

Praktikum zur Organischen Chemie für Studierende des Lehramts

WS 2010/11

Praktikumsleitung: Dr. Reiß

Assistent: Jan Schäfer

Name: Johannes Hergt

Datum: 3.2.2011

Gruppe 10: Amine, Aminosäuren und Peptide

Versuch (Assi): Isolierung von Fruchtbromelain

Zeitbedarf

Vorbereitung: 20 Minuten

Durchführung: 2 Stunden (inkl. Chromatographie)

Nachbereitung: 10 Minuten

Reaktionsgleichung



Abb. 1: Spaltung einer Peptidbindung durch Fruchtbromelain.

Chemikalien [2,3]

Tab. 1: Verwendete Chemikalien.

1. Isolierung von Fruchtbromelain						
Eingesetzte Stoffe	Summenformel	Menge	R-Sätze	S-Sätze	Gefahrensymbole	Schul-einsatz
Ananassaft (frisch)		100 mL				S1
Aceton	C ₃ H ₆ O _(l)	300 mL	11-36-66-67	(2)-9-16-26-46	F, Xi	S1
2. Ninhydrin-Reaktion im Reagenzglas						
Gelatine		0,3 g				
Essigsäurelösung (pH ~ 5)	CH ₃ COOH _(aq)	4 mL				S1
isoliertes Fruchtbromelain		Spatelspitze				S1
Glycin	C ₂ H ₅ NO _{2(s)}	0,05 g				S1
Alanin	C ₃ H ₇ NO _{2(s)}	0,05 g				S1
Prolin	C ₅ H ₉ NO _{2(s)}	0,05 g				S1
Ninhydrin	C ₉ H ₆ O _{4(s)}	Spatelspitze	22-36/37/38	26-28-36	Xn	S1

3. Chromatographische Untersuchung der Gelatine auf Aminosäuren (zusätzlich zu 2. - Fließmittel)

Eingesetzte Stoffe	Summenformel	Menge	R-Sätze	S-Sätze	Gefahrensymbole	Schuleinsatz
Methanol	CH ₃ OH _(l)	9 mL	11-23/24/25-39/23/24/25	(1/2)-7-16-36/37-45	T, F	LV
Dichlormethan	CH ₂ Cl _{2(l)}	9 mL	40	23-24/25-36/37	Xn	S1
Ammoniak (w = 0,25)	NH _{3(aq)}	2 mL	34-50	(1/2)-26-36/37/39-45-61	C, N	S1

Geräte

1. Isolierung von Fruchtbromelain

- Messer
- Küchen-Mixer
- Becherglas (250 mL)
- Erlenmeyerkolben (250 mL)
- 2 Petrischalen (10 cm Durchmesser)
- Handtuch (als Filter)

2. Ninhydrin-Reaktion im Reagenzglas

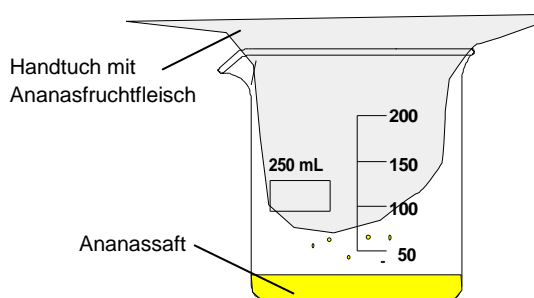
- 3 Reagenzgläser
- Reagenzglasständer
- Spatel
- Bunsenbrenner
- Dreifuß
- Drahtnetz
- Becherglas (250 mL) für Wasserbad

3. Chromatographische Untersuchung der Gelatine auf Aminosäuren

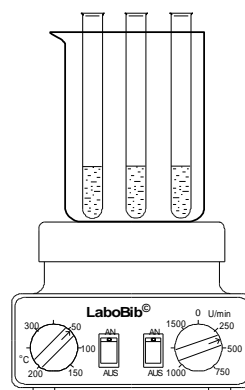
- Waage
- Spatel
- 6 kleine Bechergläser (25 - 50 mL)
- 6 Kapillaren
- Becherglas (250 mL) für Wasserbad
- Magnetrührer
- 2 DC-Kammern (mit Abdeckung)
- 2 DC-Karten
- Sprühvorrichtung

Aufbau

1.



2.



3.

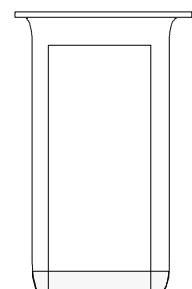


Abb. 2: Versuchsaufbau.

Durchführung

1. Isolierung von Fruchtbromelain

Ca. 500 g Ananasfruchtfleisch werden in einen Küchenmixer gegeben und zu einem Brei verarbeitet. Letzterer wird über ein Handtuch in einen Erlenmeyerkolben filtriert. Zu dem Filtrat/Ananassaft (ca. 100 mL) werden 300 mL Aceton gegeben und die Lösung ca. 1 Stunde lang ruhen gelassen. Das Aceton-Saft-Gemisch wird abgegossen und der Bodensatz (enthält Fruchtbromelain) mit möglichst wenig Flüssigkeit auf eine Petrischale gegeben.

2. Ninhydrin-Reaktion im Reagenzglas

Zunächst wird ein Gelatine-Hydrolysat vorbereitet. Dazu werden ca. 0,3 g Gelatine (mit Wasser versetzt und erhärtet) und eine Spatelspitze des gewonnenen Fruchtbromelains mit 4 mL Essigsäurelösung (pH ~ 5) versetzt. Die Lösung wird eine Stunde lang ruhen gelassen und anschließend im siedenden Wasserbad für ca. 20 Minuten erhitzt.

1 mL des Gelatine-Hydrolysats wird nun in ein Reagenzglas überführt und auf ca. 5 mL mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt. In ein zweites Reagenzglas wird eine Spatelspitze des isolierten Fruchtbromelains gegeben und ebenfalls auf ca. 5 mL mit demineralisiertem Wasser aufgefüllt. In ein drittes Reagenzglas wird je eine Spatelspitze Glycin, Alanin und Prolin gegeben und zusätzlich 5 mL demineralisiertes Wasser zugeführt. In jedes der drei Reagenzgläser wird eine Spatelspitze Ninhydrin gegeben und kräftig geschüttelt. Nun werden sie für ca. 10 Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt.

3. Chromatographische Untersuchung der Gelatine auf Aminosäuren

In fünf kleine Bechergläser oder Erlenmeyerkolben werden je einmal 0,15 g Gelatine, eine Spatelspitze Fruchtbromelain, 0,05 g Glycin, 0,05 g Alanin und 0,05 g Prolin abgewogen. Einem mL des Gelatine-Hydrolysats aus **2.** werden 4 mL Methanol zugeführt. Es werden je 5 mL Methanol zugesetzt und die Substanzen unter Erwärmen im Wasserbad gelöst.

Auf zwei DC-Karten werden je drei Lösungen mit Kapillaren bandenförmig aufgetragen. Auf die erste wird das Gelatine-Hydrolysat-Methanol-Gemisch (4x auftragen u. trocknen lassen), die Fruchtbromelainlösung (4x) sowie die Gelatinelösung (4x) in Abständen von je 1,5 cm aufgetragen. Auf die zweite DC-Karte wird die Glycin-, Alanin- und Prolinlösung (je 2x, 1,5 cm Abstände) aufgetragen.

Für je eine DC-Kammer wird ein Fließmittelgemisch mit 9 mL Dichlormethan, 9 mL Methanol und 10 mL Ammoniak angesetzt. Die DC-Platten werden so lange in der Kammer gelassen, bis sich die Fließmittelfront ca. 2 cm unterhalb des oberen Randes der jeweiligen Platte befindet. Sie werden dann herausgenommen und im Abzug (!) getrocknet.

Nun werden die DC-Platten im Abzug kräftig mit Ninhydrin-Sprühreagenz besprüht und anschließend für ca. 10 Minuten im Trockenschrank (105 °C) getrocknet.

Beobachtung

Wird der Ananassaft mit Aceton versetzt, fällt sofort ein weißer Niederschlag aus, der sich nach ca. 1 Stunde am Boden absetzt.

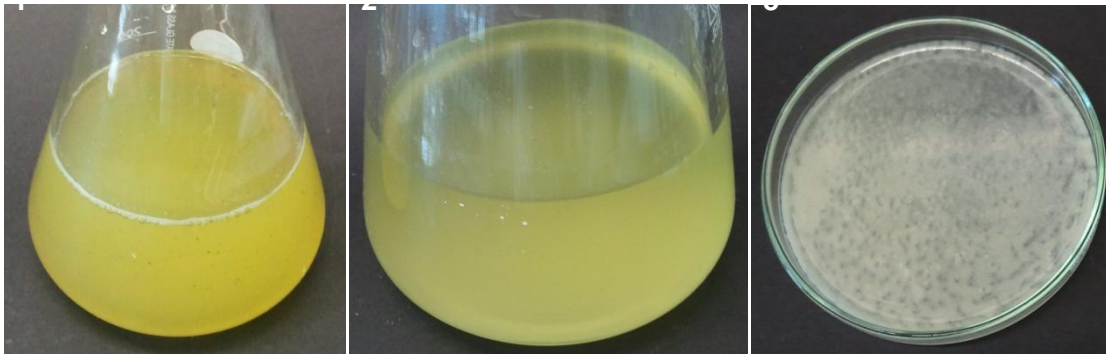


Abb. 3: Ananassaft 1; nach der Zugabe von Aceton 2; Bodensatz in Petrischale 3.

Bei der Durchführung der „Ninhydrin-Reaktion im Reagenzglas“ treten unterschiedlich starke Violett-färbungen nach der Zugabe von Ninhydrin und dem Erwärmen im Wasserbad auf (siehe Abb. 4).

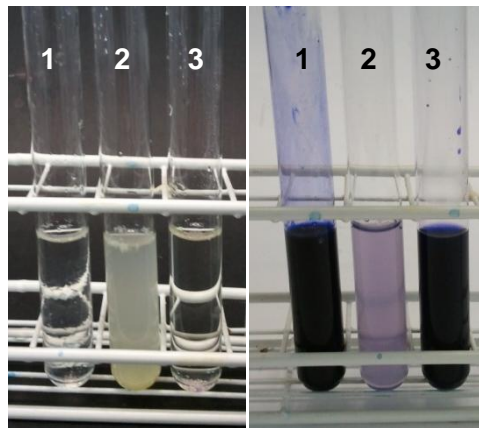


Abb. 4: Gelatine-Hydrolysat 1, Fruchtbromelainlösung 2 und Glycin-Anilin-Prolinlösung 3 vor (links) und nach (rechts) der Zugabe von Ninhydrin und dem Erwärmen im Wasserbad.

Beim Ansetzen der Lösungen zur chromatographischen Analyse der Gelatine ist zu beobachten, dass sich die Gelatine, Fruchtbromelain, Glycin und Alanin äußerst schlecht in Methanol lösen. Lediglich Prolin weist eine etwas bessere Löslichkeit auf.



Abb. 5: Schlechte Löslichkeit des Gelatine-Hydrolyсата, Fruchtbromelains, der Gelatine, Glycins und Alanins (v.l.n.r.) in Methanol. Mäßige Löslichkeit von Prolin (rechts).

Im Fall der chromatographischen Auftrennung sind für Glycin, Alanin und Prolin je eine Bande zu erkennen. Für Glycin ist diese braun, für Alanin rot und für Prolin gelb mit einem roten Rand. Das Gelatine-Hydrolysat wurde chromatographisch in 4 deutlich zu erkennende braune Banden aufgetrennt. Im Fall der Fruchtbromelainlösung ist eine violette Bande deutlich zu erkennen, des Weiteren ist jedoch eine braune, spitz zulaufende Schliere bis zur Laufmittelfront sichtbar. Oberhalb des Auftragungspunktes der Gelatinelösung sind keine Banden sichtbar.

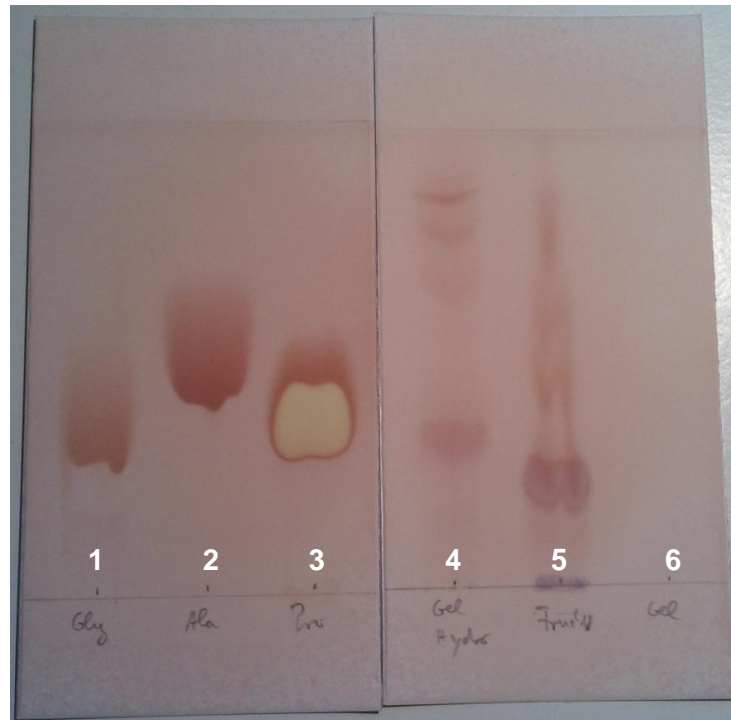


Abb. 6: Chromatogramm von Glycin, Alanin, Prolin, des Gelatine-Hydrolysats, der Fruchtbromelainlösung und der Gelatinelösung (v.l.n.r.).

Die R_f -Werte der einzelnen Banden sind in folgender Tabelle zusammengetragen:

Tab. 2: Retentionsfaktoren der jeweiligen Lösungen.

Nr.	Aminosäure	R_f - Wert
1	Glycin	0,35
2	Alanin	0,48
3	Prolin	0,37
4	Gelatine-Hydrolysat	0,34; 0,65; 0,76; 0,85
5	Fruchtbromelainlösung	0,30
6	Gelatinelösung	-

Entsorgung

Acton-, methanol- und ninhydrinhaltige Lösungen werden in den Sammelbehälter für organische Lösungsmittelabfälle gegeben. Restliche Essigsäurelösungen werden neutral im Ausguss entsorgt.

Fachliche Auswertung der Versuchsergebnisse ^[4-6]

Die Nynhidrin-Reaktion

Wird frisch gepresster Ananassaft mit Aceton versetzt, so fällt ein weißer Niederschlag aus, der das Enzym Fruchtbromelain enthält. Bevor nun auf die Eigenschaften dieses Enzyms eingegangen wird, sollten die Nachweisreaktionen mit Ninhydrin des 2. und 3. Teilversuchs betrachtet werden. Durch eine Interpretation des Chromatogramms und der Nachweisreaktion im Reagenzglas können dann Rückschlüsse auf die Funktionsweise Fruchtbromelains gezogen werden.

Die Färbungen im 2. und 3. Teilversuche sind auf eine relativ komplexe Reaktion des Ninhydrins mit primären Aminogruppen der Aminosäuren zurückzuführen.

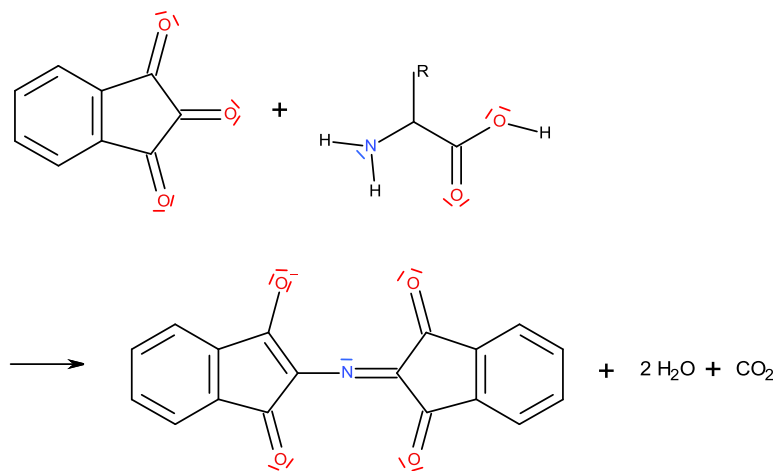


Abb. 7:^[4] Bruttogesamtreaktion.

Das entstehende Anion (siehe Abb. 7) ist aufgrund eines delokalisierten π -Elektronensystems, dessen Elektronen durch Licht im sichtbaren Spektralbereich angeregt werden können, ein sog. Chromophor (= Farbträger (altgr.)). Aus diesem Grund tritt im 2. und 3. Teilversuch eine violette bis braune Färbung auf.

Das Anion verfügt über vier äquivalente Grenzformeln:

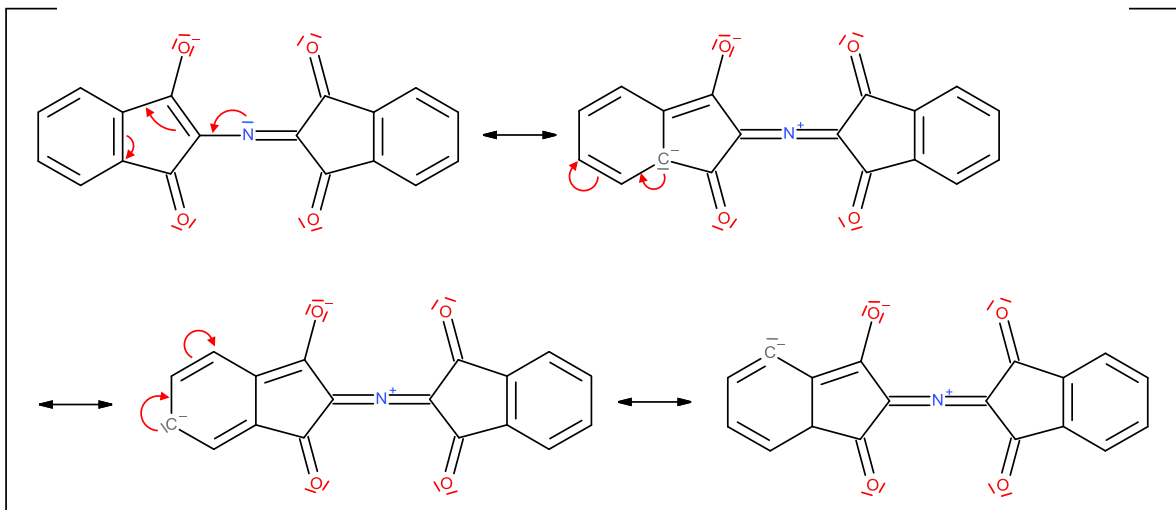


Abb. 8: Äquivalente Grenzformeln des entstandenen Anions der Ninhydrin-Nachweis-Reaktion.

Die Reaktion Ninhydrins mit einer Aminosäure beginnt mit einer Kondensation (= Reaktion unter Abspaltung eines kleineren Moleküls, in diesem Fall Wasser). Dabei findet zunächst ein nucleophiler Angriff des Stickstoffatoms an der mittleren Carbonylgruppe (auf Grund des -I-Effekts der anderen Gruppen am stärksten Elektrophil) des Ninhydrins statt. Es folgt eine Protonenübertragung und die Abspaltung einer Hydroxidgruppe, die das Wasserstoffatom der Carboxylgruppe der Aminosäure als Proton abstrahieren kann.

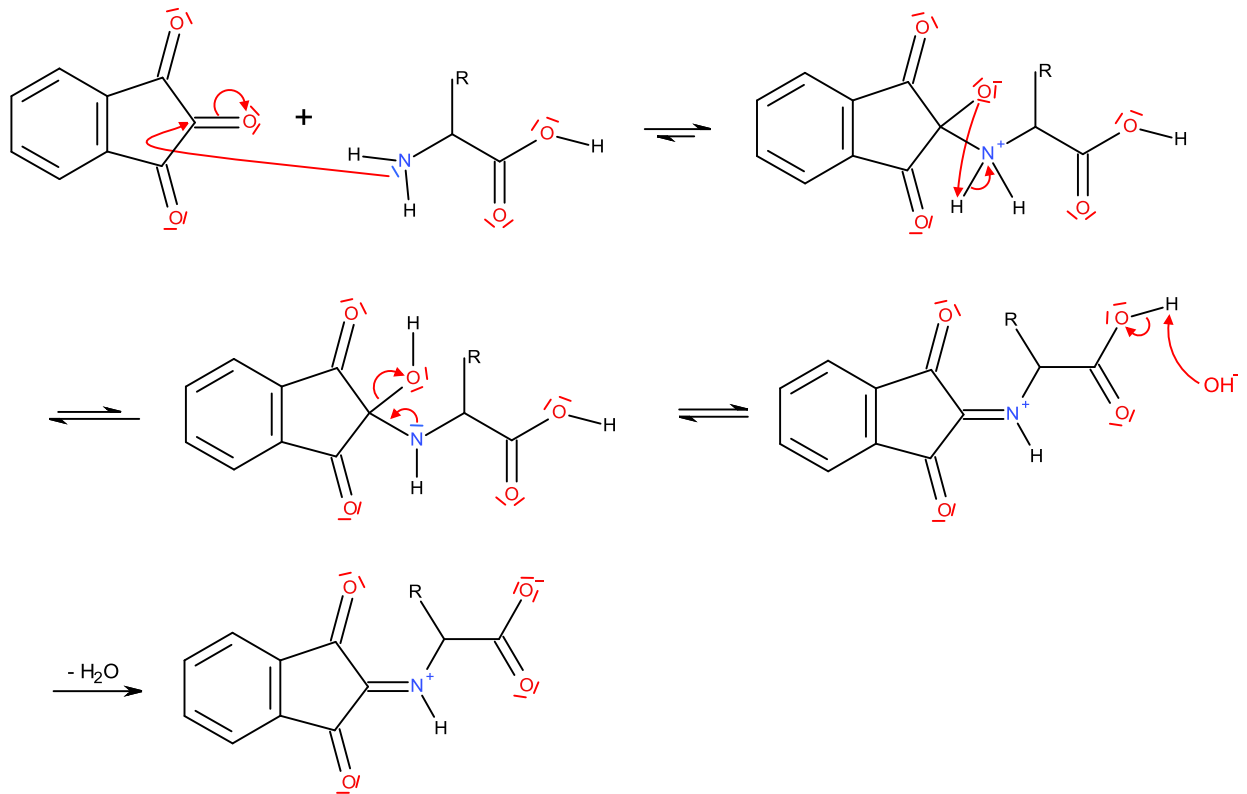


Abb. 9: Erste Reaktionsschritte des Ninhydrins mit einer Aminosäure (Kondensation).

Es folgt eine Abspaltung von Kohlendioxid und die Reduktion einer Carbonylgruppe zum Alkohol.

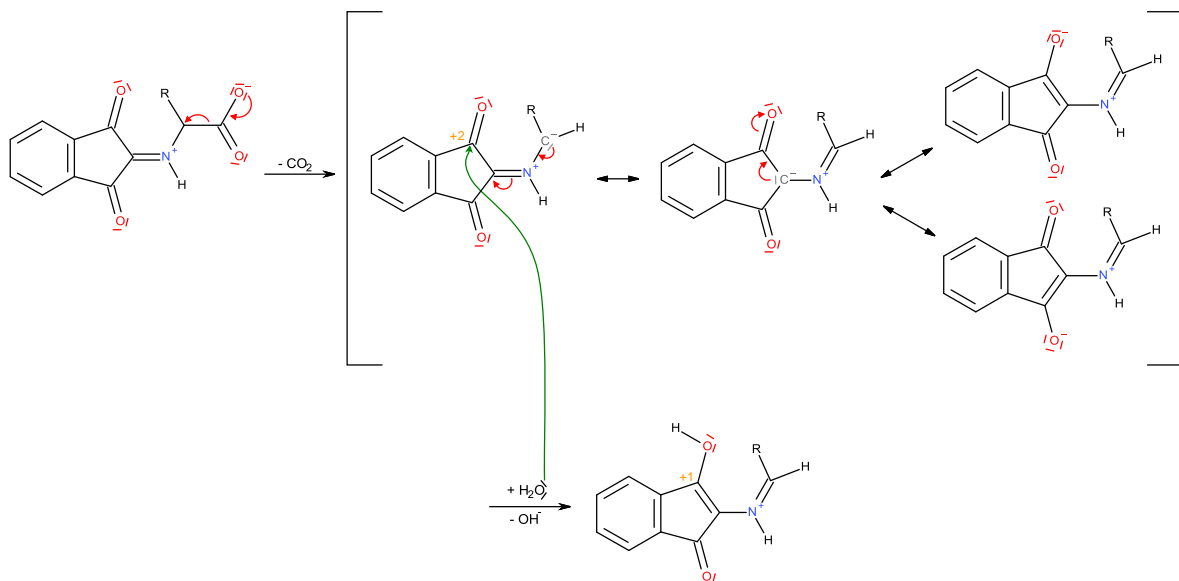


Abb. 10: Abspaltung von Kohlendioxid und Reduktion zum Alkohol durch Wasser.

Darauf folgt durch Hydrolyse und Protonenumlagerung die Bildung eines Aldehyds und eines primären Amins.

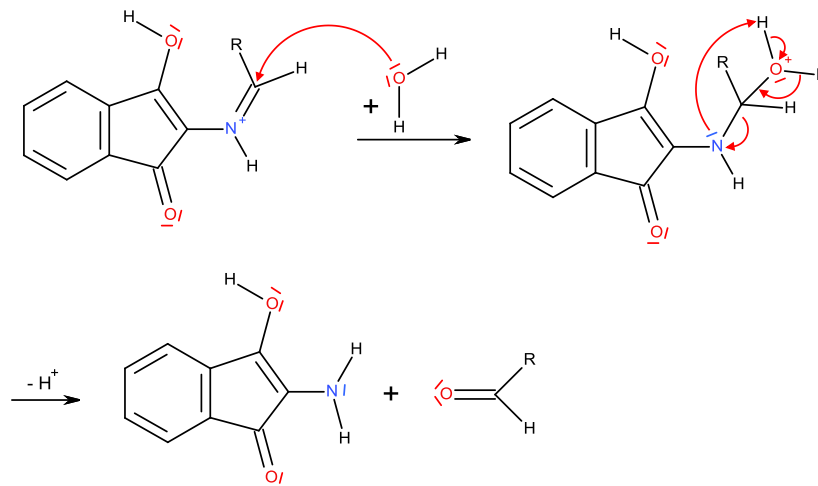


Abb. 11: Bildung eines Imins und eines Protons.

Das gebildete Amin kann nun mit Ninhydrin in einer Kondensationsreaktion zum Chromophor reagieren.

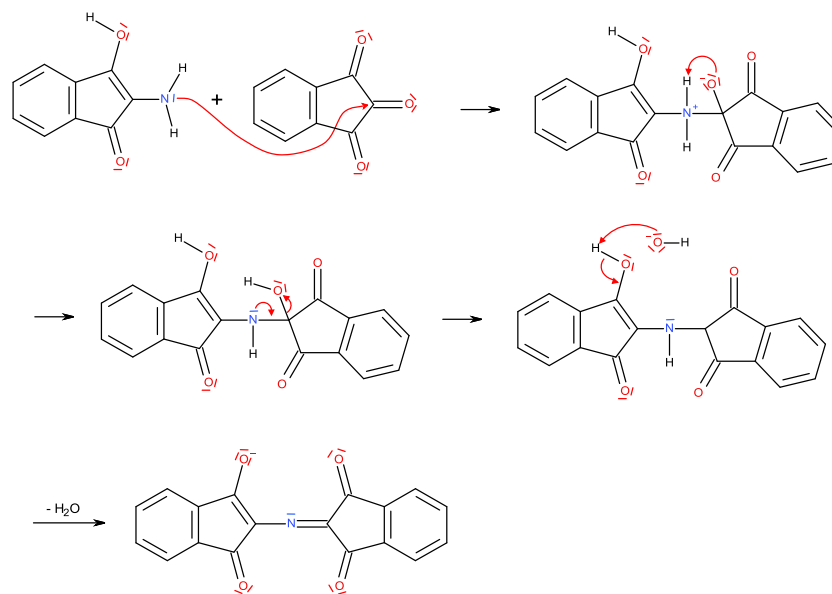


Abb. 12: Bildung des Chromophors.

Die violette Färbung, wie sie im Chromatogramm oder in der Ninhydrinreaktion im Reagenzglas zu sehen war, ist demzufolge ein Nachweis für „freie“ Aminosäuren, die über eine primäre Aminogruppe verfügen (z.B. im Versuch: Glycin, Alanin u. Prolin).

Sind Aminosäuren über Peptidbindungen miteinander verknüpft, liegen sekundäre Aminogruppen vor, die nicht mit Ninhydrin in Reaktion treten (ergo: keine violette Färbung).

Gelatine

Gelatine besteht zu einem großen Teil aus dem sog. Kollagen. Letzteres ist ein Eiweiß, das v.a. in tierischem Gewebe vorkommt und sich durch seine helikale Form auszeichnet. (V.a. die helikale Tertiär- und Quartärstruktur sind für Kollagen charakteristisch.) Während des Erhitzens werden diese Strukturen aufgelöst (Denaturierung). Beim Abkühlen verknäulen sich die Stränge erneut und bilden so ein dreidimensionales Netz (siehe Abb. 13). Die auf diese Weise „neu geordnete“, gelartige Substanz wird als Gelatine bezeichnet.

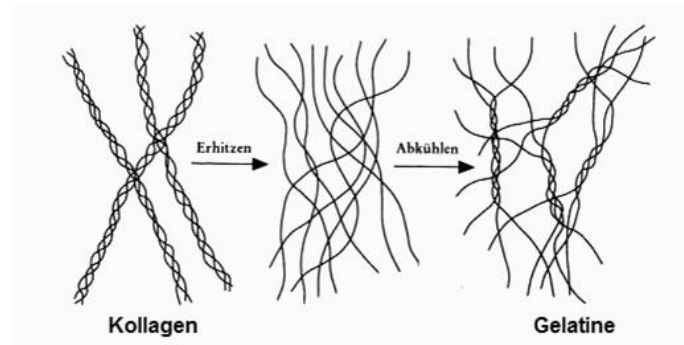


Abb. 13:^[5] Denaturierung und erneute Verknäulung zur Gelatine.

Die einzelnen Stränge, wie sie in Abb. 13 dargestellt sind, bestehen aus Aminosäuren, die durch Peptidbindungen zu Aminosäureketten verknüpft sind.

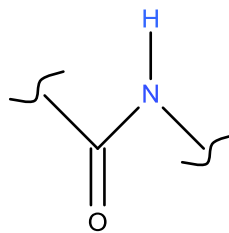


Abb. 14: Peptidbindung (blau = Aminogruppe)

Peptidbindungen entstehen z.B. durch Polykondensation zweier Aminosäuren. Dabei wird aus einem primären Amin ein sekundäres (siehe Abb. 14).

Im Chromatogramm (Teilversuch 3) ist oberhalb des Auftragungspunktes der Gelatinelösung keine Bande sichtbar (siehe Abb. 6: **6**), da sekundäre Amine nicht mit Ninhydrin in Reaktion treten können.

Im Fall des Gelatine-Hydrolysats sind jedoch mehrere Banden oberhalb des Auftragungspunktes im Chromatogramm zu sehen. Eine Bande liegt so z.B. auf der gleichen Höhe wie Glycin ($R_f = 0,34$ bzw. $0,35$), was darauf schließen lässt, dass eine der in Gelatine vorhandenen Aminosäuren Glycin ist, wohingegen Prolin und Alanin keine Aminosäuren der untersuchten Gelatine sein dürften.

Die Auftrennung und dadurch mögliche Aminosäuren-Identifizierung lässt darauf schließen, dass das zugeführte Fruchtbromelain eine peptidspaltende Wirkung haben muss. Dass es

sich bei den Banden oberhalb des Auftragungspunktes des Gelatinehydrolysats nicht um die Auftragung des Fruchtbromelains selbst handelt, wird im Vergleich mit dem Chromatogramm des reinen Fruchtbromelains ersichtlich (Vergleich: Abb. 6 - 4 und 5).

Fruchtbromelain

Fruchtbromelain ist, wie aus dem Versuch zu erschließen ist, tatsächlich ein Enzym, welches in der Lage ist Peptidbindungen zu spalten. Enzyme sind selbst Proteine, die aus verknüpften Aminosäuren bestehen (→ sekundäre Amine = keine Reaktion mit Ninhydrin). Aus diesem Grund fällt die Ninhydrin-Reaktion im Reagenzglas mit Fruchtbromelain negativ aus. (siehe Abb. 4 - 2)

Fehlerbetrachtung: In Abb. 4 - 2 ist eine leichte Violettfärbung zu erkennen, die nach der Theorie nicht auftreten dürfte. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass noch freie-Aminosäuren-haltige Ananasreste im Substrat vorhanden waren. Dies würde auch die chromatographische Aufspaltung reinen Fruchtbromelains in Abb. 6 - 5 erklären.

Fruchtbromelain findet u.a. aufgrund seiner peptidspaltenden Wirkung in der Medizin und Pharmazie Anwendung. So gilt es als erwiesen, dass Bromelain eine Rückbildung bösartiger Tumore bewirken kann und die Entstehung von Metastasen, insbesondere Lungenmetastasen, eindämmen kann.

Fruchtbromelain kann seine Wirkung jedoch kaum entfalten, wenn es auf oralem Weg eingenommen wird. Der optimale pH-Wert für Fruchtbromelain liegt zwar im sauren Bereich (pH = 5, wie im Versuch mit Essigsäurelösung eingestellt), Magensäure ist jedoch zu sauer, sodass das Enzym im Magen zerlegt bzw. hydrolysiert wird. Obwohl die Ananas (insbesondere der Strunk) einen besonders hohen Anteil an Fruchtbromelain enthält, ist es deshalb nicht möglich durch einen erhöhten Ananaskonsum das eigene Krebsrisiko zu mindern. Nur in Tabletten konzentriert und gepuffert (Säure-Puffer) kann es in den menschlichen Kreislauf gelangen.

Methodisch-Didaktische Analyse

1 Einordnung^[7]

Laut hessischem Lehrplan werden Aminosäuren, Polypeptide und Enzyme in der Qualifikationsphase 2 (zweites Halbjahr der 11. Klasse) durchgenommen. Die Ninhydrin-Reaktion kann dabei als klassischer, „quasi Pflichtnachweis“ von freien Aminosäuren betrachtet werden.

Die Betrachtung von Fruchtbromelain und dessen Einfluss auf Peptidbindungen setzt voraus, dass das Thema „Polypeptide“ bereits behandelt wurde. Zudem wäre es sinnvoll, wenn die Klasse bereits Kenntnisse über die allgemeinen Funktionsweisen von Enzymen (als Katalysator) besitzt.

Der Versuch eignet sich zur Vertiefung und Erweiterung des Themas Aminosäuren, ist jedoch nicht als Einstieg geeignet.

2 Aufwand

Die Durchführung zur Isolierung von Fruchtbromelain ist relativ schnell erledigt, lediglich das Warten nimmt eine gewisse Zeit in Anspruch. Die Ninhydrin-Reaktion im Reagenzglas lässt sich in ca. 15 Minuten durchführen. Lediglich für die Chromatographie (Ansetzen der Lösungen, Erwärmung im Wasserbad, Auftragen auf DC-Karte, Fließzeit, Trockenzeit) wird mehr Zeit benötigt.

Da bei der Chromatographie mit Methanol, Dichlormethan und Ammoniak gearbeitet wird, ist darauf zu achten, dass diese im Abzug durchgeführt wird.

Ansonsten sind für die Versuchsdurchführung keine größeren Apparaturen nötig und die Entsorgung nimmt kaum Zeit in Anspruch.

3 Durchführung

Zur Isolierung des Fruchtbromelains empfiehlt es sich, das Ananassaft-Aceton-Gemisch gemeinsam mit den Schülern anzusetzen und bis zur nächsten Unterrichtsstunde ruhen zu lassen. (Alternativ könnte der Lehrer das Gemisch schon vor der Unterrichtsstunde ansetzen.) Die Ninhydrin-Reaktion könnte dann in der nächsten Unterrichtsstunde durchgeführt werden. Die Schüler sollten dazu aufgefordert werden, ihre Beobachtungen zu notieren.

Da Methanol für Schülerversuche nicht zugelassen ist, könnte die Chromatographie nur als Demonstrationsversuch des Lehrers durchgeführt werden. Aufgrund des Zeitaufwandes bietet sich hier jedoch eher ein bereits vorhandenes Foto einer solchen Chromatographie zur Demonstration an.

4 **Fazit**

Die ersten zwei Teilversuche der Versuchsreihe sind aufgrund des guten Alltagsbezugs (Ananas), ungiftiger Chemikalien und guter Einordnung in den Lehrplan durchaus als Schülerversuche geeignet.

Die Chromatographie ist aufgrund der giftigen Chemikalien und des hohen zeitlichen Aufwands jedoch weder als Schüler- noch als Demonstrationsversuch des Lehrers geeignet.

Quellenverzeichnis

- [1] Versuchsquelle: Naturwissenschaften im Unterricht - Chemie
Daniela Roth, Olga Tribus und Katrin Sommer: *Fruchtsaft und Gummibärchen - Enzymatische Hydrolyse von Gelatine*. 2006. Heft Nr. 92, S. 22, 26.
- [2] GESTIS - Stoffdatenbank:
<http://biade.itrust.de/biade/lpext.dll?f=templates&fn=main-hit-h.htm&2.0>
(Zugriff am 6. Februar 2011)
- [3] HessGISS - GUV-Regel Umgang mit Gefahrenstoffen im Unterricht
Ausgabe Januar 1998 (Aktualisierte Fassung Juni 2004)
- [4] Reinhard Brückner: *Reaktionsmechanismen*, 3. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg, **2007**, S. 390 f.
- [5] <http://daten.didaktikchemie.uni-bayreuth.de/umat/gelatine/gelatine.htm>
Titel: Gelatine - ein vielseitiges Biopolymer
Urheber: Sandra Hollmann
Zugriff am: 7. Februar 2011
- [6] Irmey, György: *110 wirksame Behandlungsmöglichkeiten bei Krebs*, Haug-Verlag, Stuttgart, **2005**, S. 151.
- [7] Hessischer Lehrplan: Chemie. **2010**
http://www.hessen.de/irj/HKM_Internet?uid=3b43019a-8cc6-1811-f3ef-ef91921321b2
(Zugriff am 7. Februar 2011)