

TP 5: Chromatographie analytique sur couche mince des acides aminés.

1. But de l'expérience

Identifier les acides aminés contenus dans un mélange par la méthode de chromatographie sur couche mince.

2. Principe

La chromatographie sur couche mince est la plus simple des méthodes chromatographiques. Elle consiste à placer sur une feuille (papier, silice, cellulose...) une tache et de la laisser éluer en la trempant dans un solvant ou un mélange de solvant (appelé **éluant**), l'éluant diffuse le long du support. La tache migre sur la feuille plus ou moins vite selon la nature des interactions qu'elle subit de la part du support et de l'éluant.

3. Préparation des solutions :

- a) L'éluant (solvant) : est un mélange de solvants organiques constitué de (N-butanol (50%), d'acide acétique glacial (20%), et l'eau distillée (30%). à préparer 24 h à l'avance sous la hotte.
- b) Pour les solutions d'acides aminés: étalons (Alanine – Phénylalanine – Sérine) et mélange (Alanine + Sérine): dessouder 6 mg d'acide aminé dans 1 mL d'eau distillée.
- c) la solution de ninhydrine à préparer obligatoirement sous la hotte on dissout 0,2 mg de ninhydrine dans 100 mL d'acétone. La mettre en flacon opaque ou mieux dans un vaporisateur opaque.

4. Réalisation d'une CCM

La CCM se déroule en trois étapes : préparation de la cuve, préparation de la plaque, et élution.

4.1. Préparation de la cuve

Une cuve de chromatographie se compose de la cuve et d'un couvercle. Le couvercle sert d'une part à éviter l'évaporation du solvant mais surtout à réaliser la CCM en atmosphère saturée (pression de vapeur saturante du solvant), de façon à avoir des valeurs reproductibles.

L'éluant (solvant) : est un mélange de solvants organiques (N-butanol (50%), d'acide acétique glacial (20%), et l'eau distillée (30%). à préparer 24 h à l'avance sous la hotte.

La cuve à chromatographie est préparée 24 h à l'avance avec 1 cm de solvant au fond.

2.2. Préparation de la plaque

- a) Découper une bande de plaque de silice d'environ 10 cm de large.
- b) Tracer au crayon un trait à 2 cm du bas de la plaque.
- c) Sur ce trait tracer 4 petits points à 2 cm de distance où seront déposées les taches.
- d) Déposer à l'aide d'une micropipette les acides aminés sur chaque point ainsi le mélange.

Attention :

- ✓ les gouttes doivent être les plus petites possibles.
- ✓ ne jamais toucher la plaque avec les doigts, surtout lors de la CCM d'acides aminés, mettre de gants.

Remarque : si la solution est trop diluée, mettre plusieurs gouttes au même point en laissant sécher entre chaque goutte.

4.3. Elution

- a) Placer la plaque dans la cuve. fermer et laisser l'éluant diffuser.
- b) Arrêter la CCM lorsque le front d'éluant est arrivé à 1 cm du haut de la plaque (cette opération prend environ 30 min, mais dépend du support et de l'éluant).
- c) Sortir la plaque et tracer au crayon le front de l'éluant.
- d) Sécher la plaque.

5. Révélation

Certains composés sont colorés: il n'est pas nécessaire de les révéler. La plupart sont incolores. Parmi les méthodes utilisées pour révéler les plaques :

5.1. Révélation UV :

Placer la plaque sous une lampe UV et entourer les taches colorées.

5.3. Révélation par atomisation

Cette technique utilise un atomiseur contenant le révélateur en solution. On utilise la ninhydrine pour la révélation des **acides aminés**.

La ninhydrine réagit avec les acides aminés en donnant le pourpre de Ruhemann ce qui permet de donner de la couleur et donc d'observer les acides aminés.

Réaction acide aminé et ninhydrine :

Précaution. Lorsque l'on pulvérise le révélateur sur la plaque, se placer à 20 cm de la plaque et éviter toute formation de gouttelettes. Le révélateur doit-être appliqué en plusieurs pulvérisations.

6. Calculs et interprétation

La position finale de la tache (ou spot) est caractéristique de la molécule. On lui attribue une valeur, le R_f (**R**apport frontal). Ce R_f est le rapport de la distance parcourue par le composé (la tache) sur la distance parcourue par l'éluant.