

Spectroscopie : apprentissage et évaluation

un seul appareil : un spectro colorimètre

un seul produit : le paranitrophénol

par Colette DENIER, René MEYER et Ghislaine BIASINI
CAPES - Université Paul Sabatier - 31062 Toulouse Cedex

1. RÉSUMÉ

Un des grands problèmes en travaux pratiques est l'évaluation. On veut trop souvent évaluer l'élève sur son travail, en vue de lui mettre une note (évaluation sommative), alors qu'il est en situation d'apprentissage. C'est pourquoi nous proposons trois expériences différentes avec un même produit et un même appareil qui vont permettre à l'étudiant de réaliser des expériences simples et progressives et d'être naturellement évalué sur les deux dernières.

2. APPRENTISSAGE

- Apprentissage à l'utilisation du spectrophotomètre.
- Additivité des absorbances, cuve de référence, (doit on toujours utiliser la même cuve ou peut-on en utiliser plusieurs ?), vérification de la Loi de Beer Lambert, tracé $A = f(C)$.
- Détermination de ϵ et de la concentration d'une solution inconnue à partir du tracé $A = f(C)$.

2.1. Protocole expérimental

La solution de paranitrophénol est à la concentration de 15 mg/litre dans une solution aqueuse de borax $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ ou dans de la soude $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$.

Tracer $A = f(\lambda)$ entre 350 et 500 nm, $\lambda_{\text{max}} = 400 \text{ nm}$. Faire cinq dilutions à partir de la solution mère et tracer $A = f(C)$ au λ_{max} : la pente donne ϵ . Détermination de la concentration d'une solution inconnue à partir du graphe précédent.

Débarassé des problèmes d'apprentissage du savoir-faire expérimental, l'élève pourra être évalué.

2.2. Prolongements possibles sur la partie précédente

a - Comment préparer avec le maximum de précision une solution à 15 mg par litre ? La faire préparer par les élèves et comparer les différentes valeurs de ε trouvées.

Il est dommage que l'on accorde si peu d'importance à la notion d'incertitude et de précision des mesures. Peser 15 mg dans une fiole jaugée d'un litre de solvant entraîne une incertitude relative sur la concentration de 13,5 %.

Avec le traitement que subissent les balances de la part des élèves ou des étudiants, on ne peut espérer peser qu'au milligramme près avec une balance au 1/10 mg.

$$\Delta m = 2 \text{ mg}, \quad \Delta V_{1000} = 1 \text{ mL}, \quad \Delta V_{10} = 0,05 \text{ mL}, \quad \Delta V_{200} = 0,25 \text{ mL}$$

$$\Delta C_m / C_m = 2/15 + 1/1000 = 13,5 \%$$

En pesant 300 mg dans un litre puis en diluant 10 dans 200, l'incertitude relative n'est plus que de 1,4 %.

$$\Delta C_m / C_m = 2/300 + 1/1000 + 0,05/10 + 0,25/200 = 1,4 \%$$

Incertain sur ε : Kartell, fabricant de cuves, garantit le trajet optique dans la cuve à 1 % près.

$$\Delta \varepsilon / \varepsilon = 1,4 \% + 1 \% = 2,4 \%$$

Si $\varepsilon = 12\,000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\Delta \varepsilon = 300 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

b - On peut montrer que ε est une grandeur intrinsèque d'une molécule dans des conditions données : ε dépend de la nature du solvant, du pH et de la force ionique du milieu. La position de λ_{max} peut varier aussi. Pour le parantrophénol par exemple :

- dans une solution aqueuse HCl 0,1 mol.L⁻¹ :

$$\lambda_{\text{max}} = 318 \text{ nm} \quad \varepsilon = 9800 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$$

– dans l'éthanol à 100 % :

$$\lambda_{\max} = 314 \text{ nm} \quad \varepsilon = 10700 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$$

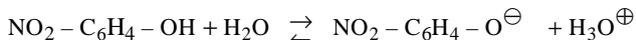
– dans une solution aqueuse de soude à $0,01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$:

$$\lambda_{\max} = 400 \text{ nm} \quad \varepsilon = 20000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$$

En fait à 314 ou 318 nm nous avons le paranitrophénol tandis que dans la soude on a l'ion paranitrophénate qui absorbe à 400 nm (cf. § 3.).

3. DÉTERMINATION DU pK DU PARANITROPHÉROL

Le paranitrophénol est un acide faible qui peut jouer le rôle d'indicateur coloré :



Le paranitrophénol est incolore en milieu acide et jaune en milieu basique.

Question

Qui du paranitrophénol ou de l'ion paranitrophénate est responsable de la couleur jaune, l'autre espèce étant incolore ? Cette question pose toujours beaucoup de problèmes aux étudiants qui ont toujours du mal à voir les déplacements d'équilibre en fonction du pH [1].

3.1. Protocole expérimental

2 ml de solution aqueuse de paranitrophénol à 15 mg/L sont complétés à 20 ml (fiOLE jaugée) avec des solutions de pH différents.



et trois solutions de tampon phosphate $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de :

$$\text{pH} = 6,8 - 7,2 - 7,5$$

voisin du pK du paranitrophénol.

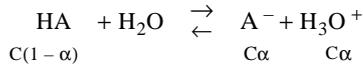
Préparation des tampons phosphate :

- Tampon phosphate $C = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ et $\text{pH} \sim 6,8$:
 - 49 mL d'une solution d'hydrogénophosphate de disodium $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,
 - 51 mL d'une solution de dihydrogénophosphate de sodium $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$.

- Tampon phosphate $C = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ et $\text{pH} \sim 7,2$:*
 - 72 mL d'une solution d'hydrogénophosphate de disodium $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$,
 - 28 mL d'une solution de dihydrogénophosphate de sodium $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.
- Tampon phosphate $C = 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ et $\text{pH} \sim 7,5$:
 - 84 mL d'une solution d'hydrogénophosphate de disodium $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$,
 - 16 mL d'une solution de dihydrogénophosphate de sodium $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$.

3.2. Exploitation des résultats

Pour simplifier, le paranitrophénol est noté HA :



$$K_a = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+] \cdot [\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad \text{pH} - \text{p}K_a = \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

Si nous sommes en milieu fortement acide, nous avons uniquement HA et $A_1 = \epsilon_1 \cdot l \cdot C$.

Dans la soude $\text{pH} \sim 12$, c'est A^- que nous avons et $A_2 = \epsilon_2 \cdot l \cdot C$.

Pour toute valeur de pH intermédiaire, nous aurons un mélange de A^- et HA. Soit $(1 - \alpha)$ la proportion de HA et (α) celle de A^- . D'après la loi d'additivité des absorbances :

$$A = \epsilon_1 \cdot l \cdot C \cdot (1 - \alpha) + \epsilon_2 \cdot l \cdot C \cdot \alpha$$

$$A = A_1 - A_1 \alpha + A_2 \alpha$$

$$\frac{A - A_1}{A_2 - A_1} = \alpha \quad \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} = \frac{C \cdot \alpha}{C(1 - \alpha)} = \frac{A - A_1}{A_2 - A_1}$$

$$\log \frac{A - A_1}{A_2 - A_1} = \text{pH} - \text{p}K$$

* Les volumes des solutions déterminés expérimentalement [2] pour obtenir un pH de 7,2 ($\text{p}K = 7,2$) sont différents de ceux qu'un calcul théorique donnerait à partir des concentrations.

a - Tracer les graphes $A = f(\lambda)$ pour les cinq solutions de pH différents entre 300 et 500 nm.

b - Tracer le graphe $\log \frac{A - A_1}{A_2 - A} = \text{pH} - \text{pK}$ quand $\log \frac{A - A_1}{A_2 - A} = 0$
 $\text{pH} = \text{pK} = 7$.

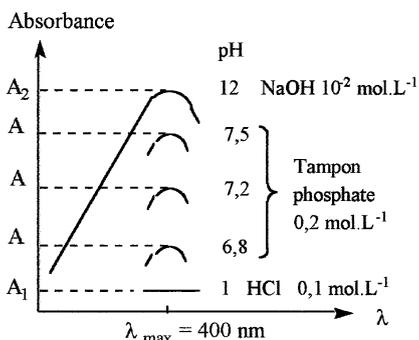


Figure 1

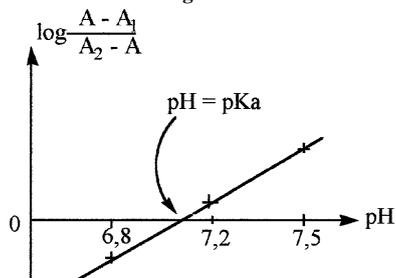
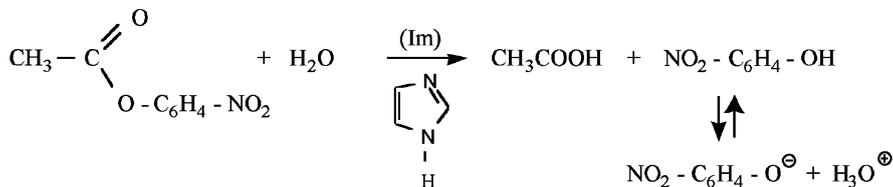


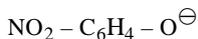
Figure 2 : Détermination graphique du pKa.

4. CINÉTIQUE DE L'HYDROLYSE DE L'ACÉTATE DE PARANITROPHÉNYLE (APNP) EN PRÉSENCE D'UN CATALYSEUR : L'IMIDAZOLE (Im)



4.1. Principe

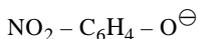
On suit l'apparition de l'ion paranitrophénate :



au cours du temps à 400 nm.

4.2. Problème

Peut-on faire l'expérience dans l'eau ? Au fur et à mesure que la réaction avance il y a apparition d'acide éthanóïque. Le milieu devenant plus acide provoque un recul d'ionisation de l'ion :



si bien que sa concentration ne sera pas proportionnelle à la quantité d'acétate hydrolysé. Dans un tampon, quel que soit son pH, la proportion :



reste constante et l'apparition de phénate est proportionnelle à la quantité d'acétate hydrolysée.

4.3. Protocole expérimental

Solutions

S_1 : Acétate de paranitrophényle (APNP) 8.10^{-4} mol.L⁻¹ dans l'acéto-nitrile CH₃CN. Dans ce solvant la solution ne s'hydrolyse pas, mais dans l'eau il y a une lente hydrolyse et la solution devient de plus en plus jaune.

S_2 : Tampon phosphate 0,1 mol.L⁻¹ et pH = 7. Mélanger 39 mL de NaH₂PO₄ 0,2 mol.l⁻¹ et 61 mL de Na₂HPO₄ 0,2 mol.l⁻¹.

S_3 : Solutions d'imidazole dans le tampon phosphate (pH = 7 et 0,1 mol.L⁻¹) préparer différentes solutions d'imidazole dans ce tampon : $0,01 \text{ mol.L}^{-1} < |\text{Im}| < 0,05 \text{ mol.L}^{-1}$.

Protocole

Introduire 1 mL de solution S_1 de APNP dans 10 mL de solution S_3 tampon contenant l'imidazole.

On suit l'apparition de l'ion phénate à 400 nm.

Durée de l'expérience : environ 400 s pour $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ en Imidazole et 1200 s pour $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ en Imidazole.

La réaction est d'ordre 1 par rapport à l'APNP.

Exploitation

La réaction est d'ordre 1 par rapport à l'APNP.

$$v = k_{\text{obs}} \cdot |\text{APNP}| \quad k_{\text{obs}} = 0,130 \text{ mol.L}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

A concentration constante en APNP, k_{obs} varie avec la concentration du catalyseur.

On montre expérimentalement que : $k_{\text{obs}} = k_0 + k_{\text{cat}} \cdot |\text{Im}|$

k_0 est la constante de vitesse dans le tampon phosphate seul (sans Imidazole).

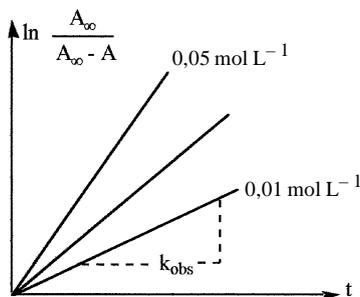


Figure 3 : Détermination de k_{obs} pour différentes concentration en Imidazole.

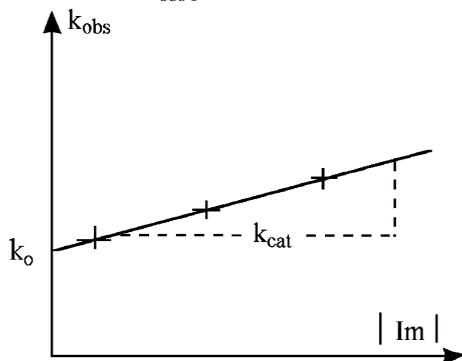


Figure 4 : Variation de $k_{\text{obs}} = f(|\text{Im}|)$.

Prolongement possible

Pour des raisons pédagogiques, il nous a paru intéressant de dissocier le tampon du catalyseur alors que dans la publication originale [3] l'imidazole $pK_a = 7$ servait à la fois de tampon et de catalyseur. En traçant $k_{obs} = k_o + k_{cat} \cdot [Im]$ dans le tampon phosphate nous avons trouvé une valeur de la constante de vitesse k_o , sans imidazole, négative : résultat aberrant. Dans le tampon imidazole la valeur trouvée est très proche de celle de la littérature $k_o = 6,5 \cdot 10^{-5} \text{ mol.l}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Si l'on utilise l'imidazole comme tampon et comme réactif la constante de vitesse k_{obs} varie (à concentration constante en imidazole) en fonction du pH. Ceci est dû au fait que la partie réactive de l'imidazole est la fonction amine libre non protonée, l'imidazole étant plus ou moins protoné suivant le pH.

5. PRODUITS CHIMIQUES

Nous avons trouvé dans le catalogue ACROS ex JANSEN les prix suivants :

| | | |
|--------------------------|--------------------|-------------------|
| – 4-nitrophénol | réf.. : 22095-0500 | 100 g 59 F. HT |
| – Acétonitrile CH_3CN | réf.. : 14952-0010 | 1 litre 132 F. HT |
| – 4-nitrophényle acétate | réf.. : 12875-0250 | 25 g 186 F. HT |
| – Imidazole | réf.. : 12202-1000 | 100 g 63 F. HT |

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. MEYER et J. DOUSSET : «*Un équilibre très instable*», B.U.P. n° 708, page 1211.
- [2] En général on considère que lorsque $pH = pK$, le rapport $r = [\text{forme basique}]/[\text{forme acide}] = [A^-]/[AH] = 1$. Or, pour simplifier, on effectue souvent le calcul du pH en utilisant les concentrations des espèces et non leur activité et de plus on néglige la force ionique des solutions ainsi que les effets de solvant. Il en résulte des différences parfois très grandes sur la valeur r ou sur la mesure du pH.
Ainsi, pour un tampon phosphate ($pK = 7,2$), $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ de $pH = 7,2$ le rapport $r = [Na_2HPO_4]/[NaH_2PO_4]$ est égal à 2,5 et non à 1. Par ailleurs si on mélange 8 mL de tampon phosphate de $pH = 7,7$ et 2 mL d'acétonitrile, le pH de la solution obtenue est égal à 8,1.
- [3] Anthony LOMBARDO : «*Kinetics of imidazole catalysed ester hydrolysis*», Journal of Chemical Education, 1982, vol 59, n° 10, page 887.