

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

COMPTE RENDU

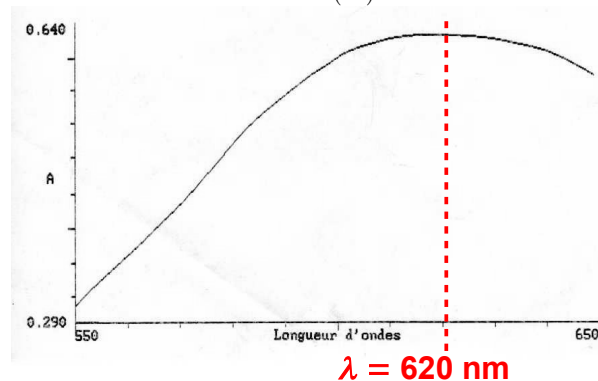
1. RÉSOLUTION DU MÉLANGE M PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION-DIFFUSION

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

Q1. Le **bleu dextran** est une molécule bleue, donc absorbe dans le jaune et l'orange. On réalise alors un spectre d'absorption entre $\lambda = 550$ nm et $\lambda = 650$ nm.

Spectre d'absorption du bleu dextran entre $\lambda = 550$ nm et $\lambda = 650$ nm

$$A = f(\lambda)$$

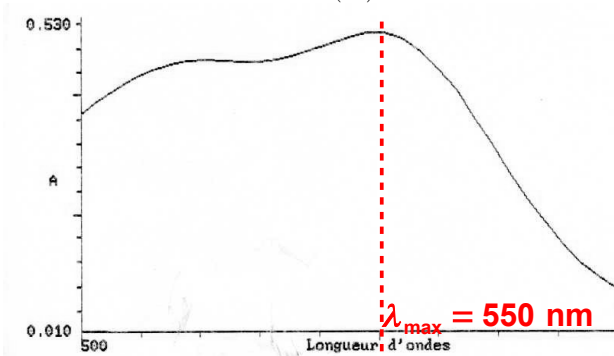


D'après le spectre obtenu, on fixe la longueur d'onde de détection du bleu dextran à $\lambda_{\max} = 620$ nm, ce qui correspond au maximum d'absorption de cette molécule.

La **vitamine B12** est une molécule rose, donc absorbe dans le vert et le jaune. On réalise alors un spectre d'absorption entre $\lambda = 500$ nm et $\lambda = 600$ nm.

Spectre d'absorption de la vitamine B12 entre $\lambda = 500$ nm et $\lambda = 600$ nm

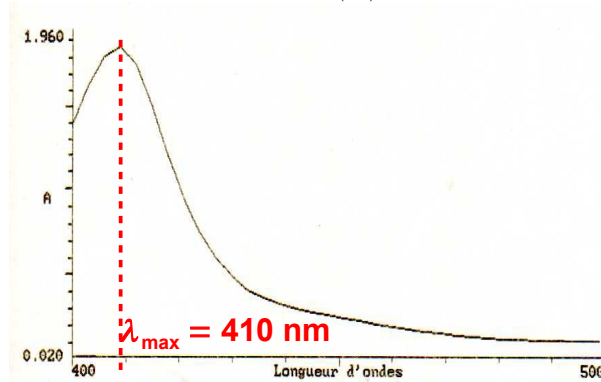
$$A = f(\lambda)$$



D'après le spectre obtenu, on fixe la longueur d'onde de détection de la vitamine B12 à $\lambda_{\max} = 550$ nm, ce qui correspond au maximum d'absorption de cette molécule.

Le **cytochrome c** une molécule orange-marron, donc absorbe dans le bleu verdâtre. On réalise alors un spectre d'absorption entre $\lambda = 400 \text{ nm}$ et $\lambda = 500 \text{ nm}$.

Spectre d'absorption du cytochrome c entre $\lambda = 400 \text{ nm}$ et $\lambda = 500 \text{ nm}$
 $A = f(\lambda)$



D'après le spectre obtenu, on fixe la longueur d'onde de détection de la vitamine B12 à $\lambda_{\text{max}} = 410 \text{ nm}$, ce qui correspond au maximum d'absorption de cette molécule.

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

Q2. Le domaine de fractionnement du gel Sephadex G75 est : 3 000 – 80 000 Da.

Q3. $V_t = 20,0 \text{ mL}$

Q4. $V_0 = 7,0 \text{ mL}$

Le volume mort V_0 correspond au volume d'éluion d'une molécule non retardée, c'est-à-dire une molécule de taille supérieure à celle des pores des billes du gel, et qui est donc exclue.

Le volume mort correspond au volume de liquide à l'extérieur des billes poreuses du gel.

Le bleu dextran ($M_{\text{bleu dextran}} = 2 \cdot 10^6 \text{ Da}$) ayant une masse molaire supérieure à la limite d'exclusion du gel Sephadex G75 (80 000 Da), il ne diffuse pas dans les billes poreuses et n'est pas retardé.

Il permet alors de déterminer le volume mort V_0 .

1.3. RÉOLUTION DU MÉLANGE M

Q5. Le témoin de compensation est de composition identique à l'éluant utilisé comme phase mobile. Il est donc réalisé avec la solution de NaCl à $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Q6.

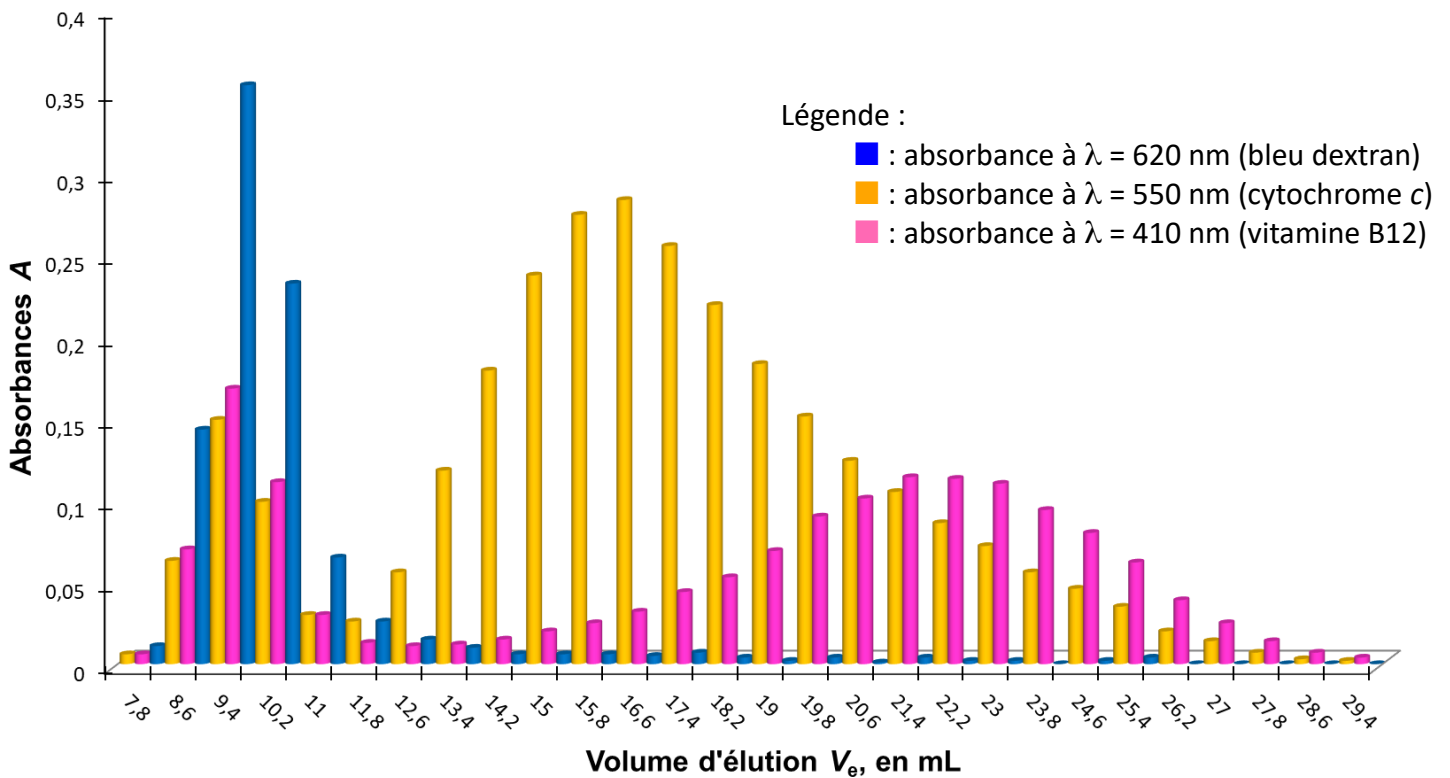
N° de fraction	V _e (mL)	A ₄₁₀	A ₅₅₀	A ₆₂₀
1	7,8	0,006	0,006	0,011
2	8,6	0,063	0,070	0,143
3	9,4	0,149	0,168	0,353
4	10,2	0,099	0,111	0,232
5	11,0	0,030	0,030	0,065
6	11,8	0,026	0,013	0,026
7	12,6	0,056	0,011	0,015
8	13,4	0,118	0,012	0,010
9	14,2	0,179	0,015	0,006

N° de fraction	V _e (mL)	A ₄₁₀	A ₅₅₀	A ₆₂₀
10	15,0	0,237	0,020	0,006
11	15,8	0,274	0,025	0,006
12	16,6	0,283	0,032	0,005
13	17,4	0,255	0,044	0,007
14	18,2	0,219	0,053	0,004
15	19,0	0,183	0,069	0,002
16	19,8	0,151	0,090	0,004
17	20,6	0,124	0,101	0,001
18	21,4	0,105	0,114	0,004

N° de fraction	V _e (mL)	A ₄₁₀	A ₅₅₀	A ₆₂₀
19	22,2	0,086	0,113	0,002
20	23,0	0,072	0,110	0,002
21	23,8	0,056	0,094	0,000
22	24,6	0,046	0,080	0,002
23	25,4	0,035	0,062	0,004
24	26,2	0,020	0,039	0,000
25	27,0	0,014	0,025	0,000
26	27,8	0,007	0,014	0,000
27	28,6	0,003	0,007	0,000
28	29,4	0,002	0,004	0,000

Q7.

Séparation des molécules colorées constitutives du mélange M par chromatographie d'exclusion-diffusion en gel Sephadex G75
 $A = f(V_e)$



Q8. Le volume de mélange M déposé est 0,3 mL.
 D'après le profil d'éluion obtenu, le bleu dextran est présent en quantité significative dans les fractions n°3 ($V_e = 9,4$ mL), n°4 ($V_e = 10,2$ mL) et n°5 ($V_e = 11,0$ mL), soit un volume d'éluant de 2,4 mL.

Le facteur de dilution du bleu dextran est alors : $\frac{2,4}{0,3} = 8$.

Le bleu dextran est donc dilué 8 fois lors de son passage dans le gel Sephadex G75.

- Q9.** $V_e(\text{vitamine B12}) \simeq 21,8 \text{ mL}$ et $V_t = 20,0 \text{ mL}$, donc $V_e(\text{vitamine B12}) > V_t$
 La vitamine B12 a une masse molaire inférieure à la limite inférieure du domaine de fractionnement du gel Sephadex G75 (3 000 Da).
 Donc $M_{\text{vitamine B12}} < 3\,000 \text{ Da}$.

- Q10.** Expérimentalement nous obtenons :

- $V_t = 20,0 \text{ mL}$
- $V_0 = 7,0 \text{ mL}$
- $V_e(\text{cytochrome } c) = 16,6 \text{ mL}$

Donc : volume d'éluion relatif du cytochrome $c = \frac{V_e(\text{cytochrome } c)}{V_0} = \frac{16,6}{7,0} = 2,4$

Et :

coefficient d'avancement du cytochrome $c = K_{\text{av}(\text{cytochrome } c)} = \frac{V_e(\text{cytochrome } c) - V_0}{V_t - V_0} = \frac{16,6 - 7,0}{20,0 - 7,0} = 0,74$

- Q11.** $M_{\text{vitamine B12}} (1\,579 \text{ Da}) < M_{\text{cytochrome } c} (11\,800 \text{ Da}) < M_{\text{bleu dextran}} (2 \cdot 10^6 \text{ Da})$

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

2.1. DOSAGE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DE L'ALBUMINE

- Q12.** On détecte l'albumine par mesure d'absorbance à $\lambda = 280 \text{ nm}$ car les protéines absorbent à cette longueur d'onde (grâce à la présence de résidus des acides aminés aromatiques tyrosine et tryptophane).

Q13. .

N° de fraction	V_e (mL)	A_{280}	$\rho_{(\text{albumine ; fraction})}$ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
1	8	0,032	0,052
2	9	0,097	0,157
3	10	0,146	0,237
4	11	0,124	0,201
5	12	0,049	0,080
6	13	0,029	0,047
7	14	0,016	0,026
8	15	0,012	0,019
9	16	0,004	0,006
10	17	0,000	0,000
11	18	0,000	0,000
12	19	0,000	0,000
13	20	0,000	0,000
14	21	0,000	0,000

15	22	0,000	0,000
16	23	0,000	0,000
17	24	0,000	0,000
18	25	0,000	0,000
19	26	0,000	0,000
20	27	0,000	0,000
21	28	0,000	0,000

Exemple de calcul pour la fraction n°3 :

$$\rho_{(\text{albumine ; fraction n}^\circ 3)} = \frac{A_{280}(\text{albumine ; fraction n}^\circ 3)}{A_{280}(\text{albumine ; solution étalon})} \times \rho_{(\text{albumine ; solution étalon})}$$

Avec :

- $\rho_{(\text{albumine ; solution étalon})} = 1,00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- $A_{280}(\text{albumine ; solution étalon}) = 0,616$
- $A_{280}(\text{albumine ; fraction n}^\circ 3) = 0,146$

donc : $\rho_{(\text{albumine ; fraction n}^\circ 3)} = \frac{0,146}{0,616} \times 1,00 = 0,237 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

Selon le même raisonnement, on trouve pour la solution S : $\rho_{(\text{albumine ; solution S})} = 1,89 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

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

Q14. Le BaSO_4 est un précipité provoquant un trouble mesurable par détermination de l'atténuation D_λ par opacimétrie avec des longueurs d'onde λ comprises entre 600 et 650 nm.

Q15.

N° de fraction	V_e (mL)	D_{650}	$\rho_{(\text{SO}_4^{2-} ; \text{fraction})}$ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
1	8	0,000	0,000
2	9	0,000	0,000
3	10	0,000	0,000
4	11	0,000	0,000
5	12	0,000	0,000
6	13	0,000	0,000
7	14	0,000	0,000
8	15	0,000	0,000
9	16	0,000	0,000
10	17	0,026	0,105
11	18	0,155	0,624
12	19	0,282	1,136
13	20	0,748	3,012
14	21	0,895	3,604
15	22	0,542	2,183
16	23	0,228	0,918
17	24	0,177	0,713
18	25	0,054	0,217

19	26	0,000	0,000
20	27	0,000	0,000
21	28	0,000	0,000

Exemple de calcul pour la fraction n°14 :

$$\rho_{(\text{SO}_4^{2-}; \text{fraction n}^\circ 14)} = \frac{D_{650}(\text{SO}_4^{2-}; \text{fraction n}^\circ 14)}{D_{650}(\text{SO}_4^{2-}; \text{solution étalon})} \times \rho_{(\text{SO}_4^{2-}; \text{solution étalon})}$$

Avec :

- $\rho_{(\text{SO}_4^{2-}; \text{solution étalon})} = 0,600 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- $D_{650}(\text{SO}_4^{2-}; \text{solution étalon}) = 0,149$
- $D_{650}(\text{SO}_4^{2-}; \text{fraction n}^\circ 14) = 0,895$

donc : $\rho_{(\text{SO}_4^{2-}; \text{fraction n}^\circ 14)} = \frac{0,895}{0,149} \times 0,600 = 3,60 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

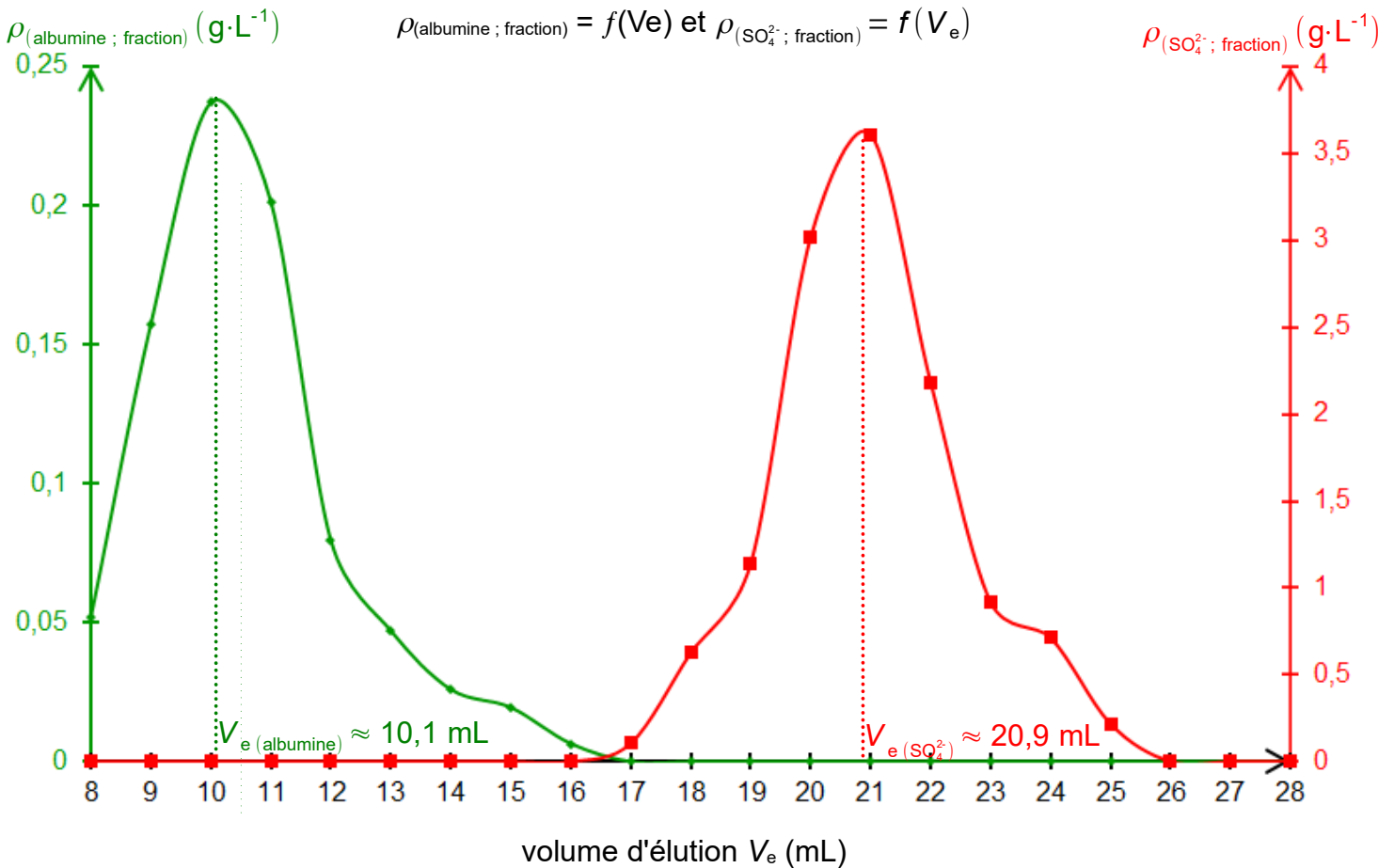
Selon le même raisonnement, on trouve pour la solution S :

$$\rho_{(\text{SO}_4^{2-}; \text{solution S})} = \frac{D_{650}(\text{SO}_4^{2-}; \text{solution S diluée})}{D_{650}(\text{SO}_4^{2-}; \text{solution étalon})} \times \rho_{(\text{SO}_4^{2-}; \text{solution étalon})} \times \frac{1}{d} = \frac{0,173}{0,149} \times 0,600 \times 50 = 34,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$$

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

Q16.

Dessalage d'une solution d'albumine par chromatographie d'exclusion-diffusion en gel Sephadex G75



Q17. Selon le profil d'élution précédent on trouve graphiquement : - $V_{e(\text{albumine})} \simeq 10,1 \text{ mL}$
- $V_{e(\text{SO}_4^{2-})} \simeq 20,9 \text{ mL}$

Q18. D'après le chromatogramme obtenu, on observe deux pics d'élutions distincts pour l'albumine et les ions SO_4^{2-} .

La chromatographie d'exclusion-diffusion en gel Sephadex G75 permet donc de séparer l'albumine des ions sulfates.

Les fractions contenant majoritairement l'albumine ne contiennent plus d'ion sulfate.

Cette méthode chromatographique peut être utilisée pour le dessalage d'une solution protéique.