

Module de T.A.P.M.I**TP N° 3 : Séparation des colorants alimentaires d'un sirop de menthe par chromatographie sur colonne.**

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.

La séparation est basée sur une différence de vitesse d'entraînement des espèces chimiques vers le bas de la colonne. L'objectif de ce TP est donc de séparer les constituants colorés d'un sirop de menthe (colorants alimentaires : le E102 jaune et le E131 bleu) puis de montrer l'intérêt de la chromatographie sur colonne *vis-à-vis* de la chromatographie sur couche mince.

1. Séparation des colorants alimentaires d'un sirop de menthe**✓ Préparation de la colonne (phase fixe) remplissage par voie sèche**

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 dans la phase stationnaire car on aurait alors des chemins préférentiels nuisant à une bonne séparation des composés. Pendant la phase d'élution avec le solvant on veillera également à ne pas assécher la partie supérieure de la colonne.

- Fixer verticalement la colonne à l'aide d'une pince ;
- Déposer un petit morceau de coton dans le bas de la colonne ;
- Peser environ 10g 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 2cm au dessus de la surface plane de la silice.

✓ Dépôt de l'échantillon à séparer

La phase fixe :

- 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 colonne 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 ;
- Eluer ensuite avec un autre éluant : un mélange d'éthanol + eau salée (70/30) ;
- Lorsque le second colorant parvient en bas de la colonne, le récupérer dans une seconde cuve.

Quel est l'intérêt de ce type de chromatographie par rapport à celle sur couche mince ?

Dans une chromatographie sur colonne on peut recueillir les constituants séparément en bas de la colonne.

Dans le sirop de menthe, le colorant jaune E102 est recueilli en premier : il est plus entraîné par l'eau et moins adsorbé par le gel de silice que le colorant cyan E131.

2. Analyse spectrophotométrique des colorants

A l'aide d'un spectrophotomètre, on souhaite tracer les spectres d'adsorption $A = f(\lambda)$ du sirop de menthe et 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 720nm.
- Une dilution des solutions sera éventuellement nécessaire si la valeur maximale mesurable par le spectrophotomètre est atteinte (balayer rapidement la gamme de longueur d'onde puis observer la valeur maximale de l'absorbance).
- le réglage de zéro se fera sur de l'eau distillée. Il est indispensable de le faire pour toutes les longueurs d'ondes.
- Tracer à l'aide les 3 courbes sur une même fenêtre (fenêtre 1) (le sirop de menthe, E102, E131).
- Interpréter les courbes obtenues. Sont-elles conformes à ce que l'on pouvait prévoir ? Interpréter chacune d'elle.