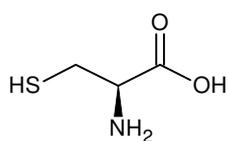


## Versuchsprotokoll

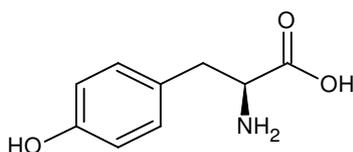
### Dünnschichtchromatographie von Aminosäuren

Gruppe 10, Typ: Pflichtversuch

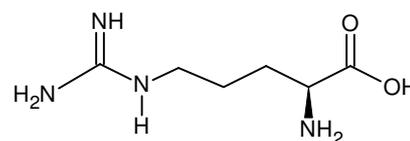
#### 1. Strukturformeln



L-Cystein



L-Tyrosin



L-Arginin

#### 2. Zeitbedarf

	Teil 1
Vorbereitung	20 min
Durchführung	60 min
Nachbearbeitung	5 min

#### 3. Chemikalien

Name	Summenformel	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze	Einsatz in der Schule
n-Butanol	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> OH	Xn	10, 22, 37/38, 41, 67	7/9, 13, 26, 37/39, 46	S I
Eisessig	CH <sub>3</sub> COOH	C	10, 35	23, 26, 45	S I
Wasser	H <sub>2</sub> O	-	-	-	S I
L-Cystein	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> S	Xn	22, 36/37/38	26, 36	S I
L-Tyrosin	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	Xi	36/37/38	26, 36	S I
L-Arginin	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	-	-	-	S I
Ninhydrin	C <sub>9</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	Xn	22, 36/37/38	26, 36	S I

## Gefahrensymbole



## 4. Materialien/Geräte

DC-Kammer, Bleistift, DC-Folie, Pipetten, Föhn, Zerstäuber,

## 5. Versuchsaufbau



Abb. 1: DC-Karten in der DC-Kammer

## 6. Versuchsdurchführung

Man gibt in die DC-Kammer 4 mL Butanol, 1 mL Eisessig und 1 mL Wasser. Das Gemisch dient als Fließmittel und sollte deshalb nicht höher als 0,5 cm sein. 1 cm oberhalb des unteren Randes der DC-Folie wird mit dem Bleistift eine Startlinie eingezeichnet und vier Startpunkte markiert. Auf den ersten Punkt trägt man mit einer Pipette einen Tropfen L-Cystein auf. Auf den zweiten Punkt wird L-Tyrosin und auf den dritten L-Arginin aufgetragen. Der vierte Punkt wird mit einem Tropfen L-Cystein und einem Tropfen L-Tyrosin versehen. Sobald die Lösungen getrocknet sind wird die DC-Folie in die DC-Kammer gestellt und gewartet bis das Fließmittel bis zu  $\frac{3}{4}$  der Karte hochgeflossen ist.

## 7. Beobachtung

Nach ca. einer Stunde ist das Fließmittel zu  $\frac{3}{4}$  der DC-Karte hochgeflossen. Nach dem Trocknen mit dem Föhn ist die Karte noch immer weiß. Durch Besprühen der Karte mit Ninhydrin-Lösung und erneutem Föhnen ist anhand roter Punkte zu erkennen, dass L-Cystein leicht hochgeflossen ist und sich vor allem in die Breite verzogen hat. L-Tyrosin ist weiter geflossen als das L-Cystein und L-Arginin hat sich mit dem Fließmittel nicht von der Stelle bewegt (Abb. 2).



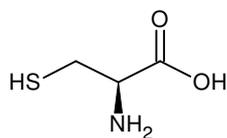
Abb. 2: DC-Karten nach Besprühen mit Ninhydrin-Reagenz.  
1) L-Cystein 2) L-Tyrosin 3) L-Arginin 4) L-Cystein und L-Tyrosin

## 8. Entsorgung

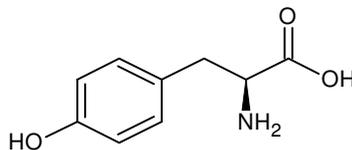
Die Lösungen kommen neutral in den Behälter für organische Lösungsmittel. Die DC-Karten werden trocken im Behälter für Feststoffe entsorgt.

## 9. Fachliche Analyse

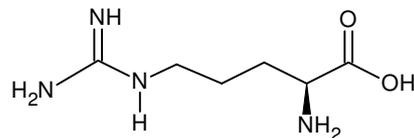
Die Dünnschichtchromatographie-Karten (kurz: DC-Karten) sind auf der einen Seite weiß, auf der anderen silbrig. Somit ist schon von außen Aluminiumoxid als Trägermittel für die zu trennenden Proben zu erkennen. Die Proben waren in dieser DC L-Cystein, L-Tyrosin und L-Arginin.



L-Cystein



L-Tyrosin



L-Arginin

Vergleicht man die Strukturen dieser drei Aminosäuren, so fällt auf, dass diese verschiedene Polaritäten aufweisen. Am stärksten polar ist L-Arginin, die schwächste Polarität zeigt das L-Tyrosin.

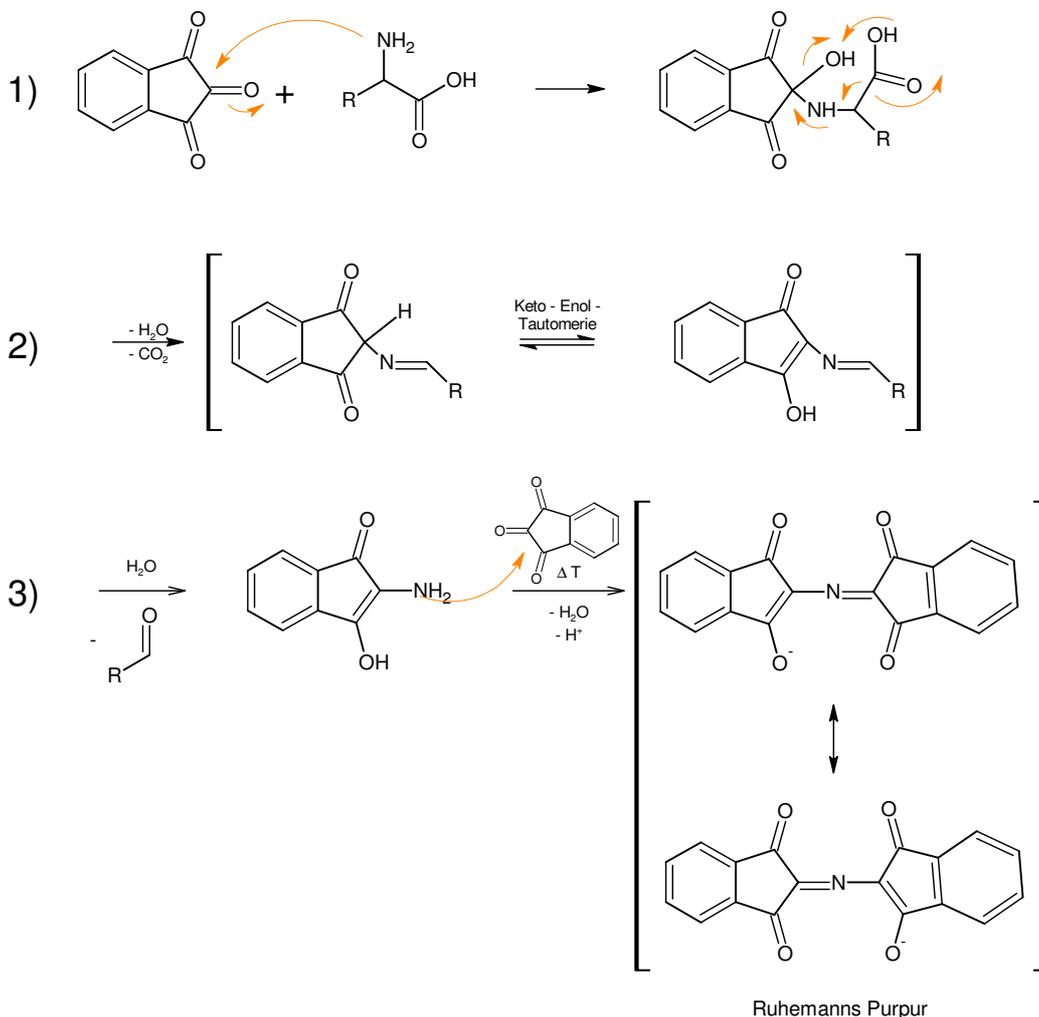
Die DC-Karte, bestehend aus Aluminiumoxid, ist polar, das Laufmittel hingegen, das aus Butanol, Essigsäure und Wasser besteht, ist aufgrund der langen unpolaren Alkylkette des Butanols eher unpolar. Je weniger polar die aufgetragenen Aminosäuren sind, umso weiter fließen diese mit dem unpolaren Lösungsmittel bzw. Fließmittel mit. Das am stärksten polare L-Arginin geht die die stärksten Wechselwirkungen mit dem polaren Aluminiumoxid ein. Diese sind so stark, dass diese Aminosäure so gut wie an der ursprünglichen Stelle verbleibt. L-Cystein und L-Tyrosin sind weniger polar und lösen sich so teilweise in dem Fließmittel. Dieses transportiert die Aminosäuren einen Teil der DC-Karte hoch. Da das L-Cystein leicht polarer ist als L-Tyrosin, wird dieses etwas weniger vom Fließmittel mittransportiert.

Bei den eingesetzten Substanzen handelt es sich um ungefärbte Substanzen, weswegen sie mit der Sprühreagenz Ninhydrin sichtbar gemacht werden müssen. Ninhydrin ist das klassische Nachweisreagenz für Aminosäuren und Proteine.

Im ersten Schritt greift das Stickstoffatom der jeweiligen Aminosäure das Ninhydrin am Kohlenstoffatom, das einen doppelt gebundenen Sauerstoff trägt, an. Diese Doppelbindung bricht auf und das Sauerstoffatom bindet ein Wasserstoffatom des der Aminogruppe.

In Schritt zwei spaltet sich Wasser und Kohlendioxid ab. Das übrig gebliebene Wasserstoffatom des Amins wird von dem Kohlenstoffatom des Ninhydrins gebunden. Die Hydroxidgruppe des Ninhydrins bindet ein Wasserstoffatom der benachbarten Hydroxidgruppe und spaltet sich als Wasser ab. Das zurückgebliebene Sauerstoffatom bildet mit dem Elektron, das aus der Bindung des Wasserstoffatoms frei wird, eine Doppelbindung zum benachbarten Kohlenstoffatom aus, wodurch dieses zwei doppelt gebundene Sauerstoffatome trägt und somit die Bindung zum benachbarten Kohlenstoffatom bricht und sich als Kohlendioxid abspaltet. Durch die Keto-Enol-Tautomerie erhält man zwei Strukturformeln.

In Schritt drei wird schließlich Wasser hinzu gegeben. Das Sauerstoffatom dieses Moleküls greift das Kohlenstoffatom der ursprünglichen Aminosäure an. Die Wasserstoffatome werden vom Stickstoff gebunden, wodurch dessen Bindung zum Kohlenstoffatom der ursprünglichen Aminosäure bricht. Dieses wiederum bildet eine Doppelbindung zum Sauerstoffatom aus und spaltet sich so als Aldehyd ab. Das Aminoketon reagiert nun mit einem weiteren Molekül Ninhydrin unter Hitzeeinwirkung und Abspaltung von Wasser und einem Proton weiter zu Ruhemanns Purpur, einem blau-violetten Farbstoff.



Ruhemanns Purpur ist aufgrund der konjugierten Doppelbindungen und der damit verbundenen delokalisierten  $\pi$ -Elektronen blau bis violett gefärbt. Der Name stammt von seinem Entdecker Siegfried Ruhemann, der 1911 erkannte, dass Aminosäuren mit Ninhydrin eine blauviolette Färbung ergibt.

Die Chromatographie wurde erstmals von den russischen Biologen Michael Tswett um 1910 zur Trennung von pflanzlichen Farbstoffen eingesetzt. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf den verschiedenen Wechselwirkungen der zu trennenden Stoffe mit der stationären (hier DC-Karte) und der mobilen (Fließmittel) Phase. Bei der Dünnschichtchromatographie werden feine Materialien wie Kieselgel oder Aluminiumoxid als stationäre Phase verwendet. Die Vorteile liegen in der schnellen Laufzeit des Fließmittels und in den gut sichtbaren Ergebnissen. Diese Methode wurde von E. Stahl im 20. Jhd. entwickelt. Es gibt jedoch auch noch andere chromatographische Verfahren wie die Säulen-Chromatographie (zum Auftrennen großer Stoffmengen), Ionenaustausch-Chromatographie (z.B. zur Herstellung von destilliertem Wasser), oder die Gas-Chromatographie (zum Trennen von Gasgemischen).

Aminosäuren sind für den Menschen essentiell. Sie stellen die Grundbausteine von Proteinen dar. Jedes Protein ist aus einer bestimmten Sequenz von Aminosäuren aufgebaut. Aminosäuren sind organische Verbindungen, die mindestens eine Carboxylgruppe (-COOH) und eine Aminogruppe (-NH<sub>2</sub>) besitzen. Sind diese beiden Gruppen direkt benachbart, so spricht man von  $\alpha$ -Aminosäuren. Die Reaktion von  $\alpha$ -Aminosäuren zu Proteinen erfolgt unter Wasserabspaltung. Von Proteinen spricht man jedoch erst dann, wenn zahlreiche Aminosäuren miteinander verknüpft sind.

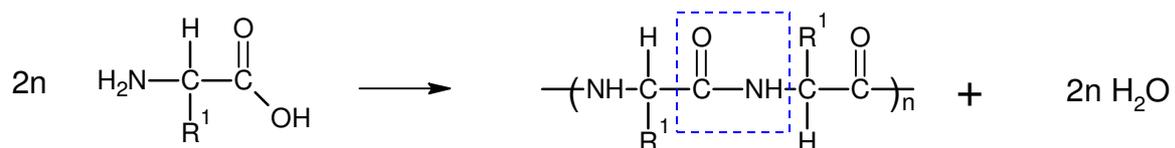


Abb. 3: Reaktion von  $\alpha$ -Aminosäure unter Wasserabspaltung und Bildung einer Peptid-Bindung zu einem Polypeptid

Im blauen Kasten ist die entstehende Peptid-Bindung gezeichnet. Dabei handelt es sich um eine Bindung zwischen der CO-Gruppe der einen und der NH-Gruppe der anderen Aminosäure. Die Aminosäureketten können von bis zu mehreren Tausend Aminosäuren aufgebaut sein. Ab 100 Aminosäuren spricht man von Polypeptiden und diese wiederum werden als Proteine bezeichnet. Bei unter 100 Aminosäuren spricht man von Oligopeptiden, oder von Dipeptiden bei Verknüpfung von zwei Aminosäuren, Tripeptiden bei drei Aminosäuren usw.

Die Aminosäuren haben alle den gleichen Grundbaustein und unterscheiden sich lediglich in ihren Resten. Für den Menschen essentiell sind folgende acht Aminosäuren: Valin, Methionin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tryptophan, Threonin und Lysin. Sie können im Körper nicht hergestellt bzw. aufgebaut werden und müssen deshalb über die Nahrung aufgenommen werden. Semi-essentielle

Aminosäuren werden in bestimmten Situationen vermehrt gebraucht (z.B. im Wachstum oder bei Verletzungen) und müssen dann auch zusätzlich über die Nahrung aufgenommen werden. Zu diesen gehören Arginin, Cystein, Histidin und Tyrosin. Alle anderen Aminosäuren können im Körper synthetisiert werden. Bei diesen insgesamt 22 Aminosäuren handelt es sich um proteinogene Aminosäuren. Sie haben alle eine C- $\alpha$ -Atom, sowie eine Carboxy-, eine Aminogruppe und eine Seitenkette. Bis auf Glycin sind sie alle chiral, denn hier ist die Seitenkette durch ein Wasserstoffatom ersetzt. Die 21 Aminosäuren haben also enantiomere Formen, die L- und D-Isomere.

Des Weiteren gibt es mehr als 250 nicht-proteinogene Aminosäuren (z.B. die Ibutensäure im Fliegenpilz, aus der durch Wasserentzug Muscimol entsteht, welches dann die psychotrope Wirkung verursacht), die in Pflanzen und Pilzen vorkommen. Von vielen dieser Aminosäuren ist die Funktion heute noch nicht bekannt. Die anderen fungieren z.B. als Stickstoff-Speicher oder hemmen die Synthese von Aminosäure bzw. die Proteinbiosynthese und wirken somit antibiotisch.

## 10. Didaktische Analyse

Dieser Versuch kann sowohl im GK als auch im LK in Jahrgangsstufe 12 eingesetzt werden (G 9), wenn es um „Technisch und biologisch wichtige Kohlenstoffverbindungen“ geht. Es bietet sich fächerübergreifender Unterricht mit der Biologie an, denn in der Jahrgangsstufe 12 steht dort das Thema Genetik an, unter dem auch die DNA behandelt wird. Da die DNA unter anderem aus den verschiedenen Aminosäuren aufgebaut ist, bietet sich hier der fächerübergreifende Unterricht sehr gut an. In Klasse 8 haben die Schüler bereits Trennverfahren von Stoffgemischen und somit auch das Verfahren der Chromatographie kennen gelernt. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Schüler schnell verstehen, wie die Chromatographie funktioniert und es kann schnell auf die chemischen Eigenschaften und Strukturen der verschiedenen Aminosäuren eingegangen werden. Dieser Versuch eignet sich also hervorragend zur Einleitung in dieses Thema. Im Anschluss kann direkt auf das Thema der Eiweiße übergeleitet werden.

Je nachdem welches chromatographische Verfahren die Schüler in Klasse 8 kennen gelernt haben und vielleicht sogar selber durchgeführt haben, kann dieser Versuch entweder von den Schülern selber durchgeführt werden, vom Lehrer vorgeführt werden, oder aber auch übersprungen werden. Er ist zwar nicht sehr materialaufwändig, das Fließmittel braucht jedoch sehr lange, bis es weit genug geflossen ist. Vielleicht lohnt es sich eher Aminosäuren in Schweiß nachzuweisen, indem z.B. nach dem Sportunterricht ein Fuß auf ein weißes Blatt Papier gestellt wird und anschließend mit Ninhydrin-Reagenz besprüht und getrocknet wird. Mit einem einfachen Handabdruck funktioniert dieser Versuch nur sehr selten, da wir meistens zu trockene Hände haben. Auch das Anziehen eines Gummihandschuhs über einen längeren Zeitraum bewirkt keine Veränderung. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass die Hand nicht auf natürliche Weise schwitzt und somit nicht vermehrt Aminosäuren ausschüttet.

## 11. Literatur

Versuchsquelle:

[1] Blume, R., *Dünnschichtchromatographie von Aminosäuren*, Cornelsen Verlag GmbH, Berlin, <http://www.chemieunterricht.de/dc2/chromato/v-aminos.htm> (letzter Zugriff: 27.12.08, 17:22 Uhr)

Fachquellen:

[2] Grunert, P., *4 semiessentielle Aminosäure*, <http://deaa.deab.org/aminos/aminos003.php> (letzter Zugriff: 13.11.08, 18:38 Uhr)

[3] *Lehrplan Chemie für die Jahrgangsstufen G7 bis G12* des hessischen Kultusministeriums, 2005 ([http://www.kultusministerium.hessen.de/irj/HKM\\_Internet?uid=3b43019a-8cc6-1811-f3ef-ef91921321b2](http://www.kultusministerium.hessen.de/irj/HKM_Internet?uid=3b43019a-8cc6-1811-f3ef-ef91921321b2))

[4] Schmidt, B., *Nachweis von Fingerabdrücken über Ninhydrin*, APOC – Audiovisuelles Praktikum der organischen Chemie, Technische-Universität Darmstadt, <http://www1.tu-darmstadt.de/fb/ch/Fachgebiete/OC/AKSchmidt/APOC/pdf/Ninhydrin.pdf>, (letzter Zugriff: 27.12.08, 15:59 Uhr)

[5] Unfallkasse Hesse (UKH), Hessisches Kultusministerium, *Hessisches GefahrstoffInformations System Schule (HessGISS)*, Version 11.0, 2006/2007

[6] Vollhardt, K. Peter C., Schore, Neil E., *Organische Chemie*, Vierte Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, 2005

[7] Wikimedia Foundation Inc., <http://de.wikipedia.org> (letzter Zugriff: 27.12.08, 15:09 Uhr)