

Module de T.A.P.M.I**TP N° 2 : Séparation et identification des acides aminés par chromatographie sur couche mince.**

1. But du TP : Le but de ce TP est d'apprendre à réaliser une chromatographie sur couche mince, de séparer et d'identifier les acides aminés d'un échantillon inconnu.

2. Principe : La chromatographie sur couche mince (CCM) repose principalement sur des phénomènes d'adsorption : la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille semi-rigide de matière plastique ou d'aluminium. Après que l'échantillon ait été déposé sur la phase stationnaire, les substances migrent à une vitesse qui dépend de leur nature et de celle du solvant. Elle dépend d'une part, des forces électrostatiques retenant le composant sur la phase stationnaire et, d'autre part, de sa solubilité dans la phase mobile. Cette vitesse peut s'exprimer par le calcul du rapport (R_f) :

$$R_f = d/D$$

Ou : **d** : distance parcourue par le composé ;

D : distance parcourue par le front du solvant.

3. Matériel et méthodes**Réactifs utilisés**

- **Phase mobiles :** butanol, acide acétique, eau (4/1/5, V/V/V).
- **Révélateur :** ninhydrine à 1% dans l'acétone dans un pulvérisateur.
- **Echantillon à analyser :** jus d'orange ou mélange d'acides aminés.
- **Solution à 2g/l des acides aminés :** tyr, lys ; ala, glycine, proline, comme acides aminés de références (étalon).

Matériel : plaque CCM, cuve à chromatographie, hotte, four à 80° pour la révélation, micropipettes ou capillaire et sèche cheveux.

Mode opératoire

1. Phase mobile dans la cuve sur une hauteur de 1cm, fermer hermétiquement et laisser saturer pendant 15min.

2. Tirer un trait de crayon sur la cellulose de la plaque à 1cm du bord et parallèlement à lui sans arracher le matériau et sans les toucher avec les doigts.

3. Déposer une microgoutte de chaque échantillon sur le trait à 1cm du bord de la plaque en laissant 1cm entre les dépôts. Faire le dépôt rapidement et sans appuyer de façon à ce que la tache formée n'excède pas 2mm de diamètre. Prendre soin de ne pas arracher la cellulose avec le capillaire. Sécher les taches à l'aide d'un sèche-cheveux.

4. Placer la plaque dans la cuve à chromatographie contenant la phase mobile. Le solvant ne doit pas atteindre la ligne de dépôt.
5. Laisser le développement se poursuivre jusqu'au trait tracé en haut de la plaque.
6. Sortir la plaque avec des pinces et la sécher avec un sèche-cheveux (air froid).
7. Révélation.

Mettre des gants et un masque pour la révélation et manipuler les plaques à la pince. Pas de flamme (acétone). La ninhydrine est cancérogène : prendre les précautions d'usage.

Sous hotte, pulvériser le révélateur (la ninhydrine) rapidement, sur toute la surface de la plaque puis laisser évaporer l'essentiel du solvant sous la hotte. Finir au sèche-cheveux chauffant (ou placer à l'étuve à 80°C et surveiller pour ne pas « cuire » les plaques) jusqu'à apparition des tâches.

4. Résultats et interprétations

- Observer, cercler les taches (les spots de couleur violette) et pointer leur centre.
- Calculer les R_f des échantillons déposés.
- Identifier les acides du mélange.