

TP B3P - CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION-DIFFUSION : RÉSOLUTION D'UN MÉLANGE DE MOLÉCULES COLORÉES ET DESSALAGE D'UNE SOLUTION D'ALBUMINE

1. BUTS

Dans un premier, on se propose de **résoudre par chromatographie d'exclusion-diffusion un mélange M constitué de molécules colorées** : le bleu dextran (bleu), la vitamine B12 (rose), le cytochrome c (marron).

On effectuera au préalable une étude de l'absorption de ces molécules.

Dans un deuxième temps, on utilisera la **chromatographie d'exclusion-diffusion comme moyen de dessalage** d'une solution d'albumine contenant les ions sulfate SO_4^{2-} .

La colonne de chromatographie est fournie prête à l'emploi, c'est-à-dire emplie de résine Sephadex G75 équilibrée en solution saline.

2. RÉSOLUTION DU MÉLANGE M PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION-DIFFUSION

2.1. ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS D'ABSORPTION DES MOLÉCULES DU MÉLANGE M

- Réaliser le spectre d'absorption des molécules colorées étudiées sur une gamme de longueur d'onde d'amplitude 100 nm judicieusement choisie (voir annexe).
- Déterminer la/les longueur(s) d'onde maximale(s) d'absorption de chaque molécule et discuter avec le professeur du choix des longueurs d'onde à utiliser pour la détection.

2.2. ÉTAPES PRÉLIMINAIRES

- Jauger une série de **microcuves « visible »** à 800 μL .
- Équilibrer la colonne avec la solution de NaCl à 9 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (faire passer environ 20 mL).
- Évaluer le volume total V_t en remplissant une colonne vide avec un volume d'eau équivalent à celui du gel contenu dans la colonne.

2.3. DÉPÔT ET ÉLUTION ISOCRATIQUE DU MÉLANGE M

- Laisser écouler l'éluant (solution de NaCl à 9 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) jusqu'à la surface du gel.
- Déposer le plus délicatement possible 300 μL du mélange M afin d'éviter toute agitation du gel.
- Laisser pénétrer dans le gel puis rajouter délicatement de l'éluant dans le haut de la colonne.

- Commencer à recueillir l'effluent dans une éprouvette.
- Régler le débit à environ 1 goutte toutes les 10 secondes.
- Quand le bleu dextran est proche du bas de la colonne, récolter des fractions de 800 μL en microcuvettes numérotées.
- Noter le volume de liquide contenu dans l'éprouvette.

2.4. MISE EN ÉVIDENCE DES MOLÉCULES ÉLUÉES

- Lire l'absorbance de chacune des fractions (y compris celle récupérée dans l'éprouvette) aux longueurs d'onde déterminées préalablement, et contre un témoin de compensation adéquat.

On pourra utiliser le mode multi longueur d'onde des spectrophotomètres (si possible).

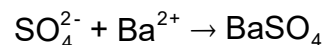
3. DESSALAGE D'UNE SOLUTION D'ALBUMINE PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION-DIFFUSION

Le dessalage permet l'élimination de sels ou de petites molécules dans les solutions protéiques.

Ici, on utilise la chromatographie d'exclusion-diffusion pour éliminer les ions SO_4^{2-} d'une solution d'albumine S.

On suivra l'élution :

- de l'albumine, par dosage spectrophotométrique à $\lambda = 280 \text{ nm}$.
- des ions SO_4^{2-} , par dosage opacimétrique à $\lambda = 650 \text{ nm}$ après réaction de précipitation avec le chlorure de baryum BaCl_2 :



3.1. DESSALAGE

- Tarer une série de **microcuvettes « UV »** à 1 mL.
- Équilibrer la colonne avec la solution de NaCl à $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Faire passer environ 20 mL).
- Laisser écouler l'éluant (solution de NaCl à $9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) jusqu'à la surface du gel.
- Déposer le plus délicatement possible 500 μL de la solution protéique d'albumine S afin d'éviter toute agitation du gel.
- Commencer à recueillir l'effluent dans une éprouvette.
- Régler le débit à environ 1 goutte toutes les 10 secondes.
- Quand le volume recueilli dans l'éprouvette est le même que celui de la partie 2.3., commencer à récolter des fractions de 1 mL en microcuvettes numérotées.

3.2. DOSAGE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DE L'ALBUMINE

- Mesurer l'absorbance à $\lambda = 280 \text{ nm}$ d'une solution étalon d'albumine à $1,00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ contre un témoin de compensation adéquat.

- Mesurer l'absorbance à $\lambda = 280$ nm de la solution S d'albumine analysée contre un témoin de compensation adéquat.
- Mesurer l'absorbance à $\lambda = 280$ nm des différentes fractions obtenues contre un témoin de compensation adéquat.

3.3. DOSAGE OPACIMÉTRIQUE DES IONS SULFATES SO_4^{2-}

L'opacimétrie permet d'apprécier le trouble d'une suspension par mesure au spectrophotomètre de l'atténuation D_λ avec des λ comprises entre 600 et 650 nm.

- Préparer en **macrocuves « visible »**, suivant le tableau :

| | Témoin de compensation | Étalon | Solution S diluée | Fraction F_1 | Fraction F_x |
|---|------------------------|--------|-------------------|----------------|----------------|
| Solution étalon de SO_4^{2-} à $0,600 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, en mL | - | 0,2 | - | - | - |
| Solution d'albumine S diluée au $1/50^{\text{ème}}$, en mL | - | - | 0,2 | - | - |
| Fraction recueillie, en mL | - | - | - | 0,2 | 0,2 |
| Solution de BaCl_2 à $50 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, en mL | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Eau déminéralisée, en mL | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,6 |

- Agiter.
- Mesurer immédiatement l'atténuation à $\lambda = 650$ nm contre un témoin de compensation adéquat.

ANNEXE : Couleurs absorbées et couleurs complémentaires



TP B3P - CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION-DIFFUSION : RÉSOLUTION D'UN MÉLANGE DE MOLÉCULES COLORÉES ET DESSALAGE D'UNE SOLUTION D'ALBUMINE

COMPTE RENDU

NOM :
PRÉNOM :

1. RÉSOLUTION DU MÉLANGE M PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION-DIFFUSION

1.1. ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS D'ABSORPTION DES MOLÉCULES DU MÉLANGE M

Q1. Indiquer la/les longueur(s) d'onde maximale(s) d'absorption des constituant du mélange M.

1.2. ÉTUDE DE LA COLONNE DE CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION-DIFFUSION

Q2. Indiquer le domaine de fractionnement du gel Sephadex G75.

Q3. Déterminer le volume total V_t de la colonne chromatographique.

Q4. Déterminer le volume mort V_0 de la colonne chromatographique. Justifier.

Donnée : $M_{\text{bleu dextran}} = 2 \cdot 10^6$ Da

1.3. RÉSOLUTION DU MÉLANGE M

Q5. Indiquer la composition du témoin de compensation.

Q6. Présenter dans un tableau les absorbances obtenues aux différentes longueurs d'onde en fonction du volume élué V_e .

Q7. Réaliser le chromatogramme $A = f(V_e)$.
(présentation sous forme d'histogrammes avec une couleur différente pour chaque longueur d'onde étudiée)

Q8. On appelle **facteur de dilution de la colonne** vis-à-vis d'un soluté le rapport :

$$\frac{\text{volume d'éluant contenant le soluté}}{\text{volume déposé sur la colonne}}$$

Calculer le facteur de dilution du bleu dextran. Conclure.

Q9. Déterminer le volume d'élution de la vitamine B12 et le comparer à V_t . Conclure.

Q10. Déterminer le volume d'élution, le volume d'élution relatif et le coefficient d'avancement du cytochrome c.

Q11. Classer les molécules colorées du mélange M par ordre de masse molaire croissante.

2. DESSALAGE D'UNE SOLUTION D'ALBUMINE PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION-DIFFUSION

2.1. DOSAGE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DE L'ALBUMINE

Q12. Justifier le choix de la longueur d'onde de détection de l'albumine.

Q13. Présenter dans un tableau les absorbances à $\lambda = 280 \text{ nm}$ et les concentrations en masse de l'albumine dans les différentes solutions et fractions analysées (indiquer un exemple de calcul de concentration).

2.2. DOSAGE OPACIMÉTRIQUE DES IONS SULFATES SO_4^{2-}

Q14. Justifier le choix de la longueur d'onde de détection du précipité de BaSO_4 .

Q15. Présenter dans un tableau les atténuances à $\lambda = 650 \text{ nm}$ et les concentrations en masse en ion sulfate SO_4^{2-} dans les différentes solutions et fractions analysées (indiquer un exemple de calcul de concentration).

2.3. ANALYSE QUALITATIVE DU DESSALAGE D'UNE SOLUTION D'ALBUMINE PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION-DIFFUSION

Q16. Tracer sur le même graphe les profils d'élution :

- $\rho_{(\text{albumine}; \text{fraction})} = f(V_e)$
- $\rho_{(\text{SO}_4^{2-}; \text{fraction})} = f(V_e)$

Q17. Déterminer les volumes d'élution de l'albumine et des ions sulfates.

Q18. Discuter de l'efficacité de la méthode employée pour dessaler une solution d'albumine.