Barwniki syntetyczne i naturalne

<u>Zagadnienia teoretyczne do przygotowania:</u>

- *podstawowe pojęcia: teoria barwności, substancja barwna, barwnik, pigment, chromofor, auksochrom*
- *podział barwników według różnych kryteriów*
- *barwniki syntetyczne*
- *barwniki asymilacyjne*
- *metody izolacji barwników z materiału roślinnego*
- *metody chromatograficzne*
- *metody spektrofotometryczne, widmo absorpcyjne*
- *reakcje diazowania i sprzęgania, wpływ warunków na przebieg reakcji; związki azowe, diazoniowe, dwuazowe*

Cel:

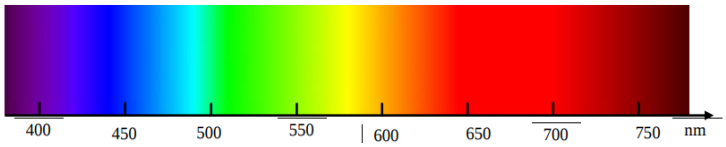
- **Ćwiczenie 7:** Zapoznanie się z metodologią otrzymywania wybranych barwników chemicznych i poznanie ich właściwości fizykochemicznych
- **Ćwiczenie 8:** Ekstrakcja barwników roślinnych (chlorofil a, chlorofil b, karoten, ksantofile) z liści, chromatograficzny rozdział mieszaniny barwników za pomocą chromatografii cienkowarstwowej TLC i oznaczanie metodą spektrofotometryczną. Ocena właściwości chlorofili w zależności od środowiska (czynników stresowych).

1. WSTĘP

Barwniki organiczne znane były już w czasach starożytnych. Należały do nich m.in.: błękitne indygo, żółtopomarańczowy szafran czy czerwony karmin rzymski. Pierwszy syntetyczny barwnik został otrzymany w 1856 roku przez Perkina i został nazwany moweiną, ze względu na kolor podobny do kwiatu malwy.

Światło widzialne dla oka ludzkiego obejmuje wąski zakres w widmie fal elektromagnetycznych o długości fali λ = 370-780 nm (Rys.1). Po rozszczepieniu daje ono całą gamę barw z trzema podstawowymi kolorami: żółtym, niebieskim i czerwonym. Promieniowanie o mniejszej długości fali to ultrafiolet, o większej – podczerwień. Oko ludzkie odbiera światło o różnych długościach fal jako wrażenie różnych barw:

- fiolet (380 nm - 436 nm)
- niebieski (436 nm - 495 nm)
- zielony (495 nm - 566 nm)
- żółty (566 nm - 589 nm)
- pomarańczowy (589 nm - 627 nm)
- czerwony (627 nm - 780 nm)



Rysunek 1. Widmo światła widzialnego

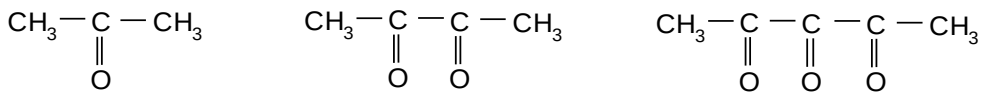
Związek barwny absorbuje wybiórczo tylko pewne długości fal świetlnych. Barwa, którą rejestruje ludzkie oko jest barwą dopełniającą do pochłoniętej. Gdy materiał całkowicie pochłania padającą na niego wiązkę promieniowania światła widzialnego, przedmiot wydaje się czarny, gdy całkowicie odbija – biały. W przypadku związków barwnych częstość pochłanianego promieniowania odpowiada różnicy poziomów energetycznych elektronu biorącego udział w przejściu ze stanu podstawowego (E_1) do stanu wzbudzonego o wyższej energii (E_2).

$$\nu = \frac{E_2\text{-}E_1}{h} = \frac{c}{\lambda}$$

h – stała Plancka
c – prędkość światła (3×108 m/s)
λ – długość fali

Zgodnie z „teorią barwników organicznych" opublikowaną w 1876 roku przez Witt'a każdy związek barwny winien zawierać ugrupowania o wiązaniach nienasyconych. Grupy te nazwano **chromoforami**, a substancje zawierające chromofory określa się jako chromogeny. Do najważniejszych i najczęstszych chromoforów należą: **-NO₂**, **-N=O**, **-N=N-**, **>C=O**, **>C=S**, **>C=N-**, **>C=C<**, **aryl**, grupa **chinonowa** itp.

Obecność jednego ugrupowania chromoforowego zazwyczaj nie wystarcza do wywołania barwy, zwiększenie liczby chromoforów powoduje pogłębienie barwy (Rys. 2).



bezbarwny żółty pomarańczowy

Rysunek 2. Wpływ liczby chromoforów na barwę

Obecność ugrupowań chromoforowych nadaje barwę substancji ale nie staje się ona jeszcze barwnikiem, tj. związkiem, za pomocą którego można w trwały sposób zabarwić włókna czy materiał pochodzenia naturalnego lub syntetycznego.

Związek barwny staje się barwnikiem, to znaczy, że może nadawać barwę innym materiałom dopiero po wprowadzeniu do jego cząsteczki ugrupowania atomów, zwanych **auksochromem**. Grupy, zawierające wolne pary elektronowe, wprowadzone do cząsteczki określonego związku organicznego, tzw. chromogenu, powodują nasilenie jego barwy i jednocześnie nadają mu cechy barwnika użytkowego o powinowactwie do barwionej materii. Do najważniejszych auksochromów należą: **-OH**, **-OCH_3**, **-$OCOCH_3$**, **-NH_2**, **-NHR**, **-NR_2**, **-$NHCOCH_3$** lub **-Cl**, **-Br**.
Ponadto, powinowactwo do wielu materiałów oraz zwiększenie rozpuszczalności barwników w wodzie warunkują grupy: **-SO_3H**, **-COOH**, **-NH_2**.
Zgodnie ze współczesną teorią barwności auksochromy są elektrodonorami, ugrupowaniami sprzyjającymi polaryzacji cząsteczki. Wprowadzone do cząsteczki mogą powodować zmiany w obserwowanym paśmie absorpcji danego związku. Dostrzec można cztery typy zmian:

- przesunięcie batochromowe – przesunięcie pasma absorpcyjnego w kierunku fal dłuższych
- przesunięcie hipsochromowe – przesunięcie pasma absorpcyjnego w kierunku fal krótszych
- efekt hiperchromowy – podwyższenie natężenia pasma absorpcji
- efekt hipochromowy - obniżenie natężenia pasma absorpcji

Barwniki organiczne warunkują między innymi barwę organizmów roślinnych i zwierzęcych oraz stosowane są w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i farmaceutycznym. Wykorzystywane są do barwienia różnego rodzaju włókien naturalnych i syntetycznych, tworzyw sztucznych, skóry, papieru i żywności. W obszarze włókienniczym zastosowanie praktyczne mają jedynie barwniki odznaczające się trwałością otrzymanych wybarwień, tzn. ich odpornością na działanie światła, potu, chloru, tarcia w stanie suchym i wilgotnym oraz prania w ciepłym roztworze mydła, prasowania, oraz te barwniki, które nie działają szkodliwie na organizm człowieka i nie wywołują odczynów alergicznych.

2. PODZIAŁ BARWNIKÓW

Barwniki klasyfikuje się według różnych kryteriów takich jak pochodzenie, budowa chemiczna, rozpuszczalność, barwa czy możliwości aplikacyjne. Uwzględniając pochodzenie wyróżnia się barwniki naturalne organiczne i nieorganiczne, roślinne i barwniki syntetyczne identyczne z naturalnymi oraz barwniki syntetyczne nie mające odpowiednika w naturze, a także barwniki pochodzące z określonego źródła np. z liści, pomidora, buraka, marchwi itp.

Ze względu na budowę chemiczną związki barwne dzieli się najogólniej na barwniki karbocykliczne i heterocykliczne. Z uwagi na rodzaj występującego w barwniku chromoforu wśród barwników karbocyklicznych rozróżnia się m.in. barwniki azowe, nitrowe, nitrozowe, triarylometanowe, benzochinonowe, naftochinonowe, antrachinonowe, chinoiminowe, wśród heterocyklicznych – barwniki indygoidowe, tioindygowe, ksantenowe, oksazynowe, akrydynowe, azynowe, tiazynowe, ftalocyjaninowe, cyjaninowe i inne.

Przykłady grup barwników uwzględniających budowę chemiczną:

- barwniki azowe (−N=N−, oranż metylowy (heliantyna), żółty 4-hydroksyazobenzen),
- barwniki chinonowe (O=C_6H_4=O, alizaryna, chinizaryna, lawson, juglon),
- barwniki difenylometanowe (Ar_2C=N, oranż akrydynowy),
- barwniki iminochinoidowe (N=C_6H_4=O lub N=C_6H_4=N, błękit indofenolowy),
- barwniki indofenolowe (2,6-dichlorofenoloindofenol)
- barwniki indygoidowe (indygotyna, indygo),
- barwniki nitrowe (−NO_2, kwas pikrynowy),
- barwniki polienowe ((−C=C−)$_n$, karoteny),
- barwniki tiazynowe (błękit metylenowy),
- barwniki trifenylometanowe (zieleń malachitowa).

3. BARWNIKI SYNTETYCZNE

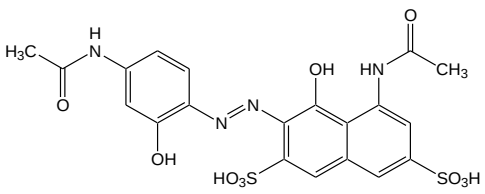
Barwniki otrzymane na drodze syntezy chemicznej charakteryzują się różnorodnością strukturalną, np.: mono-, di- i triazowe, triarylometanowe, ksantenowe, chinolinowe czy indygoidowe. Rozpuszczalne w wodzie formy tych związków najczęściej otrzymuje się przez wprowadzenie do cząsteczki barwnika grup sulfonowych lub karboksylowych. Strącenie tych barwników w postaci soli, najczęściej glinowych, umożliwia otrzymywanie barwnych pigmentów, nierozpuszczalnych w wodzie tzw. laków. Zaletą barwników syntetycznych w porównaniu z barwnikami naturalnymi jest to, że mają one standardową moc barwienia, charakteryzują się większą czystością, trwałością oraz odpornością na warunki środowiska, a ich formy handlowe (proszki, pasty, roztwory) ułatwiają stosowanie. Nie bez znaczenia jest fakt, że są one tańsze od naturalnych.

3.1. Barwniki kwasowe

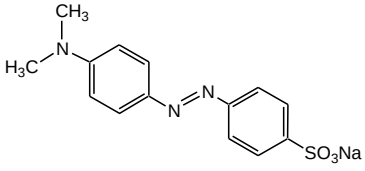
Związki z tej grupy posiadają budowę anionową i wykorzystywane są w barwieniu proteinowych włókien naturalnych (np. jedwab, wełna) i syntetycznych (np. włókna poliamidowe). Związki te wykorzystywane są także w barwieniu skóry, drewna, wyrobów kosmetycznych. Do grupy tej należą głównie pochodne azowe.

Przykładem tego typu związków jest czerwień kwasowa trwała E6B (Rys. 3). Ten monoazowy związek wykorzystywany jest w barwieniu wełny i produktów spożywczych. Obecność grupy acetylowej w strukturze podnosi odporność wybarwionych produktów na działanie światła.

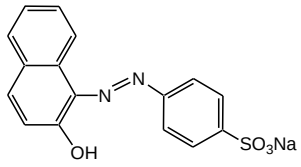
Oranż metylowy (heliantyna) (Rys. 3), będący pochodną azobenzenu, stosowany jest głównie jako indykator. W środowisku silnie kwasowym (<3,2) przyjmuje barwę czerwoną, a w środowisku o wyższym pH (>4,4) przyjmuje zabarwienie żółte. Z kolei oranż β-naftolowy (Rys. 3) jest pochodną kwasu sulfanilowego o intensywnej barwie czerwono-pomarańczowej, która kiedyś stosowana była jako barwnik spożywczy. Związek ten z powodu dużej toksyczności został wycofany z użycia w produkcji żywności.



czerwień kwasowa trwała E6B



heliantyna



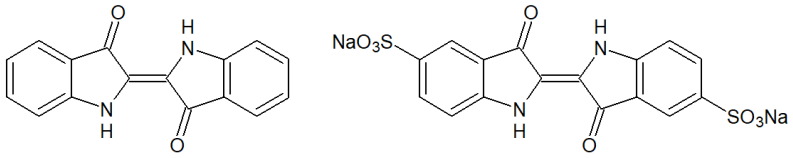
oranż β-naftolowy

Rysunek 3. Struktury wybranych barwników kwasowych

3.2. Barwniki kadziowe

Grupa ta nie jest jednorodna pod względem chemicznym, ale związki zaliczane do tej grupy charakteryzują się tym samym sposobem aplikacji: ponieważ zazwyczaj związki z tej grupy nie są rozpuszczalne w wodzie, to przed barwieniem należy przeprowadzić je w formę rozpuszczalną. Otrzymywanie formy rozpuszczalnej (leukozwiązku) zachodzi w wyniku redukcji (kadziowania) barwnika. Podczas barwienia dochodzi do utleniania leukozwiązku, co prowadzi do odtworzenia barwnika na włóknie w postaci wyjściowej.

Do tej grupy związków należy indygo (Rys. 4), pozyskiwany początkowo z surowców roślinnych. Obecnie najprostszą metodą jego syntezy jest wykorzystanie reakcji Baeyera-Drewsa z użyciem aldehydu 2-nitrobezoesowego i acetonu.



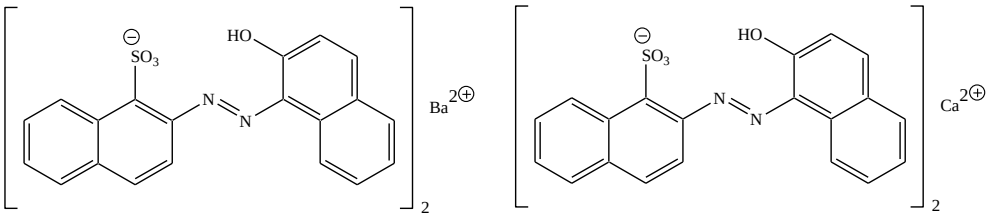
indygo indygokarmin

Rysunek 4. Struktury wybranych barwników kadziowych

3.3. Pigmenty

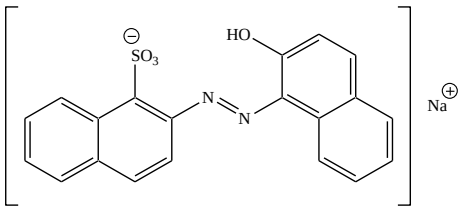
Do grupy tej zaliczmy związki nierozpuszczalne w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych, które stosowane są w formie nierozpuszczalnej. Jakkolwiek pod względem struktury chemicznej są to głównie związki azowe, to wiele popularnych pigmentów charakteryzuje się inną budową chemiczną.

Główną grupą pigmentów są czerwienie lakowe (R, RB, RC) (Rys. 5), określane również mianem laków i tonerów. Otrzymywane są one przez wytrącanie barwników kwasowych lub zasadowych w postaci nierozpuszczalnych soli. Związki te, ze względu na prostotę syntezy, są szeroko stosowane w przemyśle spożywczym, farbiarskim i kosmetycznym. Przykładami pigmentów zasadowych mogą być rodamina B (stosowana jako barwnik fluorescencyjny), zieleń malachitowa (wykorzystywany w akwarystyce), brunat zasadowy R czy B (stosowane w przemyśle farbiarskim).



czerwień lakowa RB

czerwień lakowa RC



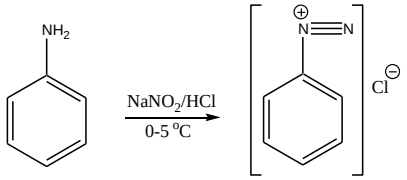
czerwień lakowa R

Rysunek 5. Struktury wybranych pigmentów

3.4. Barwniki azowe

Przeważająca ilość produkowanych przemysłowo barwników należy do grupy związków azowych (około 55%). Najczęstsza metodologia syntezy zakłada wykorzystanie dwóch następujących po sobie reakcji chemicznych: **diazowania** i **sprzęgania**.

Sole diazoniowe otrzymuje się w wyniku reakcji dwuazowania I-rzędowych amin aromatycznych z kwasem azotowym (III) w obecności kwasów mineralnych:



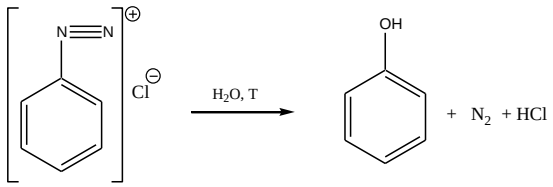
chlorek benzenodiazoniowy

Sole diazoniowe są związkami mało trwałymi i istnieć mogą jedynie w kwasowych roztworach wodnych w temperaturze około 0 °C. W wyższej temperaturze ulegają rozkładowi, a w stanie suchym wykazują właściwości wybuchowe. Ze względu na reaktywność i niestabilność szeregu związków diazoniowych, reakcje diazowania, a następnie sprzęgania, należy prowadzić w niskich temperaturach, zazwyczaj 0-5 °C. Najczęstszym sposobem przeprowadzenia diazowania jest stopniowe dodawanie wodnego roztworu azotanu (III) sodu do kwasowego roztworu lub zawiesiny diazowanej aminy. Szybkość dodawania azotanu (III) sodu jest regulowana w taki sposób, aby w

mieszaninie reakcyjnej stale utrzymywał się nadmiar kwasu azotowego (III). Stwierdza się to poprzez nanoszenie kropli mieszaniny reakcyjnej na papierek jodoskrobiowy (powinno pojawić się niebieskie zabarwienie). Papierek jodoskrobiowy nasączony jest roztworem jodków oraz skrobi. Pod wpływem utleniaczy jony jodkowe I^- utleniają się do formy cząsteczkowej jodu – I_2, który tworzy z nadmiarem jonów jodkowych jon I^{-3}. Ten ostatni, z amylozą lub amylopektyną, zawartymi w skrobi, tworzy barwne kompleksy.

Sole diazoniowe są związkami bardzo reaktywnymi. Obecną w nich grupę diazoniową można wymienić na inne grupy lub atomy, takie jak: OH, OR, F, Cl, Br, J, H, CN.

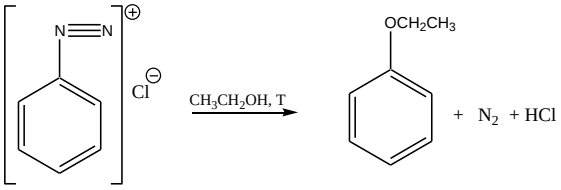
Reakcje wymiany grupy diazoniowej na grupę fenolową (-OH), alkoksylową (-OR) lub grupę -Cl przebiegają według dwuetapowego mechanizmu substytucji nukleofilowej jednocząsteczkowej S_{N1}. Pierwsza z nich to tak zwana reakcja zagotowania:



fenol

Jeżeli w roztworze znajdują się aniony chlorkowe (Cl^-), wówczas obok fenolu powstaje także chlorobenzen.

Wymiana grupy diazoniowej na alkoksylową -OR, np. etoksylową $-OC_2H_5$ zachodzi podczas ogrzewania soli diazoniowej w roztworze etanolowym:

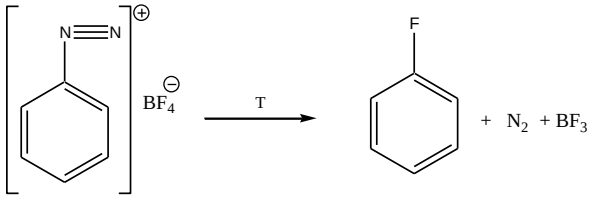


eter etylowo-fenylowy

Jonowej reakcji zastąpienia grupy diazoniowej grupą alkoksylową towarzyszy proces oksydacyjno-redukcyjny o przebiegu prawdopodobnie rodnikowym, w którym następuje wymiana grupy diazoniowej na atom wodoru prowadząc do benzenu, natomiast alkohol utlenia się do aldehydu.

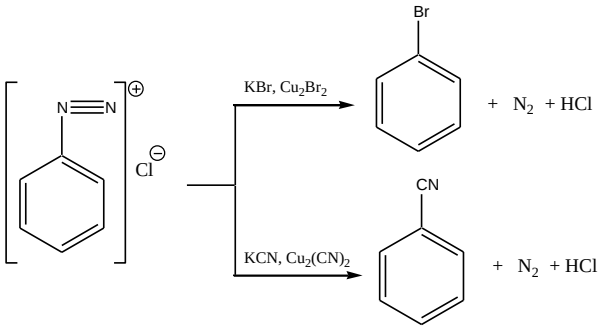
Wymiana grupy diazoniowej na atom fluoru znana jest jako **reakcja Schiemann'a**. W reakcji tej zdwuazowaną aminę aromatyczną zadaje się kwasem fluoroborowym lub jego solą. Wytrąca się

fluoroboran benzenodiazoniowy, który po odsączeniu i wysuszeniu ogrzewa się uzyskując fluorobenzen:

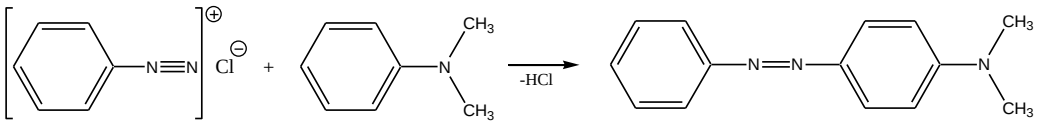


We wszystkich przedstawionych wyżej reakcjach substytucji grupy diazoniowej sól diazoniowa rozpada się w pierwszym etapie do karbokationu. W etapie drugim następuje nukleofilowy atak odpowiednio cząsteczki wody, etanolu względnie anionu BF_4^-, w następstwie którego karbokation przekształca się odpowiednio w fenol, eter względnie fluorobenzen.

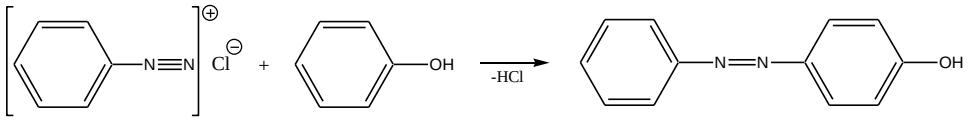
Natomiast wymiana grupy diazoniowej na grupę -Cl, -Br lub -CN, katalizowana przez sole miedzi(I) znana jest jako **reakcja Sandmeyera**.



Reakcje sprzęgania, czyli reakcje soli diazoniowych z aminami aromatycznymi i fenolami prowadzą do związków azowych:

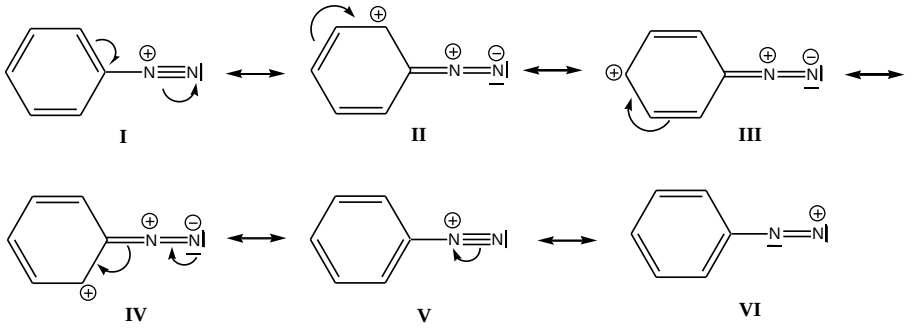


N,N-dimetyloanilina p-dimetyloaminoazobenzen



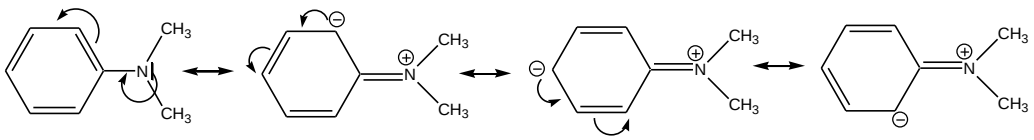
fenol p-hydroksyazobenzen

Czynnikiem elektrofilowym w powyższych reakcjach jest jon diazoniowy, który jest hybrydą sześciu granicznych struktur mezomerycznych przedstawionych poniżej:

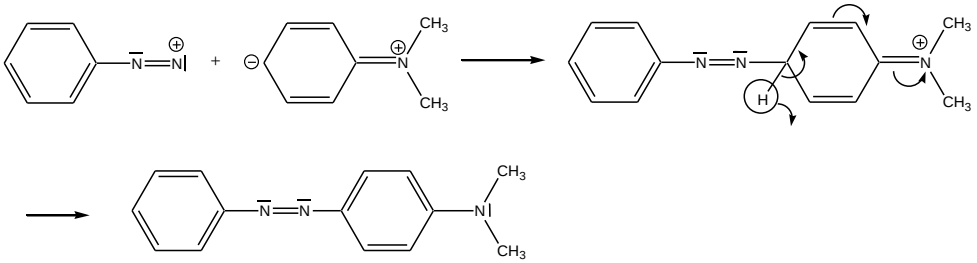


O elektrofilowym charakterze jonu diazoniowego w reakcji sprzęgania decyduje deficyt elektronów przy skrajnym atomie azotu. Porównując struktury mezomeryczne jonu diazoniowego, można łatwo zauważyć, że tylko w jednej, to jest VI występuje niedobór elektronów przy wspomnianym atomie azotu. Struktura ta nie ma dużego udziału w rzeczywistej budowie kationu. Z tego powodu jony diazoniowe są słabymi czynnikami elektofilowymi i mogą skutecznie atakować tylko takie układy aromatyczne, w których na skutek silnego efektu mezomerycznego następuje zagęszczenie elektronów przy niektórych atomach węgla pierścienia. Takie efekty mezomeryczne wywołują grupy aminowe i hydroksylowe i dlatego reakcje sprzęgania soli diazoniowych ograniczone są praktycznie do amin i fenoli.

Efekt mezomeryczny, wywołany obecnością w pierścieniu grupy dimetyloaminowej, powoduje zagęszczenie elektronów w położeniach orto i para:



Podobne zagęszczenie elektronów w pozycjach orto i para istnieje w przypadku fenolu. Kation diazoniowy przyłącza się do pierścienia w miejscu największego zagęszczenia elektronów, tworząc w pierwszym etapie nietrwały produkt przejściowy, z którego po odszczepieniu się protonu w etapie drugim powstaje p-dimetyloaminoazobenzen:



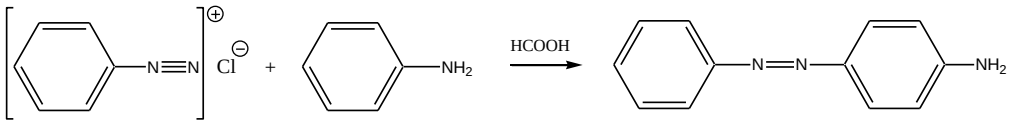
p-N,N-dimetyloaminoazobenzen

Dzięki słabym właściwościom elektrofilowym kationy diazoniowe działają bardzo selektywnie. Obok niewielkich ilości izomerów orto tworzą się prawie wyłącznie para podstawione pochodne azobenzenu. W przypadkach, gdy położenie para jest zajęte, reakcja sprzęgania przebiega również łatwo w położeniu orto.

Reakcje sprzęgania należy przeprowadzić przy optymalnych wartościach pH. **Reakcje sprzęgania z aminami przebiegają najłatwiej w środowisku słabo kwasowym**, **natomiast z fenolami w środowisku słabo zasadowym**. Stanie się to zrozumiałe po rozpatrzeniu wpływu zmian pH na budowę amin, jonów diazoniowych i fenoli. W przypadku amin wzrost stężenia jonów wodorowych powoduje powstanie jonów amoniowych, niezdolnych do reakcji z jonami diazoniowymi z powodu dezaktywacji pierścienia przez grupę amoniową (podstawnik drugiego rodzaju).

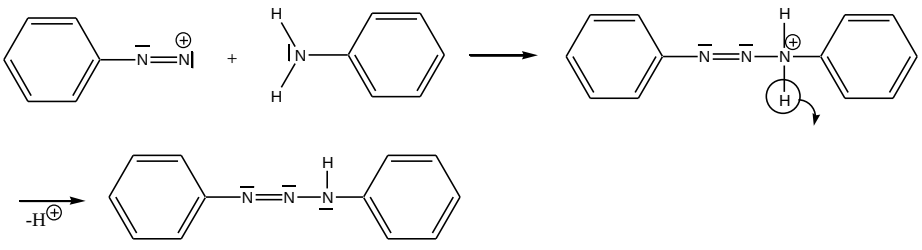
Konieczność stosowania środowiska słabo zasadowego w reakcji sprzęgania z fenolami wynika z faktu, że jony diazoniowe wchodzą w reakcję nie z fenolami, lecz z anionami fenolanowymi, bardziej od fenoli reaktywnymi. Przebieg reakcji sprzęgania soli diazoniowej z fenolem jest podobny do opisanego w przypadku dimetyloaniliny i prowadzi do p-hydroksyazobenzenu.

Dobór właściwego pH ma również istotne znaczenie w przypadku reakcji soli diazoniowej z aminami aromatycznymi I- i II-rzędowymi. Reakcję sprzęgania chlorku benzenodiazoniowego z aniliną (aminą aromatyczną I-rz.) należy przeprowadzić w kwasie mrówkowym (zamiast w kwasie octowym), a więc w środowisku nieco mocniej kwasowym niż w przypadku N,N-dimetyloaniliny. Tylko przy takim pH zachodzi reakcja sprzęgania i powstaje oczekiwany związek azowy czyli p-aminoazobenzen:



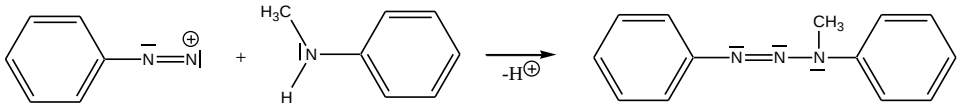
p-aminoazobenzen

Ta sama reakcja, przeprowadzona w kwasie octowym lub w środowisku obojętnym, prowadzi do związku diazoaminowego (diazoaminobenzenu), tworzącego się w wyniku ataku jonu benzenodiazoniowego na grupę aminową:



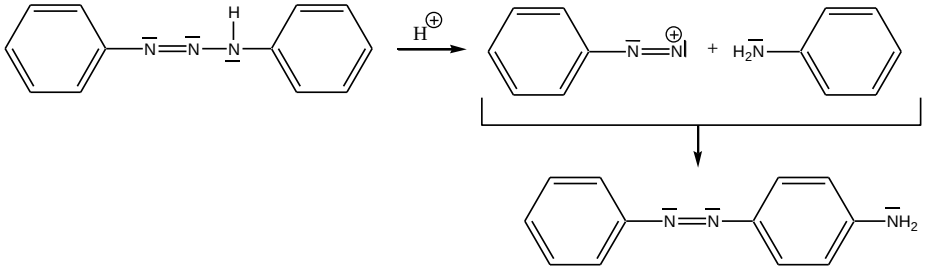
diazoaminobenzen

Podobnie przebiega w środowisku obojętnym reakcja soli diazoniowych z aminami drugorzędowymi, na przykład z N-metyloaniliną. W miejsce związku azowego powstaje połączenie diazoaminowe, a mianowicie N-metylodiazoaminobenzen:



N-metylodiazoaminobenzen

Powyższe reakcje są odwracalne w odróżnieniu od reakcji sprzęgania. W środowisku kwasowym następuje rozszczepienie związku diazoaminowego do soli diazoniowej i aminy oraz kolejne sprzęganie do związku azowego, to jest p-aminoazobenzenu:



p-aminoazobenzen

4. BARWNIKI ROŚLINNE

Barwniki fotosyntetyczne (asymilacyjne) to barwne związki chemiczne odgrywające kluczową rolę w procesie fotosyntezy i nadające barwę liściom. Wszystkie organizmy fotosyntezujące posiadają barwniki odpowiedzialne za absorpcję światła. Różnią się one budową, zakresem światła widzialnego, które mogą pochłaniać, właściwościami i pełnionymi funkcjami. Wspólną ich cechą, pozwalającą na absorpcję promieniowania jest obecność w budowie układu wiązań sprzężonych. Skład oraz zawartość barwników zmienia się wraz z rozwojem rośliny oraz zależy od natężenia i widma światła oraz dostępności składników mineralnych. Wyróżnia się trzy grupy barwników fotosyntetycznych: **chlorofile**, **karotenoidy** i **fikobiliny**.

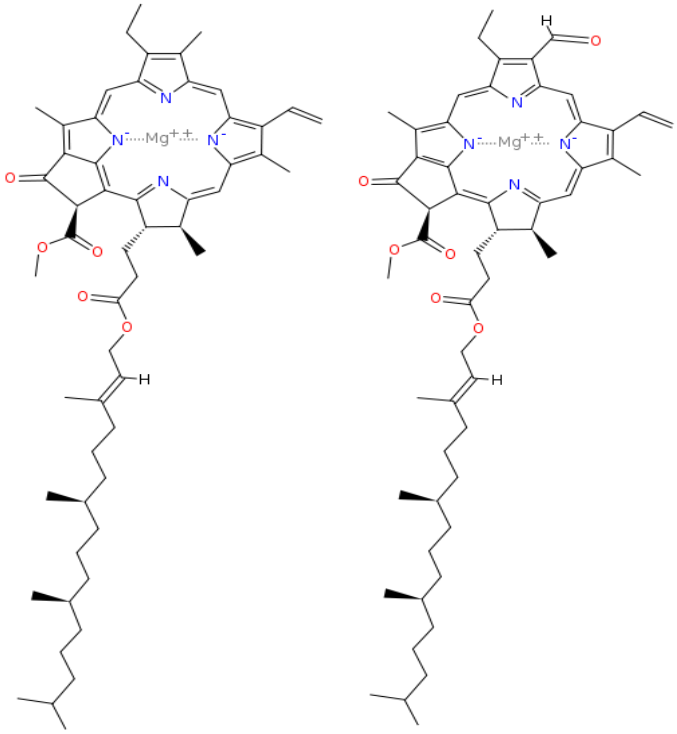
4.1. Chlorofile

U roślin wyższych występują dwa, różniące się nieznacznie budową chlorofile, niebieskozielony **chlorofil a** i żółtozielony **chlorofil b**, przy czym ilość chlorofilu b jest 2-3 krotnie mniejsza niż chlorofilu a (Rys. 6). Inne chlorofile - c i d występują jedynie u części glonów. Każdy organizm fotosyntezujący ma charakterystyczny zestaw barwników, przy czym u wszystkich obecny jest chlorofil a. Należą do barwników **porfirynowych**. Zawierają cztery połączone ze sobą pierścienie pirolowe (układ tetrapirolowy), które łączy centralnie ułożony atom magnezu. Absorbują światło o długości fali poniżej 480 nm i pomiędzy 550-700 nm, stąd w widmie chlorofili, zarówno a i b, obecne są dwa maksyma absorpcji. Maksyma te, w zależności od użytego rozpuszczalnika, mogą się przesuwać w kierunku fal dłuższych lub krótszych. Niebieskozielony chlorofil a, absorbuje głównie światło fioletowe i czerwone, żółtozielony chlorofil b, absorbuje głównie światło niebieskie i pomarańczowe. Światło o długości fali pomiędzy 480 a 550 nm (zielone) jest odbijane, stąd obserwujemy zieloną barwę roślin.

Chlorofile są nietrwałe. Zniszczenie żywej tkanki roślinnej oraz struktury chlorofili (np. w wyniku ogrzewania, działania światła, kontaktu z rozpuszczalnikami) prowadzi do przemian chlorofili i zmiany barwy.

W środowisku kwasowym następuje zastąpienie jonu magnezu przez dwa jony wodoru, w wyniku czego powstaje **feofityna** (brunatna, oliwkowa barwa). Podczas ekstrakcji barwników tworzy się ona pod wpływem endogennych kwasów organicznych, czemu zapobiega się dodając substancje neutralizujące. Niewielkie ilości feofityny występują zawsze w ekstraktach barwników roślinnych oraz w nieuszkodzonych komórkach roślinnych zdolnych do fotosyntezy tlenowej. Jej ilość rośnie

z wiekiem organizmu. Stężenie feofityny może być także wskaźnikiem stopnia uszkodzenia roślin zielonych przez czynniki środowiskowe (światło, temperatura, zanieczyszczenia).



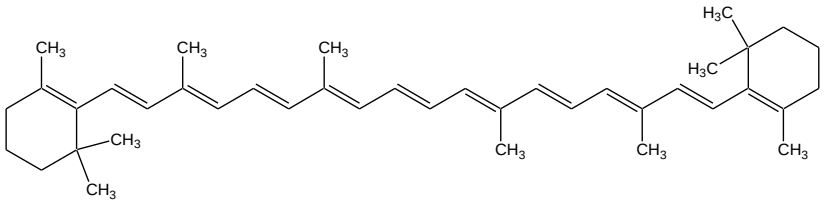
Rysunek 6. Struktury chlorofilu a i b

Środowisko zasadowe prowadzi do hydrolizy wiązań estrowych, z zachowaniem jonu magnezu w strukturze chlorofilu, a produktami reakcji są chlorofiliny (zielona barwa), które pod wpływem enzymu chlorofilazy tracą fragment fitolu. Chlorofile z łatwością ulegają reakcji wymiany jonów magnezu na jony metali dwuwartościowych, takich jak żelazo (barwa szarobrunatna), miedź, cynk czy kadm (barwa zielona).

4.2. Karotenoidy

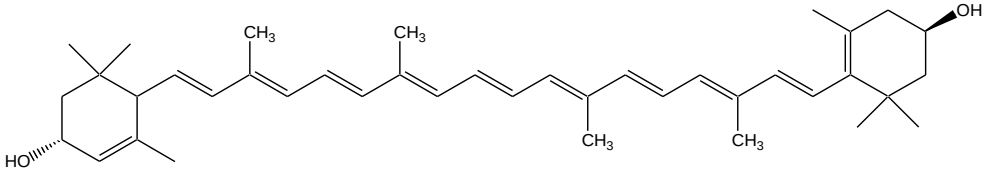
Karotenoidy (żółtopomarańczowe barwniki pomocnicze) występują w ilościach 2-6 razy mniejszych niż chlorofile. W skład karotenoidów wchodzą głównie ksantofile (Rys. 8), m.in. luteina, wiolaksantyna, neoksantyna) oraz karoteny, w tym β–karoten (Rys. 7). Należą do grupy **tetraterpenów**. Zbudowane są z ośmiu jednostek izoprenowych (40 atomów węgla). Absorbują energię świetlną w zakresie, w jakim nie mogą tego robić chlorofile. Karotenoidy występują w liściach, lecz ich żółto-pomarańczowa barwa jest zwykle maskowana przez intensywnie zielony

kolor chlorofilu. Wśród tej grupy związków β-karoten stanowi ok. 75-80% ogółu karotenów roślinnych.



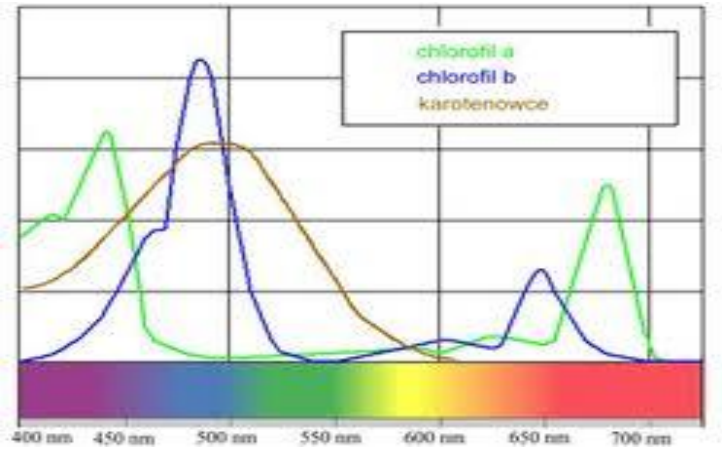
Rysunek 7. Struktura β-karotenu

Pochodne o charakterze alkoholi, epoksydów oraz zawierające grupy aldehydowe lub karboksylowe umieszczone symetrycznie nazywane są ksantofilami.



Rysunek 8. Struktura luteiny (ksantofil)

Charakterystyczne widma absorpcji chlorofilu a i b oraz karotenoidów przedstawiono na rysunku poniżej.

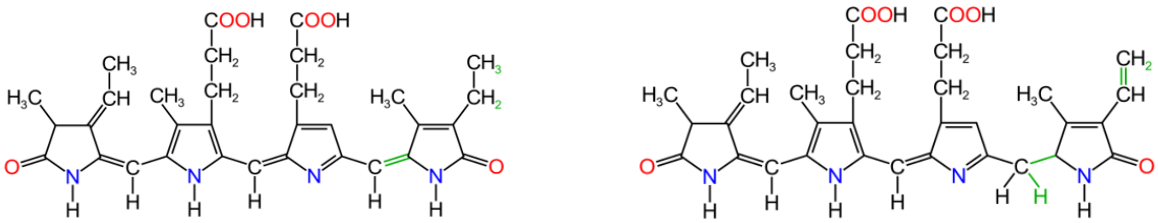


Rysunek 9. Widmo absorpcyjne chlorofili i karotenów

4.3. Fikobiliny

Fikobiliny (fikoerytryna, fikocyjanina i allofikocyjanina) to dominujące barwniki pomocnicze u krasnorostów i sinic. Wydajnie absorbują światło czerwone, pomarańczowe, żółte i zielone, czyli w zakresie długości fali częściowo nieabsorbowanym przez chlorofile. Organizmy żyjące w wodach płytkich posiadają zazwyczaj fikobiliny absorbujące światło żółte i czerwone, natomiast żyjące

w wodach głębszych – światło zielone. Fikobiliny wykazują fluorescencję i są często wykorzystywane w technikach immunofluorescencyjnych, jako znaczniki fluorescencyjne przyłączane do przeciwciał. Różnice w strukturze (inne położenie jednego z wiązań podwójnych) zaznaczono kolorem zielonym (Rys. 10).



fikocyjanobilina
(chromofor niebieski)

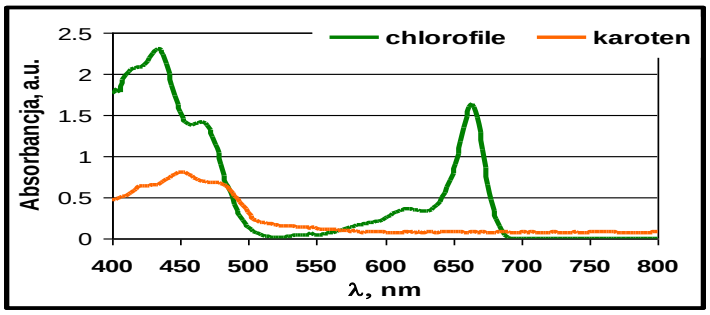
fikoerytrobilina
(chromofor czerwony)

Rysunek 10. Przykładowe fikobiliny

Barwniki asymilacyjne źle rozpuszczają się w wodzie, stąd do ich ekstrakcji stosuje się rozpuszczalniki organiczne (np. etanol, etery, aceton). Ze względu na charakter budowy i długość łańcuchów węglowych w cząsteczce różnią się one w znaczny sposób polarnością, dzięki czemu możliwe jest rozdzielenie ich z w układzie różniących się polarnością rozpuszczalników za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC). Im związek jest bardziej polarny, tym lepiej będzie adsorbowany na płytce. Mniej polarne związki eluowane są wraz z rozpuszczalnikiem (eluentem) stosowanym do rozdziału chromatograficznego. Po rozwinięciu chromatografu możliwa jest jakościowa identyfikacja poszczególnych barwników. Na płytce chromatograficznej barwniki te eluują w następującej kolejności:

1. karoteny (intensywnie żółty kolor) – najmniej polarne
2. feofityna a (intensywnie szary)
3. feofityna b (szary, może być niewidoczny)
4. chlorofil a (niebieskozielony, bardziej intensywny niż chlorofil b)
5. chlorofil b (zielony)
6. ksantofile (żółty) – najbardziej polarne

Z kolei, do ilościowego oznaczenia, z uwagi na wysokie molowe współczynniki absorpcji chlorofili i karotenoidów, wykorzystuje się metody spektrofotometryczne. Przykładowe widmo barwników wyekstrahowanych z liści lipy przedstawiono na Rys. 11.



Rysunek 11. Widmo absorpcyjne chlorofili i karotenu w ekstrakcie etanolowym z liści lipy (po rozdziale)

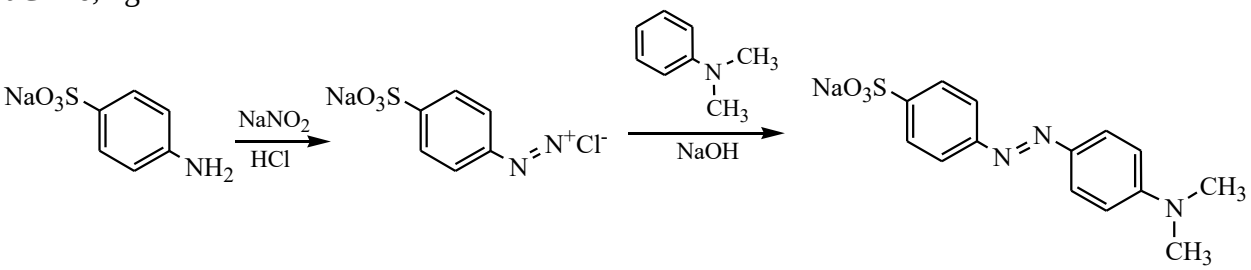
Ćwiczenie 7 - Barwniki syntetyczne – otrzymywanie

WYKONANIE ĆWICZENIA

Synteza oranżu metylowego (heliantyny)

Odczynniki:

Na_2CO_3 - 0,9 g
kwas sulfanilowy - 3,2 g
$NaNO_2$ - 1,2 g
dimetyloanilina - 2,1 ml
$HCl_{stęż.}$ - 4,7 ml
NaOH - 2,3 g
NaCl - 6,7 g

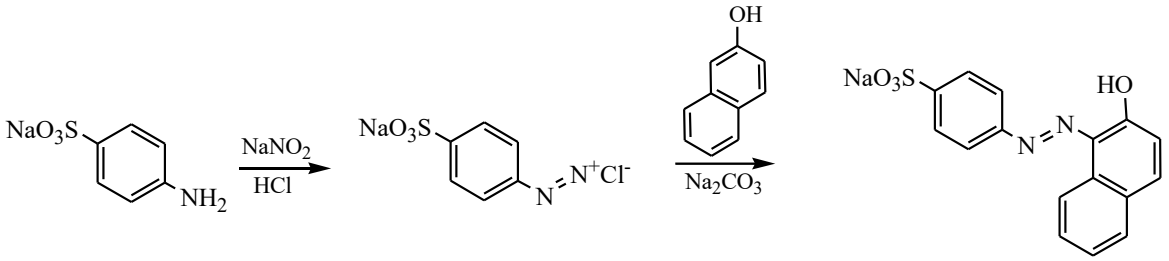


W zlewce o pojemności 250 ml rozpuszcza się 0,9 g Na_2CO_3 w 17 ml wody, dodaje 3,2 g kwasu sulfanilowego i ogrzewa zawartość zlewki w celu rozpuszczenia kwasu. Jeżeli uzyskany roztwór ma odczyn kwasowy, zobojętnia się go kilkoma kroplami 5%-owego roztworu Na_2CO_3. Roztwór oziębia się do temperatury pokojowej i mieszając wkrapla powoli roztwór 1,2 g $NaNO_2$ w 67 ml wody. Następnie dodaje się 8 g lodu i wkrapla w temperaturze 3-5 °C, ciągle mieszając, roztwór 3 ml stężonego HCl w 6,7 ml wody. Do tak otrzymanego kwasu diazobenzenosulfonowego wprowadza się, mieszając, roztwór 2,1 ml dimetyloaniliny w 3,3 ml rozcieńczonego HCl (1:1) i pozostawia 10 minut często mieszając. Następnie wlewa się do mieszaniny poreakcyjnej w odstępach 5-min. 4,7 i 2 ml roztworu, sporządzonego z 2,3 g NaOH w 6,7 ml wody. Powoduje to zmianę barwy produktu reakcji z czerwonego na pomarańczowożółtą. Po pół godzinie wysala się sól sodową heliantyny przez dodanie 6,7 g soli kuchennej i miesza do całkowitego jej rozpuszczenia. Odsączony osad krystalizuje się z wrzącej wody z dodatkiem węgla aktywowanego. Otrzymuje się około 5 g (90% wyd. teoret.) soli sodowej heliantyny w postaci krystalicznych, pomarańczowych płatków.

Synteza oranżu β–naftolowego

Odczynniki:

Na_2CO_3 bezwodny - 4,4 g
kwas sulfanilowy - 2,6 g
$NaNO_2$ - 1,1 g
β-naftol - 2,2 g
15,0 g NaCl
0,7 g NaOH

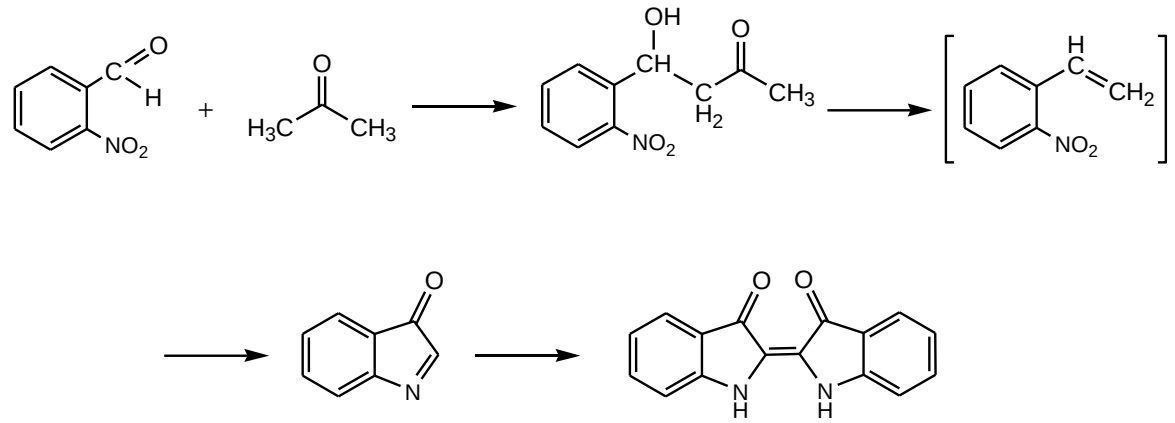


W zlewce o pojemności 100 ml rozpuszcza się 0,9 g bezwodnego Na_2CO_3 w 25 ml wody, dodaje 2,6 g kwasu sulfanilowego i ogrzewa do rozpuszczenia kwasu. Do ostudzonego roztworu dodaje się powoli, mieszając 10 ml rozcieńczonego HCl (1:1) i chłodzi z zewnątrz lodem do temperatury ok. 5 ^oC. Wytrąca się drobnokrystaliczna zawiesina kwasu sulfanilowego, do której wkrapla się powoli, mieszając, oziębiony lodem roztwór 1,1 g $NaNO_2$ w 5 ml wody, utrzymując temperaturę w granicach 0-5 ^oC. Pod koniec reakcji dwuazowania sprawdza się obecność nadmiaru HNO_2 za pomocą papierka jodoskrobiowego. Otrzymany kwas diazobenzenosulfonowy, tworzący krystaliczną zawiesinę, wlewa się wolno, mieszając, do ochłodzonego (0-5 ^oC) roztworu, uzyskanego przez rozpuszczenie 2,2 g β-naftolu w 5 ml 13%-owego roztworu NaOH i dodanie 3,5 g bezwodnego Na_2CO_3 w 30 ml wody. Podczas reakcji sprzęgania temperatura nie powinna przekroczyć 5 ^oC. Po upływie 1 h ogrzewa się zawartość zlewki w celu rozpuszczenia osadu, sączy na gorąco, dodaje do przesączu około 15 g NaCl i ogrzewa ponownie w celu rozpuszczenia soli kuchennej. Następnie pozostawia się tak otrzymany roztwór do krystalizacji w temperaturze pokojowej. Uzyskany osad odsącza się na lejku Büchnera i suszy na powietrzu. Otrzymuje się 3,8g-4,8g (70-90% wyd. teoret.) oranżu β-naftolowego w postaci czerwonopomarańczowego osadu.

Synteza indygo

Odczynniki:

aldehyd o-nitrobenzoesowy - 1,5 g
aceton - 4,5 ml
wodorotlenek sodu – 1M r-r
etanol
eter dietylowy



W zlewce rozpuszcza się 1,5 g aldehydu *o*-nitrobenzoesowego w 4,5 ml acetonu i dodaje 4 ml wody. Do klarownego roztworu, mieszając mieszadłem magnetycznym, dodaje się kroplami roztwór 1N wodorotlenku sodu, do alkalicznego odczynu. Mieszanina rozgrzewa się i staje się ciemnobrązowa. Po ochłodzeniu odsącza się na lejku Buchnera wykrystalizowany barwnik, przemywa etanolem i eterem. Otrzymuje się 0,65 g (70% wyd. teoret.). Bardzo czysty preparat ma piękny czerwono-fioletowy połysk.

Sposób przedstawiania wyników (protokół)

Elementy sprawozdania (Ćwiczenie 7 – Barwniki syntetyczne):

1. Data
2. Tytuł ćwiczenia/nazwa barwnika
3. Schemat reakcji
5. Opis w punktach kolejnych etapów ćwiczenia/syntezy
6. Masa otrzymanego związku
7. Wydajność teoretyczna i praktyczna
9. Charakterystyka fizykochemiczna produktu
10. Właściwości chemiczne produktu (2-3 reakcje)
11. Uwagi, komentarz

Ćwiczenie 8 - Barwniki roślinne – ekstrakcja, rozdział, właściwości oraz analiza widm absorpcji UV-Vis

WYKONANIE ĆWICZENIA

1. Ekstrakcja barwników z surowca naturalnego, rozdział chromatograficzny barwników z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej TLC i analiza składu jakościowego

Otrzymywanie (ekstrakcja) barwników asymilacyjnych

Materiał roślinny (szpinak, nać pietruszki itp.) rozdrobnić na małe kawałeczki. Odważyć około 1 g surowca, przenieść do suchego moździerza porcelanowego, dodać 3 ml alkoholu etylowego i 3 ml acetonu, a następnie rozcierać energicznie pistlem (w razie potrzeby dodać rozpuszczalników). Zawiesinę przefiltrować do dużej probówki. Porcją 2 ml etanolu przemyć moździerz i pistel, a następnie przenieść roztwór do probówki.

Chromatograficzny rozdział barwników

Przygotować płytkę chromatograficzną TLC o szerokości około 3 cm i długości 7 cm. W odległości około 0,5 cm od dołu zaznaczyć linię startu, na którą nanieść przy pomocy kapilary ekstrakt barwników. Po nałożeniu całej szerokości odczekać chwilę aż rozpuszczalnik odparuje, po czym nałożyć w to samo miejsce kolejną porcję barwnika. Czynność powtórzyć kilka razy. Pozostawić płytkę do odparowania rozpuszczalnika na około 5 minut.

Wysuszoną płytkę wstawić pionowo do komory chromatograficznej wypełnionej eluentem (**heksan:etanol:toluen 40:4,5:15**). Ilość eluentu powinna sięgać poniżej poziomu naniesionego ekstraktu barwników (<0,5 cm). Przykryć naczynie. Rozdział chromatograficzny prowadzić aż do momentu, gdy czoło rozpuszczalnika znajdzie się 0,5 cm przed górną krawędzią płytki. Chromatogram (płytkę) wyjąć i pozostawić do wysuszenia.

Opisać otrzymany chromatogram i przeprowadzić interpretację: zanotować kolejność elucji poszczególnych barwników; obliczyć współczynniki retencji poszczególnych barwników (R_f), określić ilość rozdzielonych pasm; na podstawie informacji o budowie określić rodzaj barwnika asymilacyjnego wyizolowanego z badanego materiału roślinnego w danym układzie rozwijającym).

Uwaga: płytkę należy trzymać tylko za jej krawędzie. Nakładać kolejne objętości kapilary tak, by tworzący się na płytce ślad miał średnicę nie większą niż 5 mm.

Uwaga: tylko końcówka płytki pod linią startu ma być zanurzona w eluencie, naniesiony barwnik nie może zanurzać się w eluencie.

2. Ocena właściwości chlorofili w zależności od środowiska (czynników stresowych)

Po 0,5 ml ekstraktu otrzymanego w poprzednim ćwiczeniu umieścić w czterech czystych probówkach:

- probówka nr 1 – dodać 1 cm^3 H_2O
- probówka nr 2 - dodać 0,5 ml H_2O i 0,5 ml 2M r-ru HCl
- probówka nr 3 – dodać 0,5 ml H_2O i 0,5 ml 2M r-ru NaOH
- probówka nr 4 – dodać 1 ml roztworu soli metalu II-wartościowego, np. octanu kadmu, azotanu (V) miedzi (II)

Po 10 min. porównać barwy roztworów w poszczególnych probówkach. Zarejestrować widma absorpcji z wykorzystaniem spektrofotometru UV-Vis (λ = 300-800 nm) roztworów z probówek nr 1-4. Wyznaczyć położenia maksimów absorpcji. Zinterpretować wyniki.

Do pomiarów widm absorpcyjnych uzyskanych barwników wykorzystuje się spektrofotometr UV-Vis firmy LLG-uniSPEC oraz szklane kuwety pomiarowe (Rys.12).



Rysunek 12. Jednowiązkowy spektrofotometr UV-Vis firmy LLG-uniSPEC oraz kuweta pomiarowa

Sposób przedstawiania wyników (protokół)

Elementy sprawozdania (Ćwiczenie 8 – Barwniki roślinne):

1. Data
2. Tytuł ćwiczenia
3. Opis w punktach kolejnych etapów ćwiczenia
4. Odwzorowana płytka chromatograficzna TLC i opis
5. Wyniki rozdziału chromatograficznego i analizy widm UV-Vis

Barwnik	Kolor	Współczynnik retencji (R_f)

6. Właściwości chlorofili

	Roztwór	Barwa roztworu	Maksima absorpcji [nm]
Probówka 1	ekstakt + woda		
Probówka 2	ekstrakt + kwas		
Probówka 3	ekstrakt + zasada		
Probówka 4	ekstrakt + sól metalu		

7. Wnioski i komentarz

ZAŁĄCZNIK

Tabela 1. Maksima absorpcji podstawowych barwników roślinnych

Barwnik	Maksima absorpcji [nm]	
	λ_1	λ_2
Chlorofil a	430	662
Chlorofil b	456	645
Feofityna a	418	653
B-karoten	450	477
Luteina	447	475
Wiolaksantyna	442	473