

## SEPARAZIONE IN COLONNA CROMATOGRAFICA DEI PIGMENTI FOGLIARI

### Cenni teorici di estrazione con solventi e cromatografia

L'esperimento proposto consiste nell'estrazione e successiva separazione con tecniche cromatografiche dei pigmenti colorati contenuti nelle foglie di spinacio, in particolare la clorofilla *a* e la clorofilla *b*.

Durante la prima parte, le foglie vengono trattate con una miscela opportuna di solventi tali da sciogliere solo i pigmenti stessi e non la parte fibrosa del vegetale. Dato che tutti e due i tipi di clorofilla vengono però estratti contemporaneamente, si deve poi ricorrere ad una tecnica specifica per poterli separare l'uno dall'altro.

La tecnica generalmente impiegata si chiama cromatografia, utilizzata per la prima volta nel 1906 dal botanico russo M. Tswett proprio per separare pigmenti vegetali di differenti colori (da qui l'origine del nome di questa tecnica, dal greco *chromatos* che significa colore). In tutti i diversi tipi di cromatografia si ha sempre una fase fissa detta fase stazionaria, su cui viene supportata la sostanza da separare, ed una fase mobile che generalmente è costituita da uno o più solventi di diversa polarità che si fanno percolare attraverso la fase stazionaria. In prima approssimazione, il liquido si muove attraverso gli interstizi delle particelle del solido finemente suddiviso che presenta così una grande superficie di contatto; se le sostanze da separare sono completamente inerti verso la superficie solida si muovono con la stessa velocità del fluido e non si osserva separazione. Se però, come accade, i soluti interagiscono in qualche maniera con la superficie, o per adsorbimento o per dissoluzione o per formazione di legami chimici, allora sono ritardati nel loro spostamento relativo rispetto allo spostamento del solvente. In altre parole, a causa del potere di adsorbimento selettivo della fase stazionaria, i componenti si muovono lungo la colonna con velocità differenti. Un componente che è adsorbito in maniera più debole si muoverà più velocemente di uno che invece è adsorbito in maniera più forte. Se le sostanze da separare sono di natura anche solo leggermente differente, la loro interazione con la fase stazionaria e la fase mobile è differente, e di conseguenza il loro spostamento. Si vengono così a creare delle bande che poi possono essere isolate e rivelate man mano che escono dalla colonna. In pratica si hanno successivi e multipli processi di adsorbimento e deadsorbimento in un processo di equilibrio in cui le sostanze da separare si distribuiscono nelle due fasi presenti nel sistema. L'adsorbimento delle sostanze da separare sulla fase stazionaria dipende dalla superficie e dalla natura chimica dei diversi materiali che sono in gioco. Il deadsorbimento da parte dell'eluente (cioè del solvente usato come fase mobile) dipende principalmente da una sua proprietà chiamata polarità che dipende dalla distribuzione di cariche nella sostanza.

## Strumenti

Colonna cromatografica di circa 18 cm di lunghezza e 1 cm di diametro, munita di rubinetto alla base, supporto ad asta con fissaggio, 2 beute codate per aspirazione sotto vuoto con raccordo per la pompa a getto d'acqua, imbuto separatore, matraccio graduato da 250 ml, guanti e occhiali protettivi.

## Reagenti chimici

Quattro foglie fresche di spinacio, carbonato di calcio anidro fatto essiccare in stufa a 150°C, solfato di sodio anidro, toluene, metanolo, etere di petrolio, dietilere, batuffolo di ovatta, sabbia.

## Esecuzione dell'esperimento

Le foglie di spinacio vengono messe nel matraccio con una miscela composta da 45 ml di etere di petrolio, 5 ml di toluene e 15 ml di metanolo. Dopo aver lasciato riposare per un'ora, il residuo vegetale viene separato dalla soluzione per filtrazione con filtro di carta, e lavato con la stessa miscela di solventi. Mediante un attento trattamento con acqua nell'imbuto separatore, si allontana il metanolo, e poi si essicca la soluzione verde ottenuta con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Separare il sale mediante filtrazione con filtro di carta.

Per preparare la colonna cromatografica si prende il tubo di vetro e vi si versa un'opportuna quantità di etere di petrolio mantenendo il rubinetto chiuso e inserendo contemporaneamente alla base della colonna un batuffolo di ovatta. Si introduce poi abbastanza sabbia da formare uno strato di un centimetro sopra il batuffolo di cotone. Aggiungere poi lentamente il carbonato di calcio fino ad ottenere uno strato spesso 4 cm battendo leggermente sulla colonna con un tubo di gomma in modo che la stratificazione sia il più possibile omogenea. Lavare le pareti della colonna con etere di petrolio in modo da recuperare l'eventuale carbonato rimastovi attaccato, quindi aprire il rubinetto in basso per eliminare l'etere di petrolio in eccesso (bisogna farlo arrivare fino al livello dello strato superiore di carbonato). Far percolare la soluzione verde ottenuta in precedenza mediante un imbuto separatore fissato opportunamente ad un'estremità della colonna. Immediatamente si formano vari strati, dei quali quello superiore di colore giallo-verde, contiene clorofilla *b*, quello azzurro-verde invece clorofilla *a*. Si separano le regioni colorate mediante una miscela eluente di etere di petrolio : toluene (4 : 1) e si raccolgono le due frazioni nelle beute codate.

