

1.1a Chromatographie der Plastidenfarbstoffe

Einleitung:

Zur Stofftrennung und Analyse wird oft die Chromatographie verwendet. Es gibt verschiedene Chromatographietechniken wie Papier-, Dünnschicht-, Säulen- oder Gaschromatographie. Die Chromatographie wirkt stoffspezifisch durch Faktoren wie Affinität, Adsorption, Ionentausch und Verteilungsgewichte, was nach einem längeren Zeitraum zu einer Stofftrennung eines Gemisches führt. Bei der DC wird das Gemisch auf einer stationären Phase aufgetragen (Cellulose=> hydrophil/polar), das Laufmittel (mobile Phase) trägt die verschiedenen Stoffe je nach deren Eigenschaften mehr oder weniger weit. Im Vergleich zur Papierchromatographie ist sie schneller und besitzt eine höhere Trennschärfe. Die zu untersuchenden Blattfarbstoffe lassen sich in die Obergruppen der grünen Chlorophylle und der gelben Carotinoide einordnen.

Material, Methoden:

Der Versuch wurde wie im Skript beschrieben durchgeführt.

Ergebnisse:

2.2: Bei der Papierchromatographie wurden die Stoffe (von innen nach außen aufgezählt) Neoxanthin, Chlorophyll b, Chlorophyll a, Violaxanthin, Lutein und β -Carotin (sehr schwach) getrennt.

2.3: Bei der Dünnschichtchromatographie wurden die Stoffe (von unten nach oben aufgezählt) Neoxanthin, Violaxanthin, Lutein, Chlorophyll b, Chlorophyll a und β -Carotin (sehr schwach) getrennt. Bei 10 μ l wurden die Stoffe sauber getrennt, bei 20 μ l kam es zu einer etwas unschärferen Trennung und bei 30 μ l wurde eindeutig die Trennungskapazität der Dünnschichtplatte überschritten. Eine rote Fluoreszenz wurde bei einer geringen Konzentration von Chlorophyll a und b unter UV-Licht festgestellt, bei Chlorophyll a war die Fluoreszenz nur am Rand ausgeprägt. Bei steigenden Konzentrationen nahm die Fluoreszenz von Chlorophyll a ab.

Diskussion:

Die Dünnschichtchromatographie beruht vollkommen auf dem Verteilungsprinzip nach Nernst. Die Substanz verteilt sich auf dem dünnen Wasserfilm über der Unterlage (Kieselgel) und der mobilen, darüber fließenden Phase des Laufmittels. Das beim Versuch verwendete Lösungsmittel (Benzin-Isopropanol-Wasser-Gemisch) ist größtenteils unpolar. Dadurch werden eher unpolare Stoffe wie β -Carotin (aus 8 unpolaren Isopren-einheiten) oder die Chlorophylle (mit charakteristischen, unpolaren Phytolrest) am weitesten getragen. Die polaren, Sauerstoff enthaltenden Xanthophylle lösen sich eher in der stationären, polaren Phase und werden deshalb kaum von der mobilen Phase getragen. Das relativ viel Sauerstoff enthaltende Neoxanthin wurde dabei weniger weit getragen als das eher sauerstoffarme Lutein.

Die Papierchromatographie beruht auch auf dem Verteilungsprinzip, aber sie wird auch von der Absorption der Stoffe an die Unterlage (Cellulose) beeinflusst. Die Reihenfolge innerhalb der Gruppen der Carotinoide und der Chlorophylle ändert sich nicht. Da sich die ausgedehnte Porphyrinstruktur mit den Hydroxygruppen der Cellulose über Wasserstoffbrückenbindungen verbinden können, befinden sie sich zwischen dem stark polaren Neoxanthin und dem schwächer polaren Violaxanthin.

Gruppe 6 V1.1a

Chlorophyll a zeigt eine konzentrationsbedingte rote Fluoreszenz. Die Pigmente können untereinander in hoher Konzentration die Lichtenergie der UV-Strahlung als Wärme abgeben, die Fluoreszenz tritt nur am Rand auf. Das Chlorophyll b zeigt in allen drei Konzentrationen eine starke rötliche Fluoreszenz. In der Pflanzenzelle liegt es im Verhältnis 1:3 zu Chlorophyll a vor (oder weniger). Dadurch kommt es bei diesem Versuch zu keiner Fluoreszenzschwächung durch eine Pigmentüberkonzentration.

Bei den Extraktionen der Blattpigmente muß Calciumcarbonat hinzugegeben werden, da die im Pflanzensaft enthaltenden Säuren sonst das Chlorophyll zu Phäophytin umwandeln würden.

Literaturhinweise:

Pflanzenphys.skript

1b Absorptionsspektren von Chloroplastenpigmenten

Einleitung:

Die Photometrische Bestimmung beruht auf dem Lambertschen Gesetz. Ein Stoff (gefärbt) absorbiert einen Anteil einfallenden Lichts einer bestimmten Wellenlänge, mit der er angeregt werden kann. Diese Absorption/Extinktion entspricht dem Produkt aus seiner Konzentration multipliziert mit der Wegstrecke, die das Licht in dem Stoff/der Flüssigkeit zurücklegt, multipliziert mit dem Extinktionskoeffizient ϵ . Dieser ist für jeden Stoff eine spezifische Konstante. Die Konzentration eines Stoffes lässt sich also durch die Absorption des einfallenden Lichts (Extinktion), der zurückgelegten Wegstrecke und dem Extinktionskoeffizienten berechnen. Im Versuch V1b messen wir die Extinktion, also die Absorption von β -Carotin und Chlorophyll a.

Material, Methoden:

Der Versuch wurde wie im Skript beschrieben durchgeführt.

Ergebnisse:

β -Carotin besitzt drei Absorptionsmaxima bei 451,5nm, 468,0nm (am ausgeprägtesten) und bei 478,5nm. Chlorophyll a besitzt zwei Maxima bei 660nm und bei 450nm. Genaue Daten siehe Kurve.

Diskussion:

Bei den gemessenen Absorptionsmaxima besitzt das Chlorophyll seine Fotosynthesetätigkeit. Mit blauem oder rotem Licht wird es zur Fotosynthese angeregt, es reagiert nicht auf grünes oder dunkelrotes Licht („Grünlücke“). Das β -Carotin ist nicht photosynthetisch tätig, es kann aber in der Wellenlänge von 451,5nm bis 478,5nm Lichtenergie abfangen und so das Photosystem vor Überlastung schützen. Desweiteren kann es das Chlorophyll vor Photoxidation durch das Abfangen von überschüssiger Wärme schützen. Im Versuch V1b enthielt das Chlorophyll a-Spektrogramm auch das β -Carotin, da dieses nicht vorher extrahiert wurde. Es ist an der „kleinen Nase“ hinter dem Maximum bei 450nm erkennbar. Da es nicht möglich war, Chlorophyll a in seiner reinen Form durch Extraktion zu gewinnen, enthielt das Spektrogramm noch Fremdstoffe, die das Ergebnis verfälschten. Die Maxima stimmten mit Lehrbuchwerten überein. Das Spektrogramm des reinen β -Carotins unterschied sich leicht vom β -Carotin in der Chlorophyll a-Lösung. Dies beruht auf der Verwendung unterschiedlicher Lösungsmittel. Das Chlorophyll musste im Verhältnis 1:4 verdünnt werden, um eine exakte Messung ermöglichen zu können.

Literaturhinweise:

Pflanzenphys.skript

V1c Eigenschaften des Chlorophylls

Einleitung:

Chlorophylle absorbieren rotes und blaues Licht für die Photosynthese, da sie grünes Licht kaum absorbieren erscheinen sie grün. Bei einer höheren Chlorophyllkonzentration wird auch das verbleibende grüne Licht absorbiert. Durch eine Anregung mit blauem oder energiereichem Licht (UV) werden die π -Elektronen in einen stark angeregten Zustand versetzt (2. Singulett-Zustand). Beim zurückspringen in einen energieärmeren Zustand (1. Singulett-Zustand, kann auch über Bestrahlung mit rotem Licht erreicht werden) wird Wärme freigesetzt. Kehrt das angeregte Elektron in den Grundzustand zurück, so gibt es entweder Photonen mit einer dunkelroten Wellenlänge ab oder die Energie wird vollständig in Wärme umgesetzt. Die roten Photonen können als rote Fluoreszenz wahrgenommen werden, die bei Zugabe von Wasser erlischt (siehe Diskussion). Kommt es zur Spin-umkehr der Elektronen (1. Triplettzustand), wird diese Energie auf die Sauerstoffatome übertragen, es kommt zur Phosphoreszenzstrahlung (eher selten). Das Zentralatom des Chlorophylls ist ein zweiwertiges Magnesium, das durch Säure herausgelöst werden kann.

Material, Methoden:

Der Versuch wurde wie im Skript beschrieben durchgeführt.

Ergebnisse:

1: Der Versuch zeigt keine auswertbaren Ergebnisse

2: Die verdünnte Chlorophylllösung erscheint hellgrün, die konzentrierte Chlorophylllösung dagegen dunkelrot.

3: An der Oberfläche des Chlorophylls ist eine rötliche Fluoreszenz erkennbar. Bei einer Verdünnung mit Wasser erlischt diese, bei einer Verdünnung mit Methanol wird die Fluoreszenz verstärkt.

4: Reagenzglas 1: Das Rohchlorophyll ist hellgrün,

Reagenzglas 2 (mit HCl): verfärbt sich gelblich.

Reagenzglas 3 (zusätzlich NaOH): die gelbliche Farbe bleibt bestehen trotz Neutralisierung.

Reagenzglas 4 (mit Fehling I): die gelbliche Farbe verfärbt sich zu blassgrün.

5: Die Blätter färben sich nach wenigen Sekunden braun.

Diskussion:

1: Der Versuch könnte theoretisch zeigen, dass Chlorophyll rotes und blaues Licht, das in der Lösung enthaltene β -Carotin einen Teil des grünen Lichtes absorbiert. Dies wäre im Versuch durch schwarze Banden (\Rightarrow Absorption) erkennbar. Eine carotinoidfreie Lösung würde bei diesem Versuch weniger schwarze Banden aufweisen. Mögliche Fehlerquellen wären die Größe der Lichtquelle (Schlitz), die Konzentration der Lösung sowie die Aufspaltungsfähigkeit des Prismas.

2: In einer verdünnten Lösung ist die Absorption von grünem Licht sehr gering („Grünlücke“), dunkelrotes Licht wird nicht absorbiert. Liegt die Lösung höher konzentriert vor, so wird trotz der geringen Absorptionsfähigkeit sämtliches grüne Licht absorbiert, nur noch das dunkelrote Licht dringt durch die Lösung, sie erscheint also dunkelrot. Das gleiche gilt auch für das Absorptionsverhalten von einer dickeren Schicht von Blättern, die sämtliches grüne Licht absorbieren und somit dunkelrot erscheinen.

3: Wie in Versuch 1a (hinreichend) beschrieben, kann Chlorophyll in höherer Konzentration die Strahlungsenergie als Wärme oder durch Kopplungsreaktionen an Nachbarmoleküle abgeben. Die Fluoreszenz tritt nur an der Oberfläche auf (geringste Konzentration). Fluoreszenz bedeutet dass ein angeregtes π -Elektron vom 1. Singulettzustand zum Grundzustand zurückkehrt und die Strahlungsenergie in Form von roten Photonen abgibt (30% der ursprünglichen Energie). Bei einer Zugabe von Wasser kommt es zur „Löschung“ (quenching) der Fluoreszenz. Die Chlorophyllmoleküle bilden eine ausgedehnte Hydrathülle und verändern so ihre Struktur, die Energie wird nur noch zu 3% in Fluoreszenzstrahlung abgegeben. Methanol hat keinen Einfluß auf Chlorophyll.

4: Das Zentralatom des Porphyringerüst des Chlorophylls ist Magnesium. Durch eine Hydrolyse mit Säuren kann dieses herausgelöst werden, es entsteht das magnesiumfreie Phäophytin (gelblich). Die Neutralisation der Säure hat keinen reversiblen Einfluß auf die Struktur des Phäophytins, das Magnesium liegt immer noch in Lösung vor. Durch Zugabe von Kupfersulfat zum zentralatomfreien Phäophytin bildet sich ein Kupferchlorophyllin-Komplex (blassgrün). Das Zentralatom des konjugierten Systems des Porphyringerüsts hat also einen bedeutenden, nicht zu unterschätzenden Einfluß auf dessen Farbe.

5: Eine Erhitzung der Oxalat-enthaltenden Blätter (Sauerklee) führt zur Freisetzung der Säure und einer anschließenden Reaktion von Oxalat mit Chlorophyll (\Rightarrow Phäophytin). Die Blätter färben sich phäophytin-charakteristisch braun.