



# 10 Jahre Schüler-Praktika

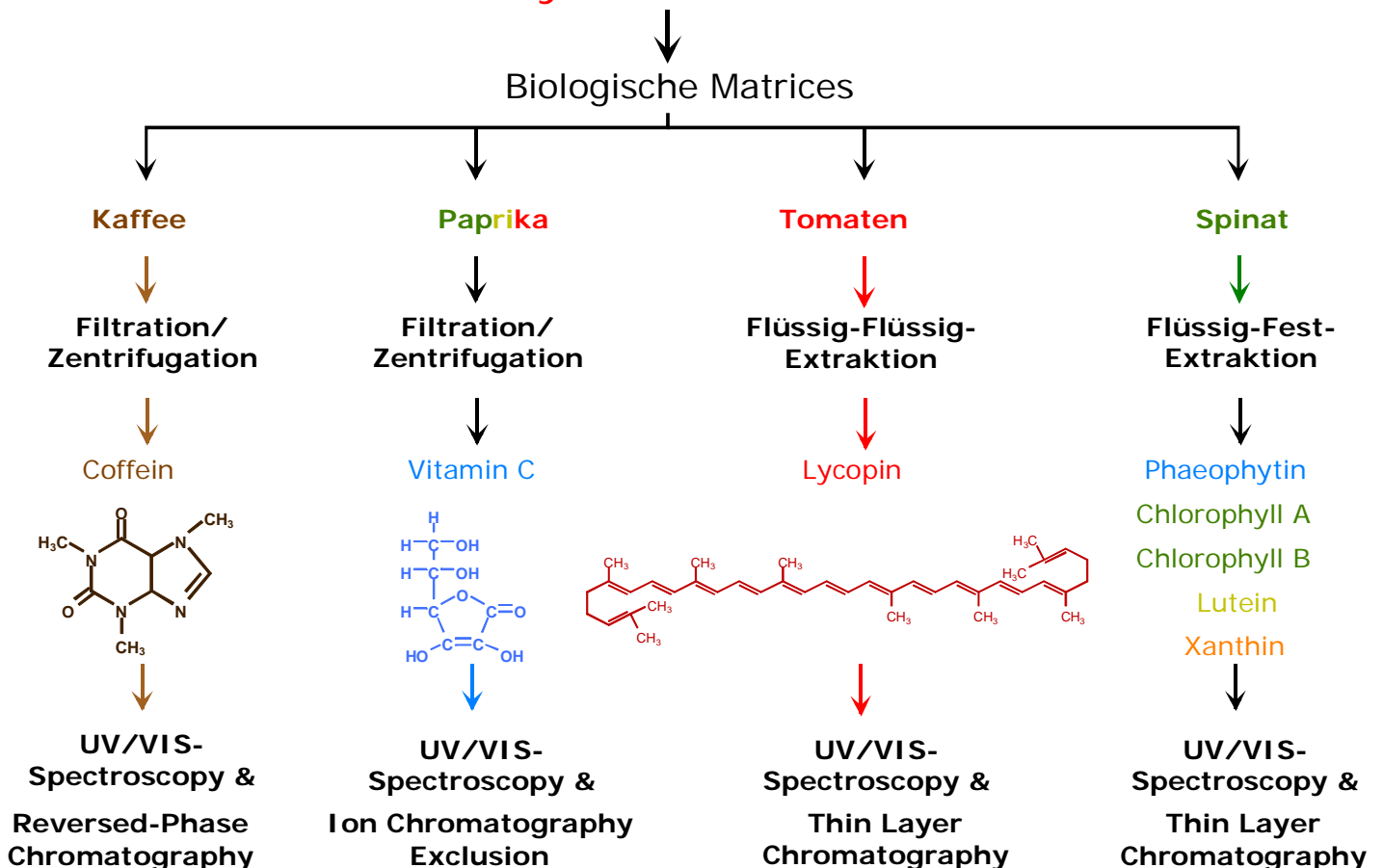
## BioAnalytik: 2003 - 2013

<b>Dienstag</b>	<b>05. März 2013</b>	<b>8.00 – 16.00 Uhr</b>
<b>Mittwoch</b>	<b>06. März 2013</b>	<b>8.00 – 16.00 Uhr</b>
<b>Donnerstag</b>	<b>14. März 2013</b>	<b>9.30 – 16.00 Uhr</b>
<b>Samstag</b>	<b>29. Juni 2013</b>	<b>9.30 – 16.00 Uhr</b>

Pro-Programm: <http://www.papa-gey.de/bb/bb13/bb13.pdf>

Zielgruppen sind Schüler mit Interesse für:  
 BioAnalytik, Biotechnologie, Chemie - BioChemie

### BioAnalytik-Praktika 2013





# BioAnalytik – Praktika 2013

## 1. „Biologische Matrices“

### a) Kaffee

Kaffee ist ein schwarzes, psychotropes, coffeinhaltiges Heißgetränk, das aus gerösteten und gemahlenden Kaffeebohnen, den Samen aus den Früchten der Kaffeepflanze, hergestellt wird.

### b) Paprika

Paprika (*Capsicum*), auch als Chili oder Peperoni bezeichnet, gehört zur Familie der Nachtschattengewächse.

Bereits die amerikanischen Ureinwohner nutzten Paprika als Heilmittel, unter anderem gegen Zahnschmerzen oder Arthrose.

### c) Tomaten

Die Tomate (*Solanum lycopersicum*) ist eine Pflanzenart aus der Familie der Nachtschattengewächse.

Hauptbestandteil der Tomate ist Wasser (etwa 95 %), außerdem enthält sie Vitamin A, B1, B2, C, E sowie Mineralstoffe, besonders Kalium und Spurenelemente. Der rote Farbstoff ist Lycopin, ein Carotinoid, das antioxidativ wirkt.

### d) Spinat

Spinat (*Spinacia oleracea*), auch Gemüsespinat genannt, ist eine Pflanzenart innerhalb der Familie der Fuchsschwanzgewächse.

Spinat wird oder wurde auch als Heilpflanze verwendet. Die Pflanze ist ein Mittel gegen Blähungen, die Samen gelten als Abführmittel.

Spinat wird zum Grünfärben anderer Lebensmittel wie z. B. Nudeln verwendet. Aus den Blättern wird Chlorophyll gewonnen, das als grüner Lebensmittelfarbstoff eingesetzt wird.

## 2. Prä-Analytik - Probenvorbereitung

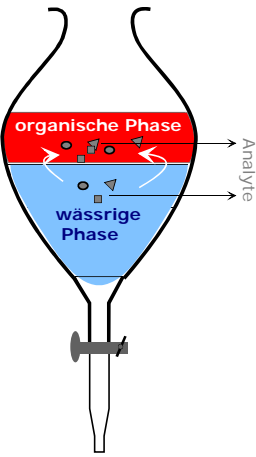
### a) Filtration

Die Filtration ist ein Verfahren zur Trennung oder Reinigung eines Mediums, meist einer Suspension oder eines Aerosols. Die Filtration gehört zu den mechanischen Trennverfahren. Eine filtrierte Flüssigkeit wird Filtrat genannt.

### b) Zentrifugation

Die Zentrifugation ist ein Trennverfahren. Sie wird oft der Filtration vorgezogen, da Filterpapiere von Lösungen z.T. angegriffen werden können.

c) Flüssig-Flüssig-Extraktion

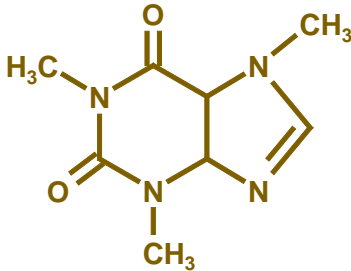
 <p><b>Bild 1</b> LLE</p>	<p>Unter Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE: <i>Liquid Liquid Extraction</i>) versteht man im allgemeinen die Extraktion einer wässrigen Lösung mit einem - mit Wasser nicht mischbaren - organischen Lösungsmittel.</p> <p>Die Extraktion kann als einfache Variante durch „Ausschütteln“ durchgeführt werden (Bild 1).</p>
--	---

d) Flüssig-Fest-Extraktion

Bei der Flüssig-Fest-Extraktionen (LSE: *Liquid Solid Extraction*) wird ein Stoff mit Hilfe eines flüssigen Extraktionsmittels aus einem Feststoffgemisch herausgelöst. Diese Variante ist vergleichbar mit der Flüssig-Flüssig-Extraktion.

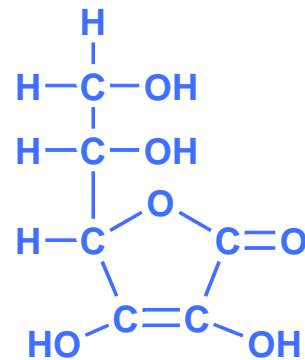
**3. Analyte**

a) Coffein

<p>Coffein (auch Koffein oder Thein) ist ein Alkaloid aus der Stoffgruppe der Xanthine und gehört zu den psychoaktiven Drogen aus der Gruppe der Stimulantien.</p> <p>Coffein ist der anregend wirkende Bestandteil von Genussmitteln wie Kaffee, Tee, Cola, Energy-Drinks.</p> <p>In reiner Form ist es ein weißes, geruchloses, kristallines Pulver mit bitterem Geschmack.</p>	 <p><b>Bild 2</b> Struktur von Coffein</p>
---	--

b) Vitamin C

Ascorbinsäure (Vitamin C) ist eine leicht oxidierbare organische Säure und wirkt deshalb antioxidativ. Vitamin C ist licht- und sauerstoff-empfindlich. Das Fehlen von Ascorbinsäure führt zu Mangelkrankheiten (Skorbut), die sich durch Zahnfleischbluten oder in schweren Fällen auch durch Zahnausfall zu erkennen geben.



**Bild 3** Struktur von Vitamin C

c) Lycopin

Lycopin ist ein ungesättigter Kohlenwasserstoff mit der Summenformel C<sub>40</sub>H<sub>56</sub> (Bild 4).

Lycopin, das in Dosentomaten oder in Tomatenmark enthalten ist, ist angeblich vom menschlichen Körper besser verwertbar.

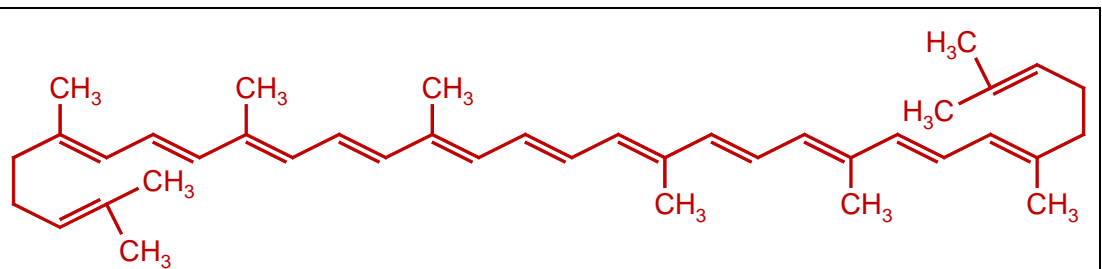
Die Verfügbarkeit von Lycopin ist aus verarbeiteten und erhitzten Produkten (z. B. Tomatensaft) höher als aus rohen, da beim Erhitzen die pflanzlichen Zellstrukturen aufgebrochen werden und das Lycopin gelöst wird.

Eine deutliche Resorptionssteigerung wird durch Kombination mit Fett erreicht.

Lycopin zählt zu den Antioxidantien und gilt als Radikalfänger, d.h., es kann bestimmte aggressive Moleküle im menschlichen Körper unschädlich machen.

Studien haben gezeigt, dass Lycopin die Wahrscheinlichkeit für bestimmte Krebsarten (Prostata- und Lungenkrebs) signifikant reduzieren kann. Auch wird in medizinischen Fachkreisen eine gute Wirkung bei rheumatischen Beschwerden diskutiert.

Außerdem wird der UV-Schutz der Haut durch Einlagerung von Lycopin in die Hautschichten verbessert. Lycopin ist daher auch ein natürlicher Sonnenschutz.



**Bild 4** Struktur von Lycopin



d) Blattfarbstoffe

Blattfarbstoffe, die in den Blättern vorkommenden Farbstoffe (z.B. Phaeophytin, Chlorophyll A, Chlorophyll B, Lutein, Xanthin).

Die grüne Farbe der Blätter wird durch Chlorophyll hervorgebracht. Gelbe, in Ethanol lösliche Farbstoffe wie z.B. Xanthophyll und gewisse rote Farbstoffe (z.B. Erythrophyll) verändern die grüne Farbe der Blätter und machen sie im Herbst, wenn das Chlorophyll verschwindet, bunt.

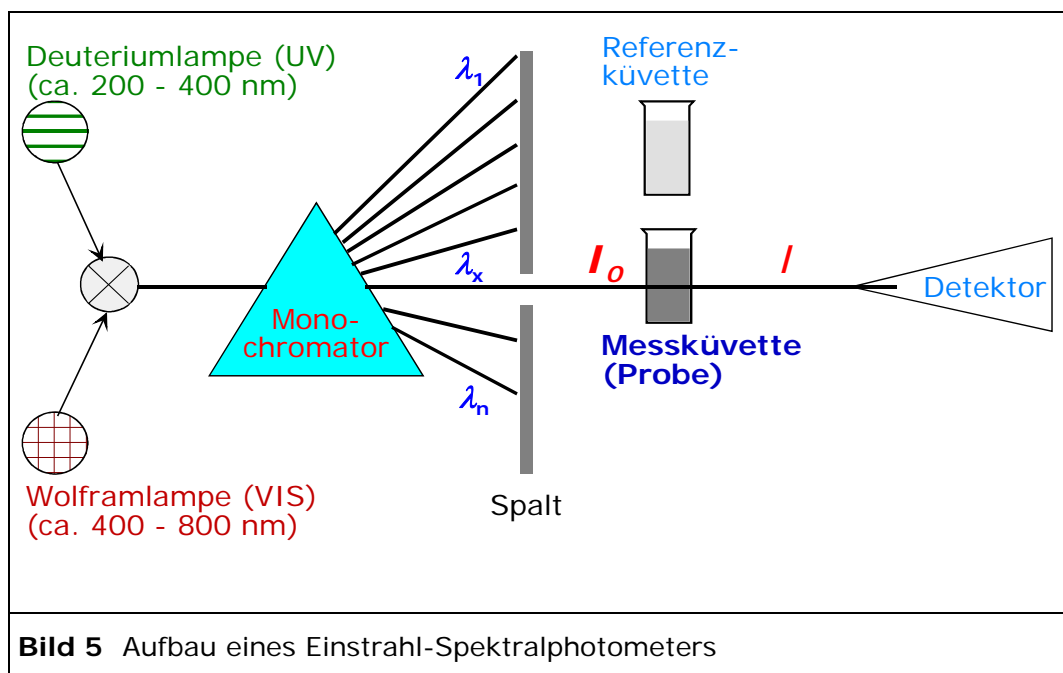
4. **UV/VIS-Spektroskopie**

a) Naturwissenschaftliches Prinzip

Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie.

b) Spektrometer-Aufbau

Die Abbildung 5 zeigt den schematischen Aufbau eines Einstrahl-Spektralphotometers:



Das von einer Lampe ausgehende polychromatische Licht wird in einem Monochromator spektral in einzelne Wellenlängen zerlegt.

Die selektierte Wellenlänge ( $\lambda_x$ ) trifft danach mit der Intensität  $I_0$  auf eine Messküvette, die die in einer Flüssigkeit gelöste Probe – Matrix plus Analyt(e) – enthält.

Bei Einstrahlgeräten wird der Lichtstrahl alternierend auf die Vergleichsküvette geleitet, um Untergrundabsorptionen durch Streuung und Reflexion zu eliminieren.

Ein Detektor (Empfänger) registriert die geschwächte Wellenlänge der Intensität  $I$ .

Als Lichtquellen dienen im UV-Bereich Deuteriumlampen und im sichtbaren Bereich werden Halogen- oder Wolframlampen eingesetzt.

Die Zerlegung des Lichtes erfolgt in einem Monochromator (Filter, Prisma, Gitter).

Während sich Gitter durch eine hohe spektrale Auflösung auszeichnen, ist das Prisma durch seine hohe Lichtintensität gekennzeichnet.

Im sichtbaren Spektralbereich (400–800 nm) werden Glasküvetten eingesetzt.

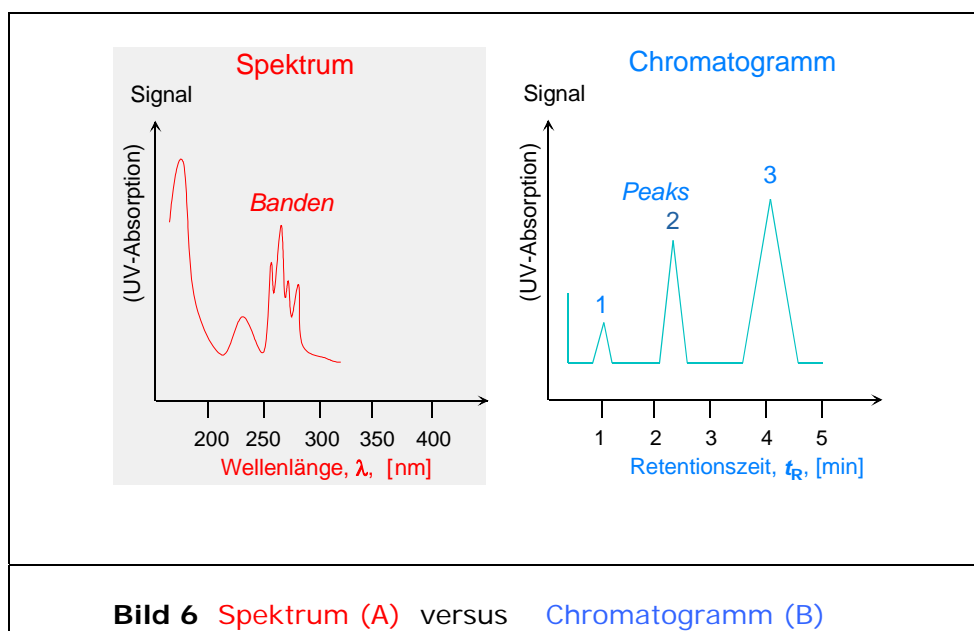
Im UV-Bereich (200–400 nm) müssen auf Grund der Eigenabsorption des Glases hochreine Quarzküvetten verwendet werden.

Als Detektoren dienen sogenannte Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) oder Fotodioden.

### c) Spektrum versus Chromatogramm

Das Ergebnis einer UV/VIS-spektroskopischen Messung ist ein Spektrum, bei dem auf der Ordinate die Intensität der elektromagnetischen Strahlung (z.B. die Absorption) und auf der Abszisse die entsprechenden Wellenlängenbereiche aufgetragen sind (Bild 6).

Demgegenüber erfolgt in einem Chromatogramm die Aufzeichnung der Intensität eines Signals (Absorption) gegen die Zeit; exakter als Retentionszeit bezeichnet (Bild 6, rechts; siehe auch Punkt 5 ff.).



d) Lambert-Beer'sches Gesetz

Das Lambert-Beer'sche Gesetz enthält eine Materialkonstante, die als molarer Extinktionskoeffizient  $\epsilon_\lambda$  (cm<sup>2</sup>/mmol) bezeichnet wird.

Durch Multiplikation mit der Konzentration  $c$  (mol/l) der Probe und der Schichtdicke  $d$  (cm) der Küvette resultiert die Extinktion  $E_\lambda$ , die dimensionslos ist.

Die Extinktion ist der Logarithmus aus dem Quotienten der Intensitäten von einfallender und austretender Strahlung.

$$\log \left[ \frac{I_0}{I} \right]_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d = E_\lambda \quad (1)$$

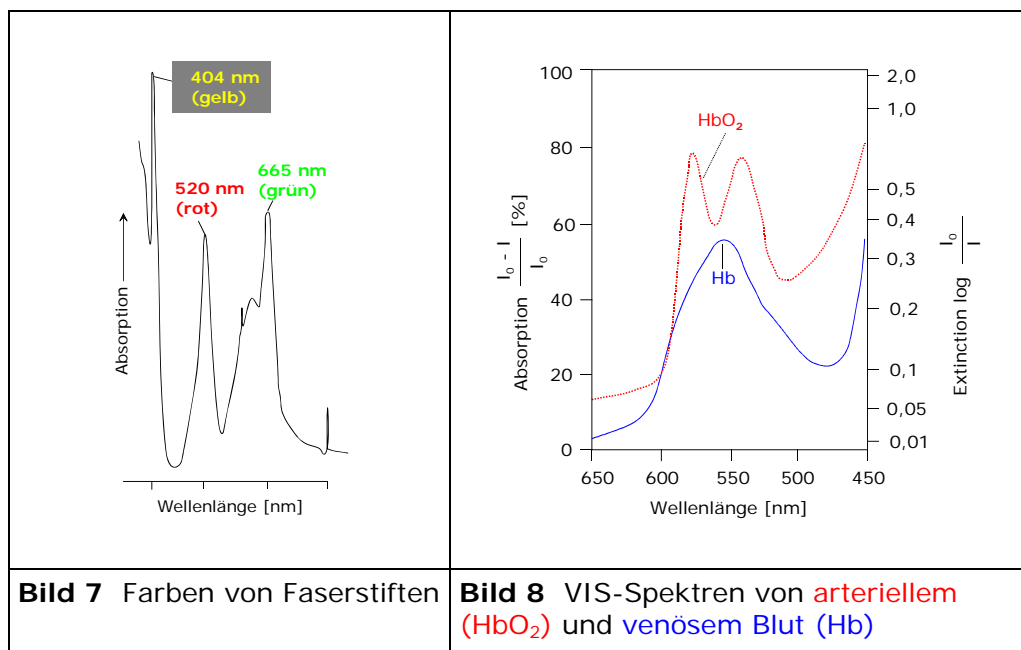
e) Ausgewählte Spektren im UV- und VIS-Bereich

Schließlich sollen noch zwei ganz praktische Beispiele die Aussagemöglichkeiten der UV/VIS-Spektroskopie belegen; vor allem im sichtbaren Spektralbereich.

Farbgemische, die aus gelben, grünen oder roten Tinten bzw. aus entsprechenden Faserstiften resultieren, können hinsichtlich der einzelnen Farben anhand der Absorptionsmaxima zugeordnet werden (Bild 7).

So erscheint bei 404 nm ein Absorptionsmaximum für die Farbe Gelb.

Bei den Maxima 520 nm und 665 nm werden der rote bzw. der grüne Farbstoff registriert.





Signifikant sind auch die Unterschiede in den Spektrenverläufen, wenn man arterielles (sauerstoffreiches) und venöses (sauerstoffarmes) Blut vergleicht (s. Bild 8).

Im praktischen Versuch kann auch Kapillarblut aus der Fingerkuppe entnommen und mit Wasser verdünnt in eine Küvette überführt und im VIS-Bereich vermessen werden. Nach Zugabe eines Reduktionsmittels (Natriumthiosulfat) wird der Sauerstoff entzogen und die Lösung in der Küvette färbt sich blau (Bild 8).

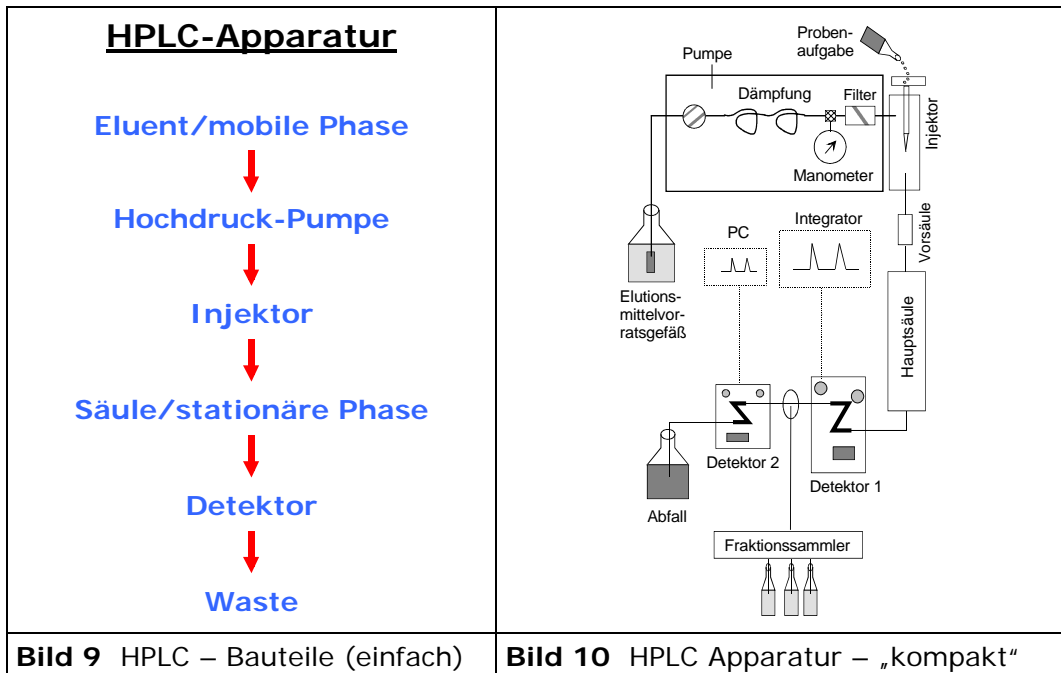
## 5. Reversed-Phase Chromatography, RP-HPLC

### a) Naturwissenschaftliches Prinzip

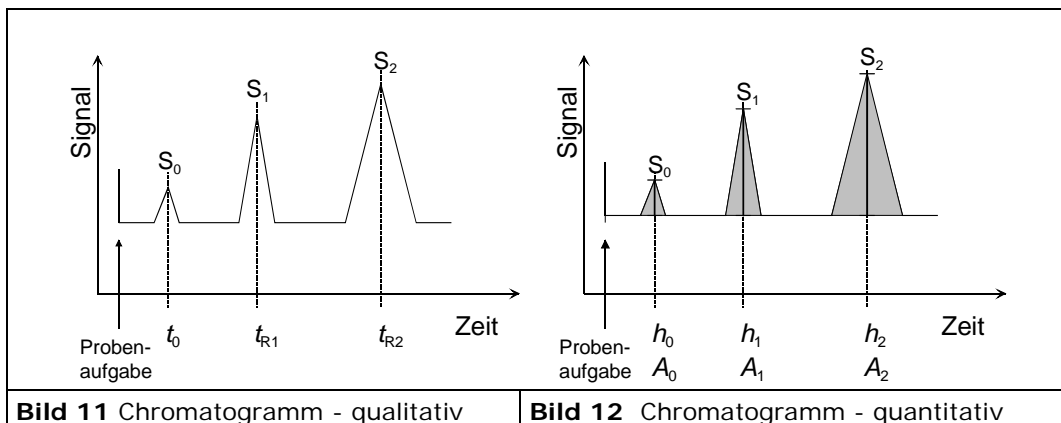
Wechselwirkungen von Analyten mit einer stationären (hier hydrophobes Silicagel) und mobilen Phase (z.B. MeOH/H<sub>2</sub>O).

### b) Aufbau Chromatographie-Apparatur

Der Aufbau einer HPLC-Apparatur ist einfacher, als im Bild 10 dargestellt. Folgendes ist wichtig – siehe linke Seite!



### c) Qualitative und quantitative Bestimmung



In einem Chromatogramm ist ein bestimmtes Signal (z.B. die UV-Absorption) und dessen Intensität gegen die Zeit aufgetragen. Zwei verschiedene Substanzen ( $S_1$  und  $S_2$ ) werden in einer Trennsäule zeitlich verzögert aufgetrennt und erscheinen nach den für sie charakteristischen Retentionszeiten  $t_R$  im Chromatogramm (Abbildung 11).

Die Zeit  $t_0$  der Substanz  $S_0$  wird als Totzeit bezeichnet und repräsentiert ein Molekül oder Ion, welches mit der stationären Phase in keinerlei Wechselwirkungen tritt. Identisch ist diese Zeit mit der Wanderungsdauer Moleküle der mobilen Phase vom Säulenanfang bis zur Registrierung des Peakmaximums in der Detektorzelle.

Grundlage der quantitativen Bestimmung ist die chromatographische Analyse einer entsprechenden Referenzsubstanz mit bekannter Konzentration und die Ermittlung ihrer Peakfläche oder -höhe (siehe Bild 12).

Nach einem zweiten Chromatographie-Lauf, in dem diese Substanz mit unbekannter Konzentration aus einer Probe unter identischen Bedingungen analysiert wird, erfolgt die Quantifizierung mit Hilfe des Dreisatzes.

$$\frac{c_{\text{Probe}}}{A(h)_{\text{Probe}}} = \frac{c_{\text{Test}}}{A(h)_{\text{Test}}} \quad (2)$$

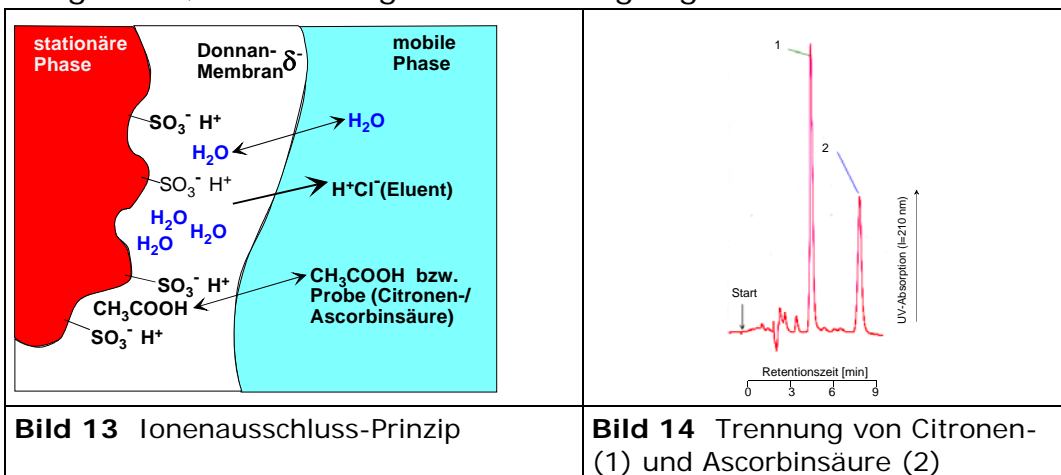
## 6. Ion Chromatography Exclusion, ICE

### a) Chromatographie-Prinzip

Wechselwirkungen von Analyten mit einer stationären (Styren-Divinylbenzen, S-DVB) und mobilen Phase (saurer Wasser mit einem pH-Wert von 3).

### b) Ionen-Ausschluss/HPLC-Chromatogramm

Im Bild 13 sind die Vorgänge einer ICE-Trennung prinzipiell dargestellt; Bild 14 zeigt die Trennung organischer Säuren.



Die stationäre Phase ist sulfoniert und demzufolge negativ geladen. Die Einstellung des pH-Wertes der mobilen Phase Wasser auf 3,0 erfolgt mit HCl. Somit sind im Eluenten negativ geladene anorganische  $\text{Cl}^-$ -Ionen enthalten, die von den  $\text{SO}_3^-$ -Ionen der stationären Phase abgestoßen werden – deshalb „Ionen-Ausschluß“! Chlorid-Ionen werden demzufolge in der Säule nicht zurückgehalten („retardiert“) und erscheinen im Chromatogramm mit der Totzeit  $t_0$ .

Organische Säuren (Citronen- und Ascorbinsäure im Bild 14) dagegen liegen im sauren pH-Bereich ( $\text{pH}=3,0$ ) in undissoziierter Form vor – also nicht ionisch wie Chlorid - sondern relativ unpolar. Somit gehen diese organischen Säuren u.a. hydrophobe Wechselwirkungen mit dem unpolaren Teilen des Styren-Divinylbenzens der stationären Phase ein und werden in der Säule retardiert. Sie erscheinen im Chromatogramm später als aufgetrennte Peaks - mit den Retentionszeiten  $t_{R1}$  und  $t_{R2}$ .

## 7. Thin-Layer Chromatography

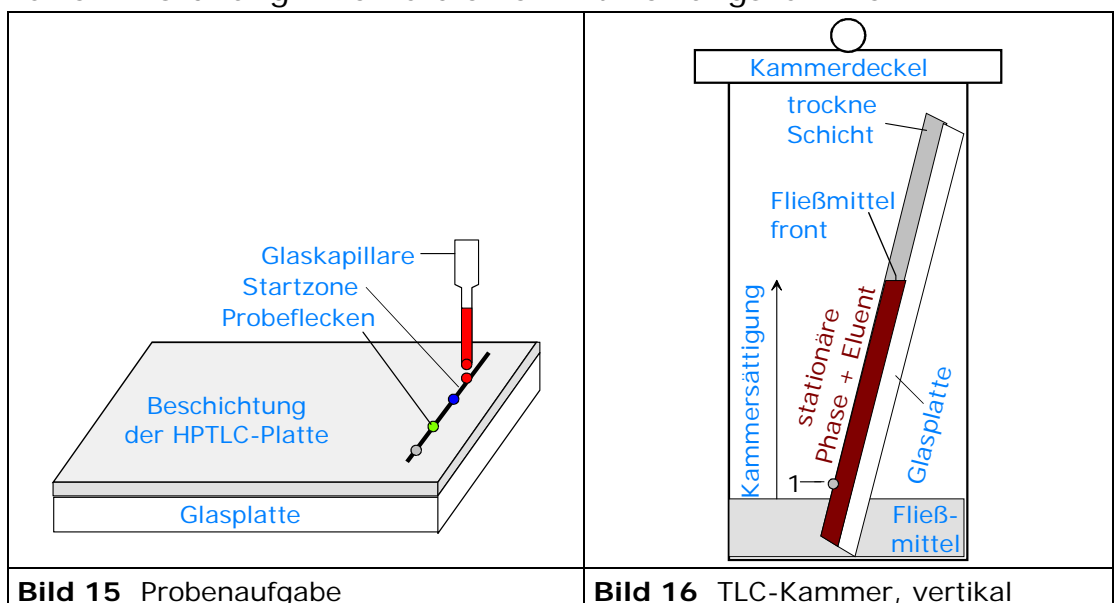
### a) Chromatographie-Prinzip

Wechselwirkungen von Analyten mit einer stationären (Silicagel) und mobilen Phase (Toluol).

### b) TLC-Apparaturen – vertikal/horizontal

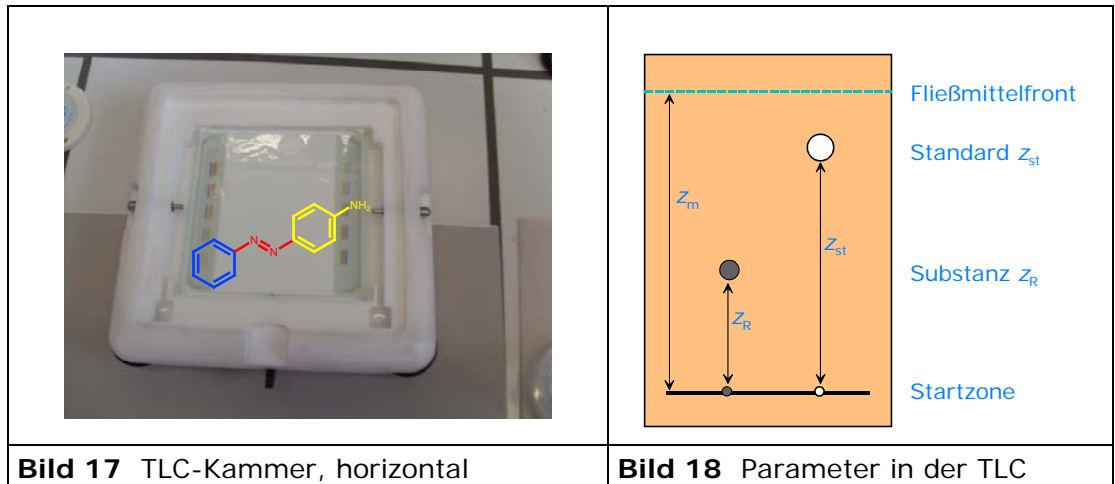
Die Abbildung 15 zeigt das „punktförmige“ Applizieren der Probe auf eine Startzone der stationären Phase mit Hilfe einer dünnen Glaskapillare. Der strichförmige Probenauftrag erfolgt mittels automatisiertem Auftragegerät (ein sogenannter „Linomat“, siehe Praktikum).

Die Entwicklung der Dünnschichtplatte und damit die chromatographische Trennung der Substanzen wird mit einem Fließmittel (der mobilen Phase) durchgeführt Bild 16). Dies erfolgt in vertikaler Anordnung innerhalb einer Entwicklungskammer.





Die horizontale Entwicklung der chromatographischen Trennung wird im Praktikum eingesetzt (siehe Bild 17).



Innerhalb der Auswertung von TLC-Chromatogrammen dient der Retentionsfaktor ( $R_f$ ) als qualitatives Maß, der auch als Verzögerungsfaktor bezeichnet wird.

Er ist als das Verhältnis der Wanderungstrecke des Analyten,  $z_R$ , zur Wanderungstrecke der mobilen Phase ( $z_M$ ) definiert (siehe Abbildung 18 und Gleichungen 3).

Zur Erzielung besserer Reproduzierbarkeiten in der Dünnschichtchromatographie wurde ein Retentionsfaktor ( $R_{st}$ ), eingeführt, der sich auf eine Standardsubstanz ( $z_{st}$ ) bezieht (siehe Gleichung 4 – ist jedoch hier nicht Bestandteil der Versuche).

$$R_f = \frac{z_R}{z_M} \quad (3)$$

$$R_{st} = \frac{z_R}{z_{st}} \quad (4)$$

## 8. Literatur

M. Gey, Instrumentelle Analytik und Bioanalytik, Springer-Verlag 2008, ISBN: 978-3-540-73803-9