Date : ..... Nom : ..... Poste : ..... **1ière STL Biotechnologies**

ETUDE PAR CHROMATOGRAPHIES DE LA COMPOSITION QUALITATIVE EN ACIDES AMINES D'UN MEDICAMENT

DOMAINE : ..... **SUJET : .....**

Le médicament *Sargenor®* est un traitement d'appoint en cas d'asthénie en association avec ces procédures : un temps de sommeil suffisant, une consommation modérée d'alcool, de café et de thé, l'arrêt du tabagisme, la pratique d'un sport, la suppression, lorsque cela est possible, des expositions au stress.
Ce médicament complète l'action de ces mesures indispensables et contient, comme principe actif, de l'arginine et de l'aspartate, deux acides aminés.
Ces nutriments sont censés participer au bon fonctionnement des muscles.

On se propose, à l'aide de deux méthodes chromatographiques, d'étudier la composition qualitative en acides aminés.

1. Séparation des acides aminés par chromatographie sur colonne échangeuse de cations

1.1. Réflexion préliminaire

Question 1 : à l'aide du document 1, proposer une définition du terme chromatographie

Question 2 : utiliser le lien ci-dessous et la fiche technique 1 pour faire un schéma légendé d'une colonne de chromatographie en laissant un espace au-dessous du schéma
Lien : YouTube + Nathan + chromatographie ou https://www.youtube.com/watch?v=Zz9qxXf0nf8&t=97s

Question 3 : exploiter les documents 2 et 3 pour expliquer pourquoi, au pH de la solution de fixation (pH = 4,2), la résine fixe des cations

Question 4 : à l'aide du document 4, compléter ce tableau en indiquant l'état (dissocié ou non) de chaque fonction chimique

Acide aminé		**Acide aspartique**	**Arginine**
Carbone α	Fonction carboxyle		
	Fonction amine		
Chaine latérale	Fonction carboxyle		
	Fonction amine		

Question 5 : indiquer la charge électrique de chaque acide aminé pH 4,2. Identifier en l'expliquant lequel des deux acides aminés va se fixer sur la résine lors de l'étape de fixation

1.2. Effectuer la manipulation selon la fiche technique 2

Visionner cette vidéo : youtube + column chromatography (durée 8 :41) ou
https://www.youtube.com/watch?v=kQ1TxvFDLB8

- Dépôt de l'échantillon : de 3 :35 à 4 :59
- Séparation des molécules de l'échantillon : 5 :02 à 5 :41

Attention : la vidéo présente une chromatographie sur colonne d'un autre type que celle l'AT
Question 6 : compléter le schéma de la question 2

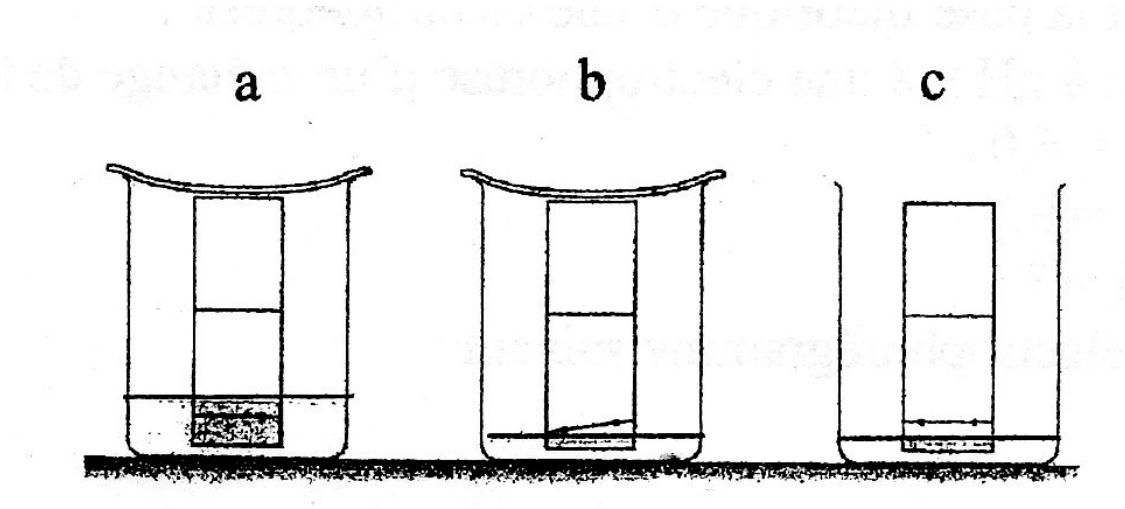
2. Identification des acides aminés séparés par chromatographie sur couche mince

Les tubes collecteurs de la phase de fixation et les tubes collecteurs de la phase de lavage vont être étudiés par la technique de chromatographie d'adsorption sur couche mince.

2.1. Réflexion préliminaire

Question 1 : à l'aide de la fiche technique 3, faire le schéma d'une plaque de chromatographie (à l'échelle 1/1) avec les dépôts suivants :
Etalons : acide aspartique (D) et l'arginine (R)
Essais : tubes L1 à L4

Question 2 : à l'aide de la fiche technique 3, identifier les erreurs effectuées pour chaque chromatographie



Question 3 : à l'aide de la fiche technique 3, identifier la ou les erreurs observées pour chaque chromatographie

Question 4 : aborder la question suivante pour la réalisation de la chromatographie puis pour la révélation des spots.
Utiliser le document 5 pour rechercher un danger éventuel, sa nature, puis une situation exposant au danger lié à la réalisation de la manipulation. Proposer la ou les mesures de prévention adaptées

Question 5 : démontrer, par une équation aux unités, que le Rf n'a pas d'unité

2.2. Effectuer deux chromatographies selon la fiche technique 3

Dépôts de la 1ière chromatographie	Dépôts de la 2ième chromatographie
Etalons : acide aspartique (D) et l'arginine (R) Essais : tubes L1 à L4	Etalons : acide aspartique (D) et l'arginine (R) Essais : tubes E1 à E4

Visionner cette vidéo : youtube + réaliser un CCM + ranssonc (durée 5 :00) ou

https://www.youtube.com/watch?v=gjrnyY1rL-M&t=10s

Etape	Temps
Préparation de la plaque	0 :40 à 1 :05 puis 2 :36 à 2 :48
Dépôts	1 :10 à 1 :50
Migration	2 :48 à 3 :23
Révélation	3 :33 à 3 :42
Exploitation	4 :17 à 4 :48

Attention : la vidéo présente une chromatographie sur couche mince différente de celle de l'AT

3. Exploitation des résultats

3.1. Exploiter les chromatographies sur couche mince du document 6 selon la fiche technique 3 Présenter les résultats sous la forme d'un tableau

3.2. Identifier l'acide aminé présent dans les tubes de lavage et celui présent dans les tubes d'élution

3.3. Expliquer précisément la présence de l'acide aminé situé dans les tubes de lavages

3.4. Conclure sur la composition qualitative du médicament *Sargenor*®

3.5. Nommer les tubes collecteurs sur lesquels une étude quantitative pourra être effectuée lors d'une prochaine séance

Question 6 : faire l'exercice du document 7

FICHE TECHNIQUE 1 : création d'une colonne pour chromatographie d'échange d'ions

Préparation de la résine : compte tenu de sa durée, cette opération sera réalisée à l'avance et par le(la) technicien(ne) de laboratoire

- En fiole d'Erlenmeyer, mélanger (agitateur magnétique et plaque agitatrice) la résine avec une solution d'hydroxyde de sodium de concentration molaire *2* $mol.L^{-1}$
- Laver à l'eau distillée jusqu'à obtention d'un pH égal à 7.
- Traiter la résine par une solution d'acide chlorhydrique de concentration molaire 2 $mol.L^{-1}$
- Laver à l'eau distillée jusqu'à neutralisation.
- Mettre enfin la résine en suspension dans une solution tampon acide éthanoïque - éthanoate de sodium à 0,1 $mol.L^{-1}$, pH 4,2.
- Conserver la résine à 4°C.

Création de la colonne :

- Placer au fond de la colonne de chromatographie (diamètre 1 cm, hauteur 30 cm) un tampon de laine de verre.
- Verser lentement la résine en suspension de manière à obtenir une colonne de 10 cm de hauteur, en évitant la formation de bulles d'air.
- Abaisser le niveau du liquide surnageant jusqu'à ce qu'il affleure à la surface de la résine.

Attention : ne jamais laisser la colonne à sec.

FICHE TECHNIQUE 2 : procédure opératoire

1.Préparation de la solution de *Sargenor*® et des tubes collecteurs de fractions

1.1. Solution de *Sargenor*® *:* dissoudre 1 comprimé dans 1 mL d'eau distillée

1.2. Tubes collecteurs : préparer 8 tubes à essais jaugés à 5 mL et identifiés : L1 à L4 et E1 à E4

2.Chromatographie cationique

2.1. Préparation de la colonne

- Rincer la phase fixe contenue dans la colonne, avec environ 5 mL de tampon pH 4,2.
- Vérifier le pH en sortie de colonne.
- Régler le débit du robinet à environ une goutte toutes les 4 à 5 secondes.
- Laisser couler le tampon jusqu'à ce qu'il affleure la surface du lit de la phase fixe.

2.2. Dépôt de l'échantillon : phase de fixation

- Disposer un tube à essai collecteur (tube à essais) jaugé à 5 mL à la sortie de la colonne.
- Déposer délicatement en surface de la phase fixe 1 mL de solution de *Sargenor*® et laisser pénétrer le liquide dans la résine.
- Aussitôt, verser 3 fois 1 mL de tampon à pH 4,2.
- Commencer à récolter la phase mobile dans le tube collecteur L1.

3.Phase de lavage

- Rincer la colonne avec environ 20 mL de tampon pH 4,2.
- En sortie de colonne, récolter des fractions de 5 mL dans les tubes de lavage notés L1 à L4

4. Phase d'élution

- Faire passer dans la colonne 20 mL de tampon d'élution à pH 12.
- Recueillir l'éluât, en fractions de 5 mL, en sortie de colonne dans des tubes d'éluât notés E1 à E4.

5. Lavage de la colonne

- Rincer la phase fixe avec environ 25 mL de tampon pH 4,2.
- Vérifier le pH en sortie de colonne.
- Rincer la résine à l'eau distillée.

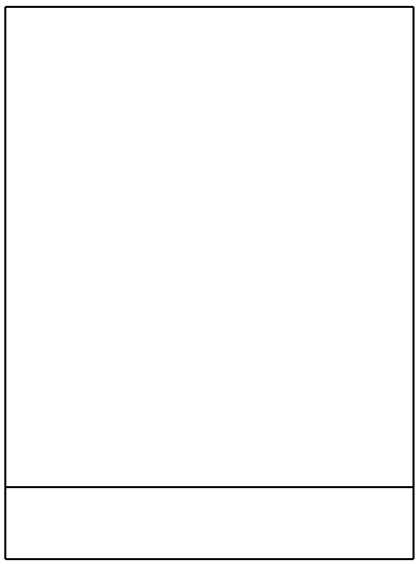
FICHE TECHNIQUE 3 : procédure opératoire de la chromatographie d'adsorption sur couche mince des acides aminés

1. **Préparation de la cuve à chromatographie**

Verser le mélange pour obtenir une hauteur d'environ 1 cm du mélange de solvants. Couvrir la cuve. L'atmosphère de la cuve se sature en vapeurs de solvants

2. **Préparation de la plaque sans toucher sa surface avec les mains : FRAGILE !**
   - Dimensions de la plaque : 120 x 60 mm
   - Emplacement des dépôts :
     - Effet de bord : pour éviter un problème de migration aux bords verticaux de la plaque (*effet de bord*), on débute les dépôts avec une distance de sécurité aux bords droit et gauche. Cette distance est, en général, égale à 5 mm ;
     - Espace entre les dépôts :

$$\textbf{Espace entre les dépôts} = \frac{\textbf{largeur en mm} - (\textbf{2 x distance de sécurité})}{\textbf{nombre de dépôts} - \textbf{1}}$$



N° poste et initiales

Dépôts à la paillasse
- Les dépôts sont réalisés à l'aide de tubes capillaires (1 par solution) ;
- Déposer 2 gouttes en séchant immédiatement avec un sèche-cheveux après chaque goutte ;
- Chaque dépôt sera le plus petit possible (2 mm) : entrainez-vous sur du papier filtre.

Au crayon et sans appuyer : ligne de dépôt à 2 cm du bord inférieur.
Identifier chaque dépôt par son initiale

3. **Migration**

- Placer la plaque dans la cuve sans remuer le mélange de solvants ;
- Laisser migrer jusqu'à ce que le front de migration soit à 1 cm du haut de la plaque : vérifier souvent la migration ;
- Tracer au crayon et à main levée le front de migration du solvant puis sécher le chromatogramme sous hotte ventilée.

4. **Révélation des spots**

Sous hotte ventilée et à environ 20 cm de la plaque, vaporisée le réactif à la ninhydrine.
Les spots sont révélés dans le four à 100°C

5. **Exploitation du chromatogramme**

Chaque spot correspond à une molécule et on l'identifie par comparaison à des solutions étalons.
Pour l'identification, on compare 3 critères : Rf, la forme et la couleur des spots.

Front de référence ou *Rf :* chaque molécule migre d'une certaine hauteur, on calcule son *Rf*

$$Rf = \frac{\textbf{Hauteur parcourue par le spot (entre le centre du spot et la ligne de dépôt))}}{\textbf{Hauteur parcourue par le front du solvant (entre le front et la ligne de dépôt)}}$$

DOCUMENT 1 : introduction à la chromatographie

Etymologiquement, chromatographie signifie l'image en couleur, puisqu'historiquement, les premières méthodes chromatographiques utilisées étaient faites sur support papier et servaient à séparer des mélanges.

Si les produits étaient colorés, le chimiste ne faisait que constater la migration, sinon il utilisait des révélateurs colorés pour constater la migration. De façon générale, une chromatographie utilise une phase stationnaire et une phase mobile.

Le produit qui sera chromatographié sera selon ses affinités soit plutôt attiré par la phase stationnaire (et ne migrera pas), soit par la phase mobile (et migrera). La technique de séparation est donc la conséquence d'un processus complexe d'interactions favorables ou défavorables entre le produit et les deux phases. Selon les techniques, la phase stationnaire sera solide ou fluide, et la phase mobile toujours fluide (liquide ou gaz).

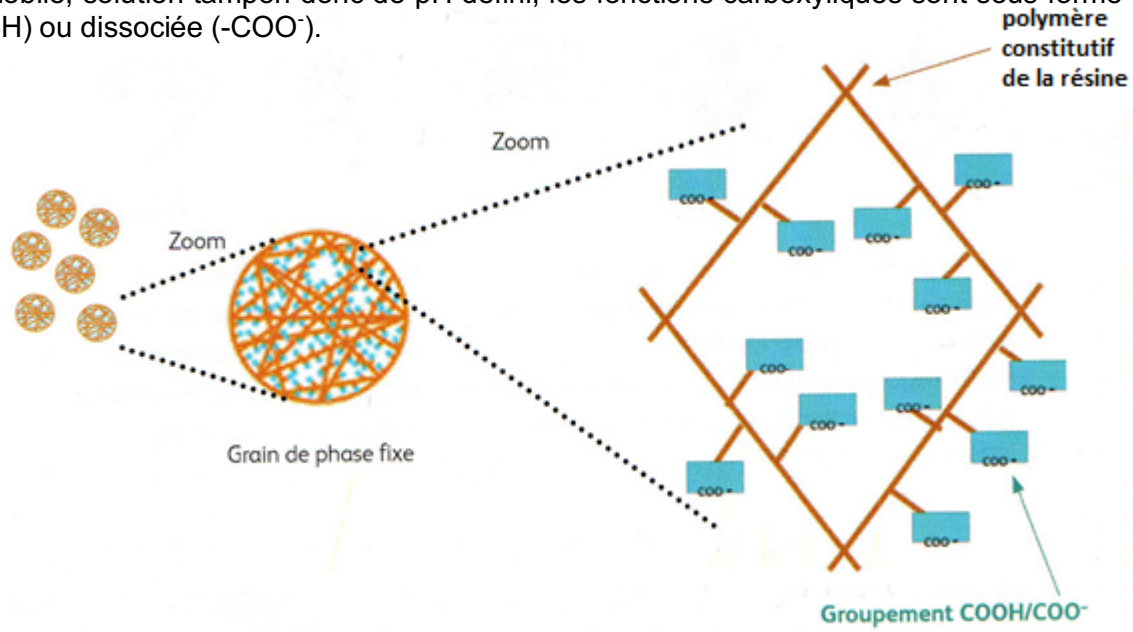
(Extrait du site : ac rouen Galilée chromatographie)

DOCUMENT 2 : principe de la chromatographie d'échange d'ions et détail de la résine cationique

C'est une chromatographie d'adsorption dans laquelle les liaisons mises en jeu entre composés ionisés sont de nature électrostatique. L'adsorbant, insoluble, est une résine pouvant échanger des ions (cations ou anions selon la résine) de façon réversible avec le milieu :

Résine	Cationique	Anionique
Réaction générale	$Re-R^-, Na^+ + C^+ = Re-R^-, C^+ + Na^+$	$Re-R^+, Cl^- + A^- = Re-R^+, A^- + Cl^-$
Exemples de résine	Carboxylique : $Re-COO^-, Na^+$	à gpt amine: $Re-N^+(CH_3)_3, Cl^-$

La résine cationique est capable de fixer réversiblement des cations. La phase fixe, composée de grains de la taille du millimètre, porte des groupes fonctionnels carboxyliques dont le pKa est égal à 2,5. En fonction du pH de la phase mobile, solution tampon donc de pH défini, les fonctions carboxyliques sont sous forme non dissociée (-COOH) ou dissociée ($-COO^-$).

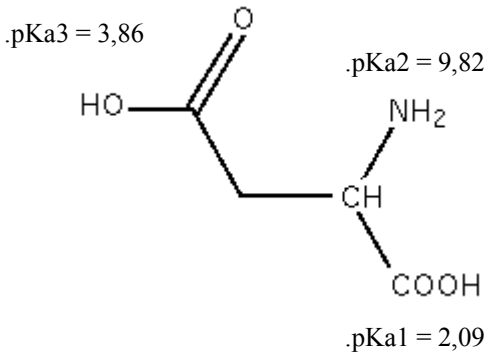


DOCUMENT 3 : évolution de la charge électrique d'une fonction ionisable faible selon pH

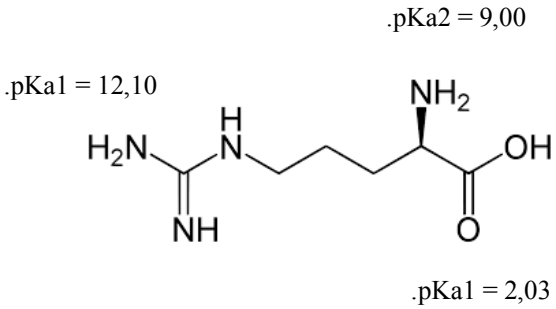
Visionner cette vidéo : youtube + équilibre entre acides et bases (durée 1:12) ou https://www.youtube.com/watch?v=0bdxgf5qZOs

DOCUMENT 4 : les deux acides aminés du médicament *Sargenor*®, leurs pKa et leurs charges électriques

Visionner cette vidéo : youtube + ionisation des acides aminés (durée 2:28) ou
https://www.youtube.com/watch?v=ysRBqGT3uxo

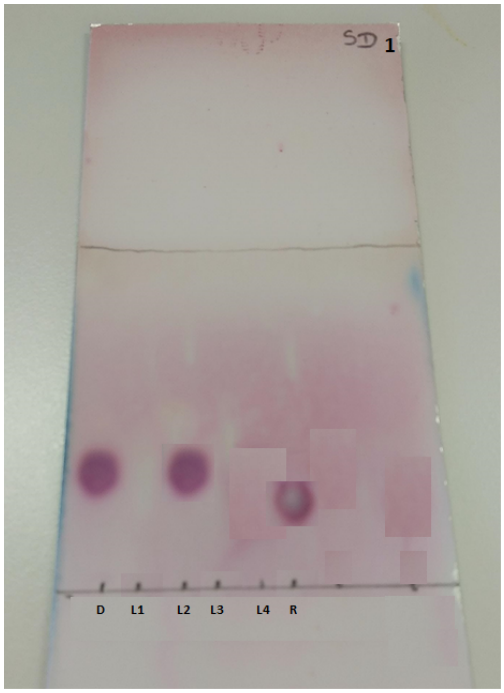


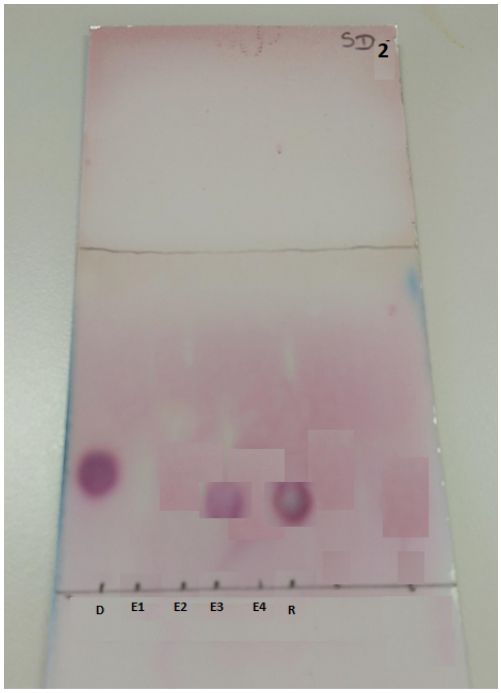
Acide aspartique



Arginine

DOCUMENT 6 : photographies des deux chromatogrammes





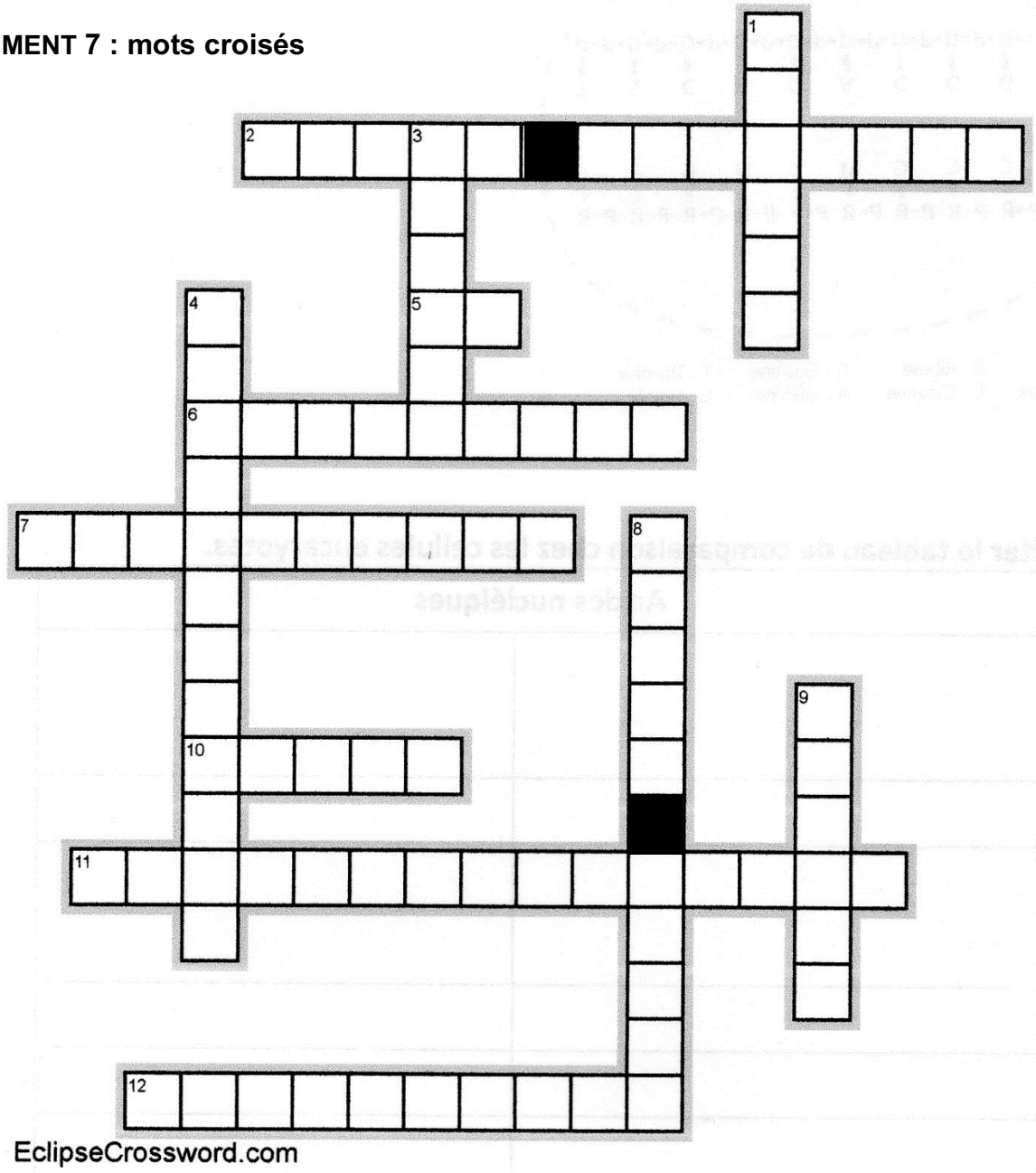
DOCUMENT 5 : données de sécurité des réactifs utilisés

Solutions tampon pH 4,2 et 12
Étiquetage non requis selon le règlement (CE) no 1272/2008 (CLP)

2. Phase mobile
• 500 mL de n-butanol • 300 mL de propanol-2 • 100 mL d'eau distillée   **DANGER** H225 Liquide et vapeurs très inflammables. H318 Provoque des lésions oculaires graves. H335 Peut irriter les voies respiratoires. H336 Peut provoquer somnolence ou vertiges. H302 Nocif en cas d'ingestion.

1. Réactif à la ninhydrine
 DANGER H302 - Nocif en cas d'ingestion H315 - Provoque une irritation cutanée H319 - Provoque une sévère irritation des yeux H335 - Peut irriter les voies respiratoires

DOCUMENT 7 : mots croisés



HORIZONTALEMENT

2. PROTEGE DES VAPEURS NOCIVES
5. MODIFIE L'IONISATION DES ACIDES AMINES
6. RESINE QUI ECHANGE DES ANIONS
7. RESINE QUI ECHANGE DES CATIONS
10. A UNE CHARGE NEGATIVE
11. SUR COLONNE OU SUR PLAQUE
12. REVELE LES ACIDES AMINES

VERTICALEMENT

1. A UNE CHARGE POSITIVE
3. SON PH EST STABLE
4. FIXE
8. AVEC UNE FONCTION AMINE ET UNE FONCTION CARBOXYLE
9. SE DEPLACE