

TP 1 : Sédimentation, filtration et Centrifugation

1. Burettes ou éprouvettes
2. L'unité de filtration sous vide (système complet) entièrement réalisée en verre comprend:
 - 1 Entonnoir 300 ml ;
 - 1 Support de filtre en verre Pyrex fritté (porosité 10 μm) ;
 - 1 Fiole 1000 ml ;
 - 1 Bouchon ;
 - 1 Pince en aluminium ;
 - 1 Flexible en caoutchouc.
 - Système compatible avec les membranes de 45 μm de diamètre du type **membrane Millipore (Sartorius)**.

Parfois, il est nécessaire de filtrer pour récupérer le produit de la synthèse chimique. La filtration sous vide est une technique plus efficace et plus rapide que la filtration par gravité (**Figure 1**).

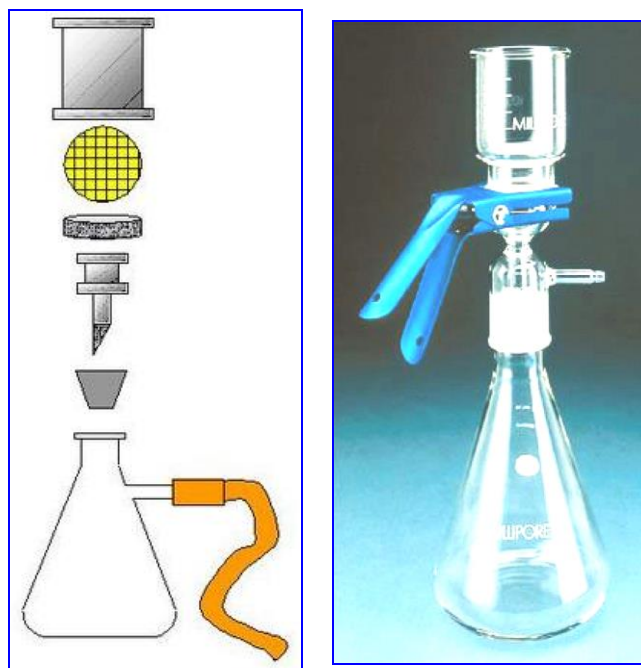


Figure 1. Unité de **filtration sous vide**

3. Centrifugeuse et microcentrifugeuse

Le remplissage des tubes de centrifugation demande une attention particulière. Vous devez dans un premier temps choisir le nombre de tubes qui seront nécessaires à votre manipulation. Les points à considérer sont les suivants:

- a) Les tubes doivent être remplis au minimum à la 1/2 de leur volume maximal. Privilégiez au moins le 3/4.
- b) Vous pouvez placer sur le rotor 2, 3, 4 ou 6 tubes en même temps.
- c) Le poids des tubes associés doit correspondre parfaitement.

La façon de disposer les tubes sur le rotor en fonction du nombre de tubes que l'on désire y mettre est présentée à la figure 1. Les tubes y ayant la même couleur doivent avoir exactement la même masse pour assurer que le centre de masse du rotor est conservé et qu'il tournera convenablement.

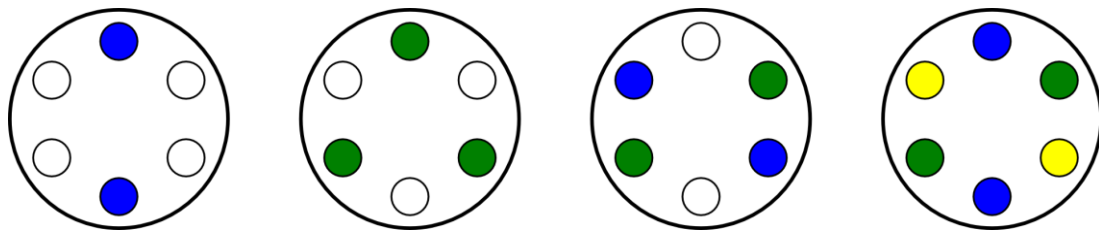


Figure 2. Différentes disposition des tubes pour équilibrer la centrifugeuse.

Dans le cas où vous n'auriez qu'un seul tube (ou 5 tubes) à centrifuger, remplissez un tube supplémentaire d'eau en vous assurant de faire correspondre sa masse et sa position afin de conserver la position du centre de masse du rotor.

Fermez le couvercle et mettez l'appareil hors tension.

TP 3 : Analyse des acides aminés par CCM

L'intérêt pédagogique est de proposer aux étudiants une manipulation simple et ludique ne nécessitant aucune condition de sécurité particulière.

1. Objectif du TP

Analyser les constituants d'un mélange (**acides aminés**) en faisant appel à une technique de séparation (**Chromatographie sur Couche Mince - CCM**).

Cette technique de fractionnement fait appel à des forces d'**adsorption*** et des phénomènes de partage entre les solvants.

Elle permet de **séparer** des **petites molécules** selon leur **affinité** pour **deux phases** :

- **Phase stationnaire (solide)**

Le **support** : *gel de silice* joue le rôle d'**adsorbant**. Il adsorbe les molécules de solutés (**acides aminés**) contenues dans la **phase mobile**, grâce à des **forces de rétention** par **adsorption** entre le **support** et les **acides aminés**. Cette adsorption empêche le déplacement des molécules de soluté et ce d'autant plus que les interactions sont importantes.

- **Phase mobile (liquide)**

Le solvant va permettre le **déplacement** et la **migration** des **molécules d'acides aminés**. Cette migration se fera d'autant plus difficilement qu'il y aura d'interactions entre le support et les **acides aminés**.

2. Solutions et matériels

- **Solvant de chromatographie (Phase Mobile)** : **n- propan-1-ol–Eau**, (**70 v : 30 v**).
- **Etalons des acides aminés**

- ❖ **Arginine (5 mg)** ;
- ❖ **Cystéine (5 mg)** ;
- ❖ **Glycine (5 mg)** ;
- ❖ **Phenyl alanine (5 mg)** ;
- ❖ **Proline (5 mg)** ;
- ❖ **Tryptophane (5 mg)** ;
- ❖ **Tyrosine (5 mg)**.
- **Tampon phosphate (pH 8.0)** ;
- **Propanone (30 ml)**.
- **Solution de révélation (développement)**
 - ❖ **Ninhydrine (10 mg)** ;
- **Chromatoplaque (Gel de silice G. 20 x 20 cm ; épaisseur 0,1 mm)** ;
- Cuve + couvercle ;
- Micropipette ;
- **Chromatoplaque en silice de (20 cm x 20 cm)**
- Etuve à + 37 °C ; à 100 °C ;
- Sèche-cheveux ;
- Vaporisateur opaque pour contenir le révélateur.

3. Protocole opératoire

Mélange de **solvants organiques**, à préparer **24 h** à l'avance sous la **hotte** ;

3.1. Cuve à CCM

Verser le solvant dans la cuve à chromatographie sur **5 mm** de **hauteur**.

3.2. Préparation de la chromatoplaque

Les **plaques** sont en **aluminium** et recouvertes d'une couche de **gel de silice**.

Ne pas toucher le gel avec les **doigts**.

Réactiver la plaque **10 minutes** à l'étuve à **100 °C**.

3.3. Préparation des étalons des acides aminés

Dissoudre les **étalons** des **acides aminés** dans l'eau distillée (obtention d'une solution concentrée en **acides aminés (1 mg/1 ml)**).

3.4. Préparation de la ninhydrine (à préparer obligatoirement sous la hotte)

Dissoudre **2 mg** de **ninhydrine** dans **60 mL propanone**.

La mettre en flacon opaque ou mieux dans un vaporisateur opaque.

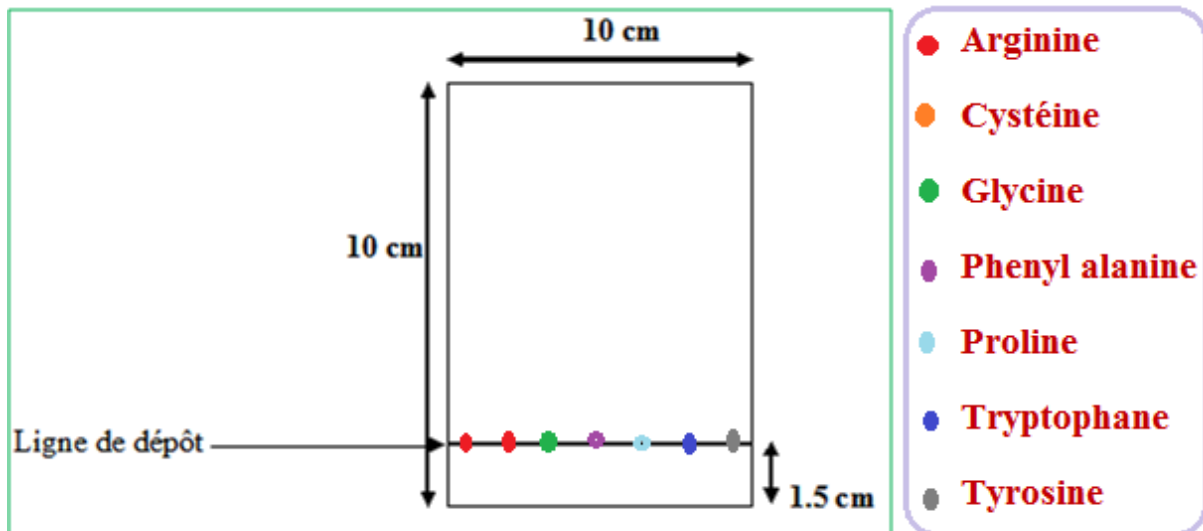
3.5. Dépôts

Tracer un **trait léger de crayon**, une **ligne de dépôt** à **1,5 cm** du **bord inférieur** de la **plaque**.

Marquer l'emplacement de **5 dépôts** régulièrement espacés et les identifier.

Déposer au moins **3 fois** les solutions d'étalons des **acides aminés**, en utilisant la **micropipette**, pour chaque solution. **Sécher** entre chaque opération au sèche-cheveux. Le **diamètre de chaque dépôt** ne doit pas dépasser **3 mm**.

Les dépôts doivent être aussi petits et concentrés que possible.



3.6. Migration

Introduire la plaque verticalement dans la cuve, dépôts en bas en veillant à ce que le niveau de départ du solvant soit inférieur à la ligne des dépôts. Mettre en place le couvercle. Laisser migrer le solvant le plus haut possible (**au-moins jusqu'aux trois quarts de la plaque**).

Durée : environ 15 à 20 minutes.

3.7. Détection ou révélation

Sortir le **chromatogramme** de la **cuve**. Le **placer horizontalement**. Tracer immédiatement la **ligne** correspondant au **front du solvant** avec la pointe du crayon.

Sécher le chromatogramme au **sèche-cheveux** quelques minutes dans l'étuve à **+ 37 °C**.

Pulvériser avec une solution de **0,2 g** de **ninhydrine** dans **100 ml** d'**éthanol** et chauffer à **110 °C** jusqu'à l'apparition de **taches rougeâtres**. Détection à la **lumière du jour** et sous la **lumière UV** de **366 nm**. Les **couleurs** ont toujours été **observées visuellement** (**45 min** après **pulvérisation**).

4. Résultats

Entourer au crayon les différents **spots** obtenus, marquer le **centre** de la **partie colorée**.

Identifier les **acides aminés** par observation des couleurs et par le **calcul** du **rapport Frontal** (R_f) de chaque colorant.

Le R_f est défini comme le **rapport** :

$$R_f = \frac{\text{Distance parcourue par le produit (d)}}{\text{Distance parcourue par le solvant (D)}}$$

(Ninhydrine +				(Ninhydrine +			
N°	Acides aminés	Couleurs Observées à chaud)	(R_f)	N°	Acides aminés	Couleurs Observées à chaud)	(R_f)
1	Glycine	Rose profond	(0.03)	5	Tyrosine	Rose clair	(0.51)
2	Arginine	Rose	(0.05)	6	Tryptophane	Violette rosée	(0.55)
3	Proline	Gris/beige	(0.22)	7	Phenyl alanine	Rose grisâtre	(0.58)
4	Cystéine	Violette rosée	(0.41)				

TP 2 : Chromatographie sur colonne d'un sirop de menthe

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 :

1. La phase stationnaire est un solide, le plus souvent de la silice ou de l'alumine remplissant une colonne.

2. L'échantillon est déposé en haut de la colonne. La séparation des espèces chimiques est obtenue par l'écoulement continu d'une **phase mobile (éluant)** à travers la colonne.

La séparation est basée sur une différence de vitesses 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 (E102 et E131)**) puis de **montrer l'intérêt** de la **chromatographie sur colonne** vis à vis de la **chromatographie sur couche mince**.

I. Séparation des colorants alimentaires d'un sirop de menthe

I.1. Préparation de la colonne (phase stationnaire)

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'élution avec le solvant, on veillera également à ne pas assécher la partie supérieure de la phase stationnaire.

1. Fixer verticalement la colonne à l'aide d'une **pince**.

2. Déposer un petit morceau de **coton** dans le **bas** de la **colonne**.

3. Déposer un peu de **sable** pour rendre la surface plane.

4. Peser environ **5 g** de **silice** et délayer dans l'eau salée pour en faire un gel.

5. Introduire la silice dans la **colonne**.

6. Tapoter la colonne afin d'obtenir une **surface plane de silice** : **rajouter** un peu de **sable** pour **aplanir**.

7. Placer un bêcher sous la **colonne**.

8. Introduire doucement de l'**eau salée** (à l'aide d'une pipette par écoulement le 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**.

I.2. Dépôt de l'échantillon à séparer

1. Déposer très doucement à l'aide d'une pipette, **sans toucher** les **parois** de la **colonne**, **5 gouttes** de **sirop de menthe** : attention à ne pas déformer la surface de la phase stationnaire pendant cette opération.

2. Lorsque le **sirop de menthe** a **pénétré** la surface de la **phase stationnaire**, **éluer** avec l'**eau salée** en remplissant la colonne doucement à la pipette.

3. Lorsque le **premier colorant** arrive **en bas** de la **colonne** le **recupérer** dans un **premier erlenmeyer**.

4. Éluer ensuite avec un autre **éluant** (**alcool à 95 °**).

5. Lorsque le **second colorant** parvient **en bas** de la **colonne**, le **recupérer** dans un **second erlenmeyer**.

Remarque : Un **bêcher** doit vous servir à **recupérer** les **liquides indésirables**.

III. Questions

1. Quelle est la phase stationnaire ? Quelles sont les phases mobiles ?

La **phase stationnaire** correspond au **gel de silice**.

Les deux **phases mobiles** sont les **deux éluants** (**eau salée** et **alcool à 95°**).

2. Quelle est la couleur du premier colorant extrait ? Proposer une méthode pour l'identifier.

Le **premier colorant** extrait est le **jaune (E102)**. On pourrait mesurer l'**absorbance** à l'aide d'un **spectrophotomètre**.

3. Quelle est la couleur du deuxième colorant extrait ?

Le **deuxième colorant** extrait est le **bleu E131**.

4. Quel est le colorant qui est le plus adsorbé par le gel de silice ?

Le colorant le plus adsorbé par le gel de silice est le **bleu (E131)**.

5. Quel est celui qui présente le plus d'affinité avec l'eau salée ?

Celui qui présente le **plus d'affinité** avec l'**eau salée** est le **jaune (E102)**.

6. Pourquoi avoir changé d'éluant pendant la chromatographie ?

Le **bleu** ne présentait aucune **affinité** avec l'**eau salée**. Nous ne serions ainsi pas parvenu à l'extraire correctement.

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

Le type de **chromatographie sur colonne** permet de **récupérer** les deux colorants. Celle sur **CCM** les **sépare simplement**.

B. Analyse spectrophotométrique des colorants

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

Une dilution des solutions obtenues est nécessaire pour ne pas dépasser la valeur maximale mesurable par le spectrophotomètre.

Réalisation des mesures

1. Le réglage du **zéro** se fera sur de l'eau distillée en **transmittance (100 %)**. Passer ensuite en **absorbance**.

2. Il est indispensable de faire le **blanc** pour **toutes les longueurs d'ondes**.

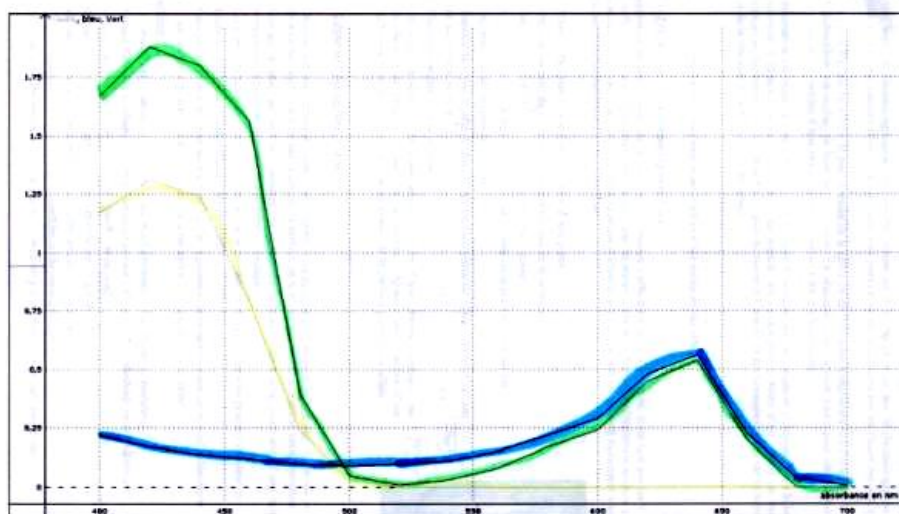
3. On fait varier la **longueur d'onde** entre **400** et **720 nm** en relevant les valeurs de l'**absorbance** tous les **10 nm** ou **20 nm** et en rentrant les valeurs au fur et à mesure dans le **tableau ci-dessous** (Excel).

λ (nm)	400	420	440	460	480	500	520	540	560	580	600	620	640	660	680	700
A _j	1,17	1,31	1,24	0,79	0,24	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
A _b	0,22	0,17	0,14	0,12	0,1	0,09	0,1	0,11	0,15	0,22	0,29	0,48	0,56	0,23	0,04	0,01
A _v	1,67	1,88	1,8	1,56	0,4	0,05	0,01	0,03	0,08	0,17	0,24	0,45	0,54	0,2	0	0

Tracer et **Interpréter** les **3 courbes** sur le même **diagramme**. **Interpréter** les **courbes** obtenues. Sont-elles **conformes** à ce que l'on pouvait **prévoir** ?

On **remarque** que les **courbes** correspondantes au **jaune** et au **bleu** possèdent **seulement un pic** : on **détermine** ainsi leur **longueur d'onde** et leur **couleur** par la même occasion. Celle correspondant au **vert** possède **deux pics** situés aux **mêmes endroits** que ceux du **jaune** et du **bleu**. On en **déduit** que le **vert** est un **composé de bleu et de jaune**.

image: <http://static.intellego.fr/uploads/4/4/44143/media/COURBE%20TP%20CHIMIE%20CHROMATOGRAPHIE.JPG>



<http://www.intellego.fr/soutien-scolaire-terminale-s/aide-scolaire-chimie/chromatographie-sur-colonne-d-un-sirop-de-menthe./48912>

Dosage des glucides dans le miel par HPLC

1. Conditions Opérationnelles

La séparation chromatographique a été effectuée en utilisant une colonne **Shodex Asahipak NH2P-504E** (C₁₈, **250 nm x 4.6 nm**)

Phase mobile : Acétonitrile/Eau dégazée : CH₃CN/H₂O (78:22, v/v) ;

P_{max} : 3,000 psi ;

Débit : 1 ml/minute ;

Température de la colonne : 35 °C ;

Détecteur : UVS 190 nm ;

Volume de la seringue : 250 µL ;

Volume injecté : 10 µL ;

Temps d'analyse était de 30 minutes.

Les échantillons ont été préparés comme suit : **0.5 g de miel** a été dissous dans une solution à **70 % d'éthanol (50 ml)** et chauffé dans un bain-marie à **35-40 °C**.

2. Solutions standards

- **500 mg de Glucose** dissous dans une solution à **70 % d'éthanol (50 ml) ;**
- **500 mg de Fructose** dissous dans une solution à **70 % d'éthanol (50 ml) ;**
- **500 mg de Saccharose** dissous dans une solution à **70 % d'éthanol (50 ml) ;**
- **500 mg de Maltose** dissous dans une solution à **70 % d'éthanol (50 ml).**

3. Échantillons

- **500 mg de miel** dissous dans une solution à **70 % d'éthanol (50 ml).**

Les étalons et les échantillons ont été **filtrés** en utilisant des filtres de **PTFE (0.22 µm)** et dilués **10 fois**.

L'identification des **glucides** a été **effectuée** en fonction de leur **temps de rétention** (**Džugan, 2016**).

Référence

Dżugan, M., Sowa, P., Monika, K., Wesołowska, M et Czernick, M. (2016). Physicochemical Parameters and Antioxidant Activity of Bee Honey Enriched With Herbs. *Plant Foods for Human Nutrition*, 72: 74-81.