

Prinzip: Die Blattfarbstoffe werden eluiert und säulenchromatographisch getrennt, sodaß genügend große Mengen zu weiteren (spektroskopischen) Untersuchungen zur Verfügung stehen.

Materialliste:

<u>Geräte:</u>		<u>Chemikalien:</u>	
1	Glasrohr ca. 30 cm lang, etwa 2cm weit,	1	Stativ
2	Gummistopfen, gebohrt	1	in das Glasrohr ziemlich genau passendes Rundholz
1	Glasrohr mit Hahn	1	Muffe
	Messer	1	Greifklemme
1	Tropftrichter	1	Mörser mit Pistill
	Watte		Filterpapier
1	Handgebläse		Blätter von Gras , Brennessel oder Spinat
			Benzin (100-140) Φ
			Propanol Φ
			Quarzsand
			Kartoffelstärke (Lebensmittel)
			dest. Wasser

Vorbereitung des Versuches:

1. Herstellen des Blattauszuges:

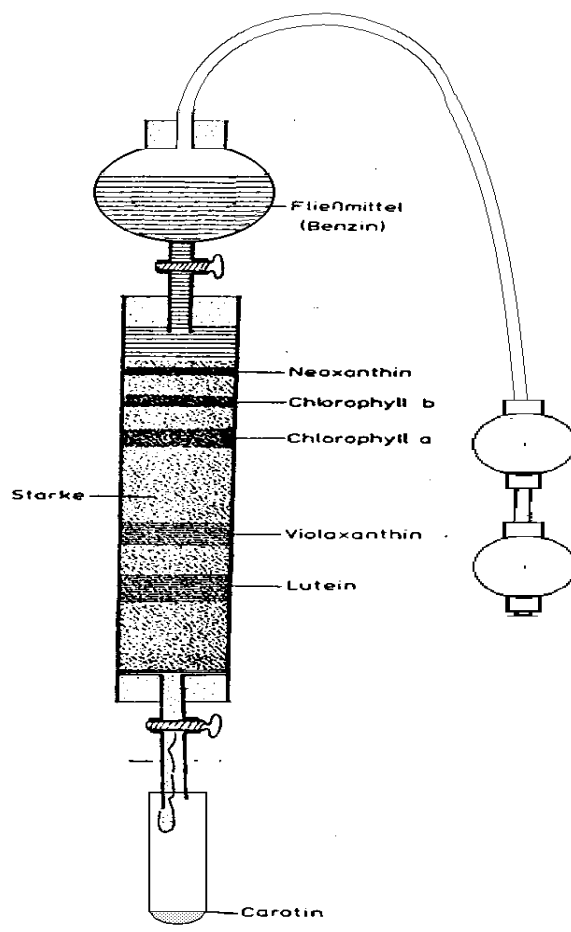
Einige Blätter von Gras, Brennessel oder Spinat und einige Tropfen Methanol werden mit Quarzsand in einer Reibschale zerrieben und mehrfach mit kleinen Benzinportionen ausgezogen, bis der Blattbrei möglichst weitgehend entfärbt ist. Der Benzinauszug (ca. 20 mL) wird zur Eliminierung des Methanols vor der Trennung mehrmals mit Wasser im Tropftrichter ausgeschüttelt und filtriert.

2. Herstellung des Fließmittels:

Ca. 300 - 500 mL Benzin werden mit etwa 1 mL n-Propanol vermischt (die Menge des Fließmittels hängt vom Querschnitt und der Länge der Säule, sowie von der Trenndauer ab).

3. Herstellung der Trennsäule:

Das Glasrohr wird senkrecht in das Stativ eingespannt und mit einem Stopfen, in dem ein kleineres Glasrohr mit Hahn eingeführt ist, verschlossen (siehe Zeichnung). Danach wird von oben zunächst etwas Watte und dann portionsweise aufgeschlämmte (klumpenfreie) Kartoffelstärke eingefüllt, der Tropftrichter mit dem Fließmittel aufgesetzt und eine Tropfgeschwindigkeit von etwa 1-3 Tropfen pro Sekunde eingestellt. Das Fließmittel sorgt für eine gleichmäßige Füllung der Säule. Der Vorgang des Auffüllens und des "Stopfens" durch das Fließmittel wird wiederholt, 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.

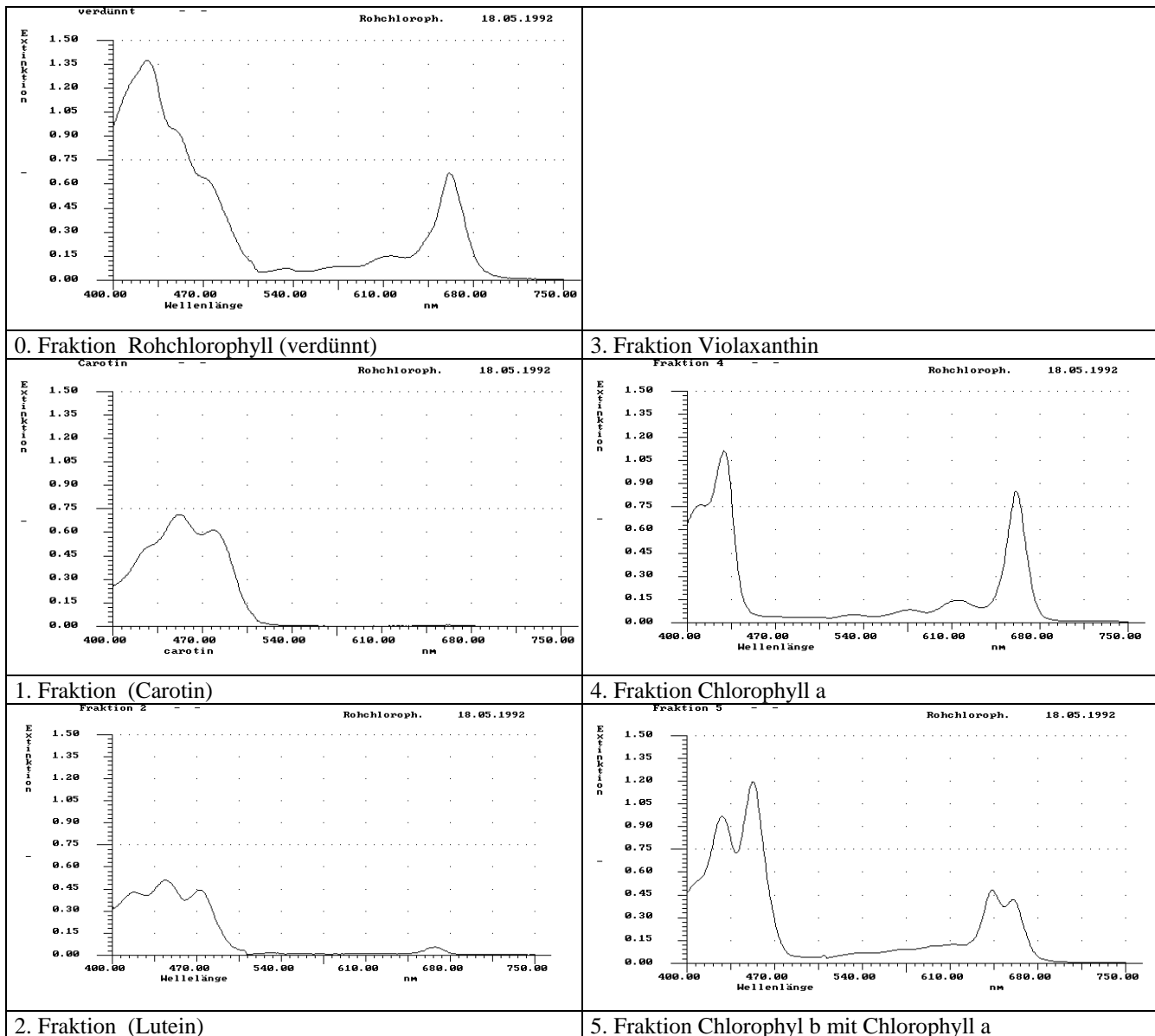


Durchführung des Versuches:

Zunächst trägt man den Benzinauszug (5-10 mL) langsam mit der Pipette ringsherum am Säulenrand herunterlaufend auf und läßt ihn einsickern. Dabei beginnt schon die Trennung in verschiedene Pigmentzonen. Dann gibt man noch etwas aufgeschlämmte Kartoffelstärke darüber und setzt den Tropftrichter wieder auf. Mit Hilfe des Handgebläses wird dann dafür gesorgt, 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.

Man läßt solange Laufmittel durch die Säule fließen, 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, läßt man trockenlaufen. Dann legt man die Säule flach, entfernt die Gummistopfen und schiebt die Füllung vorsichtig mit einem Rundholz heraus. Vorsicht: Wenn die Säule nicht ganz trocken ist, zerfließt der Inhalt.

Die einzelnen Zonen können dann mit dem Messer auseinander geschnitten werden. Man findet in der Reihenfolge Lutein, Violaxanthin, Chlorophyll a, Chlorophyll b, Neoxanthin. Nach vollständigem Trocknen kann man die Pigmente mit peroxidfreiem Ether (Aceton) ausziehen. Hier einige Spektren:



TIPS:

Andere Möglichkeit zur Herstellung eines Blattauszuges

Einige Blätter von Gras, Spinat oder Brennessel (besonders gut geeignet !) werden mit einigen mL 2 - Propanol (iso-Propanol) oder Ethanol mit Quarzsand (Seesand) in einer Reibschale zerrieben. Der Blattbrei wird abfiltriert und das Filtrat mit wenig Wasser versetzt. Anschließend gibt man ca. 3 mL Benzin dazu. Die oberste, dunkelgrüne Phase wird abgezogen und nochmals mit Wasser ausgeschüttelt, 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

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