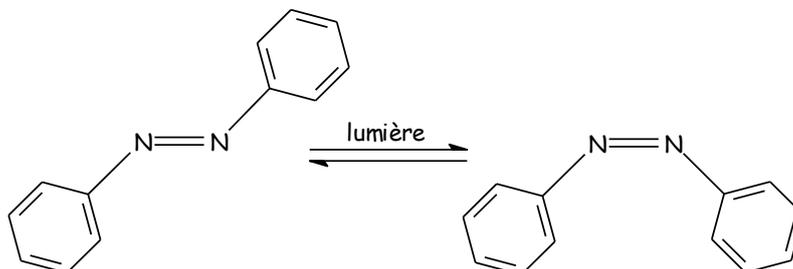


## Chromatographie sur couche mince (CCM) et sur colonne

### I. Chromatographie sur couche mince : isomérisation du (E)-azobenzène en (Z)-azobenzène

Le (E)-azobenzène, stéréoisomère le plus stable de l'azobenzène, peut être isomérisé en (Z)-azobenzène, stéréoisomère le moins stable, sous l'action de la lumière. Les deux diastéréoisomères absorbent tous les deux en UV et peuvent être séparés par CCM (adsorbant : gel de silice ; éluant : toluène).



- Préparer la cuve CCM. (éluant: toluène)
- Sur la plaque, prévoir deux points de dépôts puis effectuer sur l'un des emplacements un dépôt de la solution de (E)-azobenzène dans le toluène (10 g.L<sup>-1</sup>). La solution se trouve dans un flacon protégé de la lumière et **ne doit en aucun cas être exposée à la lumière**.
- Exposer la plaque au soleil ou à la lumière d'une lampe pendant environ deux heures.
- Effectuer alors, sur la même plaque et au niveau du deuxième emplacement prévu, un dépôt de la solution de (E)-azobenzène dans le toluène (10 g.L<sup>-1</sup>).
- Procéder à l'élution de la plaque.
- Révéler la plaque à la lumière naturelle ou éventuellement sous la lampe UV.

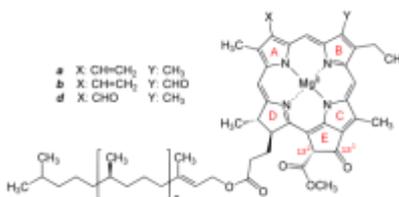
Q1. Proposer une explication sur l'ordre de migration des deux diastéréoisomères de l'azobenzène.

### II. Extraction et séparation des pigments d'épinards (β-carotène et chlorophylle) par chromatographie sur colonne

Les épinards contiennent deux pigments principaux : du β-carotène et de la chlorophylle (il en existe plusieurs types, cf représentations ci-dessous).

β-carotène

chlorophylle

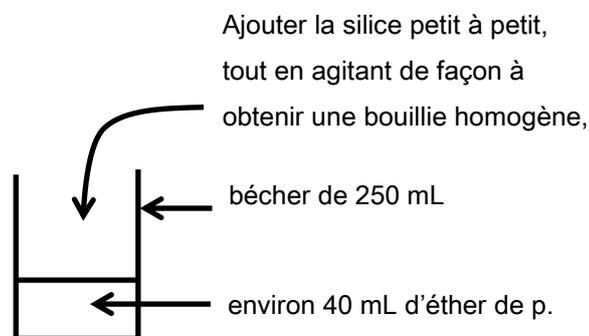


#### 1. Préparation de l'échantillon d'épinards

A l'aide d'un mortier et d'un pilon, broyer env. 10 g d'épinards en branches auxquels ont été ajoutés 15 mL d'éthanol à 95%, jusqu'à ce que le mélange ne soit plus collant. Essorer la pâte au travers d'un entonnoir muni de laine de verre dans un bécher de 50 mL. Essorer la laine de verre et la conserver avec la pulpe. Jeter l'éthanol récupéré. Ajouter 10 mL de dichlorométhane à la pulpe déshydratée et broyer pendant 2 min. Filtrer sur un entonnoir muni d'un morceau de laine de verre et recueillir le liquide dans un ballon Büchi rôdé préalablement taré. Evaporer le dichlorométhane à l'évaporateur rotatif sans chauffer jusqu'à ce qu'il reste env. 1,5 g dans le ballon. Noter la masse de brut obtenu. Prélever un petit peu de mélange pour le déposer en CCM. (éluant éther de pétrole/acétate d'éthyle 60/40)

## 2. Préparation de la colonne

- Installer la colonne de façon à ce qu'elle soit parfaitement verticale.
- Préparer au moins 20 tubes à hémolyse identiques sur un support et marquer le niveau correspondant au 4/5<sup>e</sup> de la hauteur du tube (volume à déterminer).
- Préparer la suspension d'alumine dans l'éther de pétrole : 20 g de d'alumine (granulométrie 50-160  $\mu\text{m}$ ) dans 40 mL d'éther de pétrole (voir ci-contre). **Utiliser un masque à poussière.**
- Placer dans le fond de la colonne (dans le cas des colonnes sans fritté) un peu de coton de verre (imbibé d'éther de pétrole) et un peu de sable de Fontainebleau.
- Bien mélanger le contenu du bécher et le verser dans la colonne ; laisser l'alumine se tasser.
- Ouvrir le robinet de la colonne et récupérer l'éther de pétrole dans une éprouvette propre et sèche.
- Verser le reste de l'alumine en une ou deux fois dans la colonne.
- **ATTENTION. Ne jamais laisser s'assécher le haut de la colonne** : arrêter l'écoulement quand il reste une hauteur d'environ 1 mm d'éther de pétrole au-dessus de la surface de l'alumine.
- Nettoyer l'intérieur de la colonne avec un peu d'éther de pétrole de façon à enlever la silice qui s'est déposée sur la paroi.
- Laisser s'écouler l'excès d'éther de pétrole dans une éprouvette propre et sèche en veillant à ne pas assécher la surface supérieure de l'alumine.
- Bloquer la surface supérieure de la colonne avec un peu de sable de Fontainebleau (2 mm de hauteur environ).



## 3. Dépôt du produit brut

- A l'aide d'une pipette pasteur, verser délicatement le mélange en tête de colonne.
- Ouvrir le robinet afin que le mélange pénètre dans la colonne (attention à ne pas assécher le haut de la colonne).
- Ajouter délicatement un peu de **l'éluant : mélange éther de pétrole/acétate d'éthyle 80/20.**

## 4. Elution

- **⚠ Attention : penser à fermer le robinet de la colonne lors des changements de tubes.**
- **⚠ Attention : la partie 5 doit aussi être réalisée pendant la partie 4.**

- Eluer en récoltant l'éther de pétrole dans une éprouvette, puis l'anneau jaune dans des tubes à hémolyse (Quand la première bande jaune arrive à environ 2 cm du bas de la colonne, remplacer l'éprouvette par un tube à hémolyse (tube 1) et, à partir de cet instant, collecter des fractions (au 4/5 de la hauteur, ou avant si cela semble pertinent) dans les tubes à hémolyse préalablement numérotés. Réaliser la partie 5 pendant l'élution.
- Eluer la colonne avec le même éluant pour récolter l'anneau d'élution vert, par fractions de 5 mL.

## 5. Analyse du contenu des tubes

- Analyser le contenu de chaque tube par CCM, l'adsorbant étant un gel de silice et l'éluant celui du 1. ; prévoir 5 dépôts par plaque, le premier dépôt étant celui du mélange brut puis les suivants ceux du contenu des différents tubes recueillis (le contenu de chaque tube étant en solution très diluée, effectuer 4 ou 5 dépôts en chaque point).

- Analyser le brut et les fractions contenant les pigments par spectroscopie UV-visible. (scans entre 350 et 700 nm)
- **Attention : utiliser des cuves en quartz et faire un blanc avec l'éluant.**

## 6. Elimination des déchets

L'alumine doit être éliminée dans un récipient dédié.

- Q2. Pourquoi utilise-t-on le dichlorométhane comme solvant d'extraction des deux pigments ?
- Q3. Que pourrait-on faire pour que la chlorophylle sorte plus rapidement de la colonne ?
- Q4. Justifier l'ordre de sortie des deux colorants.
- Q4. Analyser les CCM obtenues. Conclure quant à la qualité de la séparation sur cette colonne.
- Q5. Analyser les spectres UV-visible obtenus. Commenter les valeurs des longueurs d'onde des différents maxima d'absorption.