



Faculté de médecine d'Alger
Département de médecine dentaire
Année universitaire 2022/2023



Les acides aminés

partie 3

Dr Rachid.N
Cours de 1 ère année médecine dentaire

MÉTHODES D'ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS

Méthodes chromatographiques

Chromographie sur Papier

Chromographie sur Couche Mince

Chromatographie sur colonne

Chromatographie en phase gazeuse

Chromatographie échangeuse d'ion

Chromatographie en phase liquide haute performance (HPLC)

Méthodes électrophorétiques

1. Méthodes chromatographiques

Définition :

La chromatographie est une méthode d'analyse physico-chimique fondée sur **la séparation des constituants d'un mélange.**

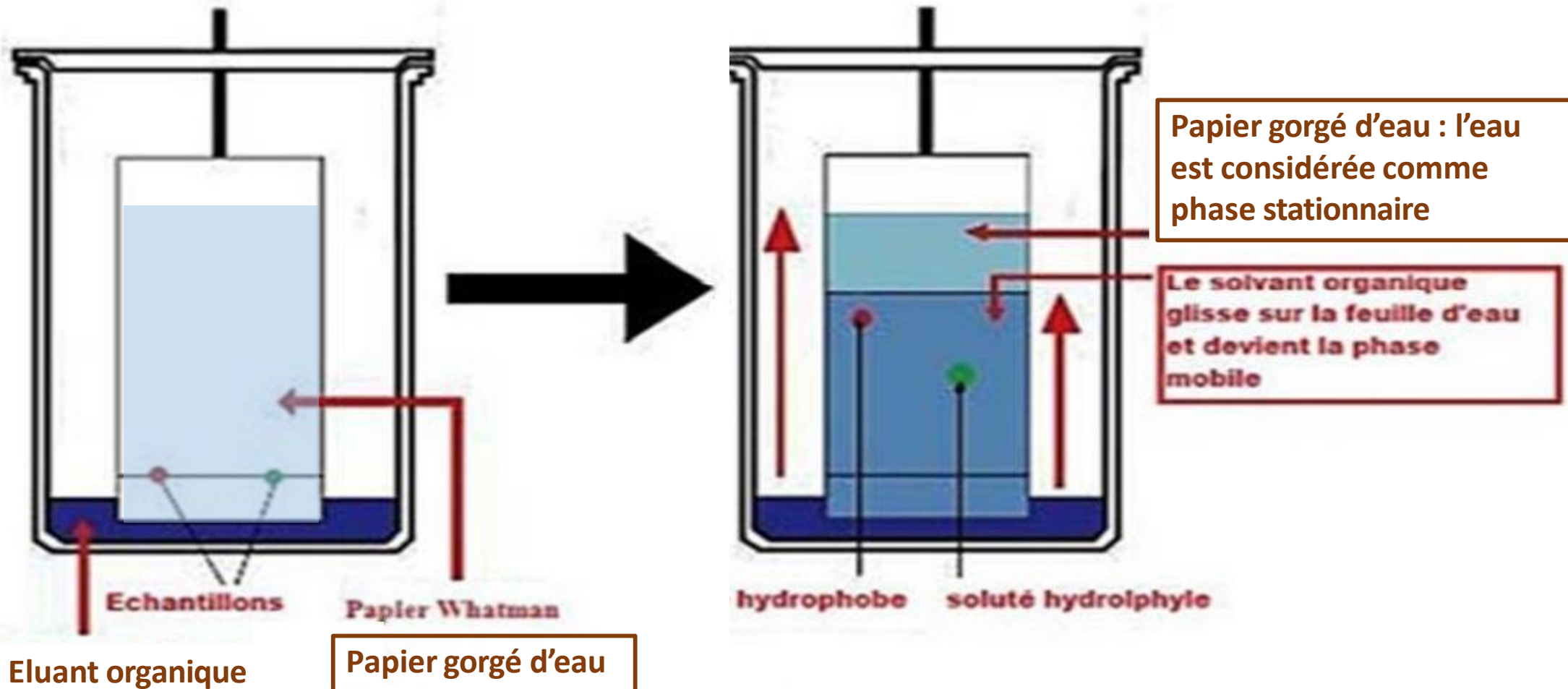
Les molécules à séparer sont entraînées par un fluide (liquide au gaz) que l'on appelle la **phase mobile**, à travers un support fixe (solide ou liquide stationnaire) que l'on appelle **phase stationnaire.**

il y'a donc une distribution des composants entre ces deux phases, et les molécules sont entraînées à **des vitesses différentes provoquant leur séparation.**

MÉTHODES D'ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS

1. Méthodes chromatographiques

Chromatographie sur papier



MÉTHODES D'ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS

1. Méthodes chromatographiques

Chromatographie sur papier

Partage entre «phase stationnaire hydrophile» et « phase mobile hydrophobe ».

- Migration par capillarité: Les Aa hydrophobes migrent le plus.
- Coloration par la ninhydrine
- L'identification des différents Aa du mélange se fait par comparaison avec des témoins, en calculant le R_f (rapport au front) de chaque soluté, ou le R_t (rapport à un témoin).

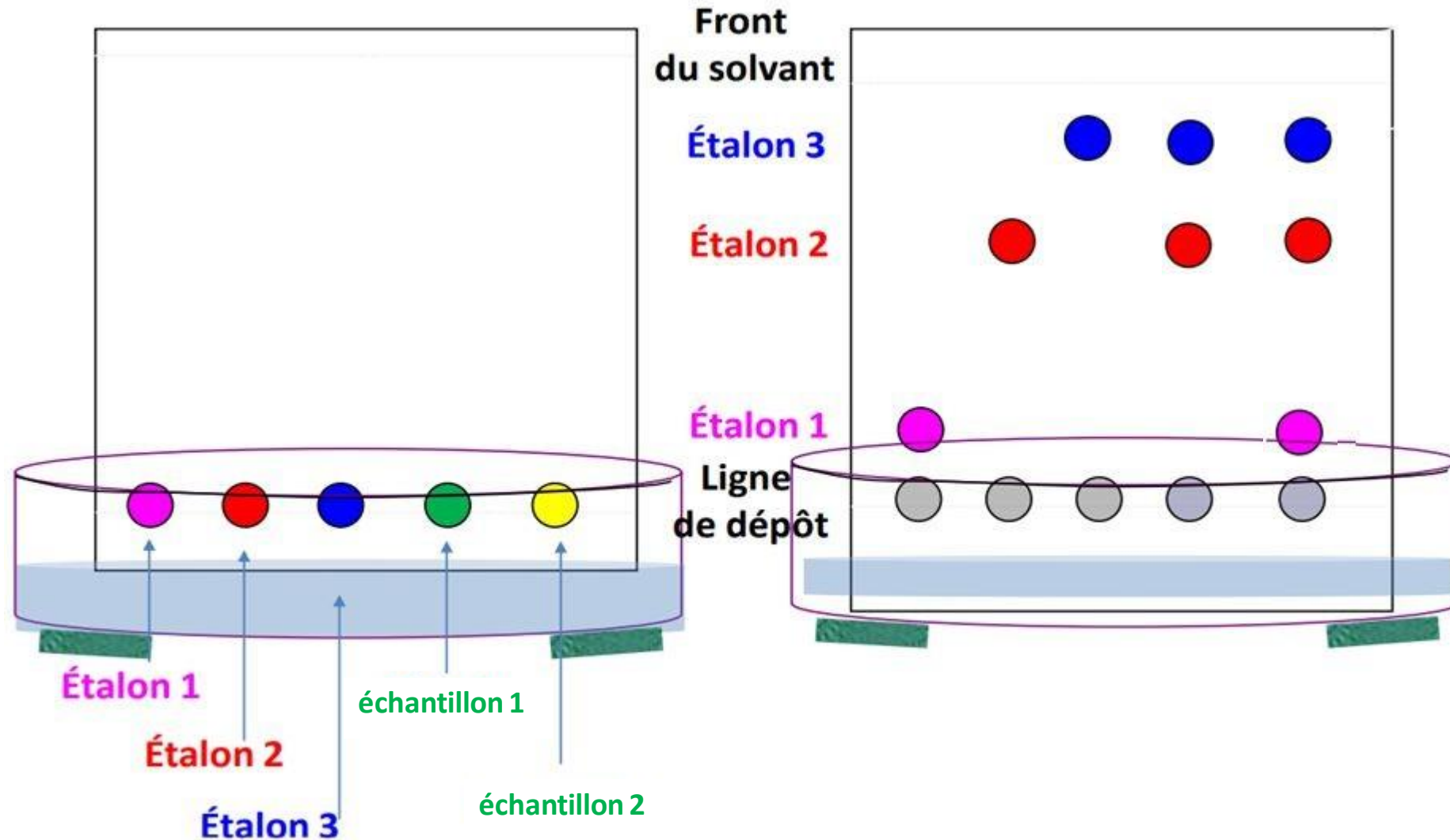
R_f = distance parcourue par la molécule / distance parcourue par le solvant

R_t = distance parcourue par la molécule / distance parcourue par le témoin

MÉTHODES D'ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS

1. Méthodes chromatographiques

Chromatographie sur papier



1. Méthodes chromatographiques

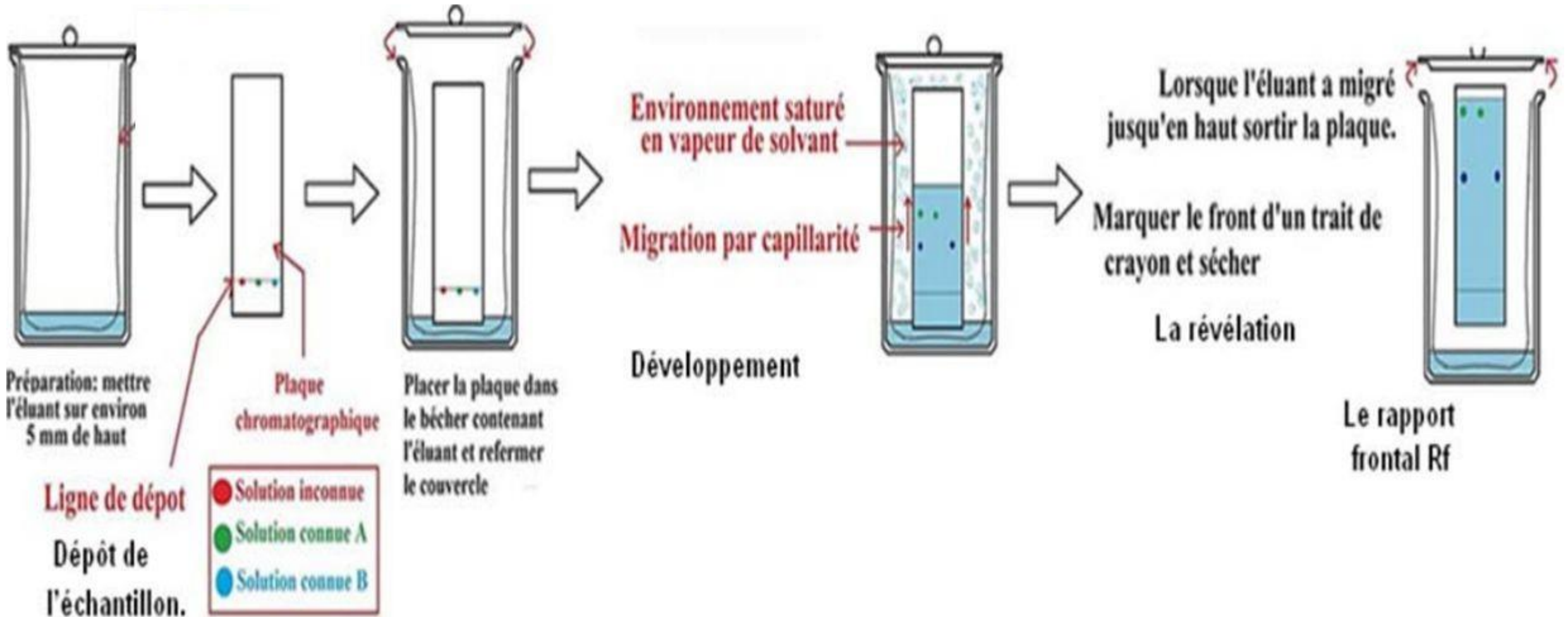
Chromatographie sur couche mince

Même principe que la chromatographie sur papier sauf qu'ici le support est une **couche de verre, plastique ou d'aluminium** tapissé par une phase stationnaire généralement **gel de silice**

MÉTHODES D'ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS

1. Méthodes chromatographiques

Chromatographie sur couche mince

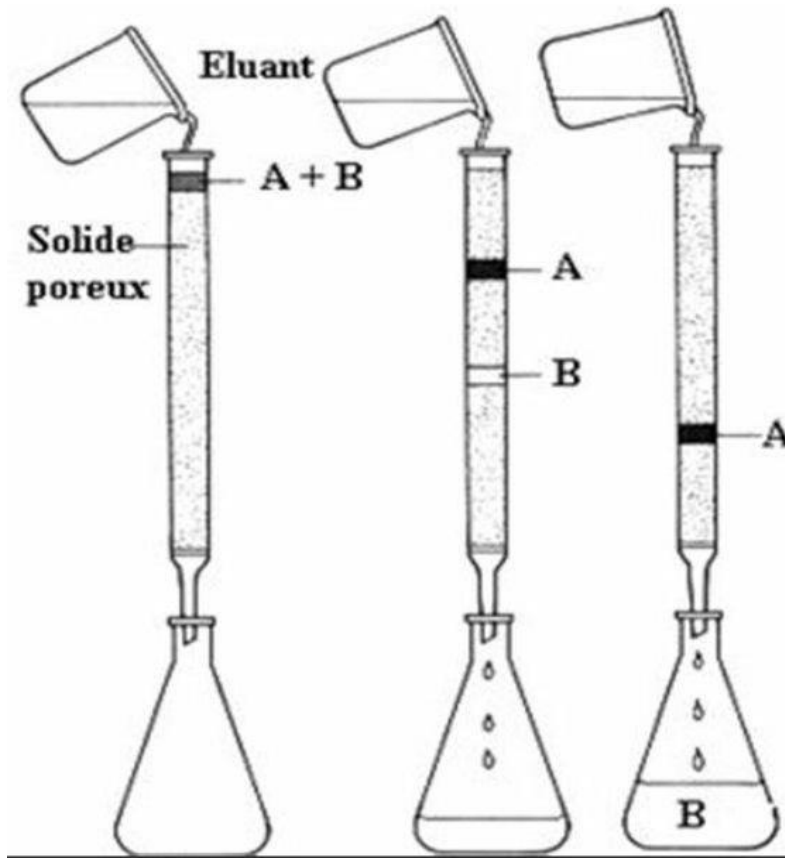


MÉTHODES D'ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS

1. Méthodes chromatographiques

Chromatographie sur colonne

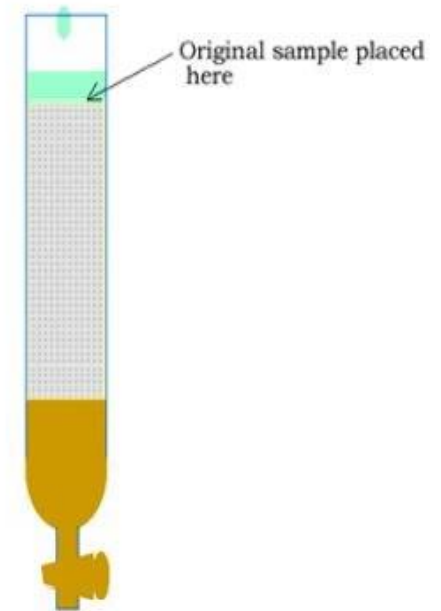
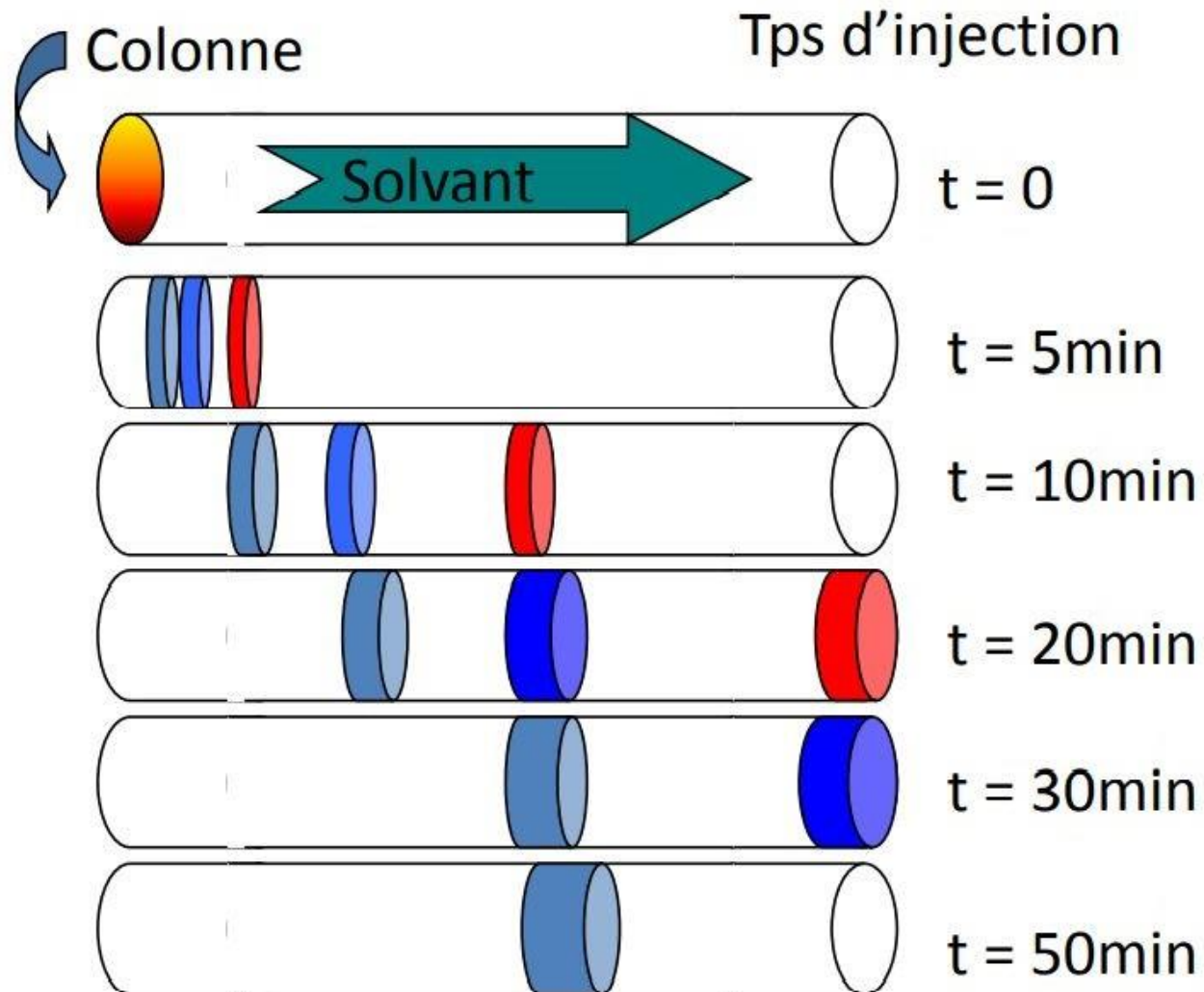
La chromatographie sur colonne est basée sur le même principe, sauf que la phase stationnaire ne se trouve pas sur une plaque mais dans une colonne



MÉTHODES D'ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS

1. Méthodes chromatographiques

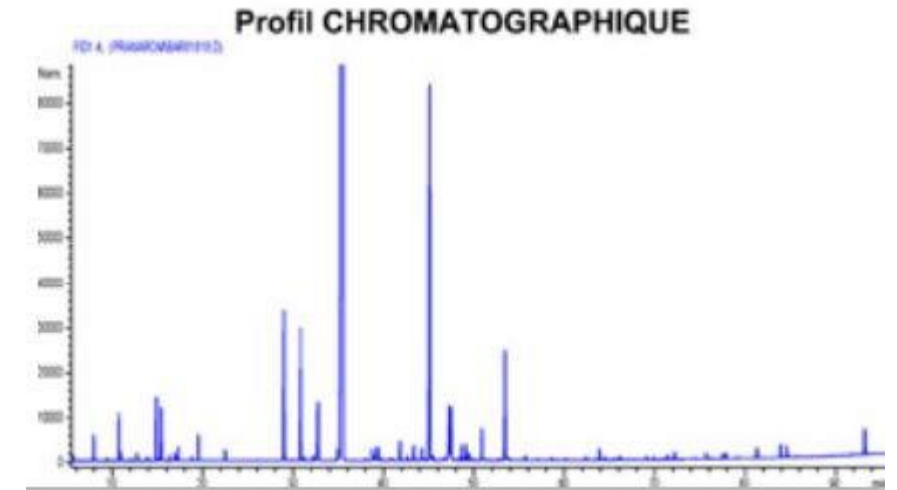
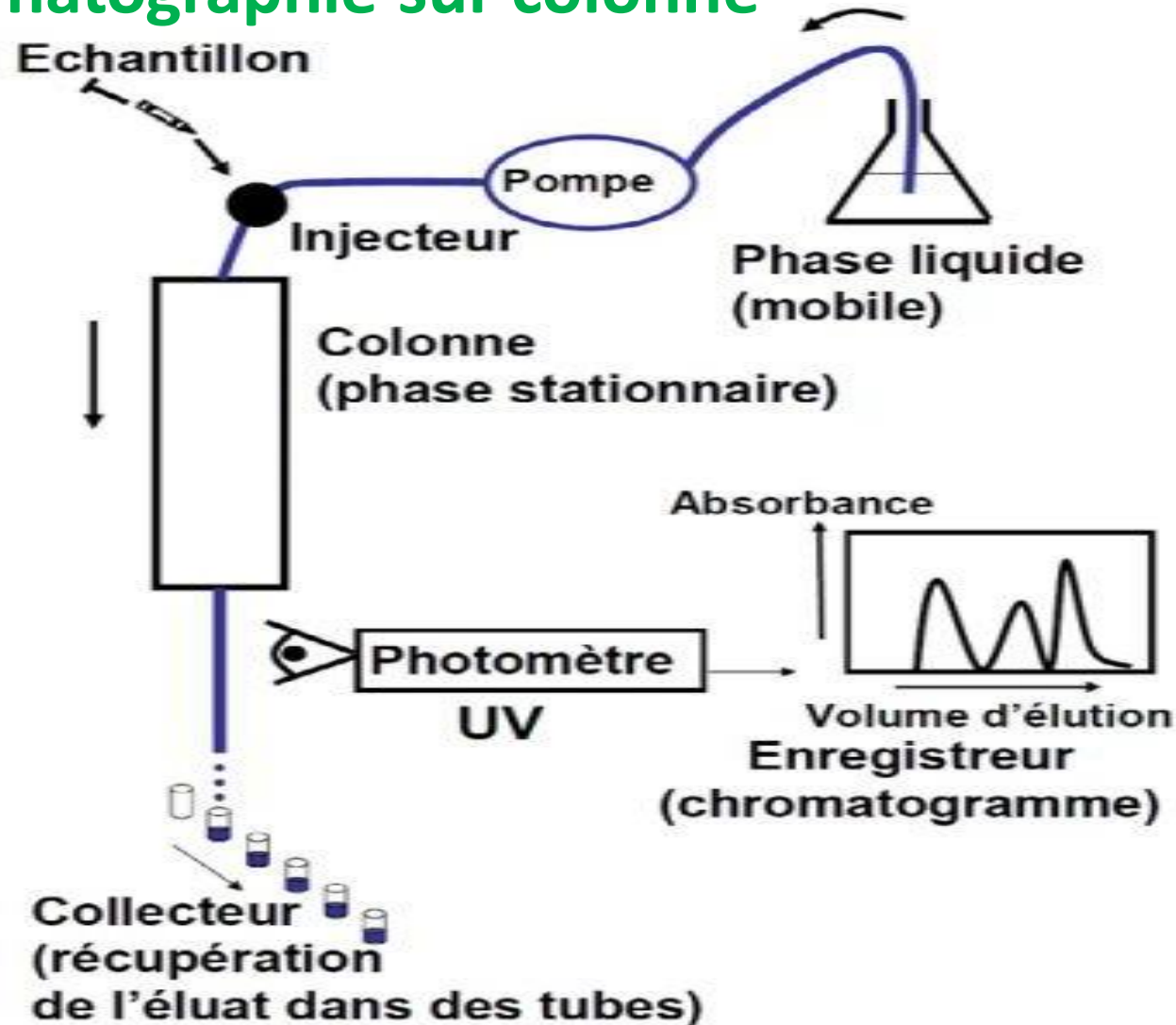
Chromatographie sur colonne



MÉTHODES D'ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS

1. Méthodes chromatographiques

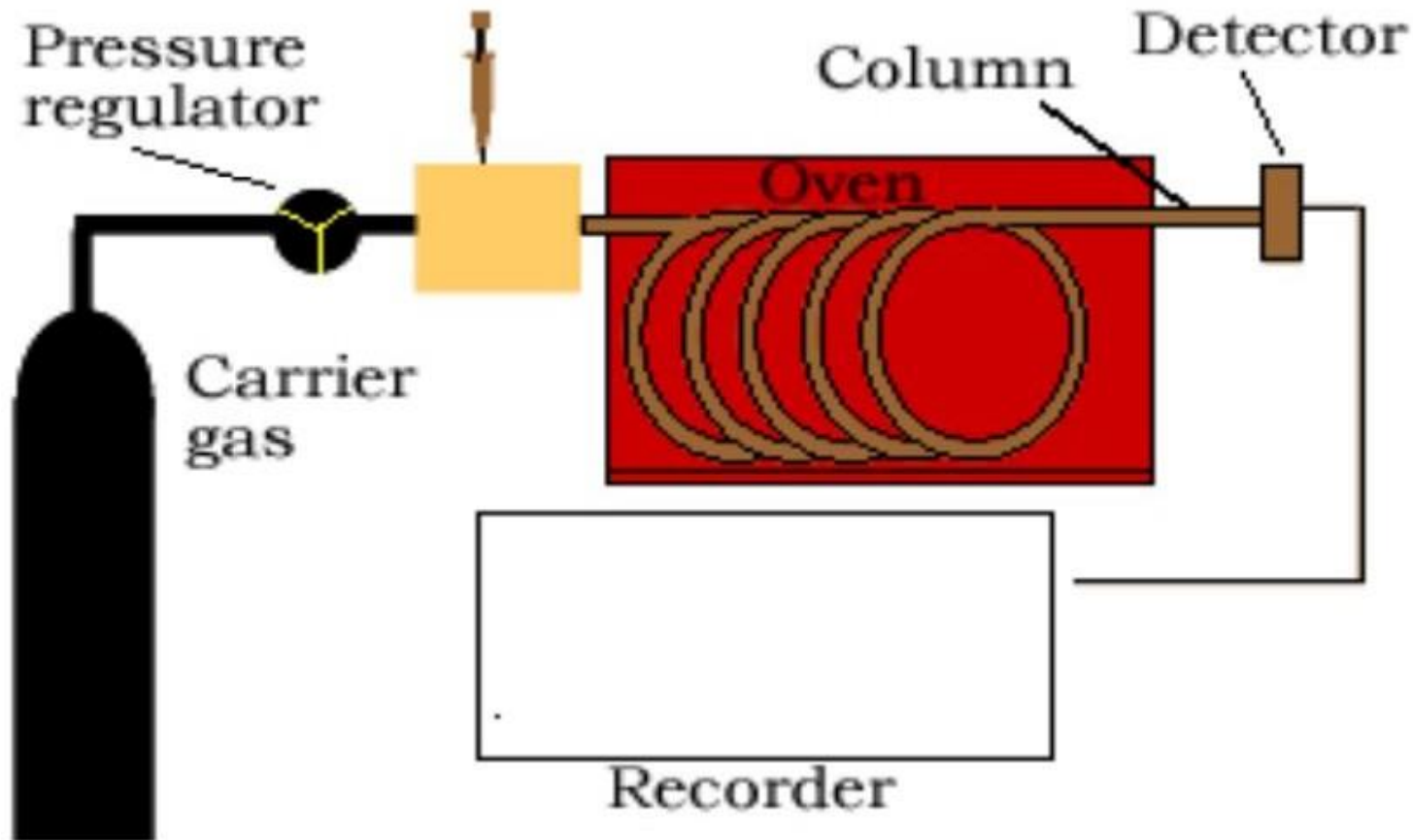
Chromatographie sur colonne



MÉTHODES D'ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS

1. Méthodes chromatographiques

Chromatographie sur colonne → chromatographie en phase gazeuse



- Phase mobile est un gaz.
- Les Aa à analyser doivent être volatiles (état de vapeur).
- Le gaz vecteur entraîne l'échantillon dans la colonne de séparation thermostatée.



MÉTHODES D'ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS |

1. Méthodes chromatographiques

Chromatographie sur colonne ➡ **chromatographie d'échange d'ions**

La chromatographie d'échange d'ions met en jeu **la charge** des acides aminés pour permettre leur séparation et cela à un **pH donné**.

La phase stationnaire est une résine échangeuse d'ions :

résine échangeuse de cations : phase stationnaire chargée

négativement. résine échangeuse d'anions : phase stationnaire chargée

positivement.

La phase mobile (éluant) : solution tamponnée à pH croissant ou décroissant (gradient de pH)

MÉTHODES D'ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS |

1. Méthodes chromatographiques

Chromatographie sur colonne → chromatographie d'échange d'ions

→ La chromatographie d'échange d'anions

Résine échangeuse d'anions chargée **positivement**.

Phase mobile avec gradient de pH : **du pH élevé (basique)** au **pH bas (acide)**

Les acides aminés se décroche de la résine lorsque le pH atteint leur pHi

Les acides aminés dont le **pHi est le plus élevé (les plus basiques)** sont **élus en premier**

MÉTHODES D'ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS

1. Méthodes chromatographiques

Chromatographie sur colonne → **chromatographie d'échange d'ions**

→ **La chromatographie d'échange de cations**

Résine échangeuse de cations chargée **négativement**.

Phase mobile avec gradient de pH : **du pH bas (acide)** au **pH élevé (basique)**

Les acides aminés se décroche de la résine lorsque le pH atteint leur pHi

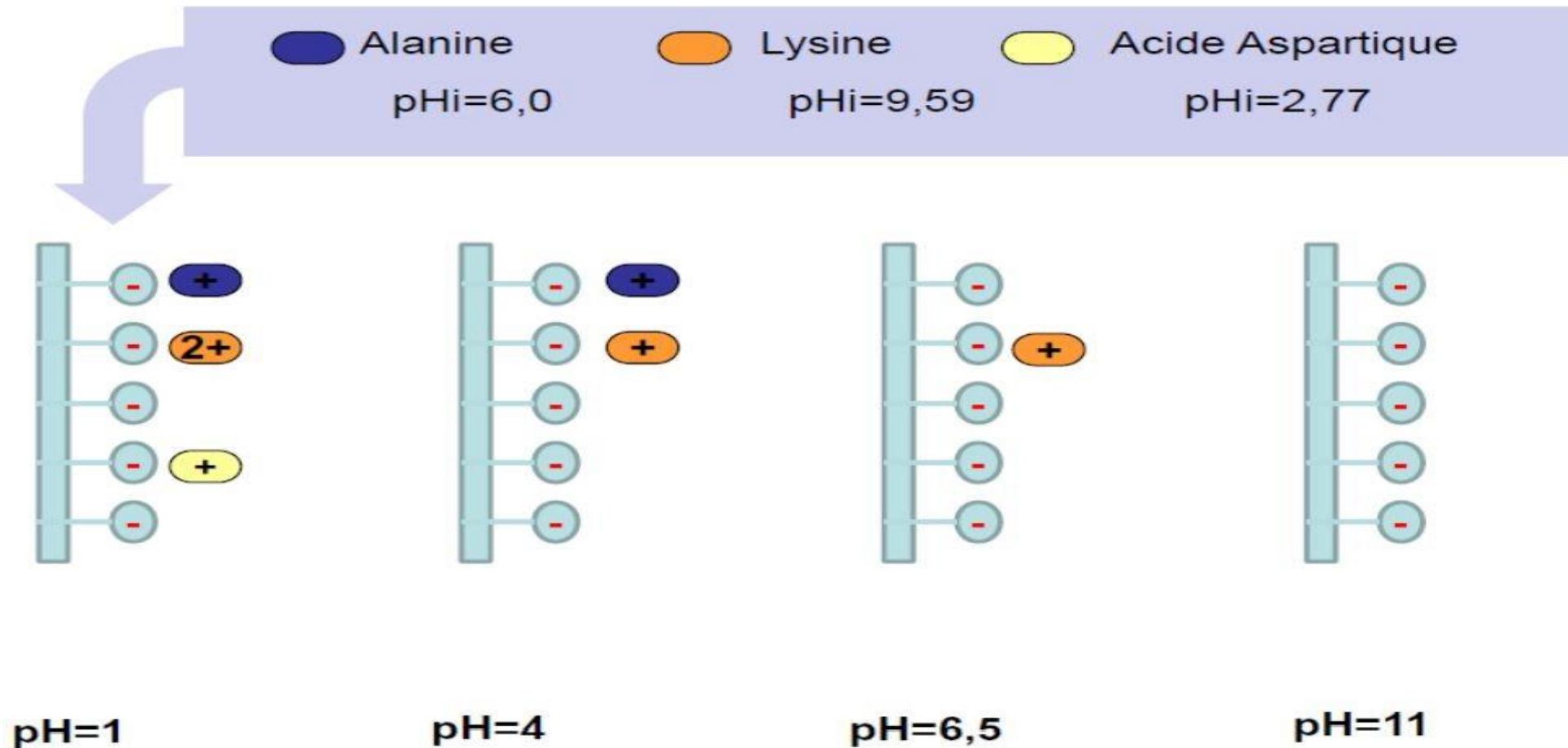
Les acides aminés dont le **pHi est le plus bas (les plus acides)** sont **élués en premier**

MÉTHODES D'ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS

1. Méthodes chromatographiques

Chromatographie sur colonne → chromatographie d'échange d'ions

Séparation d'un mélange Lys, Ala, Asp sur colonne d'échange de cations



1. Méthodes chromatographiques

Chromatographie sur colonne → chromatographie liquide haute performance (HPLC)

Le mélange d'acides aminés à analyser est poussé par un liquide (phase mobile) dans une colonne remplie de "grains" de **très petite taille** (phase stationnaire).

- La phase mobile est poussée par une **pression élevée (grâce à des pompes à haute pression)**.
- **Diminution du temps** nécessaire de séparation des composants du mélange.
- **Meilleure séparation** des composants.
- Les pics obtenus **sont plus étroits**, bien séparés (meilleure résolution)

2. Méthodes électrophorétiques (électrophorèse)

Définition :

L'électrophorèse est une méthode séparation de particules **chargées électriquement** sous l'action **d'un champs électrique**. Le champs électrique est appliqué grâce a une solution tampon qui lie une anode (+) à une cathode (-) d'un générateur électrique.

Les molécules à séparer sont déposées sur un support. Le support est mis en contact avec la solution tampon.

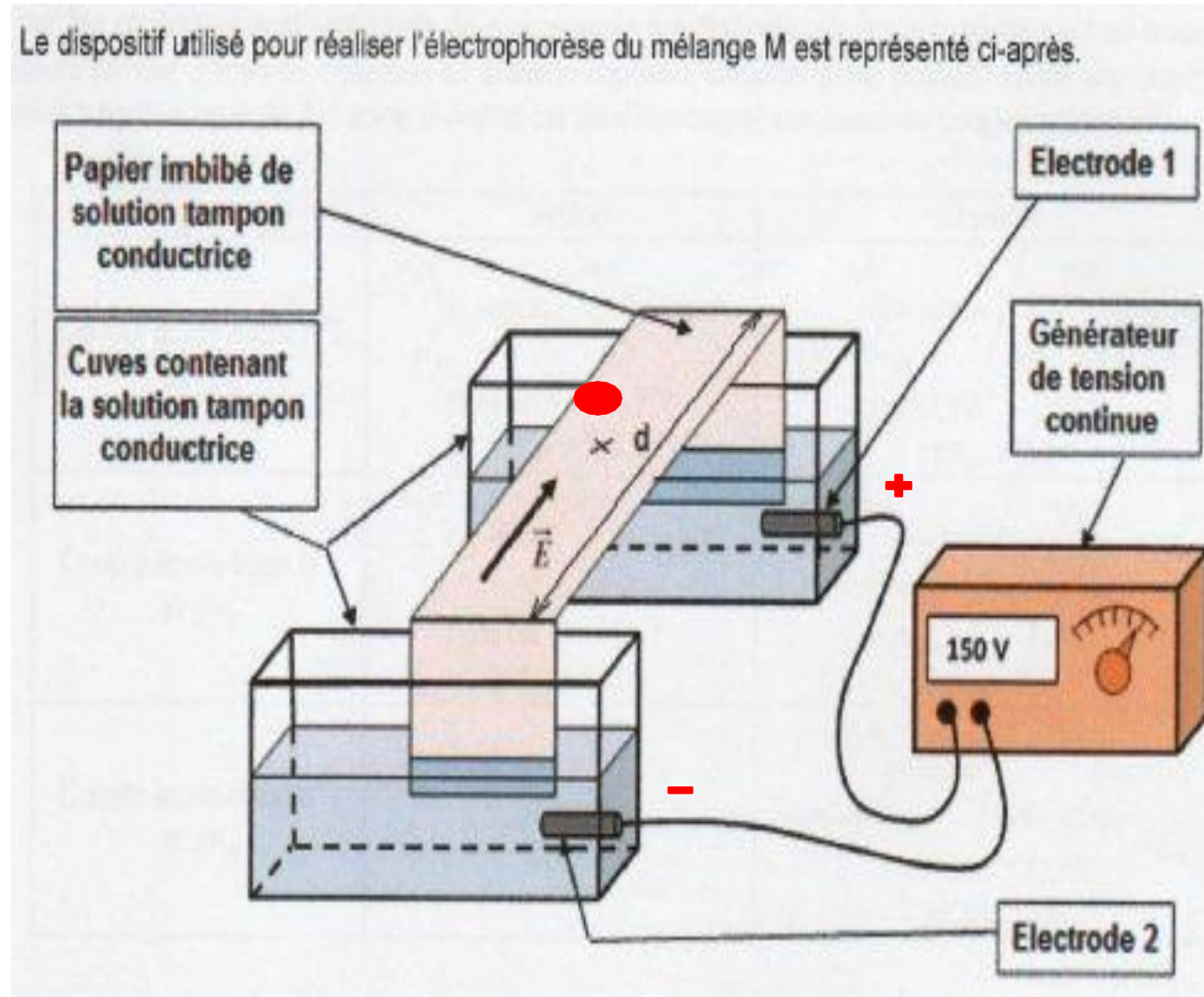
Les molécules **chargé différemment à pH déterminé**, vont être entraînées sur le support par le champs électrique à des vitesses différentes provoquant leur séparation.

MÉTHODES D'ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS

1. Méthodes électrophorétiques (électrophorèse)

Définition :

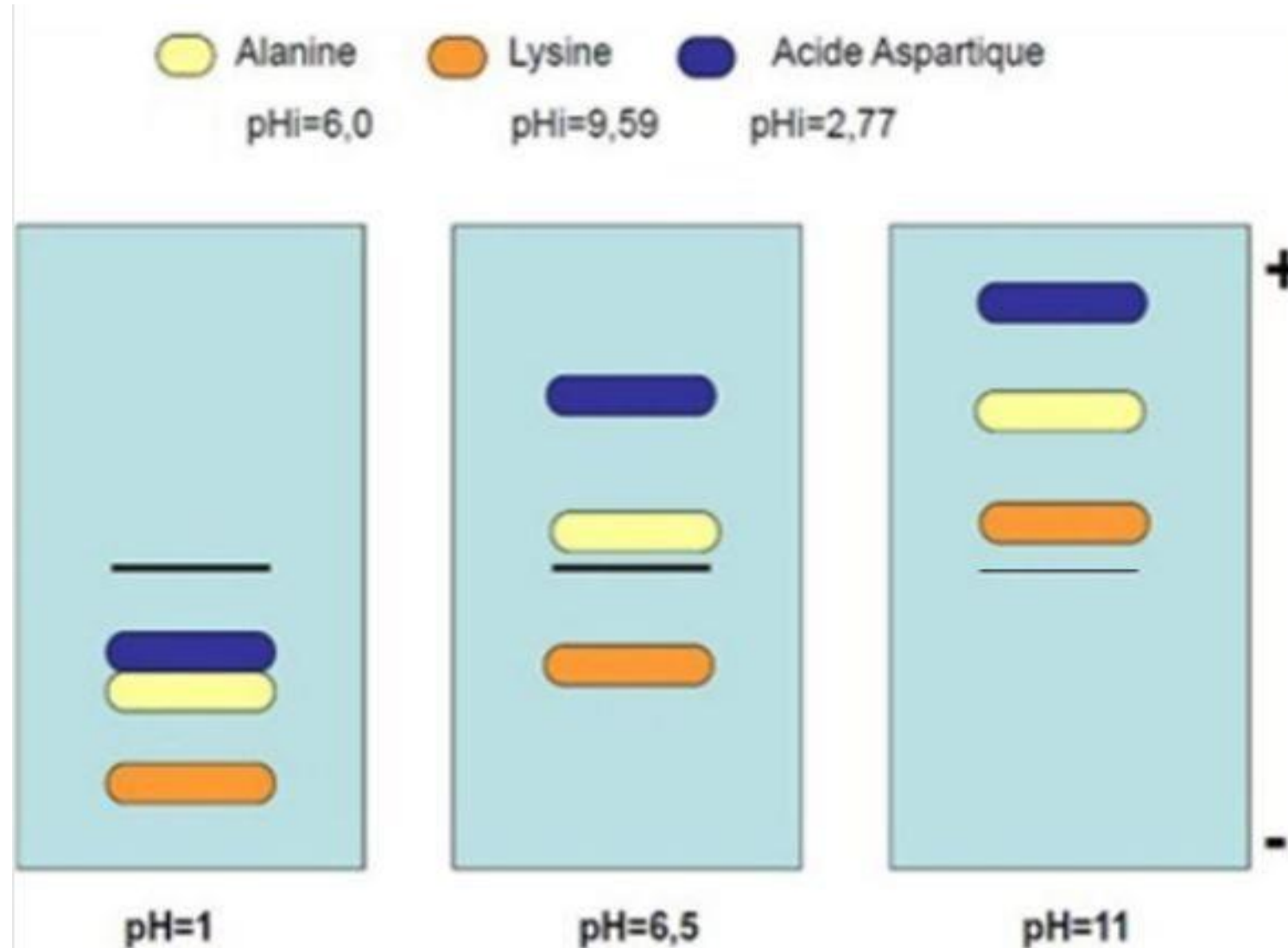
- À un pH donné, les Aa chargés électriquement peuvent exister en solution comme cations (+) ou anions (-).
- Un dépôt de l'Aa est placé au milieu du papier absorbant (humecté par une solution tampon).
- Le papier est connecté à deux électrodes (- et +).
- Lorsque le courant électrique est établi, Les cations se déplacent vers la cathode (-) et les anions se déplacent vers l'anode (+).
- La vitesse de chaque espèce migrante dépend du pH de la solution tampon et du point isoélectrique de l'acide aminé.
- Coloration (ninhydrine)



MÉTHODES D'ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS

1. Méthodes électrophorétiques (électrophorèse)

Définition :



MÉTHODES D'ÉTUDE DES ACIDES AMINÉS

- La migration est effectuée dans **un gradient de pH**; chaque Aa migre jusqu'à l'endroit où le **pH est égal à son pHi**.
- Le gradient de pH est généré par des ampholytes, molécules amphotères de synthèse introduites dans le gel au moment de sa fabrication.

