

Prinzip

Die Blattfarbstoffe werden eluiert und säulenchromatografisch getrennt, so dass genügend große Mengen zu weiteren (spektroskopischen) Untersuchungen zur Verfügung stehen.

Benötigte Geräte

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Glasrohr ca. 30cm lang,
etwa 2cm weit | <input type="checkbox"/> Stativ |
| <input type="checkbox"/> 2 Gummistopfen, gebohrt | <input type="checkbox"/> In das Glasrohr ziemlich
genau passendes Rundholz |
| <input type="checkbox"/> Glasrohr mit Hahn | <input type="checkbox"/> Muffe |
| <input type="checkbox"/> Messer | <input type="checkbox"/> Greifklemme |
| <input type="checkbox"/> Tropftrichter | <input type="checkbox"/> Mörser mit Pistill |
| <input type="checkbox"/> Watte | <input type="checkbox"/> Filterpapier |
| <input type="checkbox"/> Handgebläse | |

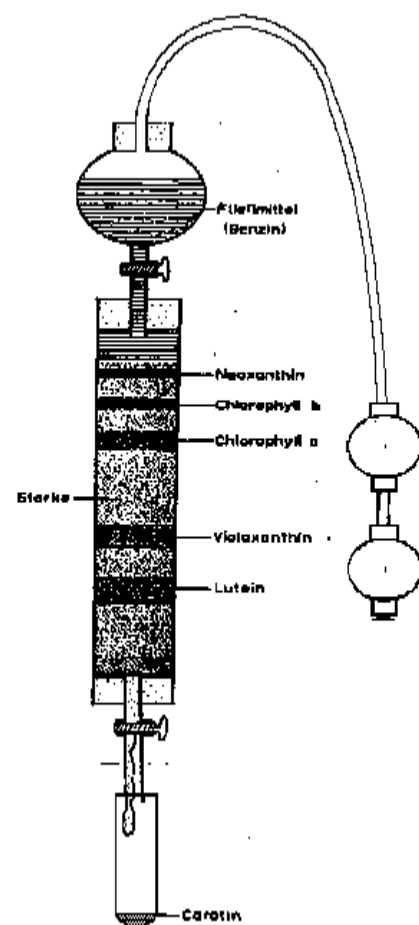
Verwendete Chemikalien

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Blätter von Gras, Brennnessel oder Spinat | |
| <input type="checkbox"/> Benzin (100-140°C) 70°C | |
| <input type="checkbox"/> Propanol | |
| <input type="checkbox"/> Quarzsand | |
| <input type="checkbox"/> Kartoffelstärke (Lebensmittel) | |
| <input type="checkbox"/> dest. Wasser | |

Vorbereitung des Versuchs

Vorbereitung

- Herstellen des Blattauszuges:
 - Einige Blätter von Gras, Brennnessel oder Spinat und einige Tropfen Methanol mit Quarzsand in einer Reibschale zerreiben und mehrfach mit kleinen Benzinportionen ausziehen, bis der Blattbrei möglichst weitgehend entfärbt ist.
 - Den Benzinauszug (ca. 20 mL) zur Eliminierung des Methanols vor der Trennung mehrmals mit Wasser im Tropftrichter ausschütteln und filtrieren.
- Herstellung des Fließmittels:
 - Ca. 300 - 500 mL Benzin mit etwa 1 mL n-Propanol vermischen (die Menge des Fließmittels hängt vom Querschnitt und der Länge der Säule, sowie von der Trenndauer ab).
- Herstellung der Trennsäule:
 - Das Glasrohr senkrecht in das Stativ einspannen und mit einem Stopfen, in dem ein kleineres Glasrohr mit Hahn eingeführt ist, verschließen (siehe Zeichnung).
 - Danach von oben zunächst etwas Watte und dann portionsweise aufgeschlämmte (klumpenfreie) Kartoffelstärke einfüllen, den Tropftrichter mit dem Fließmittel aufsetzen und eine Tropfgeschwindigkeit von etwa 1-3 Tropfen pro Sekunde einstellen.
 - Das Fließmittel sorgt für eine gleichmäßige Füllung der Säule.
 - Den Vorgang des Auffüllens und des "Stopfens" durch das Fließmittel wiederholen, bis die Säule etwa bis 5cm unter den oberen Rand gefüllt ist.
 - Das Fließmittel sollte nach Abnehmen des Tropftrichters gerade bis auf die Stärkefüllung abgelaufen sein.
 - Vorsicht: Die Säule darf nicht trocken laufen, sonst wird sie unbrauchbar.

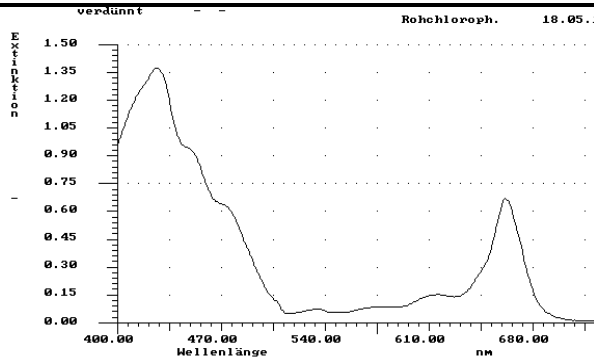


Durchführung

- Zunächst den Benzinauszug (5-10 mL) langsam mit der Pipette ringsherum am Säulenrand herunterlaufend auftragen und einsickern lassen.
- Dabei beginnt schon die Trennung in verschiedene Pigmentzonen.
- Dann noch etwas aufgeschlämmte Kartoffelstärke darüber geben und den Tropftrichter wieder aufsetzen.
- Mit Hilfe des Handgebläses dafür sorgen, dass etwa 1-2 Tropfen pro Sekunde ausfließen.
- Das Fließmittel sollte die unter der Säule stehenden Reagenzgläser etwa bis zur Hälfte füllen. Das orange-gelbe Carotin läuft praktisch mit dem Lösungsmittel durch die Trennsäule, es wird nicht an der Stärke adsorbiert.
- Solange Laufmittel durch die Säule fließen lassen, bis die einzelnen Banden deutlich getrennt sind.
- Es kann sein, dass auch eine der Xanthophyllbanden (z. B. Lutein) das untere Ende der Säule erreicht. Erst wenn die Banden wirklich getrennt sind, trockenlaufen lassen.
- Dann die Säule flach hinlegen, die Gummistopfen entfernen und die Füllung vorsichtig mit einem Rundholz herauschieben.

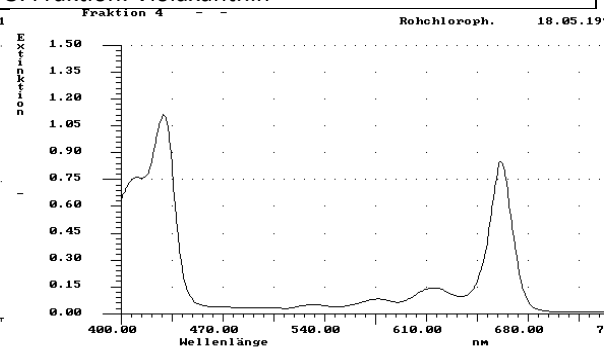
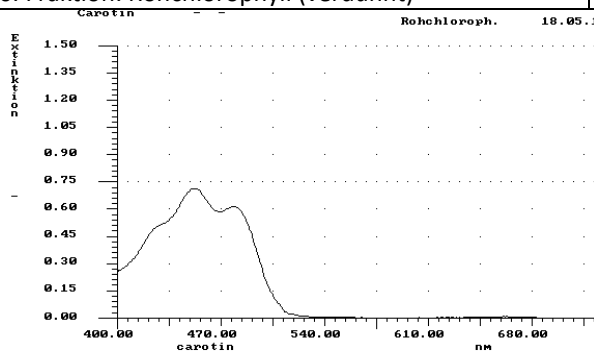
- ▶ Vorsicht: Wenn die Säule nicht ganz trocken ist, zerfließt der Inhalt.
- ▶ Die einzelnen Zonen dann mit dem Messer auseinander schneiden.
- ▶ In der Reihenfolge finden sich Lutein, Violaxanthin, Chlorophyll a, Chlorophyll b, Neoxanthin.
- ▶ Nach vollständigem Trocknen, die Pigmente mit peroxidfreiem Ether (Aceton) ausziehen.

Auswertung



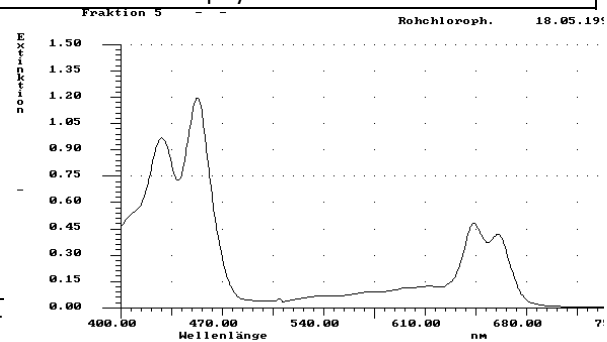
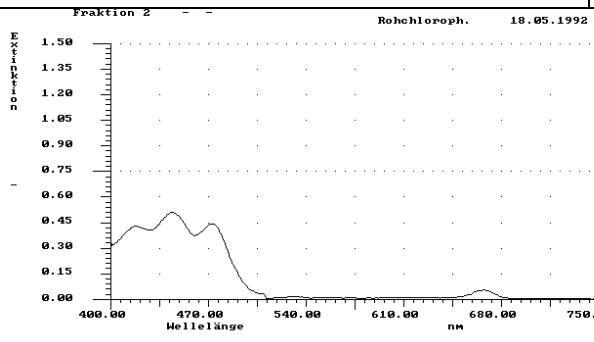
0. Fraktion: Rohchlorophyll (verdünnt)

3. Fraktion: Violaxanthin



1. Fraktion: Carotin

4. Fraktion: Chlorophyll a



2. Fraktion: Lutein

5. Fraktion: Chlorophyll b mit Chlorophyll a

Andere Möglichkeit zur Herstellung eines Blattauszuges:

- ▶ Einige Blätter von Gras, Spinat oder Brennnessel (besonders gut geeignet !) mit einigen mL 2-Propanol (iso-Propanol) oder Ethanol mit Quarzsand (Seesand) in einer Reibschale zerreiben.
- ▶ Den Blattbrei abfiltrieren und das Filtrat mit wenig Wasser versetzen.
- ▶ Anschließend ca. 3 mL Benzin dazugeben.
- ▶ Die oberste, dunkelgrüne Phase abziehen und nochmals mit Wasser ausschütteln, um 2-Propanol, bzw. Ethanolreste zu entfernen.
- ▶ Da die Phasentrennung sehr langsam erfolgt, ist es günstig, die Trennung durch Zentrifugieren zu beschleunigen (1 min, 1000 Upm).
- ▶ Zur Aufnahme der Spektren siehe: I03

Tip

Beachten



Entsorgung

Nach Ausdünsten im Abzug: Abfalleimer / Säule säubern

Literatur

K. Kuhn u. W. Probst, Biologisches Grundpraktikum Dbd. I Stuttgart 1977