**TP 2: Extraction, identification et séparation des pigments colorés de l’épinard**

**Principe**

Lorsque les cellules végétales sont écrasées, elles libèrent essentiellement deux types de pigments : les chlorophylles et les caroténoïdes. La chlorophylle est un pigment qui donne la coloration verte aux plantes végétales. Elle intervient dans la photosynthèse. Elle contient un mélange de plusieurs molécules de structures chimiques très proches. Les chlorophylles a et b sont les plus abondantes dans ces plantes. Les caroténoïdes sont des pigments jaunes ou orange. On distingue deux familles de caroténoïdes : **les carotènes** et **les xanthophylles**.

L’objectif de ce TP est de séparer les constituants colorés de l’épinard puis de monter l’intérêt de la chromatographie sur colonne vis à vis de la chromatographie sur couche mince.

**Extraction de la chlorophylle brute**

La chlorophylle dite brute contient des chlorophylles a et b, des carotènes et de la xanthophylle

**Protocole expérimental :**

* Placer dans un mortier un peu de sable, ajouter quelques feuilles bien vertes (épinards) coupées en petits morceaux.
	+ Broyer à sec les feuilles (destruction des parois cellulaires)
* Ajouter très peu d’alcool à 95° pour solubiliser certaines substances et continuer à broyer doucement pendant 5 minutes
* Dans un bécher, verser la solution contenue dans le mortier.
* La solution obtenue est dite « chlorophylle brute ».

**L’analyse de la chlorophylle brute par chromatographie sur couche mince**

* Préparer trois plaques de chromatographie sur couche mince de gel de silice (3 × 6cm)
* Tracer au crayon la ligne de dépôt à 1 cm du bord inferieur et une ligne du bord supérieur à 0.5 cm.
* Déposer à l’aide d’un capillaire 2 ou 3 gouttes d’extrait des épinards chlorophylle brutenotée Ep.
* Préparer comme premier éluant le mélange de solvants suivant (Ether de pétrole/Acétone/Cyclohexane) dans les proportions (85/10/5%) et le 2ème éluant (éther de pétrole/acétate d’éthyle) (30/70%), le 3ème éluant (éther de pétrole/ acétone) (95/5), le 4ème éluant (Cyclohexane/ acétate d’éthyle) (80/20) et le 5ème éluant chloroforme (100%).
* Placer une des cinq plaques dans un bécher (cuve) numéroté 1 qui contient le premier éluant, la deuxième plaque dans un bécher 2 qui contient le 2ème éluant, la troisième plaque dans un bécher 3 qui contient le 3ème éluant et ainsi de suite.
* Fermer les cuves. Laisser l’élution se faire.
	+ Lorsque le solvant est arrivé à la ligne du bord supérieur, sortir les plaques.
* Sécher et observer.

**Compte rendu**

* Révéler par lampe UV 254 nm toutes les plaques CCM en indiquant le système d’élution qui donne la meilleure séparation.
* Combien de tache observe-t-on pour chacun des dépôts à l’œil nu.
* Entourer les spots apparaissent sous la lampe UV et donner la couleur de chacune.
* Dessiner les chromatogrammes en indiquant les couleurs des taches et les noms des principales espèces colorées relatives et calculer le rapport frontal pour chacune.
* Mettre en ordre par polarité les principales espèces colorées de la chlorophylle, par conséquence quel est l’espèce qui migre la plus rapide avec l’éluant, indiquer sa couleur sur les chromatogrammes.
* Quel est le meilleur éluant on peut utiliser pour séparer les composants de l’épinard par la Chromatographie sur colonne, justifié.