



IN MARI-VIA-CIA

Uniwersytet Gdański  
Wydział Chemii

**Chemia żywności**  
**Katedra Analizy Środowiska**

# **Instrukcja do ćwiczeń laboratoryjnych**

## **Ćwiczenie nr 12**

### **Identyfikacja barwników naturalnych w liściach szpinaku**

**Chemia żywności**

Gdańsk, 2016

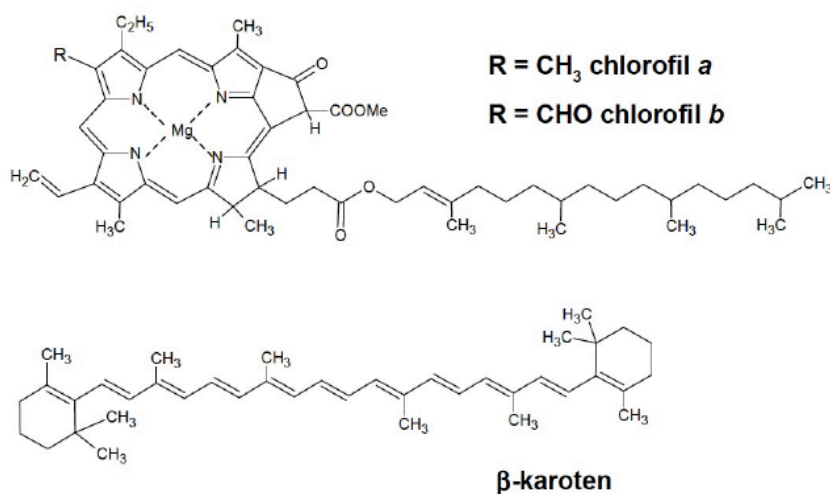
## 12. Identyfikacja barwników naturalnych w liściach szpinaku

### 1. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

#### 1.1. Barwniki roślinne

Chlorofile są barwnikami niezbędnymi w procesie fotosyntezy. W chloroplastach roślinnych występują przeważnie w dwóch formach: jako niebieskozielony chlorofil *a* oraz żółtozielony chlorofil *b* (struktury na **Rysunku 1**). Chlorofile zawierają rdzeń porfirynowy, w którym znajduje się atom magnezu łączący się z atomami azotu każdego z pierścieni rdzenia porfirynowego. Chlorofil *b* różni się od chlorofilu *a* obecnością grupy aldehydowej w bocznym pierścieniu pirolowym zamiast grupy metylowej. Budowa strukturalna feofityny *a* i *b* jest podobna do budowy chlorofilu *a* i *b*, z tym, że w miejscu jednego atomu magnezu w cząsteczce feofityny występują dwa atomy wodoru. Feofitynę można uzyskać poprzez działanie kwasem na chlorofil. Oprócz chlorofili w chloroplastach występują także karoteny, m.in. żółty  $\beta$ -karoten, czyli prowitamina A, oraz ksantofile. Zielony kolor chlorofili jest efektem tego, że związki te silnie absorbują światło w czerwonej i niebieskiej części widma promieniowania widzialnego, natomiast słabo w części zielonej. Jesienią zabarwienie liści zmienia się na żółtawe ze względu na rozkład chlorofilu, dzięki czemu ujawnia się barwa obecnych w liściach żółtych barwników.

W zależności od stanu próbki szpinaku oraz warunków eksperymentu mogą wystąpić pewne różnice w obserwowanych barwnikach. Mogą powstać nowe związki w wyniku reakcji utleniania, hydrolizy lub innych reakcji zachodzących pod wpływem światła, tlenu i innych czynników. Próbkę szpinaku i wyizolowane barwniki należy przechowywać w ciemności, jeśli jest to możliwe.



**Rysunek 1.** Wzory strukturalne chlorofilu *a*, chlorofilu *b* oraz  $\beta$ -karotenu

## 12. Identyfikacja barwników naturalnych w liściach szpinaku

### **1.2. Chromatografia adsorpcyjna**

Technikę chromatografii adsorpcyjnej stosuje się do rozdzielania szczególnie złożonych mieszanin różnorodnych związków chemicznych występujących w różnych typach próbek jak np. żywności, ale także i środowiskowych. Znajduje szczególne zastosowanie zwłaszcza gdy chodzi o związki wysokowrzące i wrażliwe na działanie temperatury, dla których rozdzielenie za pomocą krystalizacji czy destylacji jest praktycznie nieosiągalne.

W technice tej rozdział następuje w wyniku wielokrotnych, selektywnych procesów adsorpcji zachodzących na aktywnych powierzchniach sorbentów. W chromatografii ciekowej występują konkurencyjne oddziaływania między próbką (analit i matryca) a fazą stacjonarną (adsorbent), między próbką a fazą ruchomą (rozpuszczalnik wymywający próbkę z adsorbentu) i między fazą ruchomą a stacjonarną. Mechanizm adsorpcyjny polega na zatrzymywaniu cząsteczek substancji na powierzchni adsorbentu (zwykle porowatego).

W procesie tym biorą udział następujące oddziaływania międzycząsteczkowe:

- a) siły wynikające z oddziaływań między cząsteczkami mającymi trwały moment dipolowy (oddziaływania dipol-dipol),
- b) siły wynikające z oddziaływań między cząsteczkami mającymi dipol i cząsteczkami, w których dipol jest indukowany przez sąsiadujące cząsteczki (oddziaływanie dipol-dipol indukowany),
- c) oddziaływania związane z tworzeniem wiązań wodorowych, specjalny rodzaj oddziaływania dipol-dipol między atomem wodoru a atomem pierwiastka elektroujemnego, np. O, N, F.

Oddziaływania międzycząsteczkowe powodują, że rozdzielane substancje w niejednakowym stopniu zatrzymują się na adsorbencie. Im większe powinowactwo analitu do fazy stacjonarnej, tym analit jest silniej przez nią zatrzymywany. Analit z adsorbentu wymywany jest fazą ruchomą. Im silniej zatrzymywany analit, tym później opuszcza kolumnę (większa retencja czyli opóźnienie w stosunku do przepływu fazy ruchomej). Objętość fazy ruchomej potrzebna do jego wymycia nazywa się objętością retencji, a czas, w jakim analit zostaje wymyty z kolumny - czasem retencji. Objętość retencji i czas retencji analitu określa się precyzyjnie, licząc od momentu naniesienia na kolumnę do momentu opuszczenia kolumny maksimum jego stężenia.

#### **1.2.1. Fazy stacjonarne w chromatografii adsorpcyjnej**

W chromatografii ciekowej używa się adsorbentów porowatych o powierzchniach od setek do tysiąca m<sup>2</sup>/g. Adsorbenty dzieli się na polarne i niepolarne. Do niepolarnych należą węgiel aktywny, węglowodory nasycone, polimery; do polarnych – żel krzemionkowy, krzemian magnezu, tlenek glinu. Żel krzemionkowy o ogólnym wzorze SiO<sub>2</sub> x nH<sub>2</sub>O jest najczęściej stosowanym

## 12. Identyfikacja barwników naturalnych w liściach szpinaku

adsorbentem. O jego szerokim zastosowaniu decyduje łatwość otrzymywania, jak również możliwość łatwej modyfikacji jego właściwości powierzchniowych, takich jak struktura geometryczna porów czy modyfikacja chemiczna. Na powierzchni żelu krzemionkowego występują grupy -OH (silanolowe) o różnych właściwościach. Aktywność żelu krzemionkowego jak i innych adsorbent w nieorganicznych jest większa, gdy usunie się z nich zaadsorbowaną wodę. Usuwanie wody przez ogrzewanie w temperaturze 120-150 °C nazywa się aktywacją adsorbentu. Wyższa temperatura, w przypadku żelu krzemionkowego może powodować usuwanie grup wodorotlenowych z jego powierzchni. Siła adsorpcji związków organicznych na żelu krzemionkowym jest większa im większa jest ich polarność i rośnie w szeregu: węglowodory < halogenki alkilowe, aryłowe < etery (ROR) < aldehydy (RCHO) < ketony (R<sub>2</sub>CO) < estry (RCOOR) < alkohole (ROH) < fenole (ArOH) < kwasy karboksylowe.

### **1.2.2. Fazy ruchome w chromatografii adsorpcyjnej**

Zdolność rozpuszczalnika do wymywania substancji z adsorbentu zależy od jego siły oddziaływania z powierzchnią adsorbentu i zwana jest mocą elucyjną rozpuszczalnika (eluentu). Mechanizm tego oddziaływania jest taki sam jak przedstawiony wyżej dla substancji i adsorbentu. Silniejsza adsorpcja rozpuszczalnika na fazie stacjonarnej zmniejsza adsorpcję analitu. Rozpuszczalniki klasyfikuje się zgodnie ze wzrastającą zdolnością wymywania zaadsorbowanych substancji z adsorbentu (czyli zgodnie ze wzrastającą ich mocą elucyjną), zestawiając je w tzw. szereg eluotropowy. W chromatografii z fazą stacjonarną polarną, np. z żelem krzemionkowym, o sile elucji decyduje polarność eluentu, więc szereg eluotropowy rozpuszczalników jest jednocześnie szeregiem o wzrastającej ich polarności. Wybór odpowiedniego rozpuszczalnika do rozdziału wybranej mieszaniny związków nie jest łatwy. Zwykle stosuje się zestaw kilku rozpuszczalników, rozpoczynając od tego o najniższej mocy elucyjnej (polarności) i stopniowo tę moc zwiększając. Można mieszać dwa lub więcej rozpuszczalników dla uzyskania odpowiedniej siły elucji i selektywności rozdziału. Szereg eluotropowy rozpuszczalników wg wzrastającej mocy elucyjnej, dla adsorbentów polarnych przedstawiono w **Tabeli 1**.

## 12. Identyfikacja barwników naturalnych w liściach szpinaku

**Tabela 1.** Rozpuszczalniki uszeregowane zgodnie ze wzrastającą mocą elucyjną w chromatografii adsorpcyjnej na żelu krzemionkowym

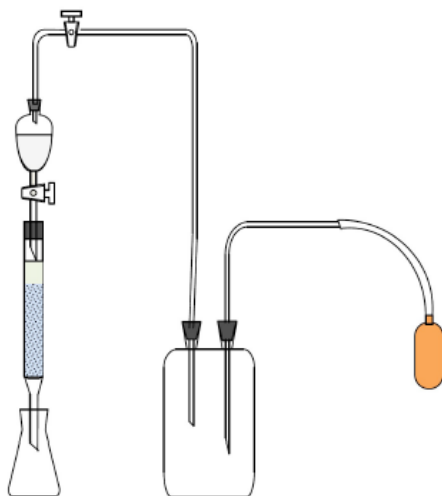
L.p.	Rozpuszczalnik	L.p.	Rozpuszczalnik	L.p.	Rozpuszczalnik
1.	n-Pentan	7.	Eter dietylowy	13.	Acetonitryl
2.	Eter naftowy	8.	Chloroform	14.	Pirydyna
3.	n-Heksan	9.	Dichlorometan	15.	Etanol
4.	Cykloheksan	10.	Tetrahydrofuran	16.	Metanol
5.	Tetrachlorek węgla	11.	Aceton	17.	Woda (b. duża siła elucji)
6.	Toluen	12.	Octan etylu	18.	Kwas octowy (b. duża siła elucji)

### 1.2.3. Kolumnowa chromatografia adsorpcyjna (LC)

W adsorpcyjnej chromatografii kolumnowej analizowane substancje w postaci roztworu są наносzone na adsorbent wypełniający kolumnę. Wybór rozpuszczalnika zależy przede wszystkim od rozpuszczalności substancji rozdzielanych. Następnie, przemywając złożę (adsorbent w kolumnie) rozpuszczalnikiem, rozwijany jest chromatogram, czyli analizowana mieszanina rozdzielana jest na grupy związków lub poszczególne związki chemiczne i w dalszej kolejności wmywana (eluowana) z kolumny i może być zbierana w poszczególne frakcje. Wymywanie można prowadzić jednym rozpuszczalnikiem lub mieszaniną o stałym składzie (elucja izokratyczna) lub kilkoma kolejno, albo mieszaniną rozpuszczalników o wzrastającej polarności (elucja gradientowa). Eluowane z kolumny frakcje zbierane są oddzielnie. W ten sposób uzyskuje się rozdział badanej mieszaniny na składniki nieadsorbowane i adsorbowane coraz silniej przez adsorbent. Poszczególne frakcje mogą być w dalszej kolejności zatężone i poddane dodatkowym analizom z wykorzystaniem innych metod/technik.

Zasadniczą częścią każdego zestawu do chromatografii kolumnowej (**Rysunek 2**) jest kolumna ze szkła obojętnego, której wymiary są dostosowane do skali przeprowadzanego rozdziału. Najczęściej mieszczą one od 10 do 100 g adsorbentu, co wystarcza do adsorpcji od 0,1 do kilku gramów substancji. Dla przyspieszenia elucji stosuje się słabe ssanie (pompka wodna) lub tłoczenie. Napełnianie kolumny adsorbentem zwykle przeprowadza się metodą na mokro, polegającą na wprowadzaniu do kolumny zawiesiny adsorbentu w rozpuszczalniku użytym do rozpuszczania substancji. Napełnianie należy wykonać tak, by złożę adsorbentu było jednorodne, pozbawione pęcherzyków powietrza i nie zmieniało objętości w czasie rozdziału. Powierzchnia adsorbentu powinna być stale pokryta płynem od chwili wprowadzenia pierwszych porcji rozpuszczalnika do zakończenia procesu. W przeciwnym razie złożę na kolumnie może łatwo wyschnąć, co uniemożliwia prowadzenie poprawnej adsorpcji.

## 12. Identyfikacja barwników naturalnych w liściach szpinaku



**Rysunek 2.** Zestaw do chromatografii kolumnowej z zastosowaniem tłoczenia

### 1.2.4. Chromatografia adsorpcyjna barwników roślinnych

Jak już wspomniano, w kolumnowej chromatografii adsorpcyjnej kolejność elucji związków chemicznych z kolumny zależy od ich polarności. W przypadku zastosowania żelu krzemionkowego jako adsorbenta (polarnego) związki o niskiej polarności są wymywane jako pierwsze, następnie eluują związki o większej polarności. Barwniki, izolowane z liści szpinaku, różnią się polarnością, co powoduje, że będą eluowały w następującym porządku zgodnym z ich wzrastającą polarnością (w nawiasach podane są kolory związków):

1. karoteny (intensywnie żółty kolor),
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).

## 2. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

### 2.1. Cel ćwiczenia

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z metodami rozdzielania i wstępnej identyfikacji barwnych związków obecnych w liściach szpinaku.

## 12. Identyfikacja barwników naturalnych w liściach szpinaku

### 2.2 Wykonanie ćwiczenia

#### *Analizowane produkty spożywcze*

- Szpinak mrożony

#### *Odczynniki chemiczne*

- bezwodny siarczan magnezu
- bezwodny siarczan sodu
- aceton V = 250 ml
- eter naftowy V = 250 ml
- mieszanina eter naftowy:aceton (9:1, v/v) V=200 ml
- mieszanina eter naftowy:aceton (7:3, v/v) V=200 ml
- żel krzemionkowy LC60A 60-200 MICRON firmy DAVISIL

#### *Szkło laboratoryjne, sprzęt i akcesoria*

- płytko + nóż do krojenia
- zlewka V = 100 ml
- zlewka V = 50 ml
- zlewka V = 25 ml
- łyżka metalowa
- tłuczek porcelanowy
- cylinder miarowy V = 25 ml
- kolbka do odparowywacza V = 100 ml
- reduktor do odparowywacza
- lejek średni + pasujące sączki
- pipeta V = 5 ml
- pompka do pipet
- kolumna szklana o wymiarach 1 Å~ 15 cm
- lejek pasujący do kolumny
- 3 cylindry miarowe V = 25 ml
- 3 cylindry miarowe V = 10 ml
- bagietka szklana
- łaźnia ultradźwiękowa, waga analityczna, rotator

### SPOSÓB WYKONANIA

## 12. Identyfikacja barwników naturalnych w liściach szpinaku

### 2.2.1 Ekstrakcja

Odważyć około 1–1,4 g mrożonego szpinaku (około 1/10 części brykietu szpinaku) za pomocą wagi precyzyjnej w zlewce o  $V = 100$  ml. Poczekać, aż szpinak się rozmrozi, dodać 1–1,4 g bezwodnego siarczanu magnezu. Wymieszać i rozetrzeć. Ekstrahować próbkę acetonem (20 ml) w łaźni ultradźwiękowej w czasie 15 min. Dodać do próbki 8 g bezwodnego siarczanu sodu, wymieszać i pozostawić na 5-10 min. Zdekantować i przesączyć ekstrakt do kolby. Pozostały osad przemyć acetonem (10 ml), zdekantować, przesączyć i połączyć ekstrakty w kolbce. Odparować aceton na odparowywaczu obrotowym w temp. około  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Jeżeli w kolbce pozostała woda, rozpuścić ekstrakt w około 5 ml heksanu, pobrać tylko warstwę organiczną i ponownie wysuszyć ją bezwodnym siarczanem sodu. Ekstrakt zatężyć do objętości 0,5 ml.

### 2.2.2. Chromatografia kolumnowa (LC)

W kolbie Erlenmeyera ( $V = 100$  ml) odważyć 4 g żelu krzemionkowego, a następnie dodać 30 ml roztworu eter naftowy-aceton (9:1 v/v). Wymieszać i pozostawić na 5-10 min. Zamocować kolumnę w statywie i zamknąć odpływ z kolumny. Umieścić na dnie kolumny małą ilość zwiniętej waty szklanej. Wprowadzić 2 ml roztworu eter naftowy-aceton (9:1 v/v). Usunąć powietrze z waty szklanej naciskając bagietką, a następnie wprowadzić krążek z bibuły. Uważnie wprowadzić zawieszinę żelu krzemionkowego do kolumny, za pomocą pipety z szerokim otworem wyjściowym lub poprzez lejek, otwierając jednocześnie odpływ z kolumny. Zrobić to w taki sposób, aby uzyskać w miarę płaskie dno oraz płaski wierzch fazy stacjonarnej. Od momentu wprowadzenia do kolumny żelu krzemionkowego jego powierzchnia musi być stale przykryta cieczą. Jeżeli w kolumnie będą bąble powietrza to proces rozpocząć od początku. Roztwór eter naftowy-aceton wypływający z kolumny zachować do zakończenia eksperymentu – posłuży do umycia kolumny oraz pipety i kolby zabrudzonej ekstraktem ze szpinaku.

**UWAGA! NIE WOLNO DOPROWADZIĆ DO PRZESUSZENIA KOLUMNY!!!**

Gdy wysokość złoża w kolumnie będzie stała, należy ją zmierzyć i zanotować. Pozostawić około 3 cm słupa cieczy nad złożem. Ważne jest, aby wierzch fazy stacjonarnej był idealnie płaski. Należy wcześniej przygotować wszystkie roztwory potrzebne do elucji barwników:

- roztwór A: eter naftowy-aceton (9:1 v/v),  $V = 20$  ml,
- roztwór B: eter naftowy-aceton (7:3 v/v),  $V = 20$  ml,
- roztwór C: aceton,  $V = 20$  ml.

Wyrównać poziom fazy ruchomej w kolumnie do poziomu ok. 0,5 cm nad powierzchnią złoża fazy stacjonarnej i zamknąć odpływ z kolumny. Ostrożnie wprowadzić do kolumny około 1/2 części



## 12. Identyfikacja barwników naturalnych w liściach szpinaku

ekstraktu ze szpinaku za pomocą pipety Pasteura i otworzyć odpływ z kolumny. Wprowadzić próbkę do fazy stacjonarnej przemywając 2-4 razy po 1 ml roztworu A aż do momentu, gdy cała próbka znajdzie się w fazie stacjonarnej (zaniknie zielone zabarwienie roztworu nad powierzchnią fazy stacjonarnej). Ostrożnie wprowadzić do kolumny pozostałą część roztworu A, a następnie roztwór B oraz roztwór C. Zbierać kolejne frakcje fazy ruchomej zawierające wydzielone barwniki roślinne do kolejnych 6 cylindrów miarowych. Należy zanotować objętości uzyskanych frakcji.

Frakcje:

- 1 – bezbarwna, V = około 5 ml,
- 2 – żółta, V = około 5 ml,
- 3 – bezbarwna, V = około 14 ml,
- 4 – szara, V = około 5 ml,
- 5 – niebiesko-zielona, V = około 10 ml,
- 6 – żółto-zielona, V = około 10 ml.

Na podstawie barwy zebranych frakcji należy dokonać wstępnej identyfikacji grup barwników występujących w badanym materiale roślinnym (liściach szpinaku).

### **3. OPRACOWANIE WYNIKÓW**

Sprawozdanie powinno zawierać opis części eksperymentalnej, zestawienie uzyskanych wyników wraz z dyskusją otrzymanych rezultatów.

#### LITERATURA

1. Pałczyński A., Podbielkowski Z., Polakowski B., Botanika. PWN, Warszawa, 1995.
2. Still W.C., Kahn M., Mitra A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J. Org. Chem.*, 1978, 43 (14), 2923–2925.
3. Pavia D.L., Lampman G.M., Kriz G.S., Engel R.G. Introduction to organic laboratory techniques: a small scale approach. Thomson Brooks/Cole, 2005.
4. Kumirska J., Gołębiowski M., Paszkiewicz M., Bychowska A., *Analiza żywności*, skrypt elektroniczny dla studentów Ochrony Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, 2010, ISBN 978-83-7326-711-4, Wydawnictwo Uniwersytetu Gdańskiego, Gdańsk 2010.