

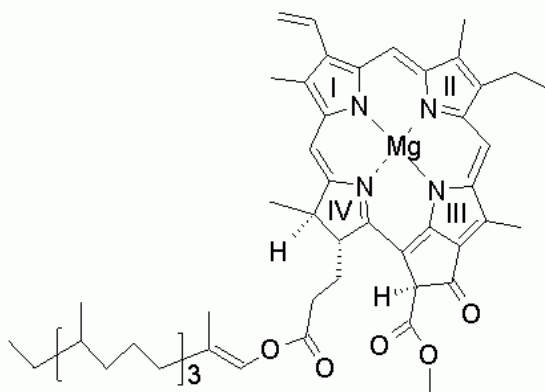
SÄULENCHROMATOGRAPHIE VON PFLANZENPIGMENTEN

Aufgabenstellung

Ein wichtiges Teilgebiet der Organischen Chemie ist die Isolierung und Charakterisierung von Naturstoffen. Sowohl zur präparativen Auftrennung als auch zur analytischen Charakterisierung wird häufig die Technik der Chromatographie benutzt. In diesem Experiment wird ein Spinatextrakt mittels Säulenchromatographie in seine Hauptkomponenten (Carotine, Chlorophylle, Xanthophylle) aufgetrennt und die Extrakte mittels Dünnschichtchromatographie auf ihre Reinheit überprüft.

THEORIE

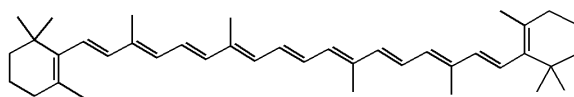
Pflanzenpigmente



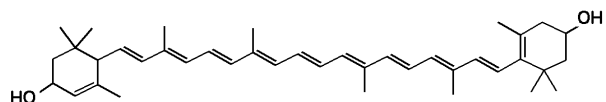
Chlorophyll ist das photosynthetisch wirksame Pigment, das die Umwandlung der Lichtenergie in chemische Energie vermittelt. Es ist der Farbstoff der grünen Blätter, ein **Porphyrinkomplex** (Pyrrolringe) mit **Magnesium als Zentralatom**. In fast allen Pflanzen kommen zwei nahe verwandte Pigmente (Chlorophyll A und B) vor, die sich in der Seitenkette des Ringes II unterscheiden (CH=O statt CH₃). Visuell unterscheiden sich die beiden Chlorophyllarten durch eine blaugrüne (A) bzw. gelbgrüne (B) Farbe in organischen

Lösungsmitteln. Technisch wird Chlorophyll als Farbstoff in Kosmetika verwendet, außerdem als Sensibilisator für Farbfilme und als Deodorant. Als chromatographischer Artefakt oder Abbauprodukt des Chlorophylls kann daneben noch **Phaeophytin** auftreten (informieren Sie sich über die Struktur und Farbe).

Carotine und Xanthophylle werden unter dem Sammelbegriff Carotinoide zusammengefasst. Sie sind durch die große Zahl der **konjugierten Doppelbindungen** (siehe Beispiel *Farbstoffe und Chemilumineszenz!*) stets farbig, meist rot oder gelb.



β-Carotin



Lutein (Blattxanthophyll)

Carotine: α- und β-Carotin sowie Lycopin sind die Farbstoffe der Karotte und Tomate. Die biologische Bedeutung der Carotine liegt in der Photosynthese und beim Sehvorgang. Technisch werden Carotine für Vitaminpräparate (Provitamin A) sowie als Antioxidantien verwendet.

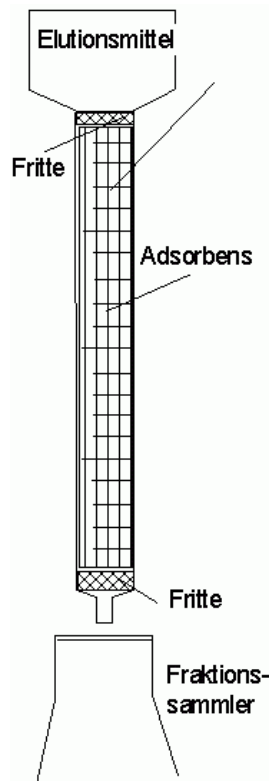
Xanthophylle: Farbstoffe z. B. im Mais und in Crustaceen (Schalentiere). Sie sind eng verwandt mit den Carotinen, aber sie besitzen noch **Hydroxylgruppen** und sind daher polarer.

Chromatographie

Als Chromatographie bezeichnet man eine Technik zur Auftrennung von Stoffgemischen durch Aufteilung zwischen einer ruhenden (stationären) und einer sich bewegenden (mobilen) Phase. Das hat

zur Folge, dass ein Molekül, das sich überwiegend in der beweglichen Phase aufhält, schneller mit dem Laufmittel weitertransportiert wird, als ein Molekül, das überwiegend in der stationären Phase verbleibt. Die Verzögerung eines Moleküls gegenüber der Laufmittelfront ist abhängig von der stationären Phase und dem Laufmittel sowie den Moleküleigenschaften.

Trennprinzip: In diesem Beispiel wird die **ADSORPTION** an der Oberfläche von feinverteilten stationären Phasen (Aluminiumoxid, Al_2O_3) benutzt. Daneben gibt es noch andere Trennprinzipien wie z. B. Verteilungschromatographie zwischen 2 Flüssigkeiten, Ausschlusschromatographie nach der Molekülgröße (siehe *Beispiel Proteinbestimmung*) oder Ionenaustauschchromatographie von geladenen Molekülen.



SÄULENCHROMATOGRAPHIE: Diese Technik wird im vorliegenden Experiment dazu verwendet, um aus einem Blattextrakt präparativ die einzelnen Pigmente zu isolieren.

Der wesentlichste apparative Teil ist die Säule, die aus einem Glas- oder Kunststoffrohr und einem Hahn besteht. Das Rohr wird mit festem Trägermaterial gefüllt (**stationäre Phase**), das dann mit den aufzutrennenden Verbindungen in Wechselwirkung tritt. Diese Chromatographieart dient zur präparativen Trennung meist größerer Substanzmengen. Die Abmessungen der Säule können - entsprechend ihrem Verwendungszweck - sehr unterschiedlich sein (und sind daher bei der Beschreibung anzugeben). Es finden sowohl kurze Tropfpipetten als auch meterlange Rohre Verwendung. Die Säule ist exakt senkrecht aufzubauen. Wichtig ist die gleichmäßige Verteilung des Füllkörpers, da sonst die Substanzen nicht als waagrechte Banden, sondern als gezackte, sich überlappende Zonen durchlaufen. Sämtliche Geräte müssen wasserfrei sein.

Die mobile Phase: Die Wahl des **Laufmittels** erfolgt nach seiner Elutionskraft und hat einen entscheidenden Einfluss auf die Trennung. Es ist einerseits Konkurrent um aktive Adsorptionsstellen und bewirkt auf der anderen Seite die Solvatisierung von Substanzen, d.h., die Lösung im Laufmittel.

Die Eigenschaften verschiedener Laufmittel werden in der **Eluotropen Reihe für die Adsorptionschromatographie** zum Ausdruck gebracht. Die eluotrope Reihe ist eine empirische Ordnung der Laufmittel nach steigender Elutionskraft (für Kieselgel und Aluminiumoxid):

Cyclohexan < Tetrachlorkohlenstoff < Toluol < Chloroform < Dichlormethan < Acetonitril < 2-Propanol < Essigester < Aceton < Pyridin < Ethanol < Dioxan < THF < Methanol < Wasser

Eluieren: Unmittelbar nach dem Aufbringen der Substanzen beginnt man mit dem Entwickeln der Säule. Man lässt solange Lösungsmittel durchlaufen, bis nach einiger Zeit die Trennung erreicht ist. Da sich die Substanzen stark in ihrer Haftfähigkeit unterscheiden, würde das Durchlaufverfahren sehr große Lösungsmittelmengen erfordern. Diesem Nachteil begegnet man, indem man die Polarität der Elutionsmittel erhöht.

Probensammlung: Zum Auffangen der Eluate gibt es mechanische Fraktions-sammler, aber es kann auch ohne aufwendige Geräte manuell (mit Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben) erfolgen.

Detektion: die Detektion kann bei gefärbten Substanzen optisch, bei farblosen Substanzen z.B. mit einem UV-Detektor, manuell in der Dünnschichtchromatographie, oder durch Messung anderer Änderungen (wie z. B. der Dichte) erfolgen.

DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE: *Diese Methode wird dazu verwendet, um die Reinheit der einzelnen isolierten Fraktionen zu überprüfen.*

Die Dünnschichtchromatographie (DC, TLC = thin layer chromatography) dient entweder zur Identifizierung bekannter Substanzen, indem man ein Vergleichspräparat am selben Chromatogramm mitlaufen lässt, oder zur Reinheitsprüfung. Die stationäre Phase besteht aus porösen Trennmaterialien (z. B. Kieselgel, d.i. amorphes Siliciumdioxid, $(\text{SiO}_2)_x$) und ist in einer dünnen, einheitlichen Schicht an eine Platte (z. B. Aluminiumfolie) fest gebunden. Die Detektion erfolgt, falls die Substanzen am Chromatogramm nicht selbst gefärbt sind, durch Betrachten im UV-Licht oder durch Derivatisierung (z. B. Besprühen mit einem Reagens).

Sicherheitshinweise: *Toluol, Aceton und Essigester sind leicht brennbar. Die Lösungsmittel in die richtigen Behälter entsorgen! Die Saugflasche und der Rotavapor sind evakuiert (Implosionsgefahr). Schutzbrillen tragen!*

Arbeitstechnische Hinweise

Wichtige Arbeitstechniken wie z.B. das Absaugen, die Benutzung des Rotavapors, das Extrahieren und das Trocknen von Lösungsmitteln, die Verwendung von Messgefäßen, der Vakuumpumpe und von Glasgeräten etc. sind in der „**Organisch-chemischen Arbeitstechnik**“ am Anfang des Organisch-chemischen Übungsteils beschrieben.

EXPERIMENT (Zweiergruppen)

*Da dieses Experiment zeitaufwendig ist, müssen die **Herstellung des Pigmentextrakts (A)** und der **Aufbau der Säule (B)** parallel zur gleichen Zeit erfolgen, damit dann nach der Isolierung der Pigmente die betriebsfertige Säule sofort verwendet werden kann.*

A) Herstellung des Pigment-Extrakts: Etwa 10 g Blattspinat werden mit derselben Menge Sand vermischt und in Portionen nach Zugabe von insgesamt ca. 50 mL Aceton in einer großen Reibschale homogenisiert. Der Brei wird durch Absaugen von der grünen Lösung getrennt und mit ca. 50 mL Aceton nachgewaschen. Die vereinigten Filtrate (= Pigmentlösung) werden am Rotationsverdampfer bei max. 40°C soweit eingengt, dass kein Aceton mehr übergeht. *Das ebenfalls im Spinat vorhandene Wasser braucht nicht fertig abgedampft werden.*

Der Rückstand wird in ca. 50 mL Cyclohexan aufgenommen. (**Achtung:** *Der Hauptteil der Pigmente klebt an der Oberseite der Kolbenwandung und muss dort erst heruntergelöst werden!*). Man trennt die Wasserschicht im Scheidetrichter ab und wäscht mit ca. 30 mL Wasser, trennt die Phasen am Scheidetrichter (die Phasenbildung erfolgt sehr langsam!) und stellt die Wasserschicht beiseite. (*Vorsicht: welches ist die Wasserschicht? Prüfen Sie das nach!*) Die Cyclohexanschicht wird in einen Erlenmeyerkolben überführt, mit Natriumsulfat getrocknet und abdekantiert oder filtriert. Die auf

diese Weise hergestellte dunkelgrüne Cyclohexanlösung enthält **Carotine** (orange), **Chlorophylle** (gelb- und blaugrün) und **Xanthophylle** (gelb) neben einigen braunen und farblosen Komponenten.

B) Aufbau der Säule: Die Säule wird auf einem Stativ befestigt und ein kleiner Erlenmeyerkolben unter die Säule gestellt. Vor dem Füllen der Säule verschließt man diese unten mit der Kunststoffkappe. Dann wird die Säule mit Toluol bis zur Erweiterung (Laufmittelreservoir) aufgefüllt. *Es ist streng darauf zu achten, dass alle Lösungsmittel wasserfrei auf die Säule aufgebracht werden müssen. Sonst wird das Adsorbens teilweise deaktiviert und die Trennwirkung verschlechtert sich rapide.*

Dann füllt man die Säule langsam mit dem Adsorbens (Aluminiumoxid, Akt.St. 3-4, neutral) und lässt dieses im Solvens auf dem Boden absetzen. *Der Flüssigkeitsspiegel muss dabei beobachtet werden und wenn nötig kontinuierlich abgesenkt werden, um ein Überlaufen zu verhindern. Während sich das Adsorbens absetzt, ist es günstig, etwas an der Säule zu klopfen, um Luftblasen zu entfernen, damit sich das Adsorbens gleichmäßig absetzt. Die Säule wird knapp bis zur Erweiterung mit Adsorbens gefüllt.* Nachdem sich das Füllmaterial abgesetzt hat, bedeckt man es, um später ein Aufwirbeln zu verhindern, mit der Kunststoff-Fritte (*Diese Fritte ist dann später beim Abbau der Säule unbedingt wieder aufzubewahren!*). Nun ist die Säule betriebsfertig.

Die vorbereitete Trennsäule muss vollkommen homogen sein, darf also keine Flecken, Risse oder Blasen zeigen! Die Säule kann durch die beiden Fritten praktisch nicht trocken laufen. Trotzdem ist darauf zu achten, denn teilweise trockengelauene Säulen sind unbrauchbar und müssen neu gefüllt werden!

C) Auftragen des Trenngutes: Zur Säulentrennung wird die dunkelgrüne, in Cyclohexan gelöste Pigmentextraktlösung, die durch Extraktion aus Spinat gewonnen wurde, am Rotavapor bei ca. 30 - 40 °C zur Trockene eingengt und der Rückstand in ca. 1-2 mL Toluol aufgenommen. Auf der betriebsfertigen Säule lässt man das überstehende Toluol bis zur Fritte einsickern und trägt dann den Spinat-Extrakt in Portionen mit der Tropfpipette auf. *Man geht dabei so vor, dass man eine kleine Portion aufträgt, und wieder einsickern lässt, bevor man den nächsten Extraktteil aufträgt.* Nach dem Auftragen des Extraktes werden portionsweise einige mL des ersten Elutionsmittels (= Toluol, siehe Tabelle) aufgetragen und wieder einsickern lassen, bis die überstehende Lösung farblos ist. *Es ist streng darauf zu achten, dass alle Lösungsmittel **wasserfrei** auf die Säule aufgebracht werden (besonders bei den Gefäßen darauf achten!). Ansonsten wird das Adsorbens teilweise deaktiviert und die Auftrennung verschlechtert sich rapide.*

D) Säulentrennung des Pigmentextraktes: Das Reservoir wird mit Elutionsmittel gefüllt und es wird mit der Auftrennung der färbigen Komponenten begonnen. Sobald die erste gefärbte Zone in den Säulenboden eintritt, wird die Vorlage gewechselt und die gefärbte Zone in einem eigenen Gefäß aufgefangen. *Alle Beobachtungen werden notiert und dann kurz im Protokoll beschrieben.* Dann wird die Elutionskraft des Laufmittels graduell erhöht, wobei die folgende Tabelle als Anhaltspunkt dienen soll.

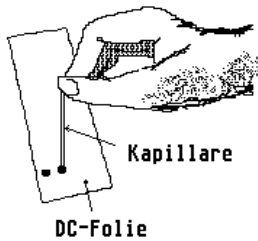
Laufmittel-Tabelle:

unpolar	Toluol
mittelpolar	Essigester

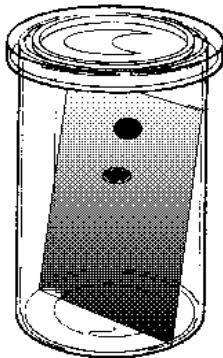
D) Reinheitsüberprüfung der getrennten Fraktionen: Die einzelnen Fraktionen werden zuerst am Rotavapor zur Trockne eingengt und dann in ca. 0.5 mL Aceton gelöst. Diese Lösungen werden

dünnschichtchromatographisch auf ihre Einheitlichkeit geprüft. Dazu werden die 3 Hauptfraktionen nebeneinander auf eine Kieselgel-DC-Folie aufgetragen und nach gutem Trocknen mit Toluol-Aceton (3:1) aufgetrennt.

Durchführung der Dünnschichtchromatographie (DC):

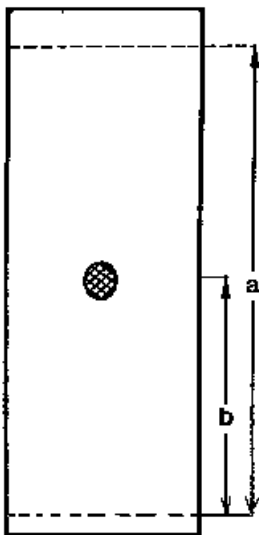


Die Substanzprobe wird auf der DC-Kieselgelfolie mit einer Kapillare als kleiner Fleck ca. 1 cm vom unteren Rand entfernt aufgetragen, dann wird das Lösungsmittel mit dem Fön kurz abgeblasen und die Platte mit der Probe nach unten zur **Entwicklung** in eine Chromatographiekammer gestellt, die ca. 3 mm hoch mit Laufmittel gefüllt ist.



Es muss darauf geachtet werden, dass das Laufmittel auf keinen Fall die aufgetragenen Substanzflecken berührt und herauslöst!

Das Laufmittel steigt durch die Kapillarkräfte an der Platte hoch und bildet die mobile Phase.



Zur **Auswertung** des Chromatogramms nimmt man nach genügend langer Laufstrecke die Platte aus der Kammer, markiert die Laufmittelfront und nach dem Trocknen die farbigen Substanzflecken,

Die Laufstrecken der Substanzen werden als **R_f-Werte** angegeben (Related to Front, Retentions-Faktor):

$$R_f = \frac{\text{Laufstrecke Substanz}}{\text{Laufstrecke Lösungsmittel}}$$

$$R_f = \frac{\text{Entfernung Startlinie} - \text{Mittelpunkt des Substanzflecks}}{\text{Entfernung Startlinie} - \text{Laufmittelfront}}$$

Beide Laufstrecken werden vom Startpunkt aus gemessen. Der R_f-Wert kann nie größer als 1 werden (warum?)!

Auswertung und Protokollführung

Beachten Sie auch die allgemeinen Hinweise zur Protokollführung im Teil: „Arbeitstechnik und Sicherheit im organisch-chemischen Labor“.

Während des Experiments protokollieren Sie **alle Daten und Beobachtungen sofort** in Ihr Laborjournal.

→ Alle relevanten Mengen-, Zeit- und Temperaturangaben (Molmassen, Molmengen, Konzentrationen) sind in das entsprechende Protokollblatt zu übertragen .

→ Mess- und Rechenergebnisse: Bei Zahlenwerten signifikante Stellen beachten; Verfügbare Kommastellen der verwendeten Waagen beachten.

Diskussion: Diskutieren Sie die kurz (3-5-Zeilen) die dünnschichtchromatographischen Ergebnisse wie Farben der Produkte, Reinheit der Fraktionen, Bestimmung und Zuordnung der Rf-Werte für alle visuell unterscheidbaren Inhaltsstoffe.

Bemühen Sie sich, alle Angaben mit Fachausdrücken zu beschreiben.