

# Thème : Autour de la chlorophylle

Salima

HADJEBA

BTS 1 ère année

Lycée Déodat de Séverac

## Etude d'une méthode conduisant à l'extraction à la séparation et à l'identification de la chlorophylle dans un végétal



Stage à l'ENFA du 11 mai au 04 juillet 2015

Tutrice : Christine DUCAMP

**Année 2015**

## **SOMMAIRE**

**INTRODUCTION : non présentée dans ce bulletin**

- 1.Présentation de l'entreprise
- 2.Organisation de l'entreprise
- 3.Présentation du sujet

**I. Les méthodes d'extractions et de séparations :**

- 1.Chromatographie sur couche mince
- 2.Chromatographie sur colonne
- 3.Spectre d'absorption

**II. La solution d'épinards E : p.10**

**III. Reproductibilité des manipulations :**

- 1.Chromatographie sur couche mince
- 2.Chromatographie sur colonne

**IV. Les épinards**

**V. Essais :**

**I. Modification des éluants :**

- 1.Diminuer la quantité d'éthanol
- 2.Ajout d'un autre solvant
- 3.Changements des pourcentages de solvants
- 4.Remplacement du cyclohexane par de l'eau

**II. Modification de la silice :**

- 1.Grosueur de la silice
- 2.Modification de la quantité de silice

**Conclusion:**

**Annexe :**

- 1.Manipulation et mode opératoire
- 2.Tableau fiche toxicologique

## Présentation du sujet

Tout au long de ce stage, j'ai continué à la mise au point d'une méthode pour extraire et séparer les constituants de la solution de chlorophylle des épinards.

Les étudiants précédents avaient déjà commencé la partie extraction de la chlorophylle et la partie Chromatographie sur Couches Minces (CCM).

Le but de ce sujet est de trouver la faisabilité d'une extraction, la CCM, la séparation par chromatographie sur colonne et l'identification par spectrométrie pour une séance de travaux pratiques (TP) d'une heure trente dans le contexte d'un TP de classe de Lycée.

Dans ce rapport je vais vous présenter les expériences réalisées, les analyses effectuées pour arriver à mettre au point cette séance.

## I. Les méthodes d'extractions et de séparations

### 1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

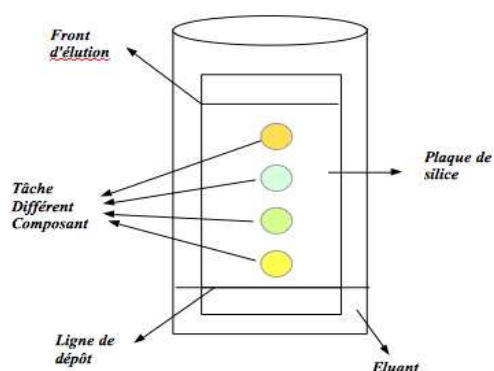
Il y'a plusieurs utilisations d'une analyse CCM. Dans ce cas l'analyse CCM sert à voir comment se séparent les constituants pour ensuite les séparer et récupérer avec une chromatographie sur colonne.

La chromatographie sur couche mince sert à tester la séparation avec différents solvant plus ou moins polaires en fonction des composés à séparer.

La phase stationnaire est constituée d'une couche solide et le gel de silice déposé par dessus sert de support. Nous avons utilisés des plaques ALLUGRAM SIL G/UV REF 81813.

La phase mobile constituée de l'éluant est entraînée par capillarité en haut de la plaque. Pour réaliser une CCM il faut tout d'abord choisir un ou plusieurs solvants qui permettront la séparation des différents constituants de la chlorophylle.

Le choix de l'éluant dépend de la polarité des solvants choisi.



*Schéma chromatographie sur couche mince*

## 2. Chromatographie sur colonne

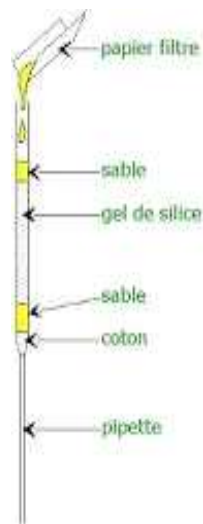
La chromatographie sur colonne est une méthode permettant de séparer les constituants d'une solution. C'est une séparation liquide-liquide.

Dans la chromatographie sur colonne il y a toujours une phase mobile et une phase stationnaire.

La phase stationnaire : Cette phase est composée le plus souvent de silice ou de gel de silice qui est fixé dans la colonne (on peut aussi utiliser le sucre glace par exemple). Elle va permettre de retenir plus ou moins l'éluant sur la phase mobile.

La phase mobile : La phase mobile est constituée de l'éluant qui va servir à entraîner la solution en bas de la burette au contact de la phase stationnaire.

C'est la polarité ou non de l'éluant suivant la phase stationnaire qui va déterminer le temps de la colonne.



### ***Schéma chromatographie sur colonne***

(J'ai utilisé une burette à la place d'une pipette).

J'utilise quatre éluants avec les mêmes solvants mais avec des proportions différentes. Il faut quatre éluants pour que les quatre constituants de la chlorophylle ne descendent pas à la même vitesse. Il faut choisir les différentes proportions des éluants en fonction de la polarité des quatre constituants.

Les quatre constituants ont des polarités différentes

Les carotènes sont des composés apolaires, ne comportant pas d'atome d'oxygène et ne sont donc pas retenus par le support solide. C'est donc les carotènes qui descendront le plus rapidement.

Les chlorophylles sont des composés peu polaires.

La chlorophylle b se différencie de la chlorophylle a par la présence d'un groupement aldéhyde (-CHO) au lieu d'un méthyle (CH<sub>3</sub>). La chlorophylle b est donc plus polaire et plus retenue par le support solide que la chlorophylle a.

Les Xanthophylles sont polaires car ils ont de nombreux atomes d'oxygènes qui vont s'accrocher au support solide.

### 3. Spectre d'absorption

La spectrométrie d'absorption est une analyse est une méthode physique d'analyse chimique. Elle se fait principalement sur des liquides.

L'absorbance mesure la capacité d'un milieu à absorber la lumière.

Pour réaliser le spectre d'absorbances, on relève l'absorbance en fonction de la longueur d'onde.

Les 4 composants de la chlorophylle ont des pics d'absorptions différents. Cela permet de les différencier et de faire un point sur la qualité de la séparation.

#### Pics d'absorbance théorique :

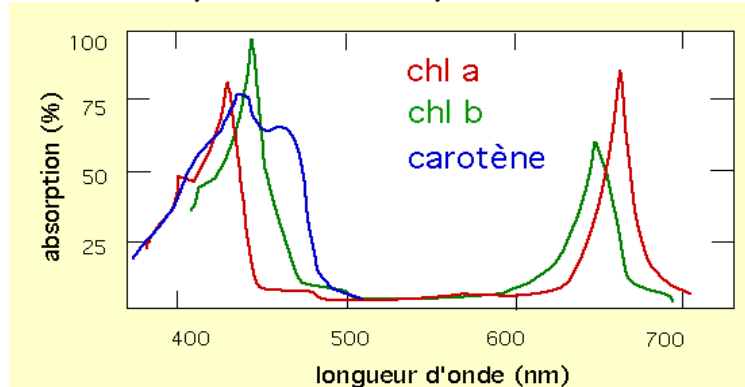
Carotène : pic 450 nm

Chlorophylle A : pic 430 nm et 660 nm

Chlorophylle B : pic 440 nm et 650 nm

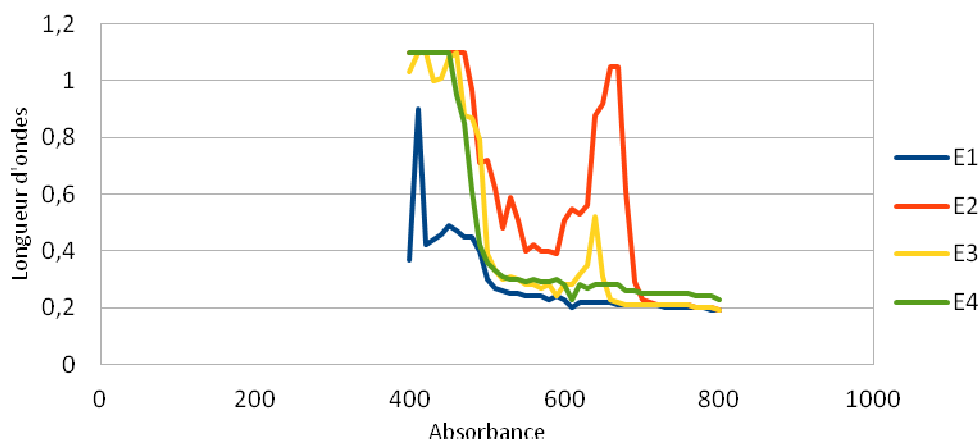
Xanthophylle : pic 470 nm et 580 nm

#### Spectre d'absorbance théorique similaire au spectre obtenu à l'ENFA :



#### Spectre d'absorption expérimental :

Evolution de l'absorbance en fonction de la longueur d'onde



E1 : Carotène- E2 : Chlorophylle A- E3 : Chlorophylle B- E4 : Xanthophylles

En comparant les deux spectres j'en conclus que le spectre expérimental est similaire au théorique.

Je me servais donc de ce spectre comme comparatif pour les prochaines manipulations.

## II. La solution d'épinards E

La solution extraite à partir d'épinard (appelé solution E) contient quatre constituants principaux que l'on peut facilement identifier au spectrophotomètre après séparation sur chromatographie sur colonne.

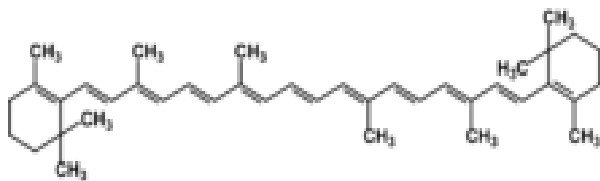
La chlorophylle est un pigment présent dans toutes les plantes de la planète Terre. Le spectre d'absorption de la chlorophylle est responsable de la couleur verte des plantes. Dans la chlorophylle il y a plusieurs composés.

Les Caroténoïdes sont des pigments de couleurs orange et jaune présents dans de nombreux organismes vivants. C'est une catégorie qui regroupe :

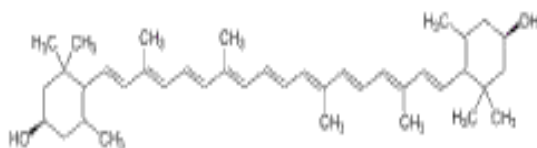
- Les carotènes : pigment de couleur jaune très important pour la photosynthèse. Les carotènes sont tous les caroténoïdes qui ne sont pas oxygénés. Elles se trouvent dans certains fruits et végétaux.
- Les xanthophylles : Molécules dérivées des carotènes.

La chlorophylle A : C'est le pigment photosynthétique le plus commun. Il est présent dans tous les végétaux.

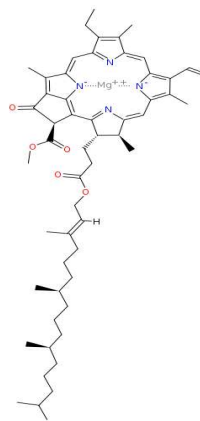
La chlorophylle B : C'est un pigment presque identique à celui de la chlorophylle a. Il y a qu'un seul groupement qui les différencie.



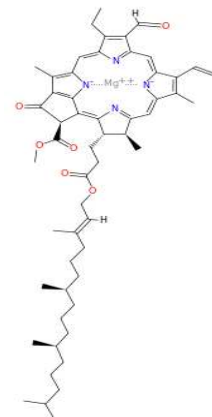
**Carotène**



**Xanthophylle**



**Chlorophylle A**



**Chlorophylle B**

### III. Reproductibilité des manipulations

Les mises aux points des manipulations des étudiants précédents (4 Etudiants de BTS Anabiotec Toulouse) me serviront de base. Je les ai donc reproduites.

Voir les expériences réalisées en annexe 1

Voici un comparatif des résultats que j'ai obtenus et leurs résultats sur les mêmes manipulations.

#### 1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les CCM sont réalisées avec des épinards frais congelés

	Eluant			Interprétation	Calculs des RF
	Ether de pétrole	Ether diéthylique	Acétone		
CCM étudiants	60%	20%	20%	Tâches plus proches et plus concentrées	RF1:0,43 RF2:0,55 RF3:0,65 RF4:1
	70%	15%	15%	Tâches plus espacées, moins concentrées	RF1 :0,34 RF2:0,44 RF3:0,53 RF4:1
Ma CCM	60%	20%	20%	Constituants bien séparés Tâches moins concentrées	RF1 :0,66 RF2 :0,83 RF3:0,93 RF4:1
	70%	15%	15%	Tâches bien séparées, moins concentrées	RF1:0,30 RF2 :0,55 RF3:0,67 RF4:1

Conclusion : Les résultats obtenus sont très proches des résultats précédents réalisés par les étudiants.

Les Rf sont différents ou légèrement différents : cela peut être dû au changement de manipulateur ainsi que la différence de température (expériences précédentes effectuées en février).

## 2. Chromatographie sur colonne

	Eluant		Préparation de la colonne	Temps	Interprétation
	Cyclohexane	Ethanol			
Colonne étudiant	98%	2%	6g de silice 0,063-0,2 mm. 12,5 mL d'éluant. 0,5 cm de sable Fontainebleau en haut et en bas. Coton en bas de la burette	30 min	Séparation entre chlorophylle A et B insuffisante Bonne séparation de la xanthophylle
	95%	5%			
	85%	15%			
	70%	30%			
1	98%	2%	6g de silice 0,063-0,2 mm. 12,5 mL d'éluant. 0,5 cm de sable Fontainebleau en haut et en bas. Coton en bas de la burette	1h15	Carotène bien séparé de la chlorophylle A Chlorophylle A et B pas assez séparés Xanthophylle bien séparé de la chlorophylle B
	95%	5%			
	85%	15%			
	70%	30%			

Conclusion : La séparation des constituants se fait de la même manière dans les deux colonnes. Il y a néanmoins une grande différence de temps entre les deux manipulations.

Ce qui pourrait expliquer cette si grande différence de temps entre les deux chromatographies sur colonne faites dans les mêmes conditions est que les épinards frais congelés utilisés sont les mêmes et que les colonnes ont été faites à un an d'intervalle. Les épinards ont pu se dégrader même conservés au congélateur et ainsi la chlorophylle n'est pas de même qualité.

## IV. Les épinards

L'extraction de la solution E se fait avec des épinards. Il y a deux sortes d'épinards disponibles au laboratoire : Les épinards frais congelés et les épinards congelés.

J'ai donc fait un comparatif de deux séparations de la colonne dans les mêmes conditions en ne changeant que les épinards.

	Type d'extraction	Eluants		Préparation de la colonne	Interprétation
		Cyclohexane	Ethanol		
2	Epinards Frais congelés	98%	2%	6g de silice 0,063-0,2 mm. 12,5 mL d'éluant 99% cyclohexane 1% éthanol. Coton et 0,5 cm de sable.	Temps de la colonne 1h25. Carotène bien séparé de la chlorophylle A Chlorophylle A et B pas assez séparés Xanthophylle bien séparé de la chlorophylle B
		95%	5%		
		85%	15%		
		70%	30%		
3	Epinards congelés	98%	2%	6g de silice 0,63-0,2 mm. 12,5 mL d'éluant 99% cyclohexane 1% éthanol. Coton et 0,5 cm de sable.	Séparation impossible. Aucune couleur n'est visible.
		95%	5%		
		85%	15%		
		70%	30%		

Conclusion : L'extraction de la solution E à partir d'épinards frais congelés donne un meilleur résultat pour la séparation.

Les épinards congelés ne donnent pas de résultats. Comme ces épinards congelés ont subi un trempage à l'eau bouillante cette opération a peut-être altéré certains des composés.

J'ai donc réalisé un spectre d'absorbance de la solution E à partir d'épinards congelés et d'épinards frais, pour voir s'il y avait les pics des quatre constituants.

**Conclusion** : Les deux spectres sont très similaires. Cela n'explique pas que la séparation des constituants de la solution E ne fonctionne pas quand elle est extraite à partir d'épinards frais. Il y a peut-être d'autres constituants dans la solution E qui ne sont pas visible au spectre et qui font que la séparation de la chlorophylle ne marche pas.

Je garderais donc pour la suite des manipulations l'extraction avec des épinards congelés.

## **V. ESSAIS**

La mise au point de la chromatographie sur couche mince a été réalisé par les étudiants antérieur. Je ne reviendrais pas sur cette manipulation.

Il faut donc mettre au point la chromatographie sur colonne pour séparer la solution E en moins de temps possible pour pouvoir faire le TP en 1h30. C'est le but de mon stage.

Dans ce paragraphe, je vais développer le cheminement de mes manipulations.

Pour trouver la bonne méthode je peux modifier certains paramètres. Il faut par contre changer qu'un seul paramètre à la fois pour pouvoir comparer avec les manipulations précédentes.

Les paramètres que je peux changer pour diminuer le temps de la chromatographie sur colonne et la séparation des différents constituants de la solution E sont :

- Les éluants : les solvants et la proportion des solvants.
- La silice : sa grosseur et sa quantité

### **I. Modifications des éluants**

#### **1. Diminuer la quantité d'éthanol**

La diminution de la quantité d'éthanol diminuera peut être le temps de la chromatographie sur colonne car l'éthanol est un solvant polaire donc plus le solvant est polaire et a d'atomes d'oxygène plus l'éluant restera accroché à la phase stationnaire.

	Eluant		Préparation de la colonne	Temps	Interprétation
	Cyclohexane	Ethanol			
4	99%	1%	6g de silice 0,063-0,2 mm 12,5 ml d'éluant 0,5 cm de sable Fontainebleau bout de coton	1h30	Les chlorophylle A et B ne sont pas séparées
	97%	3%			
	90%	10%			
	85%	15%			
5	99,5%	0,5%	6g de silice 0,063-0,2 mm 12,5 ml d'éluant 0,5 cm de sable Fontainebleau bout de coton	1h15	Les constituants sont bien séparés
	99%	1%			
	95%	5%			
	90%	10%			

**Conclusion :** Après avoir diminué au maximum la quantité d'éthanol je constate que cela améliore la séparation des constituants de la solution E et diminue aussi un peu le temps de la séparation de ses constituants. Il n'y a pas de changement significatifs.

**Je garderais donc la manipulation n°1 comme manipulation de base**

## ***2. Ajout d'un autre solvant : Le méthanol***

La chromatographie précédente a bien fonctionné mais le temps de la colonne est encore trop long.

La viscosité de l'éluant a un rôle à jouer dans la vitesse de l'élution de l'éluant. Plus l'éluant est visqueux plus l'élution sera lente.

Je choisis donc un troisième éluant moins visqueux pour diminuer le temps de la séparation.

Le méthanol est moins visqueux que l'éthanol et a les mêmes caractéristiques. Il pourra donc séparer les constituants de la solution E de la même manière.

	Formule développer	Polarité/Proticité	Viscosités
Ethanol	CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -OH	Polaire/Protique	1,20 mPa·s à 20°C
Méthanol	CH <sub>2</sub> -OH	Polaire/Protique	0,59 mPa·s à 25°C

***Voici un tableau récapitulatif de la chromatographie sur colonne faite avec le méthanol :***

	Eluant		Extractions	Préparation de la colonne	Intérprétation
	Cyclohexane	Méthanol			
6	98%	2%	Epinard Congelés	6g de silice 0,063-0,2 mm 12,5 mL d'éluant 98% cyclohexane et 2% éthanol 0,5 cm de sable Bout de coton	Le dépôt de la solution E n'est pas descendu. Aucune séparation n'est visible.
	95%	5%			
	85%	15%			
	70%	30%			

**Conclusion :** La chromatographie sur colonne avec le méthanol qui remplace l'éthanol ne fonctionne pas. J'ai donc essayé de changer les proportions du cyclohexane et du méthanol.

### 3. Changement des pourcentages des solvants

	Éluant		Extractions	Préparation de la colonne	Interprétation des résultats	
	Cyclohexane	Méthanol				
7	95%	5%	Epinarads Congelés	6g de silice 0,063 à 0,2 mm 12,5 mL d'éluant 95% Cyclohexane et 5% de méthanol. 0,5 cm de sable bout de coton	Le dépôt de la solution E n'est pas descendu	
	90%	10%				
	85%	15%				
	80%	20%				
8	Cyclohexane	Éthanol	Méthanol	Epinarads Congelés	6g de silice 0,063 à 0,2 mm 12,5 mL d'éluant 95% cyclohexane et 5% de méthanol. 0,5 cm de sable bout de coton	Les composants ne sont pas bien séparés Il manque un composé. Durée de la colonne: 40mn
	95%	2,5%	2,5%			
	90%	5%	5%			
	85%	7,5%	7,5%			
	80%	10%	10%			

**Conclusion :** La chromatographie sur colonne avec le cyclohexane et le méthanol ne fonctionne pas.

Celle avec le cyclohexane, l'éthanol et le méthanol ne séparent pas correctement les constituants de la solution E. De plus, le cyclohexane n'est pas complètement soluble avec le méthanol. Le dernier échantillon prélevé a deux phases et ne peut donc pas passer au spectrophotomètre. Le changement des pourcentages des solvants ne donne aucun résultat

### 4. Remplacement du cyclohexane et de l'éthanol par de l'eau

J'utilise l'eau comme éluant pour ces chromatographies sur colonne parce que l'eau n'est pas toxique, peu coûteuse et qu'elle est polaire et protique. Cela signifie qu'elle peut remplacer l'éthanol qui est aussi polaire et protique.

Je réalise deux colonnes avec deux extractions différentes (épinard frais et congelés) pour comparer les résultats des deux séparations et voir si j'obtiens les mêmes résultats.

	Éluant	Extraction	Préparation de la colonne	Interprétation
9	Eau	Epinarad frais congelés	Extraction à partir d'épinards congelés 6g de silice 0,2-0,5 mm 12,5 mL d'eau distillée 0,5 cm de sable de Fontainebleau Bout de coton	Aucune séparation visible
10	Eau	Epinarad congelés	Extraction à partir d'épinards frais 6g de silice 0,2-0,5 mm 12,5 mL d'eau distillée 0,5 cm de sable de Fontainebleau Bout de coton	Aucune séparation visible

**Conclusion** : Les chromatographies sur colonne avec de l'eau ne fonctionnent pas quel que soit les épinards utilisés. L'eau n'est donc pas un solvant approprié pour cette séparation.

Après avoir essayé plusieurs chromatographies en ne changeant que les éluants et leurs proportions, j'en conclus que je garderais l'éluant éthanol/cyclohexane en modifiant d'autres paramètres dans l'optique d'améliorer la séparation et la durée de la chromatographie sur colonne.

J'ai réalisé plusieurs essais :

- Changement des solvants : essais avec le méthanol et l'eau n'ont pas fonctionné
- Changement des pourcentages des solvants : Diminution de la quantité d'éthanol ne donne pas de changement significatifs

Je garde alors la manipulation n°1 comme manipulation de référence.

	Eluant		Extractions	Préparation de la colonne
	Cyclohexane	Ethanol		
1	98%	2%	Epinard Frais Congelès	6g de silice 0,063-0,2 mm 12,5 mL d'éluant 98% cyclohexane et 2% éthanol 0,5 cm de sable Bout de coton
	95%	5%		
	85%	15%		
	70%	30%		

## II. Modification de la silice.

### 1. Grosueur de la silice

La silice est fondamentale pour la séparation avec une chromatographie sur colonne. Je change donc la silice de 0,063-0,2 mm par une silice plus épaisse : 0,2-0,5 mm.

Voici un tableau récapitulatif :

	Eluant		Extraction	Préparation de la colonne	Temps	Interprétation des résultat
	Cyclohexane	Éthanol				
11	98%	2%	Epinards congelès	6g de silice 0,2-0,5 mm 12,5 mL d'éluant 0,5 cm de sable de Fontainebleau en haut de la burette. Bout de coton en bas de la burette.		Aucune séparation visible
	95%	5%				
	85%	15%				
	70%	30%				
12	99%	1%	Epinards frais congelès	6g de silice 0,2-0,5 mm 12,5 mL d'éluant 0,5 cm de sable de Fontainebleau en haut de la burette. Bout de coton en bas de la burette.	1h25	La silice a formé une crevasse. Le dernier constituant y est resté coincé.
	95%	5%				
	90%	10%				
	85%	15%				

13	Cyclohexane	Éthanol	Epinards frais congelés	6g desilice 0,2-0,5 mm 12,5 mL d'éluant 0,5 cm de sable de Fontainebleau en haut de la burette. Bout de coton en bas de la burette.	40 min	Les couleurs sont bien visibles. Les constituants sont bien séparés. Le temps de la colonne a beaucoup diminué mais est encore un peu trop long.
	99%	1%				
	95%	5%				
	90%	10%				
	85%	15%				

**Conclusion :** La silice 0,2-0,5 mm améliore nettement le temps de la colonne. Les constituants sont bien séparés. Je garderais donc cette silice pour les prochaines chromatographies en changeant d'autres paramètres.

Cette chromatographie n°13 sur colonne sera ma manipulation de référence car c'est celle qui a donné de meilleur résultat.

Ref	Eluant		Préparation de la colonne 6g desilice 0,2-0,5 mm 12,5 mL d'éluant 0,5 cm de sable de Fontainebleau en haut de la burette. Bout de coton en bas de la burette.	Temps 40 min	Interprétation des résultats Les couleurs sont bien visibles. Les constituants sont bien séparés. Le temps de la colonne a beaucoup diminué mais est encore un peu trop long.
	Cyclohexane	Éthanol			
	99%	1%			
	95%	5%			
	90%	10%			
85%	15%				

## 2. Modification de la quantité de la silice.

Le fait de modifier la quantité de la silice modifie sa hauteur dans la colonne. Diminuer cette quantité peut donc diminuer la durée de la séparation mais aussi sa qualité. C'est pour cela que je vais diminuer la quantité de silice.

14	Eluants		Préparation de la colonne 6g de silice 0,2-0,5 mm. 12,5 mL d'éluant 99% cyclohexane 1% éthanol. Coton et 0,5 cm de sable.	Temps 40 min	Interprétation Les constituants sont bien séparé
	Cyclohexane	Ethanol			
	99%	1%			
	95%	5%			
	90%	10%			
85%	15%				
15	Cyclohexane	Ethanol	4g de silice 0,2-0,5 mm. 12,5 mL d'éluant 99% cyclohexane 1% éthanol. Coton et 0,5 cm de sable.	Temps 25 min	Interprétation Les constituants sont bien séparés
	99%	1%			
	95%	5%			
	90%	10%			
	85%	15%			

**Conclusion :** Diminuer la quantité de silice diminue la durée de la séparation des différents constituants de la solution E.

La chromatographie sur colonne n°15 est celle qui a le mieux fonctionné et celle qui a pris le moins de temps.

## CONCLUSION

J'ai effectué mon stage au sein de l'Ecole National de Formation Agronomique. Lors de ce stage de 8 semaines, j'ai pu mettre en pratique mes connaissances acquises durant ma 1<sup>ère</sup> année de BTS Chimie.

De plus j'ai pu découvrir le monde du travail et le fonctionnement d'un laboratoire dans une école agronomique.

Après ma rapide intégration dans l'équipe avec laquelle j'ai travaillé, j'ai eu l'occasion de réaliser plusieurs tâches qui ont consisté à accomplir une mission de stage.

Ce stage m'a aussi permis d'apprendre de nouvelles techniques et d'apprendre la chimie verte.

C'est une très bonne expérience professionnelle qui m'a permis d'approfondir mes connaissances dans le cadre de ma formation.

Enfin je pense que cette expérience m'a offert une bonne préparation à mon insertion professionnelle car elle fut pour moi très enrichissante.

D'un point de vue de l'objectif du stage, la mise au point d'une méthode de séparation des constituants de la solution E qui dure le moins de temps possible dans l'optique de reproduire cette méthode dans le cadre d'un TP d'1h30 a été atteinte.

### Conditions d'extraction par chromatographie sur colonne :

	Eluant		Extraction	Préparation de la colonne	Temps	Interprétation
	Cyclohexane	Ethanol				
	99%	1%	Epinard Frais congelés	4g de silice 0,2-0,5 mm. 12,5 mL d'éluant 99% cyclohexane 1% éthanol. Coton et 0,5 cm de sable.	25 min	Les constituants sont bien séparés
	95%	5%				
	90%	10%				
	85%	15%				

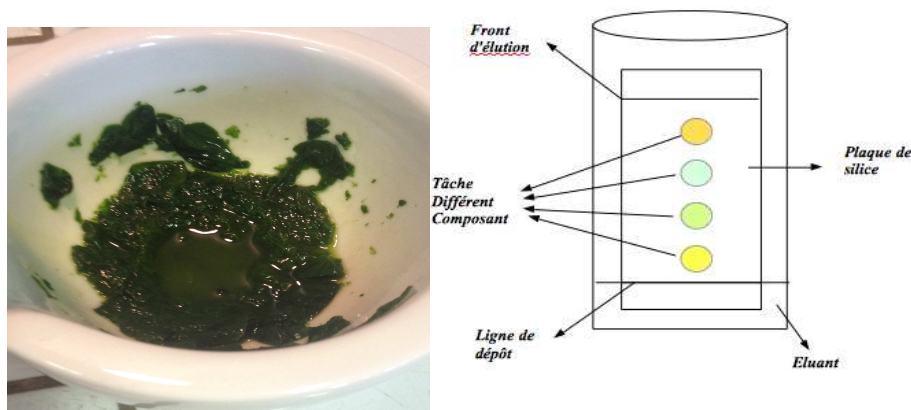
## Annexe 1 : Manipulation et mode opératoire

### Extraction de la chlorophylle à partir d'épinard frais.

Pour extraire la chlorophylle, il faut d'abord peser 10g d'épinard frais et les découper pour qu'il ne reste plus que les feuilles.

Il faut ensuite ajouter 10 ml d'éthanol

Une fois l'éthanol ajouté il faut broyer les épinards jusqu'à que le solvant ai une couleur verte bien marqué comme la photo ci-dessous. Cette manipulation doit se faire sous hotte car l'éthanol et le dichlorométhane sont des produits plus ou moins toxique.

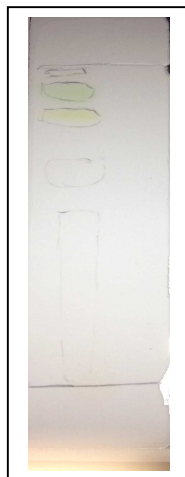


### Chromatographie sur Couche Mince

#### Mode opératoire :

Mettre la plaque de silice dans l'étuve à 110°C pendant 10 mn pour la régénérer. Pendant ce temps préparer 10 mL d'éluant : 60% d'éther de pétrole, 20% d'acétone et 20% d'éther diéthylique dans une cuve ou un bécher haut. Déposer quelques gouttes de la solution E précédemment extraite a l'aide d'un tube capillaire. Poser la plaque dans la cuve verticalement. Attendre que l'éluant arrive au  $\frac{3}{4}$  de la plaque (front d'éluant).

#### Interprétation des résultats :



Xanthophylle  
Chlorophylle B

Chlorophylle A

Carotène

- Chromatographie sur colonne
- Choix des éluants et des proportions

Pour choisir les éluants il faut prendre en compte la surface mobile et la solution que l'on veut séparer.

Pour cette chromatographie sur colonne j'utilise de l'éthanol et du cyclohexane.

L'éthanol est polaire. Il faut mettre une faible quantité d'éthanol car plus la molécule est polaire et à d'atomes d'oxygène plus l'éluant restera accroché à la phase stationnaire.

Le cyclohexane est apolaire donc il ne s'accrochera pas avec la phase stationnaire, il est soluble dans l'éthanol.

1<sup>er</sup> éluant : 98% de cyclohexane et 2% éthanol.

2<sup>ème</sup> éluant : 95% de cyclohexane et 5% d'éthanol.

3<sup>ème</sup> éluant : 85% cyclohexane et 15% éthanol

4<sup>ème</sup> éluant : 70% cyclohexane et 30% éthanol

- Préparation de la colonne



Préparer 50 mL d'éluant 98% de cyclohexane et 2% d'éthanol

Placer un bout de coton en bas de la burette. Mettre quelques gouttes d'éluant pour que ce soit bien imbibé.

Ajouter 0,5 cm de sable de Fontainebleau

Peser 6g de silice 0,063-0,2 mm et ajouter 12,5 mL de l'éluant précédemment préparé.

Mélanger jusqu'à que ça forme un gel de silice.

Verser le gel de silice dans la burette en évitant la formation de bulle.

Nettoyer le gel de silice qui est resté accroché à la paroi de la colonne avec un peu d'éluant.

Remarque : Il faut toujours que le gel de silice soit recouvert d'éluant pour ne pas qu'il sèche. La colonne est prête à être utilisée.

- Préparation de la solution de chlorophylle

Une fois la solution E extrait des épinards, placer la solution E dans un erlenmeyer et la chauffer au bain marie à 95°C jusqu'à qu'elle soit totalement desséchée.

Resolubiliser ensuite la solution E avec quelques gouttes de l'éluant précédemment utilisé pour le gel de silice.

Verser ensuite la solution E resolubiliser dans la colonne et commencer la séparation.

Ajouter le 1<sup>er</sup> éluant jusqu'à que la couleur jaune arrive en bas de la burette. Changer de flacon pour la récupérer.

Ajouter ensuite le 2<sup>ème</sup> éluant pour faire descendre la couleur vert-bleu. Une fois la couleur vert bleu en bas de la burette, changer de flacon pour la récupérer.

Ajouter ensuite le 3<sup>ème</sup> éluant pour que la couleur vert jaune descende en bas de la burette.

Changer de flacon une fois que la couleur en bas de la burette.

Ajouter le 4<sup>ème</sup> éluant pour faire descendre la couleur jaune.



Chromatographie sur colonne









- Interprétation des résultats

Pour vérifier si les échantillons récolté sont bien les produits attendu, je réalise une analyse spectrophotométrique qui permet de relever l'absorbance de la solution à analyser.








Le spectrophotomètre fait passer une lumière blanche à travers une longueur  $l$  de solution et compare son intensité avec celle d'un faisceau de lumière blanche qui n'aurait pas traversé la solution. Le rapport sans unité donne l'absorbance de l'espèce colorée pour chaque radiation composant la longueur d'onde: on obtient alors un spectre.

## Annexe 2: Tableau fiche toxicologique

### Extraction et chromatographie sur colonne

	Numéro C.A.S	Solubilité	Polarité/ Proticité	Toxicité / Pictogramme de danger
Éthanol	64-17-5	Miscible dans l'eau, Complète dans les solvants polaires et apolaires ( <u>acétone, éther diéthylique</u> )	Polaire / Protique	Inflammable 
Dichlorométhane	75-09-2	dans l'eau à 20°C :13g/L 100g/l dans l' <u>acétone</u> , l' <u>éthanol</u> , l' <u>éther diéthylique</u>	Polaire / Aprotique	 Nocif pour la santé
Méthanol	67-56-1	miscible dans l'eau et dans l'acétone en toute proportion	Polaire / Protique	Inflammable  Nocif pour la santé  Danger 
Cyclohexane	110-82-7	dans l'eau :nulle soluble dans l' <u>alcool</u> , l' <u>éther</u> et dans l'acétone. 100 mL de méthanol dissout 57g à 20°C	Apolaire / Aprotique	Inflammable  Nocif pour la santé  Dangereux pour l'environnement 

Chromatographie sur couche mince

	Numéro C.A.S	Solubilité	Polarité / Proticité	Toxicité/ Pictogramme de danger
Ether diéthylique	60-29-7	Miscible avec l' <u>éther de pétrole</u> soluble l' <u>acétone</u> très soluble dans l'éthanol Faiblement soluble dans l'eau	Peu polaire	 Danger  Inflammable
Ether de pétrole	64742-49-0	Soluble dans l'éther diéthylique et dans l'acétone	Apolaire / Aprotique	 Inflammable  Nocif pour la santé  Dangereux pour l'environnement
Acétone	67-64-1	miscible avec l'eau, l' <u>éthanol</u> , l' <u>oxyde de diéthyle</u> , les <u>esters</u>	Polaire / Aprotique	  Inflammable  Danger