Un marqueur fluorescent, la fluorescéine

Bac S 2019 Liban (ancien programme) · Exercice 1 **10 points** **Durée conseillée 1 h 40**

1.1 Identifier les différents couples acide/base associés à la fluorescéine et estimer leur pK_a.

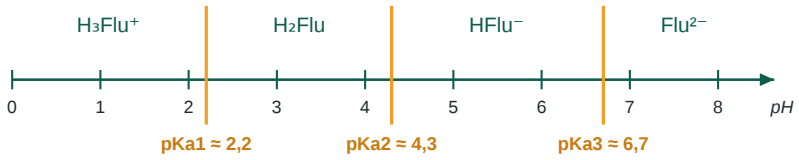
D'une forme à la suivante, la fluorescéine perd un ion H^+ : deux formes voisines sur le diagramme constituent un couple acide/base. Le pK_a du couple se lit à la frontière entre les deux domaines de prédominance.

- frontière entre H_3Flu^+ et H_2Flu : $pH \approx 2{,}2$;
- frontière entre H_2Flu et $HFlu^-$: $pH \approx 4{,}3$;
- frontière entre $HFlu^-$ et Flu^{2-} : $pH \approx 6{,}7$.

Trois couples : H_3Flu^+/H_2Flu ($pK_{a1} \approx 2{,}2$), $H_2Flu/HFlu^-$ ($pK_{a2} \approx 4{,}3$), $HFlu^-/Flu^{2-}$ ($pK_{a3} \approx 6{,}7$).

PIÈGE
Écrire la base avant l'acide, ou associer deux formes non voisines comme H_3Flu^+ et $HFlu^-$: un couple n'échange qu'un seul ion H^+.

MÉTHODE
À la frontière, acide et base ont la même concentration, donc $pH = pK_a$. Pour lire entre deux graduations, mesurer à la règle : distance à la graduation précédente divisée par la longueur d'une unité de pH.



1.1 · Diagramme de prédominance du sujet, avec les trois frontières lues

1.2.1 Écrire l'équation de la dissolution du fluorescinate de sodium en ions Flu^{2-} et Na^+ dans l'eau. En déduire la concentration molaire apportée $[Flu^{2-}]_0$.

Données utiles $m = 1{,}00 \times 10^{-2}$ g ; $V = 100$ mL ; $M(FluNa_2) = 376$ g · mol^{-1}

$$FluNa_2\,(s) \longrightarrow Flu^{2-}\,(aq) + 2\,Na^+\,(aq)$$

Une mole de solide dissous apporte une mole d'ions Flu^{2-} :

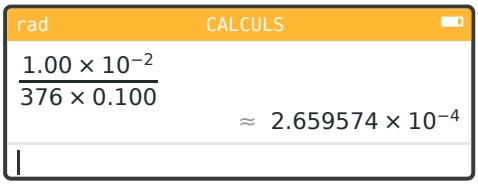
$$[Flu^{2-}]_0 = \frac{n(FluNa_2)}{V} = \frac{m}{M \times V} = \frac{1{,}00 \times 10^{-2}}{376 \times 0{,}100}$$

$[Flu^{2-}]_0 = 2{,}66 \times 10^{-4}$ mol · L^{-1}

PIÈGE
Laisser le volume en millilitres, ou oublier le coefficient 2 devant Na^+ : l'équation doit respecter la conservation des éléments et des charges.

COMPRENDRE
Trois chiffres significatifs, comme la masse et la masse molaire. La concentration apportée en ions sodium serait le double : $5{,}32 \times 10^{-4}$ mol · L^{-1}.

À LA CALCULATRICE



1.2.2 Les ions Flu^{2-} réagissent avec l'eau. Écrire l'équation de la réaction. De quel type de réaction s'agit-il ?

Flu^{2-} est la base du couple $HFlu^-/Flu^{2-}$; l'eau est l'acide du couple H_2O/HO^-.

$$Flu^{2-}\,(aq) + H_2O\,(l) \rightleftharpoons HFlu^-\,(aq) + HO^-\,(aq)$$

Réaction acido-basique : l'eau cède un ion H^+ à la base Flu^{2-}.

COMPRENDRE
La double flèche traduit une transformation non totale : à l'équilibre, Flu^{2-} et $HFlu^-$ coexistent, ce que la question suivante exploite.

1.2.3 Justifier la relation $[\mathrm{Flu}^{2-}] = [\mathrm{Flu}^{2-}]_0 - [\mathrm{HFlu}^-]$.

D'après l'équation de la question 1.2.2, chaque ion Flu^{2-} qui réagit donne un ion HFlu^-. Les ions apportés se retrouvent donc, à l'équilibre, soit intacts, soit sous la forme HFlu^- (conservation de la matière, à volume constant) :

$$[\mathrm{Flu}^{2-}]_0 = [\mathrm{Flu}^{2-}] + [\mathrm{HFlu}^-]$$

$$\boxed{[\mathrm{Flu}^{2-}] = [\mathrm{Flu}^{2-}]_0 - [\mathrm{HFlu}^-]}$$

COMPRENDRE
On néglige les formes $\mathrm{H_2Flu}$ et $\mathrm{H_3Flu}^+$: à pH voisin de 7, on est loin de leurs domaines de prédominance.

1.2.4 En déduire la concentration molaire en ions HFlu^- à l'équilibre pour un pH égal à 7,0, à l'aide de la relation $pH = pK_a + \log \dfrac{[\mathrm{Flu}^{2-}]}{[\mathrm{HFlu}^-]}$.

Données utiles $[\mathrm{Flu}^{2-}]_0 = 2{,}66 \times 10^{-4}\ \mathrm{mol \cdot L^{-1}}$ (1.2.1) ; $pK_{a3} \approx 6{,}7$ (1.1) ; $pH = 7{,}0$

Le couple concerné est $\mathrm{HFlu}^-/\mathrm{Flu}^{2-}$, de pK_{a3} :

$$\frac{[\mathrm{Flu}^{2-}]}{[\mathrm{HFlu}^-]} = 10^{pH-pK_{a3}}$$

Avec la relation de la question 1.2.3 : $[\mathrm{Flu}^{2-}]_0 - [\mathrm{HFlu}^-] = [\mathrm{HFlu}^-] \times 10^{pH-pK_{a3}}$, d'où

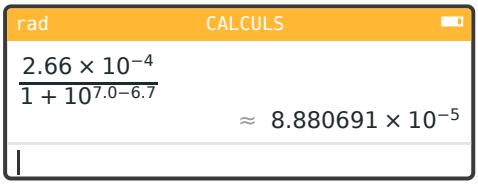
$$[\mathrm{HFlu}^-] = \frac{[\mathrm{Flu}^{2-}]_0}{1 + 10^{pH-pK_{a3}}} = \frac{2{,}66 \times 10^{-4}}{1 + 10^{7{,}0-6{,}7}}$$

$$\boxed{[\mathrm{HFlu}^-] = 8{,}9 \times 10^{-5}\ \mathrm{mol \cdot L^{-1}}}$$

PIÈGE
Prendre pK_{a1} ou pK_{a2} : la relation ne lie que les deux formes d'un même couple. Ne pas inverser le quotient : la base est au numérateur.

COMPRENDRE
Deux chiffres significatifs suffisent : le pK_{a3} est lu sur un graphique. Avec 6,6 ou 6,8, on trouverait $7{,}6 \times 10^{-5}$ ou $1{,}0 \times 10^{-4}\ \mathrm{mol \cdot L^{-1}}$.

À LA CALCULATRICE



1.2.5 Le résultat trouvé est-il cohérent avec le diagramme de prédominance ? Justifier.

Données utiles $[\mathrm{HFlu}^-] = 8{,}9 \times 10^{-5}\ \mathrm{mol \cdot L^{-1}}$ (1.2.4) ; $[\mathrm{Flu}^{2-}]_0 = 2{,}66 \times 10^{-4}\ \mathrm{mol \cdot L^{-1}}$ (1.2.1)

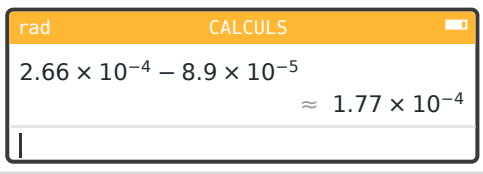
$[\mathrm{Flu}^{2-}] = [\mathrm{Flu}^{2-}]_0 - [\mathrm{HFlu}^-] = 2{,}66 \times 10^{-4} - 8{,}9 \times 10^{-5} = 1{,}8 \times 10^{-4}\ \mathrm{mol \cdot L^{-1}}$

Le calcul donne $[\mathrm{Flu}^{2-}] > [\mathrm{HFlu}^-]$. Or $pH = 7{,}0 > pK_{a3}$: sur le diagramme, on se trouve dans le domaine de Flu^{2-}.

Oui : $[\mathrm{Flu}^{2-}] \approx 1{,}8 \times 10^{-4}\ \mathrm{mol \cdot L^{-1}}$ est environ le double de $[\mathrm{HFlu}^-]$, la forme Flu^{2-} prédomine comme le prévoit le diagramme.

COMPRENDRE
Prédominer ne veut pas dire être seul : à 0,3 unité de pH au-dessus du pK_a, un tiers de la fluorescéine est encore sous forme HFlu^-.

À LA CALCULATRICE



1.3.1 Vérifier que le pH d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium de concentration molaire $0{,}01\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ est égal à 12.

Données utiles $pK_e = 14$; $c = 0{,}01\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

L'hydroxyde de sodium est entièrement dissocié dans l'eau : $[\text{HO}^-] = c = 1\times10^{-2}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

Produit ionique de l'eau : $[\text{H}_3\text{O}^+]\times[\text{HO}^-] = K_e = 10^{-pK_e}$, donc

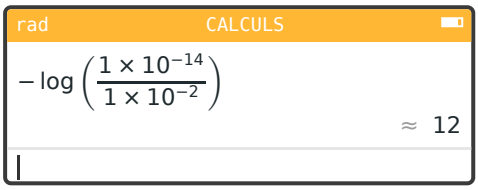
$$[\text{H}_3\text{O}^+] = \frac{10^{-14}}{1\times10^{-2}} = 1\times10^{-12}\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$$

$$pH = -\log[\text{H}_3\text{O}^+] = -\log\left(1\times10^{-12}\right)$$

$pH = 12$, valeur attendue.

MÉTHODE
Pour une base forte de concentration c : passer par $[\text{HO}^-] = c$, puis par K_e. On obtient la formule de l'ancien programme $pH = pK_e + \log c$, qu'il vaut mieux savoir retrouver.

À LA CALCULATRICE



1.3.2 Cette solution permet-elle d'assurer une fluorescence maximale ? Argumenter.

À $pH = 12$, on est très au-dessus de $pK_{a3} \approx 6{,}7$: la fluorescéine est presque entièrement sous la forme Flu^{2-}. La figure 2 le confirme : à ce pH, l'absorbance est sur son palier maximal.

D'après l'énoncé, Flu^{2-} est la forme la plus fluorescente.

Oui : à pH 12, la fluorescéine est sous la forme Flu^{2-}, la plus fluorescente ; la fluorescence est maximale.

COMPRENDRE
Écart de plus de 5 unités de pH avec le pK_{a3} : le rapport $[\text{Flu}^{2-}]/[\text{HFlu}^-]$ dépasse 10^5. La forme acide est négligeable.

1.3.3 Quelle courbe de la figure 1 correspond au spectre d'absorption de la fluorescéine, sachant qu'elle absorbe dans le bleu et fluoresce dans le vert ?

Le maximum de la courbe en trait plein se situe vers 490 nm, celui de la courbe en pointillés vers 515 nm.

Dans le visible, le bleu correspond à des longueurs d'onde plus courtes que le vert : la courbe dont le maximum est le plus à gauche est celle de l'absorption.

Le spectre d'absorption est la courbe en trait plein (maximum vers 490 nm) ; la courbe en pointillés est le spectre d'émission.

COMPRENDRE
La lumière réémise a une longueur d'onde plus grande que la lumière absorbée : le photon émis a une énergie plus faible, une partie de l'énergie absorbée étant dissipée dans la solution.

1.3.4 L'eau à la source du Lez à Montpellier a un pH de 8,3. Le suivi fluorimétrique du cours d'eau est-il envisageable ? Justifier.

$pH = 8{,}3 > pK_{a3} \approx 6{,}7$: dans cette eau, la fluorescéine est très majoritairement sous la forme Flu^{2-}, la plus fluorescente.

Sur la figure 2, à $pH = 8{,}3$, l'absorbance vaut environ 0,7 : elle a pratiquement atteint son palier maximal.

Oui : à pH 8,3, la fluorescéine est presque entièrement sous la forme Flu^{2-} ; sa fluorescence est proche du maximum, le suivi est envisageable.

PIÈGE
Répondre sans s'appuyer sur un document. « Justifier » attend ici un argument chiffré : comparaison du pH au pK_{a3} ou lecture de l'absorbance sur la figure 2.

1.4.1 Rédiger le protocole de dilution pour préparer S_1 à partir de S_0 en précisant la liste du matériel utilisé.

Dilution par 10 : le volume de solution fille est dix fois celui de solution mère prélevé, $V_1 = 10 \times V_0$. Par exemple $V_0 = 10{,}0$ mL et $V_1 = 100{,}0$ mL.

Matériel : bécher, pipette jaugée de 10,0 mL avec propipette, fiole jaugée de 100,0 mL avec bouchon, pissette d'eau distillée.

- Verser un peu de S_0 dans le bécher.
- Prélever 10,0 mL de S_0 à la pipette jaugée et les introduire dans la fiole jaugée.
- Ajouter de l'eau distillée jusqu'aux deux tiers, boucher, agiter.
- Compléter à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge, boucher, homogénéiser.

Prélever 10,0 mL de S_0 à la pipette jaugée, les placer dans une fiole jaugée de 100,0 mL et compléter à l'eau distillée jusqu'au trait de jauge.

PIÈGE
Utiliser une éprouvette graduée ou un bécher pour mesurer les volumes : seule la verrerie jaugée donne la précision attendue. Ne jamais pipeter directement dans le flacon de solution mère.

COMPRENDRE
Le tableau annonce $2{,}68 \times 10^{-5}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pour S_1, alors que $[\text{Flu}^{2-}]_0/10 = 2{,}66 \times 10^{-5}\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Léger écart du sujet, sans conséquence : on utilise les valeurs du tableau.

1.4.2 À quelle longueur d'onde faut-il réaliser le dosage spectrophotométrique ?

On règle le spectrophotomètre sur la longueur d'onde du maximum d'absorption de l'espèce dosée. Sur le spectre d'absorption de la figure 1 (trait plein), ce maximum est atteint vers 490 nm.

$\lambda \approx 490$ nm, longueur d'onde du maximum d'absorption de Flu^{2-}.

COMPRENDRE
Au maximum d'absorption, l'absorbance mesurée est la plus grande : la mesure est plus sensible et l'incertitude relative plus faible.

1.4.3 Montrer que les mesures réalisées sont en accord avec la loi de Beer-Lambert.

Données utiles tableau des concentrations C et des absorbances A des solutions S_1 à S_4

D'après la loi de Beer-Lambert, $A = \varepsilon\, l\, C$: à longueur d'onde et cuve fixées, l'absorbance est proportionnelle à la concentration. On calcule le quotient $k = \dfrac{A}{C}$ pour chaque solution.

- S_1 : $k_1 = \dfrac{1{,}523}{2{,}68 \times 10^{-5}} = 5{,}68 \times 10^4\ \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$
- S_2 : $k_2 = \dfrac{1{,}200}{2{,}01 \times 10^{-5}} = 5{,}97 \times 10^4\ \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$
- S_3 : $k_3 = \dfrac{0{,}811}{1{,}34 \times 10^{-5}} = 6{,}05 \times 10^4\ \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$
- S_4 : $k_4 = \dfrac{0{,}411}{6{,}70 \times 10^{-6}} = 6{,}13 \times 10^4\ \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$

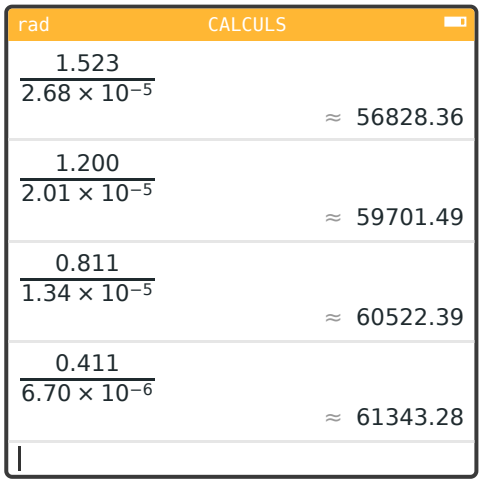
Les quatre quotients sont voisins (écart de moins de 5 % autour de leur moyenne) : les points $(C\ ;\ A)$ sont pratiquement alignés sur une droite passant par l'origine.

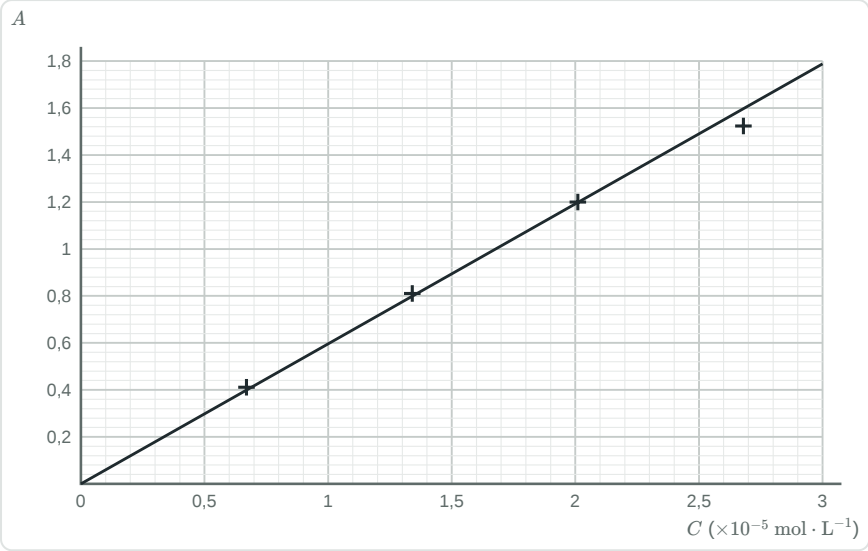
$\dfrac{A}{C} \approx 6{,}0 \times 10^4\ \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ pour les quatre solutions : A est proportionnelle à C, la loi de Beer-Lambert est vérifiée.

COMPRENDRE
Le quotient baisse un peu quand C augmente : au-delà d'une absorbance de 1,5 environ, la loi est moins bien suivie.

MÉTHODE
Deux façons de prouver une proportionnalité : quotient constant dans un tableau, ou droite passant par l'origine sur un graphique. La première est la plus rapide sans papier millimétré.

À LA CALCULATRICE





1.4.3 · Absorbance en fonction de la concentration : points du tableau et droite de pente moyenne

1.4.4 En déduire la valeur du coefficient d'extinction molaire ε pour la forme prédominante de la fluorescéine à ce pH.

Données utiles quotients k (1.4.3) ; $l = 1$ cm

Moyenne des quatre quotients :

$$k = \frac{(5{,}68 + 5{,}97 + 6{,}05 + 6{,}13) \times 10^4}{4} = 5{,}96 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Comme $k = \varepsilon\, l$:

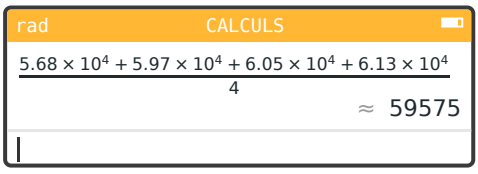
$$\varepsilon = \frac{k}{l} = \frac{5{,}96 \times 10^4}{1}$$

$\varepsilon \approx 6{,}0 \times 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour la forme Flu^{2-} (pH supérieur à 9).

PIÈGE
Oublier l'unité, ou donner $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ seulement : ε dépend de l'unité choisie pour la longueur de cuve, ici le centimètre.

COMPRENDRE
Les quotients sont dispersés de quelques pour cent : deux chiffres significatifs suffisent. La valeur ne vaut qu'à la longueur d'onde de la mesure.

À LA CALCULATRICE



2.1 Identifier les deux réactifs résorcine et anhydride phtalique dans l'équation de réaction. Justifier la démarche.

Données utiles résorcine $C_6H_6O_2$; anhydride phtalique $C_8H_4O_3$

On établit la formule brute de chaque réactif à partir de sa formule topologique.

- Premier réactif (coefficient 2) : un cycle à 6 atomes de carbone portant deux groupes $-OH$, soit $C_6H_6O_2$.
- Second réactif : 8 atomes de carbone (6 dans le cycle et 2 liés à un oxygène par double liaison) et 3 atomes d'oxygène, soit $C_8H_4O_3$.

La résorcine est le premier réactif (coefficient 2, deux groupes $-OH$) ; l'anhydride phtalique est le second (trois atomes d'oxygène).

MÉTHODE
Dans une formule topologique, chaque sommet ou extrémité de segment est un atome de carbone ; on complète avec des hydrogènes pour que chaque carbone ait quatre liaisons.

2.2 Montrer que la résorcine est introduite en excès.

Données utiles résorcine : $m_1 = 3{,}30$ g, $M_1 = 110$ g · mol^{-1} ; anhydride phtalique : $m_2 = 2{,}00$ g, $M_2 = 148$ g · mol^{-1}

$n_1 = \dfrac{m_1}{M_1} = \dfrac{3{,}30}{110} = 3{,}00 \times 10^{-2}$ mol $\quad n_2 = \dfrac{m_2}{M_2} = \dfrac{2{,}00}{148} = 1{,}35 \times 10^{-2}$ mol

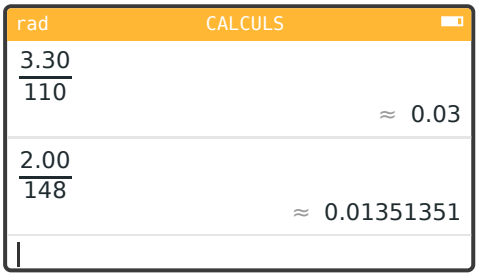
L'équation indique que 2 mol de résorcine réagissent avec 1 mol d'anhydride phtalique. On compare donc $\dfrac{n_1}{2}$ et $\dfrac{n_2}{1}$:

$$\frac{n_1}{2} = 1{,}50 \times 10^{-2} \text{ mol} > n_2 = 1{,}35 \times 10^{-2} \text{ mol}$$

$\dfrac{n_1}{2} > n_2$: l'anhydride phtalique est le réactif limitant, la résorcine est en excès.

PIÈGE
Comparer directement n_1 et n_2 ou, pire, les masses. Il faut diviser chaque quantité de matière par son nombre stœchiométrique avant de comparer.

À LA CALCULATRICE



2.3 Sous quel état physique se trouvent les réactifs à la température du bain d'huile ?

Données utiles bain d'huile à 180 °C ; résorcine : $T_f = 110$ °C, $T_{eb} = 280$ °C ; anhydride phtalique : $T_f = 131$ °C, $T_{eb} = 284$ °C

Pour les deux réactifs, la température du bain est comprise entre la température de fusion et la température d'ébullition :

$110\ ^\circ\text{C} < 180\ ^\circ\text{C} < 280\ ^\circ\text{C}$ et $131\ ^\circ\text{C} < 180\ ^\circ\text{C} < 284\ ^\circ\text{C}$

À 180 °C, la résorcine et l'anhydride phtalique sont tous deux liquides.

COMPRENDRE
Les réactifs fondus se mélangent intimement : la synthèse se fait sans solvant.

2.4 Quel est le rôle de l'acide sulfurique lors de l'étape c ? Justifier.

L'acide sulfurique n'apparaît pas dans le bilan de la réaction : il est écrit au-dessus de la flèche. Il est introduit en très petite quantité (quelques gouttes).

L'acide sulfurique est un catalyseur : il accélère la réaction sans figurer dans son équation.

COMPRENDRE
Un catalyseur diminue la durée de la transformation sans modifier l'état final : il ne change pas la quantité maximale de produit.

2.5 Quelle est la nature des vapeurs émises lors de l'étape d ? Justifier.

D'après l'équation, la synthèse produit de l'eau. Le milieu est à 180 °C, température supérieure à la température d'ébullition de l'eau (100 °C) : l'eau formée se vaporise aussitôt.

Les vapeurs émises sont de la vapeur d'eau, produit de la réaction.

COMPRENDRE
Les autres espèces ne peuvent pas être en cause : les réactifs bouillent au-delà de 280 °C et la fluorescéine ne fond qu'à 315 °C.

2.6 Sous quelle forme prédomine la fluorescéine à la fin de l'étape f ?

Données utiles soude à $1\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $pK_{a3} \approx 6{,}7$ (1.1)

La soude à $1\ \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ est une solution très basique. Le produit se dissout dans un milieu dont le pH est très supérieur à $pK_{a3} \approx 6{,}7$.

À la fin de l'étape f, la fluorescéine est sous la forme Flu^{2-}.

COMPRENDRE
Le produit brut, peu soluble sous la forme H_2Flu, passe en solution parce que le fluorescinate de sodium est très soluble ($600\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$).

2.7 Pourquoi l'ajout d'acide sulfurique dans l'étape h permet-il la précipitation de la fluorescéine ?

Données utiles $pK_{a1} \approx 2{,}2$ et $pK_{a2} \approx 4{,}3$ (1.1) ; forme H_2Flu peu soluble dans l'eau

L'acide sulfurique fait diminuer le pH. Quand le pH passe sous pK_{a3} puis sous $pK_{a2} \approx 4{,}3$, les ions Flu^{2-} sont transformés en HFlu^- puis en H_2Flu, qui devient la forme prédominante.

Or la forme H_2Flu, non chargée, est peu soluble dans l'eau : elle apparaît à l'état solide.

En milieu acide, la fluorescéine passe sous la forme H_2Flu, peu soluble dans l'eau : elle précipite.

PIÈGE
Trop acidifier : sous $pH \approx 2{,}2$, la forme H_3Flu^+, chargée, prédominerait et le solide pourrait se redissoudre. D'où l'ajout progressif demandé par le protocole.

2.8 Une masse de 2,47 g de fluorescéine est obtenue. Quel est le rendement de la synthèse ?

Données utiles $m_{exp} = 2{,}47\ \text{g}$; $m_2 = 2{,}00\ \text{g}$; $M_2 = 148\ \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$; $M(\text{H}_2\text{Flu}) = 332\ \text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$; anhydride phtalique limitant (2.2)

L'anhydride phtalique est limitant et une mole d'anhydride donne une mole de fluorescéine :

$$n_{max} = n_2 = \frac{m_2}{M_2}$$

Masse maximale de fluorescéine : $m_{max} = n_{max} \times M(\text{H}_2\text{Flu}) = \dfrac{2{,}00}{148} \times 332 = 4{,}49$ g.

Rendement :

$$\eta = \frac{m_{exp}}{m_{max}} = \frac{m_{exp} \times M_2}{m_2 \times M(\text{H}_2\text{Flu})} = \frac{2{,}47 \times 148}{2{,}00 \times 332}$$

$\eta = 0{,}551$, soit un rendement de 55,1 %.

PIÈGE
Calculer la quantité maximale à partir de la résorcine, en excès : on trouverait 4,98 g et un rendement faux. Le rendement se rapporte toujours au réactif limitant.

COMPRENDRE
Rendement inférieur à 100 % : transformation incomplète en 30 min, pertes lors de la précipitation et de la filtration.

À LA CALCULATRICE

