

Chromatographie sur papier et électrophorèse d'acides α -aminés

par Odile DURUPHY,

Lycée Dumont-d'Urville, Toulon

André DURUPHY,

Lycée Jean-Perrin, Marseille

et Michèle DUBUSC,

Université de Provence, Marseille.

Les jus de la plupart des fruits contiennent des acides aminés libres et des protéines. Ces substances peuvent être séparées par chromatographie sur papier ou par électrophorèse, la séparation étant ensuite mise en évidence par révélation à la ninhydrine.

Ces deux techniques de séparation peuvent être présentées au lycée en classe de terminales D, à l'aide d'un matériel simple et de produits peu coûteux.

CHROMATOGRAPHIE

Cette technique de séparation est basée sur la différence des coefficients de partage des divers acides aminés et protéines entre deux solvants : l'un aqueux (à un pH choisi en fonction des pH_i (*) des acides aminés à séparer), l'autre organique (alcool, céto...).

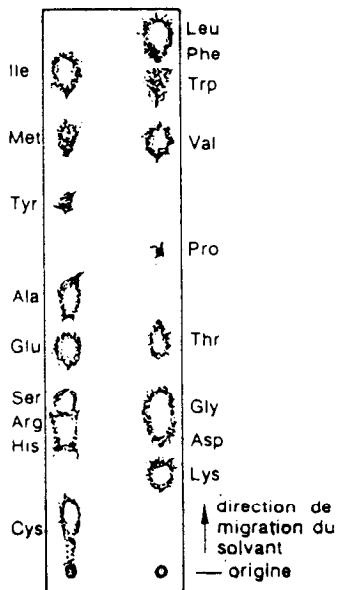
Un très grand nombre d'extractions successives se font entre l'eau, phase fixe, retenue dans les pores du papier et la phase organique mobile qui migre par capillarité.

Les acides aminés à résidus polaires (Cys, Lys, His, Asp, Arg, Ser, Glu, Thr...) ou à petits résidus non polaires (Gly, Ala, Pro)

(*) *N.D.L.R.* — pH du point isoélectrique égal à $1/2.(pK_{a1} + pK_{a2})$ où pK_{a1} et pK_{a2} sont les pK_a des couples (AH_2^+, AH^\pm) et (AH^\pm, A^-) mis en jeu par l'acide aminé. A ce pH, la concentration du zwitterion AH^\pm est maximale.

Voir *chimie fondamentale. Etudes biologiques et médicales. I. Echanges d'énergie et équilibres.* J.-C. CHOTTARD, J.-C. DEPEZAY, J.-P. LE-ROUX. Hermann, p. 94-104.

plus solubles dans l'eau migrent peu, les autres, plus solubles dans les solvants moins polaires, sont plus facilement entraînés (fig. 1).



solvant :
 { butanol-1 (40 cm³)
 { acide éthanoïque (10 cm³)
 { eau (50 cm³)

Fig. 1

MANIPULATION.

Etude des acides α -aminés suivants :

- A acide aspartique (10^{-2} mol.l⁻¹ dans le mélange 90 % eau, 10 % propanol-2),
- B leucine (10^{-2} mol.l⁻¹ dans le mélange 90 % eau, 10 % propanol-2),
- C lysine (10^{-2} mol.l⁻¹ dans le mélange 90 % eau, 10 % propanol-2),
- D mélange équimolaire des 3 acides aminés ci-dessus,
- E jus d'orange filtré,
- F jus de citron filtré,
- G jus de tomate filtré.

Préparation des solvants :

solvant acide : 25 cm³ butanol-1 + 10 cm³ acide éthanoïque
+ 15 cm³ eau,

solvant basique : 20 cm³ propanol-2 + 10 cm³ NH₃ à 2 %
(1,2 N).

Préparation des « cuves » :

Dans un pot haut (type Nescafé), verser la moitié du solvant acide ; bien refermer. Dans 2 boîtes de Pétri, verser un fond de solvant acide dans l'une, basique dans l'autre ; replacer les couvercles. Dans quelques tubes à essais, verser environ 1 cm³ de solvant acide ou basique, les boucher.

Préparation des chromatogrammes :

Utiliser des gants pour éviter les traces d'acides α -aminés des doigts.

1) Papier rectangulaire pour pot haut (papier filtre ou Wattman), tracer au crayon, à 2 cm du bord inférieur (longueur), une ligne de base ; y repérer 7 points équidistants, les deux extrêmes au moins à 1,5 cm des bords. Sur ces points, placer dans l'ordre, à l'aide d'un effilé, une petite tache ($\varnothing \approx 5$ à 6 mm) des solutions A à G. Rouler le papier en cylindre ; le maintenir en forme à l'aide de papier collant ou d'agrafes mais sans que les bords ne se chevauchent.

Placer ce cylindre dans le pot (fig. 2) (ligne de base en bas) en veillant à ce qu'il ne touche pas les parois. Refermer et laisser migrer.

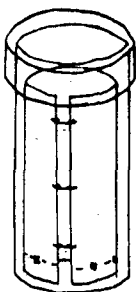
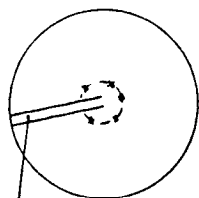


Fig. 2

2) Papiers filtre ronds pour boîtes de Pétri : : découper une languette et tracer au crayon un cercle de 2 cm de diamètre centré sur l'origine de la mèche. Y repérer 5 points comme indiqué fig. 3 a. Sur ces points, placer à l'effilé des taches ($\varnothing < 5$ mm)

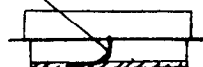
de 5 solutions au choix parmi les solutions A à G. Replier la languette sur elle-même pour lui donner une épaisseur double et placer le cercle sur la boîte de Pétri en faisant tremper la languette. Replacer le couvercle et laisser migrer (fig. 3 b).

Fig. 3 a



languette

Fig. 3 b



Révélation :

Quand le front du solvant est arrivé à 1 cm du haut (ou du bord de la boîte de Pétri selon le dispositif de la fig. 3 b), sortir avec des gants le chromatographe, repérer le front du solvant par un trait de crayon. Sécher à l'air froid (sèche-cheveux froid). Pulvériser le révélateur (ninhydrine à 2 g.l^{-1} dans la propanone) sur toute la surface du chromatogramme, puis le placer 5 minutes à l'étuve à 80°C ou au-dessus d'une plaque chauffante : les taches violettes qui apparaissent localisent les acides α -aminés. Les identifier.

Nota. — Ces chromatogrammes se conservent mal : les taches s'estompent progressivement en 4 à 5 mois.

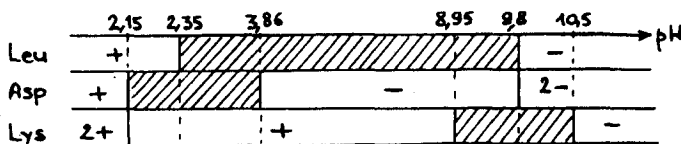
ELECTROPHORESE

Sous l'effet d'un champ électrique, les ions migrent ; leur sens de migration dépend du signe de leur charge ; la vitesse de déplacement dépend de leur mobilité et d'éventuelles interactions avec un support ou des parois.

La séparation par électrophorèse consiste à placer dans un champ électrique le mélange à séparer, à un pH tel, que les charges des divers constituants soient, le plus possible, différentes.

Exemple : mélange leucine, acide aspartique, lysine (le signe et la valeur des charges portées sont indiqués pour chaque

domaine de pH). Les zones hachurées correspondent au domaine de prépondérance des espèces neutres (zwitterions). Une telle zone est limitée par les pK_{a_1} et pK_{a_2} de l'acide aminé considéré.



Dans la zone de $4 < \text{pH} < 8$, l'électrophorèse d'un mélange placé initialement au centre d'une bande d'électrophorèse conduit à la séparation :

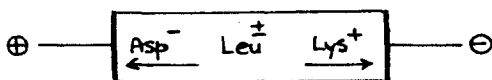


Fig. 4

MANIPULATION.

Solutions :

— tampon pH 6,1 :

$$\left\{ \begin{array}{l} 50 \text{ cm}^3 \text{ d'hydrogénophthalate de potassium } \text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4 \\ 0,2 \text{ mol.l}^{-1} \\ 92,8 \text{ cm}^3 \text{ d'hydroxyde de sodium } \text{NaOH} \text{ } 0,1 \text{ mol.l}^{-1} \\ \text{eau q.s.p. } 200 \text{ cm}^3 \end{array} \right.$$

ou :

$$\left\{ \begin{array}{l} 15 \text{ cm}^3 \text{ d'hydrogénophosphate de sodium } \text{Na}_2\text{HPO}_4 \\ 1/15 \text{ mol.l}^{-1} \\ 85 \text{ cm}^3 \text{ de dihydrogénophosphate de potassium } \\ \text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ } 1/15 \text{ mol.l}^{-1} ; \end{array} \right.$$

— acides aminés de référence (cf. chromatographie) ;

— jus de fruits :

filtrats de jus de citron, d'orange, de tomate.

Montage :

Dans une grande cuve munie d'un couvercle (ou sous un grand cristallisoir), placer deux béciers contenant des hauteurs égales de solution tampon ; y plonger deux électrodes de graphite neuves que l'on reliera à un générateur de courant continu permettant de délivrer une tension d'environ 100 V. Entre les béciers, un support maintenant une tige en verre à l'horizontale à envi-

ron 6 cm de hauteur, permettra de suspendre en forme de V renversé des bandes de papier en pont entre les béchers.

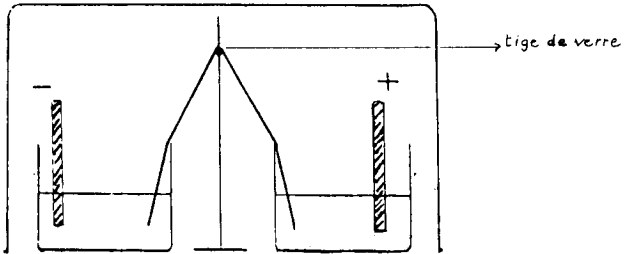


Fig. 5

Préparation des électrophorégrammes :

En manipulant si possible avec des gants, découper des bandes de papier Wattman de 15 cm de long par 1 à 2 cm de large ; les plonger dans la solution tampon pH 6,1 ; les égoutter sur papier filtre. Au centre de chaque bande, déposer une mince ligne de la solution à étudier.

Electrophorèse :

Suspendre les bandes entre les béchers (3 ou 4 bandes peuvent être suspendues en parallèle mais il faut alors veiller à ce que leurs bords ne se chevauchent pas). Appliquer une tension d'environ 100 V pendant au moins 2 heures (l'intensité est alors d'environ 2 mA). Veiller à ce que les bandes ne sèchent pas (effet Joule) ; au besoin, on pourra les réhumidifier par pulvérisation avec la solution tampon.

Révélation :

Egoutter et sécher les bandes puis les révéler à la ninhydrine (cf. chromatographie).

CONCLUSION.

Ces deux expériences sont, bien sûr, trop imprécises pour permettre l'identification des composants des jus de fruits étudiés. Elles ne prétendent que présenter aux élèves des méthodes de séparation qui, dans des conditions plus sérieuses, sont aujourd'hui très performantes : études très précises de sérums sanguins, de protéines animales et végétales...

Remarque : Réaction avec la ninhydrine :

Par chauffage d'un mélange de ninhydrine (en solution dans l'éthanol ou l'acétone) et d'acide α -aminé, il apparaît une coloration pourpre (sauf pour Pro et HPro qui donnent une colora-

tion jaune). Les réactions qui ont lieu sont (sauf pour Pro et HPro) :

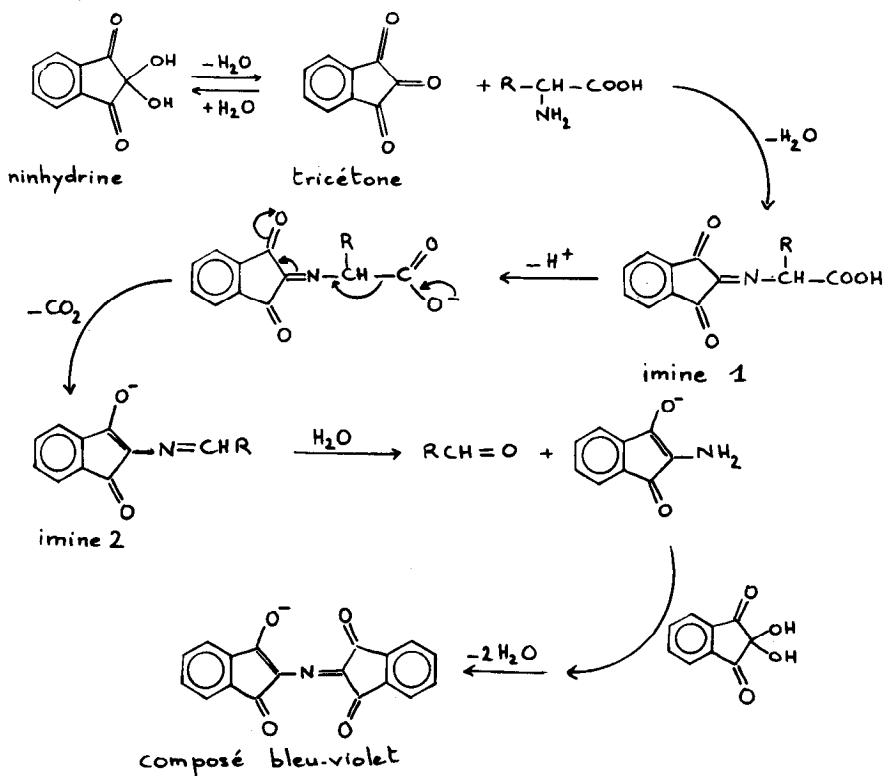


Fig. 6

BIBLIOGRAPHIE

- SMITH et FEINBERG. — *Paper and thin layer chromatography and electrophoresis*. Shandon Scientific Company Ltd 1965.
- *Encyclopédie Universalis*. — Vol. 4 : *Chromatographie* - Vol. 6 : *Electrophorèse*.

Coût de quelques produits (T.T.C.) chez Jeulin :

Acide aspartique	(50 g)	29 F,
Leucine	(25 g)	46 F,
Lysine	(10 g)	56 F,
Ninhydrine	(5 g)	45 F,
Papier Wattman (25 feuilles)		93 F.