

Stephanie [REDACTED]
BTA-UH 1
Gruppe A
Partner: Ljiljana [REDACTED]

Versuch vom 23.04.2002

„Blattpigmente“

(Absorptionspektrum)

Biochemisches Praktikum

Berufskolleg Kartäuserwall
Kartäuserwall 30, Köln

bei: Fr. Ulrike Schlicher

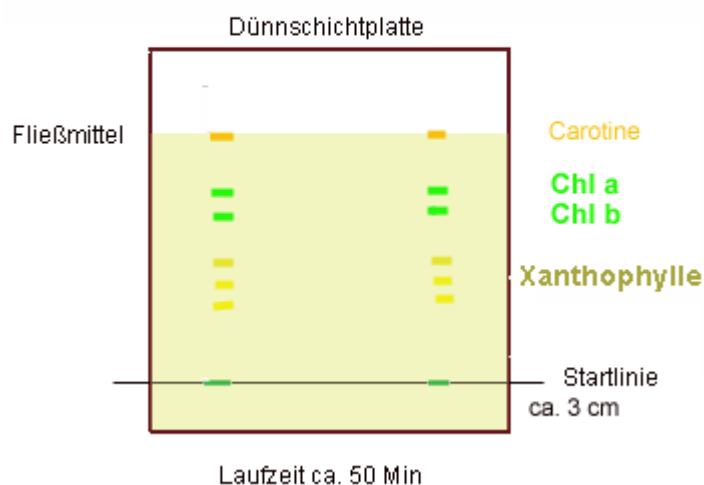
Untersuchung der Absorption der Pigmentfarbstoffe des Eibenblattes

Theorie / Prinzip des Versuchs

Die Blattpigmente dienen der Energiegewinnung der Pflanzen. Durch sie kann die Pflanze Licht bestimmter Wellenlängen absorbieren. Das Licht wird in der Photosynthese in Energie umgewandelt. Im folgenden Versuch wollen wir untersuchen, in wieweit die einzelnen Blattfarbstoffe das Licht absorbieren. Hierzu bedienen wir uns zur Auftrennung der Pigmente der **Dünnschicht-Chromatographie (DC)**:

Bei der DC wird ein Rohextrakt aus den Blättern = **mobile Phase** auf die **Startlinie** einer Kieselgel-Platte = **stationäre Phase** aufgetragen. Im Rohextrakt sind die Blattpigmente in einem geeigneten Lösungsmittel gelöst. Wir haben Aceton benutzt welches bewirkt, dass die Zellen aufplatzen und die Pigmente frei werden. Mit Hilfe eines **Laufmittels** werden die einzelnen Bestandteile aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften aufgetrennt, da sie unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeiten haben. Das Laufmittel saugt sich aufgrund der Kapillarität durch die stationäre Phase nach oben und führt die mobile Phase mit sich. Nach einiger Zeit liegen die Bestandteile als einzelne Banden auf der Platte vor. Man erhält ein **Chromatogramm**:

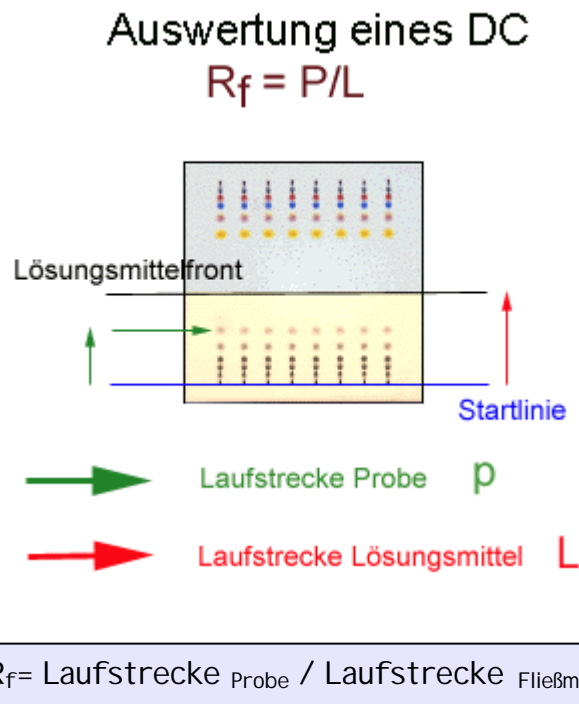
DC-Chromatographie Blattextrakt



DC funktioniert durch die Wechselwirkung von Adsorption und Verteilung. Die Auftrennung erfolgt nach unterschiedlicher Teilchengröße, Ladung oder Affinität zum Trägermaterial (also zur DC-Platte). Dabei ist zu beachten, dass sich Gleiches immer in gleichem löst! Das Ergebnis hängt vom Rohextrakt und der Wahl des Laufmittels ab. Wir haben ein wasserarmes, petroleumbenzinhaltiges und daher recht unpolares Laufmittel gewählt. Die Pigmente aus unserem Rohextrakt werden daher aufgrund verschiedener Polaritäten der Moleküle aufgetrennt: die unpolaren werden verteilt, die polaren haften mehr an der DC-Platte. Kieselgel besteht aus SiO_2 =

Quarzsand. Aufgrund seiner zahlreichen SiOH-Gruppen ist er sehr polar.

Das Ergebnis einer Dünnschicht-Chromatographie ist der **R_f-Wert**, der die Substanzen charakterisiert. Dies ist der Quotient aus der Laufstrecke der aufgetragenen Substanz und der Laufstrecke des Fließmittels (= **Laufmittelfront**):



Hierzu misst man die Strecke Startlinie-Probe und teilt diesen Wert durch die Strecke Startlinie-Laufmittelfront.

Nachdem die Pigmente mittels DC aufgetrennt sind, kann man sie einzeln weiter untersuchen. Wir wollen mit einem Photometer Absorptionsspektren erstellen. Ein Photometer ist ein optisches Messgerät. Wir haben mit einem UV/VIS-Spektrophotometer gearbeitet. Ein solches Photometer besitzt zwei Lampen: die eine erzeugt das Spektrum des UV-Lichtes (Deuteriumlampe), die andere erzeugt das Spektrum des sichtbaren Lichtes (Wolframlampe). Im Prinzip funktioniert ein Photometer wie folgt:

Die Strahlungsquelle, also die jeweilige Lampe erzeugt einen Lichtstrahl. Das Licht durchläuft einen Monochromator, in dem es in die Spektralfarben der unterschiedlichen Wellenlängen zerlegt wird. Es wird durch einen Spalt geschickt, der nur das Licht an der gerade eingestellten Wellenlänge passieren lässt. Dadurch wird das Licht monochrom = einfarbig. Dieses einfarbige Licht durchläuft nun die Proben und vergleicht sie mit dem Nullwert; im Einstrahlphotometer nacheinander, im Zweistrahlphotometer parallel. Der Nullwert ist der Referenzwert für die Messung. Es handelt sich i.d.R. um das Lösungsmittel oder den Puffer ohne den gelösten Stoff. Hinter den Proben befindet sich eine Photozelle, die die Intensität des Lichtes nach Durchtritt durch die Probe registriert. Das Signal wird noch verstärkt und von einem Anzeigegerät (Skala, Schreiber etc...) sichtbar gemacht. Es entsteht ein Spektrum aus dem man ablesen kann, in welchen Bereichen das Pigment Licht absorbiert.

Die Blattpigmente erscheinen uns grün und gelb. Dieser Effekt kommt zustande, da die Pigmente Licht der anderen Wellenlängen absorbieren und nur grünes Licht reflektieren. Das, was wir als Farbe empfinden, ist also nur ein Farbeindruck. Er kommt zustande, da wir eine Mischung der reflektieren Farben = Komplementärfarben wahrnehmen.

Material

Geräte: Zentrifugenröhrchen 25 ml von Schott / Duran
Ultra-Torrax TP 18/10 von IKA-Werk
Pasteurpipette
Messpipette 10 ml von Schott
Messpipette 1 ml von Schott
Messzylinder 100 ml approx. von Schott
Laufkammer
Omnifuge 2.0 RS von Heraeus Sepatech
Präzisionswaage 1500 von Faust
Spectrophotometer mit PC-Software von Pharmacia Biotech
Glasküvetten von Sigma

Untersuchungsmaterial: Blattpigmente im Rohextrakt frischer Eibenblätter

Chemikalien: Isopropanol C_3H_8O , M: 60,10 g/mol, R 11-36-67, S 7-16-24/25-26

Aqua dest.

Petroleumbenzin, Siedebereich 100° - $140^{\circ}C$, R 11-51/53-65, S 9-16-23.2-24-33-61-62

Kieselgel 60 F254, DC-Platte 20X20cm

Aceton C_3H_6O , M: 58.08 g/mol, R 11-36-66-67, S 9-16-26

Durchführung

- ⊗frische Eibenblätter werden vom Zweig abgepflückt und in einem Zentrifugenröhrchen grob zerkleinert
- ⊗dann werden einige ml Aceton hinzugegeben
- ⊗mit dem Ultra-Torrax wird die Masse zu einem Brei zerkleinert
- ⊗dann wird mit etwa 20 ml Aceton aufgefüllt (=Rohextrakt)
- ⊗der Rohextrakt wird 10 min bei 4000 Upm zentrifugiert
- ⊗währenddessen wird das Laufmittel in der Kammer angesetzt: 12 ml Isopropanol mit 0,5 ml Aqua dest. lösen und dann schrittweise mit 100 ml Petroleumbenzin mischen
⇒ Kammer muß gesättigt werden
- ⊗mit einer Pasteurpipette wird der Überstand (Supernatant = SN) auf die Startlinie der DC-Platte getropft
- ⊗man gibt etwa 5-8 Schichten auf
- ⊗die Platte wird in die Kammer gestellt, bis sich die Laufmittelfront unterhalb des

oberen Randes der Platte befindet (ca. 120 min)

- ⊕ die einzelnen Banden der Pigmente werden separat voneinander abgekratzt und in ihrem entsprechenden Lösungsmittel (Aceton für Chlorophyll) gelöst
- ⊕ von den Lösungen der einzelnen Blattpigmente sowie vom Rohextrakt der alten Blätter und der jungen Triebe werden mit dem Photometer Absorptionsspektren aufgenommen (von 400 - 800 nm)
- ⊕ die Absorptionsspektren werden ausgewertet

Ergebnisse und Auswertung

Im DC-Chromatogramm werden die Blattpigmente wie folgt von oben nach unten aufgetrennt:

[Graphik mit Strukturformeln der Blattpigmente]

Die Reihenfolge hängt mit der Polarität der einzelnen Moleküle und daher mit ihrer Affinität zum Laufmittel und zur DC-Platte zusammen. Die Xanthophylle (unten, gelb) besitzen viele OH-Gruppen und sind daher am polarsten. Sie werden von polaren SiOH-Gruppen des Kieselgels festgehalten (Adsorption). Die Chlorophylle sind schon weniger polar, wobei Chlorophyll b als Oxidationsprodukt von Chlorophyll a noch etwas polarer ist, also weiter unten liegt. Das Carotin letztlich besitzt keine OH-Gruppen und ist unpolar. Es löst sich fast vollständig im Laufmittel und wird fast so schnell mitgenommen, wie dieses aufsteigt.

Die Farben der Blattpigmente ergeben sich, wenn man die Spektrogramme der einzelnen Pigmente auswertet. Hier wird sichtbar, welche Wellenlängen vom Pigment absorbiert werden und in welcher Intensität. Vorab die Einstellungen des Geräts, die bei allen Messungen identisch waren:

Meßbereich: 400 - 800 nm

Temperatur: aus

Meßschritte: 1,0 nm

Scan-Modus: Absorption

Scan-Geschwindigkeit: 600 nm / min

[Einfügen der jeweiligen Chromatogramme]

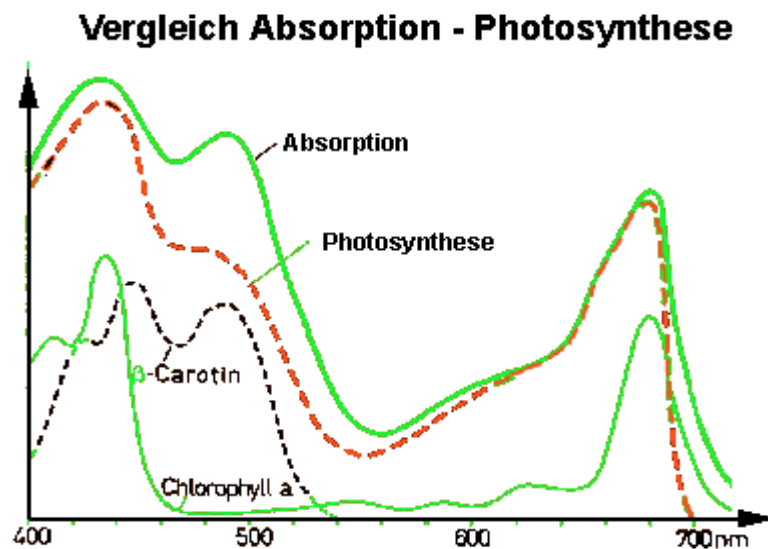
- a) *Xanthophylle* 1.-3. Bande
Peaks bei 422 nm, 436 nm und 464 nm
Absorption 0,13 - 0,18
Absorptionmax. 436,3 nm
Absorptionsbereich 400 - 470 nm
Spektralfarbe blau
Farbeindruck gelb

- b) *Chlorophyll b* 4. Bande
 Peaks bei 455,5 nm und 645,2 nm
 Absorption 1,1 - 2,9
 Absorptionsmax. 455,5 nm
 Absortionsbereich 420 - 470 nm bzw. 630 - 660 nm
 Spektralfarben blau bzw. rot
 Farbeindruck gelbgrün
- c) *Chlorophyll a* 5. Bande
 Peaks bei 411,8 nm; 425,6 nm und 661,8 nm
 Absorption 2,0 - 2,4
 Absorptionsmax. 425,65 nm
 Absortionsbereich 400 - 440 nm bzw. 640 - 680 nm
 Spektralfarben violett bzw. rot
 Farbeindruck blaugrün
- d) *Carotin* 6. Bande
 Peak bei 446,8 nm
 Absorption 0,89
 Absorptionsmax. 446,8 nm
 Absortionsbereich 410 - 500 nm
 Spektralfarbe grünblau
 Farbeindruck orange
- e) *Rohextrakt Knospen*
 Peaks bei 662,5 nm (zw. 400-450 nm nicht meßbar!)
 Absorption 2,06 - über 3,0
 Absorptionsmax. 662,5 nm
 Absortionsbereich 400 - 490 nm bzw. 640 - 670 nm
 Spektralfarbe violett-blau bzw. rot
 Farbeindruck grün
- f) *Rohextrakt alte Blätter*
 Peaks bei 431,5 nm; 453,4 nm und 661,9 nm
 Absorption 1,1 - 2,0
 Absorptionsmax. 431,5 nm
 Absortionsbereich 400 - 480 nm bzw. 640 - 675 nm
 Spektralfarbe blau bzw. rot
 Farbeindruck grün

Aus der Intensität der Absorption kann man erkennen, dass in den Blättern viel weniger Xanthophylle und Carotin enthalten sind als Chlorophylle. Das erkläre ich damit, dass es sich um ein immergrünes Gewächs handelt. Da es im Herbst nicht gelb oder braun wird, benötigt es nicht so viele gelbe Farbstoffe und wird auch weniger produzieren. Als Reserve sind sie aber auch hier vorhanden, obwohl ihre Energieausbeute (nur ein Peak) geringer ist als bei Chlorophyll.

Die Spektrogramme der Rohextrakte zeigen durch die Absorptionswerte, dass in den Knospen bestimmt doppelt soviel Pigmente enthalten sind wie in den älteren Blättern. Die Pigmente werden also über die Jahre abgebaut.

Vergleicht man die Absorption der Pigmente mit der Photosyntheserate so wird deutlich, dass genau die oben genannten Wellenlänge notwendig sind, um Photosynthese zu betreiben:



Fehlerdiskussion

Die von mir ermittelten Daten dürften keine größeren Fehler aufweisen. Zwar wurden alle Messungen nur einmal durchgeführt. Doch weichen meine Daten nicht wesentlich von den in der Literatur ermittelten Werten ab.