

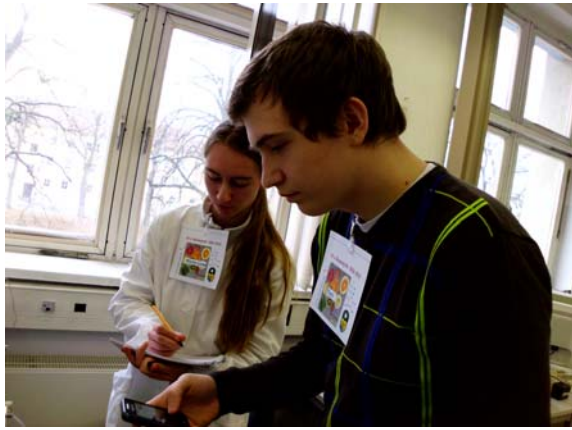
# 10. Schüler-Praktikum zur Bio-Analytik, 7./8. März 2012

Erfolgreiche Kooperation! Sächsische Gymnasien (Frau Dipl.- Päd.  
Monika Opitz) – Hochschule Zittau/Görlitz (Prof. Dr. Manfred Gey)



**Wir danken dem Fonds der Chemischen Industrie (FCI) für die  
großzügige finanzielle Unterstützung!**





Frühlingsboten zum  
10. Schüler- Praktikum **Bio-  
Analytik** von Frau Monika Opitz  
(Fachberaterin Biologie/Chemie)

---

Liebe Frau Opitz!  
Vielen Dank für die sehr gute  
Kooperation und Organisation.  
Ihr Manfred Gey





## 10. Schülerpraktikum zur BIO-Analytik

### „Extraktion – Spektroskopie – Chromatographie“

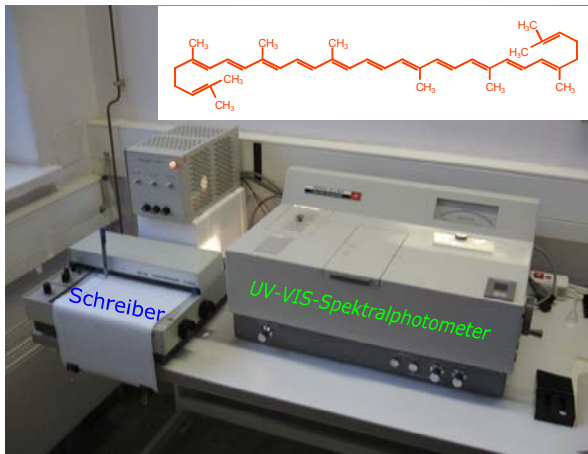
Mittwoch 07. März 2012, 9.30 – 16.00 Uhr

Donnerstag 08. März 2012, 9.30 – 16.00 Uhr

Samstag, 30. Juni 2012, 9.30 – 16.00 Uhr

Pro-Programm: <http://www.papa-gey.de/bb/bb12/bb12.pdf>

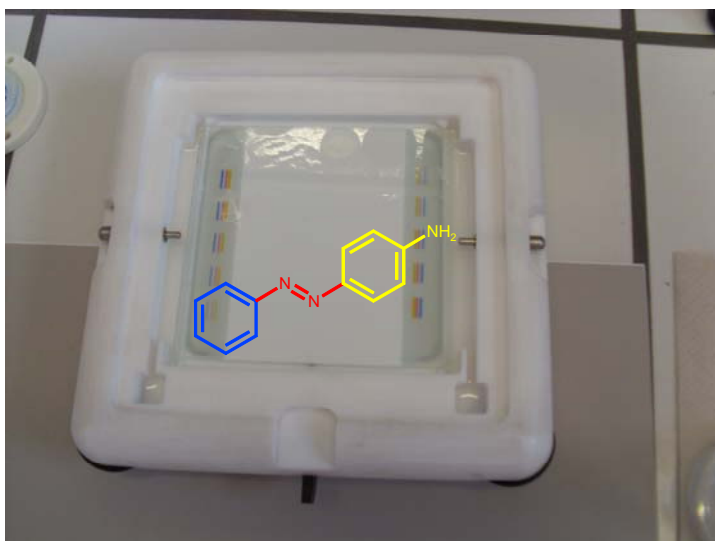
#### UV/VIS von Lycopin



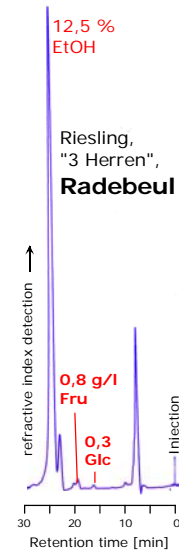
#### HPLC von Vitamin C in:



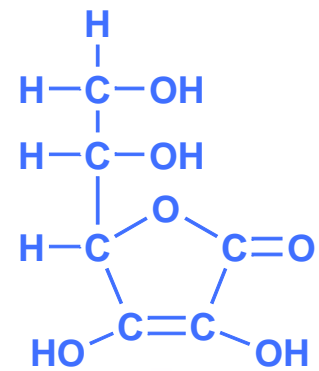
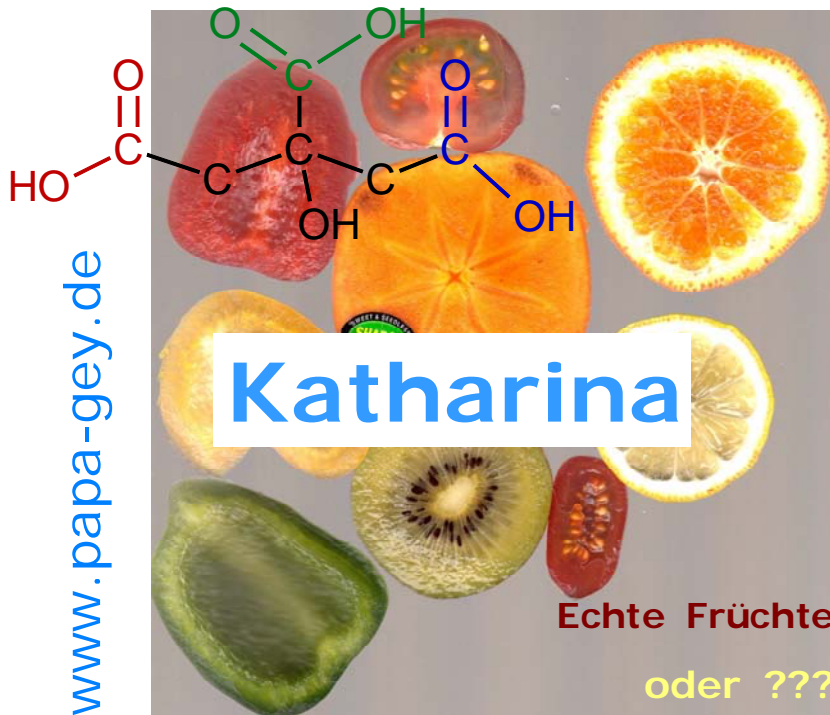
#### HPTLC von AZO-Farbstoffen



#### Weinanalytik

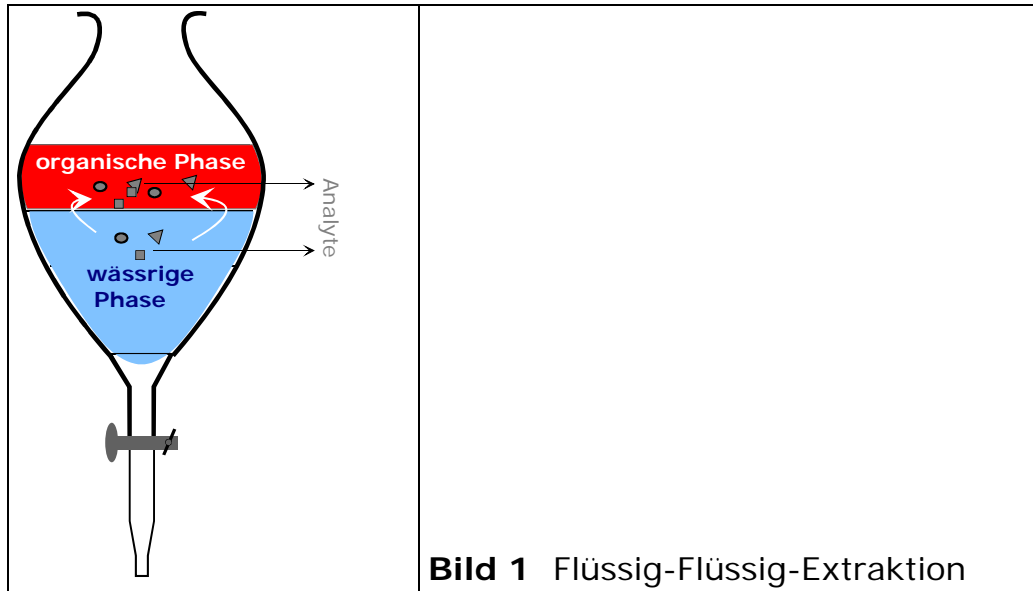


# 10 x BioAnalytik: 2003-2012



## 1. Extraktion

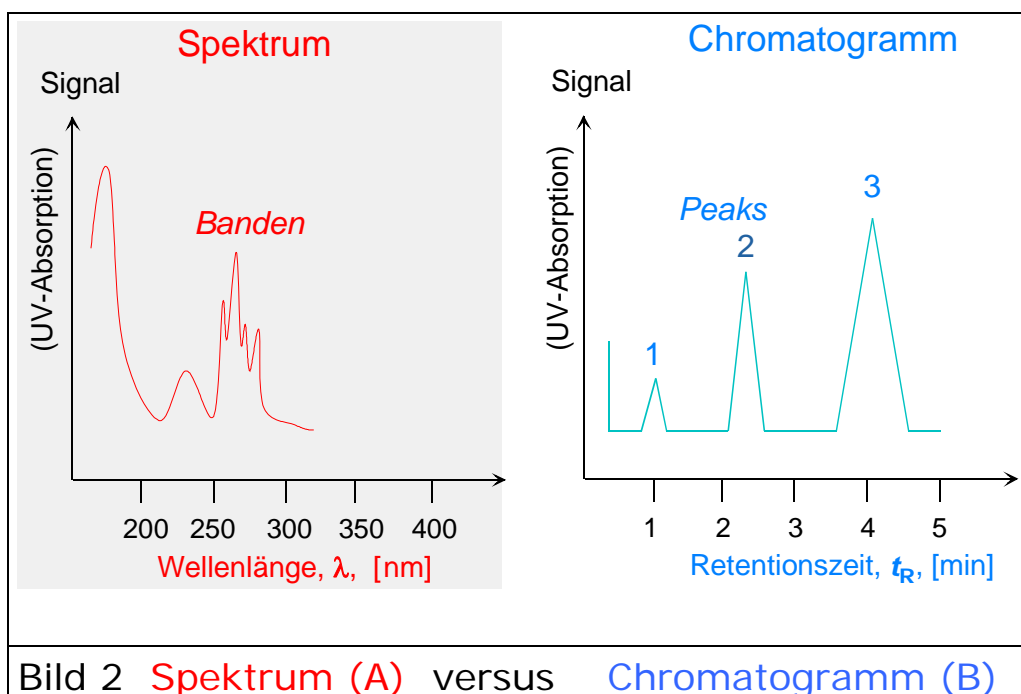
- Unter Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE: *Liquid Liquid Extraction*) versteht man im allgemeinen die Extraktion einer wässrigen Lösung mit einem mit Wasser nicht mischbaren organischen Lösungsmittel.
- Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion sollte zwischen dem Extraktionsgut und dem Extraktionsmittel ein 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 (Bild 1).
- Dies ist mit einer einmaligen Gleichgewichtseinstellung verbunden; es resultieren Extrakt und Raffinat.



- Im Praktikum wird im Versuch 1 Tomatenmark (eine „Art wässrige Phase“, das den roten Farbstoff Lycopin reichlich enthält, mit Hexan (organische Phase) extrahiert.
- **Was passiert dabei mit dem Lycopin und warum?**

## 2. 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 (z.B. die Absorption) und auf der Abszisse die entsprechenden Wellenlängenbereiche aufgetragen sind (Bild 2A).
- Demgegenüber erfolgt in einem Chromatogramm die Aufzeichnung der Intensität eines Signals (Absorption) gegen die Zeit; exakter als Retentionszeit bezeichnet (Bild 2B; siehe auch Punkt 3).



Die Abbildung 3 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.

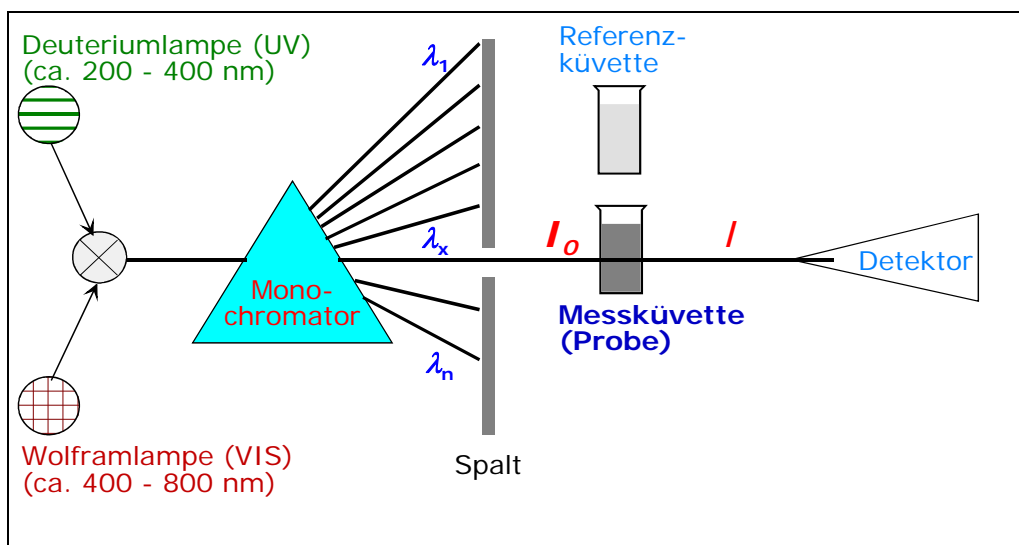
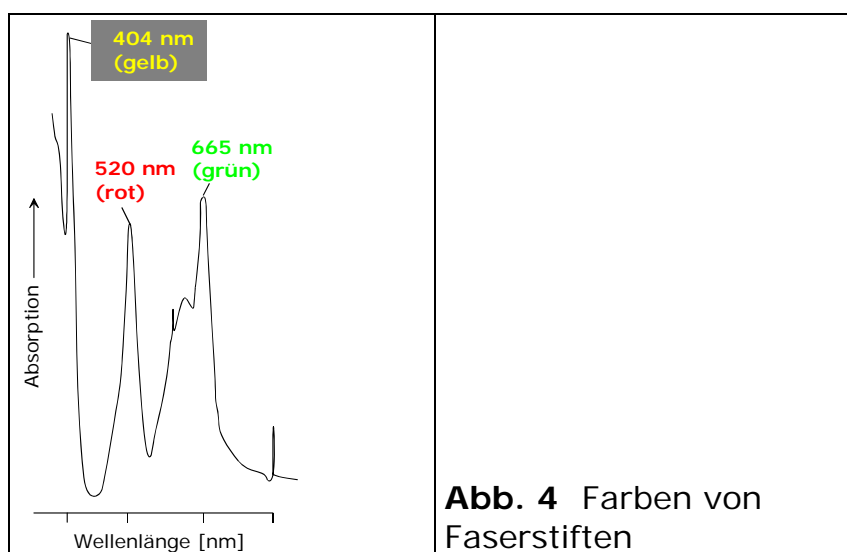


Bild 3 Aufbau eines Einstrahl-Spektralphotometers

- 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

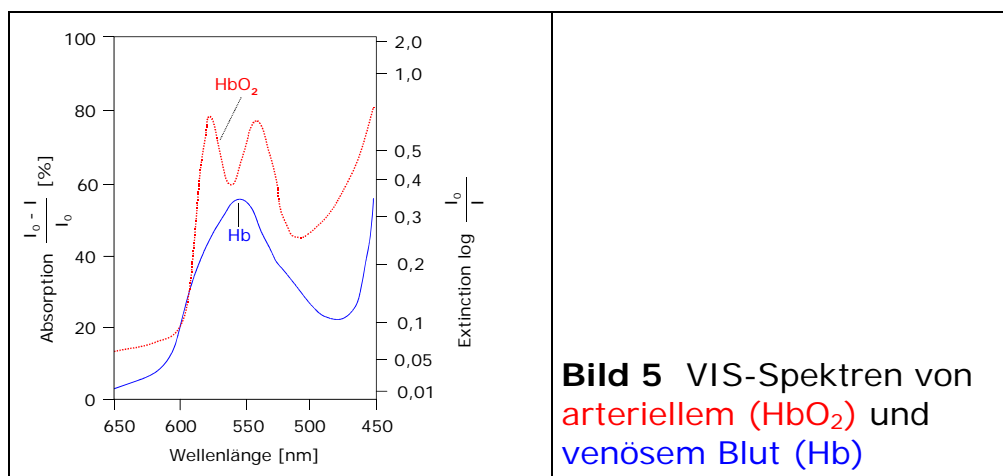
- Schließlich sollen noch zwei ganz praktische Beispiele die Aussagemöglichkeiten der UV/VIS-Spektroskopie belegen; vor allem im sichtbaren Spektralbereich.
- Farbgemische, die aus gelben, grünen oder roten Tinten bzw. aus entsprechenden Faserstiften resultieren, können hinsichtlich der einzelnen Farben anhand der Absorptionsmaxima zugeordnet werden (Bild 4).
- 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.
- Im praktischen Versuch kann auch Kapillarblut aus der Fingerkuppe entnommen und mit Wasser verdünnt in eine Küvette überführt werden.



**Abb. 4** Farben von Faserstiften



- In dieser Probe ist Sauerstoff an den roten Blutfarbstoff Hämoglobin ( $\text{HbO}_2$ ) gebunden und das Spektrum im sichtbaren Bereich zeigt um 550 nm zwei charakteristische Absorptionsmaxima (Bild 5).
- 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“).



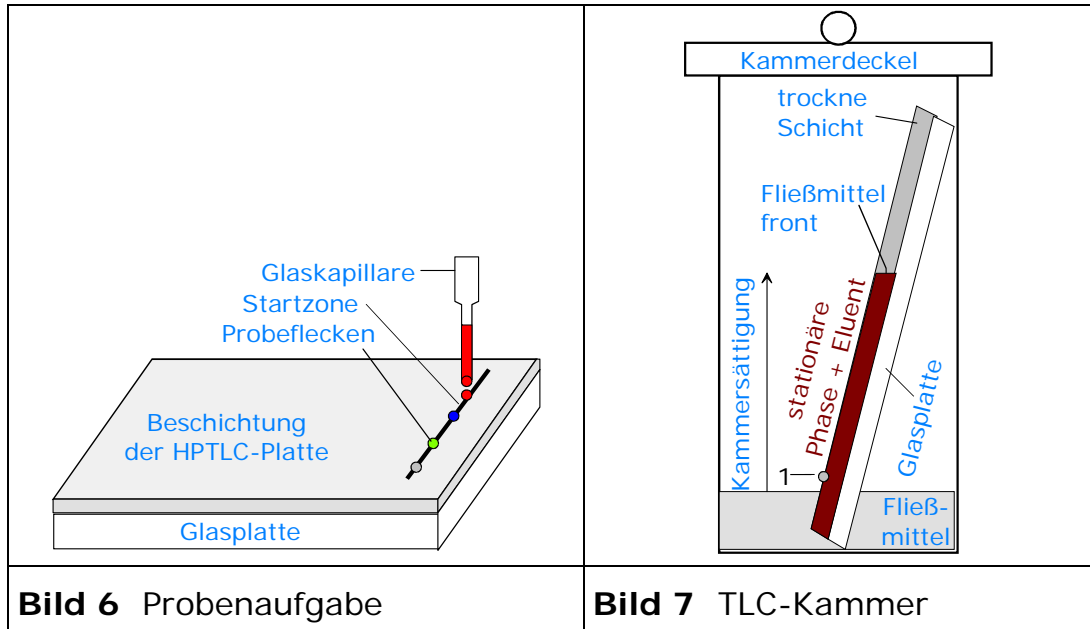
**Bild 5** VIS-Spektren von arteriellem ( $\text{HbO}_2$ ) und venösem Blut (Hb)

### 3. Chromatographie

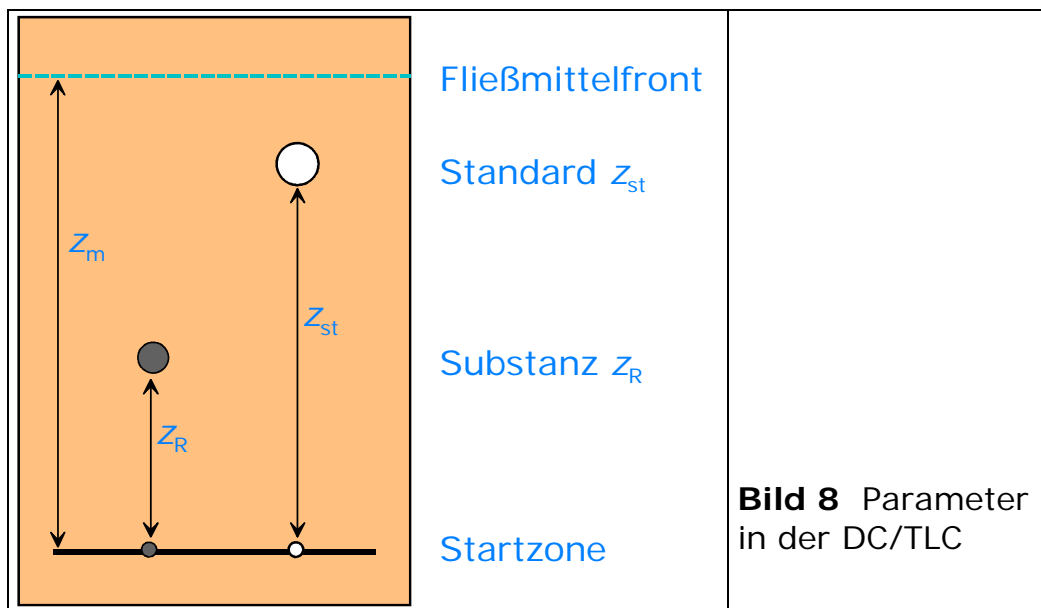
- Eine Analysenprobe besteht aus Analyt(en) und Matrix.
- Die Chromatographie ist eine analytische Trennmethode.
- In der Chromatographie werden die Analyte zwischen einer mobilen und einer stationären Phase verteilt.
- Man unterscheidet zwischen Gas(GC)- und Flüssigchromatographie(LC: *Liquid Chromatography*) – 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 **Säulen**chromatographie.

## Dünnschichtchromatographie

- In den Abbildungen 6 und 7 werden die Grundlagen der DC/HPTLC (HP: **High Performance**) dargestellt. Neben dieser vertikalen DC gibt auch die horizontale Variante (siehe Deckblatt und Anleitungen 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 Wanderungstrecke des Analyten,  $z_R$ , zur Wanderungstrecke der mobilen Phase ( $z_M$ ) definiert (siehe Abbildung 8 und Gleichungen 1/2).



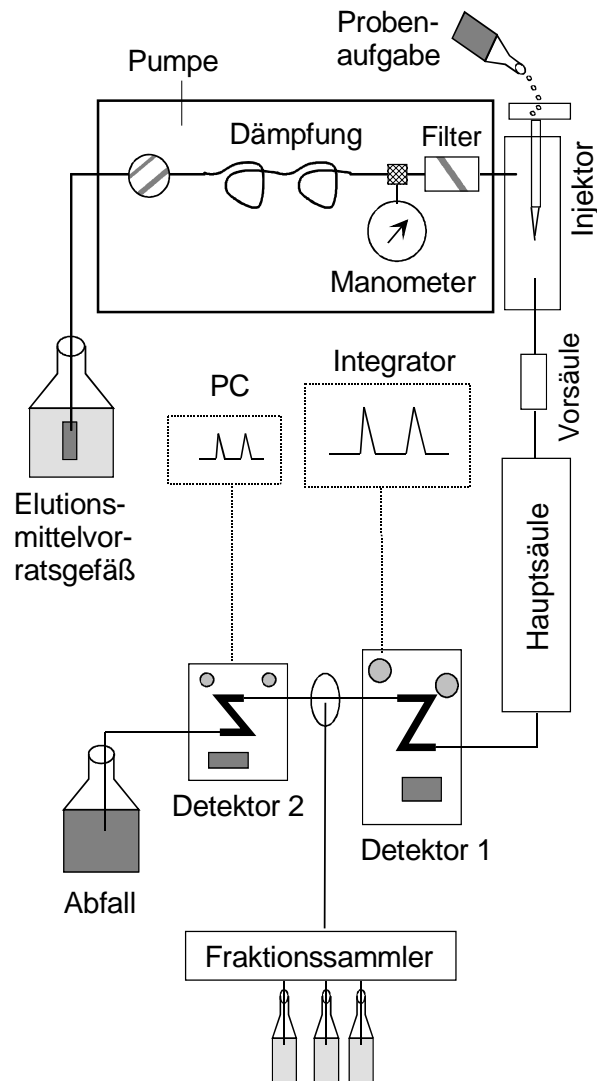
- Zur Erzielung besserer Reproduzierbarkeiten in der Dünnschichtchromatographie wurde ein Retentionsfaktor ( $R_{st}$ ), eingeführt, der sich auf eine Standardsubstanz ( $z_{st}$ ) bezieht.

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

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

### Hochleistungsflüssigchromatographie

- Die Abbildung 9 zeigt den apparativen Aufbau eines Hochleistungsflüssigchromatographen.

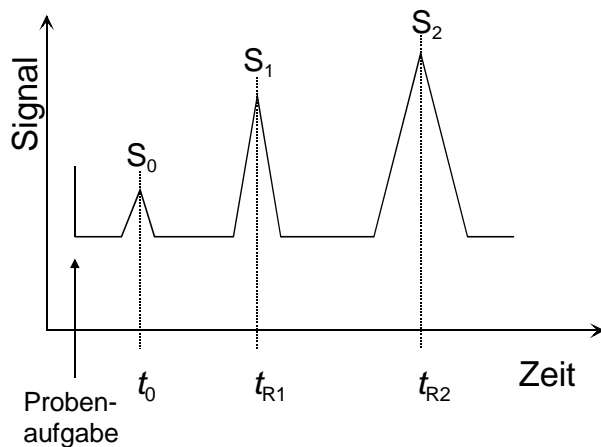


**Bild 9 HPLC-Apparatur (High-Performance Liquid Chromatography)**

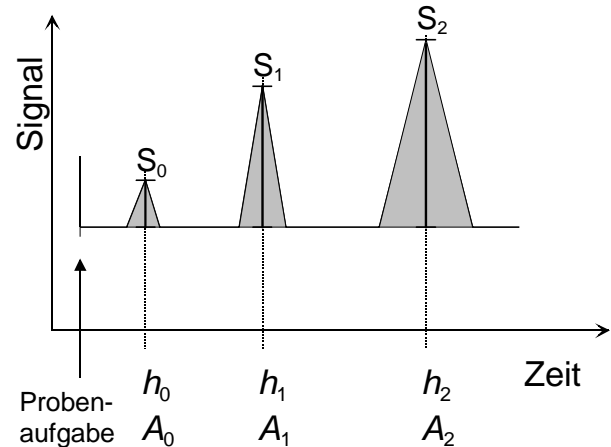
- Die mobile Phase (auch Eluent oder Elutionsmittel genannt) befindet sich in einem Vorratsgefäß und wird mit Hilfe von Helium entgast.
- Mittels Hochdruckpumpe erfolgt die Förderung des flüssigen Eluenten bei einem Druck von ca. 2 bis 20 MPa über eine Pulsationsdämpfung und einen Filter zum Injektor (i.d.R. ein sogenanntes Rheodyne-Ventil).
- Diese Bauteile sind mit Kapillaren verbunden, die größere Innendurchmesser aufweisen können (1 mm oder auch größer).
- Mittels spezieller Dosierspritze erfolgt die Aufgabe der Probe (Volumen i.d.R. 5, 10 oder 20 µl) in den Injektor, ohne dass eine Druckreduzierung notwendig wird.
- Die Vorsäule dient zum Zurückhalten von möglichen Probekontaminationen und damit zur Schonung der Hauptsäule, in der die einzelnen Substanzen durch Wechselwirkungen zwischen mobiler und stationärer Phase aufgetrennt werden.
- Danach erfolgt ihre Registrierung der Elutionskurve (bzw. des **Chromatogramms**) mit Hilfe eines Detektors auf einem Schreiber bzw. mit Hilfe von Integratoren oder Computern
- Auch mehrere Detektoren können hintereinander geschaltet werden.
- Die Verbindungskapillaren vom Injektor bis hin zur Durchflussküvette des Detektors sollen sehr kleine Innendurchmesser (< 0,5 mm) besitzen, damit es zu keiner Verbreiterung der chromatographischen Peaks kommt.
- Ein Fraktionssammler (im Versuch nicht integriert) dient zum „Auffangen“ der getrennten Substanzen.

## HPLC-Chromatogramm

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 10a).



**Bild 10a** Chromatogramm (qualitativ)



**Bild 10b** Chromatogramm (quantitativ)

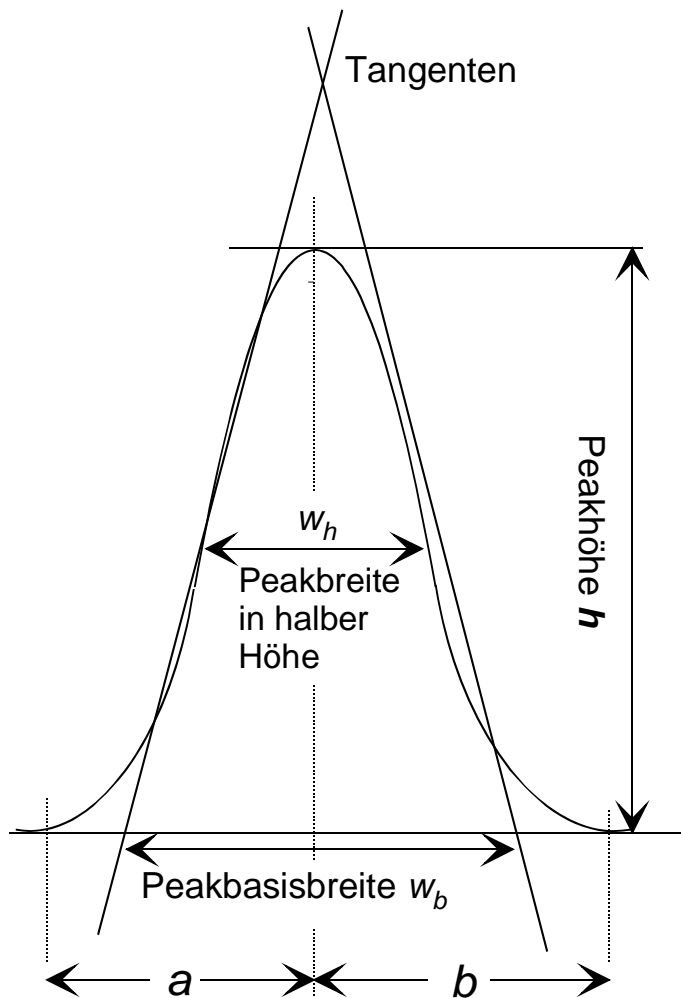
Die Zeit  $t_0$  der Substanz  $S_0$  wird als Totzeit bezeichnet und repräsentiert eine Verbindung, die mit der stationären Phase in keinerlei Wechselwirkungen tritt. Identisch ist die Zeit mit der Wanderungsdauer des Moleküls der mobilen Phase vom Säulenanfang bis zur Registrierung des Peakmaximums 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 10b).

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.

$$\frac{c_{\text{Probe}}}{A(h)_{\text{Probe}}} = \frac{c_{\text{Test}}}{A(h)_{\text{Test}}} \quad (3)$$

Aus dem Chromatogramm und den aufgezeichneten Peaks lassen sich weitere Kenngrößen wie die Peakbasisbreite  $w_b$  oder die Peakbreite in halber Höhe  $w_h$  ermitteln, die zur Charakterisierung einer chromatographischen Trennung erforderlich sind (siehe Bild 11).



**Bild 11** Peakprofil und Kenngrößen

Als Maß für das Trennvermögen der Säule wird die auf ein benachbartes Peakpaar bezogene Auflösung  $R$  herangezogen, die in der Praxis durch die Bildung des Quotienten aus dem Abstand beider Peakmaxima (Differenz der Retentionszeiten  $t_{R2}$  und  $t_{R1}$ ) und dem arithmetischen Mittel aus den dazugehörigen Peakbasisbreiten  $w_{b1}$  und  $w_{b2}$  (4) berechnet wird.

$$R = \frac{2(t_{R2} - t_{R1})}{w_{b1} + w_{b2}} \quad (4)$$

Angestrebt werden optimale chromatographische Auflösungen. Bei  $R = 1,5$  erfolgt Basislinientrennung zwischen beiden Peaks. Für quantitative Peakauswertungen sind  $R$ -Werte  $\leq 0,8$  unzureichend.