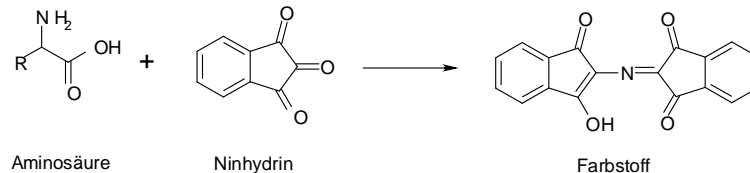




## Trennung von Aminosäuren

**Einführung:** Aminosäuren sind die Einzelbausteine der Proteine und können z.B. durch Hydrolyse daraus gewonnen werden. Sie sind stark polare Substanzen, die zumindest eine Amino- und eine Carbonsäuregruppe besitzen. Die Adsorptionschromatographie (Kieselgel, Aluminiumoxid) liefert schlechte Ergebnisse. Die Aminosäuren werden daher auf einer Dünnschicht-*Cellulosefolie* aufgetrennt (die Celluloseschicht verhält sich ähnlich wie ein Chromatographiepapier = **Verteilungschromatographie**).

**Problemstellung:** Da nur wenige Aminosäuren eine Eigenfarbe besitzen oder im UV-Licht durch Fluoreszenzlöschung (quenching) sichtbar gemacht werden können (Voraussetzung: aromatisches System), wird als Nachweis eine Sichtbarmachung durch entsprechende Reagenzien gewählt. Das klassische Reagens für Aminosäuren ist **Ninhydrin**:



**Trennmateriale:** Cellulose (Verteilungschromatographie);

**Laufmittel:** Als Laufmittel hat sich folgende Mischung bewährt:

<b>Butanol (35)</b>	<b>Aceton (35)</b>	<b>Eisessig (7)</b>	<b>Wasser (23)</b>
---------------------	--------------------	---------------------	--------------------

**Durchführung:** Die unbekannte Aminosäure sowie die 4 Vergleichsaminosäuren (**Glycin, Alanin, Tyrosin, Phenylalanin**; Menge: je eine Spatelspitze) werden in Eprovetten durch Erhitzen mit der Heissluftpistole in ca. 1 mL Wasser gelöst (eventuell Ethanol zugeben) und nebeneinander auf *einer* Cellulosefolie chromatographiert.

**Detektion:** Nach dem Entwickeln (Dauer: ca. 25-30 min) wird in der Sprühkammer auf die getrocknete DC-Folie eine 0.2 proz. alkoholische Ninhydrinlösung mit einem Zerstäuber aufgesprüht (*Achtung: nicht die Hände besprühen*). Dabei darf nur ein feiner Flüssigkeits-schleier (seidiger Glanz) auf dem Chromatogramm zu erkennen sein. Auf keinen Fall darf überschüssige Reagenslösung auf das Chromatogramm gelangen, da sonst die Flecken ihre scharfe Abgrenzung verlieren. Da sich die Flecken erst nach einiger Zeit bilden, wird durch Erhitzen der DC-Platten mit der Heissluftpistole die Reaktion beschleunigt.

Nach Ausbildung der Flecken werden diese mit Bleistift umrandet, da die Farbflecken nur einige Stunden haltbar sind. Dann wird der R<sub>f</sub>-Wert ermittelt und anhand des R<sub>f</sub>- Wertes und der Farbe die gesuchte Aminosäure identifiziert.

**Auswertung:** Nach Ausbildung der Flecken werden diese mit Bleistift umrandet, da die Farbflecken nur einige Stunden haltbar sind. Dann wird der R<sub>f</sub>-Wert ermittelt und anhand des R<sub>f</sub>- Wertes und der Farbe die gesuchte Aminosäure identifiziert.

### Fehlermöglichkeiten:

*Schiefelaufende Front:* Die Schicht der DC-Folie ist an der Längsseite beschädigt.

- Abhilfe durch Zurechtschneiden der Folie.

*Zu große Flecken, Schwanzbildung:* Konzentration ist zu hoch (Sorptionisotherme verläßt den geradlinigen Teil) oder Sprühreagens wurde nicht sofort getrocknet (Diffusion).

- Abhilfe: Lösung verdünnen oder weniger auftragen.

R<sub>f</sub>-Werte sind zu klein: Laufmittel ist nicht (mehr) in Ordnung (z.T. verdampft oder zu oft verwendet).

- Abhilfe: neues Laufmittel verwenden.

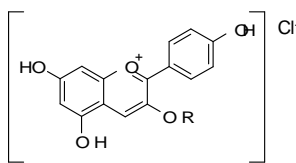
## Auftrennung von Blütenfarbstoffen

**Einführung:** Diese Pflanzenfarbstoffe bilden die große Vielfalt der gelben, roten und blauen Blütenfarbstoffe und finden sich auch in vielen anderen Pflanzenteilen. Aus den verschiedenen Blütenextrakten lassen sich trotz der großen Farbvielfalt zwischen rotorange bis tiefblau meist nur Farbstoff-Flecken in vier Farbtönen nachweisen:

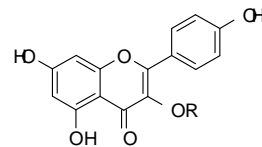
**Rotorange** (*Pelargonidin*), **Violett** (*Cyanidin*), **Lilablau** (*Delphinidin*), und **Gelbgrün** (*Flavonole*).

Die ersten drei Farbstoffe gehören zur Gruppe der **Anthocyanidine**. Die **Flavonole** sind mit den Anthocyanidinen chemisch und pflanzenphysiologisch eng verwandt: man kann sie als oxidierte Anthocyanidine auffassen. Als Grundgerüst besitzen sie alle das 2-Phenylchromen (ein Benzopyran). In der Pflanze liegen die Anthocyanidine und Flavonole als Glykoside (*Anthocyane*) vor, d.h. in der 3- oder 5-Stellung des Chromens ist ein H-Atom der Hydroxygruppe durch einen Zuckerrest R ersetzt. Dadurch wird auch eine gute Wasserlöslichkeit bewirkt.

**Problemstellung:** Die Blütenfarbstoffe sind nur in Form ihrer Salze (am besten Hydrochloride) gut chromatographierbar. Um ausserdem die große Anzahl an Farbstoffen auf einige wenige zu reduzieren, wird durch Etherspaltung in Salzsäure der Glykosidrest abgespalten. Dadurch kann mittel DC der jeweilige Farbstoff anhand der obigen Liste zugeordnet werden.



Pelargonidin-Hydrochlorid,  
(ein Anthocyanidin)



Quercetin, ein Flavonol

**Trennmittel:** Als stationäre Phase werden **Cellulosefolien** verwendet.

**Laufmittel:**

LM2	<i>n</i> -Butanol (3)	Ameisensäure (1)	Wasser (1)	38 min
-----	-----------------------	------------------	------------	--------

**Durchführung:** Etwa 1-2 g Blütenblätter werden mit der Schere kleingeschnitten und in einem Mörser mit ca. 2 g Sand und ca. 5 mL 1-proz. methanolischer HCl homogenisiert (aus 0.8 mL konz. HCl und 30 mL Methanol). Die Homogenate werden mittels Saugfinger abgesaugt und die intensiv gefärbten Lösungen direkt zur Dünnschichtchromatographie eingesetzt (Vorsicht: die Lösungen und später die Chromatogramme nicht längere Zeit dem hellen Sonnenlicht aussetzen).

Auf der DC-Folie wird der Blütenextrakt möglichst konzentriert aufgetragen. Dann trocknet man mit kalter Luft aus dem Fön, entwickelt, und trocknet das Chromatogramm kurz mit dem Fön.

**Detektion:** Die Farbstoffe werden im sichtbaren Licht sowie im UV-Licht bei 254 und 360 nm detektiert..

**Auswertung:** Die im UV und VIS sichtbaren Flecken werden sofort mit Bleistift umrandet, da manche nur einige Stunden haltbar sind. Anhand der Farben werden die Farbstoffe anhand der oben angeführten Farbtabelle identifiziert.

**Farbwechsel bei Anthocyanen:** Das fertige, ausgewertete Chromatogramm wird ca. 20 sek. mit der Pinzette in den Dampfraum einer DC-Kammer gehalten, die mit wenigen mL konz. Ammoniak gefüllt ist. Dabei beobachtet man eine Farbvertiefung beim Übergang vom Farbkation (Pyryliumsalz) zum Farbanion.

Welcher Farbstoff wird erst jetzt im VIS sichtbar?

Der Vorgang ist reversibel (führen Sie den Versuch analog mit einer kleinen Menge konz. Salzsäure durch!).

**Fehlermöglichkeiten:**

*Schieflaufende Front:* Die Schicht der DC-Folie ist an der Längsseite beschädigt.

- Abhilfe durch Zurechtschneiden der Folie.

*Zu große Flecken:* Kapillaren sind zu dick, es wurde zu lange aufgetragen oder nicht sofort getrocknet (Diffusion).

- Abhilfe: Weniger, aber mehrmals auftragen, zwischentrocknen.

R<sub>f</sub>-Werte sind zu klein: Laufmittel ist nicht (mehr) in Ordnung .

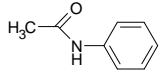
- Abhilfe: neues Laufmittel verwenden.

## DC-Analyse eines unbekanntes Substanzgemisches

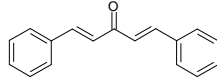
**Problemstellung:** Ein Gemisch von 2 unbekanntes Verbindungen (Substanzen, die entweder durch Fluoreszenzlöschung oder Derivatisierung am DC sichtbar sind) wird durch Vergleich mit 4 bekannten Verbindungen (siehe Tabelle unten) eine Identifizierung durchgeführt.

Vergleichssubstanzen, die durch Fluoreszenzlöschung detektiert werden können: **Dibenzalacetone, Acetanilid**

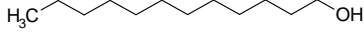
Vergleichssubstanzen, die durch Derivatisierung sichtbar gemacht werden müssen: **1-Dodecanol, 3-Menthol**



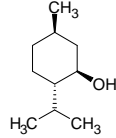
N-Phenyl-acetamide  
Acetanilid



1,7-Diphenyl-hepta-1,6-dien-4-one  
Dibenzalacetone



Dodecan-1-ol



(1R,2S,5R)-2-Isopropyl-5-methyl-cyclohexanol  
Menthol

**Trennmateriale:** Als stationäre Phase wird eine *Kieselgelfolie* verwendet (Adsorptionschromatographie).

**Laufmittel:** Das Laufmittel wird anhand der elutropen Reihe und den angegebenen Laufmittelgemischen zusammengestellt.

**Durchführung:** Die Probe wird mit jeweils 2 Vergleichsproben in einem mittelpolaren Laufmittel (vgl. Chromatographie-Vorlesung) chromatographiert.

**Detektion:** a) durch Betrachtung im UV-Licht (bei welcher Wellenlänge beobachten Sie Fluoreszenzlöschung?)  
b) mittels Derivatisierung durch Tauchen in Vanillin-Schwefelsäure.

Zusammensetzung des Tauchreagens:			
150 mL Wasser	20 mL konz. Schwefelsäure	125 mL Ethanol	1.5 g Vanillin
Anwendung: 1 sek tauchen, abstreifen, mit der Heissluftpistole ca. 2 min trocknen			

**Auswertung:** Bestimmung der  $R_f$ -Werte und Zuordnung der unbekanntes Substanzen zu identischen Vergleichssubstanzen

### Fehlermöglichkeiten:

*Schieflaufende Front:* Die Schicht der DC-Folie ist an der Längsseite beschädigt.

- Abhilfe durch Zurechtschneiden der Folie.

*Zu große Flecken, Schwanzbildung:* Konzentration ist zu hoch (Sorptionisotherme verläßt den geradlinigen Teil), oder Tauchreagens wurde nicht sofort getrocknet (Diffusion).

- Abhilfe: Lösung verdünnen oder weniger auftragen.

$R_f$ -Werte sind zu klein, zu groß oder überlappen: Laufmittel ist nicht (mehr) in Ordnung (z.T. verdampft oder zu oft verwendet), Laufmittlwahl war falsch.

- Abhilfe: neues (anderes) Laufmittel verwenden.