Laboratorio del Corso di Chimica delle Sostanze Organiche Naturali
AA 2026-2027
Prof. ssa Brigida D'Abrosca

Estrazione di clorofille e carotenoidi dagli spinaci e loro separazione mediante cromatografia di adsorbimento su colonna

Scopo dell'esperienza. Separazione mediante cromatografia di adsorbimento su colonna di gel di silice (SiO_2) dell'estratto acetonico, ottenuto mediante macerazione di foglie di spinaci

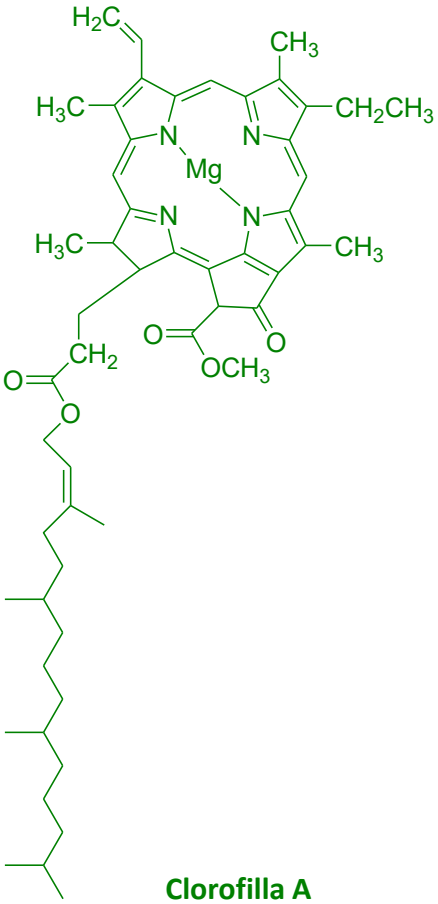
PRINCIPI DEL METODO

In questa esperienza si effettuerà una separazione, mediante cromatografia di adsorbimento su colonna, di un estratto acetonico di foglie di spinaci. L'accuratezza della separazione ottenuta sarà verificata con una cromatografia di adsorbimento su strato sottile (TLC).

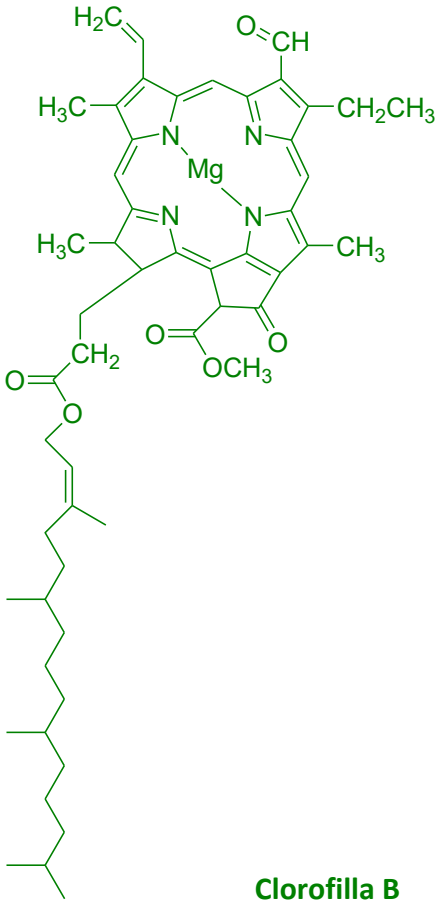
La colonna presenta una fase solida polare (gel di silice) e tratterà maggiormente durante l'eluizione con acetato di etile/ etere di petrolio i composti più polari. Le molecole del campione polari vengono adsorbite dal gruppo ossidrilico presente sulla superficie della resina utilizzata. La fase mobile polare fluisce continuamente nella colonna indebolendo il legame tra il campione ed il gruppo attivo presente sulla resina.

Questo tipo di processo continua fino alla fine della colonna permettendo la separazione dei vari pigmenti in base alla forza dei legami che si instaurano con la fase stazionaria.

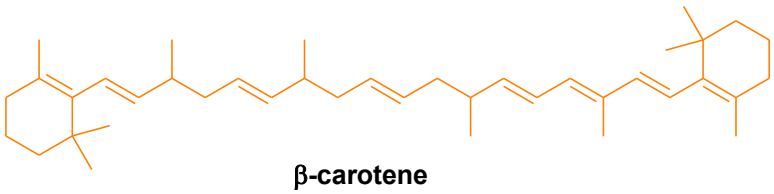
L'ordine di eluizione sarà β-carotene, clorofille, ed infine luteina (dal composto più apolare a quello più polare).



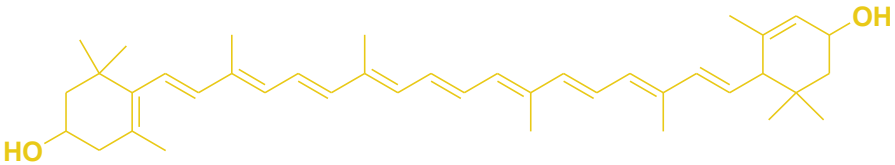
Clorofilla A



Clorofilla B



β-carotene



Luteina

Le frazioni ottenute dalla colonna cromatografica vengono controllate con una cromatografia in strato sottile (TLC) usando lastrine di silice. Per ogni macchia quindi il corrispondente composto può essere caratterizzato da un valore di Rf

distanza della macchia dal punto di partenza (cm)

Rf = ----------

distanza del fronte del solvente dal punto di partenza (cm)

Anche in questo caso si tratta di una cromatografia di adsorbimento ciò implica che le molecole più polari verranno eluite meno e quindi presenteranno un valore di Rf inferiore a quello di composti meno polari. Si riuniscono le frazioni che contengono lo stesso composto e si portano a secco in rotavapor.

NORME DI SICUREZZA

Le norme di sicurezza saranno illustrate a lezione dal docente.

Le schede di sicurezza sono riportate in appendice.

Parte prima -ESTRAZIONE PIGMENTI DA SPINACI

Materiale:

Da prelevare dal cassetto di laboratorio	
mortaio e pestello	
pallone con collo smerigliato	
imbuto	
Consegnato dal docente nel corso dell'esperienza:	
carta filtro	
Da prelevare nel corso dell'esperienza su indicazione del docente:	
Acetone	
Acetato di etile	
Solfato di sodio anidro	
Etere di petrolio	
A cura dello studente	
Foglie di spinaci	

Pesare e triturare in mortaio circa 10 g di foglie di spinaci finché si presentano molto fini, usare circa 30 mL di acetone per la prima estrazione. Attendere 10 minuti per la macerazione, successivamente filtrare l'estratto ottenuto servendosi di un imbuto equipaggiato con carta da filtro. Anidrificare la fase liquida con due spatolate di solfato di sodio, poi filtrare la soluzione nel pallone (precedentemente tarato); ripetere per due volte il procedimento aggiungendo circa 10 mL alla volta di acetone al residuo rimasto nel mortaio. Portare a secco la soluzione contenuta nel pallone e pesare. Calcolare la massa di pigmenti estratti ed esprimere il risultato come mg di pigmenti per g di foglie.

Riprendere l'estratto essiccato con 2 mL di acetato di etile.

Parte seconda - SEPARAZIONE MEDIANTE CROMATOGRAFIA SU COLONNA

Materiale:

Da prelevare dal cassetto di laboratorio	
Pipetta Pasteur	becker da 150 ml
bacchetta di vetro	
imbuto	
Consegnato dal docente nel corso dell'esperienza:	
colonna cromatografia in vetro, stativo, pinza e morsetto	
5 palloni da 250 ml	
Da prelevare nel corso dell'esperienza su indicazione del docente:	
10 g di gel di silice	
Acetato di etile	
1 spatolata di sabbia	
Etere di petrolio	
A cura dello studente	
Pennarello	

Impaccare circa 20 cm di colonna con gel di silice. Per far questo mettere 10 g di gel di silice in un becker con 60 mL di soluzione di etere di petrolio – acetato di etile (9 : 1), omogeneizzare con una bacchetta di vetro e versare il tutto con un imbuto nella colonna (rubinetto aperto). Aprire il rubinetto e raccogliere in un becker la soluzione che fuoriesce facendo attenzione a non lasciare andare a secco la colonna (ciò comporta la formazione di cammini preferenziali con perdita di

efficienza e risoluzione della colonna). Riempire e svuotare ripetutamente la colonna con la soluzione etere – acetato fino a quando la fase solida (gel di silice) non presenta un colore bianco uniforme sinonimo di assenza di cammini preferenziali. Portare il limite dell'etere a 2 o 3 mm dal gel di silice, aggiungere una spatolata di sabbia (circa 0.5 – 1 cm di spessore) in testa alla colonna ed aiutandosi con una pipetta da 1 mL versare nella colonna 1 mL dell'estratto precedentemente disciolto in 2 ml della soluzione etere di petrolio – acetato di etile (9 : 1), e lasciarlo adsorbire sulla sabbia. Aprire leggermente il rubinetto della colonna e far migrare il campione fino al gel di silice senza lasciare andare a secco la colonna.

Si aggiungono quindi in sequenza 5 soluzioni di eluente a differente polarità (metodo eluizione in gradiente):

1. 50 mL di soluzione etere di petrolio – acetato di etile 9:1
2. 50 mL di soluzione etere di petrolio – acetato di etile 3:1
3. 50 mL di soluzione etere di petrolio – acetato di etile 1:1
4. 50 mL di soluzione etere di petrolio – acetato di etile 1:3
5. 50 mL di acetato di etile

I pigmenti adsorbiti migreranno nella colonna formando una serie di bande diversamente colorate. Raccogliere separatamente le varie bande colorate in palloni da 250 mL. Si dovrebbero ottenere almeno cinque frazioni:

a) caroteni: giallo scuri

b) clorofille + caroteni

c) clorofille: verdi

d) luteina : gialla

e) altri caroteni polari

Parte terza – Analisi Dell'efficienza Della Separazione Mediante Cromatografia su Strato Sottile (TLC)

Da prelevare dal cassetto di laboratorio	
Camera Cromatografica	
Consegnato dal docente nel corso dell'esperienza:	
lastra cromatografica di gel di silice	
Capillari in vetro	

Da prelevare nel corso dell'esperienza su indicazione del docente:	
Acetato di etile	
Etere di petrolio	
A cura dello studente	
matita	

Tracciare (marcandolo con una riga a matita), ad 1 cm circa dal margine inferiore di una lastrina TLC di silice, la linea di semina del campione e depositarvi, aiutandosi con un capillare di vetro, una piccola quantità delle frazioni ottenute dalla colonna cromatografica oltre che una piccola aliquota dell'estratto iniziale.

Preparare la miscela di eluizione etere di petrolio - acetato di etile 1:1 (10 mL) e versarla nella camera cromatografica. Eluire la lastrina: si noteranno delle macchie colorate a distanze diverse dal punto di semina. Determinare per ogni macchia il valore di Rf ed accorpare tra loro i pigmenti separati con colonna che presentano il medesimo valore di Rf in TLC.

Appendice: Schede di sicurezza

ACETATO DI ETILE

Etichettatura secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008

Pittogramma



Avvertenza	Pericolo
Indicazioni di pericolo	
H225	Liquido e vapori facilmente infiammabili.
H319	Provoca grave irritazione oculare.
H336	Può provocare sonnolenza o vertigini.
Consigli di prudenza	
P210	Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare.
P233	Tenere il recipiente ben chiuso.
P240	Mettere a terra e a massa il contenitore e il dispositivo ricevente.
P241	Utilizzare impianti elettrici/ di ventilazione/ d'illuminazione a prova di esplosione.
P242	Utilizzare utensili antiscintillamento.
P305 + P351 + P338	IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare.
Informazioni supplementari sui pericoli (EU)	
EUH066	L'esposizione ripetuta può provocare secchezza o screpolature della pelle.

ETERE DI PETROLIO

Etichettatura (REGOLAMENTO (CE) N. 1272/2008)

Pittogrammi di pericolo :



Avvertenza : Pericolo

Indicazioni di pericolo :

H225	Liquido e vapori facilmente infiammabili.
H304	Può essere letale in caso di ingestione e di penetrazione nelle vie respiratorie.
H315	Provoca irritazione cutanea.
H336	Può provocare sonnolenza o vertigini.
H361f	Sospettato di nuocere alla fertilità.
H372	Provoca danni agli organi (Sistema nervoso) in caso di esposizione prolungata o ripetuta se inalato.
H411	Tossico per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

Consigli di prudenza :

Prevenzione:

P210	Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare.
P273	Non disperdere nell'ambiente.
P280	Indossare guanti/ indumenti protettivi/ proteggere gli occhi/ proteggere il viso.

Reazione:

P301 + P310	IN CASO DI INGESTIONE: contattare immediatamente un CENTRO ANTIVELENI/ un medico.
P303 + P361 + P353	IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE (o con i capelli): togliersi di dosso immediatamente tutti gli indumenti contaminati. Sciacquare la pelle.
P331	NON provocare il vomito.

ACETONE

Etichettatura secondo il Regolamento (CE) n. 1272/2008 (CLP)

- Avvertenza pericolo

- Pittogrammi

GHS02, GHS07



- Indicazioni di pericolo

H225	Liquido e vapori facilmente infiammabili.
H319	Provoca grave irritazione oculare.
H336	Può provocare sonnolenza o vertigini.

- Consigli di prudenza

P210	Tenere lontano da fonti di calore, superfici calde, scintille, fiamme libere o altre fonti di accensione. Non fumare.
P261	Evitare di respirare la polvere/i fumi/i gas/la nebbia/i vapori/gli aerosol.
P312	In caso di malessere, contattare un CENTRO ANTIVELENI/un medico.
P370+P378	In caso di incendio: utilizzare sabbia, anidride carbonica o estinguenti in polvere per estinguere.
P403+P233	Tenere il recipiente ben chiuso e in luogo ben ventilato.
P403+P235	Conservare in luogo fresco e ben ventilato.
P501	Smaltire il prodotto/recipiente in impianto di combustione industriale.

- Informazioni supplementari sui pericoli

EUH066	L'esposizione ripetuta può provocare secchezza o screpolature della pelle.