

## 24. Spektrofotometryczne badanie barwników roślinnych. Kolory

Barwniki stosuje się od starożytności. Do XIX wieku były to najczęściej barwniki roślinne. Wykorzystywano wiele roślin, np.:

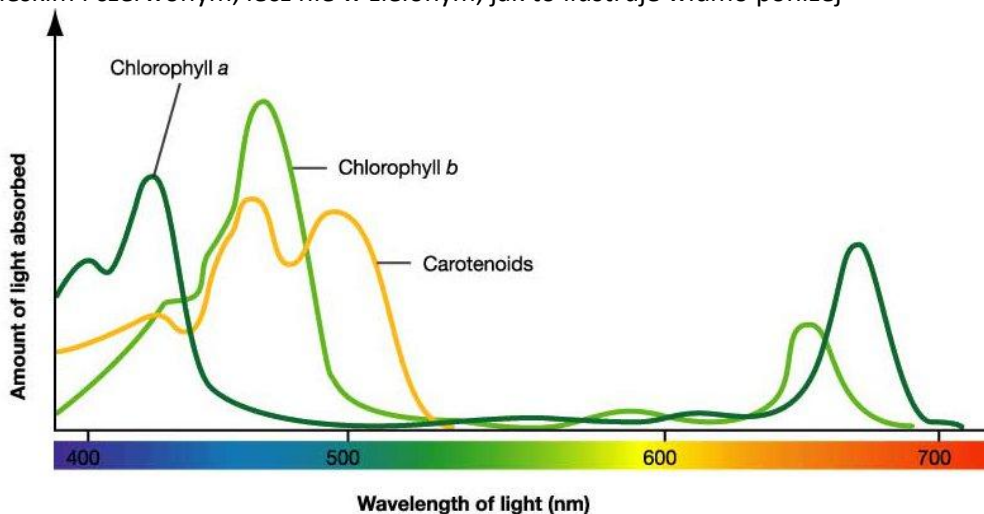
- Owoc mącznicy (*Ramnus*) – barwnik żółty;
- Drewno akacji – barwnik brązowy;
- Suszony kwiat krokosza barwierskiego – barwnik czerwony;
- Drewno różnych drzew – barwnik czarny, i in.

Z nielicznymi wyjątkami, naturalne barwniki wymagały stosowania nieorganicznych związków zwanych mordantami. Powodują one wytrącanie się barwników.

Po wynalezieniu barwników syntetycznych pojawiły się teorie próbujące wyjaśnić związek między chemiczną budową związku a jego barwą. Teoria „chromoforowa” zakłada istnienie grup funkcyjnych intensyfikujących barwę. Pierwotnie chromofory identyfikowano z chinonami (utlenionymi strukturami, pochodnymi benzenu). Obecnie chromoforami nazywamy grupy silnie absorbujące światło w zakresie od ultrafioletu do bliskiej podczerwieni.

Zgodnie z teorią kwantową, absorpcja w zakresie światła widzialnego zwiększa energię elektronów w molekule do tzw. stanu wzbudzonego. Ta energia musi zostać następnie wydzielona jako ciepło, fosforescencja lub fluorescencja, albo w reakcji chemicznej z otoczeniem. Tak zatem substancja posiada barwę, ponieważ selektywnie absorbuje światło widzialne. Tak więc czerwona substancja absorbuje światło niebieskie i zielone, zielona absorbuje niebieskie i czerwone, itd.

Przykładem jest chlorofil, zielony barwnik roślin. W przyrodzie głównie występuje jako *chlorofil a* i *chlorofil b*, obecne we wszystkich fotosyntezujących organizmach; inne chlorofile (*c* i *d*) występują w algach. Chlorofile dobrze rozpuszczają się w acetonie, lipidach, alkoholach, ale bardzo słabo w wodzie. Więcej chlorofilu w roślinie to bardziej wydajna fotosynteza, a zatem i lepsza kondycja rośliny. Chlorofile są zielone, bo absorbują światło w obszarach niebieskim i czerwonym, lecz nie w zielonym, jak to ilustruje widmo poniżej



Rys.1. Widmo absorpcyjne karotenoidów oraz chlorofilu a i chlorofilu b.

Najważniejszymi barwnikami roślin są:

- Karoteny i flawony, absorbujące w niebieskim obszarze widma. Obecne są np. w korzeniu marchwi, kwiatach jaskra (*Ranunculus*) i pierwiosnka (*Primula*) itp., nadając pomarańczową lub żółtą barwę (patrz Rys. 1);
- Antocyjany, rozpuszczone w płynie międzykomórkowym, są odpowiedzialne za kolor czerwony. Chemicznie bliskie flawonom, dlatego nawet bardzo genetycznie bliskie rośliny mają bardzo różne barwy, od czerwonego i żółtego po niebieski. Ponadto ich barwa zależy od pH, najczęściej kolor czerwony w środowisku alkalicznym zmienia się na niebieski. Barwa może też zależeć od zawartości niektórych metali np. glinu) w glebie.

Co interesujące, kolor biały jest wywołany zupełnym rozproszeniem światła przez maleńkie pęcherzyki powietrza w przestrzeniach międzykomórkowych, co czasem występuje w płatkach kwiatów.

Jesienią wspaniała paleta barw liści to zasługa karotenów i antocyjanów, niemaskowanych przez dominujący zielony kolor chlorofilu.

Z kolei intensywnie czerwona barwa buraka ćwikłowego to nie antocyjany, ale betalainy, odrębna grupa barwników, występujących także w szpinaku oraz komosowatych (*Chenopodium*). Te barwniki nie są odporne na

temperaturę oraz tlen z powietrza, zwłaszcza przy pH powyżej 4.5, w wysokich pH ulegają rozkładowi. Silnie redukujący charakter (antyutleniający) charakter barwników buraka czyni to warzywo niezmiernie ważnym w diecie, zwłaszcza leczniczej.

Celem niniejszego ćwiczenia jest porównawcza analiza widm UV-VIS barwników różnych roślin i zbadanie zależności między kształtem widma a obserwowanym kolorem naturalnych barwników.

Studenci są proszeni o zebranie i przyniesienie na zajęcia kilku różnych próbek roślinnych: barwne korzenie, liście, płatki kwiatowe, owoce. Potrzebne będą przynajmniej trzy różne próbki (o różnych barwach). Najbardziej pożądane są m.in. korzeń buraka ćwikłowego (betalainy), korzeń marchwi (karoten) i płatki kwiatów (antocyjany i in.). Barwniki zostaną nich wymyte lub ekstrahowane, zależnie od ich właściwości.

#### Odczynniki i aparatura:

- płatki (róż, tulipanów, kwiatów łąkowych itp., ale nie goździków), owoce (wiśnia, malina, porzeczka czerwona lub czarna itp.), korzenie (marchwi, buraka itp.);
- bufor o pH = 1; 4.5; 8.3
- aceton, alkohol n-propylowy, etanol, n-heksan lub n-heptan
- moździerz
- kolby jednmiarowe á 50 mL
- zlewki na 100mL i 25 mL
- szklane lejki, wata, bibuła filtracyjna (średnia)
- pipety, nasadki do pipet, szklane bagietki
- tarka, deseczki, noże, rękawiczki, ręczniki papierowe do wycierania kuwet z zewnątrz
- tryskawka z H<sub>2</sub>O, tryskawka z mieszaniną metanol-aceton (1:1) do mycia kuwet
- spektrofotometr z kuwetami
- pendrive
- linia gazowym azotem

#### Procedura:

Zważ ok. 5 g próbki owoców, płatków, korzenia itp. w moździerzu, rozdrobnij próbkę w moździerzu, przenieś do zlewki na 100 ml i dodaj ok. 40 mL rozpuszczalnika<sup>\*/</sup>, pozostaw na 10 min. Cały wyciąg należy przefiltrować przez watę lub sączek z bibuły umieszczony w małym szklanym lejku do kolby miarowej na 50 mL oraz uzupełnić rozpuszczalnikiem do kreski - **konieczne jest otrzymanie klarownego barwnego ekstraktu**. Ten punkt może jednak być inny zależnie od typu próbki – poproś prowadzącego o radę.

Wlej 5 mL roztworu do zlewki na 25 mL i dodaj ok. 5 mL buforu o pH=1. Wymieszaj zawartość (szklana bagietka). Dla tej samej próbki przygotuj w ten sam sposób kolejne roztwory z buforami o pH = 4.5 oraz 8.3. Wlej część przygotowanego roztworu do kwarcowej kuwety z wyposażenia spektrofotometru.

Zmierz widma UV-VIS swoich roztworów, zapisz też ich barwy, tak jak je widzisz. Uwaga: pracując ze spektrofotometrem poproś prowadzącego, żeby był przy tym obecny. Uwaga: po pomiarach roztwory z kuwet wylej do pojemnika „Zlewki organiczne” a kuwety przepłucz mieszaniną metanol – aceton (z tryskawki) i wysusz pod strumieniem gazowego azotu.

Powyższą procedurę przeprowadź dla trzech różnych próbek.

Dla bardziej ambitnych: Spróbuj w płatkami hortensji (*Hydrangea*), dodając przy różnych pH roztworu soli Al<sup>3+</sup> i/lub Sn<sup>2+</sup>. Hortensja znana jest z tego, że barwa jej kwiatów zależy silnie od zawartości jonów metali w glebie. Spróbuj też zinterpretować swoje obserwacje w kontekście pH gleby.

#### Sprawozdanie:

Sprawozdanie powinno zawierać zmierzone widma i interpretację dotyczącą związku między ich kształtem a obserwowaną barwą próbki. Spróbuj też wyjaśnić zmiany spowodowane różnym pH.

Uwaga: dla tego ćwiczenia nie ma wzoru (formularza) sprawozdania, bowiem jest ono głównie opisowe.

<sup>\*/</sup> Rozpuszczalnikiem może być wodny roztwór acetonu lub alkoholu lub węglowodór – należy dobrać najlepszy metodą prób i błędów.

#### Źródła:

- Leo M.L. Nollet, "Handbook of Food Analysis", Second Edition, Volume 1: "Physical Characterization and Nutrient Analysis", Marcel Dekker, Inc., USA 2004.
- P. Kafarski, P. Wieczorek, "Ćwiczenia laboratoryjne z chemii bioorganicznej", Wrocław Technical University, 1997

- D. M. Mulati, N. S. Timonah and W. Bjorn, "The absorption spectra of natural dyes and their suitability as a sensitizer in organic solar cell application", JAGST 14(1) 2012, p. 45-60.
- D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch, "Fundamentals of Analytical Chemistry", Thomson Brooks/cole (2000).
- Materiały Uniwersytetu Opolskiego
- <http://kobiocypracownik.pl/>
- <http://portalwiedzy.onet.pl>
- <http://www.readbag.com/staff-amu-pl-wlodgal-antocyjany>
- [http://cct.me.ntut.edu.tw/ccteducation/chchtting/aiahtm/pub\\_cct/paper/Ting07g.pdf](http://cct.me.ntut.edu.tw/ccteducation/chchtting/aiahtm/pub_cct/paper/Ting07g.pdf)
- <http://www.webexhibits.org/causesofcolor/7.html>
- <http://www.newton.dep.anl.gov>
- [http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Chlorophyceae/Chloro\\_key.html](http://cfb.unh.edu/phycokey/Choices/Chlorophyceae/Chloro_key.html)