

Dünnschicht- und Säulenchromatographie

Autor: Florian KLUBENSCHIEDL

Bericht verfasst am: 28. Februar 2019

Versuchsdurchführung am: 04. März 2019
Gruppe, Matrikelnummer: 3, 11805747
Assistent: Professor Smith

Zusammenfassung

1 Trennung von Aminosäuren - Dünnschichtchromatographie

1.1 Theoretische Grundlagen

1.1.1 Motivation

Aminosäuren spielen eine grundlegende Rolle in vielen biochemischen Vorgängen. Werden sie über eine Peptidbindung miteinander verknüpft, bilden sie Polypeptide und in weiterer Folge Proteine. Um nun die oft sehr komplexe Funktionsweise der Proteine besser zu verstehen, ist es notwendig, ihren chemischen Aufbau zu kennen - also die Aminosäuresequenz. Die Möglichkeiten diese zu bestimmen reichen von ausgeklügelten spektroskopischen Methoden über spezifische Abbaureaktionen¹ bis zu chromatographischen Methoden.

Die Dünnschichtchromatographie ist eine schnelle Methode [1, S. 148], ein Aminosäurengemisch ohne viel apparativen Aufwand aufzutrennen. Gründe für die Trennung sind Polaritätsunterschiede und verschiedene Dissoziationszustände² bei gleichem pHWert³. Durch Vergleich mit Referenzmessungen kann dann die genaue Zusammensetzung vom Aminosäurengemisch bestimmt werden.

1.1.2 Ziel des Experiments

Auf Basis der obigen Überlegungen ist das Ziel, die Zusammensetzung einer Aminosäurenmischung⁴ zu bestimmen. Die Auswahl ist dabei beschränkt auf L-Serin, L-Leucin, L-Prolin, L-Arginin und L-Histidin.

¹z. B. Hydrolyse der Amidbindung

²unter den Aminosäuren

³Aminosäuren haben typischerweise zwei unterschiedliche pK_s Werte (aufgrund der Carbonsäure- und der Aminogruppe), weswegen bei unterschiedlichen pHWerten unterschiedliche Ionen zu erwarten sind - das Zwitterion liegt am isoelektrischen Punkt vor

⁴mindestens zwei Aminosäuren sind enthalten

1.2 Experimenteller Teil

1.2.1 Verwendete Materialien

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Geräte und Chemikalien

Geräte	Hersteller	Chemikalie	Bezogen von
DC-Platte		neutrales Laufmittel - 30 ml CH_3CN , 20 ml 0.1 M NH_4Ac , 25 ml Ethanol	Vorrat
250 ml Becherglas		saures Laufmittel - 30 ml n- Butanol, 10 ml deion. H_2O , 10 ml konz. Eisessig	Vorrat
Uhrglas		verdünnte L-Serin Lösung	
Föhn		verdünnte L-Leucin Lösung	
Glaskapillaren		verdünnte L-Prolin Lösung	
Trockenschrank		verdünnte L-Arginin Lösung	
14 cm Geodreieck und Bleistift		verdünnte L-Histidin Lösung	
		0.1 % (w/w) Ninhydrin Lösung in Ethanol	

Anmerkung zur Handhabung von Ninhydrin⁵: Haut, Atemwege und Augen werden gereizt - bei Kontakt mit Wasser spülen

1.2.2 Versuchsdurchführung

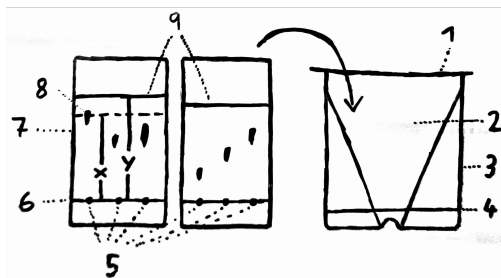


Abbildung 1: schematische Versuchsanordnung: (1) Uhrglas, (2) mit Lösungsmitteldämpfen gesättigter Gasraum, (3) DC-Kammer - 250 ml Becherglas, (4) Laufmittelstand - ca. 0.5 cm über dem Boden des Becherglases, (5) Probespots, (6) mit Bleistift markierte Startlinie, (7) DC-Platte, (8) Probespots nach erfolgter Trennung, (9) Laufmittelfronten - nach Entnahme der DC-Platte mit Bleistift markiert

⁵H und P Sätze: H - 302, 315, 319, 335; P - 261, 305, 351, 338

Zu Beginn wurde die DC-Kammer mit dem jeweiligem Laufmittel⁶ gefüllt, wie in Abbildung 1 beschrieben. Das Becherglas wurde mit dem Uhrglas bedeckt, um die DC-Kammer mit dem Lösungsmitteldampf zu sättigen.

Auf zwei DC-Platten wurde in einer Höhe von 1 cm je eine Startlinie eingezeichnet. Auf dieser wurden dann in regelmäßigem Abstand Probespots der gegebenen fünf Aminosäuren und der zu untersuchenden Probe aufgetragen⁷. Es wurde darauf geachtet, große Probespots zu vermeiden (max. Durchmesser von 2 mm). Nach dem Trocknen der Spots wurden die DC-Platten in die wie oben beschrieben präparierte DC-Kammer gestellt (wie in Abbildung 1 zu sehen) und mit dem Uhrglas abgedeckt. Nachdem die Laufmittelfront ca. 2/3 der Platte erreichte, wurde sie aus der DC-Kammer entnommen und die Laufmittelfront mit einem Bleistift markiert. Nach dem Trocknen wurde die DC-Platte im Abzug mit einer Ninhydrin Lösung besprüht und kurz geföhnt. Anschließend wurde sie im Trockenschrank bei 110 °C entwickelt.

1.2.3 Auswertung

Aufgrund der in 1.1.1 genannten, unterschiedlichen Eigenschaften der untersuchten Proben, halten sich die einzelnen Substanzen verschieden lange in der stationären⁸ bzw. der mobilen⁹ Phase auf. Damit legen sie unterschiedliche Strecken auf der DC-Platte zurück, die für eine Substanz charakteristisch, also reproduzierbar sind¹⁰. Aus der zurückgelegten Strecke der Substanz ($= x$) und der zurückgelegten Strecke des Laufmittels ($= y$) errechnet sich der Retentionsfaktor wie in (1) dargestellt.

$$R_f = \frac{x}{y} \quad (1)$$

1.2.4 Messergebnisse

In Tabelle 2 sind alle Messwerte, die im Rahmen der Versuchsdurchführung wie in 1.2.2 beschrieben, gemessen wurden. Die Werte von y_{sauer} , $y_{neutral}$ separat: $y_{sauer} = \text{cm}$, $y_{neutral} = \text{cm}$.

Tabelle 2: Messdaten

Substanz	x_{sauer} in cm	$R_{f,sauer}$	$x_{neutral}$ in cm	$R_{f,neutral}$
L-Serin				
L-Leucin				
L-Prolin				
L-Arginin				
L-Histidin				
Probe				

⁶es wurden zwei Laufmittel verwendet, die Zusammensetzung ist in Tabelle 1 beschrieben

⁷mithilfe einer Kapillare, die vor jeder neuen Probenaufnahme gereinigt wurde

⁸Kieselgel der DC-Platte

⁹Laufmittel

¹⁰natürlich bei gleicher Laufmittelzusammensetzung

1.3 Ergebnisse und Diskussion

2 Trennung von Pflanzenfarbstoffen - Säulenchromatographie

2.1 Theoretische Grundlagen

2.1.1 Motivation

Säulenchromatographie ist analog zur Dünnschichtchromatographie eine Methode zum Trennen einer Substanzmischung. Die stationäre Phase ist in einer Säule gepackt. Die Probe wird am Anfang der Säule aufgegeben und anschließend wird kontinuierlich Eluent (= mobile Phase) hinzugeben. Die Retentionszeit gibt an, wie lang eine Substanz braucht, um durch die Säule zu wandern. Aufgrund der unterschiedlich starken Wechselwirkungen der einzelnen Substanzen mit der stationären Phase, werden die Substanzen getrennt. Der apparative Aufwand ist im Vergleich zur Dünnschichtchromatographie etwas größer, hält sich jedoch in Grenzen [1, S. 154].

Die beiden Biomoleküle Chlorophyll und Carotin nehmen eine bedeutende Rolle im Leben ein. Chlorophyll ist für die grüne Blattfarbe verantwortlich und überlagert zunächst das Carotin. Dieses kommt jedoch zum Vorschein, wenn im Herbst das Chlorophyll systematisch abgebaut wird [2].

2.1.2 Ziel des Experiments

Um die Eigenschaften der beiden in 2.1.1 genannten Moleküle genauer zu bestimmen, müssen diese zuerst voneinander getrennt werden. Das Ziel des Experiments ist somit, mithilfe von Säulenchromatographie eine entsprechende Trennung durchzuführen. Als Probenmaterial wurden Spinatblätter verwendet.

2.2 Experimenteller Teil

2.2.1 Verwendete Materialien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Geräte und Chemikalien

Geräte	Hersteller	Chemikalie	Bezogen von
Pasteurpipette mit Saugaufsatz		Spinatblätter (<i>lat. Spinacia oleracea</i>)	Vorrat
(10.0 ± 0.1) ml Messzylinder		Petrolether	Vorrat
Reagenzgläser		Ethanol	
50 ml Becherglas		Aceton	
		Al ₂ O ₃	
		Glaswolle	
		Sand	

2.2.2 Versuchsdurchführung

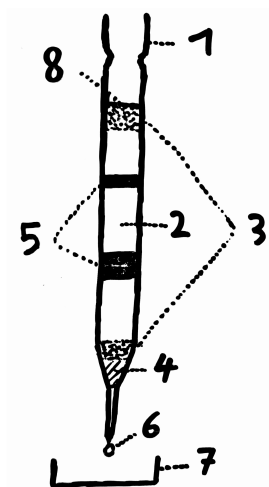


Abbildung 2: schematische Versuchsanordnung: (1) Pasteurpipette - Säule - und Öffnung für Eluentenzufuhr, (2) ca. Al_2O_3 -Schicht, (3) Sand, (4) Glaswolle, (5) Banden der getrennten Substanzen, (6) Ort der Elution der Substanz, (7) Auffangvorrichtung, (8) Aufgabe der Probe

Im ersten Schritt wurde eine Analysenlösung vorbereitet. Dazu wurde ein Spinatblatt im 50 ml Becherglas zerkleinert und mit ca. 5 ml EtOH gewaschen. Die EtOH-Fraktion wurde abdekantiert und verworfen. Nun wurden 5 ml Petrolether hinzugegeben und das Blattextrakt für ca. 5 min lang durch Schütteln extrahiert. Es wurde wieder abdekantiert, wobei die Petrolether-Fraktion nicht verworfen und nicht zur Trennung eingesetzt wurde.

Nun wurden die Elutionslösungen¹¹ vorbereitet. Elutionslösung 1 war eine Mischung von 0.7 ml Aceton mit 9.3 ml Petrolether. Elutionslösung 2 war reines Aceton. Beide Lösungen wurden griffbereit aufbewahrt.

Die Trennsäule wurde wie in 2 skizziert vorbereitet. Als Säule diente eine Pasteurpipette, die man mit einem Stativ befestigte. Zuerst wurde die Pipette mit Glaswolle befüllt, die mithilfe eines Drahtes schön kompakt zusammengedrückt wurde¹². Danach wurde diese mit einer ca. 0.3 cm hohen Sandschicht überdeckt. In einem Reagenzglas wurde eine ca. 1 cm dicke Al_2O_3 -Schicht mit 7 cm Petrolether überdeckt. Durch Aufschlemmen des Al_2O_3 mit einer Pasteurpipette erhielt man eine Suspension, die in die Säule überführt wurde, wobei darauf geachtet wurde, die Entstehung von Luftblasen in der Säule zu vermeiden. Ein Trockenlaufen der Säule wurde in allen folgenden Schritten durch konstante Zufuhr an Elutionslösung verhindert¹³. Diese Schicht wurde mit einer ca. 0.3 cm hohen Sandschicht überdeckt.

Nun konnte mit der Trennung gestartet werden. Dazu wurde die im ersten Schritt vorbereitete Analysenlösung auf die oberste Sandschicht gelegt¹⁴ und gewartet, bis sie zur Gänze in die Sand-

¹¹=mobilen Phase

¹²desto kompakter, desto höher ist die Trennleistung aufgrund der größeren Anzahl an Wechselwirkungen

¹³beim Befüllen nach dem Trockenlaufen kann es zum Einschluss von Luft in der Säule kommen, was die Trennleistung reduziert

¹⁴der Petrolether hat gerade die oberste Sandschicht durchquert

schicht eingedrungen war¹⁵. Elutionslösung 1 wurde hinzugegeben. Das Carotin löste sich in dieser besser wie das Chlorophyll und eine gelbe Bande wanderte die Säule hinunter. Am Säulenende angelangt, wurde die Fraktion in einem Reagenzglas aufgefangen, wie in 2 gezeigt¹⁶. Das Chlorophyll wurde durch einen Wechsel der Elutionslösung erhalten. Elutionslösung 2 wurde dazu verwendet. Analog zum Carotin wurde das Chlorophyll am Säulenende aufgefangen¹⁷.

2.3 Ergebnisse und Diskussion

Nach dem Trennvorgang wurden zwei Lösungen erhalten - Eluent 1 mit Carotin und Eluent 2 mit Chlorophyll. Durch die unterschiedliche Farbe können sie eindeutig voneinander unterschieden werden, weswegen die Trennung als erfolgreich anzusehen ist.

¹⁵Vorgang auch als Beladen der Säule bezeichnet

¹⁶Eluent 1

¹⁷natürlich in einem anderen Reagenzglas - Eluent 2

Reaktionsverzeichnis

Literaturverzeichnis

- [1] Georg Schwedt. *Taschenatlas der Analytik*. 3. Auflage. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2007 (siehe S. [1](#), [4](#)).
- [2] George A. F. Hendry, Jennifer D. Houghton und Stanley B. Brown. “The Degradation of Chlorophyll-a biological enigma”. In: *New Phytologist* 107 (2 1987), S. 255–302. DOI: [10.1111/j.1469-8137.1987.tb00181.x](#) (siehe S. [4](#)).

Abbildungsverzeichnis

1	schematische Versuchsanordnung Dünnschichtchromatographie, Quelle: Autor	2
2	schematische Versuchsanordnung Säulenchromatographie, Quelle: Autor	5

Tabellenverzeichnis

1	Materialienliste Dünnschichtchromatographie, Quelle: Autor	2
2	Messdaten, Quelle: Autor	3
3	Materialienliste Säulenchromatographie, Quelle: Autor	4