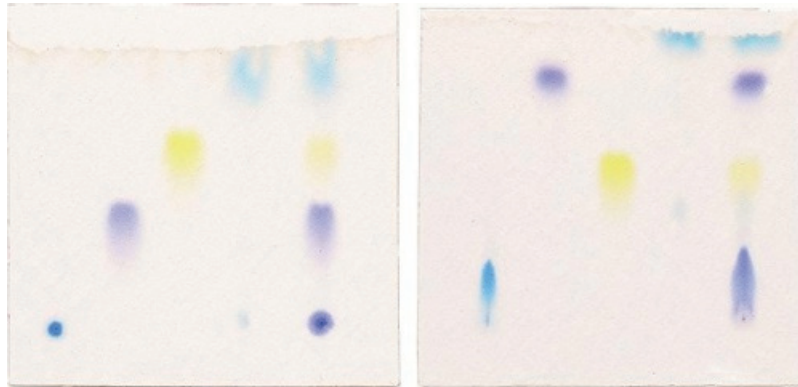


Betriebsanleitung

BAD_1093148

Prinzipien und praktische Anwendungen der
Dünnschichtchromatographie

EINLEITUNG

Inhalte und Lernziele

- die Verteilung von Farbstoffen mithilfe einer vorgegebenen Excel-Datei bei unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten simulieren und die Auswirkungen an der Excel-Grafik ablesen.
- an einigen Beispielen die zugrunde liegende Excel-Rechenanweisungen zur Konzentrationsberechnung nachvollziehen.
- experimentell sauber arbeiten und Versuchsprotokolle führen können.
- in einem Versuch zur Trennung von Farbstoffgemischen erleben, dass die Dünnschichtchromatographie überraschende Ergebnisse liefert.

Im Kit enthaltene Komponenten:

Farbstoffen

A	Brilliant-Blau
B	Blau-Rot
C	Gelb
D	Hellblau
E	Mischung der Farbstoffe A-D

Lösungen

F	Kaliumacetatlösung (10x konzentriert)
G	Natriumcitrat gelöst in Isopropanol
1x	Celluloseplatten für die DC 10x20cm
20x	Kapillare Mikroliterpipetten aus Glas – Volumen 5µl

Erforderliches Zubehör (nicht im Kit enthalten):

250ml Bechergläser
Lineale
Bleistifte
Pipetten (5ml oder 10ml)
Pipettierhelfer oder Peleusbälle

Die Dünnschichtchromatografie ist ein chemisches / biochemisches Trennverfahren zur Analyse von molekularen Mischungen. Sie wird außerdem verwendet um Mischungen anorganischer Ionen und biochemische Bestandteile (wie beispielsweise Proteine, Fette, Zucker, Aminosäuren und Pigmente) zu trennen. Das Wort „Chromatographie“ (aus dem Griechischen) bedeutet „mit Farbe schreiben“ (chroma = Farbe, graphein = schreiben). In der Chemie fasst man unter diesem Begriff keine Maltechnik, sondern eine Reihe von Techniken zur analytischen Trennung von Stoffen zusammen: Papier-, Dünnschicht-, Gaschromatographie und noch weitere moderne Methoden. Die Chromatographie war und ist für die Naturstoff- und Biochemie von sehr großer Bedeutung, da man mit ihr Stoffgemische sehr leicht trennen und die Bestandteile identifizieren kann. Erwin Chargaff hat zum Beispiel mithilfe chromatographischer Techniken einen wesentlichen Beitrag zur Strukturaufklärung der DNA geleistet. In modernen Labors werden Chromatographien automatisiert durchgeführt und per Computer ausgewertet.

Erstmals wurde die Chromatografie vom russischen Botaniker Tswett 1903 zur Trennung von Blattfarbstoffen angewendet (chroma, gr. = Farbe). In den 30ern Jahren wurde diese Methode ausschließlich zur Trennung von Pigmenten verwendet. Erst ab 1940 fing man an Papierstreifen oder Kieselgelstreifen zu verwenden, um wasserlösliche Substanzen wie Aminosäuren und Zucker aufzutrennen. Heute verwendet man fast ausschließlich Plättchen aus Kunststoff, Aluminium oder Glas, die mit einer dünnen Schicht eines sehr feinkörnigen Stoffes (z.B. Cellulose- oder Aluminiumoxidpulver) beschichtet sind. Die eigentliche Oberfläche zeigt dabei Ladungen, die es ermöglicht polare Substanzen sehr einfach aufzutrennen.

Diese Schicht bezeichnet man als stationäre Phase. Das zu trennende Gemisch wird nun in der Nähe des unteren Randes des Plättchens punktförmig aufgetragen. Anschließend wird das Plättchen in ein Gefäß gestellt, das eine geringe Menge Flüssigkeit enthält. Diese Flüssigkeit bezeichnet man als Fließmittel oder mobile Phase. Das



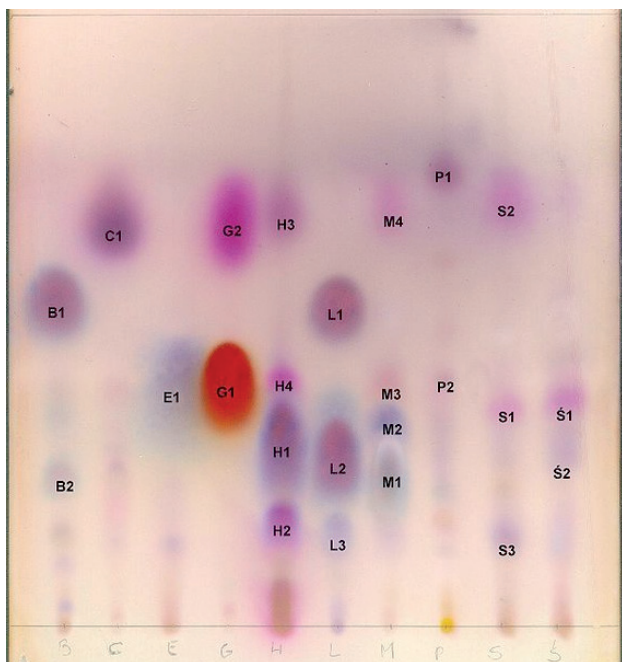
CONATEX-DIDACTIC Lehrmittel GmbH - Rombachstr. 65 - D-66539 Neunkirchen
Kundenservice (kostenfrei): 00800 0266 2839 (D, CH, A, L) oder 0049 (0) 6821 - 94 11-0

www.conatex.com - email: didactic@conatex.com

Weitergabe und Vervielfältigung dieser Publikation oder von Teilen daraus sind ohne die ausdrückliche schriftliche Genehmigung durch die Conatex Didactic Lehrmittel GmbH nicht gestattet.

Fließmittel steigt nun durch die Kapillarkraft in der Schicht hoch. Sobald die Flüssigkeit den Gemischfleck erreicht hat, sind die Teilchen des Gemisches der Anziehungskraft der stationären Phase einerseits und der Anziehungskraft der mobilen Phase andererseits ausgesetzt. Je nach Kräfteverhältnis bleibt ein Teilchen eher am Startpunkt oder es wandert eher mit der mobilen Phase nach oben.

Die Kräfte und somit das Wanderverhalten eines Teilchens hängen sowohl von der Art des Schichtmaterials und des Fließmittels, als auch von der Art des Teilchens ab. In den meisten Fällen lassen sich Schichtmaterialien und Fließmittelgemische so kombinieren, dass die verschiedenen Teilchensorten eines Gemisches verschieden weit wandern, sodass sie sich voneinander trennen lassen.



Dieses Bild (Quelle: Wikipedia) zeigt den Scan einer Kieselgelplatte (Silica gel G) auf der 10 Öle mit einer Toluol / Ethylacetat-haltigen (Verhältnis 93:7 v/v) mobilen Phase entwickelt wurden. Zuletzt wurde die Platte mit in Schwefelsäure gelöstem Vanillin besprüht und getrocknet.

Von links nach rechts wurden folgende Öle aufgetrennt:

B	Bergamotte
C	Zeder
E	Eukalyptus
G	Gewürznelke
H	Cajeput
L	Lavendel
M	Minze
P	Orange
S	Pinie
S	Fichte

Dabei wurden folgende Komponenten sicher identifiziert

B1 und L1: Linalol
B2 und L2: Linalyl-Acetat

E1: Cineol
G1: Eugenol
G2: Carophyllene

Komponenten, die nicht ganz sicher bestimmt werden konnten:

C1: Cedrol
M3: Menthol
P1: Limonene

Phasen der Chromatographie

Feste Phase

Bei der Dünnschicht-Chromatographie benutzt man eine feste Phase auf einem Trägermaterial (Alufolie, Plastikfolie oder Glasplatte), an der die zu untersuchenden Stoffe getrennt werden. Die feste Phase kann zum Beispiel Cellulose, Aluminiumoxid oder Kieselgel sein. Sie ist sehr fein und gleichmäßig auf dem Trägermaterial verteilt.

Mobile Phase: Das Laufmittel

Die flüssige Phase bewegt sich durch Kapillarkräfte durch die feste Phase und transportiert dabei die Stoffe des Substanzgemisches.

Auftragung der Substanzproben

Auf die Dünnschichtchromatographie-Folie trägt man mithilfe einer Kapillare die Proben punktförmig entlang einer Startlinie auf und lässt sie eintrocknen.

Die Trennung der Substanzen

Nach dem Auftragen der Proben stellt man die Folie aufrecht in einen Chromatographie-Tank, der gerade soviel von der mobilen (flüssigen) Phase enthält, dass die Startlinie mit den aufgetragenen Proben einen halben Zentimeter oberhalb des Flüssigkeitsspiegels liegt. Durch Kapillarkräfte beginnt die mobile Phase durch die feste Phase zu wandern und zieht dabei die Substanzproben mit sich. Während der Chromatographie stellt sich entlang der Laufstrecke ständig ein neues Gleichgewicht ein zwischen der Lösung des Stoffes (in der mobilen Phase) und der Adsorption des Stoffes (an die stationäre Phase). Nimmt man die Folie aus dem Gefäß und trocknet sie, so befindet sich der „Fleck“ jeder Komponente der Probe auf einer ganz bestimmten Höhe des Chromatogramms (wobei sich die Farbstoffmengen der mobilen und der stationären Phase nach der Trocknung der Folie an jedem Ort jeweils addieren). Die Trennung kommt dadurch zustande, dass sich die Substanzen

- ▣ verschieden gut in der mobilen Phase lösen und weitertransportiert werden.
- ▣ verschieden fest an die feste Phase angelagert (Adsorption).

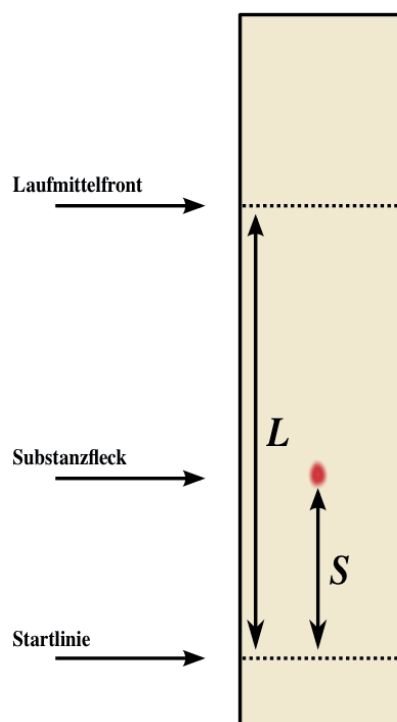
Der Rf-Wert (Bildquelle: Wiki)

Je besser sich eine Substanz im wandernden Lösungsmittel löst und je kleiner ihre Affinität zum Trägermaterial ist, desto schneller und weiter wird sie mit dem Lösungsmittel wandern. Daraus ergibt sich als eine charakteristische Größe der Rf-Wert („Ratio of front“) der Substanz (Wanderungsstrecke der Substanz / gesamte Wanderungsstrecke des Lösungsmittels). Der maximale Rf-Wert beträgt so



CONATEX-DIDACTIC Lehrmittel GmbH - Rombachstr. 65 - D-66539 Neunkirchen
Kundenservice (kostenfrei): 00800 0266 2839 (D, CH, A, L) oder 0049 (0) 6821 - 94 11-0
www.conatex.com - email: didactic@conatex.com

Weitergabe und Vervielfältigung dieser Publikation oder von Teilen daraus sind ohne die ausdrückliche schriftliche Genehmigung durch die Conatex Didactic Lehrmittel GmbH nicht gestattet.



mit 1, meist liegt er deutlich darunter. Er hängt von der chemischen Struktur der Substanz, vom Trägermaterial und vom Lösungsmittelgemisch ab (Kammersättigung und konstante Versuchstemperatur werden vorausgesetzt).

Jonas Hostettler vom Departement Chemie der Universität Basel hat ein kleines Simulationsprogramm entwickelt und für die Veröffentlichung zur Verfügung gestellt. Es eignet sich sehr gut als Ergänzung zu den eher trockenen Erklärungen der Vorgänge bei der multiplen Verteilung (Beamerpräsentation, Nutzung am heimischen Rechner oder im Computerraum) -- <http://www.chemie.unibas.ch/~huber/MVTutorial/index.html>

Experimenteller Ablauf

In diesem Experiment wird eine Mischung verschiedener Farbstoffe auf einer Celluloseplatte in zwei unterschiedlichen Lösungsmitteln getrennt. Es sollte daher bei jedem Experiment die Laufmittelfront der Platte maximal in der Hälfte enden. Anschließend stellt man die Platte auf den Kopf und startet das zweite Experiment – so hat man die zu vergleichenden Ergebnisse quasi gespiegelt auf einer Platte vorliegen und kann direkt vergleichen. Die zu trennenden Substanzen enthalten unterschiedliche Ladungen und polare Gruppen, unterschiedliches Molekulargewicht, sind verschieden geometrisch und die Position und Anzahl ihrer CC-Doppelbindungen unterscheiden sich ebenfalls.

Nach Durchführung des Experimentes sollte unbedingt die Laufmittelfront gekennzeichnet werden, um auch sicher den Rf-Wert bestimmen zu können.

Vorbereitungen

Zerteilen Sie die Platte mit einer spitzen Schere in acht gleiche Teile (5x5cm).

Lösen Sie den Kaliumacetatpuffer (10x): geben Sie auf 1ml Puffer je 9ml Wasser

Bereiten Sie pro Gruppe zwei Bechergläser vor, die mit F und G beschriftet sind.

Geben Sie in jedes F-Becherglas 4ml des Puffers F und in jedes G-Becherglas 4ml des Puffers G (gerade soviel, dass der Boden des Becherglases damit bedeckt ist.)



Laborsicherheit

An das Tragen von Laborkittel, Schutzbrille und Handschuhen sollte immer gedacht werden!

Genereller Hinweis zum Auftragen der Farbstoffe

Fasse die DC-Folie vorsichtig an, beschädige nicht die weiße Beschichtung mit deinen

Fingern oder durch Knicken! Zeichne - ohne den Belag zu beschädigen - vorsichtig eine Startlinie in 15 mm Höhe ein.

Tupfe nun die verschiedenen Farben mittels Kapillarpipette auf die Startlinie. Achte darauf, dass du nur jeweils einen möglichst kleinen Tupfer aufbringst, lasse ihn trocknen, dann bringst Du auf die gleiche Stelle die gleiche Farbe erneut kurz auf. Lieber pro Farbe mehrere kleine Flecke übereinander als einen Riesenfleck!

Jetzt kann's losgehen!

1. Du erhältst zwei DC-Platten, beschrifte eine mit F und eine mit G
2. Beginne auf der Platte F (nachdem Du die Startlinie mit Bleistift gezeichnet hast) mit dem Auftragen der Farben. Beginne mit B (Brilliant-Blau) auf der linken Seite.
3. Bevor Du von links nach rechts im Abstand 2 cm alle Farbstoffe auf der Startlinie aufträgst, mußt Du jeweils die Pipette gründlich mit Wasser spülen, da sich sonst die Farbpigmente der einzelnen Stoffe vermischen.
4. Trage nun 1µl C (Gelb) auf und spüle anschließend die Pipette
5. Jetzt ist 1µl D (Hellblau) an der Reihe – Pipette spülen nicht vergessen!
6. Zuletzt ist 1µl E (unbekannte Mischung) dran – Pipette spülen und das ganze Procedere mit der Platte G wiederholen.
7. Lass beide Platten 5min trocknen.

Wir beginnen die eigentliche Chromatographie:

1. Zur Entwicklung stellst Du nun die vorbereitete Platte in ein dicht abschließbares Gefäß, welches vorher mit der Lösung F (Kaliumacetat) soweit befüllt wurde, dass die Platte etwa bis zur halben Wegstrecke zwischen Unterkante der



CONATEX-DIDACTIC Lehrmittel GmbH - Rombachstr. 65 - D-66539 Neunkirchen
Kundenservice (kostenfrei): 00800 0266 2839 (D, CH, A, L) oder 0049 (0) 6821 - 94 11-0

www.conatex.com - email: didactic@conatex.com

Weitergabe und Vervielfältigung dieser Publikation oder von Teilen daraus sind ohne die ausdrückliche schriftliche Genehmigung durch die Conatex Didactic Lehrmittel GmbH nicht gestattet.

- Platte und Startpunktlinie benetzt wird.
- Die Startpunkte selbst sollen erst im Laufe der Kapillarenwanderung des Solvens mit Lösungsmittel benetzt werden.
 - Sofort nach dem Einstellen der Platte wird das Entwicklungsgefäß dicht verschlossen um eine Sättigung der Platte mit dem Lösungsmitteldampf zu erreichen (Kammersättigung). Auch wenn in Deinem Versuch die Kammer offen bleiben kann (!) – für eine richtige Chromatographie mit sensiblen Stoffen ist die Kammersättigung enorm wichtig um gute Ergebnisse zu erhalten.
 - Lass Deiner Chromatographie 12min Zeit – innerhalb dieser Zeit sollte die Platte allerdings nicht vollkommen vom Fließmittel benetzt werden (höchstens bis in die Hälfte laufen lassen).
 - Temperaturschwankungen während der Chromatographie sind zu vermeiden. Klimatisierte Räume sind ideal!
 - Nimm jetzt die Platten aus den Gefäßen und lass sie flach auf einem Stück Papier trocknen.
 - Berechne den Rf-Wert beider Platten.

Fragen:

- Unterscheiden sich die Rf-Werte der einzelnen Farbkomponenten je nachdem mit welchem Fließmittel sie getrennt wurden?
- Welche Farbstoffe sind eher in Fließmittel F, welche in G löslich?
- Welche Farbstoffe wurden am Besten in Fließmittel F, welche in G absorbiert?
- Nimm an, Du hättest ein Lösungsmittel mit einem höheren Anteil an Isopropanol als Fließmittel G – würde Farbstoff A besser oder schlechter darin gelöst werden als in F oder G?
- Wie kann man mittels TLC die Komponenten einer unbekannt Substanz-Mischung identifizieren?

Fragen + Antworten:

- Unterscheiden sich die Rf-Werte der einzelnen Farbkomponenten je nachdem mit welchem Fließmittel sie getrennt wurden?
Die Rf-Werte der beiden Chromatographie-Platten müssen sich unterscheiden, da sich der Rf-Wert aus der Distanz von Laufmittelfront und konkretem Spot des Farbstoffes berechnet.
- Welche Farbstoffe sind eher in Fließmittel F, welche in G löslich?
Die Farbstoffe C und D sind löslicher in F. Die Substanzen B und D eher löslich in G.
- Welche Farbstoffe wurden am Besten und welche am schlechtesten in Fließmittel F absorbiert?
Im Lösungsmittel F wird der Farbstoff A am Besten, D am schlechtesten absorbiert.
- Nimm an, Du hättest ein Lösungsmittel mit einem höheren Anteil an Isopropanol als Fließmittel G – würde Farbstoff A besser oder schlechter darin gelöst werden als in F oder G?
Der Farbstoff A würde schneller wandern, da er in der wässrigen Phase von Isopropanol des Lösungsmittels G stärker löslich ist. Lösungsmittel F enthält kein Isopropanol und deshalb würde der Farbstoff A hier auf der Startlinie (Rf=0) verweilen.
- Wie kann man mittels TLC die Komponenten einer unbekannt Substanz-Mischung identifizieren?
Man kann unbekannt Stoffe mit dem Trennverhalten bekannter Stoffe in verschiedenen Lösungsmitteln vergleichen und daraus Schlussfolgern, welche Eigenschaften zutreffen müssen. Vergleicht man die Rf-Werte, so können (sofern diese gleich sind) auch einzelne Komponenten identifiziert werden.

