

Travaux Pratiques Génie Biochimique



CUMILA

Dr. AISSOUS Imane

Centre Universitaire
Abdelhafid Boussouf Mila

Institut des sciences de la
nature et de la vie

Département des
Biotechnologie

Email : *aissous.i@centre-
univ-mila.dz*

Année universitaire 2023-
2024

1.0
Mars 2024

Table des matières

I - Thème 2 : Identification des constituants d'un mélange d'acides aminés par la chromatographie sur couche mince	3
1. Objectifs spécifiques	3
2. Introduction	3
3. Principe	4
4. Matériels utilisés	4
5. Mode opératoire	6
5.1. Préparation de la plaque	6
5.2. Préparation de la cuve	6
5.3. Éluion	6
5.4. Révélation	6
6. Calcule du Rapport Frontal	7

I Thème 2 : Identification des constituants d'un mélange d'acides aminés par la chromatographie sur couche mince

1. Objectifs spécifiques

A l'issu de ce chapitre, l'apprenant sera capable de :

- **Identifier** les principes de base de la chromatographie sur couche mince (CCM).
- **Appliquer** le principe de la CCM pour séparer les composés présents dans un mélange d'acides aminés inconnu.
- **Analyser** les résultats obtenus pour identifier la composition spécifique du mélange fourni.

2. Introduction

Définition

La chromatographie est une technique de séparation des constituants d'un mélange, basée sur leurs affinités respectives pour une phase stationnaire et une phase mobile.

La chromatographie sur couche mince est l'une des chromatographies les plus faciles à mettre en œuvre. Elle est utilisée en général dans un but analytique et qualitatif.

Complément

Dans la chromatographie sur couche mince **la phase stationnaire** est représentée par **une couche de gel de silice** étalée sur une plaque de verre, d'aluminium ou un autre support.

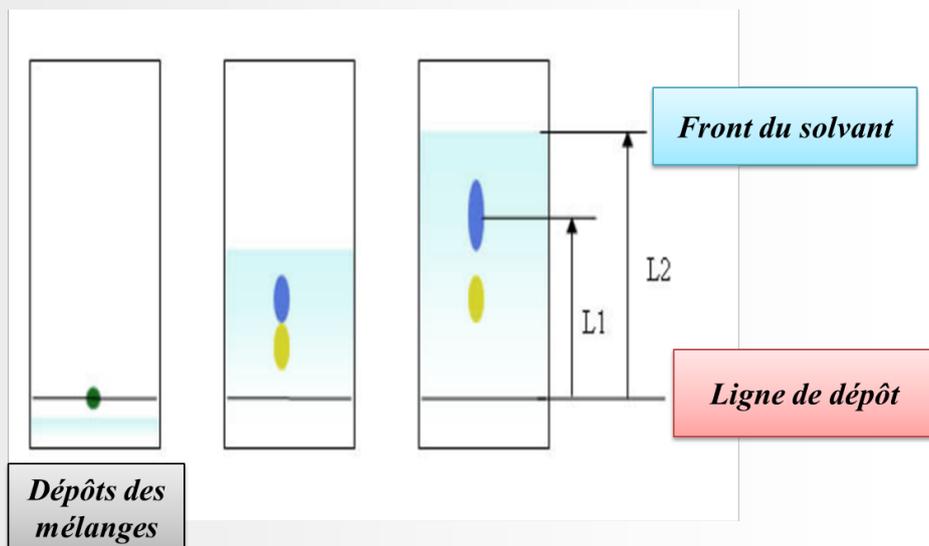
La phase mobile est représentée par **un solvant** ou un mélange de plusieurs solvants de polarité différente et de constituants variable.

3. Principe

💡 Fondamental

Après le contact avec la phase stationnaire, **la phase mobile** permet **la migration** de l'échantillon le long de la plaque de silice par capillarité (**en entraînant** avec elle **les substances** préalablement **déposées sur la phase stationnaire**).

Suite à des phénomènes de désorption et d'adsorption, les molécules vont être **séparées** selon leur **affinité** (solubilité) pour les deux phases.



Principe de la CCM.

4. Matériels utilisés

Pour la réalisation de cette technique on a besoin de :

- Solutions d'acides aminés (2%) : Glycine, Alanine, Tyrosine, Proline, Serine, et le mélange X.
- Micro-pipette de 10 μ L.
- Plaque CCM.
- Cuve à chromatographie.
- Solution de révélation (la ninhydrine) à préparer juste avant l'utilisation, pulvérisateur.
- Crayon, règle et un sèche-cheveux.
- Éluant (phase mobile).

Butanol	50%
Acide acétique	40%
Eau	10%

Tableau 2 : la composition de la phase mobile (Éluant).

5. Mode opératoire

5.1. Préparation de la plaque

Méthode

- A l'aide d'une règle, tracez une ligne horizontale à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque CCM.
- Laissez un espace de 1 cm à gauche et à droite de la plaque puis mettez des points- repères espacés de 1 cm sur la ligne horizontale.
- A l'aide d'une micro-pipette, mettez des gouttes (de chaque solution) les plus petites possibles aux points- repères (moins de 3 mm).
- Sécher immédiatement avec un sèche-cheveux à chaque dépôt.
- Répétez 3 fois en séchant à chaque fois.

Attention

Ne pas toucher la face blanche avec les doigts et éviter d'appuyer sur le crayon et la règle.

5.2. Préparation de la cuve

Méthode

Il est important de remplir la cuve avec 130 mL de l'éluant afin de saturer l'atmosphère.

Attention

Ces solvants doivent être manipulés sous la hotte.

5.3. Éluion

Méthode

- Mettez la plaque en position verticale dans la cuve.
- Laissez migrer jusqu'à ce que le front de migration arrive à 1 cm du bord supérieur de la plaque.

Remarque

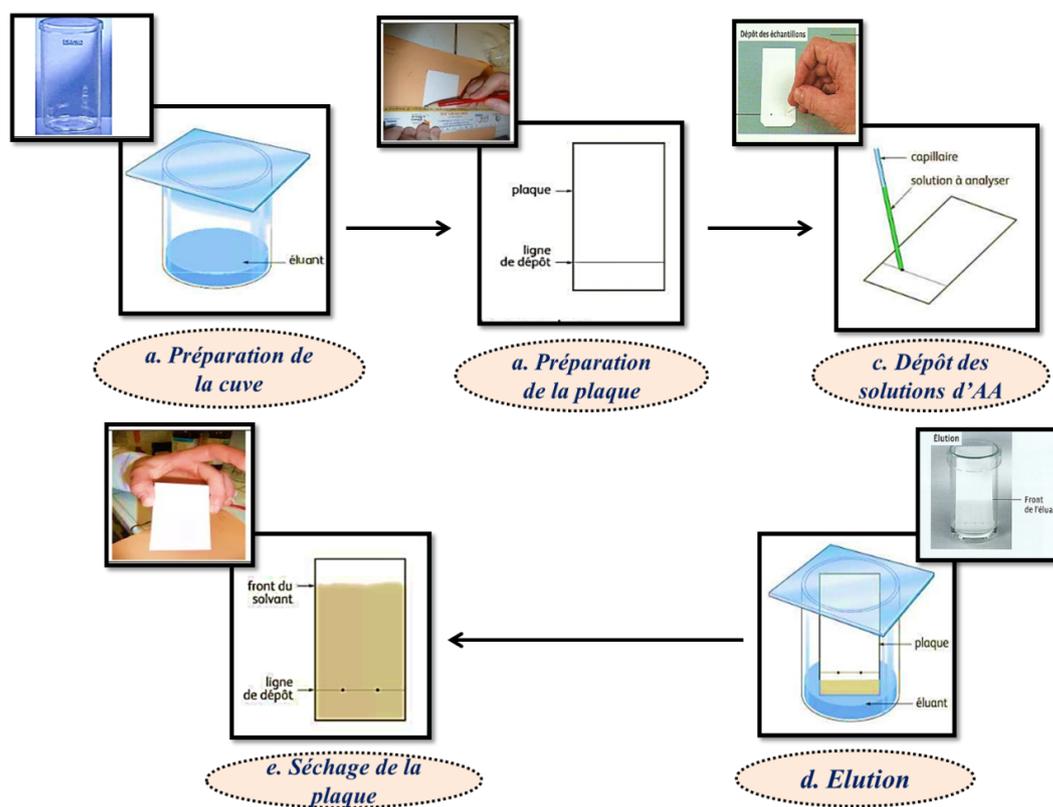
La ligne de dépôt ne doit pas toucher l'éluant.

5.4. Révélation

Méthode

- Sortez la plaque, tracez au crayon le front de migration puis séchez à l'aide d'un sèche- cheveux.
- Préparer la solution de révélation.
- Pulvérisez votre plaque par la solution révélatrice.
- Séchez à l'aide d'un sèche-cheveux et entourez les spots révélés (colorés) au crayon.

Cette étape s'effectue sous la hotte ventilée.



Présentation schématique de la CCM des acides aminés.

Remarque

Les plaques préalablement traitées avec **une substance fluorescente**, peuvent être révélées sous **une lampe d'ultraviolets**. Dans ce cas toute la plaque va réagir aux **UV** sauf au niveau des taches.

6. Calcule du Rapport Frontal

Définition

Le rapport frontal étant le rapport entre la distance parcourue par **le soluté (d)**, divisé par la distance parcourue par **le front du solvant (D)**. Ce paramètre, nous informera sur la bonne séparation des composés.

Le RF est calculé selon la formule suivante :

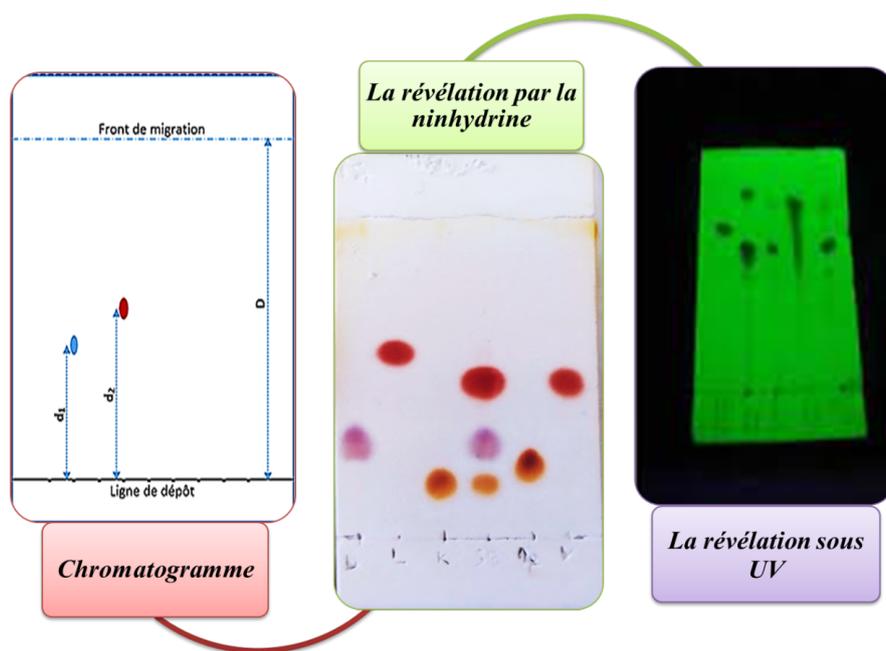
$$RF = \frac{d}{D}$$

Méthode

- A l'aide d'une règle mesurer la distance parcourue par le front du solvant (D) et la distance parcourue par chacune des molécules séparées (d).
- Calculer le RF de chaque molécule. Il est possible d'identifier une molécule en comparant son RF avec celui d'un témoin.
- Déterminer la composition du mélange fourni.

Remarque

Une photo du chromatogramme doit être incluse dans le rapport.



Résultats attendus.

Conseil

Consulter la vidéo sur le site: https://www.youtube.com/watch?v=ySeWHW1d79k*