



Séparation de deux colorants alimentaires

Chromatographie sur colonne

Séparation de plusieurs dérivés aromatiques

Chromatographie sur couche mince



La blouse et les lunettes de protection seront portées pendant toute la durée de la séance.

1. Séparation par CCM de dérivés aromatiques

1.1. Principe de la CCM

L'objectif de cette activité est de mettre en évidence quelles interactions intermoléculaires (Keesom, London ou Liaison hydrogène) sont principalement responsables des différences de migration de composés déposés sur la plaque de silice, lors d'une chromatographie sur couche mince.

Lors de son ascension sur la plaque, la molécule peut établir des forces intermoléculaires attractives avec :

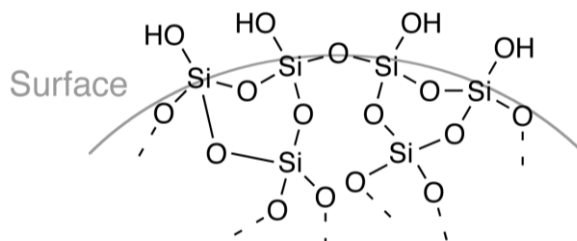
- La phase stationnaire (gel de silice)
- La phase mobile (éluant)

Causes de la différence de migration :

- Si les forces attractives établies avec la **phase stationnaire** sont fortes, la molécule va fortement être retenue par celle-ci et va, par conséquent, peu avancer.
- Au contraire, si les forces attractives établies avec la **phase mobile** sont intenses, la molécule sera fortement entraînée par celle-ci et va parcourir une distance élevée sur la plaque.

Interactions mises en jeu :

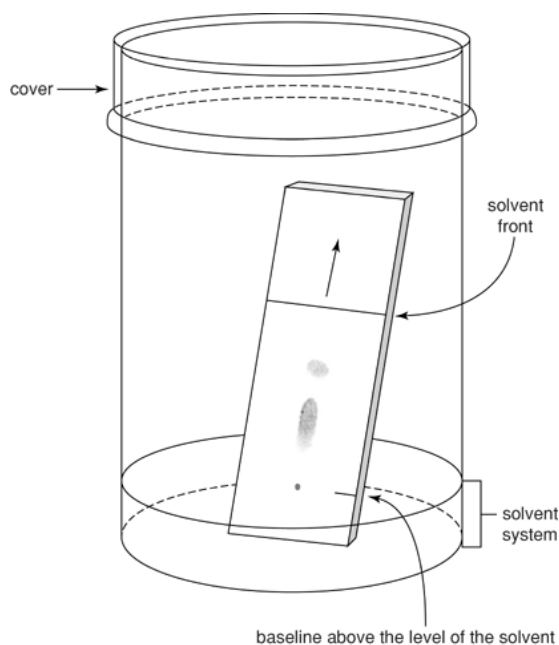
- La surface de la **phase stationnaire** (gel de silice) d'une CCM présente les groupes suivants :



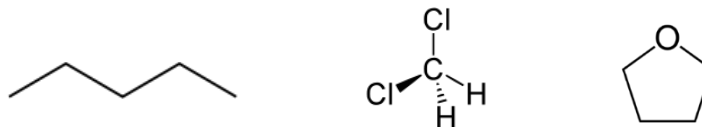
- La **phase mobile** (éluant) est généralement un solvant ou un mélange de solvants organiques. Il est facile de moduler la polarité du mélange en jouant sur les proportions de deux solvants, l'un très polaire et l'autre moins.

Dans l'activité proposée ici, l'éluant est :

- Éluant 1 : dichlorométhane-pentane (pourcentages volumiques respectifs 60 – 40)
- Éluant 2 : THF et pentane (pourcentages volumiques respectifs 20 - 80) (mélange plus polaire que le premier)



Solvant	Température d'ébullition	Constante diélectrique	Masse volumique	Moment dipolaire
Pentane	36 °C	1,84	0,626 g/ml	0,00 D
Dichloromethane (DCM)	40 °C	9,1	1,3266 g/ml	1,14 D
Tetrahydrofuran (THF)	66 °C	7,5	0,886 g/ml	1,75 D

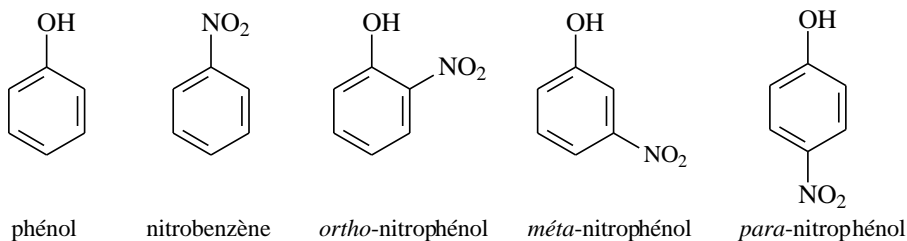


Quelles interactions intermoléculaires attractives sont susceptibles d'établir, avec les molécules déposées :

- d'une part, la phase stationnaire,
- et d'autre part, la phase mobile ?

Molécules à séparer :

Les composés déposés sur la plaque sont les dérivés aromatiques représentés ci-dessous.



Par ailleurs, on donne pour les trois isomères du nitrophénol :

Isomère	Ortho	Mé	Para
Température de fusion	45 °C	97 °C	114 °C
pK _A	7,2	8,4	7,2

Pour chaque molécule, déterminer son caractère polaire/apolaire et sa capacité à établir des liaisons hydrogène.

Proposer une explication à la différence de température de fusion des nitrophénols.

Proposer une explication à la différence d'acidité des nitrophénols.

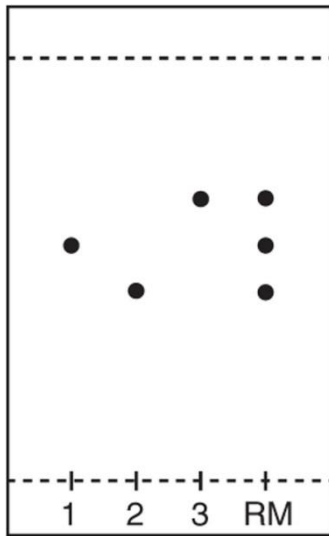
1.2. Réalisation des CCM

→ Visionner sur le site la vidéo relative à la CCM

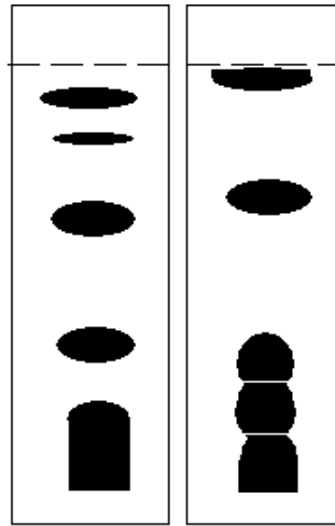
- Conditions retenues pour les chromatographies sur couche mince :
 - Plaque : gel de silice ;
 - Solvant : dichlorométhane (solution à 5, 2 ou 1 %) ;
 - Eluant : Eluant 1 ou 2 selon l'expérience ;
 - Révélation : lampe U.V.
- Pour faciliter la comparaison, les dépôts se feront dans l'ordre :
 - *para*-nitrophénol,
 - *mé*ta-nitrophénol,
 - *ortho*-nitrophénol,
 - phénol
 - nitrobenzène.

Le **solvant** sert à dissoudre le composé pour **obtenir une solution** à déposer sur la plaque. L'**éluant** est le mélange de solvants utilisés pour **faire migrer** les composés.

Une **solution à 2 %** est préparée avec 2 g de composé et 98 g de solvant pour avoir 2 g de composé dans 100 g de solution. (ou 20 mg dans 1 g de solution)



Exploitable
Dépôts visibles et de faibles diamètres



Non exploitable
Dépôts de diamètre trop important
→ Risque de chevauchement entre les taches
→ Obtention d'une unique tache en apparence

Après dépôt, les capillaires seront déposés dans la boîte de récupération dédiée.

Pourquoi apparaissent des taches sous UV à l'endroit où s'est arrêté un composé ?
Le gel de silice contient une molécule capable d'émettre de la lumière quand elle est soumise à un rayonnement UV (fluorescence). A l'endroit où une molécule déposée s'est arrêtée de migrer, les molécules fluorescentes ne reçoivent plus d'UV : elles n'émettent plus de lumière : il apparaît un point sombre.

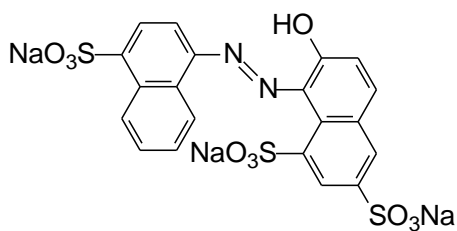
1.3. Exploitation

- ✓ Calculer les rapports frontaux dans les deux CCM.
- ✓ Proposer des explications aux migrations différentes observées pour ces composés pour un même éluant.
- ✓ Proposer une explication aux différences observées quand on change d'éluant.

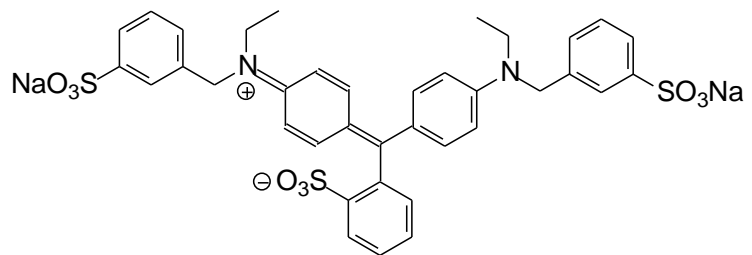
2. Séparation de deux colorants alimentaires

2.1. Principe

On se propose ici de séparer deux colorants alimentaires : la cocchine nouvelle ou rouge cochenille A ou Ponceau 4R (rose ; E124) et l'érioglaurine ou bleu brillant (bleu ; E133), contenus dans un mélange tel qu'il pourrait être utilisé par l'industrie agro-alimentaire.



Ponceau 4R (E124)



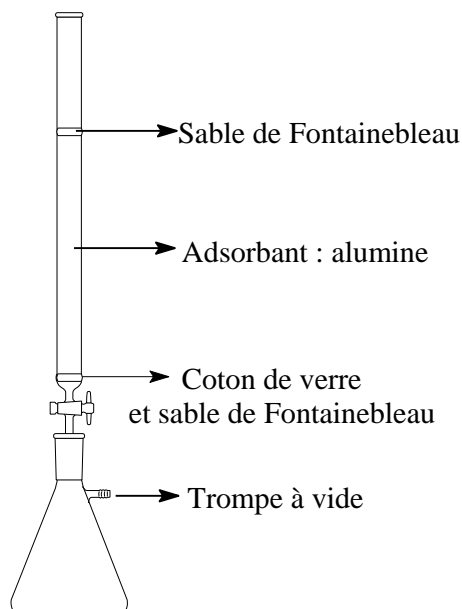
Bleu brillant (E133) (sel disodique)

2.2. Expérience

→ Avant de se lancer dans la manipulation, visionner la video relative à la chromatographie sur colonne.

a. Préparation de la colonne

- **Fixer** verticalement la colonne à l'aide d'une pince et d'une noix.
- Introduire un petit morceau de **coton de verre** dans la colonne jusqu'à la partie la plus effilée (une tige aimantée ou un agitateur en verre pourra être utilisé pour mettre en place le coton).
- A l'aide d'un **entonnoir**, ajouter sur une hauteur d'environ 4 mm du **sable de Fontainebleau**.
- Le robinet étant **fermé**, introduire à la pipette, en le faisant couler doucement **le long de la paroi** pour **ne pas déformer** le niveau du sable, quelques mL de l'éluant n°1 (mélange eau - éthanol en proportion volumique 80/20) afin d'imbiber le coton et le sable de Fontainebleau, puis ouvrir le robinet pour laisser couler l'éluant. Quand le niveau de l'éluant est à **0,5 cm au-dessus du sable, fermer le robinet**.
- Dans un bécher contenant environ 25 mL de l'éluant n°1, introduire **par petites quantités** environ 15 g d'alumine en agitant à l'aide d'une baguette en verre. Ce mélange doit former une bouillie suffisamment fluide pour couler facilement.
- Verser alors la bouillie en la mélangeant, en une fois, dans la colonne à l'aide d'un entonnoir ; pendant que l'alumine se descend, on peut tapoter la colonne pour **favoriser le tassement maximum**.
- Placer le bécher contenant le reste de gel d'alumine sous la colonne.
- Ouvrir le robinet pour que l'éluant coule lentement presque jusqu'au niveau de l'adsorbant (attention 🌪️, la **surface supérieure ne doit pas devenir sèche**).
- Avec l'éluant récupéré, introduire le reste de bouillie dans la colonne (fermer le robinet préalablement) et répéter l'opération jusqu'à avoir ajouté toute l'alumine. L'écoulement de l'éluant est arrêté lorsqu'il reste $\approx 0,5$ cm d'éluant en fermant le robinet.
- Après avoir rincé et séché l'entonnoir, quelques mm de sable de Fontainebleau sont ajoutés au-dessus du gel d'alumine.



- Une fiole à vide est mise en place pour obtenir un débit suffisant d'éluant et l'éluant est coulé jusqu'à atteindre le niveau du sable en ouvrant le robinet de la colonne : la colonne est prête, sa hauteur est d'environ 8 cm (hauteur de l'alumine).

b. Dépôt de l'échantillon à analyser

L'échantillon à analyser contient de la coccine à 150 mg.L^{-1} et de l'érioglaucine à 100 mg.L^{-1} dans de l'éthanol à 30 %.

- Verser délicatement 1 mL d'échantillon sur le haut de la colonne, en veillant à ne pas déformer pas la surface supérieure de sable : pour cela, laisser écouler le liquide en plaçant l'extrémité de la pipette près de la surface du sable de Fontainebleau le long de la paroi de la colonne.
- Laisser absorber le colorant jusqu'à limite d'effleurement, en ouvrant le robinet.

c. Extraction du colorant bleu

- Prélever 50 mL de l'éluant n°1.
- Déposer très délicatement cet éluant en prenant les mêmes précautions que lors du dépôt du colorant ; on verse le liquide en plaçant l'extrémité de la pipette d'abord près de la surface du sable de Fontainebleau, puis on suivra le niveau supérieur de l'éluant en remontant graduellement la pipette et en le faisant couler le long de la paroi.

☛ **Il est fondamental de ne jamais laisser la colonne se dessécher. A tout moment de l'élution, la surface haute du sable de Fontainebleau ne doit jamais être à l'air libre, elle doit être en permanence recouverte de liquide ainsi la surface de l'alumine n'est pas desséchée.**

- Le débit d'élution ne doit pas dépasser 1 goutte par seconde. Pour cela, ouvrir très progressivement le robinet de la colonne et **éventuellement** ouvrir le robinet de la trompe à eau de façon à créer une légère aspiration supplémentaire.
- Observer l'évolution de la colonne. Assez rapidement, on voit un anneau rose se former en haut de la colonne tandis que le colorant bleu progresse dans la colonne.
- Laisser couler l'éluant jusqu'à ce que la première bande de colorant bleu atteigne le bas de la colonne.
- Lorsque **le bas de la colonne se colore en bleu, fermer le robinet**, casser le vide à l'aide du robinet **trois voies** et vider le contenu de la fiole à vide dans un bécher.
- Remettre le vide et recueillir dans la fiole la fraction bleue jusqu'à ce que le bas de la colonne soit incolore
- Lorsque toute la fraction bleue est recueillie, fermer le robinet de la colonne, casser le vide comme précédemment et verser cette fraction dans le flacon **1**.

d. Extraction de la coccine

- La fiole à vide est rincée avec l'éluant n°1 recueilli.
- Laisser absorber le reste d'éluant n°1 jusqu'à limite d'effleurement du sable de Fontainebleau et procéder de la même façon que précédemment avec 35 mL d'éluant n°2 constitué d'un mélange eau/ammoniaque à 32 % en proportion 100/1. La fiole à vide est rincée à l'eau puis avec un peu de l'éluant n°2 avant de recueillir la coccine.

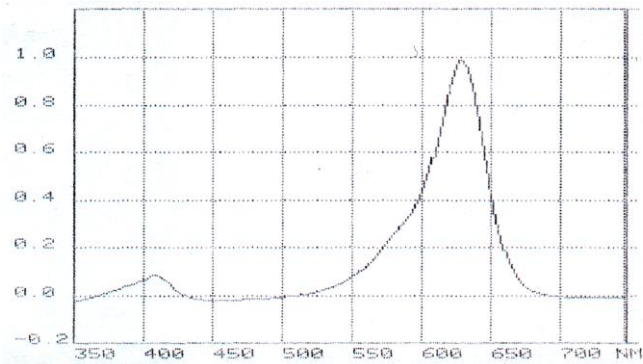
2.3. Résultats

- Identifier les colorants dans chaque phase recueillie.
- Si temps restant, déterminer le rendement d'extraction de chaque colorant.
- Proposer ou rechercher des situations dans lesquelles la chromatographie sur colonne serait utile.

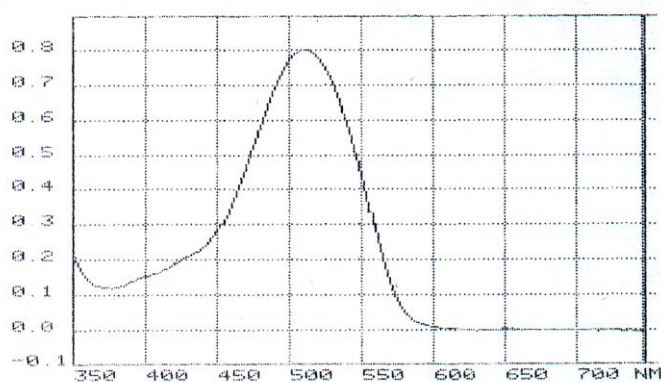
Données :

Spectre des solutions aqueuses d'érioglaurine à 10 mg L^{-1} et de coccine à 30 mg L^{-1} (disponibles dans la salle).

Spectre du bleu brillant :
(10 mg.L^{-1})



Spectre de la coccine
(30 mg.L^{-1})



3. A la fin de la séance

- Evacuation des produits : Les solutions organiques seront évacuées dans les bidons de récupération appropriés.
- La paille est lavée et remise en ordre.
- Se laver les mains.

