Practicum: kolomchromatografie

In dit experiment worden bladgroenpigmenten gescheiden d.m.v. chromatografische technieken. Bij kolomchromatografie maken we gebruik van een aardappelzetmeel-en wasbenzine suspensie in een pasteurpipetje. Als we een extract van gras of bladspinazie op de kolom aanbrengen zullen de moleculen van het extract gescheiden worden op grootte. De kleinste moleculen lopen het hardst en komen als eerste uit de kolom.

**Benodigdheden:**

1 à 2 gram vers gras of bladspinazie (diepvries) aceton

petroleumether wasbenzine

aardappelzetmeel gedestilleerd water

plukje watten 3 reageerbuizen

3 rubber stoppen 2 erlenmeyers

mortier en vijzel trechter

metalen theezeefje microspatel

glazen roerstaaf pasteurpipetten

speentjes statief + klem

tafelcentrifuge + centrifugebuizen

De ene leerling extraheert het bladgroen en de andere maakt de kolom.

**Bereiding van het bladgroenextract:**

Wrijf de bladeren in het mortier fijn en breng de rij met een spatel over i een reageerbuis. Spoel de mortier met 2 ml aceton en breng dit ook over in de reageerbuis. Sluit de reageerbuis met een rubber stop en schud flink, zodat alle brij goed in aanraking komt met de aceton Zet de buis 10 min weg in het donker (aluminiumfolie om de buis). Giet de inhoud van de buis vervolgens over in een centrifugebuis via een op een trechter geplaatst metalen theezeefje, zodat de grove bladresten in de zeef achterblijven. Spoel de eerste buis na met 2 ml water en breng dit ook via de zeef over in de centrifugebuis. Voeg 0,5-1,0 ml petroleumether in de centrifugebuis en schud ongeveer 10 minuten krachtig. De bladgroenkleuren worden nu opgenomen in de petroleumetherlaag. Plaats de buis in de centrifuge en centrifugeer ongeveer 15 sec. De bovenste laag is de petroleumether met het bladgroen. Haal deze laag er met een pasteurpipet af.

**Het maken van de aardappelzetmeelkolom:**

Roer m.b.v. een roerstaaf ongeveer 10 gram aardappelzetmeel in een erlenmeyer met ongeveer 20 ml wasbenzine tot een niet al te dikke suspensie. Breng m.b.v. een microspatel een plukje watten onder in een pasteurpipet. Bevestig deze pasteurpipet, die als kolom dienst gaat doen, aan een statief en zet er een bekerglaasje onder. Druppel m.b.v. een tweede pasteurpipet wat wasbenzine op de watten en vul de kolom vervolgens met de aardappelzetmeel-wasbenzine suspensie totdat het aardappelzetmeel tot ca 1 cm onder de rand staat. Blijf bijvullen met wasbenzine, de kolom mag niet droog komen te staan.

**Kolomchromatografie:**

Laat de kolom bijna droog lopen. Breng nu met een pasteurpipet 4 à 5 druppels bladgroenextract op de kolom. Laat het bladgroen in de kolom trekken en druppel, als bijna alle bladgroen in de kolom is, wasbenzine op de kolom. Probeer de bovenkant van de kolom niet om te woelen. Druppel dus voorzichtig. Blijf wasbenzine toevoegen, zodat de kolom niet droog valt. Het gele caroteen wordt het snelst door de wasbenzine meegenomen; stop de scheiding voordat het caroteen de onderkant van de kolom heeft bereikt, door het toevoegen van wasbenzine te staken en de boven de kolom staande laag wasbenzine af te pipetteren.

 Boven het caroteengebied zijn botergele banden xanthofyllen zichtbaar, terwijl boven in de kolom het blauwgroene chlorofyl-a en geelgroen chlorofyl-b te onderscheiden zijn. Eventuele aanwezige grijsbruine banden worden veroorzaakt door feofytinen.