



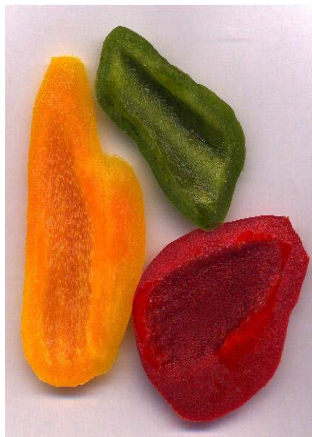
8. Schülerpraktikum zur BIO-Analytik

„Separation Science – Chromatographie“

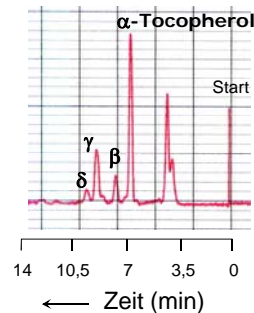
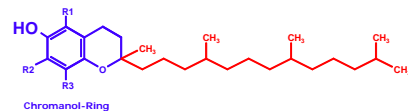
Dienstag 02. März 2010, 9.30 – 16.00 Uhr
Mittwoch 03. März 2010, 9.30 – 16.00 Uhr
Donnerstag 04. März 2010, 8.00 – 17.00 Uhr

Pro-Programm: Versuche 1 - 4

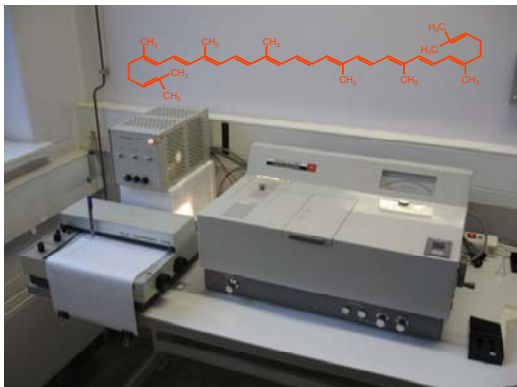
1: HPLC von Vitamin C



2: HPLC von Vitamin E



3: UV/VIS+HPLC v. Lycopin



4: HPTLC von Farbstoffen



Nanomat für die HPTLC



HPTLC von Farbstoffen



HPLC von Vitamin C



HPLC von Vitamin E



Liquid-Liquid-Extraction



Ein Team



Ein weiteres Team

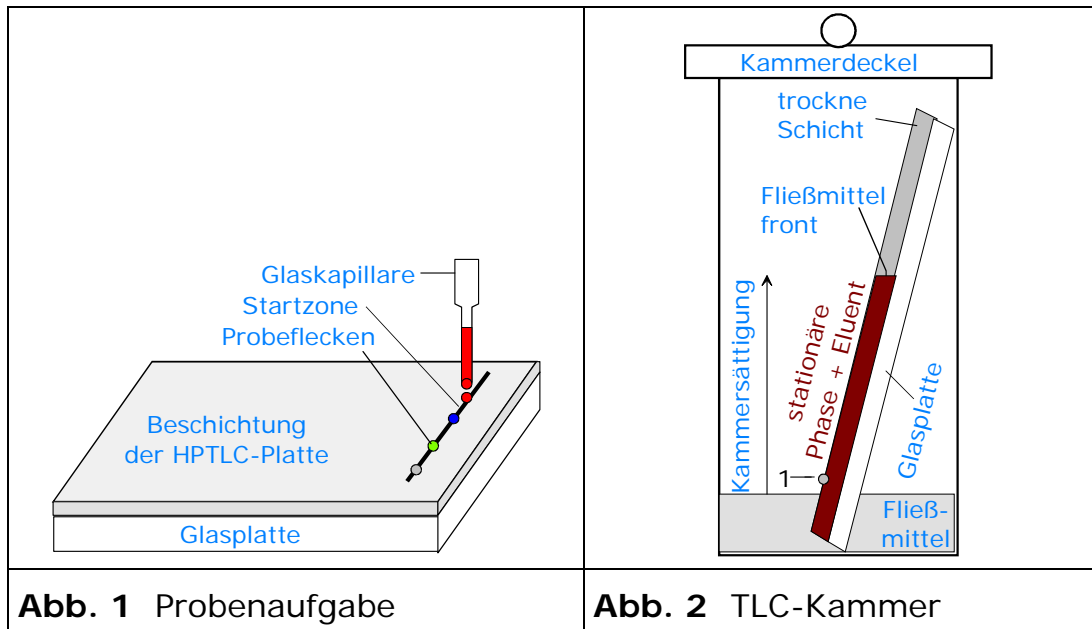


Da sind wir gespannt!



1. Chromatographie

- Eine Analysenprobe besteht aus Analyt(en) und Matrix.
- Die Chromatographie ist eine analytische Trennmethode.
- In der Chromatographie werden die Analyte zwischen einer mobilen und einer stationären Phase verteilt.
- Man unterscheidet zwischen Gas(GC)- und Flüssigchromatographie(LC: *Liquid Chromatography*) – in Abhängigkeit davon, ob die mobile Phase ein Gas oder eine Flüssigkeit ist.
- In der LC existieren die Techniken Papierchromatographie (PC), Dünnschichtchromatographie (DC bzw. TLC: *Thin Layer Chromatography*), die auf Glasplatten oder Folien durchgeführt wird, und **Säulenchromatographie**.
- In den Abbildungen 1 und 2 werden die Grundlagen der DC/HPTLC (HP: *High Performance*) dargestellt (Diskussion erfolgt im Praktikum).

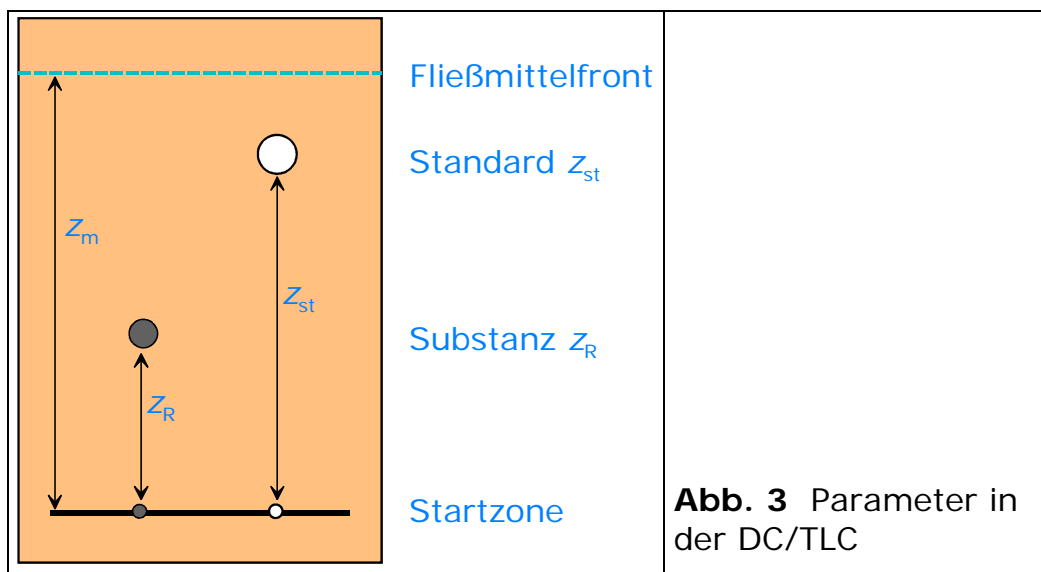


- Innerhalb der Auswertung von TLC-Chromatogrammen dient der Retentionsfaktor (R_f) als qualitatives Maß, der auch als Verzögerungsfaktor bezeichnet wird.
- Er ist als das Verhältnis der Wanderungsstrecke des Analyten, z_R , zur Wanderungsstrecke der mobilen Phase (z_M) definiert (siehe Abbildung 3 und Gleichungen 1/2).

$$R_f = \frac{z_R}{z_M} \quad (1)$$

$$R_{st} = \frac{z_R}{z_{st}} \quad (2)$$

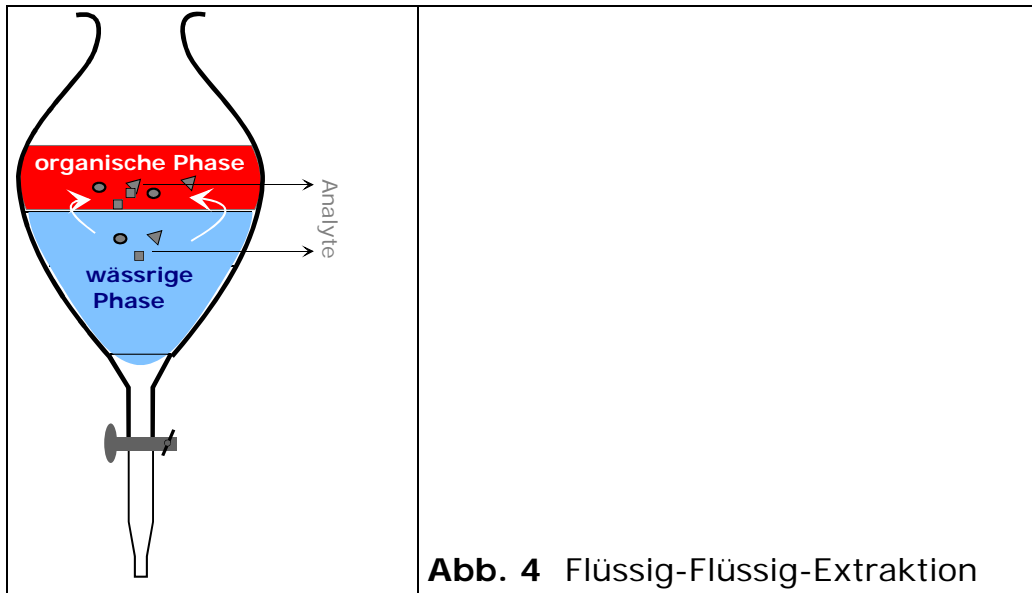
- Zur Erzielung besserer Reproduzierbarkeiten in der Dünnschichtchromatographie wurde ein Retentionsfaktor (R_{st}), eingeführt, der sich auf eine Standardsubstanz (z_{st}) bezieht.



2. Extraktion

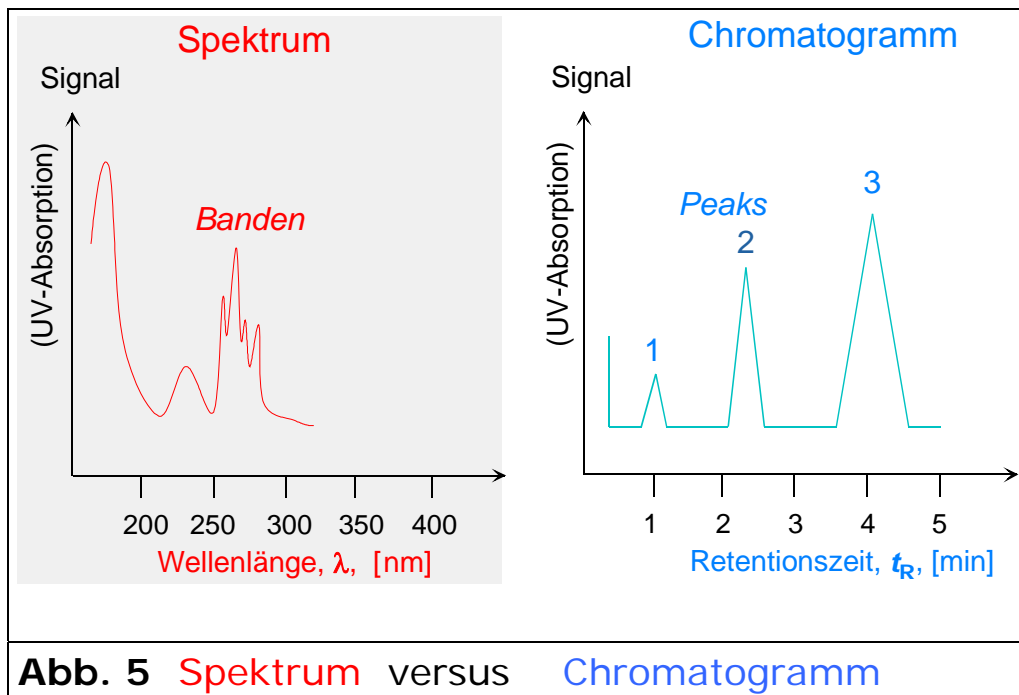
- Unter Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE: *Liquid Liquid Extraction*) versteht man im allgemeinen die Extraktion einer wässrigen Lösung mit einem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel.
- Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion sollte zwischen dem Extraktionsgut und dem Extraktionsmittel ein genügend hoher Dichteunterschied sein, um das Abtrennen beider Phasen zu ermöglichen.
- Die Polarität des Lösungsmittels zum Extraktionsgut muss unterschiedlich sein, damit sich die zu extrahierenden Stoffe nicht ineinander lösen.

- Die Extraktion kann als einfache Variante durch „Ausschütteln“ durchgeführt werden (Abbildung 4).
- Dies ist mit einer einmaligen Gleichgewichtseinstellung verbunden; es resultieren Extrakt und Raffinat.

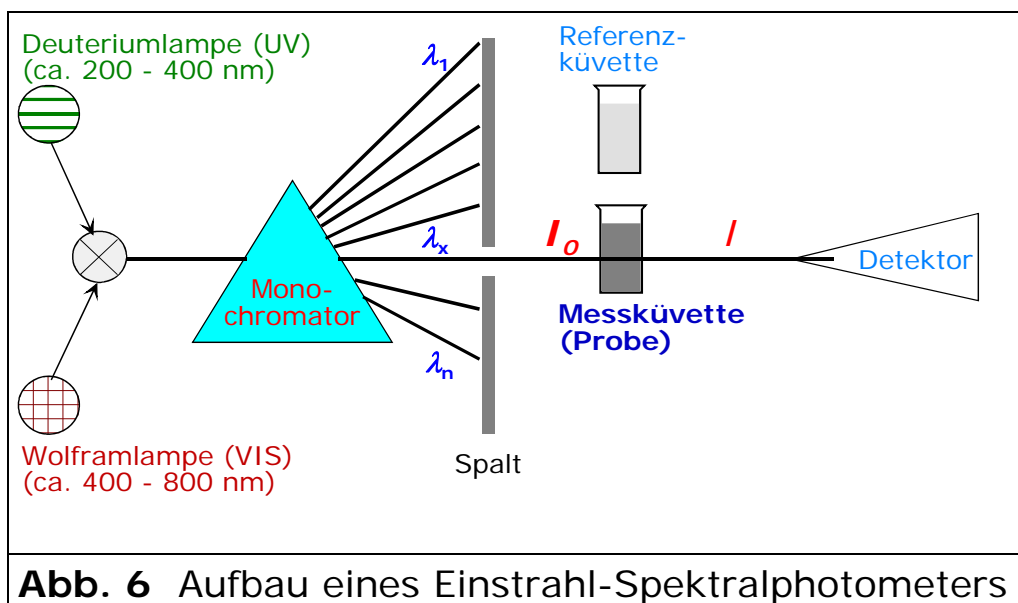


3. UV/VIS-Spektroskopie

- Die Spektroskopie beinhaltet die analytischen Methoden, die auf Wechselwirkungen zwischen elektromagnetischer Strahlung und Materie basieren.
- Materie bedeutet die Gesamtheit des zu analysierenden Probenmaterials (i. d. R. die Analyte).
- Das Gebiet der UV-Strahlung liegt zwischen etwa 200 und 400 nm und der daran anschließende sichtbare Spektralbereich erstreckt sich bis ca. 800 nm.
- Das Ergebnis einer UV/VIS-spektroskopischen Messung ist ein Spektrum, bei dem auf der Ordinate die Intensität der elektromagnetischen Strahlung und auf der Abszisse die entsprechenden Wellenlängenbereiche aufgetragen sind.
- Demgegenüber erfolgt in einem Chromatogramm die Aufzeichnung der Intensität eines Signals (Absorption) gegen die Zeit (siehe Abbildung 5).



- Die Abbildung 6 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 (λ_x) trifft danach mit der Intensität I_0 auf eine Messküvette, 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.

Applikationen aus der UV/VIS-Spektroskopie

- 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 (Abbildung 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.

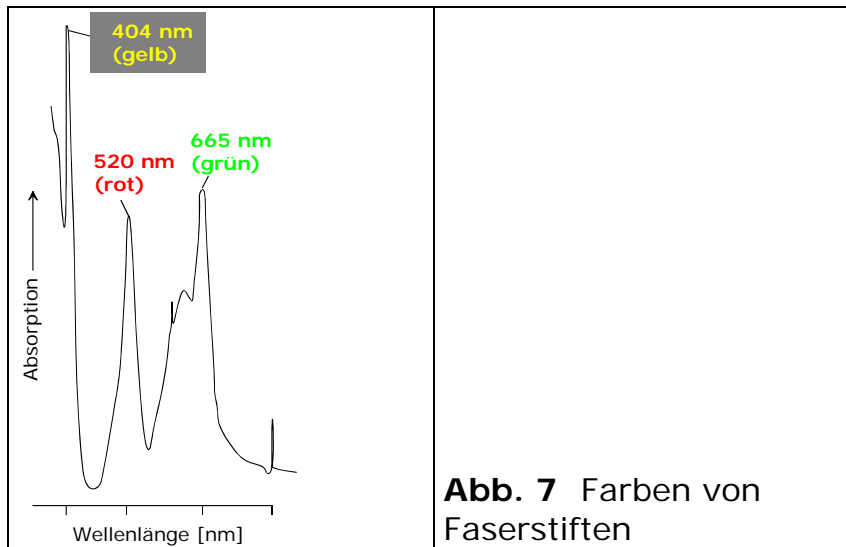


Abb. 7 Farben von Faserstiften

- Signifikant sind auch die Unterschiede in den Spektrenverläufen, wenn man arterielles (sauerstoffreiches) und venöses (sauerstoffarmes) Blut vergleicht.
- Im praktischen Versuch kann auch Kapillarblut aus der Fingerkuppe entnommen und mit Wasser verdünnt in eine Küvette überführt werden.
- In dieser Probe ist Sauerstoff an den roten Blutfarbstoff Hämoglobin (HbO_2) gebunden und das Spektrum im sichtbaren Bereich zeigt um 550 nm zwei charakteristische Absorptionsmaxima (Abbildung 8).
- Durch Zugabe einer kleinen Spatelspitze Natriumthiosulfat direkt in die Messküvette erfolgt die Reduktion des Hämoglobins zu Desoxyhämoglobin.
- Im nachfolgend aufgenommenen Spektrum verschwinden die beiden Absorptionsmaxima und es resultiert eine relativ breit ausgeprägte Bande in diesem Spektralbereich (siehe „Hb-Kurve“).

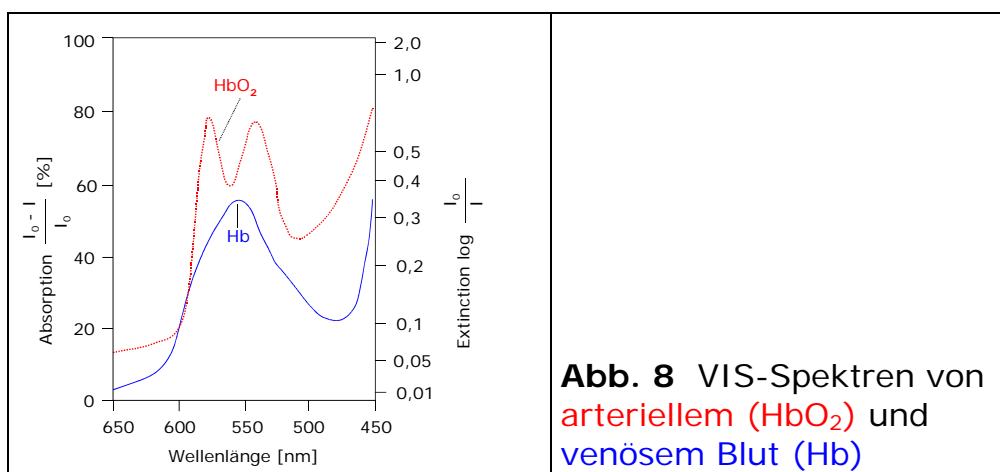


Abb. 8 VIS-Spektren von arteriellem (HbO_2) und venösem Blut (Hb)

Versuch 1:

„Analyse von Vitamin C in Gemüse (Paprikaschoten, Tomaten) und Citrusfrüchten (Apfelsine, Citrone)“

1. Ausgangspunkt und Zielstellung

Vitamine sind lebenswichtige organische Wirkstoffe, die in fettlösliche (Vitamin A, D, E) und wasserlösliche (Vitamin B₁, B₂, B₆, B₁₂ und C) Spezies unterteilt werden. „*Vita*“ bedeutet Leben und „*Amin*“ weist auf die aminartige Reaktion speziell von Vitamin B₂ hin.

Ziel des Versuches ist es, Ascorbinsäure aus Paprikaschoten zu isolieren und den Gehalt dieses Vitamins quantitativ zu bestimmen. Es soll auch ermittelt werden, ob die Mengen an Ascorbinsäure zwischen gelber, grüner und roter Schote annähernd identisch oder signifikant unterschiedlich sind.

Weiterhin sollen die Ascorbinsäuregehalte zwischen den frisch gepressten und den in gelben Plastikfässchen enthaltenen Zitronensäften verglichen werden. Es können auch mitgebrachte Produkte (z. B. Tomaten, Cola, Kiwi etc.) untersucht werden!

2. Kenntnis-/Methodenstand

2.1 Ascorbinsäure (Vitamin C)

Ascorbinsäure ist eine leicht oxidierbare organische Säure und wirkt deshalb antioxidativ. Sie ist sowohl licht- als auch sauerstoffempfindlich.

Der Sammelbegriff *Vitamin C* umfasst neben L-(+)-Ascorbinsäure alle Stoffe, die im Körper zu Ascorbinsäure metabolisiert werden können (z.B. Dehydroascorbinsäure).

Das Fehlen von Ascorbinsäure führt zu Mangelkrankheiten (Skorbut), die sich durch Zahnfleischbluten oder in schweren Fällen auch durch Zahnausfall zu erkennen geben. Bis ins 18. Jahrhundert war Skorbut die häufigste Todesursache auf Seereisen.

1921 gab der Biochemiker Sylvester Zilva einer Zitronensaftmischung, die in der Lage war, Skorbut zu heilen, die Bezeichnung *Vitamin C*.

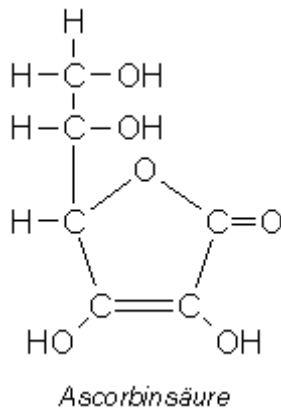


Bild 1 Struktur von Vitamin C

1934 stellte Györgyi fest, dass eine für die Heilung von Skorbut verantwortliche Substanz identisch mit der 1913 entdeckten L-Ascorbinsäure ist. Ebenfalls 1934 gelang Walter Haworth und Tadeus Reichstein erstmalig die Synthese künstlicher L-Ascorbinsäure aus Glucose. Haworth erhielt 1937 für seine Forschungen am Vitamin C den Nobelpreis für Chemie, Szent Györgyi den Nobelpreis für Medizin.

Zur Unterscheidung von dieser synthetisch hergestellten Ascorbinsäure wird ein mittels gentechnisch veränderter Mikroorganismen hergestelltes Vitamin C international mit GMO-Vitamin C (GMO=*genetically manipulated organism*, genetisch veränderter Organismus) bezeichnet. GMO-Ascorbinsäure ist preiswerter; nach diesem Verfahren wird weltweit der größere Teil hergestellt.

Ascorbinsäure findet hauptsächlich als Antioxidans Verwendung. Sie wird vielen Lebensmittelprodukten als Konservierungsmittel unter der Nummer E 300 zugesetzt.

Vitamin C wird zur Prophylaxe von Erkältungen eingesetzt. Diese Anwendung wurde insbesondere in den 1970er Jahren durch den Nobelpreisträger Linus Pauling populär. Eine Analyse von 55 Studien zeigt jedoch, dass Vitamin C Erkältungskrankheiten *nicht* verhindern kann.

Jedoch bei Menschen, die starken körperlichen Anstrengungen (Extremsportler) oder extremer Kälte ausgesetzt sind, scheint Vitamin C eine leicht vorbeugende Wirkung zu haben.

Es gibt Hinweise darauf, dass sich die Dauer einer Erkältung durch das Vitamin C geringfügig verringern lässt.

In weiten Teilen der Welt ist die Versorgung mit Ascorbinsäure relativ gut, der Tagesbedarf eines Erwachsenen beträgt laut Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Ernährung 100 mg.

Die Meinungen hierüber gehen jedoch weit auseinander; die Empfehlungen anderer Gruppierungen liegen zwischen einem Bruchteil (z.B. der Hälfte) und einem Vielfachen (z.B. „so viel wie möglich“) dieses Wertes. Fest steht aber, dass Mengen bis zu 5000 mg kurzzeitig als unbedenklich gelten.

Überschüssige Mengen werden vom Körper über den Urin ausgeschieden, da Vitamin C gut wasserlöslich ist. Ascorbinsäure ($C_6H_8O_6$) ist vor allem im frischen Obst und Gemüse enthalten.

Tabelle 1: Vitamin C-Gehalt einiger Früchte/Gemüse je 100 g, geordnet nach absteigendem Vitamin C-Gehalt

Camu-Camu	2000 mg
Acerolakirsche	1300-1700 mg
Hagebutte	1250 mg
Sanddornbeere	200-800 mg
Schwarze Johannisbeere	189 mg
Grünkohl	105-150 mg
Rosenkohl	90-150 mg
Paprika	100 mg
Ebereschenfrucht	98 mg
Spinat	50-90 mg
Kiwi	90 mg
Erdbeere	50-80 mg
Zitrone	53 mg
Apfelsine	50 mg
Rotkohl	50 mg
Weißkohl	45 mg
Heidelbeere	22 mg
Ananas	20 mg
Sauerkraut	20 mg
Avocado	13 mg
Kulturapfel	12 mg
Banane	10-12 mg
Pfirsich	10 mg
Birna	5 mg

Tierische Organismen und Säuglinge (bis zum 1. Lebensjahr) können es aus Glucose synthetisieren, während der erwachsene Mensch auf die Aufnahme von Ascorbinsäure über die Nahrungskette angewiesen ist.

Als **Hypervitaminose** werden jene Erscheinungen zusammengefasst, die bei übermäßiger Zufuhr der entsprechenden Vitamine, sei es über die Ernährung, in Form von Nahrungsergänzungsmitteln oder Vitaminpräparaten, aber auch bei parenteraler („am Darm vorbei“) Gabe, auftreten können.

Überdosierungserscheinungen treten wesentlich eher bei den fettlöslichen Vitaminen (insbesondere bei den Vitaminen A und D) auf, da diese nicht wie die wasserlöslichen Vitamine über die Niere ausgeschieden werden können. Zudem ist eine Zufuhr in der Größenordnung des 50-100 fachen der empfohlen Tagesdosis nötig, um eine Hypervitaminose zu verursachen.

Ein Vitaminmangel wird mit **Hypovitaminose** und ein Fehlen von Vitaminen mit **Avitaminose** bezeichnet.

Citronensäure ($C_6H_8O_7$) ist auch ein Hauptbestandteil der Citrusfrüchte sowie von vielen Getränken u.a. natürlichen Matrices. Mittels Flüssigchromatographie können beide Säuren getrennt und in komplexen biologischen Matrices bzw. Lebensmitteln und Fruchtsäften qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden.

2.2 Flüssigchromatographie

Die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) ist für die Analytik von fett- und wasserlöslichen Vitaminen sowie von organischen Säuren (z.B. Citronensäure) eine sehr effiziente und empfindliche Methode.

Das naturwissenschaftliche Prinzip dieser Trennmethode sowie die theoretischen und apparativen Grundlagen wurden bereits im Skript „Analytische Chemie“ ausführlich dargelegt.

Für die HPLC-Trennung von Citronen- und Ascorbinsäure dient eine Polyspher®-Säule, die als stationäre Phase einen vollständig sulfonierten Kationenaustauscher auf Polystyrol-Divinylbenzol-Basis enthält.

Als Eluent (mobile Phase) kommt innerhalb dieses Versuches reines Wasser zum Einsatz, das mit verdünnter Schwefelsäure leicht angesäuert wurde (pH = 3,0).

Dieses Trennsystem arbeitet nach dem Ionenausschluss-Prinzip (s. Bild 2). Dabei werden die Sulfonsäuregruppen durch die Wassermoleküle der mobilen Phase hydratisiert. Die Hydrathülle wird durch eine partiell negativ geladene Donnan-Membran begrenzt, die z.B. von nicht dissoziierten Säuren bzw. auch von Ascorbinsäure passierbar ist.

Diese Verbindungen können in die Poren des Styrol-Divinylbenzol-Trennmateriale eindringen, da sie dem Donnan-Ausschluss nicht unterliegen. Weitere Phänomene dieses Trennmechanismus sind Adsorption und sterischer Ausschluss.

Sie werden dadurch unterschiedlich lang in der Säule zurückgehalten (retardiert). Vollständig dissoziierte (anorganische) Säuren (HCl , H_2SO_4) werden von der stationären Phase nicht retardiert (Abstoßung!) und eluieren mit der Durchbruchfront als Cl^- bzw. SO_4^{2-} zur Totzeit (t_0).

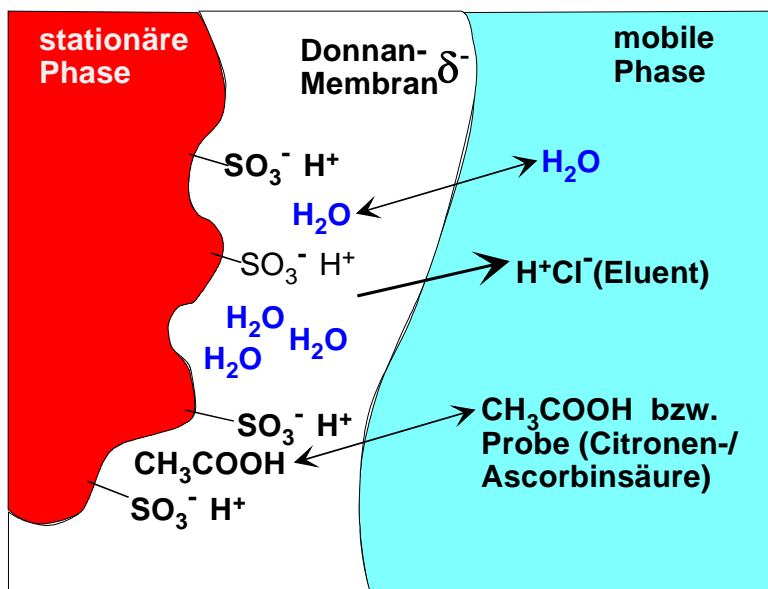


Bild 2 Schematische Darstellung des Ionenausschlussprozesses

3. Material und Methoden

- Paprikaschoten, gelb, grün, rot,
- Zitronen/„Künstlicher Zitronensaft“,
- „Fruchtreihe“ für die Schoten,
- Fruchtpresse, Trichter mit Stativ und Filterpapier,
- diverse Kolben, destilliertes Wasser, 500 μl -Spritze,
- Präparation von Standards u. verdünnten Probelösungen,
- Ionenausschlusschromatographie mit UV-Detektion (Wellenlänge λ i.d.R im Bereich 210 bis 250 nm).

4. Versuchsdurchführung

- Die Paprikaschoten werden zur Gewinnung des Saftes gerieben und anschließend filtriert.
- Die Zitrusfrüchte werden ausgepresst – der Saft (auch der aus der Plastik-Zitronen) werden filtriert.
- Die gewonnenen Proben werden zentrifugiert (10 min bei einer Geschwindigkeit 13 000 g, Zimmertemperatur).
- Danach erfolgt eine Verdünnung von 1:10 V/V mit entionisiertem Wasser (z.B. 500µl Saft in einem 5 ml-Kolben auffüllen; ggf. sollte auch der auch der Eluenten zum Verdünnen dienen!).
- Aufnahme von UV-Spektren für Citronen- und Ascorbinsäure im Bereich von 370 – 220 nm.
- Applizieren der Test- und Probelösungen in das LC-System durch den Laborverantwortlichen bzw. nach Absprache.

5. Versuchsauswertung

- I. Darstellung der Retentionsdaten für Citronensäure und Ascorbinsäure.
- II. Diskussion der UV-Spektren von Citronen- und Ascorbinsäure.
- III. Ausweisen der apparativen Parameter.
- IV. Beschreiben Sie sehr exakt den ICE-Trennmechanismus!
- V. Darstellung bzw. Einscannen und Beschriftung der Spektren und Chromatogramme.
- VI. Vergleichen Sie die ermittelten Vitamin C-Gehalte in frisch gepressten und „künstlichen“ Zitronensäften. Welche Schlussfolgerungen resultieren?
- VII. Welche farbige Paprikaschote hat die höchsten - welche die niedrigsten Vitamin C-Gehalte?

6. Vorbereitungen zum Testat

- a) Erläutern Sie die Probenvorbereitungen!
- b) Wie erfolgt die quantitative Analyse von Vitamin C?
- c) Erklären Sie den Aufbau einer LC-Apparatur.
- d) Wie funktioniert die Ionenausschlusschromatographie?
- e) Was sind Vitamine und wie werden sie unterteilt?

- f) Nennen Sie einzelnen Vertreter der Vitamine.
- g) Wozu dienen Vitamine? Nennen Sie Beispiele.
- h) Welche Produkte enthalten besonders viel Vitamin C?
- i) Was sind **Hypovitaminose** und **Hypervitaminosen**?

7. Informationsquellen

- 1) Vorlesung Instrumentelle Bioanalytik am **06.01.2010!**
- 2) Buch „Instrumentelle Analytik und Bioanalytik“.
- 3) Skript „Analytische Chemie“.
- 4) Internet.

8. Ausgewählte Ergebnisse

Im Bild 3 ist eine chromatographische Trennung von Citronen- und Ascorbinsäure mittels Ionenausschlusschromatographie (ICE: ion chromatography exclusion) dargestellt. Die Elution erfolgte an einer Polyspher-Säule und als mobile Phase diente entionisiertes Wasser, welches mit Schwefelsäure auf einen pH-Wert von 3,0 eingestellt wurde.

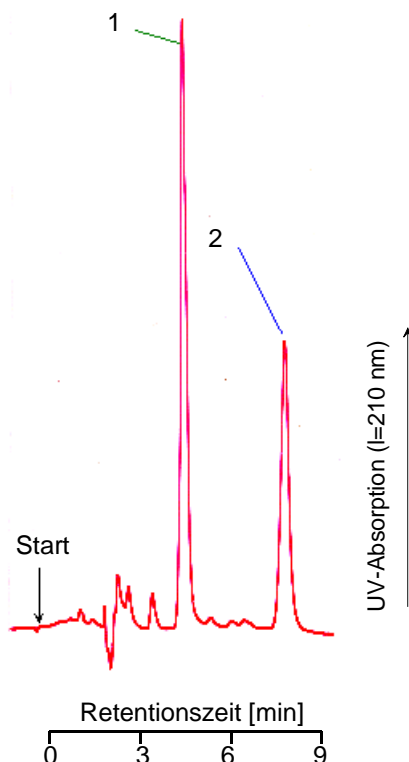


Bild 3 Chromatographische Trennung von Citronensäure (1) und Ascorbinsäure (2) mittels ICE

Versuch 2:

„Isolierung von fettlöslichen Vitaminen aus Margarinen/Olivenölen und Detektion von α -, β -, γ - und δ -Tocopherolen mittels Fluoreszenzspektroskopie“

1. Ausgangspunkt und Zielstellung

Vitamine sind lebenswichtige organische Wirkstoffe, die in fettlösliche (Vitamin A, D, E) und wasserlösliche (Vitamin B₁, B₂, B₆, B₁₂ und C) Spezies unterteilt werden. „*Vita*“ bedeutet Leben und „*Amin*“ weist auf die aminartige Reaktion von Vitamin B₂ hin.

Vier der Vitamin E- Formen werden **Tocotrienole** (Bild 1) genannt. Die anderen bisher bekannten vier Formen von Vitamin E bezeichnet man als **Tocopherole** (Bild 2) [abgeleitet von den altgriechischen Wörtern: *tókos* „Geburt“ und *phérein* „tragen“, „bringen“]. Es existieren α -, β -, γ - und δ -**Tocopherol**.

Ziel des Versuches ist, die isomeren Tocopherole aus Margarinen, Oliven- und Badeölen zu isolieren und entsprechend aufzuarbeiten (Lösen, Filtrieren, Zentrifugieren), um klare Lösungen zu erhalten. Diese sollen mit LC-Fluoreszenzspektroskopie analysiert werden. Die Ergebnisse der analysierten Proben sind untereinander hinsichtlich der α -, β -, γ - und δ -Tocopherole zu vergleichen und zu diskutieren.

2. Kenntnis-/Methodenstand

2.1 Vitamin E (Tocopherole)

Vitamin E ist Bestandteil aller Membranen tierischer Zellen. Es wird jedoch nur von photosynthetisch aktiven Organismen wie Pflanzen und Cyanobakterien gebildet.

Tocopherole sind auch Bestandteil von Kosmetika (Hautcreme, Lotionen), da von den Herstellern gesundheitsfördernde Effekte bei der Hautregenerierung oder Narbenheilung nach Verbrennungen postuliert werden. Bekannt sind auch antioxidative Wirkungen zur Beseitigung von Radikalen.

Dies ist auf den **Chromanolring mit Hydroxylgruppe** (Bild 2), die durch die Bereitstellung eines Wasserstoffatoms die Radikale eliminiert, zurückzuführen. Der hydrophobe Rest des Moleküls ermöglicht das Eindringen in biologische Membranen (Bild 3).

Häufig wird der Begriff Vitamin E „fälschlicherweise“ allein für α -Tocopherol, die aktivste Form aller Vitamin E-Formen, verwendet.

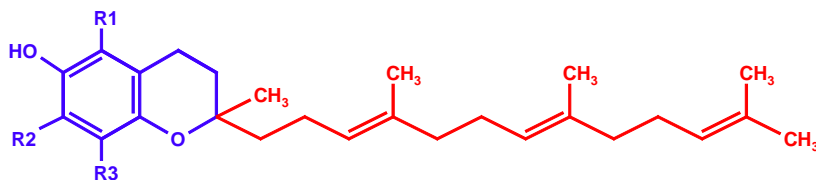


Bild 1 Strukturen der Tocotrienole

Form	R1	R2	R3
Alpha	CH ₃	CH ₃	CH ₃
Beta	CH ₃	H	CH ₃
Gamma	H	CH ₃	CH ₃
Delta	H	H	CH ₃

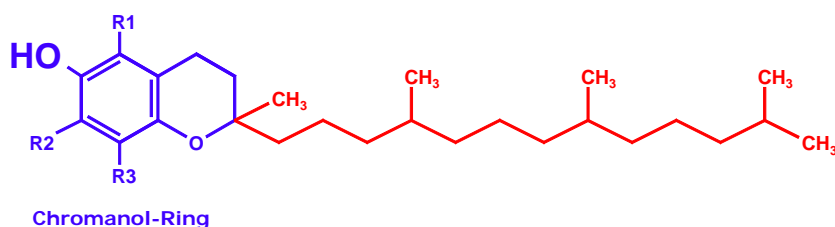


Bild 2 Strukturen der Tocopherole

Auf Grund seiner Struktur, kann Vitamin E mit seinem hydrophoben Molekülteil in die Lipiddoppelschicht eindringen und den Organismus gegen oxidativen Angriff schützen (Bild 3).

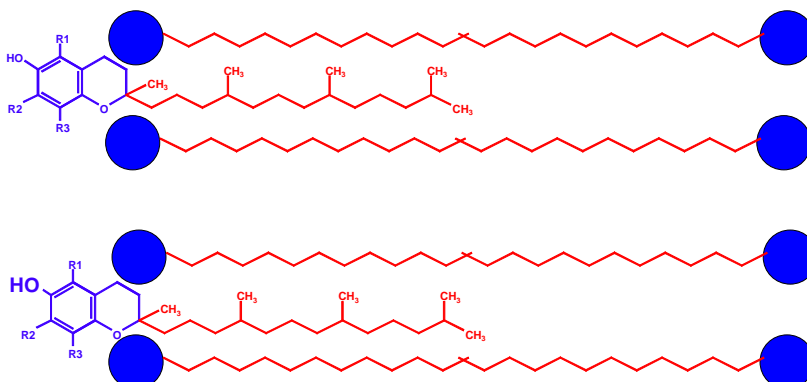


Bild 3 Einfügung von Vitamin E in die Lipidmembran

2.2 Vorkommen

Tocopherole kommen vor allem in pflanzlichen Lebensmitteln vor (Getreide, Nüsse, Samen, Pflanzenöle, Keimöle, kaltgepresste Speiseöle guter Qualität). Olivenöl, Milch und Eier sind weitere häufig genannte „Vitamin-E-Lieferanten“, aber auch viele Gemüse-, Obstsorten sowie grüne Salate enthalten dieses Antioxidans.

Besonders reiche Vitamin-E-Quellen sind:

- Weizenkeimöl (174-176 mg/100 g),
- Leinsamen (57 mg/100 g),
- Sonnenblumenöl (50-62 mg/100g),
- Walnussöl (39 mg/100 g),
- Maiskeimöl (31-34 mg/100 g),
- Distelöl (29-44 mg/100 g),
- Sesamöl (28 mg/100 g),
- Haselnüsse (27 mg/ 100 g),
- Sojaöl (17-25 mg/100 g),
- Erdnussöl (25 mg/100 g),
- Mandeln (25 mg/100 g),
- Palmöl (25 mg/100 g),
- Sonnenblumenöl (25 mg/100 g),
- Margarine (14 mg/100 g),
- Olivenöl (12 mg/100 g),
- Schwarzwurzeln (6 mg/100 g),
- Leinöl (5,8 mg/100 g).

Wegen seiner antioxidativen Wirkung wird Vitamin E als Zusatzstoff (E 306-309) auch Lebensmitteln, Kosmetika (Sonnenschutzmitteln) und Anstrichmitteln beigelegt.

2.3. Bedarf

5-30 mg pro Tag. Empfohlene Tagesdosis bei Erwachsenen: 12 mg (Frauen)/14 mg (Männer) pro Tag. Schwangere und Stillende haben einen erhöhten Bedarf. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung empfiehlt Männern wie Frauen eine tägliche Aufnahme von 22 Internationalen Einheiten (IU) an Vitamin E. Von den Lebensmitteln sind besonders Pflanzenöle, Nüsse und grüne Salate reich an Vitamin E.

2.4 Mangelerscheinungen (Hypovitaminose)

Mangelerscheinungen beim Menschen sind bislang nicht bekannt, da alle Formen des Vitamin E offenbar ausreichend in der Nahrung vorhanden sind. Vermutet werden:

- trockene, faltige Haut,
- Konzentrationsstörungen,
- Leistungsschwäche,
- Müdigkeit,
- Reizbarkeit,
- schlecht heilende Wunden,
- Begünstigung von Arteriosklerose.

2.5 Folgen einer Überdosierung (Hypervitaminose)

- starke Überdosierung: Behinderung der Aufnahme von Vitamin A und Vitamin K,
- Übelkeit, Erbrechen, Magen-Darm-Beschwerden,
- Erschöpfung, Muskelschwäche,
- Verschlechterung der Blutgerinnung (vereinzelt in sehr hohen Dosen),
- Verschlechterung von Diabetes mellitus, Bluthochdruck und Angina Pectoris (Erkrankung der Herzkranzgefäße und damit verbundene anfallartig auftretende Schmerzen hinter dem Brustbein),
- Lebensgefahr.

2.6 Fluoreszenzdetektion

Die Fluoreszenz beruht darauf, dass Lichtquanten (Photonen) von einem Molekül absorbiert und danach von diesem Molekül in Form einer Emissionsstrahlung wieder abgegeben werden.

Die Lichtquelle sendet über ein optisches System mit Anregungsfilter eine vorgegebene Extinktionswellenlänge (λ_{ex}) direkt auf die Mikrodurchflussküvette (s. Bild 4).

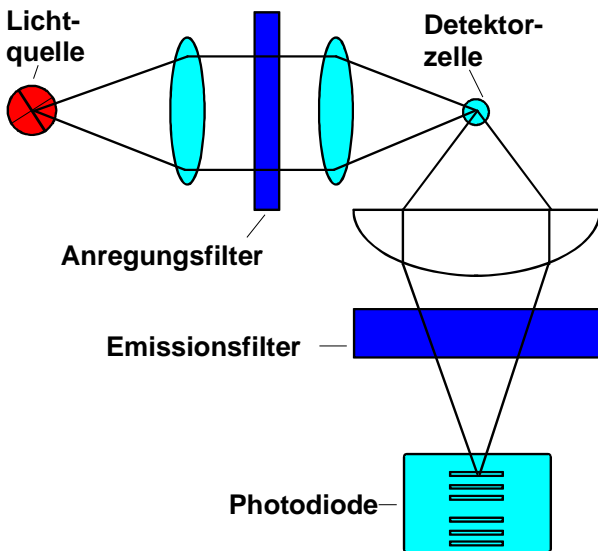


Bild 4 Prinzipieller Aufbau eines Fluoreszenzdetektors

Diese elektromagnetische Strahlung wird von den darin enthaltenen Molekülen absorbiert und senkrecht zur Strahlungsebene über einen Emissionsfilter in Form einer Emissionswellenlänge (λ_{em}) auf den Photodioden detektiert.

Dabei wird ein Elektron von einem Grundzustand in einen höheren angeregten Zustand unter Absorption (λ_{ex}) von Photonen überführt. Danach erfolgt ein sogenannter "strahlungsloser Übergang" dieses Elektrons auf ein geringfügig tiefer liegendes Energieniveau innerhalb des angeregten Energiebereiches (Bild 5).

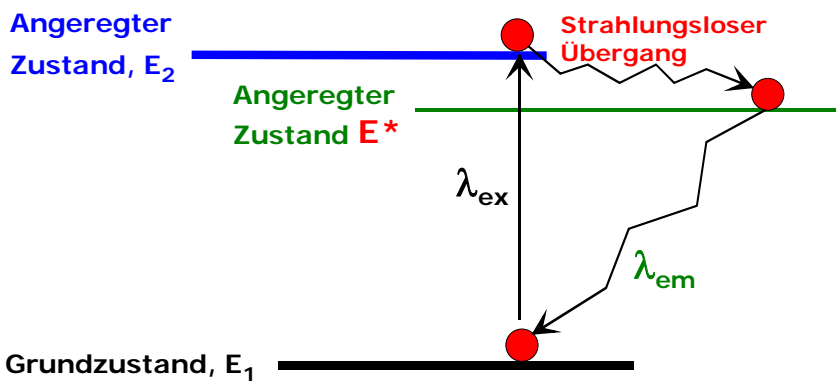


Bild 5 Energieterm (schematisch)

Somit wird die Energiedifferenz zum Grundzustand etwas geringer und beim Zurückspringen des Elektrons in diesen Ausgangszustand wird demzufolge die emittierende Lichtstrahlung (λ_{em}) zu größeren Wellenlängen hin verschoben (Bild 6).

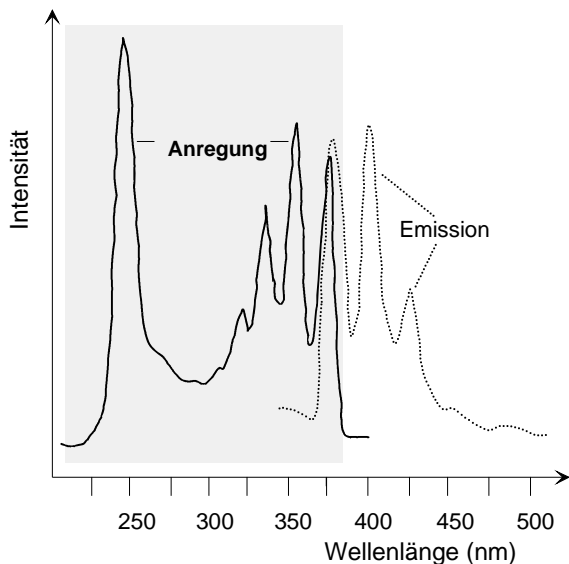


Bild 6 Anregungs- und Emissionsspektrum von Anthracen

Dieser Zusammenhang geht auch aus den folgenden Formeln (1) hervor, wobei h das Planck'sche Wirkungsquantum, ν die Frequenz, c die Lichtgeschwindigkeit und λ die Wellenlänge sind.

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h \cdot \nu = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (1)$$

Diese Beziehung zeigt auch, dass kürzere Wellenlängen eines Spektralbereiches (UV: 200-400 nm) energiereicher als langwelliges Licht (Infrarotbereich > 800 nm) sind, da die Wellenlänge der Energie umgekehrt proportional ist.

3. Material und Methoden

- Margarine (Lätta, Rama, Du darfst, Becel, Sonja), Butter, Olivenöle, Badeöle u.a., Lösungsmittel: Heptan, Isooctan.
- LC- HPLC-Apparatur mit Fluoreszenzdetektor:
($\lambda_{\text{ex}} = 295 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 330 \text{ nm}$), Response: 1, Fctr: 1024,
- Säule: 250 x 4,6mm i.D., (ggf. andere Säulenkombination),
- Stationäre Phase: Silicagel (Nucleosil), $dp = 5 \mu\text{m}$,
- Mobile Phase: Hexan/Isopropanol 98% : 2% V/V,
- Flussrate: 1,0 ml/min,
- Vordruck: 24 bar,
- Dosiervolumen: 20 μl ,
- Schreiber: 4mm/min.

4. Versuchsdurchführung

4.1. Herstellen der Stammlösung α -Tocopherol:

Das α -Tocopherol ist bei RT nur wenig beständig und muss bei + 4°C im Kühlschrank gelagert werden! Die Konzentration der Stammlösung beträgt 1 mg/ml und als Lösungsmittel dient Isooctan zur *Spektroskopie*.

Es erfolgt eine Einwaage von 10 mg α -Tocopherol in einem 20 ml Becherglas. Anschließend werden ca. 5-7 ml Isooctan zugesetzt und danach 5 min im Ultraschallbad bei RT homogenisiert.

Anschließend wird die Lösung quantitativ in einen 10 ml- Kolben überführt, auf 10 ml mit Isooctan aufgefüllt und gut geschüttelt. Falls schwerlösliche Begleitstoffe vorhanden sind, sollen sich diese noch absetzen (ca. 10-15 min). Es soll auch im Praktikum geprüft werden, ob eine Filtration oder Zentrifugation der Lösungen zur weiteren Realisierung von klaren Lösungen geeignet sind (Rücksprache mit dem Laborleiter).

4.2. Herstellen der Verdünnungen:

100 μ l Stammlösung werden entnommen und in einem 10ml- Kolben mit Isooctan aufgefüllt (Verdünnung: 1:100 V/V , entspricht **Lösung A**).

Von Lösung A ist eine weitere Verdünnung 1:100 V/V herzustellen (= **Lösung B**).

4.3. Herstellen der Stammlösungen von verschiedenen Margarinen, Oliven- und Badeölen

Ca. 1 g Vitamin E haltiges Lebensmittel werden in einem 20 ml Bechglas eingewogen (ggf. 2 Spatel dazu verwenden!). Danach erfolgt die Präparation einer Stammlösung, wie unter Punkt 1 beschrieben.

Für die Fluoreszenzanalyse und UV/VIS-Spektroskopie wird eine Verdünnung im Volumenverhältnis 1:10 V/V hergestellt (Lösungsmittel: Isooctan).

4.4. Separation von α -, β -, γ - und δ -Tocopherolen an polaren Silicagelphasen mit Fluoreszenzdetektion

Die meisten Versuchsbedingungen sind bereits im Punkt 3 „Material und Methoden“ enthalten. Weitere Rücksprachen mit dem Laborleiter sind erforderlich!.

5. Versuchsauswertung

- I. Darstellung der Retentionsdaten für α -, β -, γ - und δ -Tocopherole.
- II. Ausweisen der apparativen Parameter.
- III. Einscannen und Beschriftung ausgewählter Chromatogramme und qualitative Diskussion zur Verteilung der einzelnen Tocopherole.
- IV. Qualitative/"quantitative" Auswertung der Chromatogramme hinsichtlich von α -, β -, γ - und δ -Tocopherol.
- V. Vergleichen und diskutieren Sie die Trennsysteme zur Analyse von Vitamin C und Vitamin E!

6. Vorbereitungen zum Testat

- a) Wie erfolgt die Aufarbeitung der Produkte zur Bestimmung des Vitamin E-Gehaltes?
- b) Welches stationären und mobilen Phasen werden zur LC von Vitamin E eingesetzt und warum?
- c) Zeichnen Sie die Struktur der Tocopherole.
- d) Welche strukturellen Unterschiede bestehen zwischen α -, β -, γ - und δ -Tocopherolen? Wie signifikant sind diese Unterschiede, wenn man Basislinientrennung der Species erzielen möchte?
- e) Ziehen Sie Vergleiche zu dem Trennsystem, das zur chromatographischen Trennung von Vitamin C verwendet wird!
- f) Erklären Sie die Fluoreszenzspektroskopie!
- g) Welche Produkte erhalten viel Vitamin E?
- h) Weshalb schützt Vitamin E die Lipidmembranen?

7. Informationsquellen

- Vorlesung Instrumentelle Bioanalytik am 06.01.2010.
- Buch „Instrumentelle Analytik und Bioanalytik“.
- Skript „Analytische Chemie“.
- Internet.

8. Ausgewählte Ergebnisse

Ausgewählte Chromatogramme verschiedener Margarinen sind in den Abbildungen 7 und 8 dargestellt.

Diese Peaksignale können hier nur halbquantitativ bzw. von der „Tendenz“ her verglichen werden.

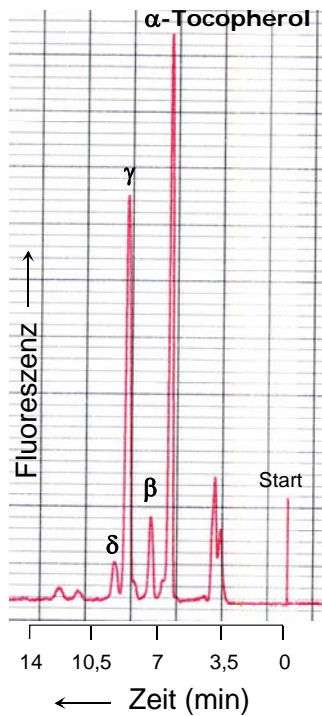


Bild 7 HPLC von "Rama"
 $c = 100,9 \text{ mg/ml}$,
 $V = 20 \mu\text{l}$: $m = 2,02 \text{ mg}$.

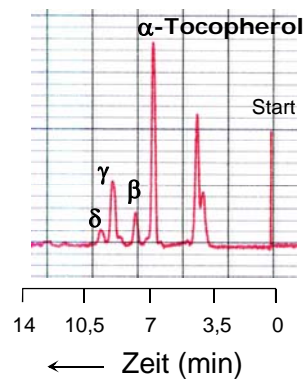


Bild 8 HPLC von "Lätta"
 $c = 100,3 \text{ mg/ml}$,
 $m = 2,01 \text{ mg}$.

Versuch 3:

„Extraktion von Lycopin aus Tomatenprodukten mit organischen Lösungsmitteln“

1. Ausgangspunkt und Zielstellung

Lycopin (Lycopen) ist das wichtigste Carotinoid. Es verleiht den Tomaten und Hagebutten die rote Farbe.

Reife Tomaten haben einen besonders hohen Lycopinanteil. Er liegt bei ca. 3,9 - 5,6 mg pro 100 g reife Tomaten. Wesentlich mehr Lycopin enthalten Dosentomaten: ca. 10 mg pro 100 Gramm Doseninhalt. Dosentomaten werden meist erst in reifem Zustand geerntet und enthalten deshalb mehr von diesem, höchstwahrscheinlich gesundheitsfördernden Inhaltstoff.

Konzentriertes Tomatenmark enthält sehr hohe Lycopinkonzentrationen (circa 62 mg Lycopin pro 100 Gramm).

Ziel des Versuches ist, Lycopin mittels Hexan (Pentan) aus Tomatenmark und Tomatenschalen zu extrahieren.

Die so gewonnenen Lösungen stehen als Proben für zukünftige analytische Messungen mittels UV/VIS-Spektroskopie und Hochleistungsflüssigchromatographie zur Verfügung.

2. Kenntnis-/Methodenstand

Lycopin ist ein ungesättigter Kohlenwasserstoff mit der Summenformel $C_{20}H_{56}$ (Bild 1).

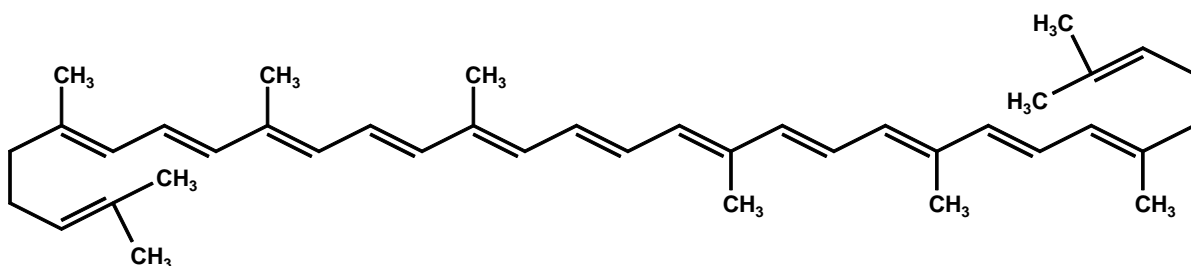


Abb. 1 Struktur von Lycopin

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.

Lycopin wird mit organischen Lösungsmitteln Hexan, (Dichlormethan, Methanol) aus Tomatenkonzentraten gewonnen; 1 kg Tomaten enthalten ca. 20 mg Lycopin. Es wird vor allem zur Färbung von herzhaften Produkten, Suppen und Soßen, wo der Beigeschmack nach Tomate nicht stört, eingesetzt.

3. Material und Methoden

- Tomatenmark, (Tomatenprodukte),
- Hexan zur Spektroskopie,
- Bechergläser,
- Abfallbehältnisse (Waste),
- Dosierspritzen.

4. Versuchsdurchführung

- 1) Ca. 10 g Tomatenmark aus der Labortube sind einzuwägen.
- 2) Die Probe wird mit 50 ml Hexan im Becherglas vereinigt.
- 3) Danach erfolgt die Extraktion im Ultraschallbad (10 min).
- 4) Für weitere Experimente (UV/VIS-Spektroskopie, HPLC) sind die Lösungen zu filtrieren und/oder zu zentrifugieren.

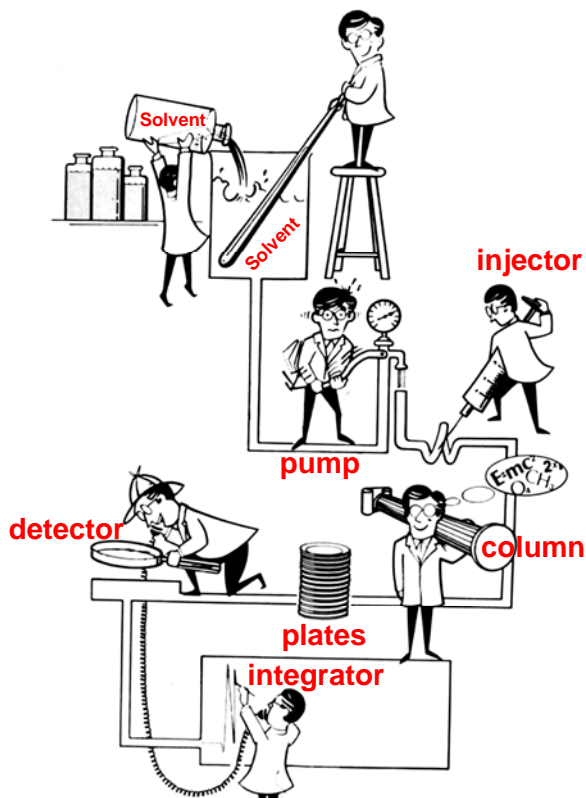
5. Versuchsauswertung

- 1) Notieren Sie Ihre Beobachtungen hinsichtlich Löslichkeit, Aussehen nach der Extraktion mit Hexan.
- 2) Aufnahme des UV/VIS-Spektrums und Interpretation.
- 3) Aufnahme eines HPLC-Chromatogramms.

6. Vorbereitung auf das Testat

- 1) Was ist Lycopin?
- 2) Wie hoch ist Konzentration im Tomatenmark?
- 3) Welche positiven gesundheitlichen Merkmale besitzt es?
- 4) Was sind Antioxidantien?

Liquid Chromatography



Der Optimist
sieht in jeder
Schwierigkeit
eine Gelegenheit.
Der Pessimist
sieht in jeder
Gelegenheit eine
Schwierigkeit.

Günter F. Gross

Versuch 4:

„Trennung von Farbstoffen mittels Dünnschichtchromatographie“

Versuch ist neu – Anleitung im Praktikum!

