Département des Sciences de l’Environnement et Sciences Agroomiques

2ieme année Ingéniorat Agronomie

Module de Biochimie

**TP N° 1 : Chromatographie sur couche mince (CCM) des acides aminés**

**Objectifs:**

* 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.

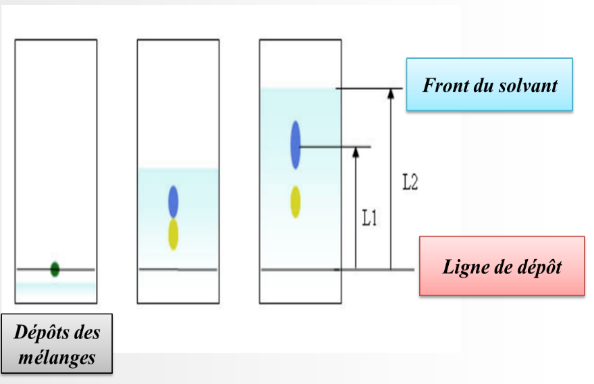
**Introduction:**

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 CCM est l'une des chromatographies les plus faciles à mettre en œuvre. Elle est utilisée en général dans un but analytique et qualitatif.

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 variables

**Principe:**

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.

**Matériel 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 μL.
* Plaque CCM préalablement désactivée dans l’étuve.
* Cuve à chromatographie.
* Solution de révélation, la ninhydrine, préparée dans l’acétone (1%) .
* Pulvérisateur, crayon, règle et un sèche-cheveux.
* Éluant (phase mobile) en composition suivante:

**Mode opératoire:**

**Préparation de la plaque**

* A l'aide d'une règle, tracez une ligne horizontale(ligne de dépôt) 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.

**Préparation de la cuve**

Il est important de remplir la cuve avec un volume important de l'éluant afin de saturer l'atmosphère et éviter l’effet de bord. Ces solvants doivent être manipulés sous la hotte.

**Élution**

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

**Révélation**

* Retirer la plaque de la cuve chromatographique, 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

**Calculs:**

* 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.