

Travaux pratiques en Biochimie végétale



Table des matières

Objectifs	3
Introduction	4
I - Extraction et séparation des pigments de menthe par chromatographie sur colonne et sur couche mince.	6
1. Objectifs	6
2. Principe	6
3. Mode opératoire	8
3.1. <i>Extraction des pigments</i>	8
3.2. <i>Séparation des pigments par chromatographie sur colonne</i>	8
3.3. <i>Séparation des pigments de menthe par CCM</i>	9
4. Expression des résultats	9
5. Exercice	10
6. Exercice : J'évalue mes acquis	10
7. Exercice	10
Bibliographie	11
Webographie	12

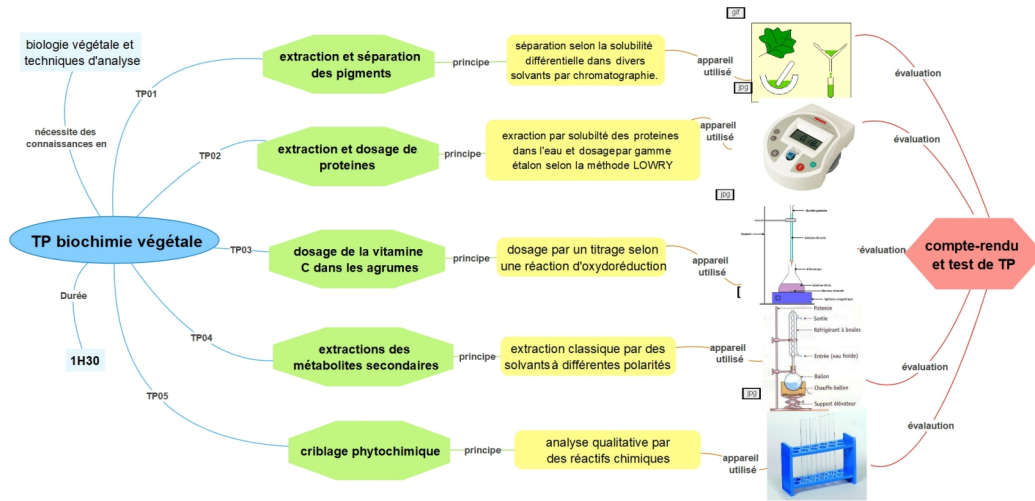
Objectifs

- Extraire les métabolites primaire et secondaire de plantes.
- Analyse qualitative et quantitative des métabolites par différentes techniques.
- Se préparer à la recherche.

Introduction

Les plantes sont caractérisés par leur originalité de synthèse de différentes substances classifiées en métabolites primaires (protéines, lipides, glucides) et secondaires qui appartiennent à des groupes chimiques variés (composés phénoliques, alcaloïdes, terpénoïdes,...) présentant une source de molécules importante pour l'homme. De ce fait, pour exploiter cette source, ça nécessite une étude pratique qui consiste à réaliser des extractions, identifications et quantifications des différents constituants de plantes.





Carte conceptuelle des travaux pratiques en Biochimie végétale.

I Extraction et séparation des pigments de menthe par chromatographie sur colonne et sur couche mince.

1. Objectifs

*Séparer les pigments végétaux.

*Appliquer la chromatographie comme technique de séparation.

2. Principe

Les pigments désignent des substances végétales capables de réfléchir et/ou transmettre la lumière solaire sur les tissus de plantes. Ces dernières contiennent plusieurs types de pigments dont les chlorophylles (a,b,..) et les caroténoïdes (β -carotène, xanthophylles,..) qui diffèrent par leurs structures. Les pigments sont séparés et purifiés selon une méthode basée sur leur solubilité différentielle dans divers solvants par chromatographie.

La chromatographie est une méthode de séparation qui a pour but d'identifier et de quantifier les composés d'un mélange. La chromatographie sur colonne (CC) est une chromatographie d'adsorption qui consiste en la formation des interactions entre les molécules d'un composé et celles de la substance adsorbante. La phase stationnaire est un solide, le plus souvent silice, cellulose, alumine remplissant une colonne au contraire à la chromatographie sur couche mince (CCM) où la phase stationnaire est retenue sur une surface plane recouverte d'une mince couche de silice, cellulose ou d'alumine. [1,2,3*,4]***

⊕ Complément

Le nom commun de certains pigments donne une réflexion sur l'origine de leur découverte par exemple : carotène a été isolé pour la première fois à partir du carotte (*Daucus carota*), anthocyanidins, pelargonidin à partir du géranium (*Pelargonium*).

3. Mode opératoire

3.1. Extraction des pigments

- Placer 15g de feuilles de menthe hachés dans un mortier et les broyés avec un peu de sable et 20 mL d'acétone.
- Filtrer le broyat dans un Erlenmeyer à l'aide d'un coton.
- Récupérer le filtrat dans un bécher.

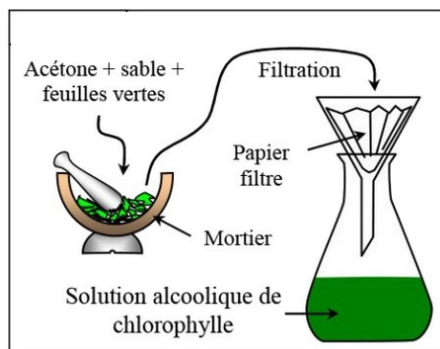


Figure 01 : Extraction des pigments. [5]

Cf. "séparation des pigments"

3.2. Séparation des pigments par chromatographie sur colonne

- La colonne utilisée est une pipette Pasteur équipée d'un coton.
- Remplissez 2/3 de la colonne par la silice (phase stationnaire) à l'aide du papier filtre.
- Versez l'éluant (phase mobile) constitué d'un mélange de 40% d'éther de pétrole/ 60% d'éther diéthylique au-dessus de la colonne à l'aide d'une micropipette jusqu'à son écoulement afin de gélifier la silice.
- Déposez lentement 0,5 mL de l'extrait de menthe au sommet de la colonne.
- Après la diffusion de l'extrait, ajoutez l'éluant et suivez la séparation en récupérant les différentes fractions dans des tubes correspondants aux différentes couleurs.

⚠ Attention

Ne laissez jamais la colonne chromatographique sèche.



3.3. Séparation des pigments de menthe par CCM

- La phase stationnaire est représentée par une couche du gel de silice étalé sur une plaque.
- Tracer une ligne fine à 1cm de l'extrémité inférieure sur laquelle vous marquez les points de dépôts des échantillons par un crayon sans gratter le gel.
- Tracer le front du solvant à 1cm de l'extrémité supérieure de la plaque
- Préparer la cuve chromatographique (un récipient en verre fermer par un couvercle étanche) :
 - Introduire l'éluant constitué d'un mélange de 40% d'éther de pétrole/ 60% d'éther diéthylique (phase mobile) dans la cuve ;
 - Ajuster le niveau à environ 0,5 cm du fond de la cuve et fermer le récipient pour être saturée en vapeur de solvant.
- Déposer soigneusement à l'aide d'un capillaire les fractions récupérés par CC ainsi que l'extrait brut. Les dépôts doivent être concentrés et séchés.
- Déposer la plaque dans la cuve en position verticale et laisser l'élution jusqu'au front du solvant
- Retirer la plaque, entourer les taches pour calculer le rapport frontal (*R_f*).

$R_f = (\text{distance parcourue par la substance} / \text{distance parcourue par le solvant})$

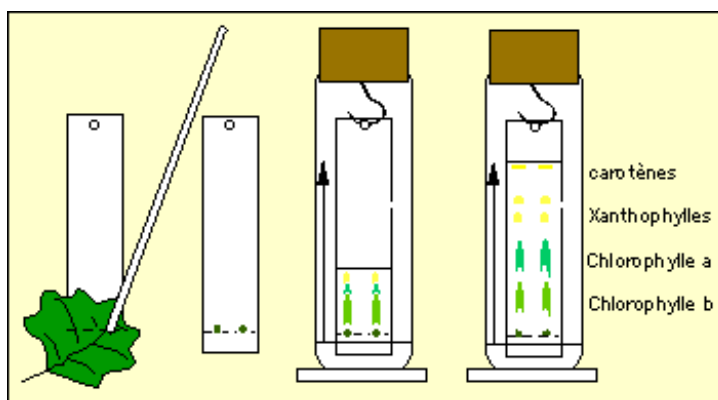


Figure 03 : Séparation des pigments par CCM. [6]

Remarque

Les chromatoplaques doivent être activées à l'étuve avant utilisation.

La cuve doit être hermétiquement fermée et à ne pas déplacer.

Attention

La manipulation des solvants organiques s'effectue sous la hotte car ils sont volatiles et toxiques.

4. Expression des résultats

Réaliser le compte rendu de ce TP incluant:

- introduction

- But et principe du TP
- Matériel et méthodes
- Résultats et interprétations
- Conclusion

5. Exercice

La chromatographie sur colonne (CC) est une chromatographie d'adsorption qui consiste en la formation des interactions entre les molécules d'un composé et celles de la substance adsorbante. La phase stationnaire est un solide, le plus souvent silice, cellulose, alumine remplissant une colonne au contraire à la chromatographie sur couche mince (CCM) où la phase stationnaire est adsorbée sur une surface plane recouverte d'une mince couche de silice, cellulose ou d'adsorbant.

6. Exercice : J'évalue mes acquis

De quoi est constituée la phase stationnaire ?

7. Exercice

Comment calculer le rapport frontal ?

Bibliographie

Duval, D., Lafont, O. (2001). *Le Préparateur En Pharmacie. Dossier 1, Chimie, Biochimie*. France: Tec & Doc Lavoisier.

Schoefs, B. (2004). Determination of pigments in vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 217–226. doi:10.1016/j.chroma.2004.05.105.

Gross, J. (2012). *Pigments in Vegetables: Chlorophylls and Carotenoids*. Royaume-Uni: Springer US.

Davies K., *Plant Pigments and Their Manipulation*. (2009). *Annual Plant Reviews*, Allemagne: Wiley.

Olson, B. J. S. C., & Markwell, J. (2007). Assays for Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Protein Science*, 3.4.1–3.4.29. doi:10.1002/0471140864.ps0304s48

Mendham, J., Toullec, J. (2005). *Analyse chimique quantitative de Vogel*. Belgique: De Boeck Supérieur.

Le Grand Oral du Bac en sciences: Pistes de réflexion en Mathématiques - NSI - Physique-chimie - SVT. (2023). (n.p.): ELLIPSES.

Webographie

<https://www.alloschool.com/element/132257>

<https://fsm.rnu.tn/useruploads/cours/ulpcsm/biologie/module1/simuler/chapitre2/photosynt/2extract-det.htm>