

CHEMISCHE METHODEN

Wachstum und Stoffwechsel der Pflanzen

Heißwasser und Säureextraktion

40 mg HWE
20 mg SRE
1,5 ml
AI, KI 0,5 +10

1. Anionenchromatographie von Organischen Säuren und Anorganischen Anionen

Prinzip der Methode

Die Anionenchromatographie ist eine flüssigchromatographische Methode, bei der die Probe-Ionen an einem Ionenaustauscherharz (oder -silikagel) aufgetrennt werden. Die Säule wird von einer mobilen Phase (einem Elektrolyten, z.B. einer verdünnten Base) durchspült, die für eine Elution der Probe-Ionen von der stationären Phase sorgt.

Mit Hilfe der Anionenchromatographie lassen sich anorganische Anionen (etwa Nitrat, Chlorid, Sulfat und Phosphat) und organische Säuren (z.B. Äpfel- oder Zitronensäure) bestimmen, wobei zur Detektion ein Detektor verwendet wird, der die elektrische Leitfähigkeit erfasst. Ein Problem ist dabei die hohe Eigenleitfähigkeit des Eluenten, der ja selbst ein Elektrolyt sein muss. Zur Unterdrückung der Eigenleitfähigkeit des Eluenten wird vor den Detektor ein „Supressor“ geschaltet, der auf chemischem Wege die Leitfähigkeit des Eluenten (hier einer verdünnte Natronlauge) herabsetzt.

Trennsystem

Säule	Anionentauscher IonPac AS11 (starker Anionenaustauscher auf Latex-Harz-Basis), 10 µm, 25 cm x 4 mm Innendurchmesser.
Vorsäule	IonPac AS11-guard, 13 µm, 5 cm x 4 mm.
Eluent	0,5 mM NaOH auf 37.5 mM NaOH in 18 min, Eluentengenerator EG40.
Diverses	Flußrate 2mL min ⁻¹ , Temperatur 35 °C, Leitfähigkeitsdetektor nach chemischer Supression

Standards

Es wird eine kombinierte Anionenstandardlösung hergestellt, die folgende Ionen in einer Konzentration von 100 mg/L enthalten soll: Chlorid, Nitrat, Sulfat, Phosphat, Malat, Oxalat und Citrat.

Von dieser Lösung wird zur Kalibrierung der Methode eine entsprechende Verdünnungsreihe hergerichtet. Dazu werden 0.8 mL A.dest in 10 2-mL Eppendorf Gefäße vorgelegt. In das erste Röhrchen werden 0.8 mL des 100 mg/L Standards pipettiert (Verdünnung 1:2, also 50 mg/L). Das Gefäß wird geschlossen, gut geschüttelt und die Verdünnung wird genauso weiter verdünnt. Bei 10-maligem Wiederholen, sind am Ende Standards mit folgender Konzentration vorhanden: 50.0, 25.0, 12.5, 6.25, 3.125, 1.563, 0.781, 0.391, 0.195 und 0.098 mg/L.

Vorbereitung der Proben und Standards

Von allen Heißwasser-Extrakten werden nun 1:20 Verdünnungen (in 1 mL) hergestellt. Dazu werden 50 µL der Extrakte in 1.5 mL Eppendorf-Röhrchen vorgelegt und dazu 950 µL A. dest pipettiert. Die Standards werden ohne weitere Verdünnung in 1 mL GC Vials umgefüllt. Die Beschriftung der Röhrchen erfolgt dabei auf der Seite, NICHT auf dem Deckel.

2. Kationenchromatographie

Prinzip der Methode

Die Kationenchromatographie ist eine flüssigchromatographische Methode, bei der die Probe-Ionen an einem Kationenaustauscher aufgetrennt werden. Die Säule wird von einer mobilen Phase (einem Elektrolyten, z.B. einer verdünnten Weinsäure) durchspült, die für eine Elution der Probe-Ionen von der stationären Phase sorgt.

Vorbereitung der Proben

Von allen Heißwasser-Extrakten werden nun 1:20 Verdünnungen (in 10 mL) hergestellt. Dazu werden 500 µL der Extrakte in 10 mL Greiner-Röhrchen vorgelegt und dazu 10 mL A. dest pipettiert.

Von allen HCl-Extrakten werden 1:200 Verdünnungen (in 10 mL) hergestellt. Dazu werden 50 µL der Extrakte in 10 mL Greiner-Röhrchen vorgelegt und dazu 10 mL A. dest pipettiert.

Die Beschriftung der Röhrchen erfolgt dabei auf dem Deckel.

3. Analyse von Chlorophyll a, Chlorophyll b und Carotinoiden

Extraktion

5 Scheibchen (Korkbohrer, d=1 cm) mit 4 mL *N,N*-Dimethylformamid überschichten und im Kühlraum (+ 4°C) extrahieren lassen.

Eine Zerkleinerung des Pflanzenmaterials ist nicht notwendig!

Detektion

Die UV-Extinktionen werden bei folgenden Wellenlängen ermittelt:
480, 645, 647, 652, 663, 664 nm

Chlorophyll a

$$\text{Chl a} = 11.78 E_{664} - 2.29 E_{647}$$

Chlorophyll b

$$\text{Chl b} = 20.05 E_{647} - 4.77 E_{664}$$

Gesamtchlorophyll

$$\text{Gesamtchlorophyll: Chla} + \text{Chlb} = 27.8 E_{652}$$

Carotinoide

$$\text{Car} = E_{480} + 0.114 E_{663} - 0.638 E_{645}$$

Molmasse und Extinktionskoeffizient bei der Detektionswellenlänge sind in diesen Formeln bereits berücksichtigt.

Die Küvette fasst 4 mL, also das gesamte eingesetzte Lösungsmittel. Die Konzentration der Analyten wird in mg L^{-1} ermittelt. Fünf Blattscheiben haben eine Fläche von ca. 4 cm^2 . Die zu ermittelnden Werte sind in $\mu\text{g/cm}^2$ anzugeben.

Molmassen

Chlorophyll a:	893 g/mol
Chlorophyll b:	907 g/mol
Carotinoide (β -Carotin):	550 g/mol

ANHANG

A. Analyse von Photosynthesepigmenten: Chlorophyll a, Chlorophyll b, Carotinoide

