

Separazione cromatografica di pigmenti fotosintetici: β -Carotene e Clorofilla

Scopo

L'esperienza consiste nell'estrazione con solvente organico di β -Carotene e Clorofilla, pigmenti fotosintetici presenti nelle foglie di diverse piante, e successiva separazione attraverso cromatografia di adsorbimento.

La cromatografia viene definita dalla IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) come:

"Metodo usato primariamente per la separazione dei componenti di una miscela; i componenti vengono distribuiti tra due fasi una delle quali è fissa mentre l'altra è mobile. La fase stazionaria può essere un solido, o un liquido supportato su di un solido, o un gel. La fase stazionaria può essere impaccata in una colonna, sparsa come uno strato, o distribuita come un film. La definizione "letto cromatografico" è usata come termine generale per denotare una qualsiasi delle varie forme in cui può essere usata la fase stazionaria."

Quindi la cromatografia è una tecnica di separazione basata sulla migrazione differenziata delle sostanze da separare attraverso due fasi tra loro immiscibili.

Le piante contengono diversi tipi di pigmenti fotosintetici liposolubili, tra cui clorofille e carotenoidi, la cui estrazione viene effettuata con solventi organici. La separazione viene condotta mediante separazione cromatografia su gel di silice impaccato in colonna (fase stazionaria) e solvente organico (o miscele appropriate di solventi organici) come fase eluente (fase mobile).

Nel sistema cromatografico ciascun pigmento è ritardato in funzione dell'interazione che la sua molecola subisce con la fase stazionaria e con la fase eluente. In particolare, il flusso del solvente eluirà ogni sostanza dal punto di applicazione verso l'estremità opposta della colonna. Se il composto non avrà interazioni con la fase stazionaria migrerà con il fronte del solvente altrimenti, se trattenuto, subirà un rallentamento, in funzione di uno specifico R_f (fattore di ritenzione) determinato dal seguente rapporto:

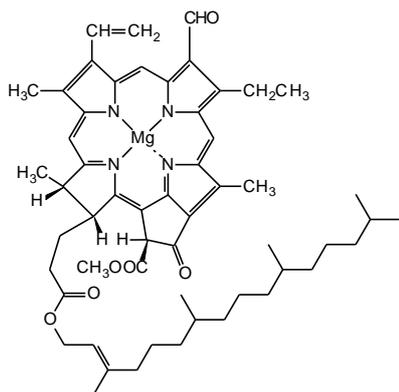
$$R_f = R_p / R_s$$

dove

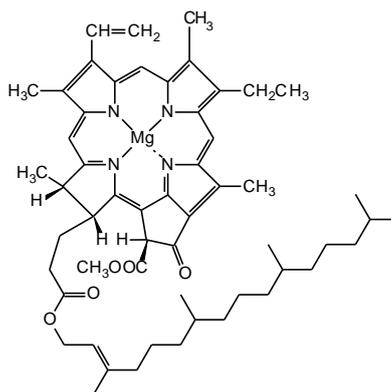
R_p = distanza tra punto di applicazione e banda del pigmento

R_s = distanza tra punto di applicazione e fronte del solvente

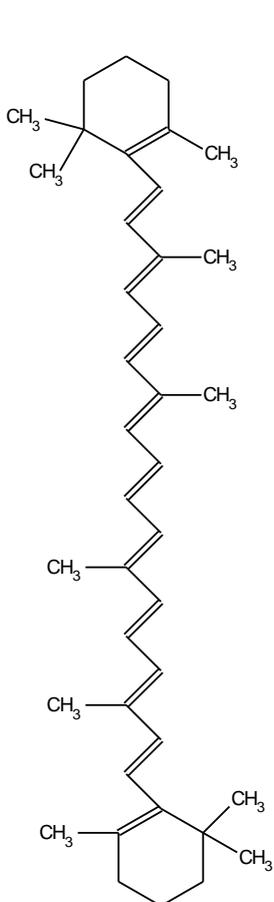
L'ordine di eluizione sarà β - carotene, clorofilla ed infine luteina (banda più scura che rimarrà in colonna).



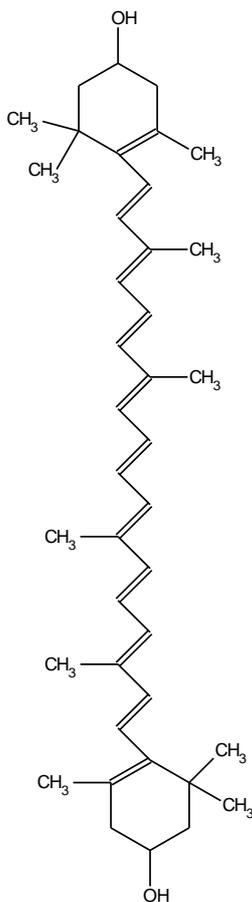
Clorofilla b



Clorofilla a



β - CAROTENE



LUTEINA

Procedura di estrazione

Tagliare a pezzetti le foglie di spinaci e porle nel becker, dove saranno aggiunti 6 ml circa di Etanolo assoluto; pestellare gli spinaci fino ad ottenere una poltiglia di colore verde scuro. Spremere la poltiglia con una spatola, prelevare l'estratto verde scuro contenente i pigmenti fotosintetici con una Pasteur. L'estratto è pronto per la purificazione su colonna cromatografica.

TLC (Thin Layer Chromatography)

TLC su gel di silice

Prima di procedere con la separazione cromatografica, si esegue una TLC su gel di silice per valutare la separazione dei vari pigmenti su quella che sarà la fase stazionaria della colonna.

Preparare la camera di eluizione con una miscela di etere di petrolio – acetone (8:2). Provare comunque altre composizioni di miscela eluente.

Preparare la lastrina TLC segnando leggermente con la matita la linea di base a circa 1 cm dal bordo inferiore. Depositare l'estratto etanologico con l'apposito capillare; attendere l'evaporazione del solvente e porre la lastrina nella camera. Attendere l'eluizione della lastrina sino ad una distanza di circa 1 cm tra fronte del solvente e bordo superiore. Togliere la lastra e segnare con la matita la linea di risalita del solvente.

Aspettare l'evaporazione del solvente e verificare la separazione dei pigmenti in diverse macchie con colorazioni diverse. Calcolare il valore di R_f per le varie macchie.

Procedura di separazione cromatografia

Introdurre un batuffolo di cotone sul fondo della colonna e con l'aiuto di un imbuto introdurre il gel di silice sino ad ottenere un'altezza della fase stazionaria pari a 14 cm.

Impaccare la colonna aggiungendo etere di petrolio (circa 70 ml), aprire il rubinetto della colonna e attendere l'eluizione del solvente all'interno di una beuta. Recuperare il solvente raccolto e riutilizzarlo per ripetere l'operazione sino a completa omogeneizzazione della fase stazionaria. Portare il livello della fase mobile a pari della fase stazionaria e procedere caricando l'estratto in colonna con cautela in modo da evitare il rimescolamento della silice. Lasciate andare il livello del liquido colorato a livello della fase stazionaria.

Inizialmente eluire con etere di petrolio (circa 30 ml), raccogliere in una beuta la prima banda di colore verde chiaro (residui vegetali più apolari); completare l'eluizione aumentando la polarità dell'eluente con etere di petrolio: acetone 8:2 (circa 100 ml).

Terminare la raccolta della prima banda verde chiaro, cambiare beuta e procedere con aumento della polarità dell'eluente con etere di petrolio: acetone 7:3 (circa 100 ml) fino a 6:4 (circa 100 ml), in modo da raccogliere il pigmento giallo-arancio (β -Carotene).

Osservazioni: notare la maggiore migrazione della banda arancio-giallo (β -Carotene) incrementando la polarità della fase mobile.

In un'altra beuta, si eluisce la clorofilla (banda colore verde scuro) e a tale scopo occorre aumentare ulteriormente la polarità dell'eluente, utilizzando etere di petrolio: acetone 1:1 (circa 100 ml). Eluire sino a completa raccolta della banda.

N.B. 3 turni alle 4 colonne:
1, 2, 3, 4 impac. + Ia macchia
5, 6, 7, 8 IIa macchia
9, 10, 7, 8 IIIa macchia

alle TLC (2 polarità)
5-10
1-4