

Säulenchromatographie von Blattpigmenten an einer selbsthergestellten Umkehrphase – eine einfache Technik für Schülerversuche

ANDREAS BRINK, SUSANNE TRIEBKORN,
HEINZ SCHMIDKUNZ

Die Herstellung der Umkehrphase aus mikrokristalliner Cellulose und Speiseöl sowie die Durchführung der Säulenelutionschromatographie werden beschrieben. In der miniaturisierten Anordnung wird auf apolare Lösungsmittel verzichtet. Als Elutionsmittel dienen Ethanol, Aceton und Wasser bzw. Isopropanol. Die Xanthophylle, die Chlorophylle und das Carotin werden innerhalb von 40 min in verschiedenen Vorlagen aufgefangen (Prinzip der Fraktionssammlung).

Schülergerechte und umweltfreundliche Gestaltung durch das Umkehrphasenprinzip

Die in der Literatur beschriebenen säulenchromatographischen Trennungen von Blattpigmenten im Chemieunterricht sind besonders aufgrund der durchgängigen Verwendung von apolaren, organischen Elutionsmitteln (Petroleumbenzin, Benzol, Ether, Chloroform) sowohl in der Ausführung als „Trockensäulenchromatographie“ /1, 2, 3/ als auch als Elutionschromatographie /4, 5/ für Schülerversuche eher ungeeignet. Säulenchromatographieexperimente sollten aus heutiger, den Gefahrstoff- und Umweltaspekt berücksichtigender Sicht 1. durch konsequente Miniaturisierung geld-, zeit-,

material- und chemikaliensparend sein und 2. auf apolare, mit Wasser nicht mischbare, organische Lösungsmittel vollständig verzichten. Diesem Anspruch genügt die Verwendung des chromatographischen Umkehrphasenprinzips (reversed phase). Diese Technik, eine apolare organische stationäre Phase und eine polare, zum Teil wäßrige mobile Phase zu benutzen, wurde bereits Ende der 40er Jahre beschrieben /6, 7, 8/. Sie setzte sich jedoch erst durch, nachdem mit der Entwicklung der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) die auf einem Trägermaterial (meist Kieselgel) chemisch gebundene „organische“ Phase entwickelt wurde (bonded reversed phase) /15/. Käufliche „professionelle“ Umkehrphasen auf Kieselgelbasis sind teuer und können ggf. für eine Demonstrationsapparatur eingesetzt werden /9/.

Im folgenden wird daher eine Technik beschrieben, die es ermöglicht, mit einfachen Mitteln eine für die Säulenelutionschromatographie verwendbare Umkehrphase selbst herzustellen und diese im Schülerversuch zu verwenden. Wir benutzen mikrokristalline Cellulose, die in Anlehnung an eine dünn-schichtchromatographische Technik /10/ mit LIVIO-Speiseöl adsorptiv beschichtet wird. Dieser vorgeschaltete „Imprägnierungsschritt“ kann je nach Situation vom Lehrer oder von den Schülern durchgeführt werden.

Als Chromatographiesäule dient das Röhrchen einer Pasteur-Tropfpipette aus Glas /11, 12, 13/ und als Vorlagegefäße finden – im Sinne einer konsequenten Miniaturisierung – 1,5-ml-Eppendorfgefäße mit Schnapdeckel Verwendung /14/. Nach Aufbringen einer kleinen Portion des acetonischen Blattfarbstoffextraktes (6 mm hoch) wird zunächst mit dem Elutionsmittel I (Ethanol/Aceton/Wasser 105:37,5:15; äquilibriert mit 5 ml LIVIO-Speiseöl) und anschließend mit 2-Propanol eluiert, um auch das stark retardierte Carotin durch die Säule zu transportieren (typisches Verhalten einer apolaren Substanz auf einer Umkehrphase). Wenn man die Eppendorfgefäß-Vorlagen zu den geeigneten Zeiten wechselt, hat man die gelben Komponenten (Xanthophylle) von den grünen Chlorophyllen und den orangefarbenen Pigmenten (Carotine) getrennt, und zwar in dem auch für Schülerinnen und Schüler unmittelbaren Sinn, daß sie sich anschließend in drei verschiedenen Gefäßen befinden.

Experimentelle Durchführung

Ansetzen des Elutionsmittels I

Chemikalien: Ethanol (ALDRICH Nr. 24, 511-9 mit 5 % 2-Propanol vergällt), Aceton p.a., LIVIO-Speiseöl

Geräte und Materialien: 2 Meßzylinder 100 ml und 10 ml, Schüttel- oder Tropftrichter 250 ml, Erlenmeyerkolben 250 ml mit Stopfen 105 ml Ethanol, 37,5 ml Aceton p.a., 15 ml dest. Wasser und 5 ml Speiseöl werden in Meßzylindern abgemessen und in einen 250-ml-Tropf- oder Scheidetrichter gegeben. Nach intensivem Schütteln läßt man die milchig weiße Emulsion über Nacht stehen. Die untere Ölphase wird abgelassen und die klare Oberphase durch die Trichteröffnung in einen 250-ml-Erlenmeyerkolben gegossen.

Ansetzen des Beschichtungsmittels

Chemikalien: Aceton p.a., LIVIO-Speiseöl
Geräte und Material: Steilbrustflasche braun 100 ml, Meßzylinder 100 ml und 10 ml 5 ml LIVIO-Speiseöl, das nicht älter als ein halbes Jahr sein sollte /Anm./, werden mit

einem 10-ml-Meßzylinder abgemessen und mit 95 ml Aceton in einer 100-ml-Steilbrustflasche zusammengegeben. Anschließend wird kurz geschüttelt, um eine homogene Lösung zu erreichen.

Beschichten des Cellulosepulvers

Chemikalien: Beschichtungsmittel (vgl. Ansetzen des Beschichtungsmittels), Ethanol (ALDRICH), Cellulose mikrokristallin (MERCK, Avicel, 20-100 µm)

Geräte und Material: Becherglas 400 ml, Meßzylinder 100 ml, Rührkern 2 cm, Magnetührer, Saugflasche 250 ml, Büchner-Trichter 180/55, Rundfilterpapier grob 5,5 cm (SCHLEICHER und SCHUELL Nr. 607), Erlenmeyerkolben 50 ml, Uhrglas 10 cm, Waage, ggf. Trockenschrank

11,5 g mikrokristalline Cellulose werden in einem 400-ml-Becherglas mit 50 ml des Beschichtungsmittels versetzt und nach Zugabe eines Rührkerns für 30 min auf einem Magnetührer gerührt.

Das Gemisch wird anschließend durch einen Büchner-Trichter (Rundfilterpapier 5,5 cm, grob) abgesaugt und mit 2 Portionen zu je 15 ml Ethanol/dest. Wasser (24:6) nachgewaschen. Dabei wird die Flüssigkeit auf den Filtrerrückstand gegossen und ohne Rühren scharf abgesaugt. Danach gibt man die beladene Cellulose auf ein Uhrglas und läßt sie über Nacht trocknen. Alternativ kann man das Material im Trockenschrank 30 min bei 80 °C trocknen. Die Portion reicht aus, um ca. 10 Säulen zu füllen.

Füllen der Chromatographiesäulen

Chemikalien: Elutionsmittel I, beschichtete Cellulose

Geräte und Materialien: 2 Pasteur-Tropfpipetten 15 cm mit Gummihütchen, Rundfilterpapier (5,5 cm, grob SCHLEICHER und SCHUELL Nr. 607), dünner PVC-Schlauch (TYGON 3603, Ø innen 1,6 mm, außen 3,2 mm), dünner Glasstab (≤ 2 mm), Schere, 2 Bechergläser 100 ml, Bleistift, Büroklammer, Stativmaterial oder 2 Bechergläser 400 ml (hohe Form), Waage

Aus dem 5,5-cm-Rundfilterpapier wird ein Viertel der Fläche herausgeschnitten. Die ver-

bleibende 3/4-Fläche wird zu einem doppelwandigen Kegel gedreht, der anschließend zu einem Kreissegment zusammengedrückt wird. Von diesem Segment schneidet man die Spitze ab (ca. 6 mm Seitenlänge), die anschließend mittels eines dünnen Glasstabs zu einem „Miniaturkegel“ aufgeklappt und in das Röhrchen einer Pasteur-Tropfpipette eingebracht wird. Der kleine Papierkegel wird bis in den konisch zusammenlaufenden unteren Teil des Pipettenröhrchens geschoben. Dort bildet er einen einfachen und relativ gleichmäßigen Säulenabschluß (Abb. 1).

Die so vorbereitete Mikrosäule wird mit einem Gummiband an einer waagerechten Stativstange oder an einem Bleistift befestigt, den man anschließend über zwei 400-ml-Bechergläser legt und mit einer Büroklammer an einer Seite am Rande des Becherglases fixiert (Stativersatz).

7 g beladene und getrocknete Cellulose werden in einem 100-ml-Becherglas mit 38 ml Elutionsmittel I versetzt und zu einer homogenen Suspension vermischt. Die Säule wird gefüllt, indem man die Suspension mit einer zweiten Pasteurpipette aufsaugt (Gummihütchen vollständig zusammendrücken, um ein maximales Volumen zu entnehmen, Suspension dabei leicht schütteln) und anschließend von oben einfließen läßt. Nach der ersten Füllung wartet man 15 sec (die Cellulose sedimentiert ab, und ein Teil der Flüssigkeit tropft aus der Säule) und gibt ebenso eine zweite Füllung zu. Nach einer Minute bemißt man die dritte Füllung so, daß die Suspension bis ca. 3 mm unter den oberen Rand reicht. Anschließend läßt man absedimentieren und auslaufen. Die Höhe der Packung liegt zwischen 6 und 7 cm.

Wenn der Flüssigkeitsstand ca. 1 cm über der

Cellulosepackung steht, wird der Auslauf der Säule verschlossen, indem man ein 3 cm langes Stück eines dünnen Schlauches, das man an einem Ende mit einem Tropfen Klebstoff verschlossen hat, aufschiebt. Die obere Öffnung verschließt man mit einem Gummihütchen oder einem Stück Aluminiumfolie.

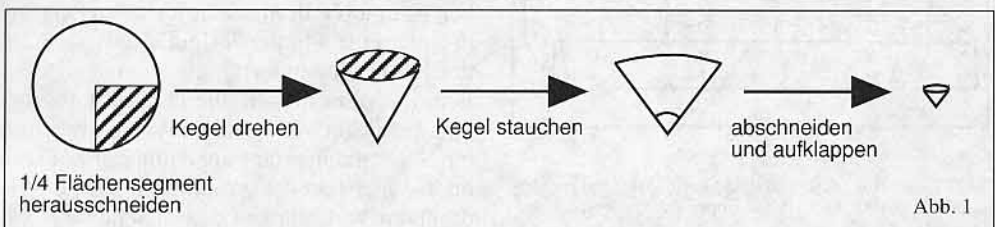
Die so vorbereiteten Säulen können den Schülern ausgehändigt werden, wenn die Vorbereitung nicht selbst Gegenstand des praktischen Arbeitens sein soll. Hat der Lehrer mehrere (z.B. 10) Säulen vorzubereiten, muß dies natürlich nicht nacheinander geschehen, sondern man kann die Röhrchen mit eingeletem Papierkegel zu einem Bündel zusammenfassen (mit einem Gummiband) und in einer Stativklammer fixieren. Das Befüllen mit Cellulosesuspension kann dann zügig hintereinander geschehen.

Herstellung eines Blattfarbstoffextraktes, Aufgabe der Probe und Elution der Säule

Chemikalien: Aceton p.a., Natriumcarbonat, Elutionsmittel I, 2-Propanol

Geräte und Material: Porzellanmörser mit Pistill, kleines Schraubdeckelglas (30 - 50 ml), Tropfpipetten, Waage, 4 Eppendorfgefäße 1,5 ml mit Schnapdeckel (Best. Nr. 0030120.086), Ständer für Eppendorfgefäße, Sand

Als Blattmaterial eignen sich besonders Grünkohl, Spinat oder Petersilie, auch tiefgefroren. 2 g des Materials werden mit einer Schere möglichst klein zerschnitten und in einen Mörser gegeben. Nach Zugabe von einer Spatelspitze Natriumcarbonat und einer Spatelspitze Sand wird das Blattmaterial etwas zerrieben und anschließend mit 5 ml Aceton versetzt. Man reibt ca. 3 min weiter, bis ein tiefgrüner Extrakt entstanden ist. Die-



ser (2-3 ml) wird vorsichtig in ein Schraubdeckelgefäß abgegossen.

Wenn die Schüler die Extraktion nicht selber durchführen, kann man ihnen den Extrakt, der immer kühl und dunkel aufbewahrt werden sollte, fertig aushändigen.

Nachdem die Mikrosäule fixiert worden ist, läßt man, nach Öffnung des oberen und unteren Verschlusses, die Flüssigkeit bis 1 mm über die Cellulosepackung ablaufen (Tropfgeschwindigkeit ca. 1 Tropfen je 5-6 sec). Als Vorlage dient zunächst ein 100-ml-Becherglas. Anschließend gibt man mit einer Tropfpipette vorsichtig den Blattextrakt auf, bis die grüne Probelösung eine Höhe von 6 mm in der Säule erreicht hat (Abb. 2). Zuviel Farbstoff verschlechtert das Trennergebnis. Nach ca. 1 min ist der Farbstoffextrakt bis auf ca. 1 mm eingesickert, und man füllt mit dem Elutionsmittel I bis zum oberen Rand auf.

Wenn diese Portion durchgelaufen ist und

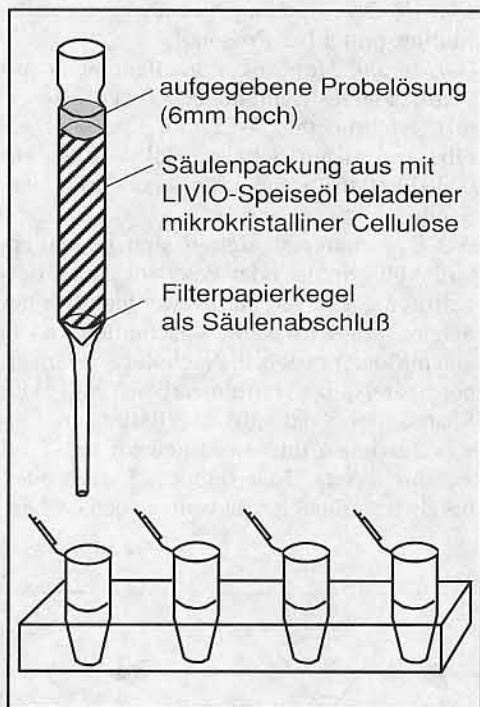


Abb. 2 Gefüllte Chromatographiesäule mit aufgegebene Blattextrakt und 1,5-ml-Eppendorfgläsern als Vorlage

Übersicht zum Verlauf der Elution (Zeit in min)

Operation	Beginn nach ca:	Dauer
1. Aufgabe von Blattextrakt (6 mm) und Einsickern der Probe		1
2. Auffüllen und Elution mit Elutionsmittel I	1	7
3. 1. Auffüllen und Elution mit 2-Propanol	8	7
4. Elutionsbeginn der gelben Xanthophylle	12	6,5
5. 2. Auffüllen und Elution mit 2-Propanol	15	9
6. Ende der „gelben Fraktion“ und Elutionsbeginn der Chlorophylle	18,5	8
7. 3. Auffüllen und Elution mit 2-Propanol	24	14
8. Ende der „grünen Chlorophyllfraktion“ und Beginn der Zwischenfraktion	26,5	6,5
9. Ende der Zwischenfraktion und Beginn der Carotin-Fraktion	33	5
10. Ende der Carotin-Fraktion	38	

sich die Flüssigkeitsoberfläche 1 mm über der Cellulosepackung befindet (nach ca. 8 min) wird mit dem Elutionsmittel II (2-Propanol p.a.) bis oben hin aufgefüllt.

Zu diesem Zeitpunkt ist schon eine deutliche Trennung der relativ polaren Xanthophylle von den grünen Chlorophyllen, die etwas zurückbleiben, zu erkennen. Am Säulenansatz wird unter anderem eine gelborangefarbige Fraktion zurückgehalten, die auch die Carotine enthält. Diese beginnen erst nach Zugabe des chromatographisch stärkeren 2-Propanols als hellorangefarbiger Streifen durch die Säule zu wandern.

Nach ca. 12 min beginnt die Fraktion der gelben Xanthophylle auszulaufen. Man fängt sie in einem ersten Eppendorfgläser auf. Als Ständer für die Eppendorfgläser eignen sich Folien mit Vertiefungen, die man im Laborbedarfshandel erwerben kann. Alternativ erfüllt ein Stück geknickter Pappe mit vier Löchern oder ein Streifen Styropor mit vier eingedrückten Vertiefungen den gleichen Zweck.

Nach 15 min ist der Flüssigkeitsspiegel wieder annähernd auf die Cellulosepackung abgesackt, und man füllt erneut mit 2-Propanol bis zum Rand.

Einige Minuten später (nach ca. 18,5 min) ist die „gelbe Fraktion“ ausgelaufen, und ein grün gefärbtes Eluat beginnt auszutropfen. An dieser Stelle wechselt man die Vorlage durch Verschieben des Ständers um ein Eppendorfgefäß (Prinzip des automatisierten Fraktionsammlers).

Nach 24 min wird die Säule zum dritten Mal mit 2-Propanol gefüllt. Das Ende der „grünen“ Chlorophyllfraktion ist nach ca. 26,5 min erreicht, und man wechselt zu einem dritten Eppendorfgefäß, um die ungefärbte Zwischenfraktion aufzufangen.

Das hellorangefarbige Carotin verläßt nach ca. 33 min die Säule (4. Eppendorfgefäß). Nach ca. 38 min ist auch diese Fraktion abgeschlossen (vgl. Übersicht).

Literatur

- 1 Brauner, L., Bukatsch, F.: Das kleine pflanzenphysiologische Praktikum. – G. Fischer Verlag. – Stuttgart, 7. Aufl., 1864, S. 65...67
- 2 Oechler, F.: MNU 3(1950), 89
- 3 Müller, H.W.: Pflanzenphysiologisches Experimentierbuch. – Kosmos Verlag, Franckh'sche Verlagsbuchhandlung. – Stuttgart, 1966, S. 84
- 4 Hirsch, H.: MNU 5(1952), 178...180
- 5 Metzner, H.: Pflanzenphysiologische Versuche. – G. Fischer Verlag. – Stuttgart, 1982, S. 69-71
- 6 Boscott, R.J.: Nature 159(1947), 342
- 7 Boldingh, J.: Experientia 4(1948), 270
- 8 Howard, G.A., Martin, J.P.: Biochem. J. 46 (1950), 532
- 9 Wiederhold, E., Zuleger, W.: NiU-Physik/Chemie 33 (3) (1985), 86...88
- 10 Kleinig, H.: Biol. i. u. Zeit 7 (3) (1977), 94...95
- 11 Freese, J.M., Olesen, B., Pinnick, H.R., Useted, J.T.: J. Chem. Educ. 54 (1977), 684
- 12 Serafimov, O., Kopp, C., Berg, M.: Praxis-Chemie 35(11) (1986), 35...37
- 13 Reynolds, R.C., O'Dell, C.A.: J. Chem. Educ. 69(1992), 989...991
- 14 Brink, A.: NiU-Chemie 4(20) (1993), 22...25 (446...449)
- 15 Stewart, H. N. M.; Perry, S. G.: J. Chromatogr. 37(1968), 97

Anmerkung

Die ungesättigten Fettsäuren werden mit der Zeit oxidiert, und das Material verändert seine chromatographischen Eigenschaften. Eine Verschlechterung der Trennung ist die Folge.