

ANHANG A – VERSUCHSANLEITUNGEN ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG VON PFLANZENFARBSTOFFEN









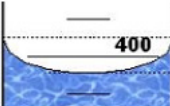
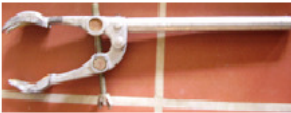



Allgemeine Hinweise:

- Bei Geräten auf Sauberkeit und Wasserfreiheit achten!
- Geräte immer beschriften!
- Quantitative Arbeit, daher immer genau arbeiten.
- Sicherheitsaspekte beachten, R und S Sätze beachten.

Sicherheitshinweise:

- ❖ Laborbrille und Labormantel tragen.
- ❖ Natriumsulfat:
 - **S 22** Staub nicht einatmen.
 - **S 23** Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
 - **S 24/25** Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden.
- ❖ Cyclohexan:
 - **R 11** Leichtentzündlich.
 - **R 38** Reizt die Haut.
 - **R 65** Gesundheitsschädlich: Kann beim Verschlucken Lungenschäden verursachen.
 - **R50/53** Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
 - **S 9** Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren.
 - **S 16** Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen.
 - **S 25** Berührung mit den Augen vermeiden.
 - **S 33** Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladung treffen.
 - **S 60** Dieses Produkt und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen
 - **S 61** Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.
 - **S 62** Bei Verschlucken kein Erbrechen herbeiführen. Sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder dieses Etikett vorzeigen.
- ❖ Aceton:
 - **R 11** Leichtentzündlich.
 - **R 38** Reizt die Haut.
 - **R 66** Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.
 - **R 67** Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.
 - **S 9** Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren.
 - **S 16** Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen.
 - **S 26** Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.

Überblick über benötigte Geräte

 <p>Nutsche/ Fritte</p>	 <p>Saugflasche + Gummidichtung + Nutsche</p>	 <p>Pasteurpipette + Saughütchen</p>	 <p>Wasserstrahl- pumpe</p>	 <p>Spatel</p>	 <p>Doppelmuffe</p>	
 <p>Messzylinder</p>	 <p>Messpipette</p>	 <p>richtiges Ablesen von Messzylinder- pipette</p> <p>400</p> <p>→ Falsch abgelesen</p> <p>→ Richtig abgelesen</p>	 <p>Universalklemme</p>	 <p>Mörser + Pistill</p>	 <p>Stativ</p>	 <p>Peleusball</p>

1.1 Versuchsanleitung zur quantitativen Bestimmung von β -Carotin in Buchenblättern - photometrisch

<p>Benötigte Chemikalien:</p> <ul style="list-style-type: none">- Calciumcarbonat (CaCO_3)- Natriumsulfat (Na_2SO_4)- Aceton- Cyclohexan- Kieselgel- Glaswolle	<p>Benötigte Geräte:</p> <ul style="list-style-type: none">- Mörser und Pistill- Spatel- Pasteurpipette- Saughütchen- 5 oder 10 ml Messpipette- Peleusball- Messzylinder- Saugflasche mit Nutsche (oder Fritte) und Gummidichtung- Wasserstrahlpumpe + entsprechende Schläuche- 2 Bechergläser oder entsprechende andere Gefäße- 1 Schraubgefäß- 2 Doppelmuffen und 2 Universal-klemmen- 1 Stativ- 2 Küvetten- 1 Spektrometer
--	---

Versuchsdurchführung

Der Versuch besteht aus folgenden 3 großen Arbeitsabschnitten, die sich wiederum in kleinere Schritte aufteilen:

ÜBERBLICK:

Blattaufschluss: β -Carotin wird aus den Blättern herausgelöst

Mechanischer Blattaufschluss: Blätter werden mittels Mörser zerkleinert.

Chemischer Blattaufschluss: mittels Chemikalien wird das β -Carotin aus den Blättern herausgelöst.

Reinigung: β -Carotin wird von anderen, auch herausgelösten, Bestandteilen gereinigt

Verdünnung: Ist notwendig, um eine Reinigung möglich zu machen.

Säulen: β -Carotin wird über eine Kieselgelsäule gereinigt.

Messung und Berechnung: Menge an β -Carotin wird bestimmt

Messung: Die Extinktion der β -Carotin-Lösung wird mittels eines Spektrometers bestimmt.

Berechnung: Die Konzentration der β -Carotin-Lösung beziehungsweise der Anteil von β -Carotin im Blatt wird berechnet.

TIPP: Um Zeit zu sparen können von dem Extraktionsmittel größere Mengen für die ganze Klasse und für mehrere Labortage hergestellt werden. Man braucht dafür aber teilweise größere und andere (verschließbare) Gefäße als angegeben.

VERSUCHSABLAUF

Blattaufschluss:

Mechanischer Blattaufschluss:

≈ **0,5 g Blätter** abwiegen und genaues Gewicht aufschreiben.

Blätter mit den Händen so klein wie möglich reißen und in den Mörser geben.

VORSICHT: Aufpassen, dass wirklich alle Blattteile in den Mörser kommen und nichts daneben fällt.

≈ **0,5 g Calciumcarbonat** (CaCO_3) und ≈ **3 g Natriumsulfat** (Na_2SO_4) abwiegen und zu den Blättern in den Mörser geben.

Das Ganze solange gut durchmörsern bis ein einheitliches, feines grünes Pulver entsteht.

Chemischer Blattaufschluss

Extraktionsmittel herstellen: In einem verschließbaren Gefäß 100 ml eines Gemisches aus **70 Volumsprozent Cyclohexan** und **30 Volumsprozent Aceton** herstellen

Genau **20 ml des Gemisches** im Messzylinder abmessen.

VORSICHT: 20 ml sehr genau abmessen oder verwendete ml genau aufschreiben.

Blattpulver aus dem Mörser kratzen, in die Nutsche geben. Diese auf die Saugflasche setzen und mit der Doppelmuffe und der Universal-klemme am Stativ befestigen.

VORSICHT: Darauf achten, dass das gesamte Pulver in die Nutsche überführt wird.

Ca. **5 ml des Cyclohexan/Acetongemisches** in Mörser geben und Pulverreste darin lösen und diese Lösung in die Nutsche geben.

Diesen Vorgang einmal wiederholen.

Diesen Blattpulver/Lösungsmittel-Brei für ca. 5 min in der Nutsche auf der Saugflasche stehen lassen.

In der Zwischenzeit etwas Glaswolle zu einer kleinen Kugel formen und damit die Pasteurpipette im schmalen Teil verstopfen.

Ca. 5 cm hoch Kieselgel in die Pasteurpipette geben und diese Säule mit einer Doppelmuffe und einer Universalklemme am Stativ befestigen.

Die Wasserstrahlpumpe an die Saugflasche anschließen und die grüne Flüssigkeit absaugen.

VORSICHT: Zuerst Schlauch von der Saugflasche abziehen und dann erst Wasser abdrehen, ansonsten kann es sein, dass Wasser in die Saugflasche gesaugt wird.

Den Schlauch abziehen und ca. **5 ml Cyclohexan/Acetongemisch** in die Nutsche geben, kurz mit dem Spachtel etwas umrühren und die Flüssigkeit absaugen.

Diesen Vorgang mit dem restlichen Cyclohexan/Acetongemisch wiederholen. Die Flüssigkeit sollte farblos sein.

Reinigung:

Verdünnen:

2 ml der grünen Lösung mit der Messpipette in ein Becherglas pipettieren und dazu **4 ml Cyclohexan** ebenfalls mit der Messpipette dazugeben. Lösung etwas verrühren.

Säulen:

Ein leeres Becherglas unter die Säule (= mit Kieselgel befüllte Pasteurpipette) stellen.

1 ml der eben hergestellten **Lösung** in die Säule geben und warten bis die ganze Flüssigkeit durchgeronnen ist.

VORSICHT: Aufpassen, dass die gesamte Flüssigkeit in die Säule überführt wird und nicht außen runterläuft.

Diesen Vorgang noch **2x wiederholen**, sodass letztendlich 3 ml der Blattlösung in die Säule gegeben wurden.

Die **Säule 2x mit je 1 ml reinem Cyclohexan** nachwaschen. Um diesen Vorgang zu beschleunigen kann man hierbei mit einem Saughütchen etwas nachhelfen und die Flüssigkeit etwas durchdrücken.

Solange drücken, bis keine Flüssigkeit mehr heraustropft.

Das Gesamtvolumen der gesäulten Flüssigkeit bestimmen: dazu wird diese einfach gänzlich in die Messpipette aufgesaugt und das Volumen abgelesen. **Dieser Wert muss unbedingt notiert werden.**

Messung und Berechnung:

Messung:

In eine Küvette ca. 3 cm hoch Cyclohexan geben, in die andere die gesäulte orange-gelbe Flüssigkeit

Spektrometer einschalten.

Durch Drücken auf den Abwärtspfeil „**Extinktion 480 nm**“ einstellen

Küvette mit Cyclohexan in die entsprechende Vorrichtung stellen, Lichtschutz darüber geben und auf die **Taste 0,000 drücken** → am Display erscheint OK und nach 2 Sekunden die Aufschrift „Messprobe“.

Küvette mit orange-gelber Flüssigkeit in die Vorrichtung stellen und auf die **Taste „mg/l“** drücken. Wert, der auf dem Display erscheint, notieren.

Durch Drücken des Aufwärtsfeiles Gerät auf **635 nm** einstellen und nochmals die „mg/l“-Taste drücken. Wert notieren.

Berechnung:

$$\text{Anteil an } \beta\text{-Carotin im Blatt in } \% = \frac{(E_{480nm} - E_{635nm}) * v_1 * v_2 * M * V}{k * g} * 100$$

k.....siehe unten (Hintergrundinformation)

M.....siehe unten (Hintergrundinformation)

g.....eingewogene Blättermasse in Milligramm

V.....ml des Extraktionsmittels (20 ml laut Arbeitsvorschrift (Punkt I.2.b))

v₁.....1. Verdünnungsfaktor (vor dem Säulen);
(3 laut Arbeitsvorschrift, (da Rohextrakt 2:1 verdünnt wird))

v₂.....2. Verdünnungsfaktor (der durch das Säulen entsteht)

($\frac{\text{Gesamt volumen der gesäulten Flüssigkeit}}{3}$ laut Arbeitsvorschrift)

Zusätzliche Hintergrundinformation:

(UV)-Vis-Spektrometrie:

Wird verwendet: zur Konzentrationsbestimmung färbiger Lösungen

Grundbegriffe:

- monochromatisches Licht: Licht mit nur einer bestimmten Wellenlänge z.B.: 480nm
- Absorption: Teil des Lichts wird vom Farbstoff aufgenommen
- Detektor: misst die austretende Strahlung
- Extinktion (E): ist ein Maß für die Absorption des Lichtes;
Genauer gesagt ist die Extinktion der negative Logarithmus des Quotienten aus austretender Strahlung(I₁) und einfallender Strahlung(I₀);

$$E = -\lg\left(\frac{I_1}{I_0}\right)$$

Lambert-Beer-Gesetz:

Lambert-Beer-Gesetz: Extinktion ist proportional zur Konzentration: **E = k.c**

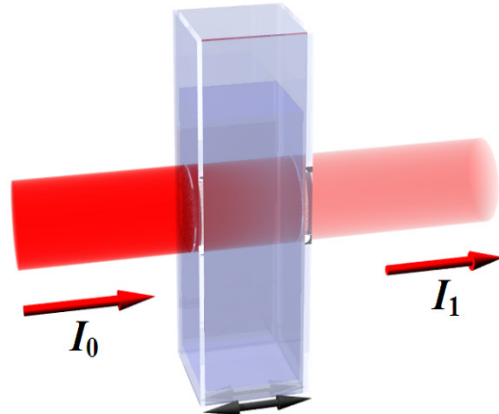
k: Proportionalitätsfaktor: ist vom Farbstoff und der Küvettedicke abhängig

(in unserem Fall ist $k \approx 90000 \frac{l}{mol}$)

genauer: $k = 86587,5 \text{ l/mol}$

Funktionsweise:

- ▶ Licht geht durch färbige Lösung
- ▶ ein Teil des Lichtes wird absorbiert
- ▶ weniger Licht kommt am Detektor an
- ▶ I_1 wird gemessen
- ▶ Extinktion wird vom Gerät berechnet und kann abgelesen werden



Überlegung:

- **Je höher die Konzentration** der färbigen Bestandteile einer Lösung ist, **desto intensiver** (dunkler) ist die **Lösung** gefärbt.
- **Je intensiver** (dunkler) eine **Lösung** gefärbt ist, **desto mehr Licht** wird von der Lösung **absorbiert**.
- **Je mehr Licht absorbiert** wird, **desto weniger Licht kommt** nach dem Durchgang durch die Lösung **wieder heraus** (desto geringer ist die Intensität des austretenden Lichtes bzw. **desto kleiner ist I_1**).
- **Je kleiner I_1** ist, **desto kleiner ist der Quotient I_1/I_0** aber **umso größer ist die Extinktion (da negativer Logarithmus – log !!)**.
- **Je größer die Extinktion**, **desto größer** ist laut Berechnung die **Konzentration**.

Festphasentrennung – „Säulen“:

Wird verwendet : zur Reinigung eines Gemisches von chemischen Substanzen

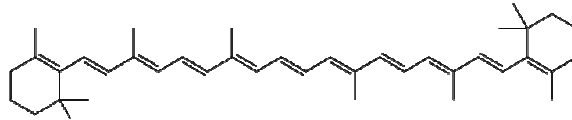
Grundbegriffe:

- Polarität: Substanzen sind aufgrund ihres atomaren Aufbaus sehr polar, weniger polar oder nicht polar

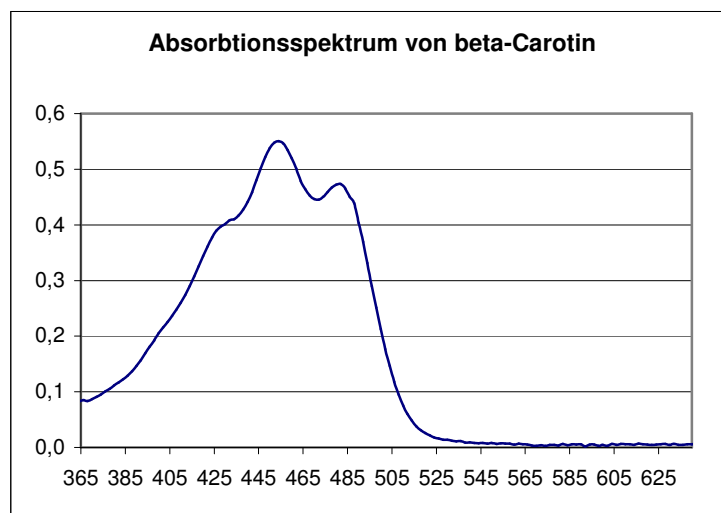
Funktionsweise:

- ▶ Probe wird auf die Säule aufgegeben
- ▶ aufgrund der Unterschiedlichen Polarität der einzelnen Stoffe werden manche Stoffe (die polaren Stoffe Chlorophylle und Xanthophylle) durch das polar Kieselsigel festgehalten; unpolare Stoffe (β -Carotin) werden nicht gebunden und werden mit dem unpolaren Lösungsmittel Cyclohexan rausgewaschen

β-Carotin:



- **hat eine Molmasse M von 536 g/mol**
- hat die Summenformel $C_{40}H_{56}$; es enthält also nur Kohlenstoff und Wasserstoff
- ist unpolar
- ist orange-gelb; die Farbe entsteht durch die vielen konjugierten Doppelbindungen, da hier die Elektronen delokalisiert sind.
- hat 2 Absorptionsmaxima



Häufige Probleme:

- ✓ Lösung ist trüb oder es bilden sich kleine Tröpfchen:
 - ✓ Wasser ist in die Lösung gekommen.
Behebung: Lösung nach Möglichkeit etwas stehen lassen → Wasser setzt sich als großer Tropfen ab → überstehende Lösung kann verwendet werden.
- ✓ Säule trennt nicht (gut):
 - Zuviel Aceton in Lösung.
Behebung: mit Cyclohexan verdünnen; wahrscheinlich auf Arbeitsschritt 13 vergessen.
- ✓ Blatt ist schlecht aufgeschlossen, d.h.: viel Grünes ist noch vorhanden:
 - Zuwenig gemörsert
oder Aufschlussmittel hat nicht das Cyclohexan-Acetonverhältnis von 70 zu 30.
Behebung: das nächste Mal besser mörsern und besser auf die Zusammensetzung des Aufschlussmittels achten.
- ✓ Nutsche saugt nicht:

Saugvorrichtung ist undicht.

Behebung: *die Nutsche etwas auf die Saugflasche drücken*

✓ Spektrometer geht nicht:

Das Aufsetzen des Lichtschutzes vergessen

Oder Batterien liegen nicht richtig.

Behebung: *Lichtschutz aufsetzen und Batterien checken.*

1.2 Versuchsanleitung zur quantitativen Bestimmung von Anthocyanen in Buchenblättern - photometrisch

<p>Benötigte Chemikalien:</p> <ul style="list-style-type: none">- Natriumsulfat (Na_2SO_4)- Aceton- Methanol- dest. Wasser- HCl (hoch prozentig oder konzentriert)- Kaliumchlorid (KCl)- Natriumacetat ($\text{Na}(\text{CH}_3\text{COO}) \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$)- C-18-Festphasenextraktions-säulchen	<p>Benötigte Geräte:</p> <ul style="list-style-type: none">- Mörser und Pistill- Spatel- Saughütchen- 5 oder 10 ml Messpipette- Peleusball- Messzylinder- Saugflasche mit Nutsche (oder Fritte) und Gummidichtung- Wasserstrahlpumpe und entsprechende Schläuche- 5 Bechergläser 100 ml oder entsprechende andere Gefäße- 2 große (1000 ml) Bechergläser- 2 große (1000 ml) Messkolben- 1 Schraubgefäß- 2 Doppelmuffen und 2 Universal-klemmen- 1 Stativ- pH-Meter- 4 Küvetten- 1 Spektrometer
--	--

Versuchsdurchführung:

Der Versuch besteht aus folgenden 3 großen Arbeitsabschnitten, die sich wiederum in kleinere Schritte aufteilen:

ÜBERBLICK:

I. Blattaufschluss: Anthocyane werden aus den Blättern herausgelöst

- I.1. Mechanischer Blattaufschluss: Blätter werden mittels Mörser zerkleinert.
- I.2. Chemischer Blattaufschluss: mittels Chemikalien werden die Anthocyane aus den Blättern herausgelöst.

II. Reinigung: Anthocyane werden von anderen, auch mit herausgelösten, Bestandteilen gereinigt

- II.1. Reinigung: Anthocyane werden über eine C-18-Festphasenextraktions-Säule gereinigt.

III. Messung und Berechnung: Menge an Anthocyanen wird bestimmt

- III.1. Herstellen der Puffer: Anthocyane werden bei 2 bestimmten pH-Werten gemessen, also muss man entsprechende Puffer herstellen.
- III.2. Herstellen der Nulllösungen.
- III.3. Verdünnen: Verdünnen ist notwendig um erstens den pH-Wert einzustellen und zweitens um eine vernünftige Messung zu ermöglichen.
- III.4. Messung: Die Extinktion der Anthocyanlösung-Lösung wird mittels eines Spektrometers bestimmt.
- III.5. Berechnung: Die Konzentration der Anthocyanlösung beziehungsweise der Anteil von Anthocyanen im Blatt wird berechnet.

TIPP 1: Um Zeit zu sparen können von den Puffern, von dem Extraktionsmittel und von den Nulllösungen größere Mengen für die ganze Klasse und für mehrere Labortage hergestellt werden. Man braucht dafür aber teilweise größere und andere (verschiebbare) Gefäße als angegeben.

Tipp 2: Chlorophyll- und Anthocyanbestimmung lassen sich gemeinsam mit nur einem Blattaufschluss, also aus demselben Blattextrakt, durchführen.

VERSUCHSABLAUF

I. Blattaufschluss:

I.1. Mechanischer Blattaufschluss:

- I.1.a. **≈ 0,5 g Blätter** abwiegen und genaues Gewicht aufschreiben.
- I.1.b. Blätter mit den Händen so klein wie möglich reißen und in den Mörser geben.

VORSICHT: Aufpassen, dass wirklich alle Blattteile in den Mörser kommen und nichts daneben fällt.

- I.1.c. **≈ 3 g Natriumsulfat** (Na_2SO_4) abwiegen und zu den Blättern in den Mörser geben.
- I.1.d. Das Ganze solange gut durchmörsern bis ein einheitliches, feines grünes Pulver entsteht.

I.2. Chemischer Blattaufschluss

- I.2.a. **Extraktionsmittel herstellen:** In einem Gefäß (z.B.: Messzylinder) 20 ml eines Gemisches aus **60 Volumsprozent Aceton**, **20 Volumsprozent Wasser** und **20 Volumsprozent Methanol** herstellen.

VORSICHT: 20 ml sehr genau abmessen oder verwendete ml genau aufschreiben.

- I.2.b. Blattpulver aus dem Mörser kratzen, in die Nutsche geben. Diese auf die Saugflasche setzen und mit einer Doppelmuffe und einer Universalklemme am Stativ befestigen.

VORSICHT: Darauf achten, dass das gesamte Pulver in die Nutsche überführt wird.

- I.2.c. Ca. **5 ml des Aceton/Wasser/Methanolgemisches** in den Mörser geben und Pulverreste darin lösen und diese Lösung in die Nutsche geben.
- I.2.d. Diesen Vorgang einmal wiederholen.

- I.2.e. Diesen Blattpulver-Lösungsmittel-Brei für ca. 5 min in der Nutsche auf der Saugflasche stehen lassen.
- I.2.f. Die Wasserstrahlpumpe an die Saugflasche anschließen, Wasser aufdrehen und die grüne Flüssigkeit absaugen.

VORSICHT: Zuerst Schlauch von der Saugflasche abziehen und dann erst Wasser abdrehen, ansonsten kann es sein, dass Wasser in die Saugflasche gesaugt wird.

- I.2.g. Den Schlauch abziehen und ca. **5 ml Aceton/Wasser/Methanolgemisch** in die Nutsche geben, kurz mit dem Spatel etwas umrühren und die Flüssigkeit wieder absaugen.
- I.2.h. Diesen Vorgang mit dem restlichen Aceton/Wasser/Methanolgemisch wiederholen. Die Flüssigkeit, die abgesaugt wird, sollte farblos sein.

II. Reinigung:

- II.1.a. Die C-18-Festphasenextraktions-Säule mit einer Doppelmuffe und einer Universalklemme am Stativ befestigen.
- II.1.b. Ein Becherglas oder dergleichen unter die Säule stellen.
- II.1.c. **3 ml des Rohextraktes** mit der Pipette in die C-18-Festphasenextraktions-Säule geben und langsam durchtropfen lassen. Es sammelt sich im Becherglas unter der Säule eine rötlich-orange Flüssigkeit.
- II.1.d. Nachdem ca. die Hälfte der Flüssigkeit durchgetropft ist, kann man etwas mit dem Saughütchen nachhelfen und oben etwas nachdrücken.

VORSICHT: Es darf auf keinen Fall schneller als ein Tropfen pro Sekunde tropfen.

- II.1.e. Sobald die ganze Flüssigkeit durchgetropft ist, gibt man 0,5 ml Wasser in die Säule und wäscht diese damit nach. Diesesmal soll man mit dem Saughütchen von oben nachdrücken und so die gesamte Flüssigkeit aus der Säule pressen.

III. Messung und Berechnung:

III.1. Herstellen der Puffer:

- III.1.a. **pH1-Puffer/KCl-Puffer:** 0,186g KCl und ca. 98 ml destilliertes Wasser in einem 100 ml Becherglas vermischen.

TIPP: Die vorgeschlagen 100 ml reichen für 20 - 30 Versuchsdurchführungen. Der Puffer muss daher nicht jedesmal neu hergestellt werden.

TIPP: Der Puffer kann mehrere Monate gelagert werden; es sollte aber nach längerer Lagerung der pH-Wert überprüft und gegebenenfalls korrigiert werden.

- III.1.b. Mit einem pH-Meter den pH-Wert messen und mit HCl den pH-Wert der Lösung auf **pH1** einstellen.

VORSICHT: Aufpassen beim pH-Wert einstellen. In der Nähe des gewünschten pH-Wertes nur mehr Tröpfchen zugeben und immer wieder umrühren und messen.

- III.1.c. Das Ganze in einen 100 ml Messkolben überführen und mit dest. Wasser bis zur Markierung auffüllen.

- III.1.d. **pH4,5-Puffer/Natriumacetat-Puffer:** 5,443 g Na(CH₃COO) · 3 H₂O mit ca. 96 ml dest. Wasser in einem 100 ml Becherglas vermischen.

- III.1.e. Mit einem pH-Meter den pH-Wert messen und mit HCl auf **pH 4,5** einstellen.

- III.1.f. Das Ganze in einen 100 ml Messkolben überführen und mit dest. Wasser bis zur Markierung auffüllen.

WICHTIG: Gefäße beschriften!

III.2. Herstellen der Nulllösungen:

- III.2.a. 1 ml Extraktionsmittel in ein Becherglas pipettieren und mit 2 ml Methanol und 2 ml pH1-Puffer verdünnen. → „Nulllösung pH1“

III.2.b. **1 ml Extraktionsmittel** in ein Becherglas pipettieren und mit **2 ml Methanol** und **2 ml pH4,5-Puffer** verdünnen. → „Nulllösung pH4,5“

III.3. Verdünnen:

III.3.a. **1 ml der gesäulten orangen Flüssigkeit** in ein Becherglas pipettieren und mit **2 ml Methanol** und **2 ml pH1-Puffer** verdünnen. Lösung wird leicht rötlich. → „Anthocyanlösung pH1“

III.3.b. **1 ml der gesäulten orangen Flüssigkeit** in ein anderes Becherglas pipettieren und mit **2 ml Methanol** und **2 ml pH4,5-Puffer** verdünnen. → „Anthocyanlösung pH4,5“

III.4. Messung:

III.4.a. In eine Küvette die „Nulllösung pH1“ geben, in die andere die rötliche „Anthocyanlösung pH1“.

III.4.b. In eine weitere Küvette die „Nulllösung pH4,5“ geben, in die letzte Küvette die „Anthocyanlösung pH4,5“.

III.4.c. Spektrometer einschalten und warten bis es betriebsbereit ist.

III.4.d. 526 nm eingeben und „go to λ “ drücken; warten bis das Gerät 526 nm eingestellt hat.

III.4.e. Küvette mit der „Nulllösung pH1“ in Spektrometer stellen und Taste „Auto Zero“ drücken; warten bis das Gerät auf der Anzeige auf Null gestellt hat.

VORSICHT: Deckel des Spektrometers immer wieder schnell schließen.

III.4.f. Küvette mit der „Nulllösung pH1“ aus dem Spektrometer nehmen und Küvette mit der rötlichen „Anthocyanlösung pH1“ in das Spektrometer stellen.

III.4.g. Extinktion, die das Gerät am Display anzeigt, notieren.

III.4.h. Gerät auf 700 nm einstellen, mit „Nulllösung pH1“ auf 0 kalibrieren (siehe III.4.d und e), Messlösung („Anthocyanlösung pH1“) in das Spektrometer stellen und Extinktion ablesen und notieren.

III.4.i. Den gleichen Messvorgang (Schritte III.4.d – h) auch mit „Nulllösung pH4,5“ und „Anthocyanlösung pH4,5“ wiederholen.

VORSICHT: Zwischen den Messungen sollte möglichst wenig Zeit vergehen, daher empfiehlt es sich mit 4 Küvetten und zügig zu arbeiten.

III.5. Berechnung:

$$\text{Anteil an Anthocyanen im Blatt in \%} = \frac{\frac{A}{k} * v_1 * v_2 * M * V}{g} * 100$$

$$A = (E_{526nm(pH1)} - E_{700nm(pH1)}) - (E_{526nm(pH4,5)} - E_{700nm(pH4,5)})$$

k.....26900 l/mol

g.....eingewogene Blättermasse

V.....l des Extraktionsmittels (20 ml laut Arbeitsvorschrift)

M.....449,2 g/mol

v₁.....Verdünnung vor der Messung: Lösung wird 1:2:2 (Lösung:Methanol:Puffer) verdünnt; das entspricht einem Verdünnungsfaktor von 5

v₂.....Verdünnung die beim Säulen entsteht: 3 ml des Rohextrakts werden in die Säule eingebracht und mit 0,5 ml Wasser gewaschen (aus 3 ml werden 3,5 ml) das entspricht einem Verdünnungsfaktor von 3,5/3.

Zusätzliche Hintergrundinformation:

(UV)-Vis-Spektrometrie:

Wird verwendet: zur Konzentrationsbestimmung färbiger Lösungen

Grundbegriffe:

- monochromatisches Licht: Licht mit nur einer bestimmten Wellenlänge z.B.: 480nm
- Absorption: Teil des Lichts wird vom Farbstoff aufgenommen
- Detektor: misst die austretende Strahlung
- Extinktion (E): ist ein Maß für die Absorption des Lichtes;
Genauer gesagt ist die Extinktion der negative Logarithmus des Quotienten aus einfallender Strahlung(I_0) und austretender Strahlung(I_1);

$$E = -\lg\left(\frac{I_0}{I_1}\right)$$

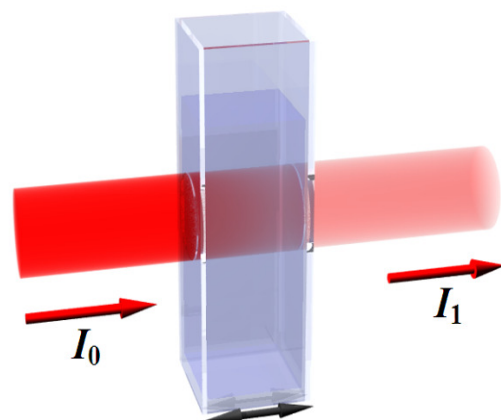
Lambert-Beer-Gesetz:

Lambert-Beer-Gesetz: Extinktion ist proportional zur Konzentration: **E = k.c**

k: Proportionalitätsfaktor: ist vom Farbstoff und der Küvettedicke abhängig
(in unserem Fall ist k 26900 l/mol)

Funktionsweise:

- ▶ Licht geht durch färbige Lösung
- ▶ ein Teil des Lichtes wird absorbiert
- ▶ weniger Licht kommt am Detektor an
- ▶ I_1 wird gemessen
- ▶ Extinktion wird vom Gerät berechnet und kann abgelesen werden

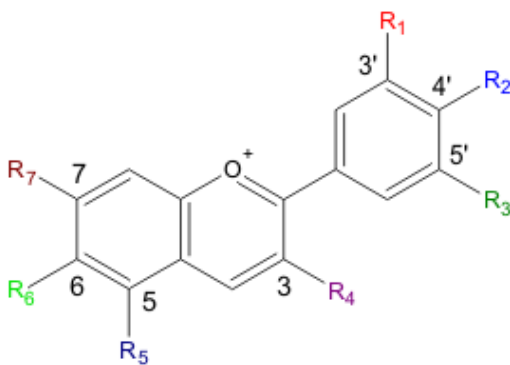


Überlegung:

- **Je höher die Konzentration** der färbigen Bestandteile einer Lösung ist, **desto intensiver** (dunkler) ist die **Lösung** gefärbt.
- **Je intensiver** (dunkler) eine **Lösung** gefärbt ist, **desto mehr Licht** wird von der Lösung **absorbiert**.
- **Je mehr Licht absorbiert** wird, **desto weniger Licht kommt** nach dem Durchgang durch die Lösung **wieder heraus** (desto geringer ist die Intensität des austretenden Lichtes bzw. **desto kleiner ist I_1**).
- **Je kleiner I_1** ist, **desto kleiner ist der Quotient I_1/I_0** aber **umso größer ist die Extinktion** (*da negativer Logarithmus – log !!*).
- **Je größer die Extinktion**, **desto größer** ist laut Berechnung die **Konzentration**.

Anthocyane:

Was sind Anthocyane und wodurch unterscheiden sie sich?

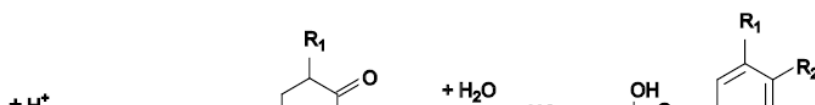
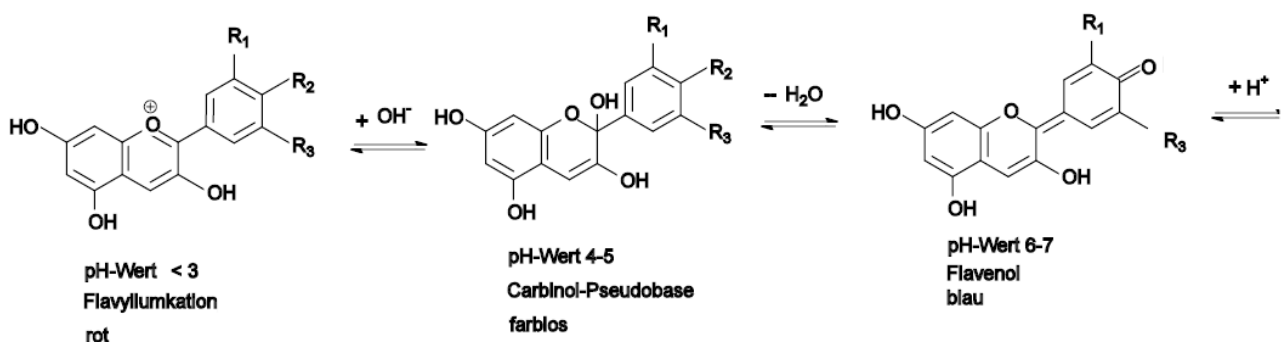


Anthocyane sind natürliche Farbstoffe, die chemisch gesehen zur Familie der Flavonoiden gehören.

Das Bild zeigt das Grundgerüst aller Anthocyane. Die Reste $R_1 - R_7$ können je nach Anthocyan variieren. In der Pflanze ist an das Anthocyan normalerweise ein Zuckermolekül (glycosidisch) gebunden.

Warum ändern Anthocyane ihre Farbe bei pH-Wert-Veränderungen?

Bei der Änderung des pH-Werts ändert sich die Struktur der Anthocyane und ruft eine Farbänderung hervor.



Wie kann man diese Farbänderung für die Quantifizierung der Anthocyane nutzen?

Bei pH-Werten kleiner 3 wie z.B. 1 erscheinen die Anthocyane rot, bei pH-Werten zwischen 4 und 5 wie z.B. 4,5 haben sie keine Farbe, sind also farblos.

Misst man die Extinktion einer Anthocyanlösung mit niedrigem pH-Wert (wie z.B. 1) absorbieren die Anthocyane Licht, da sie ja farbig sind (natürlich nur in einem bestimmten Wellenlängenbereich wie z.B. bei 526 nm). Misst man aber Anthocyanlösungen mit einem pH-Wert zwischen 4 und 5 absorbieren die Anthocyane kein Licht, da sie ja farblos sind. Aus dieser Differenz kann man leicht die Konzentration der Anthocyane berechnen. Man nennt diese Methode, sinnvollerweise, **pH-Differenzen-Methode** (engl.: pH-differential method).

Häufige Probleme:

- ✓ Die zu messende Lösung ist trüb:
 - ✓ Nur mit Puffer verdünnt und nicht auch mit Methanol.
Behebung: *Lösung auch mit Methanol verdünnen.*
- ✓ Säule trennt nicht (gut):
 - Zuviel Methanol in der Lösung*
 - oder zu schnell durchtropfen lassen.*
 - Behebung:** *Beim Herstellen des Extraktionsmittels besser auf die genaue Zusammensetzung achten*
 - oder mehr Geduld beim Säulen haben.*
- ✓ Blatt ist schlecht aufgeschlossen, d.h.: viel Grünes ist noch vorhanden:
 - Zu wenig gemörsert,*
 - oder Aufschlussmittel hat nicht das Aceton/Wasser/Methanolverhältnis von 60/20/20.*
 - Behebung:** *Das nächste Mal besser mörsern*
 - und besser auf die Zusammensetzung des Aufschlussmittels achten.*
- ✓ Nutsche saugt nicht:
 - Saugvorrichtung ist undicht.*
 - Behebung:** *Die Nutsche etwas auf die Saugflasche drücken.*

1.3 Versuchsanleitung zur quantitativen Bestimmung von Anthocyanen in Buchenblättern – photometrisch

<p>Benötigte Chemikalien:</p> <ul style="list-style-type: none">- Natriumsulfat (Na_2SO_4)- Aceton- Methanol- dest. Wasser	<p>Benötigte Geräte:</p> <ul style="list-style-type: none">- Mörser und Pistill- Spatel- Saughütchen- 5 oder 10 ml Messpipette- Peleusball- Messzylinder- Saugflasche mit Nutsche (oder Fritte) und Gummidichtung- Wasserstrahlpumpe und entsprechende Schläuche- 2 Bechergläser oder entsprechende andere Gefäße- 1 100 ml Schraubgefäß- 2 Doppelmuffen und 2 Universal-klemmen- 1 Stativ- 2 Küvetten- 1 Spektrometer
--	---

Versuchsdurchführung

Der Versuch besteht aus folgenden 3 großen Arbeitsabschnitten, die sich wiederum in kleinere Schritte aufteilen:

ÜBERBLICK:

IV. Blattaufschluss: Chlorophyll wird aus den Blättern herausgelöst

- IV.1. Mechanischer Blattaufschluss: Blätter werden mittels Mörser zerkleinert.
- IV.2. Chemischer Blattaufschluss: mittels Chemikalien wird das Chlorophyll herausgelöst.

V. Messvorbereitung: Chlorophyll wird verdünnt

- V.1. Verdünnung: Ist notwendig, um eine Messung möglich zu machen.

VI. Messung und Berechnung: Menge an Chlorophyll wird bestimmt

- VI.1. Messung: Die Extinktion der Chlorophyll-Lösung wird mittels eines Spektrometers bestimmt.
- VI.2. Berechnung: Die Konzentration der Chlorophyll-Lösung beziehungsweise der Anteil von Chlorophyll im Blatt wird berechnet.

TIPP: Um Zeit zu sparen können von dem Extraktionsmittel größere Mengen für die ganze Klasse und für mehrere Labortage hergestellt werden. Man braucht dafür aber teilweise größere und andere (verschiebbare) Gefäße als angegeben.

VERSUCHSABLAUF

IV. Blattaufschluss:

IV.1. Mechanischer Blattaufschluss:

IV.1.a. **≈ 0,5 g Blätter** abwägen und genaues Gewicht aufschreiben.

IV.1.b. Blätter mit den Händen so klein wie möglich reißen und in den Mörser geben.

VORSICHT: Aufpassen, dass wirklich alle Blattteile in den Mörser kommen und nichts daneben fällt.

IV.1.c. **≈ 3 g Natriumsulfat** (Na_2SO_4) abwägen und zu den Blättern in den Mörser geben.

IV.1.d. Das Ganze solange gut durchmörsern bis ein einheitliches, feines grünes Pulver entsteht.

IV.2. Chemischer Blattaufschluss

IV.2.a. **Extraktionsmittel herstellen:** In einem Gefäß 20 ml eines Gemisches aus **60 Volumsprozent Aceton, 20 Volumsprozent Wasser** und **20 Volumsprozent Methanol** herstellen.

VORSICHT: 20 ml sehr genau abmessen oder verwendete ml genau aufschreiben.

IV.2.b. Blattpulver aus dem Mörser kratzen, in die Nutsche geben. Diese auf die Saugflasche setzen und mit der Doppelmuffe und der Universalklemme am Stativ befestigen.

VORSICHT: Darauf achten, dass das gesamte Pulver in die Nutsche überführt wird.

- IV.2.c. Ca. **5 ml des Aceton/Wasser/Methanolgemisches** in den Mörser geben und Pulverreste darin lösen und diese Lösung in die Nutsche geben.
- IV.2.d. Diesen Vorgang einmal wiederholen.
- IV.2.e. Diesen Blattpulver-Lösungsmittel-Brei für ca. 5 min in der Nutsche auf der Saugflasche stehen lassen.
- IV.2.f. Die Wasserstrahlpumpe an die Saugflasche anschließen und die grüne Flüssigkeit absaugen.

VORSICHT: Zuerst Schlauch von der Saugflasche abziehen und dann erst Wasser abdrehen, ansonsten kann es sein, dass Wasser in die Saugflasche gesaugt wird.

- IV.2.g. Den Schlauch abziehen und ca. **5 ml Aceton/Wasser/Methanolgemisch** in die Nutsche geben, kurz mit dem Spachtel etwas umrühren und die Flüssigkeit absaugen.
- IV.2.h. Diesen Vorgang mit dem restlichen Aceton/Wasser/Methanolgemisch wiederholen. Die Flüssigkeit sollte farblos sein.

V. Messvorbereitung:

V.1. Verdünnen:

- V.1.a. **0,5 ml der grünen Lösung** mit der Messpipette in ein Becherglas pipettieren. Dazu werden **4,5 ml Wasser** und **20 ml Aceton**, ebenfalls mit der Messpipette, gegeben. Lösung etwas verrühren.

VI. Messung und Berechnung:

VI.1. Messung:

- VI.1.a. In eine Küvette das Extraktionsmittel = Nulllösung (Aceton/Wasser/Methanolgemisch) geben, in die andere die verdünnte hellgrüne Chlorophylllösung.
- VI.1.b. Spektrometer einschalten und warten bis es betriebsbereit ist.

VI.1.c. 652 nm eingeben und „go to λ “ drücken; warten bis das Gerät 652 nm eingestellt hat.

VI.1.d. Küvette mit der Nulllösung in Spektrometer stellen und Taste „Auto Zero“ drücken; warten bis das Gerät auf der Anzeige auf Null gestellt hat.

VORSICHT: Deckel des Spektrometers immer wieder schnell schließen.

VI.1.e. Küvette mit der Nulllösung aus dem Spektrometer nehmen und Küvette mit hellgrüner Chlorophylllösung in das Spektrometer stellen.

VI.1.f. Extinktion, die das Gerät am Display anzeigt, notieren.

VI.2. Berechnung:

$$\text{Anteil an Chlorophyll im Blatt in } \% = \frac{E_{652nm} * F * v * V}{g} * 100$$

g.....eingewogene Blättermasse

V.....l des Extraktionsmittels (20 ml laut Arbeitsvorschrift)

v.....Rohextrakt wird 1:49 verdünnt, das ergibt einen Verdünnungsfaktor von 50

F.....Faktor, in diesem Fall $\frac{1000}{34,5}$ (siehe Hintergrundinformation)

Zusätzliche Hintergrundinformation:

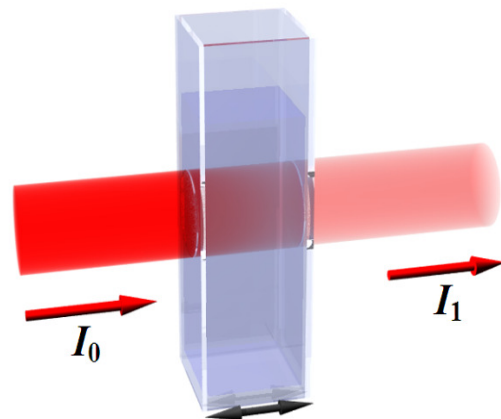
(UV)-Vis-Spektrometrie:

Wird verwendet: zur Konzentrationsbestimmung färbiger Lösungen

Grundbegriffe:

- monochromatisches Licht: Licht mit nur einer bestimmten Wellenlänge z.B.: 480nm
- Absorption: Teil des Lichts wird vom Farbstoff aufgenommen
- Detektor: misst die austretende Strahlung
- Extinktion (E): ist ein Maß für die Absorption des Lichtes;
Genauer gesagt ist die Extinktion der negative Logarithmus des Quotienten aus einfallender Strahlung(I_0) und austretender Strahlung(I_1);

$$E = -\lg\left(\frac{I_0}{I_1}\right)$$



Funktionsweise:

- ▶ Licht geht durch färbige Lösung
- ▶ ein Teil des Lichts wird absorbiert
- ▶ weniger Licht kommt am Detektor an
- ▶ I_1 wird gemessen
- ▶ Extinktion wird vom Gerät berechnet und kann abgelesen werden

Überlegung:

- **Je höher die Konzentration** der färbigen Bestandteile einer Lösung ist, **desto intensiver** (dunkler) ist die **Lösung** gefärbt.
- **Je intensiver** (dunkler) eine **Lösung** gefärbt ist, **desto mehr Licht** wird von der Lösung **absorbiert**.
- **Je mehr Licht absorbiert** wird, **desto weniger Licht kommt** nach dem Durchgang durch die Lösung **wieder heraus** (desto geringer ist die Intensität des austretenden Lichtes bzw. **desto kleiner ist I_1**).

- **Je kleiner I_1 ist, desto kleiner ist der Quotient I_1/I_0 aber umso größer ist die Extinktion (*da negativer Logarithmus – log !!*).**
- **Je größer die Extinktion, desto größer ist laut Berechnung die Konzentration.**

Worauf basiert diese Art der Bestimmung?

Grundsätzlich wird wieder Photometrie betrieben, aber in diesem Fall wird eine Literaturangabe verwendet, die diesen Faktor F angibt.

In der Pflanze gibt es 2 Arten von Chlorophyll: Chlorophyll a und b.

Wenn man den gesamten Gehalt an Chlorophyll bestimmen möchte und nicht zwischen Chlorophyll a und b unterscheiden möchte bietet sich diese Methode an, da dieser Faktor F die Absorption beider Chlorophyllarten beschreibt. Er beinhaltet sowohl beide Extinktionskoeffizienten (bei uns k genannt), beide Molmassen und die unterschiedliche Absorption der beiden Stoffe bei einer gewissen (652nm) Wellenlänge.

Häufige Probleme:

- ✓ Die zu messende Lösung ist trüb:
- ✓ Nur mit Wasser verdünnt und nicht auch mit Aceton.
Behebung: *Lösung auch mit Aceton verdünnen*
- ✓ Blatt ist schlecht aufgeschlossen, d.h.: viel Grünes ist noch vorhanden:
Zu wenig gemörsert,
oder Aufschlussmittel hat nicht das Aceton/Wasser/Methanolverhältnis von 60/20/20.
Behebung: *Das nächste Mal besser mörsern*
und besser auf die Zusammensetzung des Aufschlussmittels achten.
- ✓ Nutsche saugt nicht:
Saugvorrichtung ist undicht.
Behebung: *Die Nutsche etwas auf die Saugflasche drücken.*