

Praktikum zur Organischen Chemie für Studierende des Lehramts

WS 2010/11

Praktikumsleitung: Dr. Reiß

Assistent: Jan Schäfer

Name: Johannes Hergt

Datum: 28. Januar 2011

Gruppe 10: Amine, Aminosäuren und Peptide

Versuch (Chromatogr.): Chromatographie von Aminosäuren mit Dansylchlorid

Zeitbedarf

Vorbereitung: 15 Minuten

Durchführung: 15 Minuten (+ 3 Stunden Wartezeit)

Nachbereitung: 10 Minuten

Reaktionsgleichungen

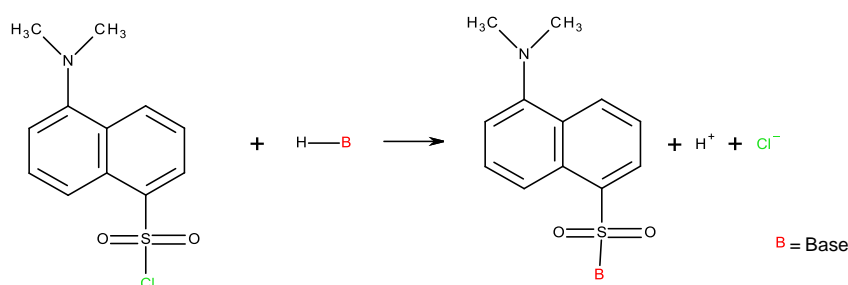


Abb. 1: Dansylchlorid (5-(Dimethylamino)-1-naphthalinsulfonsäure) als Nachweisreagenz für Aminosäuren.

Chemikalien [2,3]

Tab. 1: Verwendete Chemikalien.

Eingesetzte Stoffe	Summenformel	Menge	R-Sätze	S-Sätze	Gefahrensymbole	Schul-einsatz
Natriumhydrogencarbonatlösung (c = 0,1 mol/l)	NaHCO ₃	10 mL				S1
Dansylchloridlösung (in Aceton; w = 0,02)	C ₁₂ H ₁₂ ClNO ₂ S	0,5 g	34	26-36/37/39	C	S1
Aceton	C ₃ H ₆ O	60 mL	11-36-66-67	(2)-9-16-26-46	F, Xi	S1
Ameisensäure : Wasser (1,5 : 100 - Fließmittel)	CH ₂ O ₂ / H ₂ O	10 mL	35	(1/2)-23-26-45	C	S1
Glycin		0,05 mg				S1
L-Arginin		0,05 mg	36	26	Xi	S1
L-Leucin		0,05 mg				S1
DL-Phenylalanin		0,05 mg				

Geräte

- Magnetrührer mit Rührfisch
- DC-Karte
- DC-Kammer mit Deckel
- Kapillaren
- 4 kleine Deckelgläser
- 100 mL Becherglas
- Trockenschrank
- UV-Lampe

Aufbau

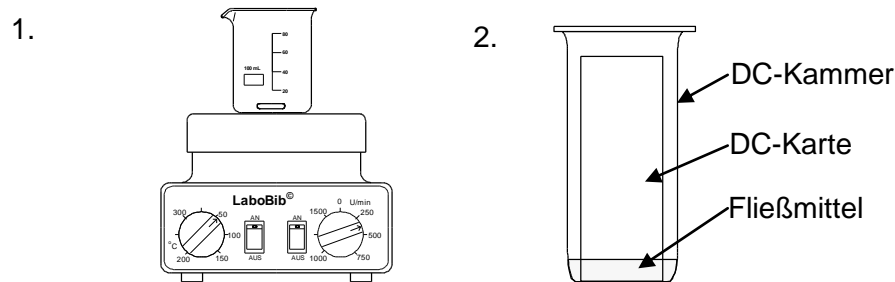


Abb. 2: Versuchsaufbau.

Durchführung

Zunächst wird eine 2 prozentige Dansylchlorid-Aceton-Lösung hergestellt. Hierzu werden 0,5 g Dansylchlorid in 60 mL Aceton gelöst (Magnetrührer + Rührfisch, siehe Abb. 2: 1.). Nun werden je 1 mL Natriumhydrogencarbonatlösung, 1 mL Dansylchlorid-Aceton-Lösung und 0,05 mg je einer Aminosäure (Glycin, L-Arginin, L-Leucin, DL-Phenylalanin) in ein Deckelglas gegeben. Letzteres wird mit einem Deckel verschlossen und für drei Stunden im Trockenschrank bei 35 °C inkubiert.

Anschließend wird von jeder Lösung mit einer Kapillare eine Probe entnommen und auf die mit Bleistift eingezeichnete Startlinie einer DC-Karte aufgetragen. Insgesamt werden drei kleine Tropfen je einer Probe aufgetragen, wobei immer wieder gewartet wird, bis die vorherige Probe eingetrocknet ist.

Nun wird die DC-Platte in das Fließmittel in der DC-Kammer gestellt (siehe Abb. 2: 2.). Das Fließmittel besteht aus 1,5 Teilen Ameisensäure und 100 Teilen Wasser. Sobald die Fließmittelfront im oberen Drittel der DC-Karte ist, wird diese aus der DC-Kammer entnommen und unter eine UV-Lampe gelegt.

Beobachtung

Die Aminosäuren lösen sich gut in der gelben Dansylchlorid-Aceton-Natriumhydrogencarbonat-Lösung (siehe Abb. 3 links).

Das Fließmittel steigt relativ rasch auf der DC-Karte, sodass das Chromatogramm bereits nach 15 Minuten herausgenommen werden kann.

Das Chromatogramm zeigt im UV-Licht für die vier verschiedenen Aminosäuren unterschiedliche Farbgebungen und Formen. Im Fall von Glycin, L-Leucin und DL-Phenylalanin sind an der Fließmittelfront blasse, hellblaue Schlieren sichtbar. Für die L-Argininlösung ist diese nicht sichtbar. Oberhalb des Auftragungspunktes der Glycinlösung ist ein blasser, grüner Fleck zu erkennen. Für die L-Argininlösung ist dieser leuchtend gelb und für die L-Leucinlösung leuchtend hellblau. Oberhalb des Auftragungspunktes von DL-Phenylalanin sind zwei leuchtend türkise Flecken sichtbar.

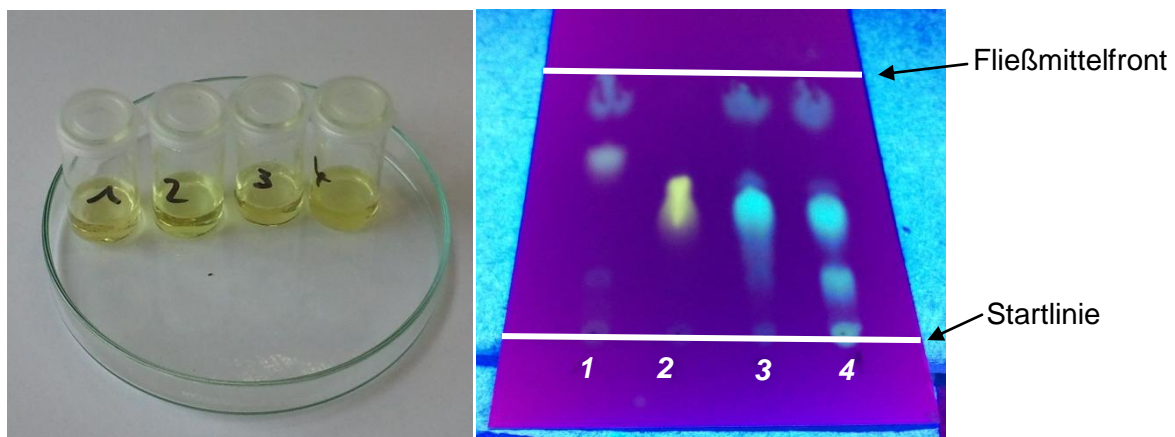


Abb. 3: Aminosäuren in der Dansylchlorid-Aceton-Natriumhydrogencarbonat-Lösung (links). Chromatogramm (rechts).
1 Glycin, 2 L-Arginin, 3 L-Leucin, 4 DL-Phenylalanin

Tab. 2: Retentionsfaktoren der jeweiligen Aminosäurenlösungen.

Nr.	Aminosäure	R _f - Wert
1	Glycin	0,74
2	L-Arginin	0,61
3	L-Leucin	0,55
4	DL-Phenylalanin	0,52 u. 0,29

Anhand der Retentionsfaktoren (siehe Tab. 2) wird ersichtlich, dass die glycinhaltige Lösung am schnellsten/weitesten mit dem Fließmittel aufgestiegen ist. Es folgen L-Arginin und L-Leucin. Am trägsten ist die DL-Phenylalaninlösung, welche aufgrund zweier Flecken zwei unterschiedliche Retentionsfaktoren besitzt.

Entsorgung

Restliche Acetonhaltige Lösungen werden im Sammelbehälter für organische Lösungsmittelabfälle entsorgt.

Fachliche Auswertung der Versuchsergebnisse [4,5]

Die Chromatographie ist ein gebräuchliches Verfahren, um Stoffe aufgrund ihrer unterschiedlichen Polaritätseigenschaften voneinander zu trennen. Die mobile Phase (im Versuch Wasser und Ameisensäure als Fließmittel) weist im Versuch eine höhere Polarität auf als die stationäre Phase (DC-Karte). Durch den Kapillareffekt steigt das Fließmittel in der dünnen Beschichtung der DC-Karte auf. Je nach Polarität und der damit verbundenen Affinität zum Fließmittel steigen auch die Aminosäuren im Chromatogramm auf. Im Falle eines polaren Fließmittels, wie im Versuch verwendet, sollten deshalb theoretisch die stark polaren Aminosäuren am schnellsten bzw. am weitesten im Chromatogramm aufsteigen, die unpolaren aufgrund ihrer höheren Affinität zur stationären Phase hingegen langsamer.

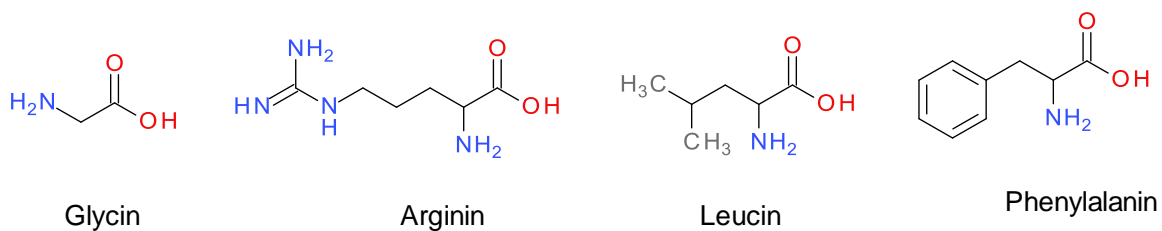


Abb. 4: Die vier chromatographisch untersuchten Aminosäuren.

Bevor nun die in Abb. 4 dargestellten Aminosäuren als polar bzw. unpolar eingestuft werden, sollte auf das im Versuch verwendete, fluoreszierende Verbindungen bildende Dansylchlorid eingegangen werden.

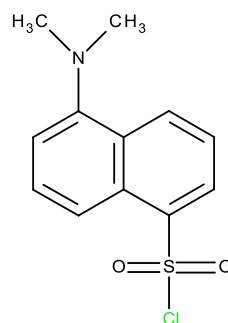


Abb. 5: Dansylchlorid (5-(Dimethylamino)-1-naphthalinsulfonsäure)

Dansylchlorid (siehe Abb. 5) verfügt über ein Chloratom, welches sehr gut als Abgangsgruppe fungieren kann. So reagiert es mit Aminosäuren unter Abspaltung von Salzsäure zu einer fluoreszierenden, „dansylierten“ Verbindung.

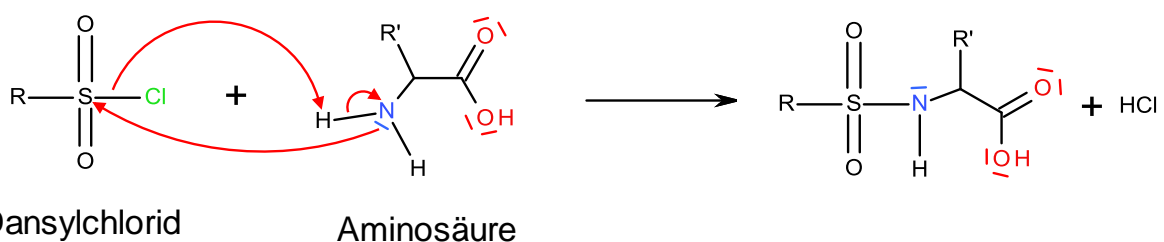


Abb. 6: Erster Schritt: Dansylierung der Aminogruppe einer Aminosäure.

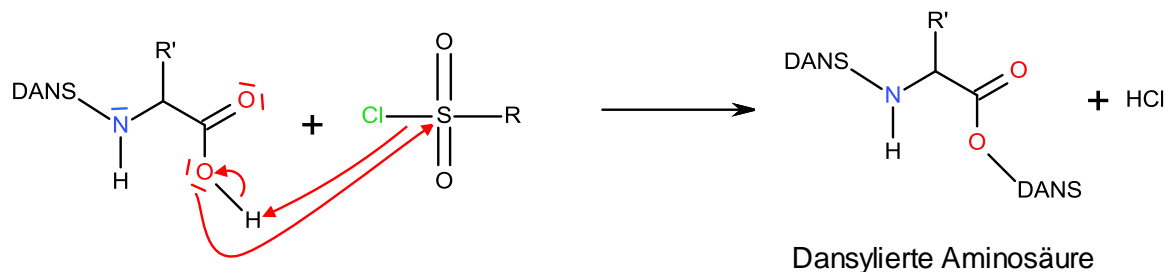
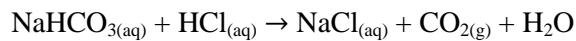


Abb. 7: Zweiter Schritt: Dansylierung der Carboxylgruppe einer Aminosäure.

Die gebildete Salzsäure reagiert mit dem in der Lösung vorhandenen Natriumhydrogencarbonat weiter zu Natriumchlorid, Kohlendioxid und Wasser, sodass sich der pH-Wert der Lösung nicht verändert (Pufferfunktion). Nach Le Chatelier werden so rascher dansylierte Aminosäuren nachgebildet.



Bei der Betrachtung der gebildeten dansylierten Aminosäure in Abb. 7 wird deutlich, dass insbesondere der Rest (R') der Aminosäure für einen gewissen Grad an Polarität verantwortlich ist.

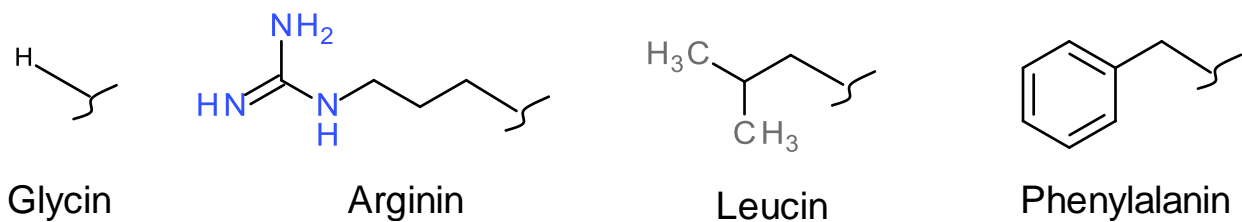


Abb. 8: Reste (R') der jeweiligen Aminosäuren.

Dadurch, dass Glycin nur ein Wasserstoffatom als Restgruppe besitzt, wird der Einfluss des „doppeltgebundenden“ Sauerstoffatoms der dansylierten Carboxylgruppe relativ groß. Glycin ist deswegen als polar einzustufen. Im Versuch wird die polare Eigenschaft Glycins bestätigt, da es mit dem polaren Fließmittel (Wasser und Ameisensäure) am schnellsten im Chromatogramm aufstieg.

Arginin ist aufgrund seiner Aminogruppen in der Restkette ebenfalls eine polare Verbindung und steigt aufgrund dessen nach Glycin ebenfalls relativ rasch im Chromatogramm auf. Da die primäre Aminogruppe zudem als Protonenakzeptor (Brönstedt-Base) reagieren kann, liegt die dansylierte Argininverbindung zu einem gewissen Teil als Kation vor, wodurch dessen Charakter nach stärker polar wird. Im Gegensatz zu Glycin besitzt es jedoch auch einen aliphatischen Teil (drei Kohlenstoffatome), sodass es nicht so schnell aufsteigt wie jenes, da die Affinität zur stationären Phase größer ist.

Leucin besitzt mit einer Isobutylgruppe einen unpolaren, aliphatischen Rest. Aus diesem Grund steigt es im Versuch im Vergleich zu Arginin und Glycin langsamer im Chromatogramm auf.

Im Fall von Phenylalanin sind zwei Flecken oberhalb des Startpunktes zu sehen. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass im Gegensatz zu den anderen drei Aminosäuren Phenylalanin nicht enantiomerenrein vorlag.

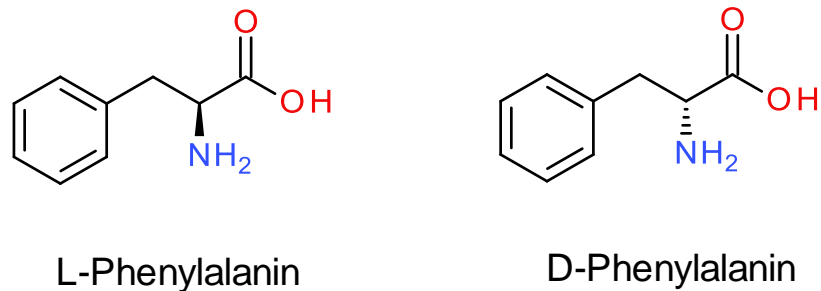


Abb. 9: Strukturformeln der beiden Phenylalaninenantiomere.

Es ist anzunehmen, dass die Dansylierung beider Enantiomere zu unterschiedlichen Eigenschaften in der Polarität geführt hat und die beiden Enantiomere so getrennt wurden. In jedem Fall ist die Phenyl-Restgruppe des Phenylalanins unpolar und steigt aus diesem Grund wie Leucin vergleichsweise langsam im Chromatogramm auf.

Die blassen, hellblauen Schlieren an der Fließmittelfront sind auf die zum Teil stattfindende Reaktion der dansylierten Aminosäuren mit dem im Fließmittel enthaltenen Wasser zurückzuführen (Reaktionsmechanismus nicht bekannt).

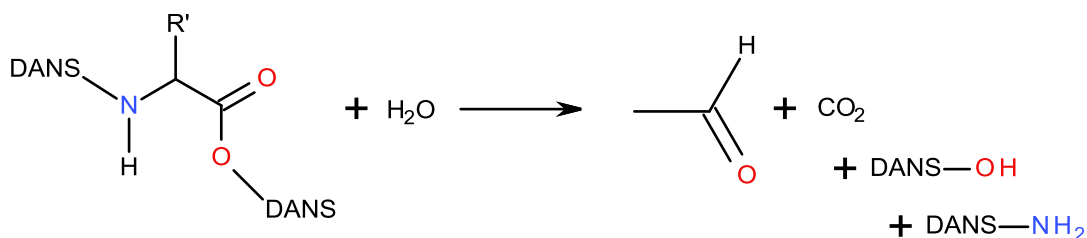


Abb. 10: Reaktion einer dansylierten Aminosäure mit Wasser.

Die gebildete Sulfonsäure (DANS-OH) sowie das gebildete Dansylamid (DANS-NH₂) sind für die schlierenhafte Fluoreszenz an der Fließmittelfront verantwortlich. Bemerkenswert dabei ist, dass diese Schlieren nicht oberhalb des gelb-leuchtenden Argininflecks auftreten, sodass davon auszugehen ist, dass Arginin stabilere Dansylverbindungen bildet (evtl. auf den angesprochenen ionischen Charakter zurückzuführen).

Neben der Dünnschichtchromatographie finden auch die Austauschchromatographie sowie die Elektrophorese, welche die Aminosäuren aufgrund ihrer unterschiedlichen pH-Werte

trennt, Verwendung. Während die DC-Chromatographie und die Elektrophorese sich vor allem zur Trennung kleinerer Mengen unterschiedlicher Aminosäuren eignen, ist die Austauschchromatographie unter Verwendung großer Ionenaustauschersäulen auch für große Substanzmengen geeignet. Die Trennungsmethode beruht hier auf der unterschiedlichen Ladung der verschiedenen Aminosäuren.

Die Trennung von Aminosäuren spielt insbesondere in der Medizin und Forschung eine wesentliche Rolle. Aminosäuren sind (als Polypeptide) Bestandteile der meisten Bioorganismen. Durch Auftrennung ist es möglich, die Bestandteile bestimmter Proteine zu bestimmen (wichtig z.B. zur Identifizierung bestimmter Gendefekte).

Methodisch-Didaktische Analyse

1 Einordnung^[6]

Laut hessischem Lehrplan werden die Strukturen und Eigenschaften von Aminosäuren in der Qualifikationsphase 2 (zweites Halbjahr der elften Klasse) behandelt. Die Chromatographie von Aminosäuren wird nicht explizit im Lehrplan erwähnt. Da sie jedoch die unterschiedlichen Eigenschaften (Polarität) von Aminosäuren aufzeigt, trägt sie in gewisser Weise zum Verständnis der Strukturen bei.

Der Versuch eignet sich gut zur Wiederholung bereits erworbenen Wissens. Begriffe wie „Polarität“ oder „aliphatisch“ sollten den Schülern bereits bekannt sein und werden durch die Theorie zur Chromatographie gefestigt.

Da die Dünnschichtchromatographie durchaus in der Medizin und Pharmazie angewandt wird, besteht bei dem Versuch zudem ein guter Alltagsbezug.

2 Aufwand

Der präparative Aufwand des Versuchs ist nicht sehr groß, bedarf aber ein wenig Zeit, da eine Natriumhydrogencarbonatlösung und eine Aceton-Dansylchloridlösung angesetzt werden müssen. Das Auftragen der Aminosäurenlösungen auf die DC-Karte erfolgt relativ zügig, es folgt jedoch eine Inkubierungszeit von 3 Stunden. Die anschließende Analyse unter der UV-Lampe geht relativ schnell von statten und auch die anschließende Entsorgung ist relativ zügig erledigt.

3 Durchführung

Aufgrund der ungiftigen Chemikalien ist der Versuch durchaus als Schülerversuch geeignet. Für den Lehrer ist es empfehlenswert die benötigten Lösungen bereits vor der Experimentiereinheit in ausreichenden Mengen anzusetzen.

Die Schüler könnten zu Beginn einer Stunde die zu untersuchenden Aminosäuren mit den vom Lehrer angesetzten Lösungen mischen und letztere über Nacht im Trockenschrank inkubieren, sodass am Folgetag/in der folgenden Unterrichtsstunde das Chromatogramm in die DC-Kammer gestellt werden könnte und anschließend unter der UV-Lampe analysiert werden könnte.

Der Lehrer könnte die Schüler dazu auffordern, Fotos (mit Handy z.B.) von ihren Chromatogrammen zu machen, da die Fluoreszenz nach dem Trocknen der DC-Karte deutlich nachlässt.

Bei der Besprechung der Theorie ist eine didaktische Reduktion auf das Wesentliche, sprich die unterschiedlichen Polaritätseigenschaften der Aminosäuren, sicher sinnvoll.

4 Fazit

Der Versuch ist aufgrund der Fluoreszenz und der unterschiedlichen Farben optisch sehr reizvoll. Da er jedoch mit einem nicht unerheblichen Zeitaufwand (insbesondere Wartezeit) verbunden ist, sollte er nur dann im Unterricht durchgeführt werden, wenn der Lehrer ausreichend Zeit dafür zur Verfügung hat.

Quellenverzeichnis

- [1] Versuchsquelle:
Krüger, Gerhard: *Mikrochromatographischer Nachweis von Aminosäuren mit Hilfe von Dansylchlorid*. (Aus: Praxis der Naturwissenschaften) Heft 11, **1978**, S. 293-295.
- [2] GESTIS - Stoffdatenbank:
<http://biade.itrust.de/biade/lpext.dll?f=templates&fn=main-hit-h.htm&2.0>
(Zugriff am 30. Januar 2011)
- [3] HessGISS - GUV-Regel Umgang mit Gefahrenstoffen im Unterricht
Ausgabe Januar 1998 (Aktualisierte Fassung Juni 2004)
- [4] Vollhardt, K. Peter C. und Neil E. Schore: *Organische Chemie*. Vierte Auflage. Wiley-VCH Verlag. Weinheim **2005**. S. 220 ff.
- [5] Bruice, Paula Y.: *Organische Chemie*, 5. Aktualisierte Auflage, Pearson Studium, München **2007**, S. 1179 f.
- [6] Hessischer Lehrplan: Chemie. **2010**
http://www.hessen.de/irj/HKM_Internet?uid=3b43019a-8cc6-1811-f3ef-ef91921321b2
(Zugriff am 30. Januar 2011)