

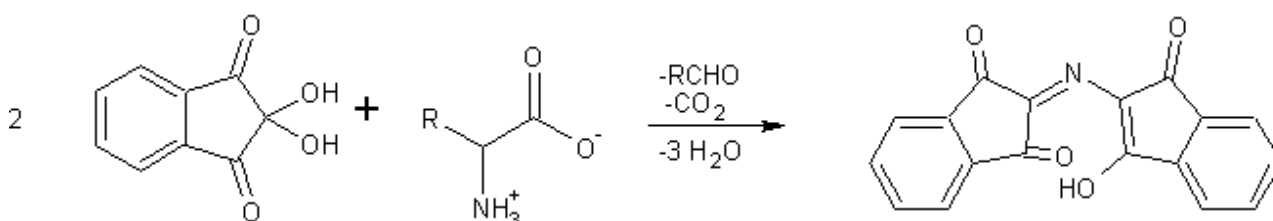
Gruppe 10:

Verbesserung: DC-Trennung von Aminosäuren

Reaktion:

Durch eine Dünnschichtchromatographie kann man Aminosäuren unterscheiden. Da die verschiedenen Aminosäuren unterschiedlich schnell steigen.

Ninhydrin-Nachweis für Aminosäuren:



Chemikalien:

Eingesetzte Stoffe	Gefahrensymbole	R- und S- Sätze	Einsatz in der Schule
Aceton	F, Xi	R 11-36-66-67 S 2-9-16-26	Sekundarstufe I
1-Butanol	Xn	R 10-22-37/38-41-67 S 2-7/9-37/39-46	Sekundarstufe I
Eisessig (Essigsäure (w = 99%))	C	R 10-35 S1/2-23-26-45	Sekundarstufe I
Dest. Wasser	-	-	Sekundarstufe I
Glycin	-	-	Sekundarstufe I
Cystein	-	-	Sekundarstufe I
Leucin	-	-	Sekundarstufe I
Methionin	-	-	Sekundarstufe I
Ninhydrin- Sprühreagenz (1,2,3- Indantrion-Hydrat)	Xi, F	R 11-36-67 S 7-16-23-24-26-51	Sekundarstufe I

Herstellung des Fließmittels:

Man gibt 35 mL Aceton, 35 mL 1-Butanol, 10 mL Eisessig und 20 mL Wasser zusammen und rührt gut um.

Herstellen der Aminosäurelösungen zum Beträufeln der DC-Karte:

Eine Spatelspitze der jeweiligen Aminosäure wird in etwas dest. Wasser gelöst.

Materialien:

DC-Kieselgelkarte, DC-Kammer, Mikropipetten, Bechergläser, Meßzylinder, Bleistift

Durchführung:

Man füllt zunächst das Laufmittel in die DC-Kammer, damit sich die Luft darin mit Dämpfen sättigt.

Nun zieht man mit einem Bleistift eine Linie ca. 2 cm entfernt vom unteren Rand der DC-Karte und markiert darauf im gleichen Abstand 4 Punkte, möglichst ohne dabei die Schicht zu verletzen.

Tragen Sie nun je 2 bis drei Tropfen der Aminosäure-Lösungen auf die Startpunkte auf, dabei ist jeweils eine saubere Mikropipette zu verwenden.

Trocknen sie die Startpunkte kurz mit einem heißen Fön und stellen sie die DC-Karte dann in die verschlossene DC-Kammer.

Die Karte wird der Kammer entnommen, wenn das Laufmittel fast den oberen Rand erreicht hat.

Trocknen sie die Karte im Abzug mit einem heißen Föhn und besprühen sie sie anschließend mit Ninhydrin. Legen sie die Platte bei 100 °C etwa 15 Minuten in den Trockenschrank.

Beobachtung:



Nach dem Auftragen der Aminosäuren und dem Einstellen der Karte in die Kammer kann man beobachten wie das Fließmittel immer weiter nach oben steigt. Es sind jedoch noch keine Punkte oder Farben erkennbar die auf die Anwesenheit von Aminosäuren schließen lassen (Foto A). Auch nach dem Trocknen und dem anschließenden Besprühen der Karte mit dem Ninhydrin-Sprühreagenz ist keine deutliche Farbveränderung zu erkennen lediglich die Eigenfarbe des Sprühreagenz ist etwas sichtbar (gelblich-orange).



Nach dem Trocknen bei 100 °C im Trockenschrank kann man jedoch eine deutliche Färbung erkennen (Foto B). Es werden 4 verschiedene Flecken unterschiedlicher Höhe und Farbe (rot-violett) sichtbar. Rf-Werte siehe Auswertung.

Entsorgung:

Restliches Fließmittel entweder zu Wiederverwendung in einer geschlossenen Flasche aufbewahren oder in die organischen Fließmittelabfälle entsorgen.

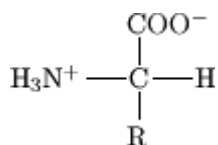
Die trockene DC-Karte nach dem Auswerten in die Feststofftonne geben.

Fachliche Analyse:

Allgemeines zum Thema Aminosäuren:

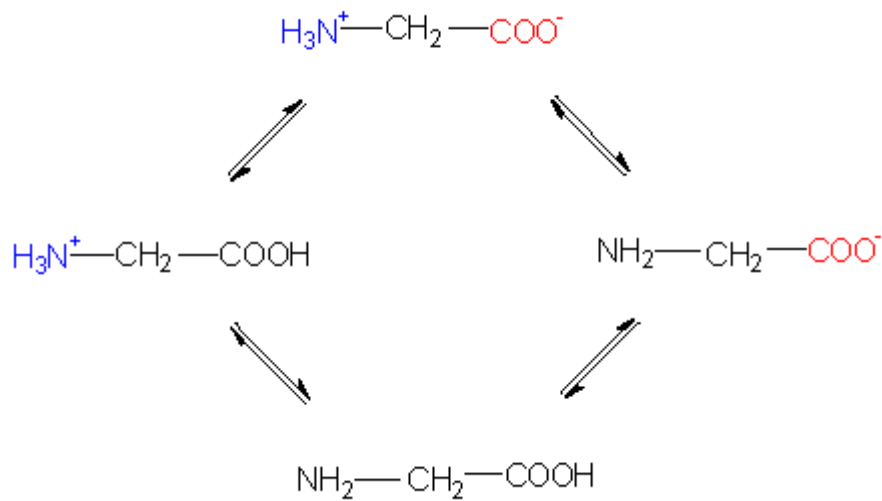
Aminosäuren sind die Bausteine der Proteine (Eiweiße). In der Natur kommen etwa zwanzig Aminosäuren vor. Davon kann der Mensch nur zehn selber aufbauen, die Übrigen muss er mit der Nahrung aufnehmen (essentielle Aminosäuren).

Aminosäuren enthalten neben der Carboxylgruppe eine Aminogruppe. Bei den natürlich vorkommenden Aminosäuren befindet sich eine Aminogruppe am C_{alpha}-Kohlenstoff neben der Carboxylgruppe, daneben ein Wasserstoff-Atom und einen Rest R.



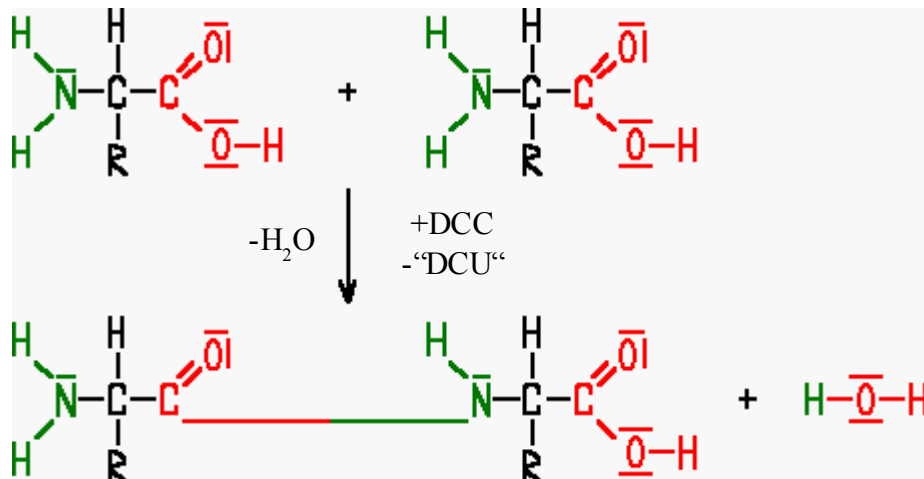
Die Formel macht deutlich, dass es sich bei den Aminosäuren um chirale Moleküle (optisch aktive Substanzen) handelt. Die überwiegende Mehrzahl der in der Natur vorkommenden und alle in Proteinen enthaltenen Aminosäuren gehören der L-Reihe an (bezogen auf C_{alpha}, andere Kohlenstoffatome können auch chiral sein!).

Sowohl die Carboxyl-, als auch die Aminogruppe sind ionisierbar, so dass man es mit Zwitterionen zu tun hat:

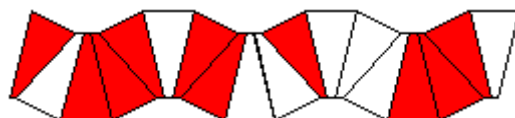


Die Standardamino­säuren werden nach ihren Resten in Gruppen aufgeteilt. Dabei kann eine Aminosäure in verschiedenen Gruppen gleichzeitig auftauchen. Es gibt die aliphatischen, aromatischen und polaren Aminosäuren.

Die verschiedenen Aminosäuren können sich in unendlich vielen Kombinationen kettenförmig zu großen Eiweiß-Molekülen (Proteine) verbinden. Entstehung einer solchen Peptidbindung aus zwei Aminosäuren zum Beispiel mit DCC als Aktivator:



Die Aminosäure-Ketten falten sich zu einer bestimmten, räumlichen Struktur. Diese sind spiralförmig aufgerollt:



Entscheidend für die Funktionsweise und Aufgabe eines Proteins im Organismus ist dabei, wie die Aminosäuren kombiniert und in welcher Reihenfolge sie verbunden sind. Dies ist für jedes einzelne Protein in dem zugehörigen Gen codiert.

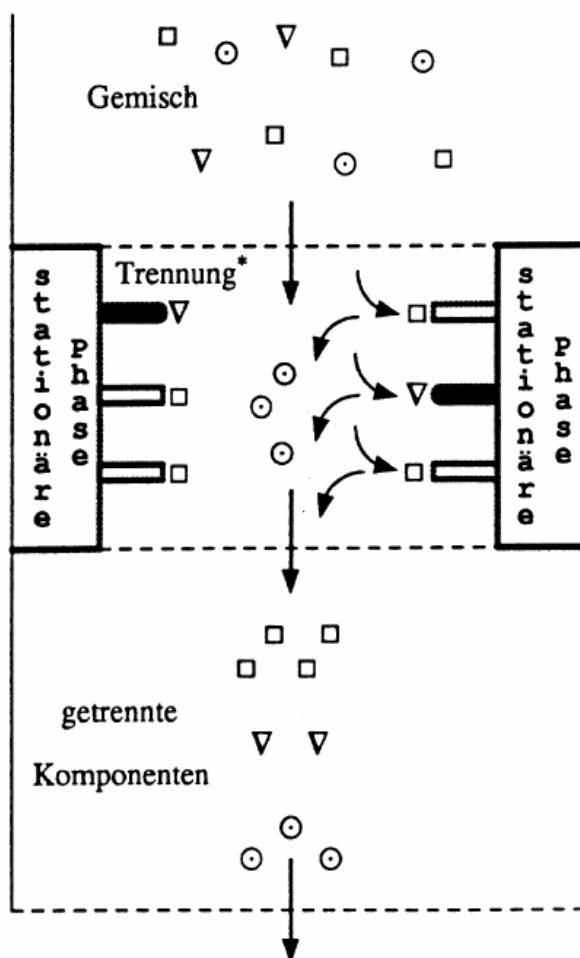
In jeweils drei "Buchstaben" (Basen) der DNA ist die "Bauanleitung" für eine Aminosäure verschlüsselt. Für alle zwanzig Aminosäuren gibt es ein entsprechendes, aus drei Basenpaaren bestehendes Code-Wort (auch "Codon" genannt).

Allgemeines zum Thema Chromatographie:

Chromatographie ist eine physikalisch-chemische Trennmethode zur Trennung flüssiger und gasförmiger Stoffgemische.

Dabei wird das Gemisch mit Hilfe einer Flüssigkeit oder eines Gases - der beweglichen oder mobilen Phase - an einem festen oder flüssigen Stoff von großer Oberfläche - der stationären Phase - vorbeigeführt. Die einzelnen Substanzen werden von der stationären Phase in unterschiedlichem Ausmaß zurückgehalten aufgrund der Prinzipien Adsorption und Verteilung

Schema chromatographischer Verfahren



1. Adsorption

Bei der Adsorption werden Gase oder gelöste Stoffe auf der Oberfläche eines Feststoffes reversibel angelagert (Van-der-Waals-Kräfte, Dipol-Dipol-Wechselwirkungen, Wasserstoffbrücken-Bindungen).

2. Verteilung:

Bei der Verteilung zwischen zwei Phasen spielt die unterschiedliche Löslichkeit eines Stoffes in zwei miteinander nicht oder nur beschränkt mischbaren Lösungsmitteln eine Rolle.

Die Wanderungsgeschwindigkeiten der Stoffe hängen daher von ihren Verteilungskoeffizienten ab. Je besser sich ein Stoff in der mobilen Phase löst, desto schneller wandert er.

Je nachdem, welchen Aggregatzustand beide Phasen besitzen, unterscheidet man verschiedene Chromatographie-Verfahren. Nach der Art der Ausführung unterscheidet man Papier-, Dünnschicht-, Säulen- und Gas-Chromatographie.

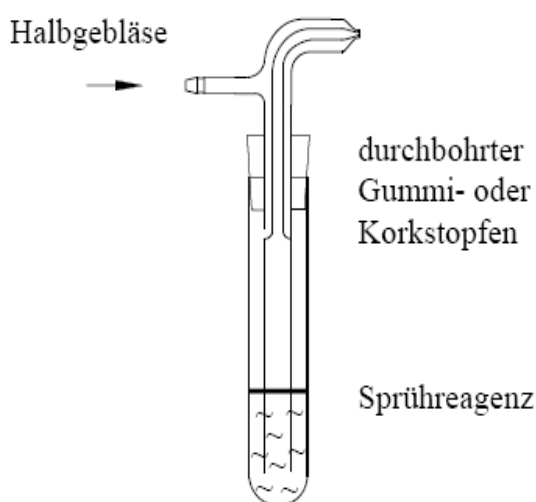
Allgemeines zum Thema Dünnschichtchromatographie:

Die Dünnschicht-Chromatographie (DC) ist heute eine sehr häufig angewandte chromatographische Analysenmethode. Da sie viele Vorteile hat:

- Der apparative Aufwand ist gering.
- Die Trennleistung steht der aufwendigeren chromatographischen Methoden nur wenig nach.
- Bei der Dünnschicht-Chromatographie lassen sich noch Mengen < 1 mg trennen. Die Nachweisgrenze einer Substanz beträgt 5 – 50 μg .
- Die Entwicklungszeit für ein Dünnschicht-Chromatogramm ist kurz (ca. 1 h).
- Funktionelle Gruppen lassen sich auf der Dünnschicht-Platte mit spezifischen Sprühreagenzien nachweisen.

Bei der Dünnschicht-Chromatographie ist die stationäre Phase meistens Kieselgel oder Aluminiumoxid und als dünne Schicht auf einer Aluminiumfolie aufgetragen. Für sehr polare Verbindungen verwendet man mikrokristalline Cellulose auf einer Plastikfolie oder einer Glasplatte.

Sprühreagenzien:



Eine oft angewandte Methode, die farblose Substanzen auf dem Chromatogramm sichtbar macht und gleichzeitig Substanzklassen, funktionelle Gruppen oder bestimmte Substanzen nachzuweisen erlaubt, ist das Aufsprühen von Reagenzlösungen. Dafür verwendet man sog. "Zerstäuber". Gut eignen sich käufliche Sprühdosen mit angehängtem Behälter für Anfärbe-Reagenzien. Das Aufsprühen muss in sehr feiner Verteilung erfolgen (Sprühen aus 20 – 30 cm

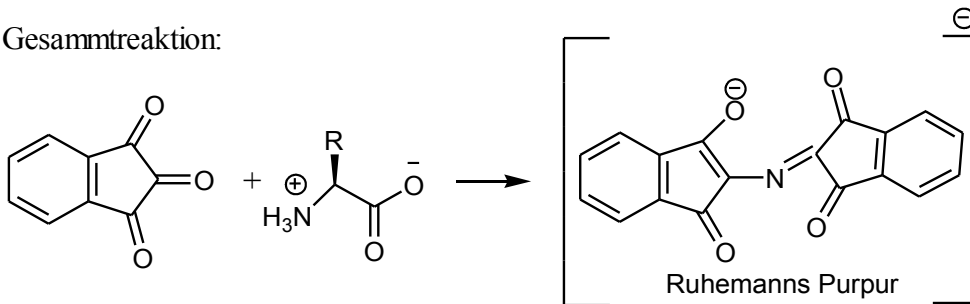
Entfernung), da zu starkes Besprühen die Substanzflecken verwäscht.

Zur Reaktion mit dem Sprühreagenz:

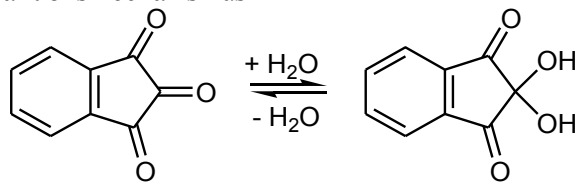
Die Wanderungsstrecke gefärbter Substanzen lässt sich direkt ablesen, während ungefärbte Substanzen erst durch spezielle Färbeverfahren sichtbar gemacht werden müssen. Die Ninhydrin-

Reaktion ist der klassische Nachweis von Aminosäuren und Proteinen. Proteine und Aminosäuren werden also üblicherweise durch das Besprühen der Dünnschichtplatten mit Ninhydrin angefärbt und somit visualisiert werden. Ninhydrin reagiert mit α -Aminosäuren nach folgender Reaktion:

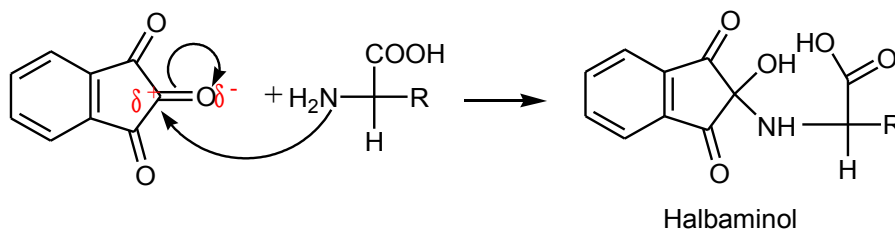
Gesamtreaktion:



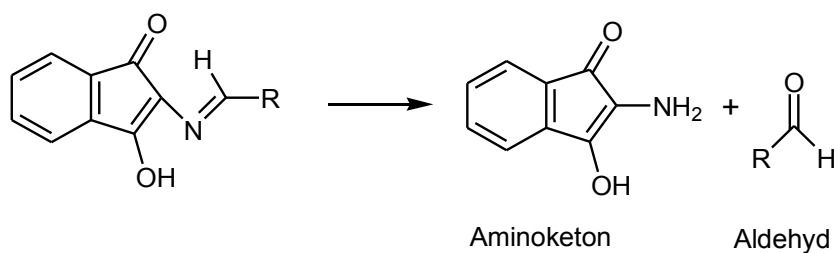
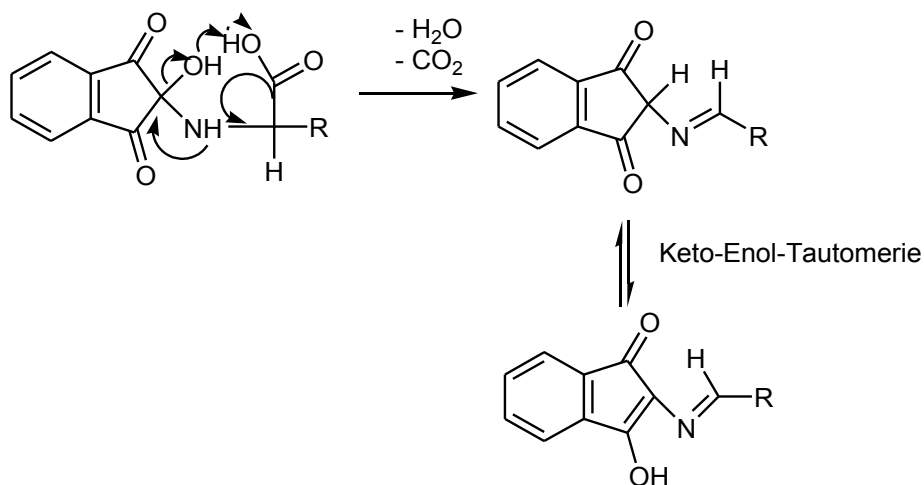
Reaktionsmechanismus

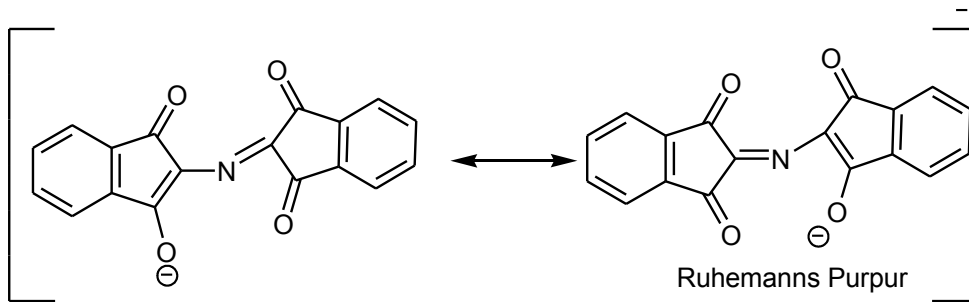
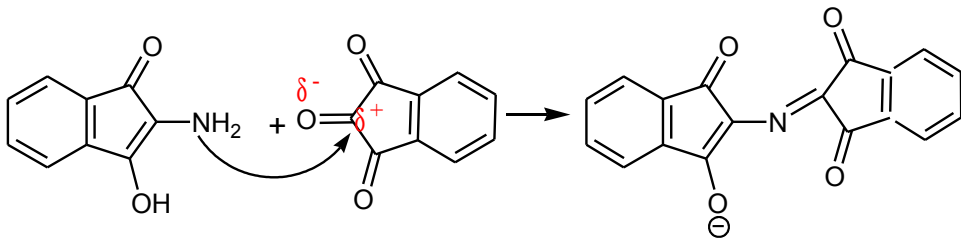


Indan-1,2,3-trion



Halbaminol



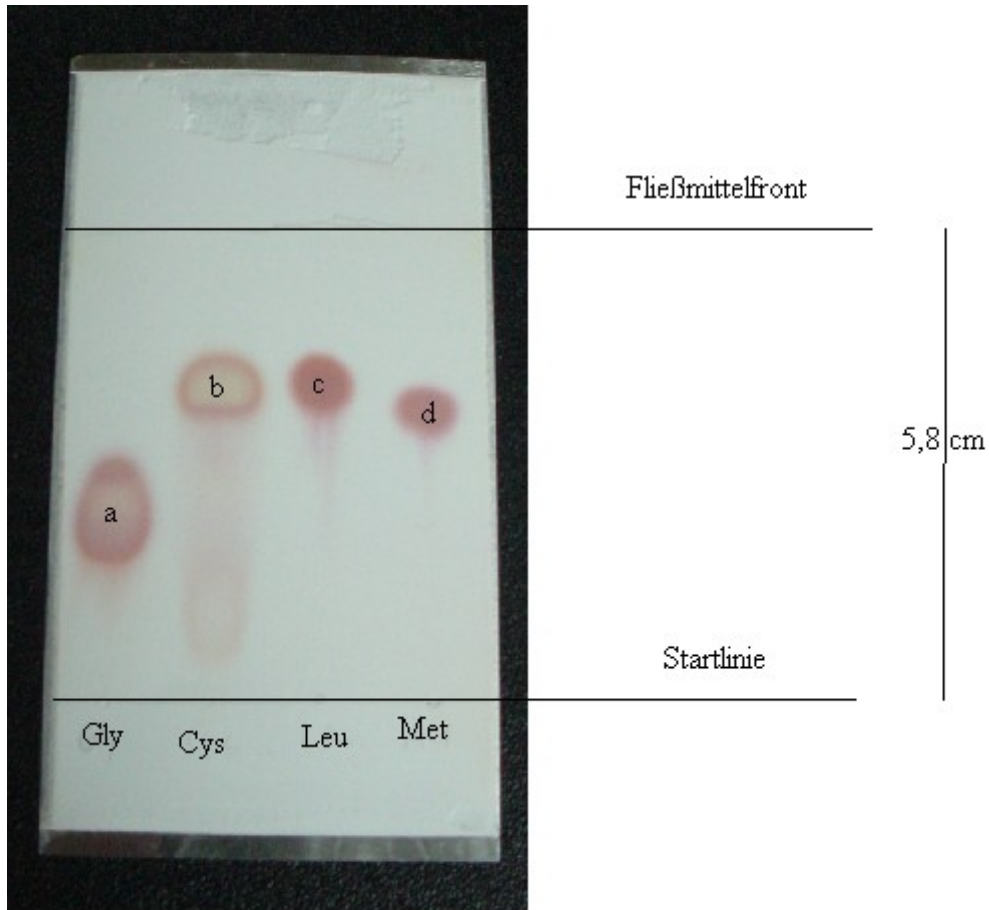


[Quelle: Experimentalvortrag: Aminosäuren und Proteine; Anke Schleipen]

Die entstandene Verbindung ist wegen der Mesomerie unter der Beteiligung der Wasserstoffbrückenbindung innerhalb des Systems konjugierter Doppelbindungen blau-violett gefärbt.

Die Ninhydrin-Reaktion findet auch in der Forensik Anwendung: so können beispielsweise Fingerabdrücke auf Papier durch Besprühen mit Ninhydrin sichtbar gemacht werden - hier reagieren die Aminosäuren im Hautschweiß mit dem Reagenz.

Auswertung der DC-Karte:



Zur Beschreibung des Laufverhaltens der Aminosäuren können die R_f-Werte (relate to front) herangezogen werden: Das chromatographische Verhalten einer Substanz wird durch den R_f-Wert beschrieben, der wie folgt berechnet wird:

$$R_f = \text{Wanderungsstrecke der Substanz} / \text{Wanderungsstrecke des Laufmittels}$$

$$= \text{Entfernung Startpunkt bis Fleckmittelpunkt} / \text{Entfernung Startpunkt bis Fließmittelfront} = S/F$$

Der R_f-Wert hängt von der Art des Dünnschichtmaterials und dem verwendeten Laufmittel ab.

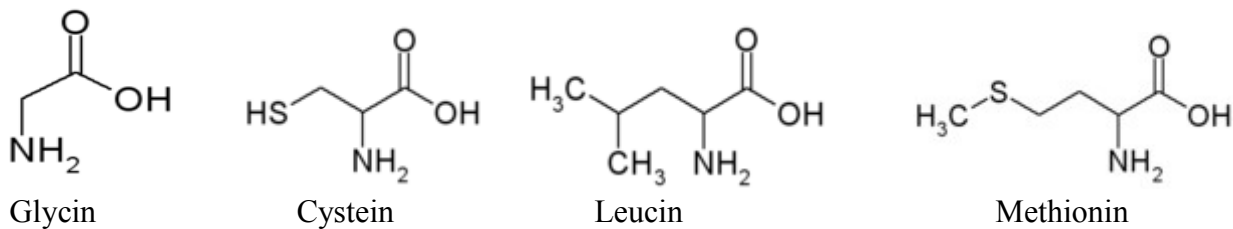
In unserem Fall ergeben sich nun folgende R_f-Werte:

Aminosäure	Entfernung Startpunkt bis Fleckmittelpunkt (in cm)	Entfernung Startpunkt bis Fließmittelfront (in cm)	R _f -Wert
Gly	2,2	5,8	0,38
Cys	3,8	5,8	0,65
Leu	3,85	5,8	0,66
Met	3,45	5,8	0,59

Hätte man also ein Gemisch mehrerer Aminosäuren mitlaufen lassen, so hätte man die Rf-Werte vergleichen können und müsste nicht mit Augenmaß angeben welcher Fleck welchem ähnelt. Man kann durch dieses Vergleichen der Rf-Werte relativ genau sagen um welche Aminosäuren es sich in Gemischen handelt.

Der Rf-Wert kennzeichnet zudem die Wanderungsgeschwindigkeit der eingesetzten Stoffe, in unserem Fall waren also Cystein und Leucin deutlich schneller als Methionin und Glycin war relativ langsam.

Betrachtet man die Strukturen der Moleküle so wird klar warum.



Da die hier verwendete DC-Karte scheinbar unpolarer als das vorwiegend polare Laufmittel (Aceton, Wasser etc.) ist, steigen die polaren Aminosäuren (wie z. B. Methionin und Cystein), da sie kaum an der unpolareren stationären Phase fixiert werden, sondern bleiben eher im Laufmittel gelöst und werden deshalb mit dem Laufmittelstrom weiter transportiert, während die unpolareren Aminosäuren (z. B. Glycin) durch Wechselwirkung mit der unpolaren stationären Phase festgehalten werden. Dem widerspricht jedoch das die ebenfalls unpolarere Aminosäure Leucin ebenfalls mit hochwandert.

Methodisch- Didaktische Analyse:

Der zeitliche Aufwand für diesen Versuch ist relativ gering. Die Nachbereitung ist wegen der einfachen Entsorgung und der leichten Reinigung der Glasgeräte recht gering, die Durchführung hingegen dauert etwas länger, da das Durchlaufen des Fließmittels ca. 1 Stunde dauert. Es empfiehlt sich also einen solchen Versuch in einer Doppelstunde durchzuführen, da man dann die DC-Kammer zu Beginn der Stunden befüllen und gegen Ende auswerten kann. Die Vorbereitung beinhaltet zwar das Herstellen des Laufmittels, dies ist jedoch völlig unkompliziert und kann auch einige Zeit vorher geschehen. Es empfiehlt sich auch aus finanzieller Sicht das übrig gebliebene Laufmittel aufzubewahren da man es mehrfach verwenden kann. Ansonsten ist der finanzielle Aufwand zu mindestens von Seiten der Chemikalien eher gering. Sollte man den Versuch jedoch als Schülerversuch durchführen wollen, so sollte man bedenken, dass nicht an jeder Schule eine solch große Anzahl an DC-Kammern vorhanden ist. Und die Anschaffung dann recht teuer werden könnte. Der restliche apparative Aufwand hält sich jedoch in Grenzen, falls an der Schule ein

Trockenschrank zur Verfügung steht.

Der methodische Wert dieses Versuches ist sehr groß, da die Schüler bei diesem Versuch nicht nur etwas zum Thema Aminosäuren, sondern vor allem etwas über die Methode der Chromatographie und deren Prinzip lernen. Da der Versuch sehr gut gelingt und sehr anschaulich ist kann man eine solche Chromatographie sehr gut in der Schule durchführen. Es empfiehlt sich jedoch das die Schüler verschiedene Gemische von Aminosäuren trennen und mit einer etwas größeren DC-Karte und somit mehr Aminosäuren arbeiten können, so lernen sie besser wofür dieser Versuch notwendig und wieso das saubere Arbeiten und die Berechnung der Rf-Werte so wichtig ist.

Die didaktische Aussage des Versuches ist es das die Schüler wichtige Trennungsv erfahren für Aminosäuren kennen lernen. Der Effekt der Trennung ist aufgrund der Farbigkeit sehr gut zu erkennen und aus diesem Grund für den Schüler leicht zu verstehen. Anhand dieses Versuches kann man wichtige Begriffe erarbeiten wie polare, unpolare Aminosäuren, den Aufbau der Aminosäuren, den Verteilungskoeffizient, das Prinzip der Verteilung und der Adsorption und das daraus resultierende Prinzip der Chromatographie.

Da der Schwerpunkt dieses Versuches bei der Methodenkompetenz der Schüler liegt sollte es sich bei diesem Versuch im besten Falle auch um einen Schülerversuch handeln. Dies ist auch aus dem Grund sehr ratsam, da man auch aus den Fehlern von schlecht gemachten Chromatogrammen viel lernen kann. Die Schüler können also so ihre Chromatogramme vergleichen und daraus lernen. Für die Durchführung als Schülerversuch spricht auch die Ungefährlichkeit der eingesetzten Substanzen, welche laut Soester-Liste alle für den Einsatz bei Schülerversuchen ab der Sekundarstufe I erlaubt sind.

Am besten eignet sich dieser Versuch in der Jahrgangsstufe 11 (sowohl für den Grundkurs wie auch den Leistungskurs) zum Thema Aminosäuren, Peptide und Polypeptide welche man laut dem neuen G8 Lehrplan gleich nach den Kohlenhydraten zum Oberthema technisch und biologisch wichtige Kohlenstoffverbindungen bearbeiten sollte.

Der Versuch ist für diese Jahrgangsstufe außerdem sehr geeignet, da nach dem neuen hessischen Lehrplan in der 11 Klasse eigenständiges Planen und das durchführen und Auswerten von Experimenten als wichtige Arbeitsmethoden auf dem Plan stehen sollten und sich die Dünnschichtchromatographie als eine wichtige Verfahrenstechnik in der Chemie dafür sehr gut eignet. Außerdem kann man anhand dieses Versuches sehr gut auf die Struktureigenschaften dieses Versuches eingehen.

Fazit: Nach der kleinen Veränderung in der Durchführung (mehr Aminosäuren und das Trennen eines Aminosäuregemisches handelt es sich um einen methodisch und didaktisch sehr wertvollen Versuch (besonders geeignet für die Jahrgangsstufe 11).

Literatur:

- Chemie heute, Sekundarstufe II; M.Jäckel; Schroedel Schulbuchverlag; 1992
- <http://www.seilnacht.com/referate/ernaehr.htm>
- <http://de.wikipedia.org>
- <http://www-organik.chemie.uni-wuerzburg.de>
- <http://www.chemgapedia.de>
- http://www.chemiedidaktik.uni-wuppertal.de/alte_seite_du/material/milch/milcheiweiss/aminosauren.pdf
- Chemie, Basiswissen der Chemie; Achte Auflage, Charles E.Mortimer, Ulrich Müller; Thieme; Stuttgart 2003
- Quelle: Experimentalvortrag: Aminosäuren und Proteine; Anke Schleipen