

Université de Mila.

3<sup>ème</sup> Biochimie

Travaux pratique = Technologie de la Biochimie

Chargée de TP : BOUCHERIT. H

## CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE D'UN SIROP DE MENTHE

La chromatographie est une technique utilisée pour séparer les constituants d'un mélange et pour purifier des substances colorées d'où le nom, Chroma (grec signifie couleur), la chromatographie est de nos jours utilisée pour séparer tous les types de substances, y compris celles qui sont incolores. Il faut donc employer une technique de révélation efficace pour observer les composés (UV, réactif complémentaire.....).

La chromatographie sur colonne permet de séparer pratiquement tous les mélanges possibles. Il suffit de trouver les bonnes conditions (phase mobile et phase stationnaire).

### A - BUT :

Le but de l'expérience consiste à séparer et identifier les colorants alimentaires présents dans un sirop de menthe par chromatographie sur colonne.

### B - PRINCIPLE

La technique de chromatographie sur colonne repose sur le même principe que la chromatographie sur couche mince : les espèces chimiques à séparer sont plus ou moins entraînées par un éluant sur une phase fixe :

- La phase fixe est un solide, le plus souvent de la silice ou de l'alumine remplissant une colonne.
- L'échantillon est déposé en haut de la colonne. La séparation des espèces chimiques est obtenue par l'écoulement continu d'une phase mobile (l'éluant) à travers la colonne.

### C - MATERIEL & PRODUITS CHIMIQUES :

#### Matériel :

- Colonne.
- Spectrophotomètre.
- Tubes à essais.



- Béchers.
- Pipettes Pasteur.

#### **Produits chimiques :**

- Sirop de menthe.
  - Eau distillée.
  - Gel de silice.
  - Ethanol
- I Séparation des colorants alimentaires d'un sirop de menthe :
- Préparation de la colonne (phase fixe).

L'opération de remplissage de la colonne conditionne l'efficacité de la séparation. Il ne faut pas qu'il y ait de bulles ou de zone sans phase stationnaire car on aurait alors des chemins préférentiels nuisant à une bonne séparation des composés. Pendant la phase d'éluion avec le solvant on veillera également à ne pas assécher la partie supérieure de la phase fixe.

- Fixer verticalement la colonne à l'aide d'une pince.
- Déposer un petit morceau de coton dans le bas de la colonne.
- Peser environ 10 g de silice.
- Introduire la silice dans la colonne.
- Tapoter la colonne afin d'obtenir une surface plane de silice.
- Placer un bécher sous la colonne.
- Introduire doucement de l'eau distillée (à l'aide d'une pipette par écoulement de long de la paroi de la colonne). Ajouter une quantité d'eau suffisante pour être environ à 2 cm au dessus de la surface plane de la silice.

#### **Dépôt de l'échantillon à séparer :**

- Déposer très doucement à l'aide d'une pipette, sans toucher les parois de la colonne, l'échantillon de sirop de menthe : attention à ne pas déformer la surface de la phase stationnaire pendant cette opération.
- Lorsque le sirop de menthe a pénétré à la surface de la phase stationnaire, éluer avec l'eau en remplissant la colonne.



- Lorsque le premier colorant arrive en bas de la colonne le récupérer dans une première cuve.
- Lorsque le second colorant parvient en bas de la colonne, le récupérer dans une seconde cuve.

## II. Analyse spectrophotométrique des colorants

A l'aide d'un spectrophotomètre, tracer les spectres d'absorption  $A=f(\lambda)$  des 2 colorants issus de la séparation précédente.

Réaliser ce spectre en tenant comptes des remarques suivantes :

- Faire varier la longueur d'onde entre 400 et 720 nm.
- Le réglage du zéro se fera sur de l'eau distillée *et de l'éthanol.*