

## TP n° 01 : Détermination de la composition en sucres d'un jus de fruit par Chromatographie sur couche mince (CCM)

### 1. Introduction :

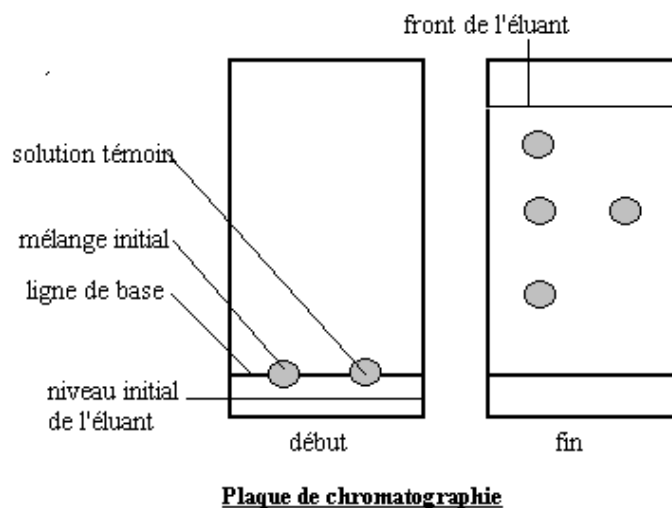
La chromatographie sur couche mince (CCM) est **une technique d'analyse qualitative**. Elle a pour but de **séparer** les produits d'un mélange et permet **d'identifier** un composé, de **vérifier sa pureté** ou de **suivre l'avancement d'une réaction** en analysant des prélèvements successifs du milieu réactionnel afin de mettre en évidence l'apparition de produits et/ou la disparition de réactifs.

### 2. Objectif du TP :

Détermination de la composition en sucres d'un jus de fruit par Chromatographie sur couche mince (CCM).

### 3. Principe de la technique :

- Considérons un mélange de composés que l'on souhaite séparer. Lors d'une CCM, le mélange est déposé sur un solide poreux adsorbant appelé **phase stationnaire** qui recouvre une plaque rigide inerte. La partie inférieure de cette plaque est mise en contact avec un solvant appelé **phase mobile** qui monte par **capillarité** : on parle **d'élution** et la phase mobile est appelée **éluant**.



- Lors de l'élution, les différents composés du mélange migrent plus ou moins haut sur la plaque du fait de la compétition entre trois phénomènes :
  - L'adsorption des composés sur la phase stationnaire ;
  - La solubilisation des composés dans l'éluant ;
  - L'adsorption de l'éluant sur la phase stationnaire (qui remplace les composés adsorbés sur la phase stationnaire et les « pousse » alors vers le haut).

Ces trois phénomènes sont gouvernés par des **interactions faibles** de **type interactions de Van der Waals** et **liaisons hydrogène**. Pour optimiser la séparation entre les trois acteurs (**composé, adsorbant, éluant**), il faut prendre en compte :

- leur **polarité** (fonction de différents paramètres tels que le moment di-polaire, la permittivité diélectrique...);
- leur **proticité** (aptitude à établir des liaisons hydrogène).

- **Phase stationnaire (adsorbant) :**

Elle est le plus souvent constituée de **silice SiO<sub>2</sub>**, déposée sur un support rigide en verre, en aluminium ou en plastique. Chaque grain de silice présente en surface des groupements **Silanols Si-OH** : c'est donc un matériau **polaire** et **protique**.

**N.B :** La silice a un caractère acide gênant si les échantillons à analyser sont dégradables en milieu acide. On peut lui substituer d'autres phases stationnaires polaires et protiques telle que **l'alumine Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**. Celle-ci peut être traitée de façon à avoir un caractère acide, neutre ou basique que l'on choisira en fonction des composés à analyser.

- **Phase mobile (éluant) :**

Un éluant est caractérisé par sa **polarité** et sa **proticité**. Il n'est pas toujours aisé de comparer la polarité des éluants entre eux.

**N.B :** L'**éluant** est souvent un **mélange de solvants**, afin de **pouvoir aisément moduler sa polarité** par simple **changement de proportions**.

#### 4.1. Réactifs utilisés :

- Système solvant (V /V) : Butanol, Acétone, Eau (5/4 /1) : 20 mL.
- Réactif de Molisch (0.25g  $\alpha$ -naphtol + 50ml Ethanol + 50ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 20%).
- Hcl 2N : 5mL
- Jus de fruit.
- Glucose : 1g.
- Fructose : 1g.
- Saccharose : 1g.
- Eau distillée : 2 L.

#### 4.2. Matériel :

- Plaque CCM. - 3 Bêcher de 50ml.
- 4 Cuve CCM ou 4 Bêcher de 100ml. - 5 Fiole jaugée de 50ml.
- Micropipette ou Capillaires pour faire les dépôts. - Entonnoir.

- Plaque chauffante + barreau aimanté. - Sèche-cheveux.
- Balance Analytique + Spatule + Capsule de pesée. - Etuve à 100°C.

## 5. Mode opératoire :

### 5.1. Préparation de l'éluant et de la cuve chromatographique :

-On utilise un système **solvant** contenant (V /V) : Butanol, Acétone, Eau (5/4 /1).

-Verser l'éluant dans **la cuve CCM** ou un bêcher sur une hauteur de **5 à 8 mm**.

-Recouvrir la cuve ou le bêcher avec une plaque ou verre de montre pour que l'air qu'elle contient soit saturée des vapeurs de l'éluant.

### 5.2. Préparation de la plaque CCM :

-On trace **la ligne de départ** et **les points de dépôts** à environ **1cm du bord inférieur** de la plaque.

### 5.3. Préparation de l'échantillon :

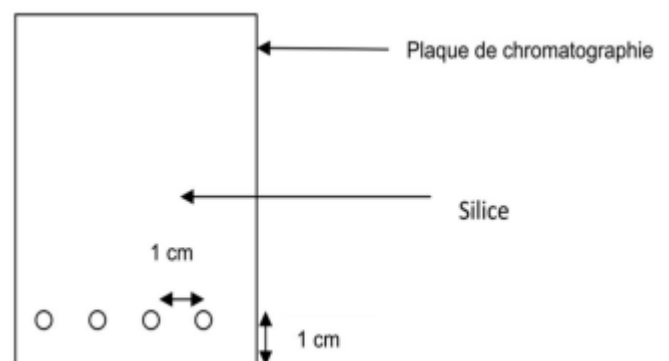
- On prend 10ml de **jus de fruit** dans une fiole jaugée de 50ml et on complète jusqu'au trait de jauge avec de **l'eau distillée**, pour obtenir un jus de **fruit dilué**.
- Du jus de fruit dilué on prélève 10ml auquel on ajoute **5ml d'HCl 2N**, et on chauffe le tout à **température légère** pendant **20 minutes** dans un bêcher de 50ml. Pour obtenir du **jus de fruit hydrolysé**.

### 5.4. Préparation des solutions des étalons :

- Les **solutions des étalons** (**glucose, fructose et saccharose**) sont préparées à raison de **2,5 g/1**.
- Préparer ces solutions par dissolution de ces sucres dans de l'eau distillée dans des fioles jaugées de 50ml.

### 5.5. Dépôts des étalons et échantillons :

- A l'aide d'une **micropipette** ou **tubes capillaires**, déposer une très petite goutte de chaque solution préparée des étalons (**saccharose, glucose et fructose**) ainsi que du liquide à analyser (**jus de fruit dilué et jus de fruit hydrolysé**) sur la plaque CCM en suivant le schéma ci-contre.



Dépôt des étalons et échantillons

**ATTENTION :** Les tâches obtenues doivent avoir un **diamètre** de l'ordre de **3mm**. Il faut tenir la plaque par les bords pour ne pas endommager la silice déposée sur la plaque.

- Sécher puis recommencer l'opération pour les concentrer, (bien superposer les tâches) : **faire ainsi 3 dépôts successifs en séchant entre chaque dépôt.**

### 5.6. Développement du chromatogramme :

- Placer la plaque de silice dans la cuve ou le bûcher en position verticale, fermer et **laisser migrer l'éluant.**

**N.B :** On ne déplacera pas la cuve pendant la migration de l'éluant.

- Retirer la plaque quand l'éluant est à environ **1 cm du bord supérieur** de la plaque.

### 5.7. Révélation :

- **Les solutés étant incolores**, il faut les faire apparaître par une réaction chimique. On utilise pour cela le **réactif de Molisch**, qui donne une **coloration violette** après réaction avec les glucides.
- Sortir la plaque, matérialiser au crayon de papier la ligne de front du solvant.
- **Sécher la plaque**, éventuellement à l'aide d'un sèche-cheveux.
- Sous la **hotte aspirante**, immerger la plaque dans le réactif de Molisch, sécher, et placer la plaque à **l'étuve à 100°C** pendant quelques minutes.

**N.B :** On peut aussi déterminer les taches sous lampe UV.

### 6. Résultats : Exploitation du chromatogramme

- Calculer le rapport frontal  $R_F$  de chaque sucre, c'est-à-dire le rapport de la distance parcourue par le sucre (repérée au centre de la tâche) sur la distance parcourue par le front du solvant. « Ce  $R_F$  est une constante pour chaque sucre dans les conditions de cette chromatographie ».
- Par comparaison, identifier et déterminer la composition en sucre du jus de fruit.

**$R_f = \text{distance parcourue par la substance (au centre de la tache)} / \text{distance parcourue par le solvant.}$**