

PRACTICA 6

SEPARACIÓN, IDENTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LOS PIGMENTOS CLOROPLÁSTICOS

En esta práctica vamos a realizar la separación e identificación de los pigmentos cloroplásticos, por medio de una cromatografía en capa fina. También realizaremos su identificación espectrofotométrica. Para ello procederemos del siguiente modo:

Cogemos hojas de espinacas, a las que les cortaremos los nervios centrales, y pesaremos hasta obtener 5 gr. Después cortaremos las hojas en porciones pequeñas y las añadiremos a un mortero junto a una cucharada de y 25 ml. de acetona. A continuación machacamos bien las hojas.

Seguidamente procederemos al filtrado de la solución resultante en un embudo Buchner. Hay que humedecer el filtro con una gotas de acetona, para que le filtro se adhiera bien al embudo.

Una vez filtrado el extracto verde se introduce en un embudo de decantación junto con unas gotas de éter de petróleo. Hay que recordar que tenemos que mezclar bien el extracto por inversión.

Cuando se ha producido la separación en dos fases, se elimina la capa inferior. Hay que tener cuidado que no que de ningún resto de la fase inferior en la superior, por ello es mejor derramar un poco de la fase superior para asegurarse. La parte superior se recoge en un vaso de precipitados que tiene que estar bien seco.

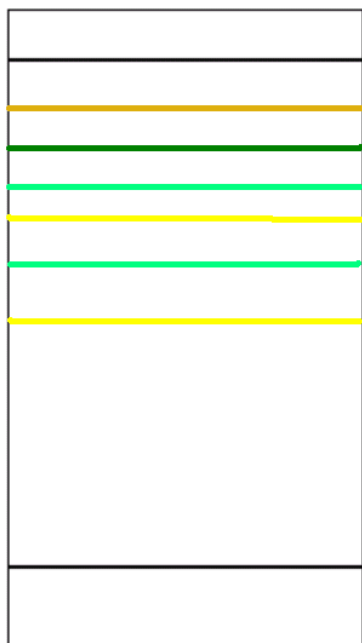
Una vez extraída la fase superior se procede a la separación de los pigmentos por medio de una cromatografía en capa fina. Para ello tomamos una placa de silica gel, en ella señalamos dos marcas, una en la parte inferior a 2 cm. y la superior a 16 cm. de la anterior. Tenemos que tener en cuenta al realizar las marcas de no hacerlo con bolígrafo sino que con lápiz y suavemente, para que la tinta no interfiera en la cromatografía con sus pigmentos. Una vez realizadas las marca se pasamos a la aplicación del extracto en la placa. Aplicaremos el extracto en la marca inferior con un microcapilar, haremos 5 o 6 aplicaciones con el capilar. Por último se introduce la placa en una tarro con un disolvente y se cierra. Según el éter sube se va produciendo la separación de los pigmentos. Si al retirar la placa del tarro el disolvente diluyó más que la marca superior tendrá que realizar otra marca y contar esta no la anterior.

Para determinar los pigmentos vamos a usar dos métodos:

- la medida del R_f
- la medida de su espectro de absorbancia.

El R_f es es el coeficiente entre lo que se desplaza el pigmento en la cromatografía y lo que se desplaza el disolvente empleado.

Para obtener el espectro de absorbancia mediremos la absorbancia a longitudes de onda distintas para todos los pigmentos y los representaremos en una gráfica.



16.75 cm disolvente

Pigmento 1 16.4 cm (amarillo anaranjado)

Pigmento 2 14.8 cm (verde oscuro)

Pigmento 3 14.0 cm (verde claro)

Pigmento 4 13.2 cm (amarillo claro)

Pigmento 5 11.2 cm (verde muy claro)

Pigmento 6 8.7 cm (amarillo verde muy claro)

0 cm inicio

Mirando el valor en la tabla:

Rf 1 = 0.98 B – Caroteno

Rf 2 = 0.88 Clorofila A

Rf 3 = 0.84 Clorofila B

Rf 4 = 0.79 Luteína

Rf 5 = 0.67 Violaxantina

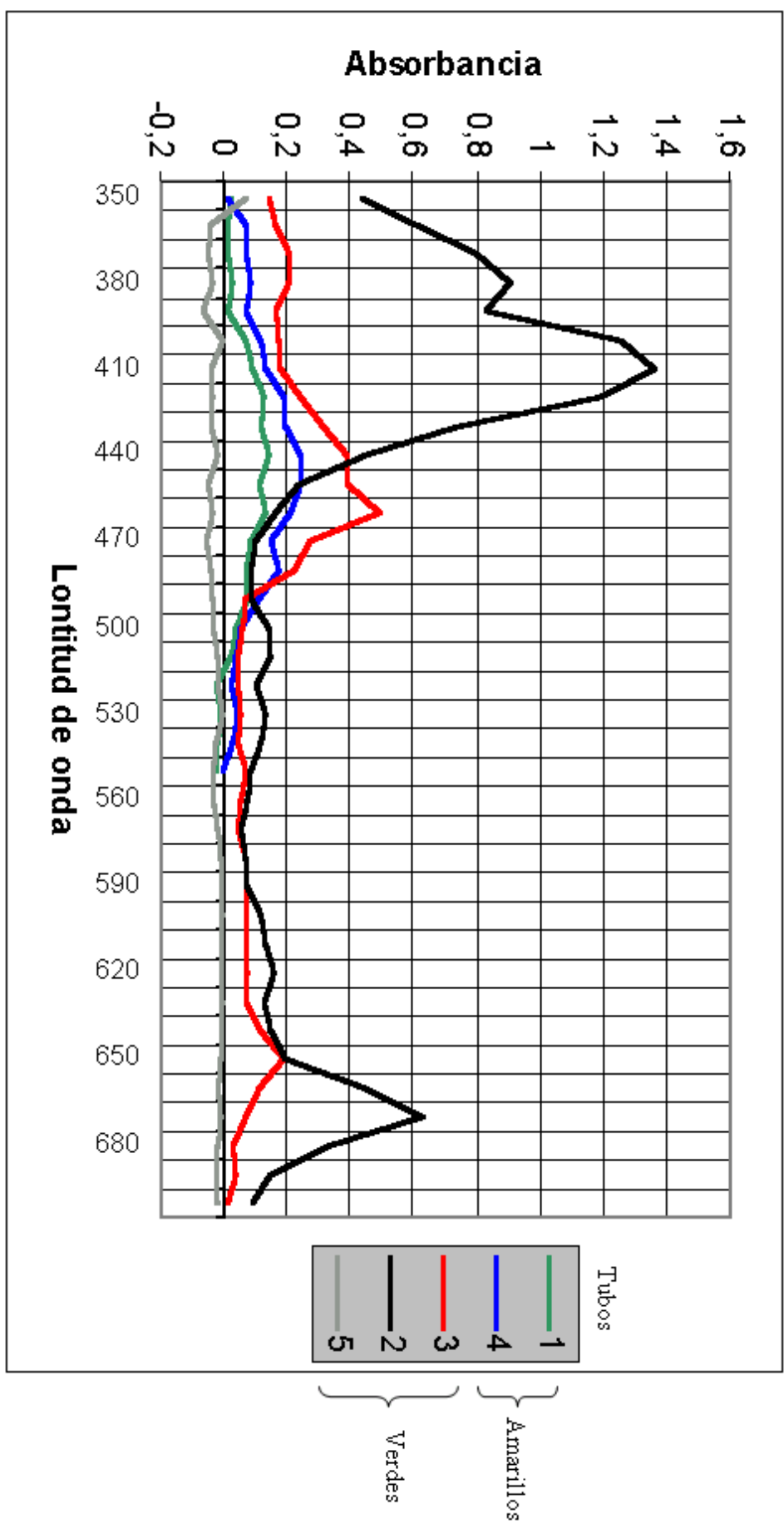
Rf 6 = 0.52 Neoxantina

Tubos

	1	4	3	2	5
--	---	---	---	---	---

Longitud de onda					
350	0,025	0,012	0,141	0,438	0,07
360	0,013	0,07	0,169	0,616	-0,04
370	0,016	0,067	0,204	0,796	-0,045
380	0,027	0,085	0,204	0,906	-0,033
390	0,012	0,068	0,17	0,83	-0,066
400	0,07	0,122	0,172	1,255	-0,004
410	0,093	0,132	0,185	1,365	-0,039
420	0,13	0,192	0,245	1,19	-0,03
430	0,12	0,2	0,32	0,741	-0,042
440	0,14	0,25	0,39	0,457	-0,02
450	0,109	0,248	0,394	0,237	-0,05
460	0,137	0,215	0,49	0,165	-0,036
470	0,085	0,152	0,281	0,099	-0,054
480	0,072	0,174	0,222	0,085	-0,044
490	0,078	0,112	0,073	0,09	-0,029
500	0,035	0,057	0,063	0,14	-0,031
510	0,02	0,04	0,046	0,152	-0,02
520	-0,023	0,02	0,047	0,102	-0,019
530	-0,005	0,05	0,056	0,137	-0,004
540	-0,015	0,027	0,05	0,118	-0,021
550	-0,024	0,003	0,074	0,083	-0,029
560			0,054	0,08	-0,029
570			0,045	0,056	-0,02
580			0,072	0,071	-0,01
590			0,074	0,081	-0,005
600			0,067	0,12	-0,003
610			0,072	0,137	-0,009
620			0,076	0,158	-0,01
630			0,074	0,128	-0,003
640			0,12	0,152	-0,012
650			0,188	0,2	-0,008
660			0,109	0,454	-0,02
670			0,067	0,625	-0,006
680			0,032	0,327	-0,02
690			0,038	0,15	-0,022
700			0,019	0,093	-0,02

Absorb.



Ahora, comparando la gráfica con los R_f podemos saber cual es el espectro de absorbancia de cada pigmento y compararlo con el de las tablas para ver si la experiencia es correcto.