

Protocole de TP



Réaliser une chromatographie des pigments d'une feuille verte

► **Matériel nécessaire :**

- feuilles d'un végétal, par exemple épinard ou mâche. Cette manipulation peut également être menée sur un matériel biologique non chlorophyllien (racines, partie blanche de feuilles panachées...) par exemple pouvant servir de témoin.

*[Étape 1]*

- mortier et pilon ou mixeur
- sable de Fontainebleau (facultatif)
- ciseaux fins
- papier filtre plissé
- entonnoir
- erlenmeyer (50 mL)
- alcool à 90° ou 95° ou acétone  
- carbonate de calcium (facultatif)

*[Étape 2]*

- éprouvette (250 mL) avec bouchon résistant aux vapeurs de solvants et dispositif d'accroche du papier Whatman
- dispositif d'occultation de l'éprouvette (papier noir entourant l'éprouvette ou papier aluminium)
- papier Whatman n° 1
- sèche-cheveux (facultatif)
- solvant pour chromatographie :

5 mL de cyclohexane      
85 mL d'éther de pétrole  
10 mL d'acétone

ou

98 mL de dichlorométhane   
2 mL de méthanol   

Remarque : selon le solvant utilisé, vous n'obtiendrez pas les mêmes résultats.

► **Équipements individuels de protection :** 

**Compte tenu des produits utilisés, il est tout d'abord nécessaire de s'équiper des protections individuelles suivantes :**



**Les manipulations doivent être réalisées sous hotte ou un endroit bien ventilé.**

► **Protocole :**

### **ÉTAPE 1 : EXTRACTION DES PIGMENTS**

***(cette étape peut être évitée dans le cas du Protocole 2 de la séparation des pigments par chromatographie sur papier)***

1. Couper des morceaux de feuilles (2 à 3 g) dans le mortier ou le mixeur.
2. Introduire 20 mL d'acétone ou alcool, une pointe de spatule de carbonate de calcium (facultatif) et du sable de Fontainebleau (facultatif).
3. Broyer à l'aide du pilon jusqu'à l'obtention d'une solution verte ou mettre en route le mixeur.
4. Filtrer pour obtenir une solution de pigments.
5. Réaliser la même extraction avec les résidus du filtre dans 10 mL d'acétone (ou alcool).
6. Réunir les 2 filtrats qui constituent l'extrait de pigments totaux.

### ÉTAPE 2 : SÉPARATION DES PIGMENTS PAR CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

#### Étape préliminaire : préparation de la cuve à chromatographie

1. Introduire 1 cm de solvant pour chromatographie dans le fond de l'éprouvette. Veiller à ne pas toucher avec les doigts le papier Whatman sur le trajet de la migration (ne touchez que les bords !)
7. Vérifier la longueur de votre papier dans l'éprouvette avec le bouchon (Réalisez si nécessaire un trou pour maintenir le papier au bouchon).
8. Tracer à l'aide d'un crayon à papier (graphite) à 2 cm un trait horizontal à partir du bord inférieur qui correspondra à la ligne de dépôt.

#### Protocole 1 : à partir de l'extrait de pigments totaux

1. À l'aide d'une pipette capillaire, déposer au centre de la ligne de dépôt une goutte de l'extrait de pigments totaux.
2. Laisser sécher ou accélérer l'évaporation de l'alcool à l'aide d'un sèche-cheveux.
3. Recommencer la manipulation 6 à 8 fois.
9. Introduire le papier Whatman dans l'éprouvette.
10. Fermer l'éprouvette et cacher de la lumière pour laisser le solvant migrer jusqu'à la partie supérieure de la feuille de papier à chromatographie.

#### Protocole 2 (après avoir réalisé l'étape préliminaire)

1. Sur une plaque de verre ou de faïence, à l'aide d'un agitateur, écraser un fragment de feuille au centre de la ligne de dépôt sur le papier Whatman.
11. Introduire le papier Whatman dans l'éprouvette.
12. Fermer l'éprouvette et cacher de la lumière pour laisser le solvant migrer jusqu'à la partie supérieure de la feuille de papier à chromatographie.