

Centre Universitaire Abd-Elhafid BOUSSOUF, Mila

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Master 1 Biotechnologie Végétale

TP n° 3. Réaliser une Chromatographie sur Couche Mince (CCM).

But de TP :

- Extraction de la chlorophylle brute d'une feuille d'épinard.
- Connaître et comprendre le principe de la C.C.M.
- Réaliser une CCM (Séparation des pigments constitutifs).
- Déterminer la composition en pigments des feuilles d'épinards par CCM.

Introduction

La CCM est une technique qui repose sur la différence d'affinité des substances à analyser vis à vis d'une phase stationnaire et d'une phase mobile.

- **La phase stationnaire** est constituée d'alumine ou de silice étalée en couche mince sur une plaque d'aluminium. Ces solides ont des propriétés adsorbantes : ils forment des interactions de Van der Waals et parfois des liaisons hydrogène avec les molécules éluées.
- **La phase mobile** est un solvant ou un mélange de solvants appelée éluant.

Lorsque l'échantillon a été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent par capillarité à une vitesse qui dépend des interactions qu'elles créent avec la phase mobile et la phase stationnaire. Chaque constituant migre d'une certaine hauteur, caractéristique de la substance, que l'on appelle rapport frontal ou rétention frontale (R_f).

$$R_f = h/H$$

1. Matériel et Réactifs

1.1. Matériel

- Plaques CCM, Cuves CCM, Capillaires pour faire les dépôts, mortier + pilon, Entonnoirs, des ciseaux, Epruvette de 100ml, papier filtre, Béchers, Sèche-cheveux, Crayon et Règle, chambre noire.
-

1.2. Réactifs et produits utilisés

- Système solvant (V /V) : Ether de pétrole/Ether diéthylique (40/60) : 100 ml, Les feuilles d'épinard, 1 pincée de sable mince, chloroforme et dichlorométhane.

2. Mode opératoire

➤ Préparation de l'éluant et de la cuve chromatographique

- On utilise un système solvant contenant (V /V) : 40 ml d'éther de pétrole, 60 ml d'éther diéthylique, pour 100 ml de la phase mobile.

- Verser l'éluant dans la cuve CCM sur une hauteur de 2cm.

- Recouvrir la cuve pour que l'air qu'elle contient soit saturé des vapeurs de l'éluant.

➤ Préparation de la plaque CCM

- On trace la ligne de départ et les points de dépôts à environ 1.5cm du bord inférieur de la plaque.

➤ Extraction de la chlorophylle brute

- Couper finement les feuilles des épinards (saines et propres), dans un mortier contenant une pincée de sable pour écraser les cellules et quelques ml de chloroforme et de dichlorométhane, jusqu'à obtention d'un liquide vert dense.

- Broyer à l'aide du pilon jusqu'à l'obtention d'un liquide vert dense.

- Filtrer le liquide obtenu, on récupère une solution alcoolique de chlorophylle brute.

- Évaporer le solvant à l'évaporateur rotatif, on obtient une pâte verte foncée.

- Dissoudre la pâte verte obtenue dans quelques ml de **chloroforme**.

➤ Chromatographie de la solution de chlorophylle brute

- A l'aide des tubes capillaires, déposer une très petite goutte de solution alcoolique de pigments sur la plaque CCM. La tache finale ne doit pas excéder un diamètre de 5 mm.

- Sécher puis recommencer l'opération pour les concentrer, (bien superposer les tâches) : faire ainsi 8 dépôts successifs en séchant entre chaque dépôt à l'aide d'un sèche-cheveux.

- On Place la plaque de silice dans la cuve en position verticale, on ferme et on laisse migrer l'éluant (20 min de temps de migration).

- 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.

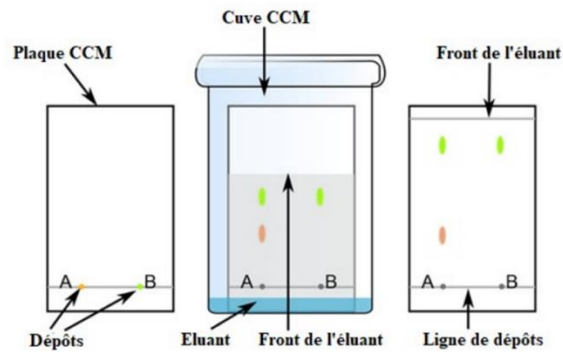


Figure 01. Schéma d'une CCM.

➤ Résultats : Exploitation du chromatogramme

- Après la séparation, les étudiants vont calculer le rapport frontal R_f de chaque pigment, par comparaison avec ceux des standards issus de la littérature, identifier et déterminer la composition en pigment des feuilles d'épinards.

Tableau 1. Rapport frontal de quelques pigments chlorophylliens.

Pigment	Valeur du R_f	Couleur
Carotène	0.89-0.98	Jaune
Phéophytine a	0.42-0.49	Gris
Phéophytine b	0.33-0.40	Marron
Chlorophylle a	0.24-0.30	Bleu vert
Chlorophylle b	0.20-0.26	Vert
Xanthophylles	0.04-0.28	Jaune