

1. Grundlagen

Chromatographie ist eine physikalisch-chemische Methode zur analytischen und präparativen Trennung gelöster oder gasförmiger Verbindungen. Alle chromatographischen Verfahren verwenden für die Stofftrennung Systeme aus zwei Phasen, die nicht miteinander mischbar sind: eine feste Phase, z.B. ein Adsorbens, wie Al_2O_3 oder SiO_2 , das in gleichmäßiger, feiner Verteilung vorliegt und eine große Oberfläche hat; diese Phase ist stationär, beispielsweise in einer Säule (= senkrecht stehendes Rohr) oder in dünner Schicht auf einer Platte angeordnet und eine mobile Phase, die gasförmig (Gaschromatographie) oder flüssig sein kann und langsam und gleichmäßig die stationäre Phase durchströmt. Auch Flüssigkeiten, auf Träger aufgebracht, dienen als stationäre Phase. Das zu trennende Stoffgemisch wird an einem Ende mit der mobilen Phase in das chromatographische Trennsystem eingespeist und durch die mobile Phase an der stationären Phase „vorbeibewegt“.

Da die Komponenten eines Gemisches unterschiedliche "Affinitäten" (Wechselwirkungen) zur stationären bzw. zur mobilen Phase besitzen, kommt es zur Trennung des Gemisches: eine Substanz durchwandert das Trennsystem langsam, wenn ihre Affinität zur stationären Phase hoch ist; ist die Affinität zur mobilen Phase größer, so durchwandert die Komponente das Trennsystem schnell.

Im Grund beruhen alle chromatographischen Trennungen auf der unterschiedlichen Verteilung eines Stoffes zwischen zwei sich berührenden jedoch nicht mischenden Phasen (Verteilungschromatographie). Wird einem solchen System ein in beiden Phasen löslicher Stoff zugesetzt, so verteilt sich dieser entsprechend seiner unterschiedlichen "Affinität" in beiden Phasen. Nach einer bestimmten Zeit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen den Konzentrationen des gelösten Stoffes in beiden Phasen ein (Phasengleichgewicht). Dieses Gleichgewicht wird durch den NERNSTschen Verteilungssatz

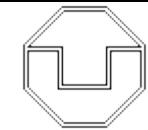
$$\frac{C_M}{C_S} = K_{p,T} = \text{konst.}$$

beschrieben, wobei C_M die Gleichgewichtskonzentration des zu verteilenden Stoffes in der mobilen, C_S die in der stationären Phase und $K_{p,T}$ den Verteilungskoeffizienten bei konstantem Druck und konstanter Temperatur darstellt.

In chromatographischen Systemen kommt es durch die Bewegung der mobilen Phase, die die Komponenten des zu trennenden Gemisches an der stationären Phase vorbeiführt, zu einer sehr großen Zahl von Gleichgewichtseinstellungen der Komponenten zwischen den beiden Phasen. Deshalb lassen sich chromatographisch auch Stoffe mit wenig unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten trennen.

Für chromatographische Trennungen werden Verteilungsvorgänge zwischen zwei flüssigen Phasen, zwischen einer gasförmigen und einer flüssigen sowie Adsorptionsgleichgewichte zwischen einer flüssigen oder gasförmigen und einer festen Phase ausgenutzt. Dominieren letztere, spricht man von Adsorptionschromatographie.

Die Trennung zweier Stoffe **A** und **B** mit unterschiedlicher Verteilung zwischen stationärer (*S*) und mobiler (*M*) Phase wird im folgenden Schema einer multiplen Verteilung veranschaulicht. Der in

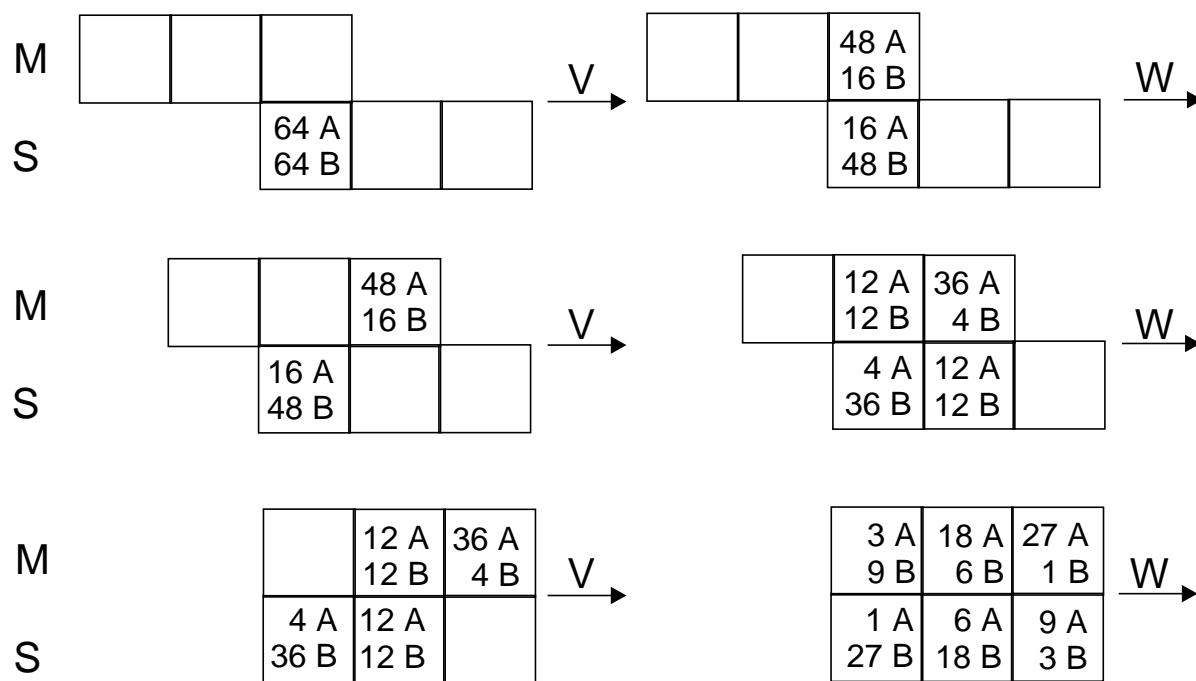


Wirklichkeit kontinuierlich ablaufende Prozess kann dabei nur diskontinuierlich dargestellt werden.
Bei einer Ausgangskonzentration von 64 Teilen A und 64 Teilen B im 1.

Segment der stationären Phase soll für die Verteilung zwischen mobiler und stationärer Phase gelten:

$$A: \quad K_A = C_M/C_S = 3:1 \quad B: \quad K_B = C_M/C_S = 1:3$$

Abwechselnd werden dann Verteilung (Austausch bei Fixierung der beiden Phasen) und Verschiebung (Weiterwandern der mobilen Phase bis zum nächsten Segment der stationären Phase) durchgeführt.

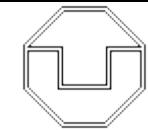


M = mobile Phase; S = stationäre Phase; V = Verteilung; W = Wandern der mobilen Phase

Abb. 1. Darstellung der Verteilung bei der Chromatographie

So kommt es zu einer immer stärkeren Anreicherung von A in der mobilen Phase M, während B sich in der stationären Phase S ansammelt. Nach einiger Zeit ist schließlich A völlig von B getrennt und verlässt das Chromatographie-System in der mobilen Phase zuerst. B wird dann von der nachfolgenden, von A freien mobilen Phase langsam aus dem System entfernt. Nach diesem Prinzip ist die Trennung komplizierter Stoffgemische möglich, wenn die Chromatographiestrecke (stationäre Phase) lang genug ist und die mobile Phase so langsam darüber hinweggeführt wird, dass sich ständig ein Gleichgewicht einstellen kann. Der große Vorteil der chromatographischen Verfahren ist, dass sie kontinuierlich ablaufen und nicht einzelne Operationen (z.B. Verteilung zwischen zwei Phasen im Schütteltrichter oder Umkristallisation) sehr oft wiederholt werden müssen, um eine entsprechende Trennung zu erreichen.

Grundsätzlich kann man die chromatographischen Verfahren so gestalten, dass die getrennten Stoffe isoliert werden; man spricht dann von präparativer Chromatographie. Bei manchen



Chromatographie-Verfahren ist das jedoch ziemlich aufwendig. Die Säulenchromatographie gehört hier zu den Ausnahmen.

Bei der technisch meist einfacher durchzuführenden analytischen Chromatographie weist man die getrennten Komponenten auf Grund spezifischer Eigenschaften nach. Dies ist z.B. dadurch möglich, dass man die Wanderungsgeschwindigkeiten bzw. Wanderungsstrecken der Komponenten mit denen von Referenzproben vergleicht, wie das in den hier durchzuführenden Versuchen der Fall ist. Da unter standardisierten Bedingungen die Wanderungsgeschwindigkeiten Stoffkonstanten sind, genügt aber auch schon die Kenntnis derselben zur Identifizierung.

Man kennt verschiedene chromatographische Verfahren, je nachdem, was als mobile und stationäre Phase benutzt wird. Zu den wichtigsten gehören:

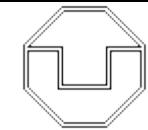
Chromatographisches Verfahren	mobile Phase	stationäre Phase
Gaschromatographie	Inertgas (Ar, He, N ₂)	Flüssigkeit auf festem Träger
Dünnschicht- oder Säulenchromatographie	Organische Lösungsmittel	SiO ₂ , Al ₂ O ₃ oder H ₂ O ¹⁾ auf diesen als Träger ²⁾
Papierchromatographie	Organische Lösungsmittel, wässrige Lösungen	H ₂ O auf Spezialpapier als Träger

- 1) Auf Kieselgel (SiO₂) immobilisiertes Wasser ist die stationäre Phase der heutigen DC bei der Trennung der Aminosäuren!
- 2) Die Grenzen zwischen Verteilungschromatographie (Verteilung zwischen zwei flüssigen Phasen) und Adsorptionschromatographie (Adsorption an der Oberfläche eines festen Stoffes, also Verteilung zwischen fester und flüssiger Phase) sind oft fließend. Wir nehmen für die heutige dünnenschichtchromatographische Trennung der Aminosäuren jedoch an, dass Adsorptionsprozesse vernachlässigt werden können und vorwiegend Verteilungschromatographie abläuft. Im Falle der chromatographischen Untersuchungen des Spinatextraktes werden vorwiegend Adsorptionsprozesse beobachtet.

Entscheidend für die Verteilung zwischen beiden Phasen (bzw. für die Adsorption an der festen Phase) sind die zwischenmolekularen Kräfte ("Affinitäten"). Hier gilt, ähnlich wie bei Wechselwirkungen zwischen Lösungsmitteln, dass polare Substanzen stärker mit polaren und unpolaren stärker mit unpolaren wechselwirken.

2. Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie (DC, engl. *thin layer chromatography, TLC*) wird die Trägersubstanz der stationären Phase (SiO₂ oder Al₂O₃) als dünne Schicht gleichmäßiger Dicke auf eine plane, entfettete Platte aufgebracht. Diese Oxide enthalten zur Stabilisierung der Schicht bis zu 15 % Bindemittel (meist Gips). Zum heutigen Versuch werden jedoch käufliche, fertig beschichtete DC-Folien verwendet.



Auftragen der Substanzen

Da mehrere Substanzen aufzutragen sind, müssen diese auf einer horizontalen Geraden (Startlinie) mit gleichmäßigem Abstand von ca. 10-12 mm vom unteren Plattenrand liegen. Setzen Sie an dem äußersten Plattenrand rechts und links mit einem weichen Bleistift je einen Punkt, der 12 mm vom unteren Plattenrand entfernt ist. Setzen Sie anschließend über die zwei Punkte eine Gerade und zeichnen Sie vorsichtig die gleichmäßig verteilten Startpunkte für die Proben. *Die Sorbentschicht darf in keinem Fall zerkratzt werden! Die Kratzer machen die DC-Platte unbrauchbar!* Das zu untersuchende Gemisch wird immer nahe der Startlinienmitte platziert, nie am Rand! (*Warum?*)

Die ausstehenden Proben sind 0,1...0,5 % Lösungen. Man verwendet zum Auftragen vorgefertigte Mikrokapillaren, in die man die Lösung eindringen lässt. Beim senkrechten Aufsetzen der gefüllten Kapillare auf die Schicht (Vorsicht: Schicht nicht beschädigen!) tritt die Lösung wieder aus. Der Durchmesser der entstehenden Flecke soll 1-2 mm betragen. Untereinander sollen die Abstände > 5 mm und von den seitlichen Plattenrändern > 8 mm sein.

Entwickeln der Platte

Nach dem Trocknen der Subanzflecken wird die Platte in eine abdeckbare Kammer eingesetzt, die die mobile Phase (Laufmittel) enthält und deren Atmosphäre mit dem Laufmittel gesättigt sein muss. Durch die Kapillarkräfte steigt das Laufmittel - entgegen der Schwerkraft - in der stationären Phase hoch. Hat es die geplante Steighöhe (etwa 1 cm vor dem oberen Ende der Platte) erreicht, wird die DC-Platte der Kammer entnommen, die Laufmittelfront sofort markiert (Bleistiftstrich) und die Platte an der Luft (Abzug) getrocknet. Farblose Substanzen werden durch Besprühen mit geeigneten Reagenzien sichtbar gemacht.

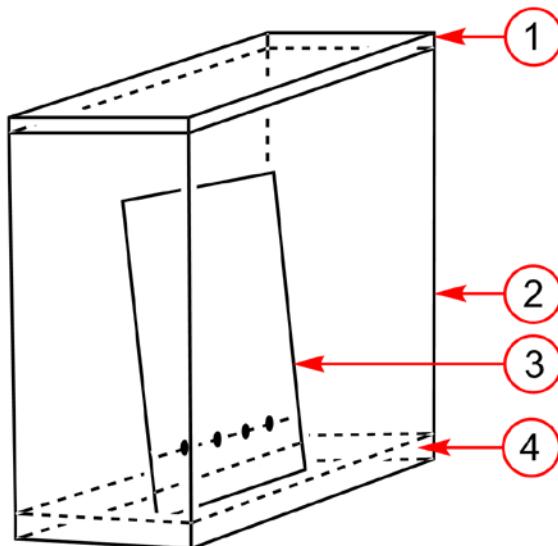


Abb. 2. Entwickeln der Platte in einer DC-Kammer.

1 - Deckel, 2 - Küvette, 3 - DC-Platte, 4 - Laufmittel (Lösungsmittelgemisch).

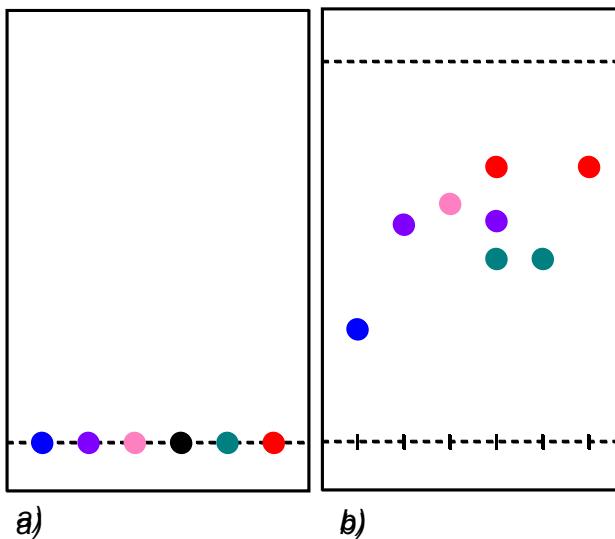
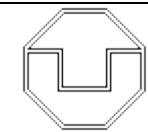


Abb. 3. Eine DC-Platte. (a) vor der Entwicklung; (b) nach der Entwicklung.

Auswertung

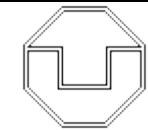
Sie erfolgt durch Vergleich mit einer auf der gleichen Platte mitlaufenden authentischen Verbindung und durch Berechnung der R_F -Werte. Der R_F -Wert ist das Verhältnis der von der Substanz zurückgelegten Strecke zu der Strecke zwischen Startlinie und Front der mobilen Phase.

$$R_F = \frac{\text{Strecke (Startlinie bis Substanzfleck-Mitte)}}{\text{Strecke (Startlinie bis Front der mobilen Phase)}}$$

Der R_F -Wert ist für jede Verbindung in einem bestimmten Trennsystem eine charakteristische Größe. R_F -Werte sind jedoch insbesondere von Temperatur und tatsächlicher Zusammensetzung des Trennsystems (bei konstanter stationärer Phase vor allem von der Zusammensetzung des Laufmittels) abhängig und deshalb schwer reproduzierbar. (Um dennoch einen Vergleich selbst ermittelter R_F -Werte mit in der Literatur angegebenen und damit eine Identifizierung von Substanzen zu ermöglichen, könnte man auf dem Chromatogramm eine Bezugssubstanz aus der getrennten Stoffklasse mitlaufen lassen und berechnet das Verhältnis von ermitteltem zu in der Literatur angegebenem R_F -Wert. Mit Hilfe dieses Korrekturfaktors können die übrigen ermittelten R_F -Werte korrigiert werden.)

3. Säulenchromatographie

Die Säulenchromatographie ist ein chromatographisches Trennverfahren, bei dem sich die stationäre Phase in einer Trennsäule befindet. Die stationäre Phase besteht aus einem trennaktiven feinkörnigen Material, meistens werden zu diesem Zweck Kieselgel oder Aluminiumoxid eingesetzt. Als mobile Phase werden unterschiedliche organische Lösungsmittel und deren Gemische (auch mit Zusatz von Wasser) verwendet. Die Säulenchromatographie beruht auf demselben Prinzip wie die Dünnschichtchromatographie, in der Säulenchromatographie bewegt sich jedoch die mobile Phase durch die Schwerkraft. Die Geschwindigkeit der mobilen Phase wird oft zusätzlich durch Überdruck im oberen Teil der Trennsäule erhöht.



Die Stationäre Phase wird am Anfang, noch bei der Vorbereitung der Trennsäule, mit mobiler Phase gesättigt, damit keine Wärmeentwicklung und keine Konkurrenz zwischen dem Lösungsmittel und den zu trennenden Stoffen bei der Adsorption an der trockenen festen Phase entstehen. Der Laufmittelstand in der vorbereiteten Säule und während des Trennversuchs muss immer über der stationären Phase bleiben, damit die letztere niemals austrocknet. Bei einer Austrocknung der stationären Phase der Trennsäule wegen des Auslaufs des Laufmittels dringt Luft (Gasphase) in die stationäre Phase ein, was zu Störungen des Trennvorgangs führt.

Das zu trennende Stoffgemisch wird in möglichst kleiner Menge des Lösungsmittels gelöst und auf die obere Schicht der vorbereiteten Trennsäule gleichmäßig gegeben, wobei eine Kristallisation der Komponenten des Gemisches zu vermeiden ist. Man lässt die Ausgangslösung in die Säule aufsaugen, spült vorsichtig mit etwas Laufmittel nach und beschichtet anschließend (optional) mit Seesand, um die obere Schicht vor Beschädigungen zu schützen.

Anschließend wird die Apparatur vorsichtig mit Laufmittel gefüllt (obere Sorbentschicht darf nicht zerstört werden!) und der Lösungsmittelstrom von oben nach unten eingestellt. Das Substanzgemisch wird mit dem Lösungsmittelstrom mitgeschleppt (Abb. 4), wobei eine kontinuierliche Stoffverteilung zwischen der unbeweglichen und beweglichen Phase erfolgt. Je nach der Polarität bzw. Affinität der Stoffe zum Sorbent und zum Laufmittel wandern die Stoffe mit unterschiedlicher Geschwindigkeit, wodurch deren Auftrennung erfolgt. Am schnellsten passieren über eine Säule mit polarem Sorbent unpolare Stoffe; stark polare Stoffe bewegen sich nicht ("Null- R_f -Substanzen"), da sie im Laufmittel unlöslich sind. Durch eine Erhöhung der Polarität des Laufmittels während des Trennvorgangs kann man die Wanderung der polareren Stoffe beschleunigen. Die aus der Säule unten austretende Flüssigkeit (*Eluat*) wird in mehrere Reagenzgläser nacheinander gefüllt. Gesammelte Fraktionen enthalten im Idealfall reine Substanzen - Komponenten des ursprünglichen Gemisches, welche im Laufmittel gelöst sind. Die erhaltenen Fraktionen werden dünnenschichtchromatographisch oder mittels einer anderen Methode analysiert. Nach Entfernung (Verdampfung) des Lösungsmittels isoliert man reine Stoffe.

Nachfolgend sind gängige Lösungsmittel (*Eluente*) nach Steigerung ihrer Elutionskraft zusammengefasst. Diese **eluotrope Reihe** bleibt für alle polaren Sorbente ungeändert:

Fluorierte Kohlenwasserstoffe < n-Pantan < n-Octan < Cyclohexan < Cyclopantan < Tetrachlormethan < Toluol < Benzol < Chloroform < Dichlormethan < Diethylether < Tetrahydrofuran < Dioxan < Aceton < Ethylacetat < Dimethylsulfoxid < Acetonitril < Pyridin < 2-Propanol < Ethanol < Methanol < Essigsäure < Wasser.

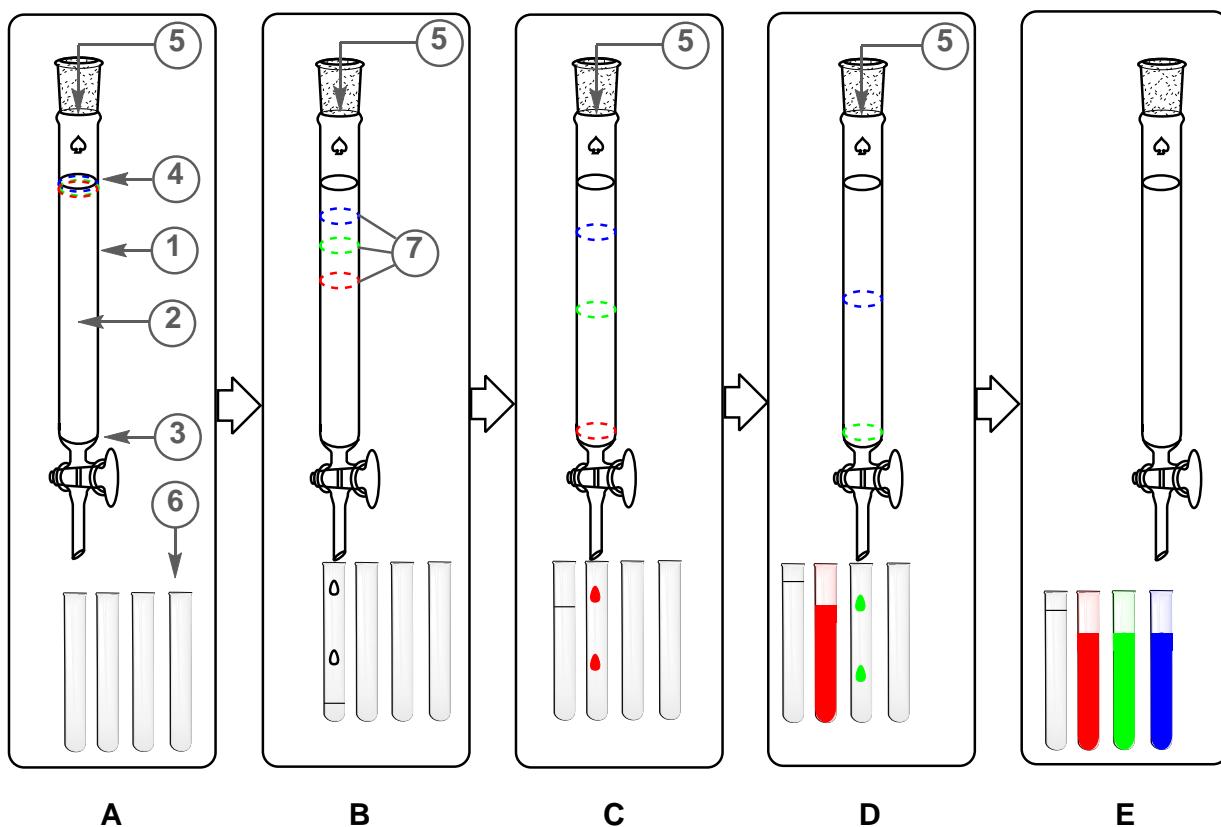


Abb. 4. Säulenchromatographische Trennung eines Gemisches von 3 Farbstoffen.

A - Gepackte Trennsäule mit Ausgangsgemisch; B - Entwicklung des Trennprozesses; C - Austritt des am wenigsten polaren Stoffes aus der Trennsäule; D - Austritt zweiter Fraktion aus der Trennsäule; E - Abgeschlossene Trennung.

1 - Trennsäule; 2 - Sorbent (stationäre Phase); 3 - Glasfritte oder Watte; 4 - Ausgangsgemisch; 5 - Zuleitung von Eluent; 6 - Reagenzgläser; 7 - wandernde Stoffe.

4. Pflanzliche Farbstoffe

Eine organische Substanz ist farbig, wenn sie aus dem sichtbaren Teil des Spektrums ($\lambda = 400$ bis 800 nm, vgl. Versuch 1, Tab. 1) einen bestimmten Wellenlängenbereich absorbiert. Wahrgenommen wird dann die Komplementärfarbe, das ist der nicht absorbierte Rest des sichtbaren Spektrums (Abb. 5).

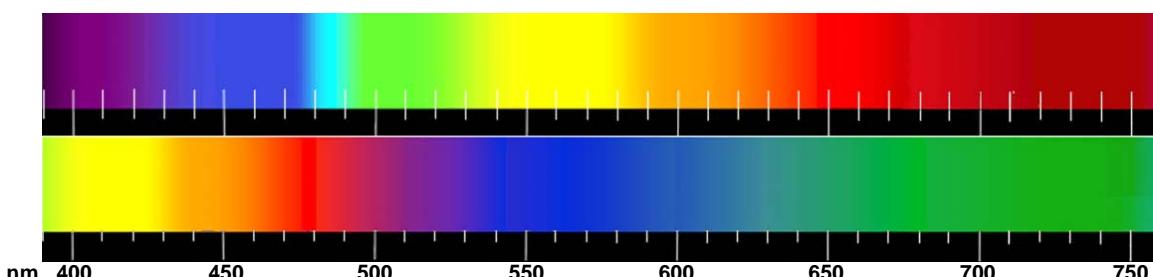
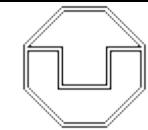


Abb. 5. Sichtbarer Spektrumsbereich (oben)
und Spektrum der komplementären Farben der Farbstoffe (unten).



So absorbiert z.B. Methylenblau aus dem Sonnenlicht den Wellenlängenbereich 580 bis 595 nm (das ist gelbes Licht, vgl. Emission der Na-D-Linie im Versuch 1) und erscheint so in der Komplementärfarbe Blau. Gesättigte Verbindungen sind meist farblos, sie haben nur σ -MOs und absorbieren im unsichtbaren UV-Bereich. Farbige Absorptionen erfordern eine geringe Energiedifferenz zwischen dem elektronischen Grundzustand und dem angeregten Zustand. Das ist häufig bei **konjugierten π -Systemen** (z.B. konjugierten Doppelbindungen) gegeben, die eine geringe HOMO–LUMO-Differenz besitzen, und deshalb als *Chromophore* (chroma = Farbe, phoron = Träger) oder *chromophore Gruppe* bezeichnet werden (HOMO = highest occupied molecular orbital; LUMO = lowest unoccupied molecular orbital). Verstärkt wird die Farbigkeit (Intensität), wenn an dem Chromophor, d. h. dem konjugierten π -System des Moleküls mesomeriefähige Auxochrome (auxochrome Gruppen) gebunden sind, die π -Elektronendonator- oder -akzeptoreigenschaften (+M- bzw. -M-Effekte) aufweisen. Beides (Chromophor und Auxochrome) sind in den Strukturen von Methylenblau und Indigo (Versuch 9) gegeben.

Chlorophyll [von griechisch χλωρός (chlōrós, „hellgrün“) und φύλλον (phýllon, „Blatt“)] ist eine allgemeine Bezeichnung von Naturfarbstoffen, die in der Biosphäre vorkommen, an der Photosynthese teilnehmen und insbesondere die grüne Färbung der meisten Pflanzen bewirken. Chlorophylle sind Chelatkomplexe, die aus derivatisiertem Porphyrinring als Chelator und Mg²⁺ als Zentralion bestehen (Abb. 6). Natürliches Chlorophyll besteht aus mehreren Komplexen, die sich durch unterschiedliche funktionelle Gruppen am Porphyrinring unterscheiden (Chlorophyll a, Chlorophyll b usw.) und absorbiert aus dem sichtbaren Sonnenlicht den Wellenlängenbereich bis ca. 490 nm (violettes und blaues Licht) und ab ca. 630 nm (rotes Licht) (Abb. 7), wobei Wellen mit den "mittleren" Längen von ca. 490-630 nm (vorwiegend grünes und gelbes Licht) reflektiert werden. Dadurch wird die grüne Färbung der Pflanzen bedingt.

Chlorophylle ohne Magnesiumion gehören zur Stoffklasse der **Phäophytine**. Diese Stoffe kommen in der Natur vor, können aber aus Chlorophyllen auch künstlich unter Einwirkung von Säuren gewonnen werden. Säure entfernt dabei das Zentralion aus dem Chelatkomplex, dieses Prozess ist allerdings reversibel: eine erneute Bildung des Chelatkomplexes mit Mg²⁺ oder mit einem anderen Ion (wie z.B. Zn²⁺, Cu²⁺) ist möglich. Phäophytine haben eine dunklere Farbe im Vergleich mit Chlorophyll, oft bläulich-grau, und spielen in der Photosynthese eine wichtige Rolle.

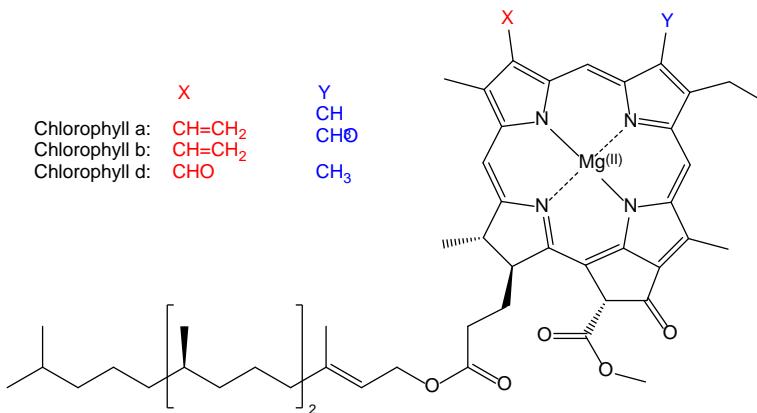


Abb. 6. Struktur der Chlorophylle a, b und d.

Aus dem Pflanzengrün werden auch die gelb bis orangefarbigen Fraktionen der **Carotinoiden** isoliert. Zur Naturstoffklasse der Carotinoiden gehören **Carotine** und **Xanthophylle**, die im heutigen Versuch chromatographisch untersucht werden. Carotine sind isomere ungesättigte Kohlenwasserstoffe mit der Summenformel C₄₀H₅₆. Die Xanthophylle enthalten in ihrer Struktur auch sauerstoffhaltige funktionelle Gruppen und haben deshalb eine höhere Polarität (Abb. 8).

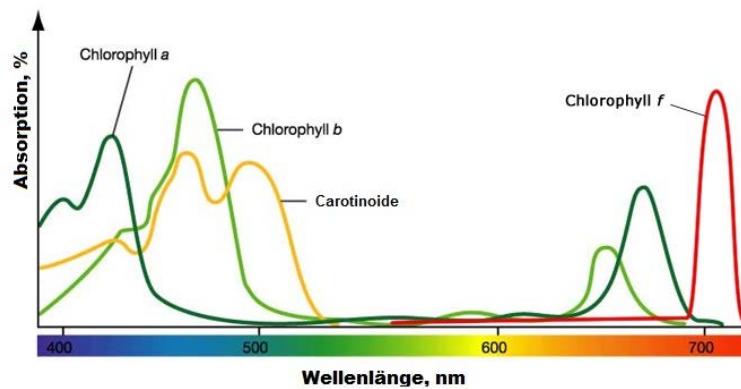
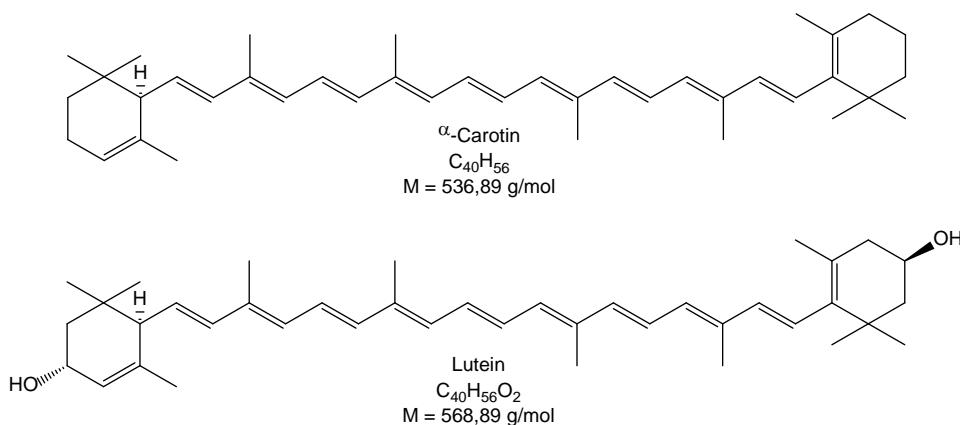
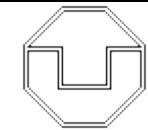


Abb. 7. Absorption der elektromagnetischen Strahlung im sichtbaren Bereich des Spektrums durch pflanzliche Farbstoffe.



**Abb. 8. Beispiele der Carotinoiden:
 α -Carotin (ein Carotin) und Lutein (ein Xanthophyll).**

Mehrere konjugierte C-C-Doppelbindungen dieser natürlichen Farbstoffe bilden ein konjugiertes π -System, welches kurze Wellenlängen des Sonnenlichtes (blaues und grünes Licht) absorbiert, deshalb haben Substanzen dieser Stoffklasse eine gelbe bis rote Färbung und bewirken entsprechende Färbungen von vielen Früchten und Blüten. Carotinoide sind natürliche Antioxidantien und sind strukturell mit Vitamin A verwandt. Vitamin A (Retinol und seine Derivate) wird in der Biosphäre aus Carotinen gebildet, daher werden Carotine (insbesondere β -Carotin) als "Provitamin A" eingestuft.



5. Versuchsaufgaben

Sicherheitshinweis. Es ist unter dem Abzug zu arbeiten, das gilt vor allem für das Entwickeln mit Ninhydrin-Lösung (Lösungsmittel n-Butanol)!

5.1 Dünnschichtchromatographische Trennung von Aminosäuren

Ein Aminosäuregemisch, das maximal aus den 3 Aminosäuren Glycin, Isoleucin, Lysin bestehen kann, ist in seine Bestandteile zu trennen, und die darin enthaltenen Aminosäuren sollen durch Vergleich mit authentischen Substanzen identifiziert werden. Sie erhalten wässrige Lösungen der zu untersuchenden Aminosäuregemische und der 3 Aminosäuren.

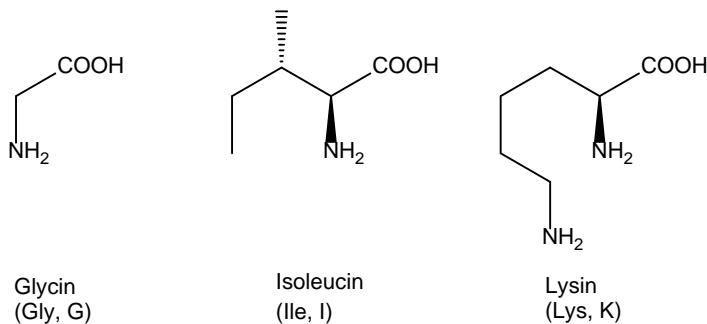


Abb. 9. Aminosäuren Glycin, Isoleucin und Lysin.

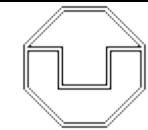
a) Kapillaren: Für diesen Versuch stehen Ihnen die Kapillaren gebrauchsfertig zur Verfügung; sie sind nach dem Auftragen der Lösung sofort wieder (wie vorgefunden) in die Flaschen zu stecken.

b) DC-Platten: Fertig beschichtete DC-Platten werden wie bereitgestellt genutzt!

c) Auftragen der Substanz: Es darf jeweils nur ein Fläschchen geöffnet auf dem Laborplatz stehen. Die Vergleichslösungen und die Analysenlösung werden wie beschrieben aufgetragen. Danach bringt man die Dünnschichtplatte zum Entfernen des Lösungsmittels Wasser für 10 min in einen Trockenschrank mit einer Innentemperatur von 105 °C (ist voreingestellt).

d) Entwickeln: Die DC-Platte wird in die DC-Kammer, die das Laufmittelgemisch n-Butanol/Eisessig/Wasser im Verhältnis 4:1:1 (Angaben in ml) enthält, eingebracht und der Deckel aufgesetzt. Das Laufmittel ist vorher **bis zu einer Höhe von ca. 0,5 cm** in die DC-Kammer zu füllen.

Nach dem Erreichen der Steighöhe des Laufmittels wird die DC-Platte aus der Kammer entfernt und die Laufmittelfront sofort mit einem (weichen) Bleistift markiert. Anschließend wird die Platte 5 min an der Luft (unter dem Abzug) und danach 5 min im Trockenschrank (bei 105 °C) aufbewahrt. Man besprüht die trockene DC-Platte gleichmäßig mit Ninhydrinlösung. Nach dem erneuten Aufbewahren im Trockenschrank (ca. 3 min) zeigen sich an den Stellen, bis zu welchen die Aminosäuren gewandert sind, farbige Flecken.



5.2 Chromatographische Untersuchungen von Chlorophyll- und Carotinoidfarbstoffen aus Spinat

Vorbereitung der Trocknungssäule

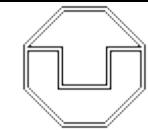
- Pipette vertikal einspannen, so dass ein Reagenzglas darunter gestellt werden kann
- kleinen Wattebausch hinein geben, mit einem Holzstab festdrücken
- ca. **0,5 g wasserfreies Natriumsulfat** einfüllen
- durch Anschnippen mit dem Finger wird die Säule fest gepackt
- beschriftetes Reagenzglas **E für Extrakt** wird darunter gestellt

Extraktion

- gefrorenen Blattspinat auftauen lassen und zwischen saugfähigem Papier trocknen
- davon 0,25 g auf einem Uhrglas abwägen, in einen Mörser geben und 1 ml kaltes Aceton zugeben
- solange mörsern, bis sich eine Art Brei ergibt und keine Pflanzen-Stücke mehr mit den Augen wahrgenommen werden können
- ist Aceton verdampft, dann **0,5-1,0 ml kaltes Aceton** erneut zugeben
- mit der Pipette den Brei in ein Zentrifugenröhrchen überführen
- Mörser und Pistill mit **1,0 ml kaltem Aceton** nachspülen, vereinigen
- zentrifugieren, die Zentrifuge sollte ausbalanciert werden, damit es nicht zur Unwucht kommt
 - nach dem Zentrifugieren wird die Flüssigkeit in ein zweites Zentrifugenröhrchen überführt, der Feststoff (Pflanzenreste) bleibt im ersten Röhrchen und wird beiseitegestellt
- **2,0 ml Hexan** in das zweite Glas geben, verschließen und gründlich schütteln
- **2,0 ml Wasser** in dieses Glas geben, schütteln und mehrmals entlüften, zentrifugieren
- die untere, wässrige Phase vorsichtig mit einer Pipette entfernen

Trocknung der Hexanlösung

- Hexanlösung mit einer **1 Spatelspitze wasserfreien Natriumsulfat** versetzen, schütteln und mittels Pipette auf die vorbereitete Trocknungssäule geben
- die getrocknete Lösung fängt man in dem Reagenzglas **E für Extrakt** auf
- hat die gesamte Lösung die Säule passiert, wird mit **0,5-1,0 ml Hexan** nachgespült
- die aufgefangene Lösung wird bis zur Trockene eingedampft (Wasserbadtemperatur 50°C, Einleitung von Stickstoff oder trockener Luft)
- nachdem das Lösungsmittel verdampft ist, wird der Rückstand in **0,5 ml Hexan** gelöst
- das Reagenzglas **E** mit einen Stopfen verschließen und dunkel stellen
- Säulen-Chromatographie vorbereiten



Säulenchromatographie

Es wird benötigt:

- **5 nummerierte Reagenzgläser (1-5)**
- **Pasteurpipetten**
- **1,25 g Aluminiumoxid, neutral**
- Lösungsmittel: (ansteigende Polarität)

Hexan

Hexan/Aceton 80:20

Hexan/Aceton 30:70

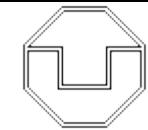
Aceton/Methanol 80:20

Vorbereitung der Säule:

- Pipette vertikal einspannen, so dass ein Reagenzglas darunter gestellt werden kann
- kleinen Wattebausch hinein geben, mit dem Holzstab festdrücken
- **1,25 g Aluminiumoxid** abwägen und in die Säule füllen
- durch Anschnippen mit dem Finger Säule fest packen
- **Reagenzglas Nr. 1** darunter stellen

Durchführung der Säulenchromatographie

- 3 ml Hexan langsam auf die Säule geben
- überschüssiges Hexan ablaufen lassen
- **0,15 ml der Pigmentlösung E mit 1ml-Spritze** auf die Säule auftragen
- Rest der Lösung verschließen und dunkel aufbewahren
- ist die Pigmentlösung in das Aluminiumoxid eingezogen, mit **0,5 ml Hexan** nachspülen, im **Reagenzglas Nr. 1** auffangen
- so lange mit Hexan nachspülen, bis die gelbe Bande die Säule fast passiert hat
- sollte die gelbe Bande mit Hexan nicht laufen, mixt man ein paar Tropfen Hexan/Aceton 80:20 in das auf der Säule überstehende Hexan und gibt weiter Hexan zu, wenn die gelbe Bande beginnt sich zu bewegen
- kurz vor dem Austreten der gelben Bande wechselt man zu **Reagenzglas Nr. 2** und fängt darin komplett die gelbe Bande auf
- nachdem die gelbe Bande im **Reagenzglas Nr. 2** aufgefangen wurde, wechselt man zu **Reagenzglas Nr. 3**



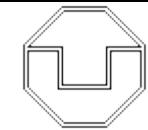
- jetzt das nächst polarere Lösungsmittel verwenden, bis die grüne Bande fast das Ende der Säule erreicht hat
- sollte die grüne Bande nicht laufen, so verwendet man eine nochmals polarere LM-Mischung
- kurz vor dem Eintreffen der grünen Bande wechselt man zu **Reagenzglas Nr. 4** und fängt darin komplett die grüne Bande auf
- manchmal erscheinen 2 grüne Fraktionen kurz hintereinander, die getrennt aufgefangen werden können (siehe DC-Folie)
- ist die Färbung nur noch schwach grün oder fast farblos, dann wechselt man zu **Reagenzglas Nr. 5**
- die aufgefangenen Fraktionen **Nr. 2 und Nr. 4** und die restliche **Pigment-Lösung E** werden im Wasserbad vom Lösungsmittel befreit

Dünnschichtchromatographie

Es wird benötigt:

- DC-Platte
- Mikrokapillaren
- DC Kammer
- Hexan/Aceton 70:30

- auf der DC-Platte eine dünne Linie ziehen, ca. 1,0 cm vom unteren Rand entfernt
- diese Linie mit drei Punkten (oder 4, je nach Anzahl der Fraktionen, die aufgetragen werden sollen) in ca. 1 cm Abstand kennzeichnen, der Abstand vom seitlichen Rand beträgt 0,6 cm
- in die **Reagenzgläser Nr. E, Nr. 2 und Nr. 4** zwei Tropfen **Hexan/Aceton 70:30** geben
- auf den ersten Punkt der DC-Platte tropft man **Extrakt E, auf den 2. Punkt** die gelbe Fraktion **Nr. 2** und auf den 3. Punkt die grüne Fraktion **Nr. 4**
- für jede Komponente ist eine neue Kapillare zu verwenden
- das Extrakt **E** und die grüne Komponente aus Glas **Nr.4** werden nur einmal aufgetragen
- die gelbe Komponente aus Glas **Nr. 2** sollte 5-10 mal auf derselben Stelle aufgetragen werden, nach jedem Auftragen die Lösung auf dem Startpunkt trocknen lassen
- die Punkte sollten nicht größer als 2 mm im Durchmesser sein
- es sollten sich 2 dunkle grüne Punkte und ein gut sichtbarer gelber Punkt für das Glas **Nr. 2** ergeben
- die DC-Platte in die Entwicklungskammer stellen, in der sich **Hexan/Aceton 70:30** befindet (Füllhöhe 0,5 cm), Kammer verschließen



- wenn die Lösungsmittelfront 1-2 cm vom oberen Rand der Platte entfernt ist, wird die Platte der DC-Kammer entnommen und sofort die Laufmittelfront mit Bleistift markiert
- man markiert ebenso die aufgetrennten Punkte, wobei auch die Farbe der Punkte möglichst schnell bestimmt werden sollte, da diese nach dem Trocknen der Platte unter Lufteinwirkung relativ rasch die Farbe ändern

Auswertung

Im Extrakt E sollten sich im Allgemeinfall folgende Verbindungen mit abnehmendem R_f -Wert identifizieren lassen:

Carotine:	gelb-orange, 1 Punkt
Pheophytin a:	grau, annähernd so intensiv wie Chlorophyll b
Pheophytin b:	grau, möglicherweise nicht sichtbar
Chlorophyll a:	blau-grün, intensiver als Chlorophyll b
Chlorophyll b:	grün
Xantophylle:	gelb, möglicherweise 3 Punkte

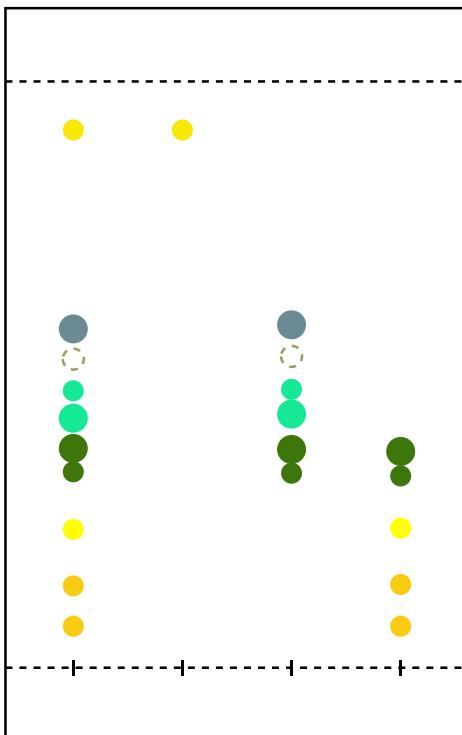
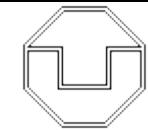


Abb. 10. Skizze der entwickelten DC-Platte.

Entsorgung:
Spinatreste: Hausmüll
DC-Laufmittel: halogenfreie Lösungsmittel
gebrauchte Säulen (Pipetten): kontaminiertes Glas



6. Fragen und Aufgaben zur Vorbereitung zum Versuch (*nicht zur Angabe im Protokoll!!*)

Erläutern Sie den Begriff Chromatographie! Nennen und charakterisieren Sie drei chromatographische Verfahren! Nennen und formulieren Sie das Gesetz, das bei der Verteilungschromatographie wirkt!

Was ist der RF-Wert (*ratio of fronts*) einer Substanz? Welche Grenzwerte kann der RF-Wert annehmen? Wodurch unterscheidet sich eine Substanz mit sehr kleinem RF-Wert von einer mit sehr großem RF-Wert? Wie kann man für ein bestimmtes Trennproblem in der DC die RF-Werte der einzelnen Substanzen beeinflussen bzw. ändern, wenn mit gleichen DC-Platten gearbeitet wird.

Wann ist eine organische Substanz farbig? Erläutern Sie die strukturellen Voraussetzungen und die spektralen Zusammenhänge! Warum darf man nicht die Laufmittel für dünschichtchromatographische Trennungen verwechseln? Welches Laufmittel ist polarer? Welchen Grund hat die Verwendung des polareren Laufmittels für die Aminosäuren? Was sind proteinogene Aminosäuren? Welche Strukturmerkmale haben proteinogene Aminosäuren? Was unterscheidet die Glycinstruktur von der der beiden anderen Aminosäuren? Erläutern Sie das Säure-Base-Verhalten der Aminosäuren. Nennen Sie die AS-Codes der zu trennenden Aminosäuren! Klassifizieren Sie die 3 Aminosäuren nach der Polarität ihrer Reste! Welche Abstufung der RF-Werte (bzw. der Wanderungsgeschwindigkeit) erwarten Sie für diese 3 Aminosäuren?

Ähnlich der chromatographischen Trennung der Aminosäuren ist die Elektrophorese, die oft mit der Chromatographie kombiniert wird, um proteinogene Aminosäuren zu trennen. Worauf beruht die unterschiedliche Wanderung der Aminosäuren in der Elektrophorese? Welche Stoffe enthält die flüssige Phase bei der Elektrophorese? Welche Konstitutionsformel hat das Nachweisreagenz Ninhydrin?

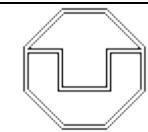
Welche wesentliche Forderung stellt die Betriebsanweisung nach § 20 GefStoffV „Allgemeine Laborordnung für Forschungslaboratorien und Studentenpraktika“ an Sie vor Aufnahme der experimentellen Arbeit? Legen Sie an 3 vorgegebenen wichtigen Gefahrstoffen, mit denen Sie heute umgehen, dar, dass Sie über die erforderlichen Kenntnisse verfügen! Nennen Sie 5 Tätigkeiten, die die Allgemeine Laborordnung für chemische Laboratorien untersagt! Nennen Sie 5 Pflichten, die die Allgemeine Laborordnung für chemische Laboratorien Ihnen auferlegt! Welchen Hinweis gibt der sichere Nachweis von Aceton in der Atemluft eines Menschen?

Wann kann ein organischer Stoff einen Wellenlängenbereich des sichtbaren Lichts absorbieren und dadurch farbig erscheinen?

Formulieren Sie die Konstitutionsformeln für Aceton, n-Hexan und Methanol! Erläutern Sie die Begriffe "Eluent" und Eluat". Wozu wird die Polarität des Eluents bei einem Trennvorgang oft erhöht?

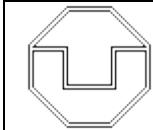
Welche Naturstoffe sind im Pflanzengrün durch einfache chromatographische Methoden nachweisbar?

Erläutern Sie die Struktur des Chlorophylls. Erläutern Sie unterschiedliche Rf-Werte der Carotinen und Xanthophylle aufgrund ihrer Struktur.



7. Einstufung der verwendeten Chemikalien:

Chemikalienname	Signalwort	Pictogrammcode	Einstufung	H-Sätze	P-Sätze
n-Butanol, Ninhydrin-Lsg. (0,1%ig in Butanol)	Gefahr		Flüssigkeit und Dampf entzündbar. Gesundheitsschädlich bei Verschlucken. Verursacht Hautreizungen. Verursacht schwere Augenschäden. Kann die Atemwege reizen. Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.	H226, H302, H315, H318, H335+H336	P261, P280, P305+P351+P338
Essigsäure	Gefahr		Flüssigkeit und Dampf entzündbar. Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.	H226, H314	P280, P305+P351+P338, P310
Methanol	Gefahr		Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. Giftig bei Verschlucken. Giftig bei Hautkontakt. Giftig bei Einatmen. Schädigt die Organe.	H225, H301, H311, H331, H370,	P210, P260, P280, P301+P310, P311
Aceton	Gefahr		Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. Verursacht schwere Augenreizung. Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.	H225, H319, H336	P210, P261, P305+P351+P338, EUH066
Essigsäureethylester	Gefahr		Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. Verursacht schwere Augenreizung. Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen. Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.	H225, H319, H336, EUH066	P210, P305+P351+P338, P370 + P378 P403 + P235
n-Hexan	Gefahr		- Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar. - Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein. - Verursacht Hautreizungen. - Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen. - Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. - Kann die Organe schädigen bei längerer oder wiederholter Exposition. - Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.	H225, H304, H315, H336, H361f, H373, H411	P201, P210, P273, P301+P310, P308+P313, P331



Protokoll

Stofftrennung durch Chromatographie

Datum: _____

Name: _____

Praktikumsgruppe: _____

Versuchsaufgaben:

1. Dünnschichtchromatographie

Trennung eines Aminosäuregemisches

R_F-Werte der Vergleichssubstanzen:

R_F-Werte der Aminosäuren des Gemisches:

Zusammensetzung des Gemisches (Nr.):

2. Chromatographische Untersuchung von Chlorophyll- und Carotinoidfarbstoffen aus Spinat

Ergebnisse des Eigenversuches.

- Kurze Beschreibung der durchgeführten chromatographischen Untersuchungen (ca. 1 Absatz!).
 - DC-Analyse der säulenchromatographisch erhaltenen Fraktionen: Auswertung nach abnehmendem R_f (*tatsächlich erhaltene Spots, deren Farben, Intensität und R_f-Werte!*):

Extrakt:	Carotinoide Pheophytin Pheophytin Chlorophyll a Chlorophyll b Xantophyll
----------	---

Fraktion gelb: Carotine

1. Fraktion grün Pheophytin
Pheophytin
Chlorophyll a
,

2. Fraktion grün Chlorophyll b
 Xanthophyll
 Xanthophyll

Die Chromatogramme sind dem Protokoll beizufügen!