

## Säulenchromatographie – Trennung von Pflanzenfarbstoffen

### Allgemeine Hinweise

- Es ist grundsätzlich immer eine Schutzbrille und ein Labormantel zu tragen.
- Alle Tätigkeiten, Aufbauten, verwendeten Chemikalien sowie Materialien und Messwerte werden im Laborjournal protokolliert.
- Arbeitsflächen sollen immer aufgeräumt sein. Die benötigten Gerätschaften sollen übersichtlich und erreichbar platziert werden.
- Es ist wichtig, vor dem Arbeitsvorgang die Anordnung am Arbeitsplatz vorzubereiten, um unnötiges Unterbrechen von Arbeitsvorgängen zu vermeiden.
- Bei allen Arbeiten ist auf äußerste Sauberkeit Wert zu legen! Grundsätzlich gilt das Verursacherprinzip: jede/r reinigt die von ihm/ihr verwendeten Flächen, Gefäße, Geräte oder sonstigen Einrichtungen selbst.
- Vor Beginn und nach Abschluss der Laborarbeiten sind die Hände zu reinigen.
- Keine Sorglosigkeit im Umgang mit Chemikalien! Chemikalien sind grundsätzlich als Gefahrstoffe zu behandeln.
- Das Einatmen von Dämpfen und Stäuben sowie der Kontakt von Gefahrstoffen mit Haut und Augen sind zu vermeiden. Falls trotzdem etwas auf die Haut oder in die Augen gelangt, sofort unter fließendem Wasser gründlich reinigen.
- Reste und Abfälle von Chemikalien müssen sachgerecht entsorgt werden.

## 1. Material

- Getrockneter Spinat
- Bechergläser 250 ml, 100ml
- Erlenmeyerkolben
- Magnetrührer und Magnetfische
- Aceton, Petrolether
- Glastrichter, Filterpapier
- Rundkolben 250 ml, 1000 ml mit Stopfen
- Pasteurpipetten und Saugnippel
- Chromatografiesäule
- Glaswolle
- Siliciumoxid
- Quarzsand
- Reagenzglasständer mit 5 Reagenzgläsern
- Pinzette
- DC -Plättchen
- DC Kammern
- Schutzbrille, Handschuhe

## **2. Durchführung**

### Herstellung des Spinatextrakts

Es werden 3 g Spinat in einem 250 ml Becherglas eingewogen. Die Spinatblätter können zwischen den Fingern zerrieben werden, bis ein feines Pulver entsteht. Es kommen 60 ml Extraktionslösung bzw. 60 ml Aceton/Petrolether (1:1) hinzu. Mit Hilfe des Magnetrührers und eines Magnetrührstäbchens soll diese Mischung für 10 min stark gerührt werden, damit so viel Pflanzenfarbstoff wie möglich aus dem Pulver gelöst wird. Die grüne, trübe Lösung wird anschließend über einen Glasrichter und ein gefaltetes Filterpapier in einen 250 ml Rundkolben hineinfltriert. Die nun klare, grüne Lösung wird danach am Rotationsverdampfer bis ins Trockene eingeengt. Weil nur ein Rotationsverdampfer vorhanden ist, werden die grünen Lösungen aller Laborteams in einem 1000 ml Rundkolben vereinigt und allesamt gleichzeitig eingeengt. Der trockene Rückstand wird wieder in Petrolether gelöst (bei 5 Laborteams  $5 \times 1,5 \text{ ml} = 7,5 \text{ ml}$ ). Pro Laborteam wird eine volle Pasteurpipette auf die fertig präparierte Säule aufgetragen. Davor soll die Flüssigkeitssäule bis knapp oberhalb der Pulversäule gesunken sein.

### Herstellung der Chromatographiesäule

Die leere Chromatographiesäule wird zu Beginn mit einer Kolbenklammer an das Metallgestell am Platz befestigt und der Hahn am unteren Ende geschlossen. Die Glassäule wird ca. 10 cm hoch mit Petrolether aus einem Becherglas gefüllt. Dann auf einem gefalteten Blatt Papier 1,5 g  $\text{SiO}_2$  einwiegen und das Pulver anschließend langsam in die Säule rieseln. Das gesamte Siliciumoxid muss immer, auch während der anschließenden Farbstofftrennung, mit genügend Lösungsmittel bedeckt sein, sonst kann es zu Luft einschlüssen, Rissen oder Blasenbildung in der Pulversäule kommen. (Dann wird ein wenig Sand über das Pulver in die Säule hineingeleert, sodass eine ca. 0,3 cm dicke Schicht entsteht.) Unter die Chromatographiesäule wird ein Reagenzglasständer mit 5 Gläsern bereitgestellt. Der Hahn kann nun geöffnet werden, sodass das Lösungsmittel die Säule hinunterwandert und in das erste Reagenzglas tropft. Wenn die Lösungsmittelfront knapp oberhalb der  $\text{SiO}_2$ -Säule ist, wird der Hahn wieder geschlossen.

### Chromatographie – Trennung der Pflanzenfarbstoffe

Pro Laborteam wird eine volle Pasteurpipette des Spinatextrakts aus dem 1000 ml Rundkolben auf die fertig präparierte Säule aufgetragen. Davor soll die Flüssigkeitssäule bis knapp oberhalb der Pulversäule gesunken sein.

Wenn nun das Extrakt in die Säule hineinwandert, erkennt man eine weiterwandernde gelbe (Carotin) sowie orange (Xanthophyll) und eine am oberen Ende der Säule verweilende grüne Phase (Chlorophyll). Die Pulversäule darf nicht trocken laufen, daher muss nach vollständigem Eindringen des Extrakts in die Säule wieder Petrolether nach gereicht werden. Es wird gewartet, bis die gelbe/orange Phase durch die Säule wandert, daraufhin fängt man sie im zweiten und dritten Reagenzglas auf. Um anschließend das grüne Chlorophyll zu sammeln, wird das Lösungsmittel gewechselt. Wenn der Petrolether die Sandschicht erreicht, wird Aceton in die Säule pipettiert. Bis die grüne Phase zum unteren Ende der Säule gewandert ist, fängt man die Zwischenfraktion im vierten Reagenzglas auf und wechselt auf das fünfte Glas, sobald die grüne Fraktion zu tropfen beginnt. Nachdem das Chlorophyll aufgefangen wurde, wird der Hahn geschlossen. Der Trennvorgang ist somit beendet.

**Es ist stets darauf zu achten, dass der Spiegel beim Erreichen der Sandschicht wieder aufgefüllt wird, sonst kann es zu Luft einschlüssen, Rissen oder Blasenbildungen in der Pulversäule kommen!**

### Überprüfen der Reinheit mittels Dünnschichtchromatographie

Die Farbstoffe, die im zweiten bis fünften Reagenzglas gesammelt wurden, sollten in ausreichender Konzentration vorhanden sein, sodass ihre Reinheit mittels Dünnschichtchromatographie (DC-Chromatographie) überprüft werden kann. Hierzu verwendet man saubere Pasteurpipetten. Die Pipette wird in die jeweilige Farbstofflösung eingetaucht. Der dünne Hals füllt sich und die Lösung kann auf ein DC-Plättchen aufgetragen werden. Hierfür wird ein rechteckiges, passendes Plättchen ausgeschnitten und ca. 1 cm vom unteren Rand entlang der schmalen Seite eine Linie mit Bleistift gezeichnet. Die Punkte werden direkt auf dieser Linie aufgetragen. Dabei ist darauf zu achten, dass die Punkte nicht zu nah beieinander liegen, sonst könnten sie während der Elution vermischt werden. Am oberen Ende der Plättchen werden die Punkte gekennzeichnet (bspw. „gelb“, „grün“). Wenn nun das DC-Plättchen in eine DC-Kammer mit wenig Aceton und Petrolether (jeweils 2 Pasteur-Pipetten) gestellt wird, fängt das Lösungsmittel langsam an, das Plättchen hinaufzuwandern. Im Zuge dessen werden die Blattfarbstoffe mitgezogen. Sollten sie nicht rein vorliegen, werden mit der Zeit mehrere Banden ersichtlich. Andernfalls wandert ein einziger Punkt gleichmäßig hoch. Am Ende der DC wird die Höhe der Laufmittelfront am Plättchen mit einem Bleistift markiert.

### 3. Varianten Versuchsdurchführung/Zeitplan

Je nach Anspruch und Lernziel kann die Chromatographie von pflanzlichen Inhaltsstoffen (Chlorophyll, Carotin und Coffein) unterschiedlich organisiert werden. Es gibt dabei 3 Empfehlungen für den Ablauf im Labor. Selbstverständlich kann auch ein individuelles Programm erstellt werden.

#### Programm 1:

Geringer Schwierigkeitsgrad, keine praktischen Erfahrungen der Schüler nötig

Lernziel: Pflanzenfarbstoffe können voneinander getrennt werden.

Sicherheitseinschulung und Einführung	25 min.
Herstellung einer Chromatographie-Säule	20 min.
Chromatographie des Spinatextrakts	60-90 min.
Dünnschichtchromatographie des Spinatextrakts	20 min.
<u>Aufräumen und Putzen</u>	<u>15 min.</u>
Gesamtzeit	2h 20min – 2h 50min

#### Programm 2:

Mittlerer Schwierigkeitsgrad, grundlegende praktischen Erfahrungen der Schüler von Vorteil

Lernziel: Pflanzenfarbstoffe können aus dem Naturstoff isoliert und voneinander getrennt werden.

Sicherheitseinschulung und Einführung	25 min.
Spinatextraktion	40 min.
Herstellung einer Chromatographie-Säule	20 min.
Chromatographie des Spinatextrakts	60-90 min.
Dünnschichtchromatographie der Reinstoffe und des Extrakts	20 min.
<u>Aufräumen und Putzen</u>	<u>15 min.</u>
Gesamtzeit	3h – 3,5h
	bei Simultanarbeit bis zu 3h

### Programm 3:

Höherer Schwierigkeitsgrad, grundlegende praktischen Erfahrungen der Schüler nötig

Lernziel: Pflanzenfarbstoffe können aus dem Naturstoff isoliert und voneinander getrennt werden. Dies geschieht einmal manuell (Säulenchromatographie von Pflanzenfarbstoffen) und einmal maschinell (HPLC von Coffein).

Sicherheitseinschulung und Einführung	25 min.
Spinatextraktion	40 min.
Herstellung einer Chromatographie-Säule	20 min.
Chromatographie des Spinatextrakts	60-90 min.
Dünnschichtchromatographie der Reinstoffe und des Extrakts	20 min.
High Performance Liquid Chromatography (HPLC)	60 min.
Aufräumen und Putzen	15 min.
Gesamtzeit	4h – 4,5h
	bei Simultanarbeit bis zu 3h