



EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN

Interfakultäres Institut für Biochemie (IfIB)

Chemisches Praktikum für Mediziner
Dr. Hubert Kalbacher, kalbacher@uni-tuebingen.de

3. Auflage, überarbeitet von H. Kalbacher, J. Leibold, J. Müller

Kurstag 7

Komplexometrie und Chromatografie

Stichworte zur Vorbereitung

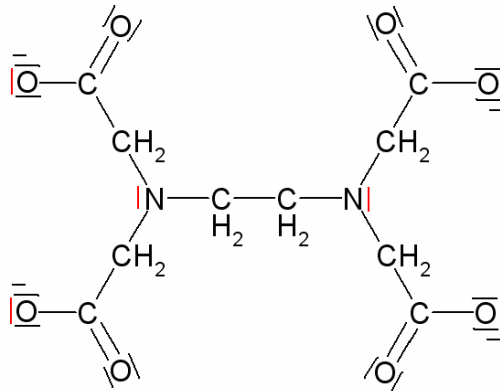
Aufbau von Metallkomplexen, Chelatkomplexe, Ligandenaustauschreaktionen, Stabilität von Metallkomplexen (wovon hängt die Stabilität der Komplexe ab?), Chromatographiearten (kurz), Prinzipien der Dünnschichtchromatographie

Ziel des Versuchstags

Das Kennen lernen zweier wichtiger komplexbildender Metalle Magnesium und Calcium ist das Hauptziel des Versuchstages. Des Weiteren soll der Blattfarbstoff Chlorophyll, der Mg^{2+} -Ionen enthält, erst isoliert und dann mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie in seine Bestandteile aufgetrennt werden.

Theorie

Die hohe Stabilität von Metall-Chelatkomplexen mit organischen mehrzähligen Liganden kann man dazu nutzen, diese Metallionen quantitativ zu bestimmen. Diese Methode nennt man komplexometrische Bestimmung. Der wichtigste organische Komplexbildner in dieser Beziehung ist Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA):



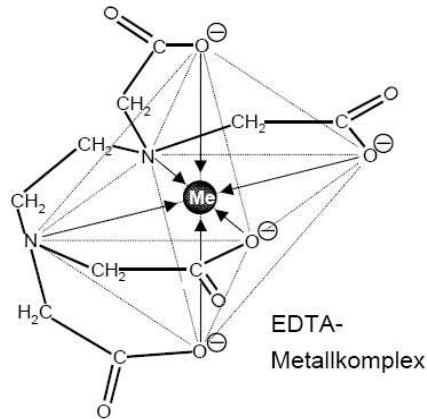
Sie entsteht, indem man im Ethylendiamin $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$ die vier H am Stickstoff durch Essigsäure ersetzt. Sie wird wie oben abgekürzt, besitzt aber auch eine Reihe von Trivialnamen wie z.B.: Komplexon oder Titriplex.

Komplexon ist eine kristalline, farblose Verbindung (Di- Na^+ -Salz, Tetra- Na^+ -Salz). In alkalischer Lösung liegt das Molekül, wie oben gezeigt, als vierfaches Anion vor. Dann besitzt es sechs freie Elektronenpaare, die koordinative Bindungen zu den entsprechenden Metallionen ausbilden können. Durch die geeignete Wahl des pH lässt sich erreichen, dass nur zwei der Carboxylgruppen als Carboxylatanionen vorliegen, so dass nur vier koordinative Bindungen ausgebildet werden können. Komplexon hat also wie Glycin (siehe Kurstag 7) zwei verschiedene funktionelle Gruppen, die als Liganden fungieren:

1. das Amin und
2. das Carboxylat-Anion

Komplexon bildet mit fast allen Metallionen sehr stabile Chelatkomplexe im Verhältnis 1:1, wobei 1 Mol Komplexon vier oder sechs koordinative Bindungen mit dem gleichen Metallion ausbildet.

Für ein Kation Me^{n+} mit der Koordinationszahl sechs ergibt sich folgender Komplex:



Mit einer Komplexlösung bekannter Konzentration kann durch komplexometrische Titration der Metallionen-Gehalt von Lösungen bestimmt werden. Wenn man davon ausgeht, dass ein Mol Komplexon mit einem Mol Metallionen reagiert, kann man aus der verbrauchten Menge der Komplexlösung die Menge der Metallionen berechnen.

Dies setzt allerdings voraus, dass man eine Möglichkeit hat, das quantitative Verschwinden von freien Metallionen aus der Lösung zu erkennen. Dazu verwendet man Metallindikatoren. Dies sind mehrzählige, gefärbte organische Liganden, die mit den Metallionen ebenfalls einen Chelatkomplex bilden. Um als Indikator bei einer komplexometrischen Titration fungieren zu können, muss dieser organische Farbstoff einige Bedingungen erfüllen:

1. Der Farbstoff muss mit dem Metallion einen Komplex bilden.
2. Der Metall-Farbstoffkomplex muss eine andere Farbe haben als der freie Farbstoff.
3. Der Metall-Farbstoff-Komplex muss wesentlich instabiler sein als der Metall-Komplexon-Komplex.

Dies soll anhand der Titration von Mg^{2+} -Ionen mit Komplexon unter Verwendung von Eriochromschwarz T als Indikator verdeutlicht werden, der obige Bedingungen erfüllt:

1. Eriochromschwarz T bildet zu Mg^{2+} drei koordinative Bindungen aus, die vierte Bindungsstelle wird von einem Wassermolekül besetzt.

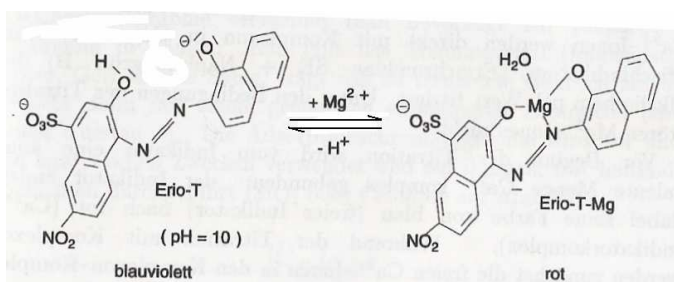


Abb.: ErioT

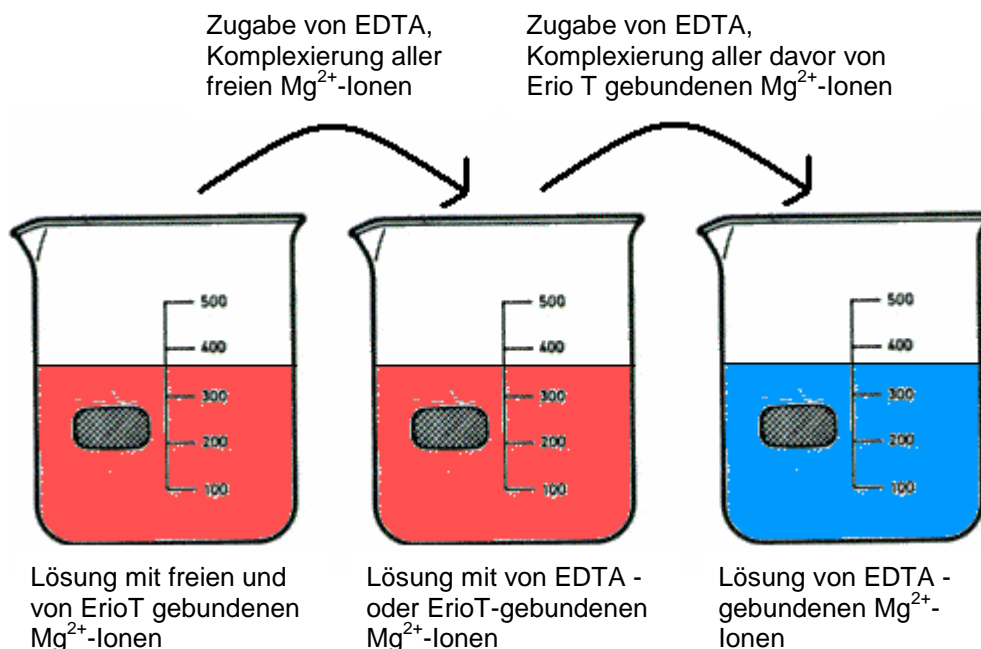
2. Der freie Farbstoff Eriochromschwarz T ist in verdünnter Lösung blau gefärbt. Er bildet mit Mg^{2+} -Ionen einen roten Komplex.
3. Der Mg^{2+} -Eriochromschwarz T-Komplex ist instabiler als der Mg^{2+} -Komplexon-Komplex, welcher bevorzugt gebildet wird.

Bei der Titration von Mg^{2+} - Eriochromschwarz T-Lösung mit Komplexon laufen folgende Reaktionen ab:

Vor der Titration liegen viele Mg^{2+} -Ionen frei vor, während einige als Mg^{2+} -Eriochromschwarz T-Komplex vorliegen und die Lösung dadurch rot färben.

Nun versetzt man langsam mit Komplexonlösung, wobei zunächst die freien Mg^{2+} -Ionen zum Mg^{2+} -Komplexon-Komplex reagieren. D.h. der Mg^{2+} - Eriochromschwarz T-Komplex bleibt zunächst erhalten und die Lösung bleibt rot.

Kurz vor dem Äquivalenzpunkt ist quasi kein freies Mg^{2+} mehr vorhanden. Wird weiterhin Komplexlösung hinzugegeben, so konkurrieren nun Komplexon und Eriochromschwarz T um die Mg^{2+} -Ionen. Da der Mg^{2+} -Komplexon-Komplex stabiler ist als der Mg^{2+} - Eriochromschwarz T-Komplex, wird er bevorzugt gebildet und entzieht dem Eriochromschwarz T die Mg^{2+} -Ionen. Eriochromschwarz T liegt nun in freier Form vor und färbt die Lösung blau.



Auf diese Art und Weise lassen sich die meisten Metallionen quantitativ bestimmen, wobei man für jedes Metallion einen spezifischen Indikator benötigt.

Komplexometrische Ca^{2+} -Bestimmung im Serum

Ca^{2+} -Ionen werden mit Komplexon analog in Gegenwart eines Mischindikators (Eriochromblau SE und Naphtholgrün B) bei alkalischem pH-Wert titriert. Unter diesen Bedingungen stören Mg^{2+} -Ionen nicht.

Der freie Mischindikator ist blau, der Ca^{2+} -Indikator-Komplex rot.

Wegen der sehr niedrigen Ca^{2+} -Konzentration ändert sich die Farbe nicht schlagartig, es tritt zunächst eine Mischfarbe auf. Um den Äquivalenzpunkt einigermaßen genau zu erreichen, titriert man eine der drei Proben absichtlich über. Der dabei erzielte Blauton sollte bei den anderen genaueren Titrationen erreicht werden.

Der Normalwert im Humanserum schwankt zwischen 9-11 mg Ca^{2+} in 100 ml Serum. Erniedrigte Ca^{2+} -Spiegel findet man hauptsächlich bei der Tetanie (Unterfunktion der Nebenschilddrüse, sie produziert zu wenig oder kein Parathormon mehr. Als Parathormonersatz dient ein Vitamin D-Derivat: Dihydrotachysterin = AT10), aber auch bei Niereninsuffizienz, Resorptionsstörungen, kindlicher Rachitis in der Heilphase und Hypoproteinämie.

Erhöhte Ca^{2+} -Spiegel findet man bei AT10 – Überdosierung oder primärem Hyperparathyreoidismus, Vitamin D-Überdosierung, Hyperproteinämie, Hyperphosphatasie und Knochentumoren.

Chromatographie

Als Chromatographie bezeichnet man eine Methode zur Trennung von chemischen Verbindungen. Die Trennung in einzelne Komponenten kann dabei durch unterschiedliche Ladung (Ionenaustauschchromatographie), unterschiedliche Größe und Form (Gelchromatographie) und unterschiedliche starke Bindung an geeignete Materialien (SiO_2 , Cellulose, Al_2O_3 , Adsorptionschromatographie: Dünnschichtchromatographie oder Gaschromatographie) erfolgen.

Die Ionenaustauschchromatographie und Gelchromatographie verwendet man bevorzugt zur präparativen Trennung in Säulen: man füllt das Trennmateriale (Ionenaustauscher, Gel) in eine Säule, trägt das zu trennende Gemisch auf und wäscht dann mit einem geeigneten Laufmittel (siehe auch Kurstag 4).

Die Adsorptionschromatographie wird vor allem zu analytischen Zwecken verwendet und auf dünnen, fest haftenden Schichten durchgeführt (SiO_2 oder Cellulose auf Alufolie).

Dünnschichtchromatographie

Die Möglichkeit, Stoffe dünnenschichtchromatographisch zu trennen, beruht auf einer geschickten Ausnutzung geringer Löslichkeitsunterschiede der zu trennenden Substanzen in einem aus zwei Phasen bestehenden Lösemittelgemisch. Üblicherweise setzt sich das Gemisch aus einem polaren Lösemittel und einem apolaren Lösemittel, das im Überschuss vorliegt, zusammen. In dieses Gemisch wird die Dünnschichtplatte gestellt und die Lösemittel werden auf dieser durch Kapillarkräfte nach oben gesaugt. Das polare Lösemittel (im Praktikum Methanol) wird aber von der Oberfläche der Dünnschichtplatte, also der Zellulose oder dem SiO_2 , auf Grund von Wasserstoffbrücken zurückgehalten und fließt damit langsamer nach oben als das apolare Lösemittel. Aufgrund dieses Verhaltens wird die langsamer fließende Phase (Methanol) als stationäre, die schneller fließende als mobile Phase bezeichnet.

Ein Stoff läuft umso langsamer, je stärker er mit der stationären Phase in Wechselwirkung treten kann bzw. je besser seine Löslichkeit in dieser ist. Stoffe, die sich gut in der mobilen Phase lösen, wandern folglich schneller.

Meist sind die Löslichkeitsunterschiede der zu trennenden Verbindungen im Substanzgemisch nur relativ klein. Da sich aber der Trennprozess in jedem Δs der Laufstrecke abspielt, ergibt sich ein Multiplikationsprozess, der die Trennung vervielfacht: der stärker wasserlösliche Stoff A (hydrophiler) bleibt zurück, der in der mobilen Phase besser lösliche Stoff B (hydrophober) läuft weiter. Das Laufmittel selbst läuft beiden voran.

Die zurückgelegte Strecke der einzelnen Stoffe bezogen auf die des Laufmittels (Laufmittelfront) ist also ein Maß für die Löslichkeitseigenschaften der Stoffe. Bildet man daher das Verhältnis der von einem Stoff zurückgelegten Strecke zu der von der Laufmittelfront zurückgelegten Strecke, so ist dieses Verhältnis bei konstanten Bedingungen (gleiches Laufmittel, Trennschicht, Temperatur) konstant, reproduzierbar und für den betreffenden Stoff charakteristisch. Man bezeichnet es als R_f -Wert (Retentionsfaktor).

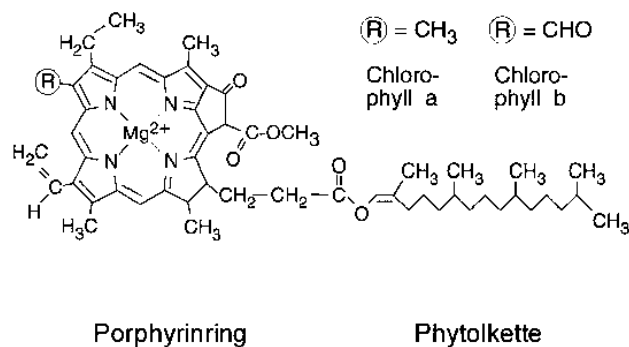
$$R_f = \frac{l_{\text{Substanz}}}{l_{\text{Laufmittel}}}$$

Für niedermolekulare, leicht flüchtige Substanzen eignet sich die Dünnschichtchromatographie nicht. Diese Gemische lassen sich mit Hilfe von Gaschromatographie auftrennen, wobei das Trennprinzip das gleiche wie bei der

Dünnschichtchromatographie ist. Als stationäre Phase fungiert ein fein gepulvertes inertes Material, das sich in einer langen, sehr dünnen Säule befindet und mit einem hochsiedenden Öl belegt ist. Als mobile Phase verwendet man ein inertes Gas (He, Ar). Der Trenneffekt beruht auf Löslichkeitsunterschieden der Komponenten des zu trennenden Gemisches im Öl des Säulenmaterials.

Nachweis von Mg^{2+} -Ionen aus Chlorophyll

Chlorophyll, der grüne Blattfarbstoff, ist ein Tetrapyrrol-Magnesium-Komplex, der maßgeblich an der Umwandlung von Lichtenergie in chemisch gespeicherte Energie in der Photosynthese beteiligt ist. Mg^{2+} -Ionen haben dabei neben der Stabilisierung des Tetrapyrrolgerüsts eine beschleunigende Funktion bei der Energieübertragung.



Durch Protonen wird Mg^{2+} über das Säure-Base-Gleichgewicht des Liganden aus dem Komplex verdrängt und lässt sich als freies Mg^{2+} mit Hilfe von Titangelb nachweisen, das mit Mg^{2+} einen roten Komplex bildet.

Trennung der Blattfarbstoffe von Spinat durch Dünnschichtchromatographie

Spinatblätter enthalten im Wesentlichen 4 Farbstoffe: Chlorophyll a ($R = -CH_3$, blaugrün), Chlorophyll b ($R = -CHO$, gelbgrün), β -Carotin (gelb) und verschiedene Xanthophylle (Sauerstoffhaltige Carinoide, gelb). Im verwendeten Laufmittel Hexan/Methanol läuft β -Carotin mit der Laufmittelfront, gefolgt von Chlorophyll a, einem Xanthophyll nicht bekannter Struktur, Chlorophyll b und verschiedenen Xanthophyllen.

Man beachte die gute Trennung von Chlorophyll a und Chlorophyll b, die sich nur dadurch unterscheiden, dass in einem hochkomplizierten Molekül eine Methylgruppe durch eine Aldehydgruppe ersetzt ist. Die erhöhte Methanollöslichkeit der Aldehydgruppe gegenüber der Methylgruppe ist für den Trenneffekt verantwortlich.

Neue Geräte und Methoden

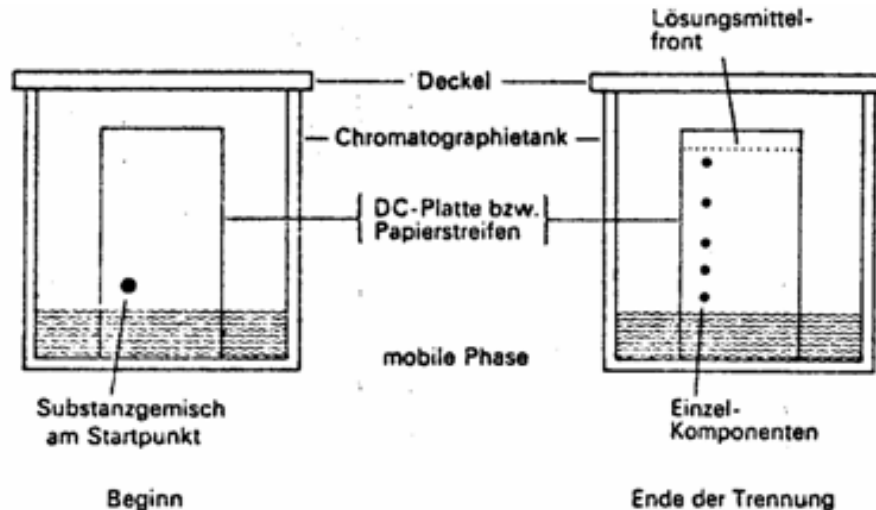
Dünnschichtchromatographie

Auf die ausliegenden DC-Platten wird ca. 2cm über dem Rand mit einem Bleistift eine feine Linie gezogen ohne das Material zu zerkratzen.

Das zu trennende Gemisch wird an der Startstelle (Punkt auf der Linie) als Lösung in Wasser oder Methanol aufgetragen. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Lösung möglichst konzentriert auf einem Punkt aufgetragen wird.

Dann wird die „Dünnschichtplatte“ in ein Gefäß gestellt, das am Boden ca. 1 cm des Laufmittelgemisches enthält. Bis das Laufmittel beinahe die komplette Strecke zurückgelegt hat, vergehen 15-60 Min (abhängig von der Trennschicht und vom Laufmittelgemisch).

Sind die zu trennenden Substanzen gefärbt, lässt sich die Trennung direkt mit dem Auge verfolgen. Sind sie nicht gefärbt, dann muss das Chromatogramm danach getrocknet und mit geeigneten Reagenzien besprüht werden, die mit den zu trennenden Substanzen eine gefärbte Verbindung eingehen (siehe auch Kurstag 12: Trennung von Aminosäuren).



Vorfragen

1. Beschreiben Sie analog zur Mg^{2+} -Bestimmung die Vorgänge während einer komplexometrischen Bestimmung von Ca^{2+} -Ionen.
2. Worauf beruht die Auftrennung eines Substanzgemisches bei der Dünnschichtchromatographie. Beschreiben Sie mit eigenen Worten.
3. Warum ist Komplexon im Vergleich zu Eriochromschwarz T der bessere Komplexbildner?

Durchführung

1. Aufgabe: Komplexometrische Bestimmung von Mg^{2+} Ionen

Man pipettiert in einen Erlenmeyer 10 ml der ausstehenden $MgSO_4$ -Lösung mit einem Gehalt von 0,5 mg Mg^{2+} pro ml. Zu dieser Lösung gibt man 2 ml Pufferlösung (NH_3/NH_4^+ , pH 10) und einige Tropfen Indikatorlösung (Eriochromschwarz T). Hierbei nimmt die Lösung eine rote Farbe an: Farbe des Komplexes aus Mg^{2+} und Eriochromschwarz T. Man titriert nun diese Lösung mit der ausstehenden 0,02 M Komplexonlösung bis zum Farbumschlag nach blau: Eigenfarbe von Eriochromschwarz T. Aus dem Verbrauch an 0,02 M Komplexonlösung berechnet man die vorgelegte Menge an Mg^{2+} -Ionen.

Der berechnete Wert sollte auf ca. 1% mit dem theoretischen Wert übereinstimmen.

2. Aufgabe: Komplexometrische Bestimmung von Mg^{2+} -Ionen

Man holt sich an der Ausgabe in einem Reagenzglas die Mg^{2+} -Analyse, gießt diese in einen Erlenmeyer um und spült gut nach. Dann versetzt man diese Lösung wie oben mit 2 ml Pufferlösung (NH_3/NH_4^+ , pH 10) und einigen Tropfen Indikatorlösung (Eriochromschwarz T) und titriert wie in Aufgabe 1 mit 0,02 M Komplexon-Lösung bis zum Farbumschlag nach blau. Aus der verbrauchten Menge an 0,02 M Komplexon-Lösung berechnet man die in der Analyse enthaltene Menge an Mg^{2+} -Ionen.

3. Aufgabe: Komplexometrische Bestimmung von Ca^{2+} -Ionen im Serum

In 3 Weithals-Erlenmeyer gibt man je 40 ml 1 % NaOH, 5 Tropfen Mischindikatorlösung (→ Blaufärbung) und genau 4 ml Serum (→ Farbumschlag nach rotviolett).

Man stellt sich 100ml 0,001M Komplexonlösung aus der ausstehenden 0,02 M Lösung durch Verdünnen im Verhältnis 1:20 her. Aus der Bürette lässt man in den ersten Erlenmeyer einen Überschuss (ca. 15ml) von 0,001 M Komplexonlösung einfließen. Der dabei erzielte Blauton soll bei den anschließenden genauen Titrationen am Endpunkt erzielt werden. Das verbrauchte Volumen (in ml) an 0,001 M Komplexonlösung gibt direkt den Ca^{2+} -Gehalt von 100 ml Serum in mg an (Normalwert ca. 10 mg Ca^{2+} /100 ml Serum).

4. Aufgabe: Nachweis von Mg^{2+} -Ionen mit Titangelb

2 ml der ausstehenden $MgSO_4$ -Lösung mit einem Gehalt von 0,5mg Mg^{2+} pro 100ml werden in ein Reagenzglas pipettiert. Zu dieser Lösung gibt man 2ml 2M NaOH, anschließend einige Tropfen 0,05%ige Titangelblösung und schüttelt gut durch. Dieser Nachweis ist sehr spezifisch.

Was beobachten Sie?

5. Aufgabe: Nachweis von Mg^{2+} -Ionen in Chlorophyll (Efeu, Brennnesseln)

Die Extraktion von Mg^{2+} -Ionen aus Chlorophyll wird 2 x pro Tisch durchgeführt, den Mg^{2+} - Nachweis führt jede Gruppe durch.

Ca. 10 g Efeu- oder Brennnesselblätter werden mit 20ml 2M HCl in einem 100ml Erlenmeyer einmal kurz aufgekocht (Dreifuß, Drahtnetz, Bunsenbrenner). Um Siedeverzüge zu vermeiden, schüttelt man öfters oder rührt mit dem Glasstab. Nach dem Aufkochen neutralisiert man durch Zugabe von 20ml 2M NaOH und filtriert die abgekühlte Suspension über einen Faltenfilter in einen 100ml Erlenmeyer. Man füllt 2ml dieser Lösung in ein Reagenzglas, gibt 2ml 2M NaOH und 0,5ml 0,05 %ige Titangelblösung zu und schüttelt gut durch.

Was beobachten Sie?

6. Aufgabe: Trennung der Blattfarbstoffe von Brennnessel- bzw. Efeublättern durch Dünnschichtchromatographie an Kieselgel

Extraktion der Farbstoffe:

1g frische Efeu- oder Brennnesselblätter werden möglichst fein zerkleinert, in einem Reagenzglas mit 5 ml Methanol versetzt und mit dem Glasstab gut durchgerührt. Wenn die Efeu- oder Brennnesselblätter nur noch schwach gelb gefärbt sind und die Lösung eine intensiv grüne Farbe angenommen hat, wird sie zur Chromatographie verwendet. Da die Extraktion relativ lange dauert, wird auch bereits vorgefertigter Extrakt + β -Carotin ausgestellt.

Chromatographie:

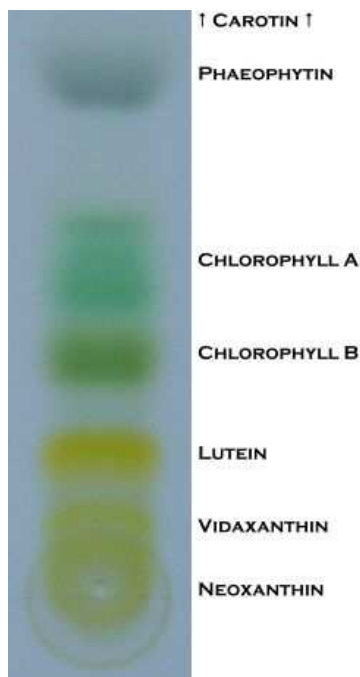
Auf eine der ausliegenden Chromatographieplatten wird obiger Extrakt mit Hilfe einer Kapillare in zwei verschiedenen Konzentrationen aufgetragen.

Anschließend wird in einem 250 ml Becherglas das Laufmittel zugegeben (Petrolether / Isopropanol im Verhältnis 20 : 2 mischen und 1 Tropfen Wasser

zugeben); steht im Abzug. Die Höhe des Laufmittels soll nicht mehr als 1cm betragen und auf jeden Fall unter der Auftragsstelle im DC liegen. Dann wird das Chromatogramm in das Becherglas gestellt und das Becherglas mit Alufolie bedeckt. Das Laufmittel wandert in ca. 15 Minuten über das Chromatogramm und nimmt die verschiedenen Farbstoffe verschieden weit mit. Da die zu trennenden Verbindungen gefärbt sind, lässt sich die Trennung direkt verfolgen.

Die Extraktion der Farbstoffe wird 2x pro Tisch durchgeführt, die chromatographische Trennung 1 x pro Gruppe.

Das Ergebnis könnte folgendermaßen aussehen:



Entsorgung:

Die verwendeten Lösungen sind in den verwendeten Mengen nicht umweltbelastend und können dem Abwasser beigegeben werden.