

Auftrennung eines Blattextrakts durch Säulenchromatografie

Versuchsziele

- Herstellung eines Blattextraktes
- Demonstration der Säulenchromatografie als Methode, um Stoffe anhand ihrer Adsorptionseigenschaften zu trennen
- Verständnis des Trennprinzips der Säulenchromatografie mit Kieselgel als stationärer Phase
- Erklärung der Elutionsreihenfolge verschiedener Blattfarbstoffe anhand ihrer Molekülstruktur
- Verständnis der Strukturzusammenhänge verschiedener Klassen von Blattfarbstoffen

Grundlagen

Die Säulenchromatografie ist eine häufig verwendete Methode, um im Labor Stoffgemische aufzutrennen. Dabei werden die Stoffe anhand ihrer Adhäsionseigenschaften isoliert. Sie funktioniert nach demselben Prinzip wie andere chromatographische Verfahren, wird im Gegensatz zu diesen aber weniger zur Identifikation, als zur Trennung und Aufreinigung von Substanzen verwendet.

Die aufzutrennenden Substanzen werden mit einer mobilen Phase (Lösemittelgemisch) durch eine stationäre Phase (in diesem Fall Kieselgel) transportiert. Während die zu trennenden Substanzen die stationäre Phase passieren, werden sie von ihr immer wieder adsorbiert (sie haften daran)

oder desorbiert (sie gehen zurück in Lösung). Stoffe mit einer hohen Affinität zur stationären Phase verbringen im Mittel eine längere Zeit im adsorbierten Zustand und weniger Zeit in der Lösung. Sie wandern deshalb langsamer durch die Säule als Stoffe mit einer geringen Affinität zur stationären Phase.

Bei der Säulenchromatografie befindet sich die stationäre Phase in einer zylinderförmigen Röhre mit Ablasshahn an der Unterseite. Die mobile Phase sickert aufgrund der Schwerkraft durch die stationäre Phase oder wird mit Druckluft durch die stationäre Phase gepumpt (*Flash-Chromatografie*). Die verschiedenen Eluate werden in separaten Gefäßen gesammelt. Diese können dann z.B. mittels Dünnschichtchromatografie auf ihre genaue Zusammensetzung



Abb. 1: Versuchsaufbau. Links: Herstellung des Blattextraktes. Rechts: Säulenchromatografie.

Geräte und Chemikalien**Herstellung des Blattextraktes**

| | | |
|---|--|----------|
| 1 | Becherglas DURAN, 100 ml, nF | 664 101 |
| 1 | Mörser Porzellan, 70 mm Ø | 667 092 |
| 1 | Pistill 100 mm | 667 091 |
| 1 | Trichter Boro 3.3, 100 mm Ø | 665 005 |
| 1 | Rundfilter Sorte 595, 150 mm Ø, Satz 100 | 661 038 |
| 1 | Steilbrustflasche Braunglas, 100 ml..... | 661 161 |
| 1 | Warnhinweise nach GHS..... | 661 0771 |
| 1 | Filtrierstativ für 2 Trichter | 666 584 |
| 1 | Seesand, gereinigt, 1 kg | 674 8210 |
| 1 | Aceton, 1 l..... | 670 0410 |

Zusätzlich benötigt:

trockene oder frische Blätter/Gräser

Säulenchromatografie

| | | |
|----|--|----------|
| 1 | Chromatographiesäule 235 x 20 mm Ø | 665 592 |
| 1 | Tropftrichter Glas, 75 ml, SB 29, graduert | 665 073 |
| 1 | Becherglas DURAN, 100 ml, nF | 664 101 |
| 1 | Becherglas, Boro 3.3, 600 ml, hF | 602 012 |
| 1 | Laborflasche nach DIN, 500 ml, GL 45..... | 602 347 |
| 1 | Warnhinweise nach GHS..... | 661 0771 |
| 1 | Messzylinder 100 ml, Kunststofffuß | 665 754 |
| 1 | Messzylinder 500 ml, Kunststofffuß | 665 756 |
| 1 | Kompaktwaage 200 g: 0,01 g | 667 7977 |
| 1 | Glasrührstab 500 mm x 8 mm Ø, Satz 10..... | 665 217 |
| 1 | Pulvertrichter PP, 100 mm Ø | 665 025 |
| 1 | Reagenzglasgestell Kunststoff, 18 mm Ø..... | 667 050 |
| 10 | Reagenzglas Fiolax, 16x160 mm, aus Satz 10 | 664 043 |
| 9 | Gummistopfen voll, 14...18 mm Ø | 667 253 |
| 1 | Löffelspatel PP, 180 mm..... | 666 966 |
| 1 | Tropfpipette 150 x 7 mm, Satz 10..... | 665 953 |
| 1 | Gummikappen, 10 Stück | 665 954 |
| 1 | Stativfuß V-förmig, klein..... | 300 02 |
| 1 | Stativstange 47 cm, 12 mm Ø | 300 42 |
| 2 | Doppelmuffe S..... | 301 09 |
| 2 | Universalklemme 0...80 mm | 666 555 |
| 1 | Benzin, 90...110 °C, 250 ml | 670 8200 |
| 1 | Glaswolle, 10 g | 672 1000 |
| 1 | Aceton, 1 l..... | 670 0410 |
| 1 | Kieselgel, 35-70 mesh, 500 g | 661 058 |
| 1 | Schliff-Fett, 60 g..... | 661 0821 |

Versuchsaufbau und -vorbereitung**Herstellung des Blattextraktes**

- Die getrockneten Blätter oder Gräser zwischen den Fingern zerreiben. So viel zerkleinertes Pflanzenmaterial in den Mörser geben, dass dieser etwa zu einem Drittel gefüllt ist.
- Etwas Seesand und so viel Aceton (2-Propanon) hinzufügen, dass das Ganze gut mit dem Extraktionsmittel durchtränkt ist.
- Das Pflanzenmaterial zusammen mit dem Sand im Mörser mit dem Pistill etwa 5 min zerreiben.
- Anschließend noch einige Milliliter Aceton hinzufügen und ca. 2 min weiter reiben.
- Den Trichter vorsichtig in das Filtrierstativ einhängen (siehe Abb. 1). Unter dem Trichterauslauf ein Becherglas platzieren.
- Aus dem Rundfilter ein Filterpapierütchen anfertigen und in den Trichter einsetzen.
- Anschließend den Filter mit Aceton anfeuchten und den Inhalt des Mörsers filtrieren.

8. Das Filtrat im Dunkeln unter dem Abzug etwas verdunsten lassen. Danach in eine entsprechend beschriftete und mit Warnhinweisen versehene Braunglasflasche füllen. Den Blattfarbstoff im Dunkeln aufbewahren.

Vorbereitung der Säulenchromatografie

Hinweis: Vor dem Versuch werden die Hähne der Glasgeräte gefettet und auf ihre Durchlässigkeit überprüft.

Das Laufmittel aus 20 Vol.-% Aceton und 80 Vol.-% Benzin wird hergestellt, indem in einer Laborflasche mit Schraubverschluss 50 ml Aceton und 200 ml Benzin miteinander gemischt werden. Die Verwendung einer Flasche mit Schraubverschluss ist nötig, da sich bei leicht flüchtigen Substanzen beim längeren Stehen an der Luft die Zusammensetzung des Laufmittels ändern kann.

Der Boden der Chromatographiesäule wird mit etwas Glaswolle bedeckt (mit dem Glasstab hineindrücken). Die Säule wird am Stativ mit einer Universalklemme befestigt. Darunter das große Becherglas platzieren. Es werden in einem 100 ml Becherglas 15 g Kieselgel abgewogen. Zum Kieselgel ein wenig Laufmittel gießen und mit einem Glasstab gut rühren, bis eine gelartige Masse entsteht. Diese wird nun mit einem Pulvertrichter in die Säule gefüllt. Hierbei muss immer wieder etwas Laufmittel hinzugegeben werden, damit das aufgeschlämmte Kieselgel vollständig in die Säule gelangt. Flüssigkeitsüberstände in der Säule werden in einem Becherglas aufgefangen. Die Säule wird bis etwa 3 cm unter dem Rand befüllt.

Versuchsdurchführung

Der Tropftrichter wird oberhalb der Chromatographiesäule befestigt. Es wird genau so viel Laufmittel aus der Säule abgelassen, bis der Flüssigkeitsspiegel den oberen Rand des Gels erreicht. Nun wird mit einer Tropfpipette ein wenig Blattextrakt auf die Säule gegeben. Ein bis zwei Millimeter Flüssigkeitsstand über der Säule reichen aus. Der Hahn wird so lange geöffnet, bis die Säule den Blattextrakt komplett aufgenommen hat.

Jetzt kann mit der Zugabe des Laufmittels begonnen werden. Der Tropftrichter wird mit Laufmittel befüllt. Die beiden Hähne werden so eingestellt, dass sie in etwa mit der gleichen Geschwindigkeit tropfen. Sollte die Säule trocken laufen, wieder etwas mehr Laufmittel in den Tropftrichter geben. Es ist darauf zu achten, wann die verschiedenfarbigen Eluate den unteren Rand der Säule erreichen, damit man sie mit Reagenzgläsern auffangen kann.

Hinweis: Optional können die aufgefangenen Eluate mit Dünnschichtchromatografie unter Verwendung desselben Laufmittels auf ihre Reinheit untersucht werden.

Beobachtung

Es lassen sich in der Säule verschiedenfarbige Banden erkennen. Die Banden sind orange, gelb, grün oder blaugrün.

Versuchsergebnis

Blattfarbstoffe ermöglichen die Photosynthese der Pflanzen. Sie befinden sich in den Lichtsammelkomplexen der Thylakoidmembran in den Chloroplasten. Das Zentrum dieser Komplexe bilden zwei Moleküle Chlorophyll a. An ihnen findet die Ladungstrennung statt, die die Oxidation von Wasser zu Luftsauerstoff ermöglicht. Chlorophyll b, Carotine und Xanthophylle haben die Funktion, das Absorptionsspektrum des Chlorophylls a zu erweitern, damit insgesamt mehr Licht eingefangen wird. Carotinoide (Carotine und

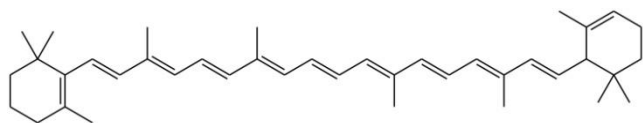
Xanthophylle) schützen das Chlorophyll a außerdem vor Zerstörung durch Photooxidation.

Abhängig von der Art der verwendeten Blätter können bei der Säulenchromatografie verschiedene Blattfarbstoffe identifiziert werden.

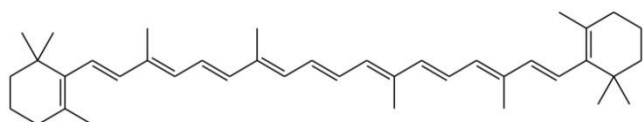
Reihenfolge möglicher Bestandteile:

1. Carotine: gelborange
2. Xanthophylle (Lutein): gelb
3. Xanthophylleoxid (Violaxanthin): gelb
4. Chlorophyll a: blaugrün (dunkelgrün)
5. Chlorophyll b: hellgrün (gelbgrün)
6. Neoxanthin: gelb

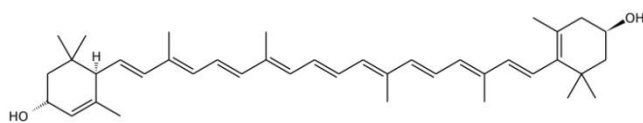
α -Carotin (gelborange)



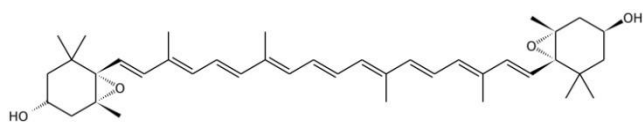
β -Carotin (gelborange)



Lutein (gelb)



Violaxanthin (gelb)



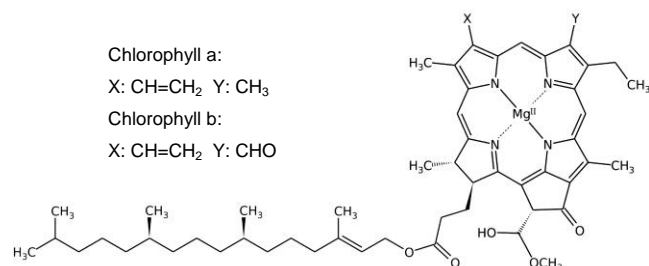
Chlorophyll (grün)

Chlorophyll a:

X: CH=CH₂ Y: CH₃

Chlorophyll b:

X: CH=CH₂ Y: CHO



Neoxanthin (gelb)

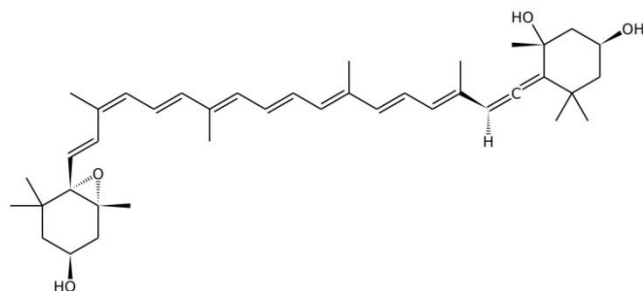


Abb. 3: Strukturformeln und Farben der Blattfarbstoffe.

Die Auftrennung erfolgt anhand der Polarität der aufzutrennenden Stoffe. Gänzlich unpolare Blattfarbstoffe wie z.B. Carotine lösen sich besonders gut im Laufmittel und interagieren kaum mit den Hydroxygruppen des Kieselgels. Sie wandern zusammen mit der Laufmittelfront.

Xanthophylle wie Lutein leiten sich von den Carotinen ab und bilden zusammen mit ihnen die Carotinoide. Beide haben das gleiche Grundgerüst bestehend aus 8 Isopren-Einheiten (siehe Abb. 4).

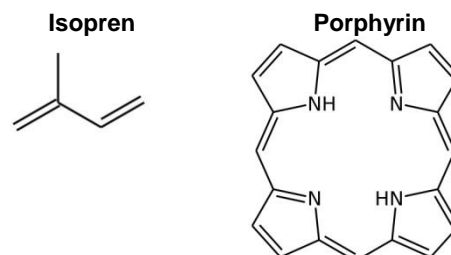


Abb. 4: Grundbausteine der Blattfarbstoffe.

Im Unterschied zu den Carotinen enthalten die Xanthophylle sauerstoffhaltige polare Gruppen wie z.B. Carbonyl-, Hydroxy- oder Epoxidgruppen. Ihre Position bei der Auftrennung ist abhängig von der Art und Anzahl der polaren Gruppen. Hydroxygruppen führen zu einer stärkeren Polarität als Carbonyl- oder Epoxidgruppen. Sie interagieren deshalb stärker mit den Hydroxygruppen des Kieselgels.

Exemplarisch lässt sich damit die Reihenfolge der drei Xanthophylle Lutein, Violaxanthin und Neoxanthin erklären: Lutein hat zwei Hydroxygruppen. Violaxanthin hat zusätzlich zwei Epoxidgruppen, die zu einer stärkeren Interaktion mit der stationären Phase führen. Violaxanthin läuft deshalb langsamer als Lutein. Neoxanthin hat nur eine zusätzliche Epoxidgruppe, aber dafür eine dritte Hydroxygruppe. Da Hydroxygruppen stärker mit der stationären Phase interagieren als Epoxidgruppen, läuft Neoxanthin von diesen dreien am langsamsten.

Zwischen Violaxanthin und Neoxanthin laufen die Chlorophylle a und b. Ihr Grundgerüst leitet sich von Porphyrin ab (siehe Abb. 4), in dessen Mitte sich ein von vier Stickstoffen koordiniertes Magnesium-Ion befindet.

Die Polarität der Chlorophylle geht zum einen vom zweifach positiv geladenen Magnesium-Ion im Zentrum des Porphyrinrings und zum anderen von den Carbonyl- und Esterfunktionen der Seitenketten aus. Chlorophyll b läuft langsamer als Chlorophyll a, da es eine zusätzliche Aldehydgruppe aufweist und deshalb etwas stärker mit der stationären Phase interagiert.

Reinigung und Entsorgung

Die Chromatographiesäule wird zum Trocknen in den Abzug gelegt. Nach dem Trocknen kann das Kieselgel mit einem Spatel aus der Säule herausgeholt und entsorgt werden. Nur vollständig getrocknetes Kieselgel kann dem Abfall zugeführt werden.

Die Wiederaufbereitung des Lösemittels durch Destillation macht hier keinen Sinn, da sich dabei die Zusammensetzung ändern würde. Übriggebliebenes Laufmittel kann für spätere Versuche in einem verschlossenen Gefäß aufbewahrt werden. Benutztes Laufmittel wird in den Sammelbehälter für halogenfreie organische Lösemittel gegeben.

Die Hähne der Glasgeräte werden entfettet und separat gelagert.