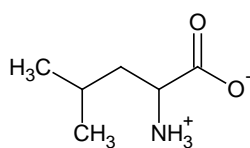


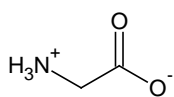
Gruppe 10 – Pflichtversuch

Dünnschichtchromatographie – Trennung von Aminosäuren

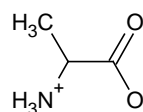
Strukturformeln:



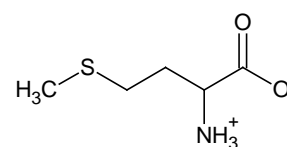
L-Leucin



Glycin



L-Alanin



Methionin

Zeitbedarf:

Vorbereitung:	15 min
Versuchsdurchführung:	40 min
Nachbereitung	15 min

Chemikalien:

Chemikalien	Summenformel	Menge	R-Sätze	S-Sätze	Gefahrensymbole	Schuleinsatz (HessGiss)
Aceton	CH ₃ COCH ₃	35 mL	11-36-66-67	9-16-26	F, Xi	S 1
Eisessig	CH ₃ COOH	10 mL	10-35	23-26-45	C	S 1
1-Butanol	C ₄ H ₉ OH	35 mL	10-22-37/38-41-67	7/9-13-26-37/39-46	Xn	S 1
L-Leucin	C ₆ H ₁₃ NO ₂	1 mL	-	-	-	S 1
Glycin	C ₂ H ₅ NO ₂	1 mL	-	22-24/25	-	S 1

L-Alanin	$C_3H_7NO_2$	1 mL	-	-	-	S 1
Methionin	$C_5H_{11}NO_2S$	1 mL	-	-	-	S 1
Ninhydrin- Isopropanol- Lösung (w = 0,01)	$C_9H_6O_4$ · C_3H_7OH	5 mL	11-22-36- 36/37/38- 67	7-16- 24/25-26- 36	Xn, F, Xi	S 1

Geräte und Materialien:

- 5 x Kapillarröhrchen
- 5 x Bechergläser (10 mL)
- 2 x DC-Karten (alternativ kann eine große DC-Karte verwendet werden)
- Bleistift
- Lineal
- Becherglas (250 mL)
- DC-Kammer (250 mL)
- Fön
- Sprühflasche

Versuchsaufbau:



Abb. 1: Proben der untersuchten Aminosäuren



Abb. 2: Vorbereitete DC-Karten



Abb. 3: DC-Kammer mit vorbereiteten DC-Karten und Fließmittel

Versuchsdurchführung:

Es werden 35 mL Aceton, 35 mL 1-Butanol, 10 mL Eisessig und 20 mL entionisiertes Wasser in einem 250 mL Becherglas vermischt. Von diesem Laufmittel wird soviel in das Chromatographiegefäß gegeben, bis ein Flüssigkeitsstand von etwa 1 cm erreicht ist. Anschließend wird das Gefäß verschlossen. Nun wird eine Spatelspitze einer Aminosäure in ein 10 mL Becherglas gegeben und in etwa 1 mL entionisiertem Wasser gelöst. Gegebenenfalls wird die Probe mit ein paar Tropfen des Eisessigs angesäuert.

Auf einer DC-Karte wird 2 cm vom unteren Rand mit Bleistift eine Linie gezogen. Auf dieser Linie wird nun in gleich großen Abständen der Reihe nach Glycin, L-Alanin, L-Leucin, Methionin und eine Mischung aus den vier Aminosäuren mit einem Kapillarröhrchen aufgetragen. Nach dem Auftragen werden die Punkte mit einem Fön getrocknet. Dieser Vorgang wird insgesamt fünfmal wiederholt. Anschließend wird die DC-Karte, mit den aufgetragenen Proben nach unten, in die DC-Kammer mit dem Laufmittel gegeben.

Die Karte wird wieder aus der DC-Kammer entfernt, sobald das Laufmittel bis ca. 1 cm unter den oberen Rand der Karte gezogen ist. Die DC-Karte wird nun mit einem Fön getrocknet. Anschließend wird sie mit einer 1 %-igen Ninhydrin-Isopropanol-Lösung besprüht und gewartet, bis sie getrocknet ist.

Beobachtungen:

Alle verwendeten Aminosäuren gingen im wässrigen, leicht sauren Milieu in Lösung. Das Fließmittel bestand aus einer klaren, farblosen Flüssigkeit.

Nachdem die DC-Kammer mit den DC-Karten bestückt war, zogen sich die Karten langsam mit dem Fließmittel voll. Es war zu beobachten, dass die Flüssigkeit langsam und gleichmäßig bis zum oberen Ende der Karten zog.

Nach dem Besprühen und anschließenden Trocknen der DC-Karten waren auf diesen rot-orange eingefärbte Laufbahnen der Probesubstanzen zu erkennen.

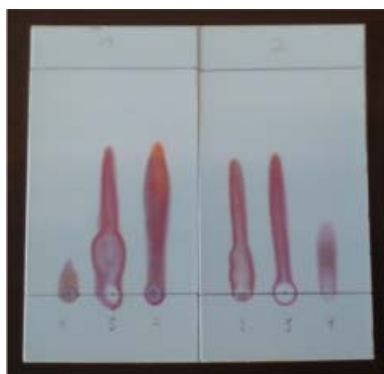


Abb. 4: Mit Ninhydrin behandelte, getrocknete DC-Karten.

Dabei sind die einzelnen Aminosäuren unterschiedlich weit ans obere Kartenende gezogen.

Die Aminosäuren legten folgende Wegstrecken zurück:

- 1) Glycin: 0,8 cm
- 2) Leucin: 3,5 cm
- 3) Methionin: 3,2 cm
- 4) L-Alanin: 1,7 cm
- 5) Gemisch: 3,5 cm

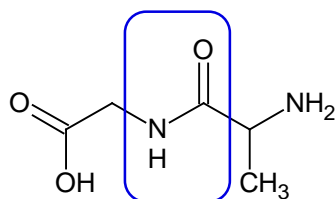
Entsorgung:

Die überschüssigen Aminosäureproben wurden neutralisiert und in den Ausguss gegeben. Das überschüssige Fließmittel wurde zur weiteren Verwendung in einem eigenen Chemikalienbehälter gesammelt. Die bereits verwendeten Fließmittelreste wurden neutralisiert und zusammen mit in den Resten der Ninhydrin-Isopropanol-Lösung in den Sammelbehälter für organische Lösungsmittel gegeben. Die verwendeten DC-Karten wurden in der Feststofftonne entsorgt.

Fachliche Analyse:

Aminosäuren sind Carbonsäuren mit einer Amino-Gruppe. Von den über 500 bekannten natürlich vorkommenden Aminosäuren sind die α -Aminosäuren oder 2-Aminosäuren die wichtigsten. Bei diesen Aminosäuren ist die Amino-Gruppe an das α -Kohlenstoffatom der Carbonsäure gebunden. Vier Beispiele dieser Untergruppe von Aminosäuren sind das L-Leucin, Glycin, L-Alanin und Methionin.

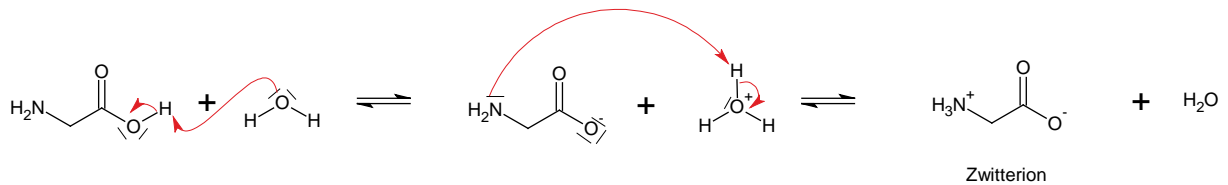
Aminosäuren können über Peptidbindungen miteinander verknüpft werden. Das N-Atom der Amino-Gruppe ist dabei in der Lage als Nucleophil das Carbonyl-Kohlenstoff-Atom der Carbonsäure-Gruppe anzugreifen. Unter Kondensation eines Wassermoleküls wird die Peptidbindung geknüpft.



Peptidbindung

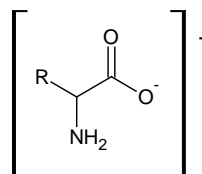
Aminosäuresequenzen mit Kondensationsgrad von bis zu 100 werden dann als Polypeptide, mit Kondensationsgrad von über 100 als Proteine bezeichnet. Aminosäuren zählen damit zu den Grundbausteinen des Lebens.

Wird eine Aminosäure in ein polares Lösungsmittel gegeben, so liegt sie als Zwitterion vor. Das Proton der Carbonsäure-Gruppe wird abgespalten und vom freien Elektronenpaar des Stickstoffs abgefangen.



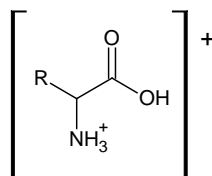
Durch die negative Ladung des Carboxylats und die positive Ladung des Ammoniums, kann das Molekül gut in polaren Lösungsmitteln gelöst werden. Die ambivalenten Ladungseigenschaften des Moleküls haben zur Bezeichnung als Zwitterion geführt. Durch diese Eigenschaft bilden Aminosäuren besonders stabile Kristallgitter. Um kristalline Aminosäure erneut zu lösen ist es z. T. nötig das polare Lösungsmittel zusätzlich leicht anzusäuern oder mit einer kleinen Menge an Base zu versetzen. Durch die gelösten Ionen können die Ladungen im Kristallgitter teilweise ausgeglichen werden. Dieses führt zu einer Herabsetzung der Gitterenergie, so dass die Gitterstruktur leichter aufgebrochen werden kann.

Zudem kann durch die zwitterionischen Eigenschaften der Ladungszustand des Moleküls über den pH-Wert des Lösungsmittels gesteuert werden. So liegen Aminosäuren in basischer Lösung als Anion vor.



in basischer Lösung

In sauren Lösungen dagegen hat es kationische Eigenschaften.



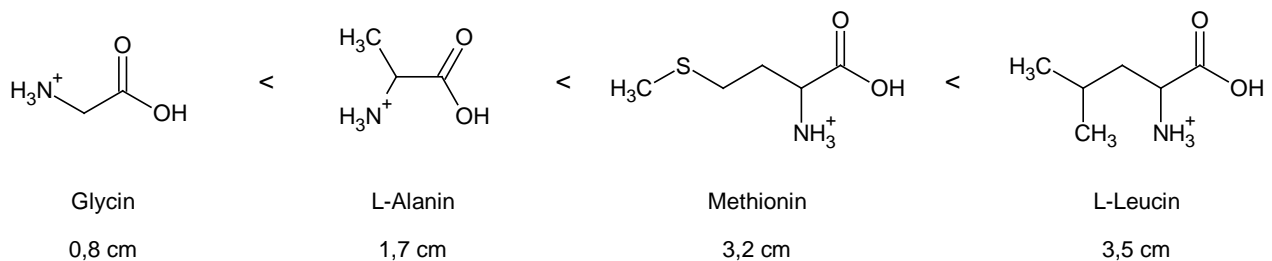
in saurer Lösung

Werden verschiedene Aminosäuren in Lösung gebracht, so bilden sie eine farblose, homogene Lösung. Die Auftrennung dieser Lösung kann mittels Dünnschichtchromatographie erfolgen. Das Trennverfahren der Chromatographie basiert auf unterschiedlich starken Wechsel-

wirkungen zwischen den einzelnen Aminosäure-Molekülen, einer mobilen und einer stationären Phase.

In der durchgeführten Chromatographie sollte ein Gemisch aus L-Leucin, Glycin, L-Alanin und Methionin aufgetrennt werden. Die mobile Phase bestand aus einem Aceton-1-Butanol-Essigsäure-Gemisch, dem so genannten Fließmittel. Es hat die Aufgabe, die zu trennenden Komponenten zu lösen und durch die stationäre Phase zu transportieren. Die stationäre Phase bestand in der durchgeführten Chromatographie aus einem Metallstreifen, auf den eine dünne Schicht eines Silicagels aufgetragen war. In gleichmäßigem Abstand wurden die reinen Aminosäure-Proben sowie eine Probe der Mischung aufgetragen.

Wird die DC-Karte aufrecht in das Fließmittel gestellt, so saugt sie sich langsam mit der Flüssigkeit voll. Hierbei spielen aufgrund der porösen Oberfläche des Gels sowohl Kapillarkräfte, als auch Adhäsionskräfte eine Rolle. Durch den leicht polaren Charakter des Fließmittels gehen die Aminosäuren in Lösung und werden von diesem mittransportiert. Da mit dem Essigsäure auch eine Säure enthalten ist, liegen die Aminosäuren als Kationen vor. Während des Transports der Kationen stehen die Moleküle in permanenten Wechselwirkungen mit dem Silicagel. Dabei sind die Wechselwirkungen der einzelnen Aminosäuren in Abhängigkeit ihrer Größe und ihrer Struktur unterschiedlich stark ausgeprägt. Die Auswertung der durchgeführten Chromatographie ergab die folgenden Laufweiten der Aminosäuren:



Das Vorkommen eines Analysestoffes kann auch in Form des R_f -Wertes („relate to front“) angegeben werden.

$$R_f = \frac{\text{zurückgelegte Strecke der Substanz}}{\text{Strecke der Laufmittelfront}}$$

Hieraus ergeben sich die folgenden werte:

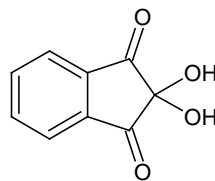
$$R_f(\text{L-Alanin}) = 0,16 < R_f(\text{Glycin}) = 0,31 < R_f(\text{Methionin}) = 0,58 < R_f(\text{L-Leucin}) = 0,64$$

Die Laufweite einer Substanz hängt im Wesentlichen von zwei Faktoren ab. Zum einen sind die Molekülgröße sowie der Grad der Verzweigung von Bedeutung. Je größer und sperriger ein Molekül ist, desto langsamer kann es die stationäre Phase passieren. Unter diesem Gesichtspunkt wäre die Abfolge L-Leucin < Methionin < L-Alanin < Glycin zu erwarten gewesen.

Die tatsächlich beobachtete Abfolge kann unter Hinzuziehen des zweiten Einflussfaktors, den Lösungsmitelegenschaften des verwendeten Fließmittels, erklärt werden. Aceton und 1-Butanol sind leicht polare Lösungsmittel. Sie können unpolare Stoffe etwas besser lösen als hoch polare Stoffe. Zwar wurde der Polarisationsgrad der Aminosäuren durch die Verwendung einer Säure herabgesetzt, dennoch sind die kurzkettigen Aminosäuren L-Alanin und Glycin aufgrund ihrer geringen Größe vergleichsweise polar. Sie werden dadurch nur schlecht im Fließmittel gelöst und nur sehr langsam von diesem mitgezogen. Da L-Alanin eine Methylgruppe mehr trägt als Glycin, wird es etwas besser gelöst und weist eine größere Laufweite auf.

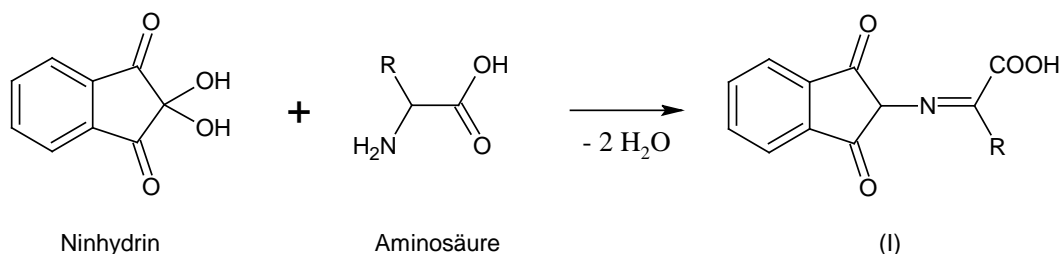
Noch besser gelöst werden Methionin und Leucin. Durch ihre Alkyl-Reste und die Thioether-Gruppe sind sie deutlich unpolarer und werden damit gut vom Lösungsmittel aufgenommen. Trotzdem die Moleküle größer sind, passieren sie die stationäre Phase deutlich schneller und erreichen damit auch größere Laufweiten. Diese beiden Moleküle ähneln sich in Größe und Struktur, wodurch sich die ähnlichen R_f -Werte ergeben.

Da es sich bei den Aminosäuren um farblose Stoffe handelt muss das Chromatogramm vor Auswertung entwickelt werden. Dazu wird die trockene DC-Karte nach Beendigung der Chromatographie mit einer Ninhydrin-Isopropanol-Lösung besprüht. Bei Ninhydrin handelt es sich um ein Nachweisreagenz für die Anwesenheit der Amino-Gruppe.

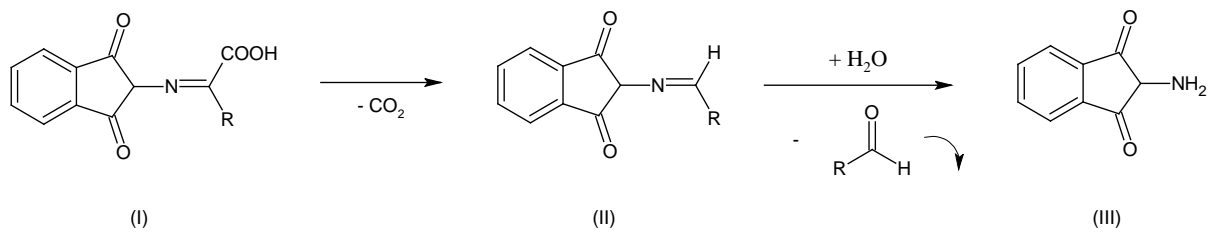


Ninhydrin

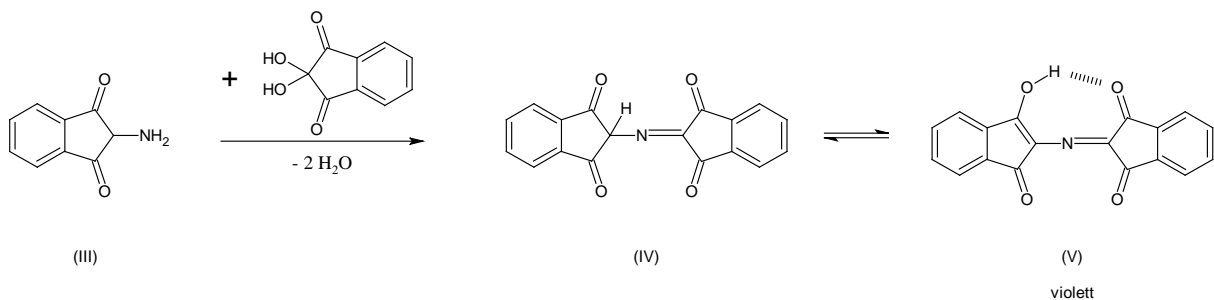
Durch eine Farbreaktionen können insbesondere Aminosäuren sichtbar gemacht werden. Dabei reagiert Ninhydrin mit der Amino-Gruppe der Aminosäure zunächst unter Kondensation zweier Wassermoleküle zum Zwischenprodukt (I).



Aus (I) wird die Carbonsäure-Gruppe als Kohlenstoffdioxid abgespalten, so dass ein weiteres Zwischenprodukt (II) gebildet wird. Zwischenprodukt (II) wird nun hydrolytisch zu einem Aldehyd und einem Amin (III) gespalten.



Die Amino-Gruppe von (III) addiert nun analog zum ersten Reaktionsschritt an ein weiteres Ninhydrin-Molekül. Es kommt zur Ausbildung des Produktes (IV), das über Tautomerie im Gleichgewicht zum violetten Farbstoff (V) steht. Der Farbeindruck des Produktes (V) entsteht über ein ausgedehntes π -Elektronensystem.



Der von einer Substanz innerhalb einer bestimmten Zeit zurückgelegte Weg, ist eine stoffspezifische Größe. Die Identifizierung der Einzelstoffe innerhalb einer unbekannt Probe erfolgt über den Abgleich mit Referenzproben, die aus Reinsubstanzen bestehen. Weist das Chromatogramm übereinstimmende Laufweiten einer Reinsubstanz mit einer Komponente des Gemisches auf, so kann daraus geschlossen werden, dass das Gemisch die entsprechende Substanz enthält. Je stärker sich die zu trennenden Substanzen chemisch und physikalisch unterscheiden, desto größer ist die Trennleistung der Chromatographie. Neben der qualitativen Analyse kann die Dünnschichtchromatographie auch zu präparativen Zwecken genutzt werden.

Methodisch-didaktische Analyse:

1. Einordnung

Der Versuch kann wie folgt in die Themengebiete des hessischen Lehrplans (G8) eingebettet werden.

Jahrgangsstufe u. Unterrichtseinheit	Themengebiet
7G.1	<u>Trennverfahren für Stoffgemische:</u> Homogene und heterogene Stoffsysteme; Labortechniken anwenden: Destillation, Filtration. Weitere Beispiele zur Auswahl: Abdampfen, Abscheiden, Extraktion, Chromatographie).
11G.2	<u>Aminosäuren, Peptide, Polypeptide:</u> Struktur und Eigenschaften natürlicher Aminosäuren; Peptidbindung; Strukturen und Strukturaufklärung von Eiweißen; Vorkommen und Bedeutung; Nachweisreaktionen für Aminosäuren und Eiweiße. Hydrolyse von Peptiden; Zwitter-Ion, isoelektrischer Punkt

2. Aufwand

Alle verwendeten Geräte und Materialien zählen zum Grundbestand einer Chemie-Sammlung oder sind einfach zu beschaffen. Die benötigten Chemikalien werden nur in kleinen Mengen verbraucht, so dass der Versuch keine hohen Kosten verursacht. Das Experiment ist innerhalb einer Doppelstunde durchführbar. Damit ist der Versuch gut für den Einsatz im Unterricht geeignet.

3. Durchführung

Der Versuch funktioniert sehr zuverlässig. Alle Effekte können gut aus der Nähe beobachtet werden. Für die Schüler empfiehlt es sich damit nah an das Versuchsgeschehen heranzutreten, um direkte Beobachtungen anstellen zu können. Zudem sollten die Schüler bei der Auswertung der DC-Karten die Möglichkeit haben diese direkt einzusehen. Nach der Behandlung mit der Ninhydrin-Lösung ist die Spur der Aminosäuren eindeutig erkennbar. Alle benötigten Chemikalien sind nach HessGiss für Schülerversuche ab der Sekundarstufe I freigegeben, so dass der Versuch auch gut als Schülerexperiment durchgeführt werden kann. Bei der Stundenplanung sollte beachtet werden, dass der „Fließvorgang“ der DC etwa 20 min in Anspruch nimmt.

Literatur:

- Versuchsvorschrift aus: Risch, K., **Organische Chemie**, Schroedel, Hannover, 1981.
- http://www.chemiedidaktik.uni-wuppertal.de/alte_seite_du/material/milch/milcheiweiss/aminosauren.pdf; Zugriff: 24.07.09.
- K. P. C. Vollhardt, N. E. Schore, **Organische Chemie, Dritte Auflage**, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2000.
- A. F. Holleman, E. Wiberg, N. Wiberg, **Lehrbuch der Anorganischen Chemie, 102. Auflage**, Walter de Gruyter & Co., Berlin, 2007.
- Charles E. Mortimer, Ulrich Müller, **Chemie, das Basiswissen der Chemie**, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2003.
- **HessGiss-Datenbank**, V 11.0 – 2006/2007.
- www.dguv.de, **GESTIS-Stoffdatenbank**, 2009, Zugriff: 01.07.09.
- **Lehrplan Chemie, Gymnasialer Bildungsgang, Jahrgangsstufen 7G bis 12G**, Hessisches Kultusministerium 2008.