

Chromatographie

Einleitung

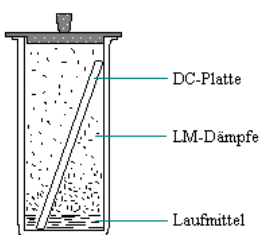
Unter Chromatographie fasst man eine Reihe von Methoden zusammen, mit denen man komplizierte Vielstoffgemische auftrennen kann.

All diesen Trennmethoden gemeinsam ist die Verwendung zweier Hilfsphasen. Eine davon ist die **unbewegliche, sogenannte stationäre Phase**. Die andere, die **bewegliche oder mobile Phase** (=Laufmittel) transportiert das Probengemisch über die stationäre Phase. Je nach der Löslichkeit der einzelnen Komponenten werden diese verschieden lange im Laufmittel festgehalten.

Von den vielen chromatographischen Methoden befassen wir uns mit der einfachsten Methode: der **Dünnschichtchromatographie**.

Bei der Dünnschichtchromatographie besteht die stationäre Phase aus einer 0,1 - 0,3 mm dünnen Schicht Aluminiumoxid oder Kieselgur, die auf Glasplatten, Kunststoff- oder Aluminiumfolien aufgebracht wurde. (Bei der heute kaum mehr eingesetzten Papierchromatographie besteht die stationäre Phase aus Papier.)

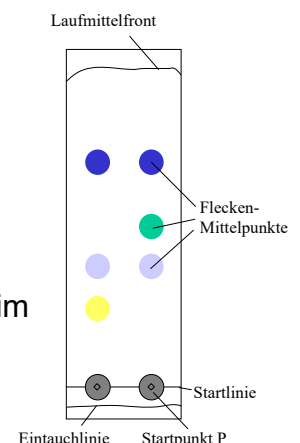
Beispiel: Ein Probengemisch, bestehend aus 3 Komponenten: Komponente 1, Komponente 2 und Komponente 3, soll dünnenschichtchromatographisch untersucht werden. Das Probengemisch wird in einem Lösungsmittel, z. B. Ethanol gelöst. Auf einer **Dünnschichtplatte wird mit einem Bleistift zart der Startpunkt P markiert**. Mit einer fein ausgezogenen **Pipette** (Ende vorsichtig rundgeschmolzen) oder einer Kapillarpipette wird **ein Tropfen Probelösung auf den Punkt P** aufgebracht. Man achte darauf, dass der **Durchmesser** des feuchten Flecks **möglichst klein** bleibt. Wenn der Fleck **trocken** ist, bringt man **neuerlich einen Tropfen** auf den Punkt Startpunkt P und wiederholt den Vorgang noch einige Male. Man kann das Auftragen beschleunigen, wenn die Auftragepunkte mit einem **kalten Fön** getrocknet werden.



In eine DC-Kammer füllt man das Laufmittel ein und **taucht die DC-Platte in das Laufmittel** (siehe Bild). Achtung! Der **Punkt P** muss sich einige cm **über dem Niveau des Laufmittels** befinden - **der Punkt P darf nicht in die Flüssigkeit tauchen!** Die DC-Kammer muss mit einem Deckel luftdicht verschlossen werden.

Trennungsvorgang: Das Laufmittel saugt sich im Trägermaterial, entgegen der Schwerkraft, hoch und „überflutet“ den Punkt P mit dem Probengemisch. Die Komponente 1 ist im Lösungsmittel sehr leicht löslich, benötigt daher nur wenig Zeit sich in dem Laufmittel zu lösen, und wandert als erste Substanz mit der Laufmittelfront mit. Die Komponente 2 ist im Laufmittel etwas schwerer löslich als die erste Komponente d.h. sie wird mit einer zeitlichen Verzögerung laufen.

Die Komponente 3 ist noch schwerer löslich als die vorhergehende und wird daher mit einer neuerlichen Verzögerung zu laufen beginnen.



Ende des Trennungsvorganges: Nach einer bestimmten Zeit - bei der Dünnschichtchromatographie genügt **in den meisten Fällen eine Stunde**, bei der Papierchromatographie benötigt man in der Regel mehrere Stunden, - wird der **Streifen aus dem Laufmittel herausgenommen** und sofort mit einem **Bleistift die „Laufmittelfront“**

markiert. Das Chromatographieren muss rechtzeitig abgebrochen werden, das Laufmittel darf **nicht** das obere Ende des Chromatogramms erreichen.

Entwicklung des Chromatogramms: Die Platte wird **an der Luft getrocknet**. Wenn die aufgetrennten Substanzen keine Eigenfarbe haben, müssen sie noch sichtbar gemacht werden. Mit einem Zerstäuber kann ein spezifisches Nachweisreagenz auf die Platte aufgesprüht werden, wobei gefärbte Flecken -»das Chromatogramm« - (chromos (griechisch) - Farbe) entstehen.

Auswertung des Chromatogramms: Mit einem **Bleistift markiert** man die **Mittelpunkte der Flecken** und bildet den Quotient - den R_f - Wert - aus gemessenen Entfernungen

$$R_f = \frac{(\text{Startpunkt } P - \text{Fleckenmittelpunkt})}{(\text{Startpunkt } P - \text{Laufmittelfront})}$$

Der R_f -Wert ist bei **gleichem Laufmittel für eine Substanz eine konstante Größe**. Um die Zusammenhänge besser erkennen zu können, kann man neben einer Probenmischung entsprechende Reinsubstanzen sowie Mischungen der Reinsubstanzen im Abstand von je 1 cm auf jeweils einem eigenem Startpunkt an der Startlinie auftragen und ein Chromatogramm entwickeln.

Quantitative Bestimmung des Chlorophylls a und Chlorophylls b in Pflanzenteilen

Geräte: Photometer, Zentrifuge, HM-Eprouvetten, Reibschale mit Pistill, Zentrifuge, Mikrospatel, 10 mL Messkolben, Trichter, Glasküvetten (d = 1cm), (keine Kunststoffküvetten), Mikropipetten, DC-Kammer (NUR welche MIT Deckel verwenden!)

Reagenzien:

- Probe: 1 mittelgroßes grünes Blatt, wissenschaftlichen und deutschen Pflanzennamen und Herkunft (Standort) angeben
- Laufmittel: Petroleumbenzin (Petrolether) 60 - 80°C : Isopropanol : Wasser = 400 : 40 : 1 (v/v/v), [bei kleinen DC-Kammern 10 mL einfüllen, bei großen 50 mL]
- Trennschicht: z.B.: Kieselgel KG60-Platten, ca. 10 x 2 cm, Trennschichttypus spielt eine untergeordnete Rolle
- Quarzsand, CaCO_3 , Aceton

Durchführung:

aus einem frischen grünen Blatt werden **2 Stücke á 2 x 2 cm geschnitten, gewogen** und **jeweils in einer Reibschale** mit einer **Mikrospatel CaCO_3** (und evtl. ein bisschen **Quarzsand**) versetzt. Anschließend wird das **Gemisch** mit dem Pistill gut **verrieben** (Aufreißen der Zellwände). Man **fügt ca. 5 mL Aceton hinzu** und verreibt das Extraktionsgemisch nochmals gut. Dann **extrahiert** man das **Chlorophyll** der **einen Reibschale mit mehreren kleinen Portionen**. Aceton **dekantieren, in einen 10 mL Messkolben** (Trichter verwenden), **auffüllen mit Aceton**. Der **konzentrierte Extrakt** der **anderen Reibschale** (ca. 2 – 3 mL) wird gleich **in ein Zentrifugenröhrchen dekantiert** und **zentrifugiert**.

Gesamtchlorophyll:

Für die Messung werden ca. **2 mL des Extraktes aus dem Messkolben zentrifugiert**, wobei **kein Aceton verdunsten** sollte (allenfalls Füllstand an Zentrifugenröhrchen markieren und später wieder auffüllen). In **Küvetten** von 1 cm Schichtdicke wird im Photometer (nach Wellenlängenscan zwischen 400 – 800 nm) die **Extinktion** (=optische Dichte) **dieses Extraktes** bei 662 nm (Absorptionsmaximum) **gegen das Extraktionsmittel (Aceton) gemessen**.

Trennung Chlorophyll a und b:

1 **cm vom unteren Rand der Platte entfernt** wird mit einem **weichen Bleistift** vorsichtig ohne Zerstörung der Trennschichten eine **horizontale Linie gezogen**. Die Schicht der Kieselgelplatte beim Markieren und Auftragen **nicht verletzen!**

Um möglichst viel Pflanzenfarbstoff auf einmal zu trennen wird der **konzentrierte Extrakt aus der 2. Reibschale als kompakter Strich** auf dieser horizontalen Linie **aufgetragen**. Eventuell unter Zwischentrocknung des „Startstriches“ **wiederholen**.

In die **DC-Kammer** einbringen, dabei darauf aufpassen, dass das Laufmittel NICHT die horizontale Linie berührt. Geeignet wäre eine Füllhöhe von etwa 0,5 cm. Man sollte darauf achten, die **beschichtete Seite nach oben bzw. nach vorne** (kein Kontakt mit Wand) anzulehnen.

Das Chromatogramm wird solange entwickelt, bis Chlorophyll a (dunkelgrün) und Chlorophyll b (hellgrün) deutlich voneinander getrennt sind. Die Platte wird **an der Luft trocknen gelassen**.

Die beiden aufgetrennten Chlorophyllstreifen werden **mit der Schere aus der Platte geschnitten** und **jeweils in einer Epruvette mit 2mL Aceton extrahiert** und ebenfalls in einer **Glasküvette die Extinktion gemessen**. Es werden für die Berechnung die Extinktionswerte der unbekanntenen Lösungen (= Lösung mit Chlorophyll a und Lösung mit Chlorophyll b) durch Vergleich mit der bekannten Lösung (= Gesamtchlorophyll) korrigiert.

Aufgabe: Berechnen Sie den Chlorophyllgehalt!

- a) bezogen auf die Blattfläche in mg Gesamtchlorophyll/cm²
- b) bezogen auf das Frischgewicht in mg Gesamtchlorophyll/g Frischgewicht

Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel und ist die Konzentration in jeweils 10mL

$$\text{Gesamtchlorophyll (mg/L)} = 30,0 \times E_{662}$$

$$\text{Chlorophyll a (mg/L)} = 11,2 \times E_{662} - 2,0 \times E_{645}$$

$$\text{Chlorophyll b (mg/L)} = 20,1 \times E_{645} - 4,2 \times E_{662}$$

Weiters wird noch das Verhältnis Chlorophyll a/b berechnet.

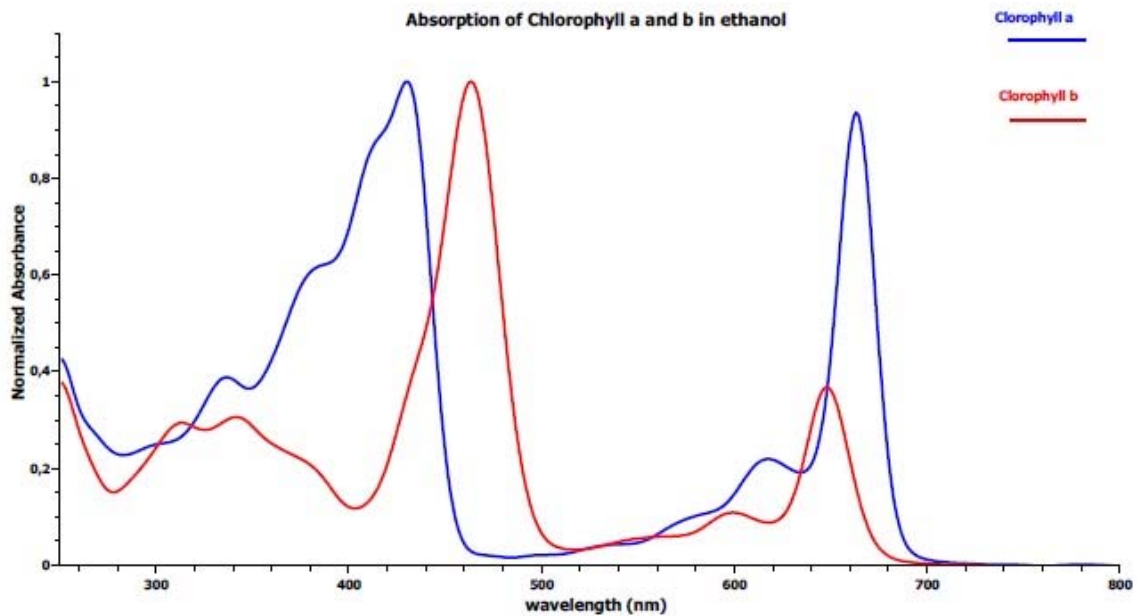


Abbildung 4.1: Das Absorptionsspektrum von Chlorophyll a und b in Propanol

Wellenlänge [nm]	ϵ_a [1/(mol*nm)]	ϵ_b [1/(mol*cm)]
647	21,2	52,3
664	89,0	10,2

Extinktion von Chlorophyll a und b für verschiedene Wellenlängen

	Chlorophyll a	Chlorophyll b
Grünkohl	189 mg	41 mg
Große Brennnessel	185 mg	173 mg
Petersilie	157 mg	55 mg
Spinat	95 mg	20 mg
Broccoli	26 mg	6 mg
grüne Bohnen	12 mg	4 mg
grüne Erbsen	10 mg	2 mg
Gurke	6 mg	2 mg
Kiwis	1,7 mg	0,4 mg
Weißkohl	0,3–1 mg	0,1–0,2 mg