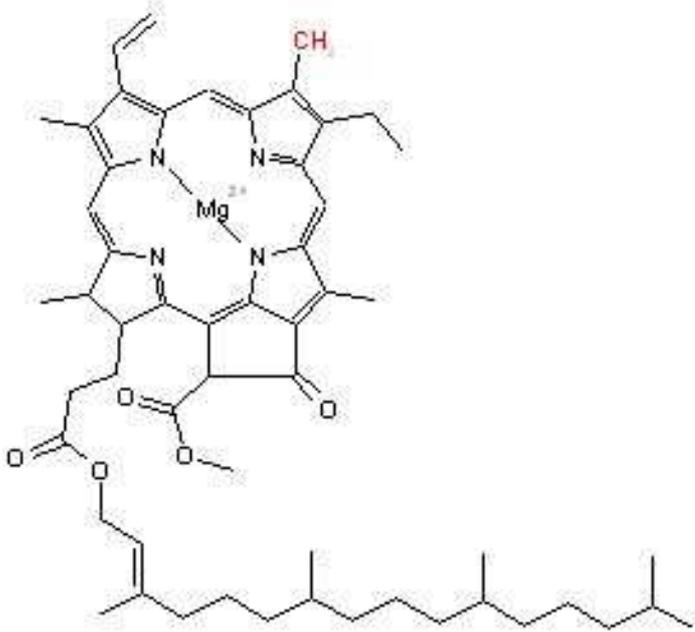


TP de Spécialité n°10 Extraction des colorants des épinards

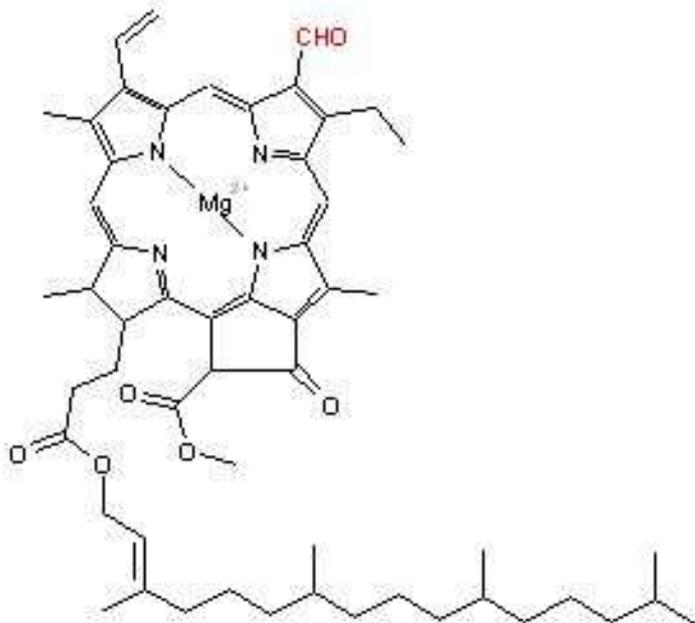
1 Introduction : lien structure & propriétés

Ce que l'on nomme couramment *chlorophylle* est en réalité un mélange de plusieurs molécules de structures chimiques très proches. On distingue ainsi les chlorophylles a, b, c et d ainsi que quelques dérivés apparentés.

Les chlorophylles a et b sont les plus abondantes chez les plantes supérieures et algues vertes, en proportions variables suivant l'espèce. Les chlorophylles c et d sont plutôt présentes chez les algues brunes et cyanobactéries.



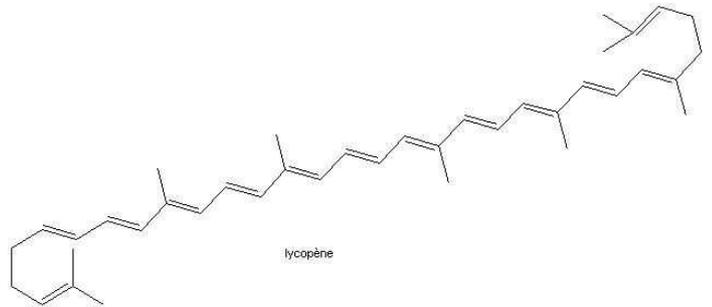
Chlorophylle a : couleur bleu-vert



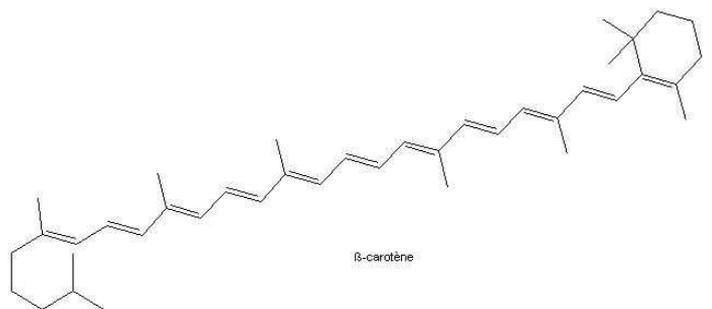
Chlorophylle b : couleur vert-jaune

Q1 Comparer la formule des 2 chlorophylles ; quelle molécule est la plus polaire ?

En plus des chlorophylles, il y a les carotènes dont :

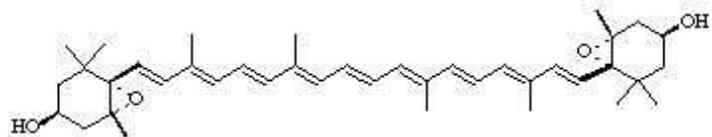


Lycopène : couleur jaune

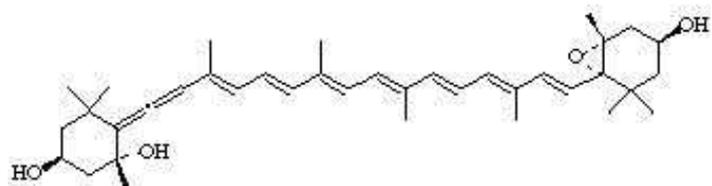


β-carotène : couleur jaune

Sont présents aussi les xanthophylles :



Violaxanthine : couleur jaune



Néoxanthine : couleur jaune

Q2 Parmi ces molécules, lesquelles sont polaires ou apolaires ?

2 Extraction des colorants

- Placer environ 10 g d'épinards hachés surgelés (préablement décongelés) dans un mortier ; ajouter 2 spatules de sable de Fontainebleau et 10 mL de dichlorométhane.
- Broyer jusqu'à ce que le solvant soit vert foncé.
- Filtrer, bien essorer les épinards à l'aide de la spatule.
- Récupérer le filtrat dans un bécher

3 Réalisation de la CCM

- Préparer 20 mL d'éluant en réalisant un mélange éther de pétrole/éther diéthylique en proportion 40/60. Le mélange est prêt sous la hotte.
- Sous la hotte, placer 10 mL d'éluant dans la cuve chromato (pot bébé) et les 10 autres mL dans un erlen bouché.
- Préparer une plaque chromatographique ; vous ferez 1 dépôt de l'extrait d'épinards, et 1 dépôt d'extrait de carotte, déjà prêt ; les dépôts doivent être vert (respectivement orange) foncé, sinon concentrer les dépôts (réaliser des spots au même endroit, en séchant à la main entre chaque spot).
- Placer la plaque dans la cuve et surveiller le front du solvant.
- Sécher la plaque à la main ; entourer avec soin les taches colorées.

Q3 Dessiner le chromatogramme en précisant les couleurs observées (les colorants sont photosensibles, les couleurs disparaissent en 2 h).

Q4 Qu'est ce que l'éther de pétrole ?

Q5 L'éluant est il apolaire ? peu polaire ? très polaire ?

Q6 Essayer d'attribuer les taches aux molécules décrites précédemment.

Q7 Calculer les rapports frontaux de chaque colorant.

4 Séparation des colorants par chromatographie sur colonne (technique minichimie)

On utilise comme colonne une pipette Pasteur, dans laquelle on introduit une boulette de coton bien serrée et bien tassée, qui jouera le rôle de filtre et de bouchon.

- Préparer une série de tubes à essais propres et secs et les numéroter.
- Verser au dessus du coton de la silice en poudre, puis tasser en frappant doucement le corps de la pipette avec une spatule. Le rapport longueur/diamètre doit être de 10 environ, donc 6 cm environ de longueur pour la colonne. Ajouter un peu de sable.
- Verser l'éluant préparé précédemment à l'aide d'une pipette Pasteur ou directement avec l'éprouvette : la colonne bien réussie doit prendre un aspect uniformément translucide, et le liquide, une fois arrivé au niveau du coton, doit s'écouler très lentement. Si une de ces conditions n'est pas remplie, recommencer. En cours de manipulation, si on est amené à arrêter « artificiellement » l'écoulement du liquide, on pourra boucher l'orifice inférieur avec le doigt.
- Quand le liquide arrive au niveau de la surface supérieure du sable, introduire environ 0,5 mL d'extrait d'épinards sur le sable, le plus près possible de la surface, sans perturber celle-ci.
- Laisser pénétrer l'extrait dans le sable, puis remplir la pipette avec l'éluant jusqu'en haut.
- Changer de tube judicieusement pour obtenir les couleurs les plus pures et les plus concentrées possibles. Ces fractions seront passées au spectrophotomètre la semaine prochaine.

Q8 Quels colorants ont été séparés ? Est-ce que chaque fraction contient uniquement un seul colorant ?

Remerciements pour le sujet : Stéphanie MORTIER, PC Blaise-Pascal, Olympiades de Chimie 2009*

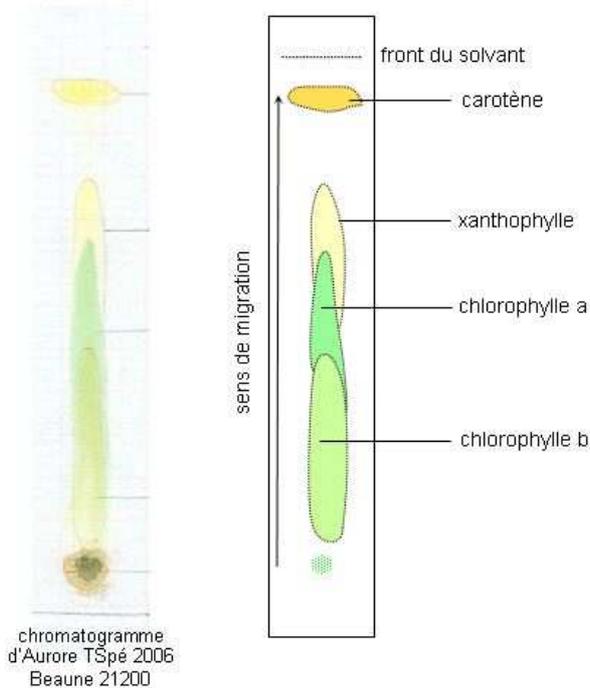


Correction du TP de Spécialité n°10 Extraction des colorants des épinards

Q1 La chlorophylle (a) a un groupe méthyle $-CH_3$ en haut à droite, alors que la chlorophylle (b) a au même endroit une fonction aldéhyde, un groupe carbonyle $-CHO$ (comportant la fonction carbonyle $C=O$, commune aux aldéhydes et cétones). La chlorophylle (b) est donc plus polaire que la (a).

Q2 Le lycopène et le *beta*-carotène, formées de longues chaînes carbonées, sont plutôt apolaires ; La violaxanthine et la néoxanthine, dont les groupes extrêmes portent des groupes alcools $R-OH$ et éther-oxyde $R-O-R'$ sont polaires.

Q3 Chromatogramme typiquement obtenu :



Q4 L'éther de pétrole est un mélange d'alcane.

Q5 L'éluant est un mélange d'un solvant apolaire (l'éther de pétrole) et d'un solvant polaire (l'éther diéthylique, qui est l'éthoxy-éthane CH_3-O-CH_3). L'éluant cumule donc les deux caractéristiques, polaire et apolaire, avec une petite dominance du caractère polaire puisque formé de 60 % d'éther diéthylique.

Q6 Dans l'attribution des tâches, on ne manquera pas d'observer que les molécules sont classées par ordre inverse de polarité : le β -carotène, peu polaire, migre plus haut que les xanthophylles, eux-mêmes moins polaires que les deux formes de chlorophylle, la chlorophylle la plus polaire, la (b), migrant le moins haut.

La hauteur de migration d'une tâche dépend de deux paramètres : l'affinité de la molécule avec l'éluant, et l'affinité avec la phase fixe. De toute

évidence, la phase fixe (silice) retient mieux les molécules polaires, alors même que l'éluant fait plus migrer les molécules apolaires. Ce dernier point ne peut s'expliquer que pour un éluant plutôt apolaire, donc en contradiction avec la question précédente, selon le principe que les molécules vont partager des *affinités* seulement si elles se ressemblent.

Ma réflexion sur ce point va donc se poursuivre, et j'espère avoir stimulé la votre.

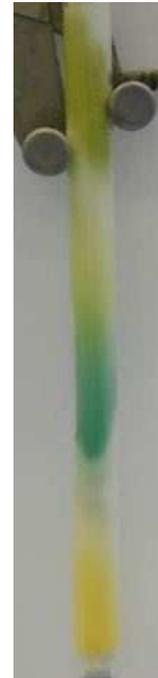
Q7 Rappel de la formule de calcul des rapports frontaux :

$$R_f = \frac{d_{\text{tache}}}{d_{\text{éluant}}}$$

Les mesures de distance sont à mener en centimètres, le rapport frontal étant sans unité.

Q8 Sur le chromatogramme, on constate une séparation des colorants suivants :

- en bas, β -carotène, jaune ;
- en vert foncé, chlorophylle (a) ;
- en vert olive, chlorophylle (b).



On remarquera que, puisque l'éluant descend par gravité le long de la colonne, les couleurs sont inversées par rapport à la chromatographie sur couche mince !

Quand on recueille les *fractions* en bas de colonne, c'est-à-dire quand on remplit un petit tube lors du passage de chaque couleur, on peut en théorie séparer les couleurs, la pratique dépendant de la longueur de la colonne et du soin apporté par l'élève (le professeur étant quant à lui au dessus de la mélé).