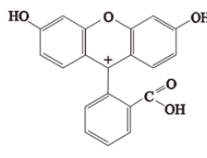
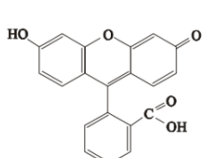
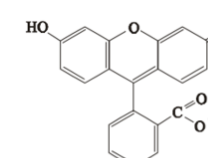
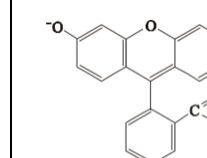


## EXERCICE 1 : UN MARQUEUR FLUORESCENT, LA FLUORESCÉINE (10 points)

La fluorescéine est obtenue par dissolution dans l'eau de fluorescinate de sodium, solide de couleur rougeâtre. La fluorescéine est connue pour émettre une lumière « vert-fluo » quand elle est éclairée en lumière blanche ou en lumière UV. Ses applications sont nombreuses : traçage de cours d'eau souterrains, détection de fuites, angiographie de l'œil. L'intérêt des molécules fluorescentes ne s'arrête pas là : en 2008, M. Chalfie et R.Y. Tsien ont reçu le prix Nobel de chimie pour la découverte de la GFP (Green Fluorescent Protein) à partir de l'étude d'une méduse bioluminescente. Cette découverte permet aujourd'hui le marquage de protéines, d'anticorps et le suivi de processus biologiques complexes par fluorescence.

À la fluorescéine sont associées différentes formes acidobasiques :



Écriture simplifiée	H <sub>3</sub> Flu <sup>+</sup>	H <sub>2</sub> Flu	HFlu <sup>-</sup>	Flu <sup>2-</sup>
Formule topologique	 CATION	 QUINONOID	 MONOANION	 DIANION

Référence : Chem. Ber. 91 572-580.1958

Cet exercice a pour objectif d'étudier les propriétés spectroscopiques de la fluorescéine d'une part et d'étudier une voie de synthèse de la fluorescéine d'autre part.

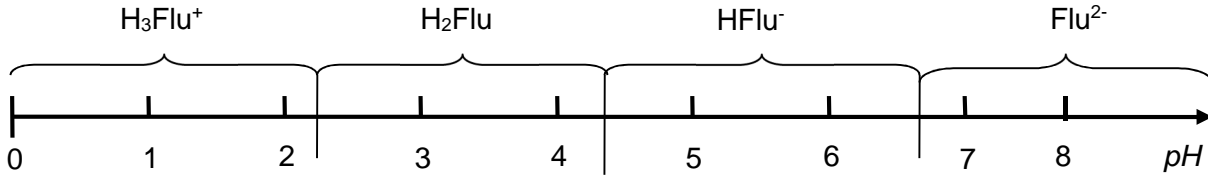
**Données :**

- Produit ionique de l'eau à 25°C :  $pK_e = 14$  ;
- Couples acido-basiques de l'eau : H<sub>3</sub>O<sup>+</sup>/H<sub>2</sub>O et H<sub>2</sub>O/HO<sup>-</sup> ;
- Loi de Beer-Lambert :  $A = \varepsilon.l.C$  avec  $\varepsilon$ , le coefficient d'extinction molaire.

Nom	Formule brute	Masse molaire en g.mol <sup>-1</sup>	Températures de changement d'état	Solubilité dans l'eau en g.L <sup>-1</sup>	Sécurité
Résorcine	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	110	$T_f = 110\text{ °C}$ ; $T_{eb} = 280\text{ °C}$	1400	
Anhydride Phtalique	C <sub>8</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	148	$T_f = 131\text{ °C}$ ; $T_{eb} = 284\text{ °C}$	$6,2 \times 10^{-3}$	
Forme H <sub>2</sub> Flu de la fluorescéine	C <sub>20</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	332	$T_f = 315\text{ °C}$	Peu soluble	
Fluorescinate de sodium FluNa <sub>2</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> Na <sub>2</sub>	376		600	
Acide sulfurique	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	98		Miscible avec l'eau	

# 1. Propriétés spectroscopiques de la fluorescéine

La détermination des concentrations de fluorescéine par mesures d'absorbance ou d'émission de fluorescence est délicate car l'absorbance et l'émission de fluorescence dépendent fortement du pH de la solution ; parmi les différentes formes de la fluorescéine, la forme  $\text{Flu}^{2-}$  est la plus fluorescente. Le diagramme de prédominance des différentes formes de la fluorescéine figure ci-après.



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

1.2. On réalise une solution aqueuse  $S_0$  en dissolvant  $1,00 \times 10^{-2}$  g de fluorescinate de sodium  $\text{FluNa}_2$  dans 100 mL d'eau déminéralisée.

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

1.2.2. Lors de la dissolution, les ions  $\text{Flu}^{2-}$  réagissent avec l'eau. Écrire l'équation de la réaction. De quel type de réaction s'agit-il ?

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

Avec :  $[\text{Flu}^{2-}]_0$  : concentration molaire apportée en ions fluorescinate.

$[\text{Flu}^{2-}]$  : concentration molaire en ion fluorescinate à l'équilibre.

$[\text{HFlu}^-]$  : concentration molaire de l'espèce  $\text{HFlu}^-$  à l'équilibre.

1.2.4. À partir des résultats précédents, en déduire la concentration molaire en ions  $\text{HFlu}^-$  à l'équilibre, pour un  $pH$  de la solution égal à 7,0, en utilisant la relation ci-dessous.

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{[\text{Flu}^{2-}]}{[\text{HFlu}^-]}\right)$$

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

1.3. Pour obtenir une solution aqueuse de fluorescence maximale, on réalise le spectre d'absorption et d'émission en absorbance de la fluorescéine sous la forme  $\text{Flu}^{2-}$  dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium ( $\text{Na}^+_{\text{aq}} ; \text{HO}^-_{\text{aq}}$ ) de concentration molaire  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ .

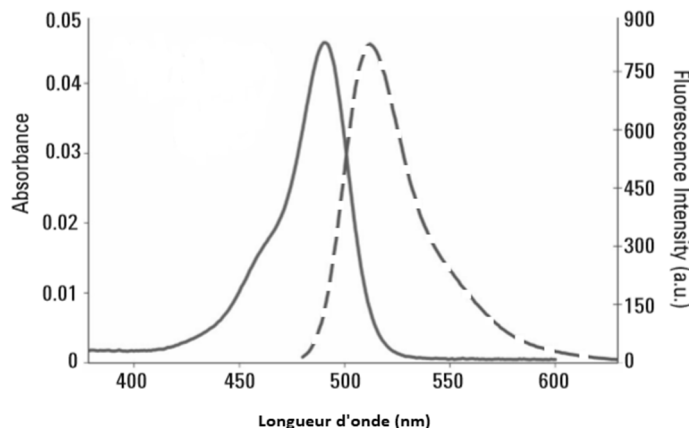


Figure 1 : Spectre d'absorption et d'émission par fluorescence de la fluorescéine sous la forme  $\text{Flu}^{2-}$  dans une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium à  $0,01 \text{ mol/L}$ .

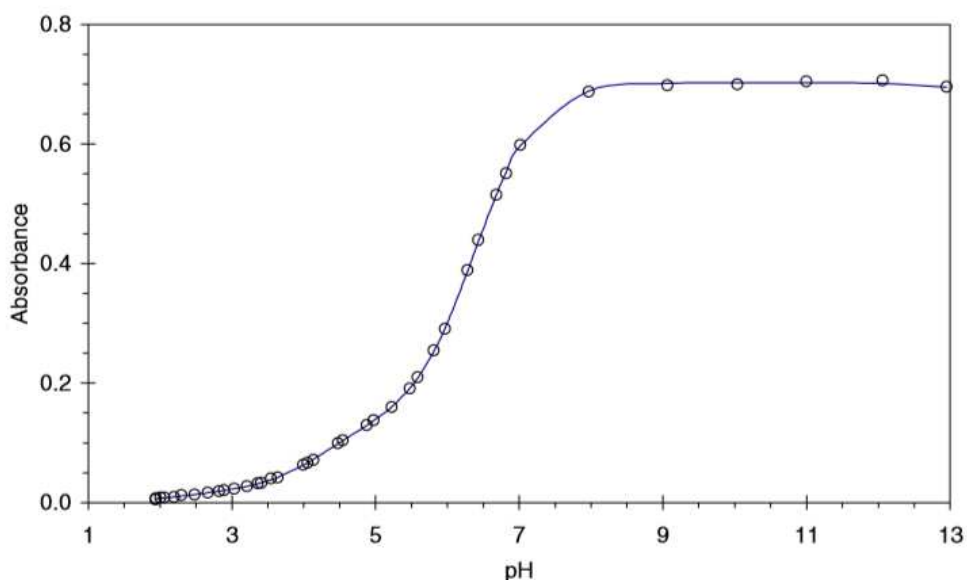


Figure 2 : Absorbance d'une solution de fluorescéine en fonction du pH.

Référence : ISSN 0378-4738 = Water SA Vol. 28 No. 4 Octobre 2002

- 1.3.1. Vérifier que le  $pH$  d'une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium ( $Na^+_{aq}$  ;  $HO^-_{aq}$ ) de concentration molaire  $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$  est égal à 12.
  - 1.3.2. Cette solution permet-elle d'assurer une fluorescence maximale ? Argumenter.
  - 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 ?
  - 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.
- 1.4. L'étude qui suit a pour objectif d'étudier l'absorption de la fluorescéine. Pour cela, on réalise une solution aqueuse  $S_0$  de volume 100,0 mL par dissolution de  $1,00 \times 10^{-2}$  g de fluoresceinate de sodium. En diluant la solution aqueuse  $S_0$  par 10, on obtient la solution aqueuse  $S_1$ . La valeur  $pH$  de cette solution aqueuse est ajustée au-dessus de 9. Trois solutions  $S_2$ ,  $S_3$  et  $S_4$  sont fabriquées de façon analogue. On mesure l'absorbance des différentes solutions aqueuses à une longueur d'onde appropriée, en utilisant une cuve spectrophotométrique de 1 cm d'épaisseur et on obtient les résultats suivants :

Solution	$S_1$	$S_2$	$S_3$	$S_4$
$C \text{ (mol.L}^{-1}\text{)}$	$2,68 \times 10^{-5}$	$2,01 \times 10^{-5}$	$1,34 \times 10^{-5}$	$6,70 \times 10^{-6}$
A	1,523	1,200	0,811	0,411

- 1.4.1. Rédiger le protocole de dilution pour préparer  $S_1$  à partir de  $S_0$  en précisant la liste du matériel utilisé.
- 1.4.2. À quelle longueur d'onde faut-il réaliser le dosage spectrophotométrique ?
- 1.4.3. Montrer que les mesures réalisées sont en accord avec la loi de Beer-Lambert.
- 1.4.4. En déduire la valeur du coefficient d'extinction molaire  $\epsilon$  pour la forme prédominante de la fluorescéine à ce  $pH$ .

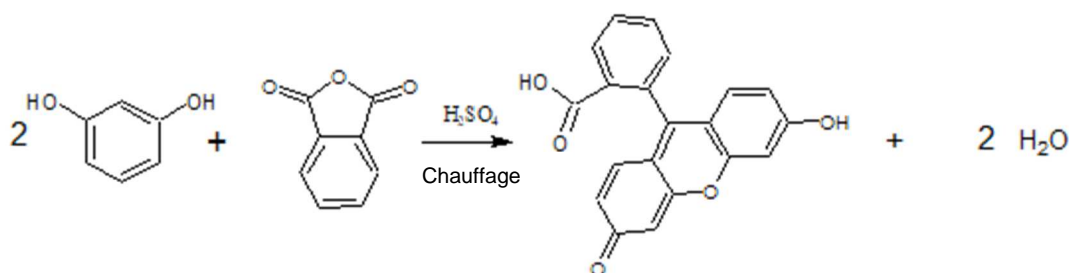
## 2. Synthèse de la fluorescéine

La fluorescéine a été découverte et synthétisée en 1871 par Adolf von Baeyer à partir de résorcine et d'anhydride phtalique. Il s'agit de la première synthèse d'une molécule fluorescente.

On se propose d'étudier un protocole de synthèse de la fluorescéine à partir de la résorcine.

- Broyer 3,30 g de résorcine et 2,00 g d'anhydride phtalique.
- Les introduire dans un ballon de 100 mL et placer l'ensemble dans un bain d'huile thermostaté à 180 °C.
- Ajouter quelques gouttes d'acide sulfurique concentré.
- Le système prend alors rapidement une couleur rougeâtre et des vapeurs sont émises. Chauffer pendant 30 min tout en agitant.
- Laisser refroidir. Veiller à retirer le barreau aimanté car le produit brut passe à l'état solide.
- Dissoudre le produit obtenu en ajoutant progressivement une solution aqueuse de soude à 1 mol.L<sup>-1</sup> en utilisant une agitation magnétique.
- Placer la solution obtenue dans un grand bécher.
- Pour précipiter la fluorescéine, acidifier la solution en ajoutant progressivement de l'acide sulfurique tout en agitant. Arrêter quand la phase aqueuse devient limpide.
- Filtrer sur Büchner.
- Sécher à l'étuve à 100 °C.

L'équation de la réaction de synthèse est donnée ci-dessous :



- Identifier les deux réactifs résorcine et anhydride phtalique dans l'équation de réaction. Justifier votre démarche.
- Montrer que la résorcine est introduite en excès.
- Sous quel état physique se trouvent les réactifs à la température du bain d'huile ?
- Quel est le rôle de l'acide sulfurique lors de l'étape c ? Justifier.
- Quelle est la nature des vapeurs émises lors de l'étape d ? Justifier.
- Sous quelle forme prédomine la fluorescéine à la fin de l'étape f ?
- Pourquoi l'ajout d'acide sulfurique dans l'étape h permet-il la précipitation de la fluorescéine ?
- Une masse de 2,47 g de fluorescéine est obtenue. Quel est le rendement de la synthèse ?