

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université d'Oum El Bouaghi



Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences de la Matière

Polycopié (UEM) :

TP Méthodes de Séparation Appliquées aux Produits Pharmaceutiques

3^{ème} A. Chimie Pharmaceutique/S6

Préparé par : Dr Dammene Debbih Ouafa

2024/2025

AVANT-PROPOS

Ce polycopié pédagogique faisant partie de l'unité d'enseignement méthodologique ; propose des énoncés de travaux pratiques de quelques méthodes de séparation appliquées aux produits pharmaceutiques.

Il s'adresse aux étudiants de 3^{ème} année chimie pharmaceutique suivant les canevas de l'offre de formation LMD de 2014-2015 et conformément à l'annexe de l'arrêté n° 1245 rédigé le 22 décembre 2022 ; déterminant le programme d'études pour l'obtention d'une Licence Académique dans le domaine des Sciences de la Matière, filière Chimie et spécialité Chimie Pharmaceutique dans les universités et centres universitaires.

SOMMAIRE

AVANT PROPOS.....	1
SOMMAIRE.....	2
LISTE DES FIGURES	3
LISTE DES TABLES.....	3
TP1 : Extraction d'une huile essentielle.....	4
TP2 : Séparation de l'eugénol et de l'acétylougénol par l'intermédiaire d'une réaction acido-basique.....	8
TP3 : Extraction de l'iode d'un antiseptique.....	10
TP4 : Préparation de Plaques Chromatographiques avec Support en Verre	12
TP5 : Chromatographie de partage sur papier.....	13
TP6 : Identification des principes actifs d'un médicament par chromatographie sur couche mince (CCM)	15
TP7 : Séparation des Constituants d'un Colorant Alimentaire par Chromatographie sur Colonne	18
RÉFÉRENCES.....	21

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Formules topologiques	2
Figure 2. Montage de l'hydrodistillation	3
Figure 3. Groupe phénol de l'eugénol	5
Figure 5. Montage de la chromatographie sur colonne.....	15

LISTE DES TABLES

Tableau 1. Densités des solvants employés et de l'eugénol.....	2
Tableau 2. Densités des solvants employés au cours de l'extraction.....	8
Tableau 3. Composition des médicaments à analyser.....	14

TP1 : Extraction d'une huile essentielle

1. Objectifs

L'objectif de ce travail pratique est d'apprendre les différentes méthodes de séparation qui sont : la distillation, le relargage, l'extraction par un solvant, la décantation, le séchage, la filtration et l'évaporation.

2. But de la manipulation

Extraire l'huile essentielle (ou essence) des clous de girofle.

3. Définition

L'huile essentielle est une combinaison de substances organiques qui ne se dissocient pas dans l'eau, ce qui donne aux plantes leur parfum. Elle est utilisée comme composant ou ingrédient dans le domaine de la parfumerie et également comme aromatisant (agent de saveur) dans l'industrie alimentaire.¹ Elle est obtenue soit par hydrodistillation ou éventuellement par entraînement à la vapeur d'eau suivie d'une extraction et d'un séchage ; ou par expression (ou pression à froid), ou encore à l'aide d'un solvant.

Les clous de girofle proviennent d'un arbre connu par le giroflier, originaire d'Indonésie.² Ils sont utilisés comme épices et possèdent une fragrance principalement attribuée à deux molécules : l'eugénol et l'acétyl-eugénol présentant des proportions de 75 à 85 % et 4 à 10 % ; respectivement. Leurs formules topologiques sont données ci-après (figure 1). Un peu d'hydrocarbures et de petites quantités de dérivés cétoniques et d'esters sont présents dans cette HE.³

Les capacités analgésiques et antiseptiques de l'eugénol sont principalement employées en dentisterie.⁴

4. Matériel et produits

Une balance, une coupelle, un mortier et un pilon, un entonnoir, une ampoule à décanter, un ballon de 150 mL, un erlenmeyer de 150 mL et un montage d'hydrodistillation.

Les clous de girofle, l'hydroxyde de sodium NaOH, le dichlorométhane CH₂Cl₂, un agent desséchant (MgSO₄ ou Na₂SO₄).

5. Quelques données

* Ci-dessous (figure 1), les formules topologiques de l'eugénol et de l'acétyl'eugénol :

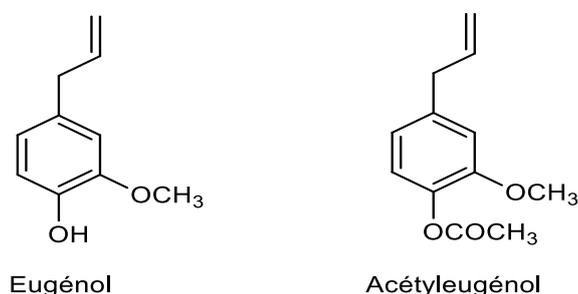


Figure 1. Formules topologiques

* Ci-après (tableau 1), les valeurs des densités des solvants utilisés ainsi que de l'eugénol :

Tableau 1. Densités des solvants employés et de l'eugénol

	Densité
Eau	0,998 (à 20°C)
Eau salée	1,1
Eugénol (sa solubilité est faible dans H ₂ O et plus faible dans H ₂ O salée et décroît avec la température. Elle est élevée dans CH ₂ Cl ₂ ainsi que dans les solvants organiques tel que le cyclohexane)	1,06
CH ₂ Cl ₂	1,326 (à 20°C)

- a. Écrire les formules brutes de l'eugénol et de l'acétyl'eugénol à l'aide de leurs formules topologiques.

6. Mode opératoire

Etape 1 : Extraction par hydrodistillation

- Écraser 10 g de clous de girofle dans un mortier en utilisant un pilon ou les broyer dans un moulin à café.
- Verser la poudre dans un ballon, lui ajouter 100 mL d'eau avec quelques morceaux de pierre ponce.
- Installer le dispositif de distillation (figure 2), et démarrer le chauffage à fond au début, puis le réduire dès que l'ébullition devient stable pour maintenir un flux constant de vapeur tout en déclenchant la circulation d'eau froide à faible débit dans le réfrigèrent.

ATTENTION : Lorsque vous aurez recueilli environ 40 mL de distillat, placer l'erlenmeyer dans un bain d'eau glacée, et continuer à récupérer le distillat jusqu'à absence de gouttelettes d'huile (environ 100 mL au total).

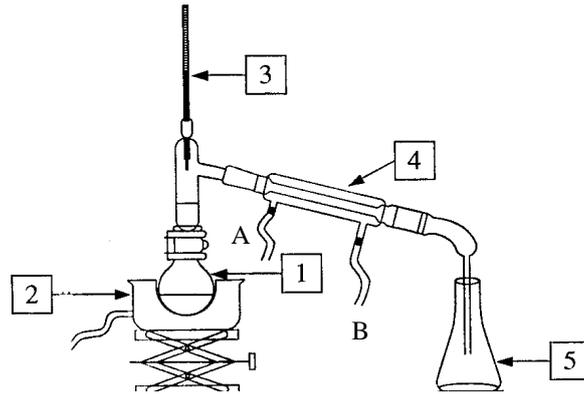


Figure 2. Montage de l'hydrodistillation

- b. Donner les noms des différents appareils répertoriés sur la figure 2 ci-dessus, tout en précisant où se situe l'arrivée et la sortie de l'eau du réfrigérant (A ou B) ?
- c. Quelle est l'utilité de l'eau introduite dans le ballon ?
- d. Quelles sont les caractéristiques du distillat que l'on pourrait observer, à savoir ; son odeur, sa couleur et sa limpidité ?
- e. Pourquoi ajoute-t-on les pierres ponce ?
- f. En se basant sur les données, expliquer pourquoi l'eau glacée a-t-elle été utilisée ?
- g. Comment peut-on affirmer que le distillat n'est pas de l'eau pure en se basant sur la température de sortie des vapeurs ? Quelle sera l'évolution de la température après l'extraction complète de l'huile essentielle ?

Etape 2 : Relargage

Incorporer environ 3 g de chlorure de sodium NaCl et mélanger jusqu'à ce que la dissolution soit complète. Cette opération est connue sous le nom de relargage. Observer ainsi l'emplacement de la phase organique par rapport à la phase aqueuse.

- h. Expliquer l'intérêt du relargage ? Quel est le principe sur lequel repose cette opération ?

Etape 3 : Extraction liquide-liquide

- Verser délicatement le contenu de l'erlenmeyer (ne pas introduire l'excès de sel solide) dans une ampoule à décanter.
 - Réaliser l'extraction de la phase organique en ajoutant 2x20 mL de dichlorométhane dans l'ampoule à décanter avec la phase aqueuse (eau salée). Agiter en effectuant, de temps à autre, un dégazage. Laisser décanter.
 - Attendre que les deux phases se séparent correctement puis récupérer la phase organique (contenant l'eugénol et l'acétyl'eugénol dissouts dans CH₂Cl₂).
- i. D'après les données, où doit se trouver la phase organique ?

Etape 4 : Séchage et évaporation

- Mettre en commun les phases organiques obtenues par tous les groupes.
 - Pour sécher la phase organique, il suffit d'ajouter quelques spatules de sulfate de sodium (Na_2SO_4) ou de magnésium (MgSO_4) anhydre, puis de filtrer dans un ballon de masse **m**=.....g.
 - Évaporer le solvant en utilisant un évaporateur rotatif.
 - Déterminer la masse de l'huile essentielle des clous de girofle : **m_{HE}** = g
- j.** En sachant que la masse totale des clous de girofle ; utilisée dans ce protocole expérimental est g, trouver le rendement de cette extraction.

TP2 : Séparation de l'eugénol et de l'acétyl'eugénol par l'intermédiaire d'une réaction acido-basique

1. Objectif

L'objectif de ce travail pratique est d'apprendre une méthode de séparation par voie chimique.

2. But de la manipulation

Séparation de l'eugénol et l'acétyl'eugénol présents dans l'huile essentielle des clous de girofle.

3. Principe de la séparation

La phase organique contient les deux constituants de l'huile essentielle : l'eugénol, dont le groupe caractéristique phénol possède des propriétés acides, et l'acétyl'eugénol.

L'eugénol est un phénol (figure 3), qui se transforme en ion eugénolate (très soluble dans l'eau) sous l'action de la solution de soude.³

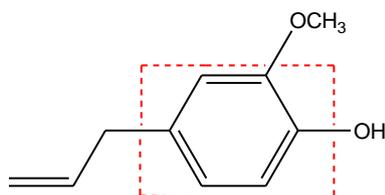


Figure 3. Groupe phénol de l'eugénol

4. Matériel et produits

Un bécher, une ampoule à décanter, un évaporateur rotatif et du papier pH.

L'huile essentielle des clous de girofle, le dichlorométhane CH_2Cl_2 , les solutions : NaOH à $2,0 \text{ mol.L}^{-1}$, HCl à $6,0 \text{ mol.L}^{-1}$.

5. Mode opératoire

- Reprendre l'HE obtenue au 1^{er} TP avec 40mL de CH_2Cl_2 .
 - Verser dans l'ampoule à décanter vide la phase organique.
 - Ajouter à cette phase 15 mL de solution de soude de concentration 2 mol.L^{-1} .
 - Agiter en dégazant de temps en temps. Laisser décanter et récupérer la phase aqueuse dans un bécher propre.
- a. En notant Ar-OH l'eugénol, écrire l'équation chimique modélisant la transformation de la fonction phénol de l'eugénol en ion eugénate (ou ion eugénolate).
- b. Que contient la phase aqueuse ? Justifier.

- c.** L'acétylougénol peut-il réaliser la même réaction ? Où se trouve-t-il alors?
- Dans la phase aqueuse, introduire une solution d'acide chlorhydrique concentré (6 mol.L^{-1}) jusqu'à obtenir un pH acide (il se forme alors une émulsion); évaluer avec un papier pH en l'humectant avec la solution et en le comparant avec l'échelle de référence.
 - L'eugénol est régénéré par action de la solution d'acide chlorhydrique.
- d.** Établir l'équation de la réaction qui se déroule avec l'ion eugénolate et trouver une interprétation de l'émulsion observée.
- e.** Quel est le but des deux réactions acido-basiques effectuées ?
- Cette fraction est réintroduite dans une ampoule à décanter et extraite en deux étapes avec 30 mL de dichlorométhane CH_2Cl_2 à chaque étape. Le produit final « l'eugénol » est obtenu après évaporation à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif.
- f.** L'eugénol possède des capacités analgésiques et antiseptiques. Expliquer.

TP3 : Extraction de l'iode d'un antiseptique

1. Objectifs

- Apprendre les étapes d'une extraction liquide-liquide par un solvant.
- Interpréter les informations provenant d'étiquettes.
- Elaborer un protocole d'extraction à partir d'informations sur les propriétés physiques des espèces chimiques recherchées.

2. But de la manipulation

L'extraction d'une espèce chimique qui est le diiode ; un constituant principal présent dans le médicament antiseptique : *la Bétadine*.

Ce composé chimique responsable de ces propriétés antiseptiques se trouve en solution aqueuse brune ; vendue en pharmacie sous le nom de *Lugol* ou de *Bétadine*.⁵

3. Matériel et produits

- Des tubes à essai, des éprouvettes graduées de 5 et 10 mL, des béchers de 25mL, des pipettes de Pasteur, des pipettes de 1mL et des ampoules à décanter de 50mL.
- Eau distillée, solution d'eau colorée, éthanol et cyclohexane (sous la hotte).
- Solution de Bétadine.

Remarque : La solution de Bétadine étant trop concentrée, on ajoutera 2 ou 3 gouttes de Bétadine à 10 mL d'eau distillée pour la diluer.

4. Quelques données

- * Afin d'effectuer cette extraction, il faut tenir en compte ces trois principaux critères :
 - Il est nécessaire que le solvant extracteur soit plus volatil et non miscible avec le solvant d'origine.
 - Le produit extrait est plus soluble dans le solvant utilisé pour l'extraire que dans le solvant d'origine.
 - Le solvant employé doit avoir la toxicité la plus faible possible.
- * Ci-après ([tableau 2](#)), les valeurs des densités des solvants extracteurs utilisés ainsi que de l'eugénol:

Tableau 2. Densités des solvants employés au cours de l'extraction

	Densité à 20°C
Eau	0,998
Ethanol	0,789
Cyclohexane	0,778
CH ₂ Cl ₂	1,326

5. Miscibilité des deux solvants

- Proposer un protocole pour évaluer la miscibilité de l'éthanol avec l'eau, puis du cyclohexane avec l'eau et ceci en prenant 1mL de chaque solvant.
- Noter les résultats obtenus, en schématisant chaque expérience. Préciser sur le schéma où se trouve chaque solvant, dans le cas où ils sont non miscibles. Justifier.

6. Solubilité du diiode dans un solvant

- Sous la hotte, munis de gants, on place dans deux tubes à essai un cristal de diiode, que l'on écrase avec un agitateur en verre.
 - Dans le premier, on ajoute un peu d'eau. Dans le second, on ajoute un peu de cyclohexane.
 - On bouche et on agite les tubes.
- Le diiode s'est-il dissout dans l'eau ? Dans le cyclohexane ? Argumenter vos réponses.
 - Comparer la quantité de diiode dissoute dans chaque tube. Dans quel solvant la solubilité du diiode est-elle la plus grande ?

7. Extraction de l'iode de la solution de Bétadine

- A partir des documents fournis, et des résultats précédents, proposer un protocole très précis (avec le matériel, les quantités, ...) permettant de réaliser l'extraction du diiode dans 10 mL de solution diluée de Bétadine.
- Quelle est le type de cette extraction ? Comment récupérer le diiode extrait ?
- Compléter : « le solvant extracteur doit être à la solution contenant l'espèce à extraire. Celle-ci doit être plus dans le solvant extracteur ».
- Le principe actif de la Bétadine est : complexe chimique à base de diiode.

TP4 : Préparation de plaques chromatographiques avec support en verre

1. Objectif :

Préparation de plaques de chromatographie sur couche mince CCM sur un support en verre.

2. Mode opératoire :

- Préparer le dispositif conçu pour étaler les plaques, constitué de 5 à 6 supports solides en verre ; de telle façon qu'il soit possible de procéder à leur étalement directement après la préparation suivante ;
- Préparer un mélange homogène qui devrait avoir une consistance pâteuse (pâte à crêpes épaisse sans grumeau). Ceci est effectué à partir de 60 g de silice (kieselgel 60H), 6g de CaCO_3 anhydre (agent de fixation) et 120 mL d'eau distillée, soit : 1g de silice pour 2mL de H_2O . Il est cependant possible de rajouter une quantité d'eau au mélange, afin d'arriver à la consistance déjà citée.
- Pour éviter qu'il ne se dessèche, le mélange préparé est aussitôt placé dans le dispositif et étalé sur les plaques en verre.
- Une fois que la plaque en verre est garnie de la phase fixe, elle est transférée sur la pailasse puis tapotée et légèrement soulevée d'environ 0,5 cm, puis relâchée sur la surface plane. Ceci est indispensable afin de s'assurer que la répartition du gel de silice est bien homogène et également afin de permettre aux éventuelles bulles d'air de remonter en surface.
- Les plaques seront ultérieurement séchées en les plaçant dans une étuve à 90°C pendant environ 24h.

TP5 : Chromatographie de partage sur papier

1. Objectifs :

Séparer par chromatographie sur feuille de papier Whatman les colorants contenus dans diverses encres de feutres.

2. Principe :

On réalise une *Chromatographie sur papier*, dans laquelle la séparation des espèces chimiques se fait uniquement à la suite de la différence de solubilité de ces dernières dans l'éluant.

La phase stationnaire est constituée de l'éluant ; lié aux molécules de cellulose du papier. Ainsi, les espèces chimiques analysées sont partagées entre l'éluant qui migre et celui lié au papier.⁶ On parle de *chromatographie de partage*.

3. Produits et instruments utilisés :

- Support : feuille 13 x 8 cm de papier Whatman n° 1.
- Eluant : eau salée (solution aqueuse de chlorure de sodium à 40 g / L) +éthanol.
- Feutres colorés.
- Des cuves à chromatographie (bêcher + verre de montre), des pipettes de 1 et 5mL et un sèche-cheveux.

4. Protocole Expérimental

a. Préparation de l'éluant :

- Prélever à la pipette graduée 5mL de la solution de chlorure de sodium. Verser dans un bêcher.
- Prélever à la pipette graduée 1mL d'éthanol. Verser également dans le bêcher précédent. Agiter le mélange réalisé.
- Couvrir le bêcher avec un verre de montre.

b. Préparation de la plaque de chromatographie :

- Sur un papier Whatman, tracer au crayon à papier un trait à 1 cm du bas de la feuille, bien parallèle au bord du papier.
- Sur ce trait, placer 5 points régulièrement répartis.
- Parmi les feutres proposés, choisir le marron, le noir et 3 autres couleurs. Déposer soigneusement une petite tache d'encre (1 mm de diamètre suffit largement) sur chacun des points précédents. Sous chaque dépôt, noter au crayon l'initiale de la couleur (exemple : M pour marron).

c. Elution :

- La partie inférieure du papier doit tremper dans la cuve, mais les dépôts doivent être au-dessus de l'éluant.
- Placer le papier ; couvrir et attendre la migration.
- Quand l'éluant est monté jusqu'à environ 1 cm du haut de la feuille, retirer la feuille. Tracer tout de suite le « front » de l'éluant au crayon à papier.
- Sécher sans tarder avec le sèche-cheveux.

5. Exploitation des résultats :

- Avant la chromatographie et au cours de la préparation du solvant, pourquoi faut-il fermer la cuve ?
- Après avoir effectué la chromatographie, le document séché (qui doit être collé sur le compte-rendu) s'appelle un chromatogramme. Quels renseignements peut-on en tirer ?
- Calculer le rapport frontal R_f de chaque constituant en utilisant la relation ci-dessous.
$$R_f = \frac{\text{hauteur } h \text{ atteinte par la tache}}{\text{hauteur } H \text{ parcourue par l'éluant}}$$
- Pourquoi les taches d'encre ne migrent-elles pas toutes de la même façon ?
- Indiquer le nombre et la couleur des constituants mis en évidence dans l'encre du feutre noir. Lequel de ces constituants est le plus soluble dans l'éluant ?
- Dans quels autres feutres retrouve-t-on les constituants du feutre marron?

TP6 : Identification des principes actifs d'un médicament par chromatographie sur couche mince (CCM)

1. Objectifs

- Séparation et identification par la technique de chromatographie sur couche mince *les principes actifs* et *excipients* d'un médicament : l'eugénol, tout en le comparant avec l'huile essentielle issue du TP.
- Interprétation d'un chromatogramme.

2. Principe

La chromatographie permet de séparer les espèces chimiques présentes dans un mélange homogène. Elle est basée sur la différence de solubilité d'une espèce chimique dans deux phases ; la première est dite : phase stationnaire (ou fixe) et la seconde : phase mobile (éluant).⁷

3. Matériel et produits

- Une cuve à chromatographie, du papier filtre, Une plaque CCM, une lampe UV.
- Dichlorométhane, acétate d'éthyle, cyclohexane.

4. CCM de l'eugénol

a. Préparation de la cuve d'éluion

Dans une cuve à chromatographie, introduire le dichlorométhane sur une hauteur de 0,6 à 0,7 cm. Afin de saturer l'atmosphère de la cuve en vapeur d'éluant, mettre un papier filtre imbibé de CH_2Cl_2 verticalement contre la paroi.

b. Préparation des solutions diluées à analyser

Les substances à analyser doivent être diluées afin de faciliter la migration ainsi que la révélation.

Dans deux béchers distincts, prélever environ 1 mL du mélange de solvant constitué de 5 mL de cyclohexane et 1 mL d'acétate d'éthyle.

Ajouter respectivement une goutte d'huile essentielle commerciale (obtenue en pharmacie) et une goutte d'huile essentielle obtenue en TP.

Ces 2 mélanges représentent les solutions à déposer sur la plaque CCM.

c. Dépôt des substances à analyser sur la plaque

Attention : La couche de silice (phase stationnaire) est très fragile.

Sur une plaque CCM, tracer un léger trait au crayon parallèle au bord de cette plaque et à une distance d'environ 1 cm. Les dépôts seront effectués sur cette ligne.

Afin de repérer les positions des dépôts, marquer au crayon 2 croix sur cette ligne, puis réaliser les dépôts.

d. Elution :

Placer délicatement la plaque CCM dans la cuve et surveiller la montée de l'éluant. Une fois que ce dernier atteint environ 1 cm du bord supérieur, retirer la plaque et repérer le front de l'éluant à l'aide d'un crayon. Sécher à l'air libre.

e. Révélation (sous UV ou par réaction chimique) :

Sous la lampe UV :

Mettre le chromatogramme sous UV puis cerchez les taches qui apparaîtront.

Par suite d'une réaction chimique

A l'aide d'une pince, placer la plaque CCM avec la couche de silice en dessous sur une solution de permanganate de potassium KMnO_4 , pour que toute sa surface soit imprégnée et ceci sur le fond d'un cristallisateur. La plaque doit être aussitôt retirée et égouttée verticalement sur du papier absorbant.

Les composés oxydés par le KMnO_4 se manifestent en taches de teinte jaune ou blanche sur un fond rose. Ces taches doivent être marquées dès qu'elles apparaissent avec le crayon.

Remarque :

Certaines substances peuvent ne pas être visibles sous UV. Dans ce cas, utilisez une méthode chimique de révélation (ex. permanganate de potassium ...).

5. CCM du Paracétamol et de l'Aspirine

a. Éluant : acétate d'éthyle/éther diméthylique dans le rapport 80/20 en volumes.

b. Solvant : eau tiède.

c. Mode opératoire :

- Préparer les échantillons :

- (1) : Aspirine (BEKER®) (tableau 3) ; dans l'eau tiède.
- (2) : Aspirine synthétisé (TP Galénique) dans l'eau tiède.
- (3) : Doliprane® (tableau 3) ; dans l'eau tiède.
- (4) : Paracétamol synthétisé (TP Galénique) dans l'eau tiède.

- Déposer les échantillons sur la plaque
- Réaliser l'élution.
- Sécher à l'aide d'un sèche-cheveux.
- Révéler sous une lumière ultraviolette de longueur d'onde $\lambda = 254 \text{ nm}$.
- Entourer légèrement les taches au moyen d'un trait de crayon à papier.
- Conclure la nature des principes actifs présents dans le médicament.

Tableau 3. Composition des médicaments à analyser

Doliprane® (par comprimé) <u>Principes actifs</u> Paracétamol 500 mg <u>Excipients</u> *Lactose *Amidon de blé *Amidon pré-gélatinisé Talc *Carboxyméthylamidon sodique *Stéarate de magnésium	Aspirine (BEKER®) (par comprimé) <u>Principes actifs</u> Acide acétylsalicylique 500 mg <u>Excipients</u> *Cellulose microcristalline *Silice colloïdale anhydre *Laurylsulfate de sodium *Acide stéarique *Croscarmellose sodique
--	---

6. Exploitation des résultats

- a. Reproduire les chromatogrammes obtenus.
- b. Chaque tâche est caractérisée par le rapport frontal R_f . Interpréter les chromatogrammes sachant que les R_f de l'acétyl-eugénol et de l'eugénol valent approximativement 0,7 et 0,3 ; respectueusement.
- c. Pourquoi faut-il faire une révélation pour la CCM ?
- d. De quoi dépend le R_f d'un constituant. Quand est-t-il pour sa concentration ?
- e. Quelle est la valeur du R_f d'une espèce insoluble dans l'éluant choisi ?
- f. La chromatographie est-elle capable de séparer des espèces qui sont à la fois très solubles dans l'éluant et n'ont aucune affinité pour la phase fixe ? Que vaut, dans ce cas ; leur rapport frontal R_f ?

TP7 : Séparation des constituants d'un colorant alimentaire par chromatographie sur colonne

1. Objectif

Identification des constituants du colorant alimentaire vert., par une chromatographie sur colonne,

2. La chromatographie sur colonne

La chromatographie sur colonne (figure 4), est une chromatographie d'adsorption.⁸ Cette adsorption implique l'établissement de liaisons entre les molécules d'un composé et celles du matériau adsorbant.⁹

La phase stationnaire est un matériau solide, généralement de type silice ou alumine occupant une colonne.¹⁰ On place l'échantillon au sommet de la colonne. L'écoulement continu de la phase mobile (éluant), assure la séparation des espèces chimiques.

La séparation des constituants est basée sur les différences de vitesses d'entraînement des substances constituant l'échantillon, vers le bas de la colonne. ¹¹ Cependant, ces vitesses sont fonction de la capacité de la phase stationnaire à adsorber l'espèce et la solubilité de cette espèce dans l'éluant.

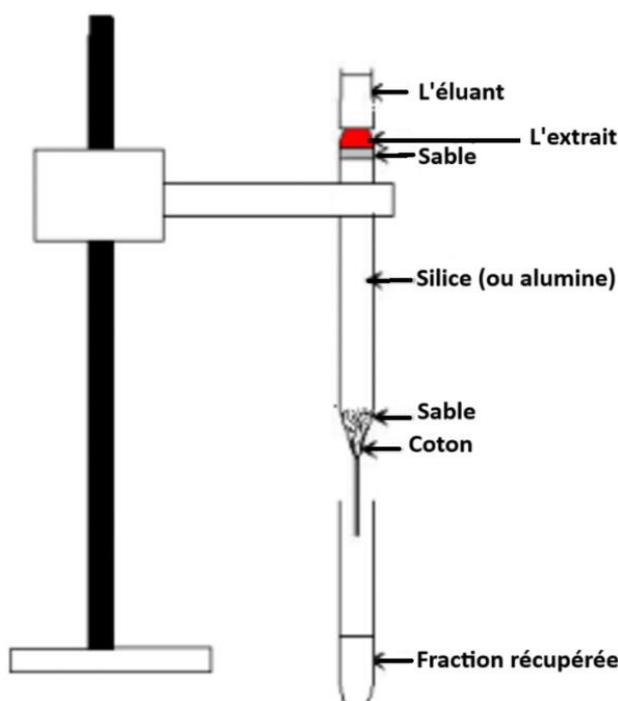


Figure 4. Montage de la chromatographie sur colonne

Voici un aperçu des éléments mentionnés sur la figure 5 et leur rôle dans la colonne :

a. Coton

- Le coton est souvent utilisé pour boucher le bas de la colonne et empêcher la fuite des solides (comme la silice ou le sable).
- Il sert de barrière physique qui permet de maintenir le reste du matériel en place tout en laissant passer les solvants et les composés.

b. Sable

- Une fine couche de sable est placée au-dessus du coton pour assurer une répartition uniforme du lit de silice.
- Cela garantit que la phase stationnaire reste bien plane, ce qui favorise une bonne séparation des composés.

c. Silice

- La silice (SiO_2) est la phase stationnaire utilisée pour retenir les composés à séparer.
- Elle est polaire et interagit avec les molécules en fonction de leur polarité. Les composés polaires restent plus longtemps dans la colonne, tandis que les composés apolaires s'éluent plus rapidement.

3. Protocole expérimental

Expériences préliminaires : choix des éluants

Pour séparer le mélange des deux colorants, on doit d'abord trouver un premier éluant qui n'entraîne que l'un des constituants puis un autre qui entraînera le second colorant.

On réalise une chromatographie sur couche mince CCM du colorant vert en utilisant la même phase stationnaire que pour la chromatographie sur colonne : la silice.

On effectue la CCM avec comme éluant : l'eau, puis une autre avec l'éthanol absolu comme éluant. Ensuite, on note les observations à partir des chromatogrammes ; qui serviront à choisir le bon éluant.

4. Préparation de la colonne

- Une pipette *Pasteur* peut servir de colonne.
- L'efficacité de la séparation dépend du bon remplissage de la colonne.
- A l'aide d'une pince, fixer délicatement la colonne en position verticale.
- Introduire un petit morceau de coton dans l'étranglement de la partie inférieure.
- Ajouter 4 à 5 mm de sable fin en se servant d'un entonnoir. Veillez de garder un niveau bien horizontal.
- Incorporer 5 à 6 cm de silice, à l'aide de la spatule et de l'entonnoir.
- Mettre environ 4mm de sable au-dessus de la poudre de silice.

- Ajouter de l'eau jusqu'au niveau du sable supérieur tout en tapotant. Il ne faut pas qu'il y ait de bulles d'air ou de zones sans phase stationnaire.

5. Dépôt de l'échantillon à séparer

Déposer délicatement quelques gouttes d'une solution aqueuse du colorant vert en se servant soit d'une pipette ou d'une pipette de pasteur, tout en veillant à ne pas déformer la surface de la phase stationnaire. Ajouter aussitôt de l'eau avant que la colonne ne se dessèche.

6. Alimentation de la colonne en éluant

- Remplir régulièrement la colonne en éluant jusqu'au niveau du sable ;
- Dans un petit tube placé sous la colonne, recueillir le premier colorant ;
- Lorsque tout le premier colorant a été recueilli et devient non visible dans la colonne, changer d'éluant par l'emploi de l'éthanol tout en veillant à conserver la colonne imbibée de cet éluant ;
- Mettre un autre tube sous la colonne pour recueillir le second colorant.

7. Exploitation des résultats

- a. Réaliser un schéma de la manipulation.
- b. Pourquoi ajoute-t-on du coton ?
- c. Pourquoi on ne devrait pas avoir de bulles d'air ?
- d. Quelles sont les teintes des solutions recueillies, donner le nom de chaque colorant qui les constitue.
- e. Le second colorant est-il plus soluble dans l'eau ou dans l'éthanol ?

RÉFÉRENCES

1. FERNANDEZ X., CHEMAT F., DO T. Les huiles essentielles: vertus et applications: Vuibert; 2014.
2. DANTHU P., PENOT E., RANOARISON K. M., RAKOTONDRAVELO J. C., MICHEL-DOUNIAS I., MICHELS T. et al. Le giroflier à Madagascar: une «success story»... à l'avenir incertain, 2014: 35.
3. TAZI S., RAISSOUNI I., CHAOUKAT F., BOUCHTA D., DAHDOUH A., ELKHAMLICHI R. et al. L'effet Inhibiteur d'Eugénol sur la corrosion du Laiton dans NaCl 3%(The Inhibition effect of Brass corrosion in NaCl 3% by Eugenol), 2016: 7: 1642-1652.
4. LAMENDIN H., TOSCANO G., REQUIRAND P. J. E.-D. Phytothérapie et aromathérapie buccodentaires, 2004: 1: 179-192.
5. BOUGHOUAL A. Synthèse et caractérisation de composés de coordination antimicrobiens: Université de Lyon; Université Abbès Laghrour Khenchela (Algérie); 2018.
6. TAYEB O. K. M. Techniques d'analyse.
7. RODI P. A. K., YOUSSEF P. R., LE S. MEMOIRE DE.
8. FARGUES C. Chromatographie des protéines appliquée à la purification de la pénicilline acylase: Modélisation de la colonne d'adsorption sur un gel d'hydroxyapatite: Institut National Polytechnique de Lorraine; 1993.
9. ZEGGAI S., KHERCHOUCHE L. Etude de l'adsorption d'un colorant textile en solutions aqueuses sur un charbon actif, 2018.
10. BLONDEAU J. Manipulations de chimie: CAPES Agrégation: L'indispensable des techniques de laboratoire, 2017.
11. MERMAT N. Etude de nouvelles phases stationnaires à base de molécules présentant une activité biologique par chromatographie; 2020.