \cdot t/T\%$									$T_t\%$
$[\text{BO}_3\text{H}_3]/$ Réactif	3,333	6,666	9,999	13,33	16,66	19,99	26,66	33,33	
Bz ₇		± 6,2		± 2,0		± 1,5	± 0,9	± 1,3	8,4
Bz ₆		± 4,8		± 4,2		± 2,9	± 2,1	± 1,8	30,3
Bz ₅	± 6,8	± 5,5	± 2,9	± 4,1	± 2,4	± 1,7	± 0,9		38,3
Bz ₁		± 7,3		± 6,9		± 3,1	± 2,6	± 1,9	21,1
Bz ₃	± 11,2	± 4,8	± 3,3	± 2,3	± 3,5	± 2,4	± 1,8	± 1,1	16,6

$E\% = 100 Sm \cdot t/T\%$									$T_t\%$
$[\text{BO}_3\text{H}_3]/$ Réactif	0,333	0,666	0,999	1,333	1,666	1,999	2,666	3,333	
Bz ₃		± 3,4		± 4,7		± 2,2	± 2,1	± 1,3	22,3
Bz ₁		± 3,9		± 3,3		± 2,5	± 1,6	± 1,1	12,2

$[\text{BO}_3\text{H}_3]$ = concentration d'acide borique, en $\mu\text{mole/l}$.

$T_t\%$ = transmission des témoins (blancs).

$E\%$ = erreur relative.

Sm = erreur-type (= S/N ; \sqrt{N} = nombre d'analyses, S = écart-type);

t (95%) = 2,776 pour 4 degrés de liberté.

$T\%$ = transmission par rapport au témoin; moyenne arithmétique de 5 essais effectués en parallèle.

donc établi une échelle de sensibilité par le calcul de a , en mesurant l'intensité de fluorescence aux maximums respectifs des complexes, pour une concentration de réactif et d'acide borique et pour une ouverture de fente fixes. Les valeurs de a ($\mu\text{mole}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ainsi obtenues ne sont évidemment pas rigoureusement comparables entre elles, puisque la largeur de la bande dépend encore de la longueur d'onde. Elles permettent toutefois une comparaison approximative des sensibilités des différents réactifs. Le tableau III donne dans la 2^e colonne les valeurs de a et dans la dernière colonne les largeurs des bandes de fluorescence que délimite l'ouverture de la fente choisie de 0,2 mm. La sensibilité du dispositif de mesure est 2,5 fois inférieure à celle que nous avons utilisée pour l'établissement des courbes de la figure 4. La concentration d'acide borique est de 3,333 $\mu\text{mole/l}$. Les valeurs de a données dans la troisième colonne du tableau III ont été calculées à partir de courbes d'étalonnage (fig. 4) en rapportant les résultats à une même ouverture de fente (0,2 mm). On observe une bonne concordance des valeurs ainsi obtenues. On voit que Bz₁ est environ 2 fois plus

Tableau III. *Sensibilité relative des différents réactifs*

Réactif	$a \mu\text{mole}^{-1} \text{cm}^{-1} \text{l}$	$l. b. f.$
Bz ₁	38,1	0,030 μ^{-1} à 2,04 μ^{-1}
Bz ₂	16,8	0,027 μ^{-1} à 2,13 μ^{-1}
Bz ₃	1,08	0,046 μ^{-1} à 2,00 μ^{-1}
Bz ₄	0,96	0,046 μ^{-1} à 2,00 μ^{-1}
Bz ₅	0,90	0,030 μ^{-1} à 1,94 μ^{-1}
Bz ₆	0,81	0,031 μ^{-1} à 1,93 μ^{-1}
Bz ₇	0,48	0,033 μ^{-1} à 1,82 μ^{-1}

sensible que Bz_2 et beaucoup plus sensible que toutes les autres benzophénones étudiées. Ce réactif donne, d'autre part, les blancs les plus faibles et les résultats les plus reproductibles. Aussi a-t-il été choisi pour le dosage fluorimétrique de quantités de bore de l'ordre du nanogramme.

F. Dosages de 1,1 à 22 ng de bore par l'hydroxy-2-méthoxy-4-chloro-4'-benzophénone (H.M.C.B.). — a) *Choix de la concentration du réactif.* Pour doser de très faibles quantités de bore, il est nécessaire d'établir une concentration optimum du réactif, suffisante pour que la réaction soit aussi quantitative que possible, mais pas trop élevée afin que les blancs restent suffisamment faibles. Nous avons étudié, pour une concentration de $0,666 \mu\text{mole/l}$ d'acide borique ($7,213 \text{ ng B/ml}$), l'influence du rapport $r = [\text{H.M.C.B.}]/[\text{BO}_3\text{H}_3]$ sur l'intensité de fluorescence. D'autre part, pour déterminer la teneur en bore de l'acide sulfurique utilisé, nous avons préparé les solutions d'une part avec l'acide sulfurique *p. a.* MERCK et d'autre part avec l'acide suprapur MERCK. La fluorescence a été mesurée après chauffage des solutions à 70° durant 35 min. La fig. 5 montre que l'intensité de fluorescence est maximum pour $r = 40$, soit pour $21 \mu\text{g}$ d'H.M.C.B. dans 3 ml, teneur du réactif qui permet de doser jusqu'à 100 ng B/3 ml (v. fig. 4, Bz_1), et que le recours à l'acide sulfurique suprapur MERCK n'est pas nécessaire.

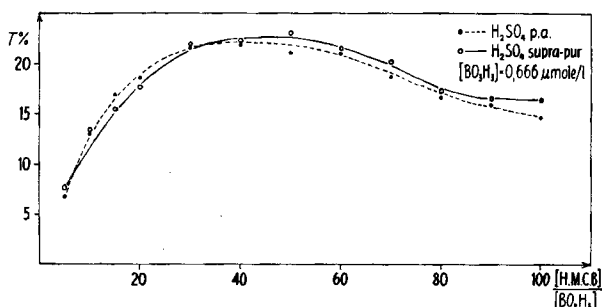


Fig. 5. Variation de l'intensité de fluorescence en fonction de $r = [\text{H.M.C.B.}]/[\text{BO}_3\text{H}_3]$

b) *Mode opératoire.* Dans un tube à essai on mélange 2,6 ml d'acide sulfurique concentré renfermant 1,1 à 22 ng de bore et 0,4 ml d'une solution sulfurique de H.M.C.B. à 0,00525%. On introduit le tube dans une étuve à 70° , laisse pendant 35 min., puis on refroidit et mesure la transmission à $2,04 \mu^{-1}$ (490 nm) par rapport à celle de la solution témoin (2,6 ml d'acide sulfurique + 0,4 ml de réactif), en excitant la solution contenue dans une cuve en quartz de 1 cm d'épaisseur par le triplet du mercure (filtre 365 nm).

c) *Courbes d'étalonnage.* Dans la fig. 6 nous donnons à titre d'exemple 2 courbes d'étalonnage établies dans les conditions ci-dessus; chaque point représente la moyenne arithmétique de 5 dosages parallèles; l'erreur relative $E\% = \frac{S_m \cdot t}{T} \cdot 100\%$ est indiquée pour chaque point.

G. Spécificité de la H.M.C.B. — Nous avons recherché l'effet, sur le dosage de 22 ng B par la H.M.C.B., des éléments suivants ($10 \mu\text{g/ml}$): Li^+ , Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , Be^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Sr^{+2} , Ba^{+2} , Sc^{+3} , Ce^{+4} , Th^{+4} , Pr^{+3} , Er^{+3} , Ti^{+4} , Zr^{+4} , V^{+5} , Ta^{+5} , Nb^{+5} , Cr^{+3} , Mo^{+6} , W^{+6} , Mn^{+2} , Re^{+7} , Fe^{+3} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Cu^{+2} , Ag^+ , Zn^{+2} , Hg^{+2} , Cd^{+2} , Al^{+3} , In^{+3} , Tl^{+3} , Sn^{+2} , Pb^{+2} , As^{+3} , Sb^{+3} , Bi^{+3} , le rapport élément/bore étant toujours de

10000/22. Aucun de ces éléments n'a donné une fluorescence supérieure à celle du blanc. La spécificité de la H.M.B.C. comme réactif fluorimétrique du bore est, par conséquent, très bonne.

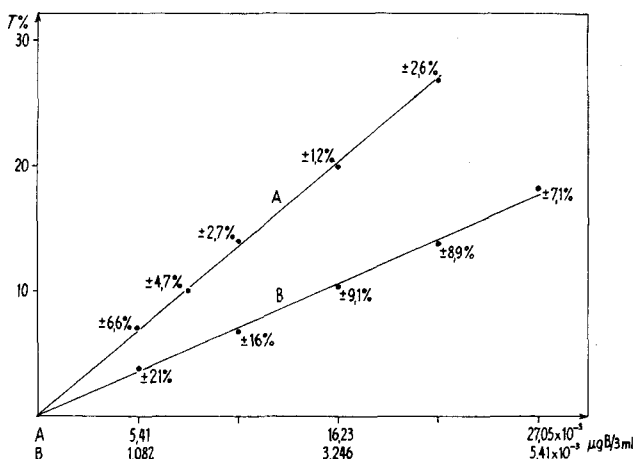


Fig. 6. Courbes d'étalonnage pour des quantités de bore comprises entre 0,001082 et 0,02164 $\mu\text{g}/3 \text{ ml}$. Largeur de la bande de fluorescence à $2,04 \mu^{-1}$: A: $0,016 \mu^{-1}$; B: $0,02 \mu^{-1}$.

Nous remercions le FONDS NATIONAL SUISSE, grâce auquel nous avons pu entreprendre ce travail.

SUMMARY

In concentrated sulfuric acid, boric acid reacted with nine substituted 2-hydroxy-benzophenones, to form fluorescent complexes. Excitation spectra indicate that these complexes are similar in structure, and fluorescence spectra show that the composition and intensity of fluorescent light depend on the electronic nature of the various substituents of the complexing agents. The optimal conditions of complex formation are investigated and the relative sensitivity of the reagents is established. All the reactants studied can be used for the determination of submicrogram quantities of boron. 2-hydroxy-4-methoxy-4'-chloro-benzophenone is the most sensitive reactant; it allows the determination of 0,00036 to 0,036 μg of boron (as boric acid) per ml (total volume: 3 ml) with a precision of $\pm 21\%$ and $\pm 1,5\%$, respectively.

Laboratoires de chimie minérale et analytique
de l'Université de Genève

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. CAPELLE, *Chim. analyt.* **45**, 303 (1963).
- [2] G. H. ELLIS, E. G. ZOOK & O. BAUDISCH, *Analyt. Chemistry* **21**, 1345 (1949).
- [3] R. RUGGIERI, *Analyt. chim. Acta* **25**, 145 (1961).
- [4] M. MARCANTONATOS, D. MONNIER & A. MARCANTONATOS, *Helv.* **47**, 705 (1964).
- [5] D. MONNIER, A. MARCANTONATOS & M. MARCANTONATOS, *Helv.* **47**, 1980 (1964).