Метод кольорометрії в дослідженні кислотно-основних характеристик барвників рослинного походження

О.М. Чеботарьов, І.С. Єфімова, Н.А. Борисюк, Д.В. Снігур

Одеський національний університет імені І.І. Мечникова, кафедра аналітичної хімії, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65089, Україна, e-mail: **alexch@ukr.net**

Надійшла: 12 травня 2011 р./ Прийнята до друку: 7 липня 2011 р.

Методом кольорометрії досліджено кислотно – основні рівноваги 3,5,7,4'-тетрагідроксібензфлавілій хлориду (пеларгонідин) і 3,5,7,3',4'-пентагідроксібензфлавілій хлориду (ціанідин) отриманих у вигляді водно-етанольних витяжок з квіток пеларгонії (Pelargonium zonale (L.) L'Hér. ex Ait.), та листків червонокачанної капусти (Brassica oleracea L. capitata. f. rubra). За даними кольорометричних характеристик розраховані відповідні константи іонізації їх іоногенних груп. Показано переваги методу кольорометрії перед класичними фізико-хімічними методами при дослідженні протолітичних рівноваг у розчинах барвників.

A.N. CHEBOTARYOV, I.S. EFIMOVA, N.A. BORISYUK, D.V. SNIGUR. *CHEMICAL CHROMATICITY METHOD IN THE STUDY OF ACID-BASE PROPERTIES OF PHYTOGENOUS DYES - The acid-base equilibria of 3,5,7,4'-tetrahydroxybenzflaviliy chloride (pelarhonidyn) and 3,5,7,3',4'-pentahydroxybenzflaviliy chloride (cyanidine) obtained in the form of water-ethanol extracts from pelargonium (Pelargonium zonale (L.) L'Hér. Ex Ait.) flowers and red cabbage (Brassica oleracea L. capitata. f. rubra) leaves have been investigated by chemical chromaticity method. Their ionization constants of ionogenous groups have been calculated by chromaticity's characteristics. The advantages of chemical chromaticity method towards classical physical-chemical methods in the study of protolytic equilibria in dyes solutions have been shown.*

Ключеві слова: рослинні барвники, кислотно-основні рівноваги, константи іонізації, кольорометрія.
Keywords: phytogenous dyes, acid-base balance, ionization constants, chemical chromaticity.

ВСТУП

Одним з найбільш розповсюджених класів барвників рослинного походження, які привертають до себе увагу хіміків-дослідників є флавоноїди (**ФН**), а саме антоціанідини (**АЦН**), що обумовлено їх фізико-хімічними властивостями і особливостями будови [1, 2]. Наявність різноманітних сукупностей таких атомних угрупувань (**АУ**) як –ОН, –СООН тощо, у поєднанні з обов'язковим оксоній-іоном обумовлює хромофорні властивості молекул АЦН в цілому [3, 4]. В той же час, замісники різної природи у основному структурному фрагменті АЦН здатні до утворення функціонально-аналітичних груп, які приймають участь у багатьох хімічних реакціях та процесах (іонізація, гідроліз, окислення-відновлення, осадження, комплексоутворення [2–4]). При розчиненні АЦН в неводних розчинниках або при введені поверхнево-активних речовин, спостерігаються зміни кислотно-основних рівноваг АУ за рахунок взаємодії молекул середовища з АЦН, що значно впливає на їх спектральні і хіміко-аналітичні характеристики [5].

Для детального вивчення і практичного застосування сполук даного класу у хімічному аналізі в якості індикаторів або/та органічних реагентів, необхідно знати їх основні фізико-хімічні характеристики у розчинах різної природи. Відомо [3, 4], що АЦН, в залежності від кислотності середовища можуть знаходитись у декількох кислотно-основних формах, які існують у вузьких інтервалах pH і характеризуються певними значеннями констант іонізації (**pK)**. Відсутність даних про кислотно-основні властивості присутніх АУ і спектральних характеристик АЦН у розчинах, в значній мірі ускладнює описання процесів їх взаємодії з компонентами хімічних систем, як неорганічної, так і органічної природи.

Для встановлення величин pK наявних кислотно-основних рівноваг, як правило, використовують класичні методи (потенціометрію, спектрофотометрію (**СФМ**), кондуктометрію), при застосуванні яких необхідно оперувати рівноважними концентраціями певної кислотно-основної форми і відповідними екстенсивними характеристиками хімічної системи та опираючись на закон діючих мас, розраховують константи [6]. До того ж, у структуру молекули АЦН, як правило, входить не менш чотирьох АУ [1, 4], що у разі близьких значень pK ускладнює застосування класичних способів для їх визначення.

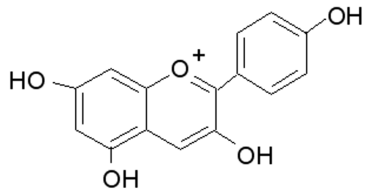
З другого боку, АЦН зазвичай виділяють з рослинного матеріалу шляхом екстракції, що виключає залучення до розрахунків як вихідних так і рівноважних концентрацій.

Авторами [7] показано перспективність методу кольорометрії (**МК**) при вивченні кислотно-основних властивостей і встановленні відповідних величин pK синтетичних барвників, без залучення даних про вихідні концентрації досліджуваних речовин у розчині та рівноважних концентрацій їх форм. Суть МК полягає у використанні координат кольору рівноконтрастної системи CIELab, які несуть інформацію про інтегральний розподіл світлопоглинання хімічної системи в широкому діапазоні довжин хвиль при різній кислотності та природи середовища. Врахування різних складових частин кольору дозволяє простежити тонкі відмінності близьких за властивостями АУ барвників, обов'язковими складовими яких є електронегативні атоми і електропозитивні атоми гідрогену і дослідити кислотно-основні рівноваги та встановити значення їх pK.

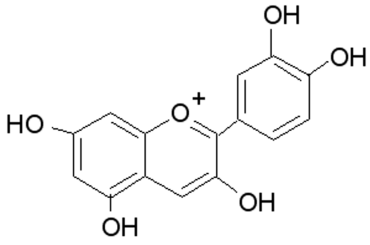
Виходячи з вище викладеного, мета даної роботи полягала в дослідженні та кількісній оцінці кислотно-основних рівноваг рослинних барвників, похідних АЦН, у водних розчинах методом кольорометрії.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Для дослідження можливості використання МК при визначенні кислотно-основних констант рівноваг барвників рослинного походження було обрано похідні АЦН – пеларгонідин **(ПН) – I** і ціанідин **(ЦН) – II**.



I



II

Робочі розчини ПН (3,5,7,4′-тетрагідроксібензфлавілій хлориду) і ЦН (3,5,7,3′,4′-пентагідроксібензфлавілій хлориду) готували шляхом їх екстракційного виділення з рослинного матеріалу. Для цього сухі червоні квітки пеларгонії (Pelargonium zonale (L.) L'Hér. Ex Ait.) масою 3,00 г і подрібнене листя свіжої червонокачанної капусти (Brassica oleraceae L. capitata. f. rubra) масою 5,00 г заливали водно-спиртовим розчином (30:70 об.%) об'ємом 100 мл і залишали на добу, періодично струшуючи. Одержані екстракти кількісно переносили у колби на 250 мл і доводили до позначки дистильованою водою [2, 4].

Кислотно-основні властивості молекул барвників та відповідні рівноваги досліджували методом кольорометрії на спектрофотометрі СФ-56 (″ОКБ СПЕКТР″, С.-Петербург, РФ) у кюветах з товщиною поглинаючого шару 1 см в інтервалі довжин хвиль 400–600 нм. Використовували наступні кольорометричні характеристики: L, a, b координати кольору у системі CIELab; S – насиченість. Відомо, що кольорометричні характеристики змінюються в залежності від забарвлення розчину барвників та існування відповідної форми при різній кислотності середовища. В даному випадку найбільшу інформацію про кольорові розрізненості забарвлених систем надає насиченість, котра після необхідних перетворень дає диференційну величину SCD (Specific Color Discrimination – питома відмінність кольору), що характеризує зміну насиченості кольору при зміні pH, яку розраховували за формулою $SCD = \frac{\Delta S}{\Delta pH}$, і може бути використана для визначення відповідних величин pK у розчинах [7]. Отримані дані обробляли на створеній нами програмі "Кольорометричний калькулятор", написаної мовою C#.

У роботі використовували реагенти кваліфікації не нижче ″ч.д.а″, необхідну кислотність створювали відповідними розчинами сульфатної кислоти і гідроксиду натрію, pH контролювали на іономірі И-130, заздалегідь налагодженому за стандартними буферними розчинами. Ідентифікацію ПН і ЦН здійснювали шляхом порівняння зареєстрованих електронних спектрів їх екстрактів з відповідними літературними даними [4].

Для встановлення значень pK барвників у водному розчині методом кольорометрії в ряд мірних колб на 50 мл вносили по 7 мл (для ПН) та по 4мл (для ЦН) розчину барвника, в кожній встановлювали кислотність середовища в діапазоні pH 1÷14 через одиницю величини pH. У разі нечіткого розмежування максимумів на кривій залежності SCD=f(pH) та задля більшої диференціації величин pK дискретність зменшували до 0,25 одиниці pH. Відомо [8], що вміст етанолу у водних розчинах до 10% не впливає на зміну величини pK і тому отримані величини констант іонізації ПН та ЦН можна віднести до водного розчину.

В даній роботі досліджено можливості застосування МК при вивчені кислотно-основних рівноваг і встановленні відповідних констант іонізації для рослинних барвників без залучення рівноважних концентрацій їх форм у широкому інтервалі pH. В якості стандартної речовини ви-

 © О.М. Чеботарьов, І.С. Єфімова, Н.А. Борисюк, Д.В. Снігур

користовували синтетичний барвник ксиленоловий оранжевий **(КО)**, який широко застосовується в хімічному аналізі, характеризується великою кількістю кислотно-основних рівноваг, з достовірно встановленими константами (табл.1). Як видно з табл.1, жоден з наведених фізико-хімічних методів не дає вичерпної інформації про константи усіх наявних іоногенних АУ. В загалі, наведені константи можна прийняти за "реперні", тобто вихідні, відносно яких будуть порівняні відповідні значення рК КО отримані методом кольорометрії. Це, в свою чергу, дозволить з високою вірогідністю стверджувати, що даний метод відповідає основним метрологічним характеристикам, а саме, правильності і відтворюваності отриманих даних.

Основний розчин КО з концентрацією $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л готували розчиненням наважки 0,16815 г сухого реагенту у бідистильованій воді, а розчини з меншими концентраціями – подальшим розведенням. При дослідженні констант іонізації КО методом кольорометрії в ряд мірних колб на 50 мл вносили по 5 мл стандартного розчину КО, встановлювали відповідну кислотність середовища від 18 М (за сульфатною кислотою) до pH 14. Враховуючи значну кількість значень рК (табл. 1), в досліджуваному діапазоні кислотності середовища, для синтетичного барвника КО дискретність зміни кислотності аналогічна випадку рослинних барвників.

Таблиця 1. Константи іонізації ксиленолового оранжевого у водному розчині

№ п/п	Група	Метод				
		Електрофорез [9, 10]	Потенціометрія [9, 11]		СФМ [12, 13]	
1	$-SO_3H$	-	-	-	-1,74	-
2	$=OH^+$	-	-	-	-1,09	-
3	–COOH	-	-	-	0,76	-
4	–COOH	1,25	2,06	2,00	-	-
5	–COOH	2,15	2,16	2,74	-	2,60
6	–COOH	3,20	3,56	4,49	-	3,70
7	–OH	6,1	7,34	7,50	6,46	6,40
8	$\equiv NH^+$	10,0	9,68	10,30	10,46	8,40
9	$\equiv NH^+$	-	12,61	12,00	12,28	12,20

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За результатами виконаних спектрофотометричних досліджень і відповідних розрахунків побудовано криву залежності величини питомої відмінності кольору (*SCD*) розчину КО від кислотності середовища (рис. 1), на якій спостерігається 9 максимумів. Знаходженням абсцис кожного максимуму отримують відповідні значення $-lgC_{H+}$, що чисельно дорівнюють величинам рК КО у розчині.

Аналіз наведеної графічної залежності вказує на існування у розчині десяти різнозарядних форм КО, що знаходяться у динамічній рівновазі в залежності від кислотності середовища, кожна з яких характеризується певним значенням величини питомої відмінності кольору і константою іонізації (табл. 2).

Отримані результати (табл. 2) корелюють з літературними даними наведеними у табл. 1, що вказує на достовірність отриманих результатів і придатність МК для дослідження кислотно-основних властивостей та встановлення відповідних величин рК молекул барвників рослинного походження.

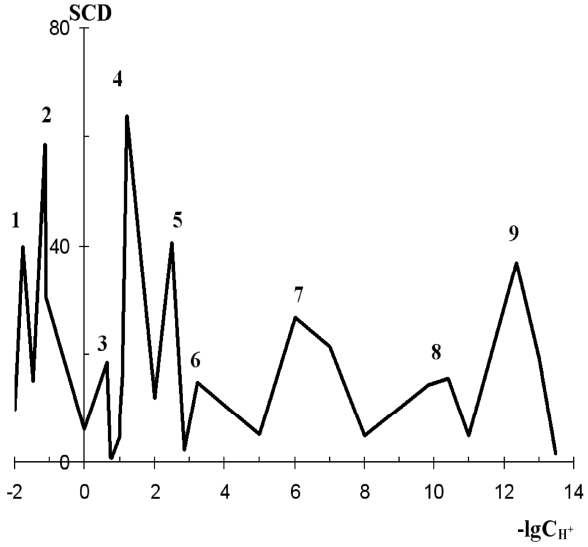


Рис.1. Залежність величини SCD розчину КО від кислотності середовища (1 $-SO_3H$; 2 $=OH^+$; 3 –COOH; 4 –COOH; 5 –COOH; 6 –COOH; 7–OH; 8 $\equiv NH^+$; 9 $\equiv NH^+$).

При дослідженні кислотно-основних рівноваг барвників ПН та ЦН з метою ідентифікації їх ек страктів зареєстровано електронні спектри в інтервалі довжин хвиль 400–600 нм і порівняно із наведеними у літературі [4].

Як видно з рис. 2 (а, б), одержані спектри досліджуваних барвників практично не відрізняються від літературних. Смуги поглинання достатньо інтенсивні, широкі з видимими перегинами та невиразними максимумами поглинання при 510±5нм для ПН і 525±5нм для ЦН, що говорить про наявність лабільної хромофорної системи спряжених зв'язків з АУ, які містять електродонорні атоми оксигену та електропозитивні атоми гідрогену.

Таблиця 2. Константи іонізації ксиленолового оранжевого встановлені методом кольорометрії (n=3, P=0,95)

№ п/п	Група	pK	S_r, %
1	$-SO_3H$	-1,73±0,15	0,35
2	$=OH^+$	-1,10±0,25	2,73
3	–COOH	0,70±0,05	1,43
4	–COOH	1,12±0,05	1,79
5	–COOH	2,53±0,05	0,79
6	–COOH	3,05±0,13	1,64
7	–OH	6,31±0,03	0,16
8	$\equiv NH^+$	10,45±0,03	0,10
9	$\equiv NH^+$	12,38±0,02	0,08

У АЦН електрон гетероциклічного атому оксигену приймає участь в утворенні π-зв'язків в гетероароматичному кільці, внаслідок чого молекула стає хромофором. Антоціанідиновий хромофорний фрагмент чутливий до наявності ауксохромів у різних положеннях, що пояснює варіювання кольору в широкому діапазоні – від рожево-червоного до синьо-фіолетового, в залежності від кислотності середовища. Тому можна прогнозувати, що такі органічні сполуки легко прийматимуть участь в протолітичних рівновагах з утворенням нових кислотно-основних форм, і не виключається можливість таутомерних перетворень деяких з них.

На рис. 3 наведено графічні залежності величини SCD від кислотності середовища, які дозволяють встановити значення pK для барвників ПН і ЦН (табл. 3). Згідно рис. 3 і даних табл. 3 кількість встановлених pK відповідає кількості АУ, здатних вступати у протолітичні рівноваги в молекулах ПН і ЦН.

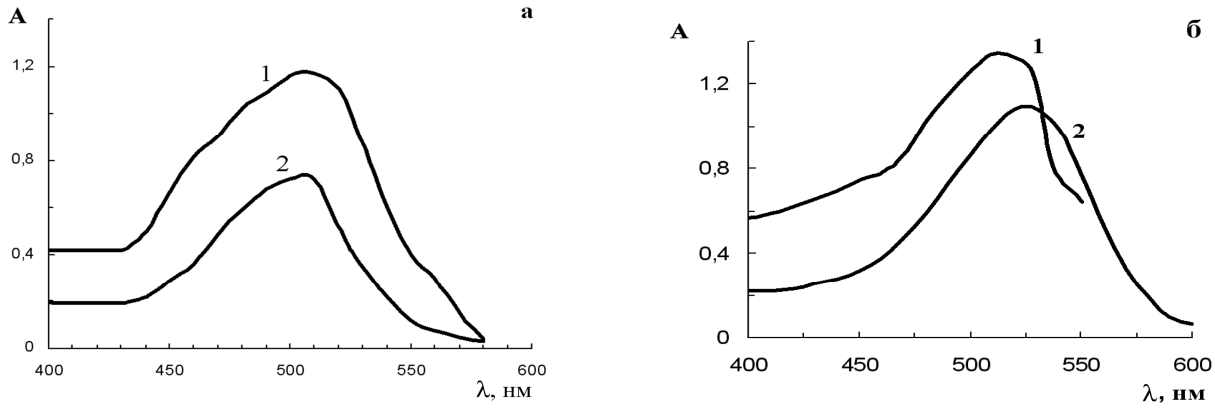


Рис.2. Електронні спектри ПН (**а**) і ЦН (**б**): 1 – спектри наведені у роботі [4], 2 – спектри досліджуваних екстрактів.

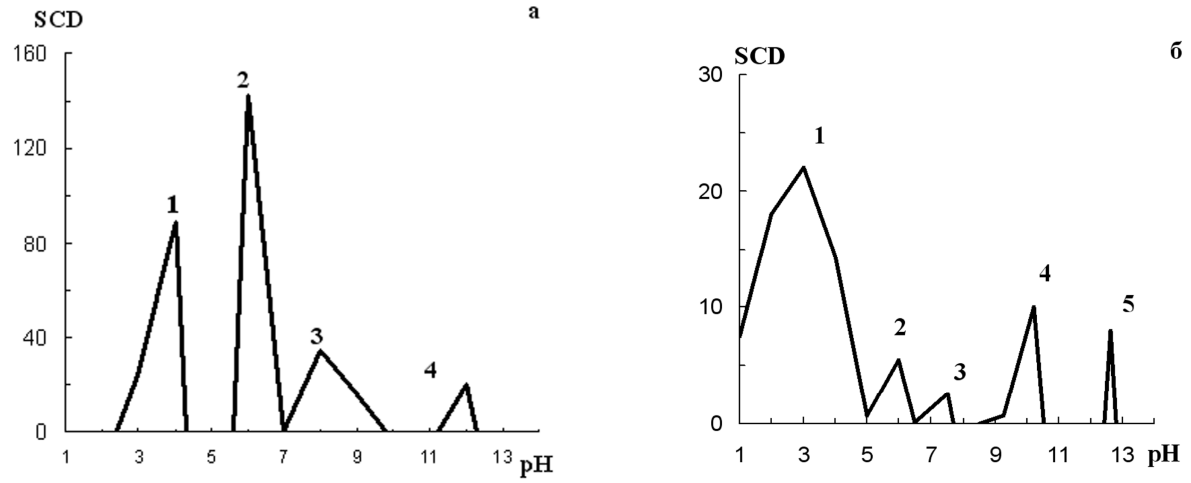


Рис.3. Залежність величини SCD розчинів ПН (**а**) та ЦН (**б**) від кислотності середовища.

© О.М. Чеботарьов, І.С. Єфімова, Н.А. Борисюк, Д.В. Снігур

Таблиця 3. Константи іонізації пеларгонідину і ціанідину (n=3, P=0,95)

№ п/п	Пеларгонідин			Ціанідин		
	Група	рК	S_r, %	Група	рК	S_r, %
1	–ОН (4')	4,00±0,10	0,25	–ОН (4')	3,05±0,10	0,33
2	–ОН (7)	6,00±0,10	1,15	–ОН (3')	6,10±0,10	0,08
3	–ОН (3)	8,00±0,10	0,12	–ОН (7)	7,50±0,10	0,16
4	–ОН (5)	12,00±0,10	0,13	–ОН (3)	10,20±0,10	0,20
5	-	-	-	–ОН (5)	12,70±0,10	0,15

Примітки: цифра у дужках вказує на положення –ОН груп у молекулах АЦН.

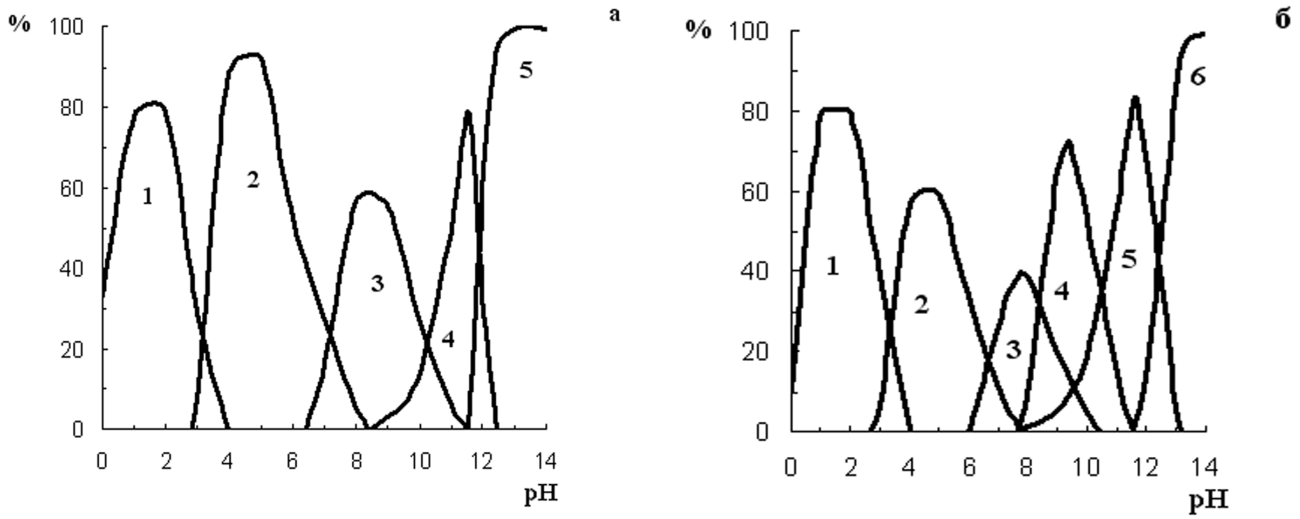


Рис. 4. Діаграми розподілу кислотно-основних форм ПН (а) і ЦН (б) в залежності від кислотності середовища.

Результати проведених досліджень покладено в основу побудови діаграм розподілу виявлених кислотно-основних форм рослинних барвників (рис. 4).

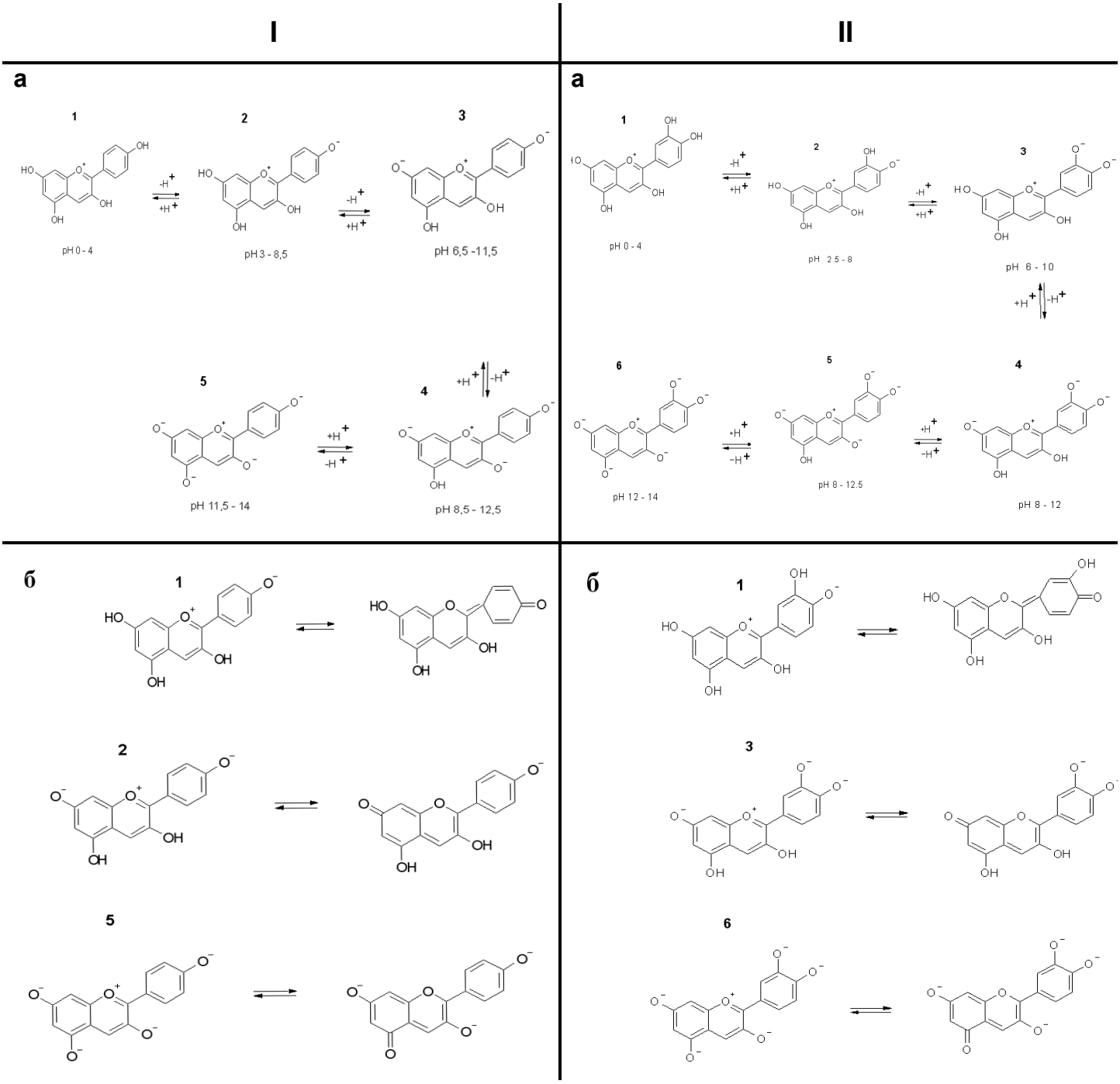
Згідно рис. 3 і даних табл. 3 кількість встановлених рК відповідає кількості АУ, здатних вступати у протолітичні рівноваги в молекулах ПН і ЦН. Результати проведених досліджень покладено в основу побудови діаграм розподілу виявлених кислотно-основних форм рослинних барвників (рис. 4).З представлених діаграм розподілу, результатів отриманих методами спектрофотометрії і кольрометрії, а також квантово-хімічних розрахунків у середовищі програми HyperChem Pro 6 можна стверджувати про існування у розчині ПН п'яти, а у ЦН шести іонних форм, які знаходяться у динамічній рівновазі в залежності від кислотності. За експериментальними і розрахунковими даними та узгодження їх з відомими теоретичними положеннями для такого класу органічних речовин представлено можливі схеми динамічних рівноваг у розчинах досліджуваних барвників (ПН – схема Іа; ЦН – схема ІІа).

Крім того, з великою ймовірністю можна стверджувати, що форми 1, 2, 5 для ПН приймають участь у таутомерних перетвореннях, які наведено на схемі Іб; для ЦН таутомерні перетворення характерні формам 1, 3, 6, згідно схеми ІІб. Слід припустити, що рухомість цих прототропних систем в цілому надзвичайно велика, а це не дозволяє зафіксувати окремо кожну таутомерну форму.

Проте, відмічене вище не перешкоджає дослідженню та кількісному описанню кислотно-основних рівноваг з використанням метода кольорометрії, тоді як для спектрофотометричного методу подібне є суттєвим ускладненням, а інколи і зовсім унеможливлює його використання.

Таким чином, застосування колірних характеристик хімічних систем в аналітичній хімії барвників розширює можливості дослідження їх кислотно-основних процесів. Також необхідно відзначити, що метод кольорометрії, порівняно з іншими фізико-хімічними методами, дає більш повну інформацію про наявні протолітичні рівноваги та відповідні константи.

.



Схеми рівноваг

основних іонних форм барвників (I – ПН, II – ЦН) та їх можливі таутомерні перетворення:

а) іонні рівноваги;

б) таутомерні перетворення

В даній роботі методом кольорометрії вперше досліджено кислотно-основні рівноваги екстрактів рослинних барвників, а саме похідних АЦН та розраховані їх константи іонізації.

Показана можливість застосування МК для встановлення величин pK_i барвників як синтетичного, так і рослинного походження, без наявності даних про рівноважну концентрацію їх кислотно-основних форм у водних розчинах

© О.М. Чеботарьов, І.С. Єфімова, Н.А. Борисюк, Д.В. Снігур

ЛІТЕРАТУРА

1. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. – М.: Мир, 1986. – 394 с.
2. Красільнікова Л.О., Авксентьєва О.О., Жмурко В.В. Біохімія рослин. – Харків.: Основа, 2007. – 191 с.
3. Левданский В.А, Бутылкина А.И., Кузнецов Б.Н. Выделение и изучение антоцианидинов коры лиственицы // Химия растительного сырья. – 2006. – №4. – С. 17– 20.
4. Клышев Л.К., Бандюкова В.А., Алюкина Л.С. Флавоноиды растений. – Алма-Ата: Наука, 1978. – 220с.
5. Фиалков Ю.А. Растворитель как средство управления химическим процессом. – Л.: Химия, 1990. – 240 с.
6. Альберт А., Сержент Е. Константы ионизации кислот и оснований. – М.: Химия, 1964. – 178 с.
7. Иванов В.М., Кузнецова О.В. Химическая цветометрия. Возможности метода, области применения и перспективы // Успехи химии. – 2001. – 70, №5. – С. 411–428.
8. Лайтинен Г.А. Химический анализ. – М.: Химия, 1966. – 656 с.
9. Hulanicki A., Glab S., Ackerman G. Complexim etric indicators: characteristics and applications // Pure & appl. chem. – 1983. – 55, №7. – P. 1137–1230.
10. Mori I., Shinogi M., Falk E., Kiso Y. Electrophoretic determination of pK-values of indicators and their relation to colour changes // Talanta. – 1972. – 19, №3. – P. 299–306.
11. Ghjlivand M.B., Bamdad F., Chasemi J. A potentiometeric study of protonation and complex formation of xylenol orange with alkaline earth and aluminum ions // Talanta. – 1998. – 46, №5. – P. 875–894.
12. Rechák B., Körbl J. Metallchrome indicatoren VIII. Physikalisch-chemische untersuchung von xylenolorange und einige seiner chelate. Dissoziationskonstanten von xylenolorange // Coll. of Czech. Chem. Comm. – 1960. – 25, №3. – P. 797–810.
13. Manshi K., Dey A. Absorptiometric study of the chelates formed between the lantanoids and xylenol orange // Mikrochim. Acta. – 1968. – 56, №5. – P. 1059–1065.