

SEPARATION ET IDENTIFICATION DE GLUCIDES PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE (CCM)

I. PROTOCOLE OPERATOIRE

1. Matériels et réactifs

- Cuve saturée par la phase mobile, constituée de : butanone-2 3V, acide acétique 1V, méthanol 1V.
- Plaque de gel de silice réactivée 15 min à 105°C (*la réactivation en éliminant l'eau du gel permet de favoriser les phénomènes d'adsorption et minimiser les phénomènes de partage*).
- Solutions témoins de glucides : glucose (GLU), saccharose (SAC), fructose (FRU) et lactose (LAC).
- Mélange de glucides X à identifier.
- Réactif révélateur (de Molish) : 0,25 g de naphthol-1, 50 mL d'éthanol, 50 mL d'acide sulfurique à 20 %.

2. Préparation de la chromatoplaque

La plaque sera manipulée avec des gants pour éviter d'y laisser des traces.

Tracer (**très légèrement**) au crayon graphite une ligne horizontale de dépôt **à 2 cm du bord inférieur** de la chromatoplaque.

Marquer légèrement l'emplacement des dépôts tous les 0,7 cm minimum, en laissant un espace de **1 cm à partir des bords latéraux** (*ceci afin d'éviter les effets de bords*).

Identifier la plaque (**nom et N° de poste**) sur le bord supérieur de la plaque.

3. Dépôt

A l'aide de capillaires différents pour chaque solution, déposer les témoins et le mélange X à identifier, celui-ci sera déposer **au milieu de la ligne de dépôt**.

Effectuer les dépôts **en 2 fois en séchant rapidement entre chaque dépôt** au sèche-cheveux (*ceci permet de limiter la diffusion des échantillons et donc d'obtenir des spots petits et ronds après révélation*).

4. Migration

Mettre la chromatoplaque verticalement, dépôts vers le bas, dans la cuve préalablement saturée en solvants. Veiller à ce que le niveau de départ des solvants soit inférieur à la ligne des dépôts (sinon les échantillons diffusent dans la cuve).

Une fois la plaque déposer **ne plus faire bouger la cuve** afin d'éviter une migration de travers des échantillons.

Laisser le solvant migrer le plus haut possible (**au maximum 1 cm du bord supérieur**).

5. Révélation

Sortir la plaque avec des gants et **noter immédiatement le front du solvant au crayon** sous la hotte (*le front du solvant n'est pas forcément une ligne droite et les solvants s'évaporent rapidement*).

Sécher à l'air chaud sous la hotte (**attention : vapeurs irritantes !!**).

Sous la hotte, badigeonner au pinceau ou pulvériser la plaque avec le réactif révélateur (le réactif de MOLISH) puis sécher à l'air chaud et révéler en plaçant la plaque 15 min à 100 °C.

A la sortie de l'étuve, **entourer les spots** au crayon de papier.

II. SECURITE

	produits	identification du danger
Mélange de solvants	Butanone-2 ou méthyléthylcétone	 Xi  F R11-36-66-67 et S9-16
	Acide acétique	 C R10-35 et S23-26-45
	méthanol	 T  F R11-23/24/25-39 et S7-16-36/37-45
Réactif de Molish	Naphtol-1	 Xn R21/22-37/38-41 et S22-26-37/39
	éthanol	 F R11 et S7-16
	Acide sulfurique 20 %	 C R35 et S26-30-36/37/39-45

III. COMPTE-RENDU

- Mesures de préventions liées à la manipulation.
- Principe de la CCM (4 lignes).
- Récapituler les grandes étapes de la manipulation.
- Scotcher le chromatogramme et le dessiner à coté en annotant (dessin à l'échelle réelle).
- Calculer les rapports frontaux R_f des différentes tâches obtenues. Présenter les résultats sous forme d'un tableau :

dépôt	couleur	d en cm	D en cm	R _f

- En déduire, en justifiant, la composition du mélange de glucides X.
- Expliquer pourquoi certains glucides ont migré plus vite que d'autres.