

Barevnost látek kolem nás a její změny v průběhu chemické reakce

Cíle

Seznámení žáků s problematikou barevnosti látek na příkladu reakce přírodního barviva lykopenu.

Podrobnější rozbor cílů

- Seznámit se se základy teorie barevnosti látek a problematiky vnímání barev.
- Seznámit se se strukturou lykopenu.
- Zvládnout, navrhnout a provést extrakci nepolárního barviva lykopenu z rajčatového protlaku.
- Odhadnout průběh reakce lykopenu s bromem, navrhnout možné produkty.
- Experimentálně ověřit průběh adice bromu na lykopen.

Zadání úlohy

V souvislosti s barevností prostudujte průběh adiční reakce na konjugovaný systém dvojných vazeb.

Technická úskalí, tipy a triky

Problematika barevnosti látek přesahuje do řady oborů. My se v této úloze budeme držet především problematiky barevnosti v souvislosti se strukturou látek a dále pak fyzikální podstaty barevnosti.

Reakce je dobře proveditelná pouze vizuálně v odměrném válci. Celý experiment je možné postavit nejdříve na demonstraci průběhu reakce ve velkém objemu (ve válci), a poté se věnovat studiu změn s využitím spektrofotometru.

Pomůcky

spektrofotometr PASCO Amadeus s příslušenstvím (SE-7183), skleněná kyveta (!) do spektrofotometru, počítač se SW Quantum, popř. datalogger PASCO SPARK či Xplorer GLX (s instalovaným klíčem pro použití s PASCO Amadeus), odměrný válec 250 ml, zkumavky (4×) a stojánek na zkumavky, kádinka 100 ml, kádinka 400 ml (na odpad), pipeta 1 ml a mikropipeta 200 µl, laboratorní lžička, skleněná tyčinka, stříčka s destilovanou vodou, chemikálie (benzín, bromová voda 1,5%), biologický materiál – rajčatový protlak bez konzervantů, popisovač (lihový fix), pracovní návod, pracovní list

Zařazení do výuky

Experiment je koncipován jako demonstrační, a to v rámci témat: barviva a barevnost látek (organická barviva), uhlovodíky a jejich klasifikace – adice, případně v rámci biochemie (fotosyntéza, karotenoidy, vitamíny). ZŠ: demonstrace; SŠ: demonstrace, lab. cvičení

Časová náročnost

Délka demonstračního experimentu – do 20 minut.

Návaznost experimentů

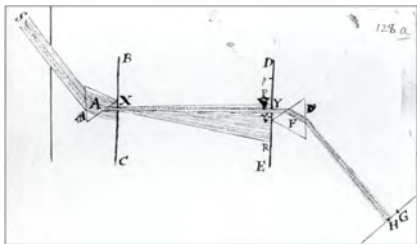
Na tuto úlohu se dá velice dobře navázat např. praktickým cvičením s úlohou č. 19 (Studium rostlinných barviv), v případě obecné problematiky barevnosti látek také úlohou č. 20 (Stanovení isosbestického bodu bromkresolové zeleně).

Mezipředmětové vztahy

fyzika (optika); biologie (vitamíny, karotenoidy, výživa, metabolismus rostlin a fotosyntéza, zrakový orgán); výtvarná výchova (barevnost látek, míchání barev)

Isaac Newton

Studiu složení světla se intenzivně věnoval Isaac Newton.

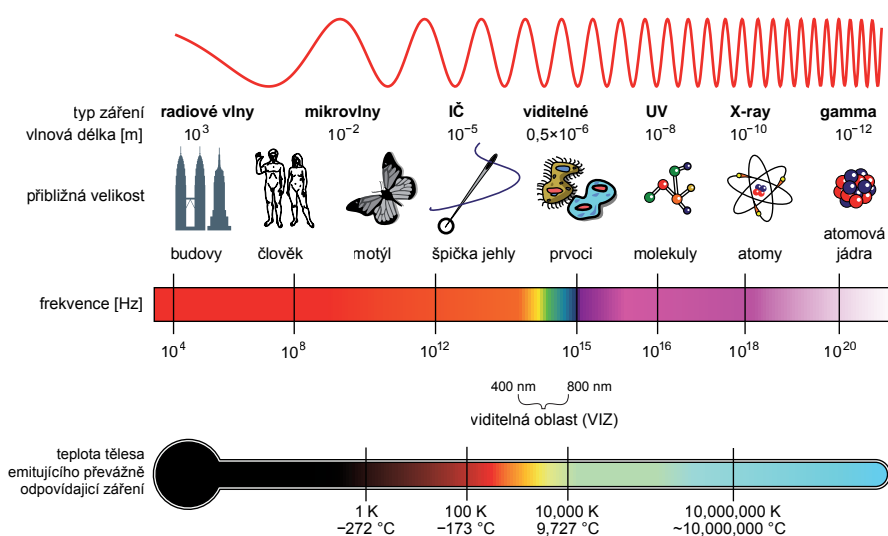


Teoretický úvod

Proč jsou látky kolem nás barevné? Jak vznikají barvy? Co je to vlastně barva? Jak to, že je možné z určitých barev namíchat barvu jinou? Jak je možné, že z nebarevného světla vznikne barevná duha? Dají se barvy nějak objektivně popsat a uspořádat do určitého systému?

Problematika barev a barevnosti látek kolem nás byla v historii „výzvou“ nejen pro celou řadu vědců, ale také filozofů, lékařů a umělců. V souvislosti s barevností látek se můžeme setkat se jmény takových velikánů, jako byli **Isaac Newton**, **Thomas Young**, **Johann Wolfgang Goethe**, **Hermann Helmholtz** a celá řada dalších.

Podívejme se nejdříve na světlo. Světlo je **elektromagnetické záření**, které jsme schopni vnímat naším zrakovým orgánem zhruba v rozmezí vlnových délek od 400 nm do 800 nm. Hovoříme pak o tzv. **viditelném světle** (viz obr. 1).



Obr. 1: Spektrum elektromagnetického záření s vyznačením viditelné oblasti

Pokud rozložíme „bílé světlo“ (což můžeme udělat s využitím hranolu, mřížky anebo třeba pouhým pozorováním duhy), uvidíme najednou hned několik barev — jsou to tzv. **spektrální barvy**. Barva je zde dána určitou vlnovou délkou, která odpovídá **energii záření** (viz vztah 1 pro výpočet energie):

$$E = \frac{h \cdot c}{\lambda} \quad (1)$$

h – Planckova konstanta

c – rychlost světla

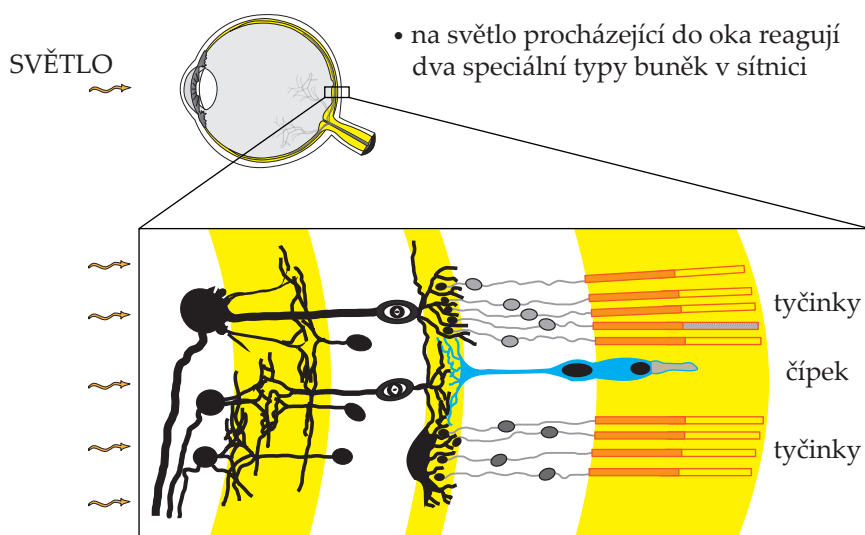
λ – vlnová délka

Čím je ale způsobeno, že jsou kolem nás **barevné věci**? Víme, že látky jsou složeny z **atomů** a **molekul**. V atomech jsou **valenční elektrony**, které je možné předáním určité energie „posunout“ na vyšší energetickou hladinu (tzv. **excitovat**). Když dopadne záření na určitou látku, mohou její elektrony pohltit právě takovou část tohoto záření, která odpovídá excitaci jejich elektronů na vyšší energetickou hladinu. Pokud jsou fotony pohlceny látkou z viditelné části světelného spektra, bude se nám látka jevit jako barevná. Chybějící pohlcená barva se projeví tak, že uvidíme její tzv. **doplňkovou barvu** (viz tab. 1 a obr. 2).

Absorbovaná vlnová délka [nm]	Barva absorbovaného světla	Barva látky
400–435	fialová	žlutozelená
435–480	modrá	žlutá
480–490	zelenomodrá	oranžová
490–500	modrozelená	červená
500–560	zelená	purpurová
560–580	žlutozelená	fialová
580–595	žlutá	modrá
595–605	oranžová	zelenomodrá
605–670	červená	modrozelená

Tab. 1: Barevnost látek – přehled vlnových délek pohlceného světla a odpovídajících doplňkových barev

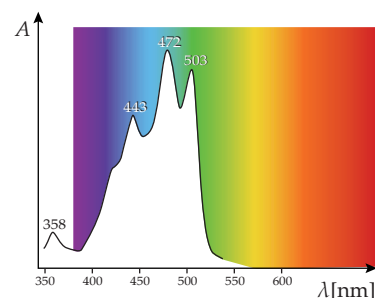
Naším smyslovým orgánem, kterým vnímáme barvy, je oko. **Oko** obsahuje v sítnici dva základní typy buněk coby světelné receptory (**fotoreceptory**). Jsou to tzv. **tyčinky** a **čípky**, které můžeme považovat za přeměněné neurony.



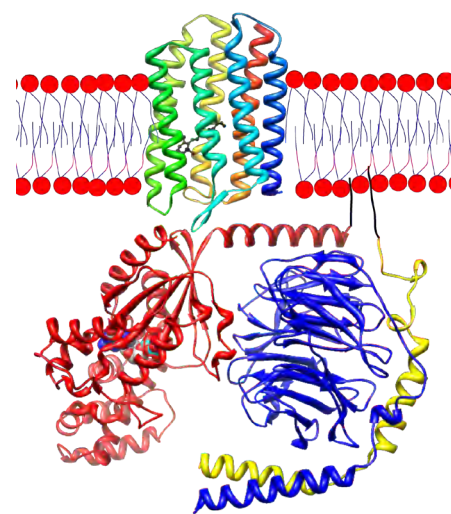
Obr. 3: Schéma sítnice lidského oka

Tyčinky umožňují především vnímání kontrastů (**černo-bílé vidění**). V lidské sítnici je přibližně 120 miliónů těchto buněk. Za **barevné vidění** zodpovídají **čípky**, které jsou tří základních typů, a to S (citlivé především k modré části spektra), M (citlivé především k zelené části spektra) a L (citlivé především k červené části spektra). V lidské sítnici je čípků mnohem méně než tyčinek (asi 6 miliónů). Principem vzniku nervového vzruchu je, zjednodušeně řečeno, vznik receptorového potenciálu po dopadu fotonu na speciální protein (**rhodopsin**, obr. 4) ve fotoreceptorech.

V souvislosti s barvami hovoříme o tzv. **primárních** a **sekundárních barvách**. Jde o základní barvy, jejichž kombinací získáme barvy jiné. Primární barvy vychází z výše popsaných zákonitostí vnímání barev lidským okem – jsou to: červená (R = red), zelená (G = green) a modrá (B = blue). Sekundární barvy získáme z barev primárních jejich smícháním. Výsledkem je azurová (C = cyan), purpurová (M = magenta) a žlutá (Y = yellow). Pokud pracujeme přímo se svítícím světelným zdrojem (např. monitor), používáme nejčastěji **barvový model** vycházející z primárních barev – **model**

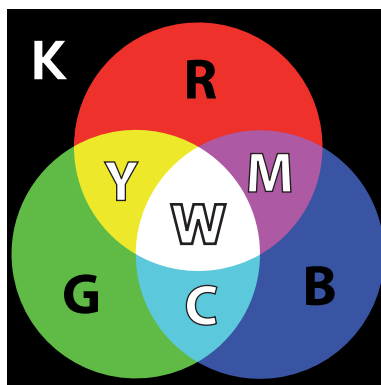


Obr. 2: Absorpční spektrum lykopenu. Látka pohlcuje světlo o vlnových délkách přibližně 400–530 nm. Prázdné místo naznačuje absorbované záření. Červené zbarvení lykopenu je dáno složením zbylých (neabsorbovaných) vlnových délek.

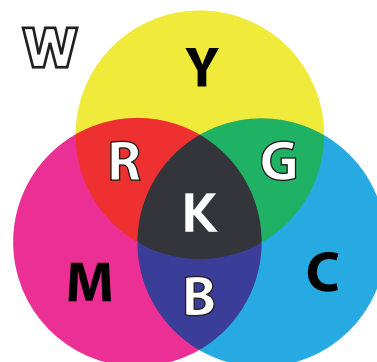


Obr. 4: Membránový protein rhodopsin (prochází nahoře skrz membránu) asociovaný s G proteinem (dole).

RGB (aditivní model, složením všech barev vznikne bílá). V případě, že dochází k absorpci světla (např. barvy vytištěné na papíru) využíváme nejčastěji **barvový model CMY** (subtraktivní model, složením všech barev vznikne černá). Protože je namíchání skutečně černé barvy problematické, tiskne se černá zvlášť. Sekundární barvy jsou pak doplněny čtvrtou barvou, černou (K = black, **barvový model** pak označujeme jako **CMYK**).



ADITIVNÍ MODEL
(míchání barev na monitoru, TV, ...)
Primární barvy:
R (červená), G (zelená), B (modrá).
Bílá (W) vzniká smísením všech barev.

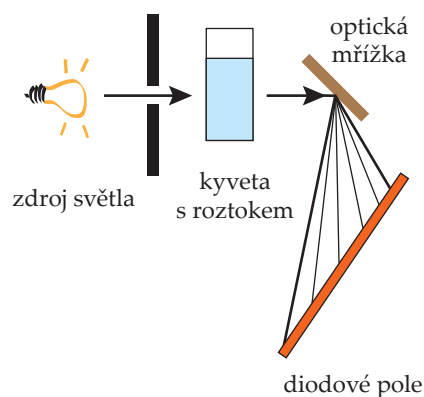


SUBTRAKTIVNÍ MODEL
(míchání barev na papíře, tisk, ...)
Primární barvy:
C (azurová), M (purpurová), Y (žlutá).
Smísením všech barev vzniká černá (K).

Obr. 5: Primární a sekundární barvy, barvové modely

Diodové pole?

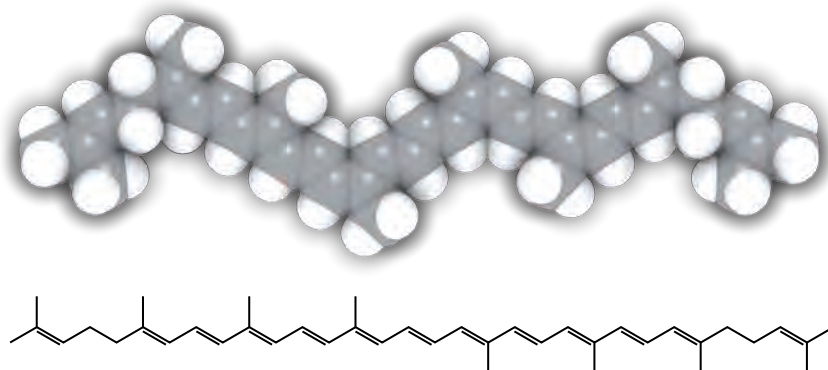
Spektrofotometr Amadeus disponuje detektorem typu diodového pole (diode array). Tím je umožněno současné sledování absorbance v rozsahu vlnových délek zhruba od 350 do 800 nm. Princip tohoto detektoru je na následujícím obrázku.



Vraťme se ale zpět k elektronům. Barevnost látek je způsobena nejčastěji následujícími skutečnostmi:

- Látka obsahuje **π -elektronový systém**, který umožňuje absorpci fotonů z viditelné oblasti (např. látky mající konjugované dvojně vazby, azo skupinu $-N=N-$, aromatické a heterocyklické struktury a řada dalších).
- Atom má **valenční elektrony v orbitalech d a/nebo f** (přechodné a vnitřně přechodné kovy). Takové atomy jsou často součástí koordinačně kovalentních komplexů, které jsou typické svým zbarvením ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $[Fe(SCN)_2]^+$). Nebo ve vysokém oxidačním čísle vystupují jako součást iontů (MnO_4^- , CrO_4^{2-}).

My se dále zaměříme na první z uvedených případů. Jako jeden z reaktantů použijeme **přírodní barvivo lykopen**. Jedná se o organickou látku, která patří mezi **karotenoidy** a její barevnost souvisí právě s přítomností konjugovaného systému dvojných vazeb. Strukturálně se jedná o tetraterpen složený z osmi isoprenových jednotek. Strukturální vzorec je na obrázku č. 6.



Obr. 6: Přírodní barvivo lykopen – model molekuly a strukturální vzorec

Lykopen je světle červená látka, kterou známe nejčastěji ze zeleniny a ovoce (rajčata, vodní meloun, papaya a další). U rostlin je lykopen velmi důležitou látkou, která souvisí např. s metabolismem fotosyntetických pigmentů. Pro svoji barevnost, a také pro výrazné **antioxidační účinky**, se využívá v potravinářství pod kódem **E160d**.

V našem experimentu se pokusíme postupně jednotlivé dvojně vazby lykopenu „rozbít“, a přitom budeme sledovat, co se bude dít s barevností této látky. K tomu využijeme spektrofotometr PASCO Amadeus, který nám umožňuje sledovat absorpční spektrum v rozsahu vlnových délek zhruba od 350 nm do 850 nm.

Motivace

Protože budeme v tomto experimentu pracovat s rajčatovým protlakem, je vhodné na úvod ukázat zralé rajče a zeptat se, proč je vlastně červené. Pak ukážeme vzorec lykopenu a položíme otázku: „Co zodpovídá za to, že je tato molekula barevná?“ Dovedeme žáky k tomu, že jsou to právě dvojně vazby. Můžeme nějakým způsobem barevnost rajčete ovlivnit? S využitím bromové vody (je potřeba co nejkonzentrovanejší) můžeme barevnost části rajčete ovlivnit. Stačí kousek rajčete odříznout a na červenou řeznou plochu nakapat několik kapek bromové vody. Následně přejdeme k obecnému pojednání o barevnosti látek a k popisu spektrofotometru.

Bezpečnost práce

Pracujte pečlivě a v souladu s pracovním návodem. Jedna z chemikálií v tomto praktickém cvičení je vysoce hořlavá, druhá pak vysoce toxická. Dbejte zvýšené opatrnosti a s chemikáliemi zacházejte vždy v souladu s instrukcemi na obalu. Nikdy nepipetujte ústy. V laboratoři používejte ochranné brýle, plášť a případně další pomůcky v souladu se správnou laboratorní praxí.

benzín (F, Xn, N, R 11-38-50/53-65-67, S 9-16-29-33-60-61-62)

brom (T+, C, N, R 26-35-50, S 7/9-26-45-61)

Příprava úlohy

K provedení tohoto experimentu je třeba zajistit rajčatový protlak bez konzervantů a připravit bromovou vodu. Pokud budete provádět experiment také v odměrném válci, je vhodné použít namísto bromové vody přímo několik kapek bromu. Alternativou pak je použití většího objemu bromové vody.



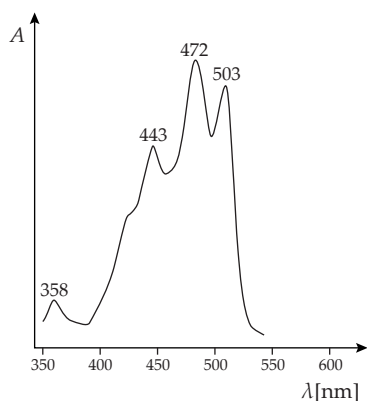
Obr. 7: Připravené pracovní místo pro provedení obou částí experimentu

Technická úskalí, tipy a triky

S bromem pracujte pouze v digestoři!

Příprava bromové vody

Přípravu bromové vody je třeba provádět v digestoři. Pokud nemáte k dispozici přímo brom, můžete si ho připravit např. reakcí bromidu draselného, dichromanu draselného a koncentrované kyseliny sírové. (Sestavte zábrusovou destilační aparaturu. Do 250 ml destilační baňky dejte 10 g rozetřeného bromidu, přidejte 10 g rozetřeného dichromanu a z dělicí nálevky poté přidejte 30 ml koncentrované kyseliny sírové. Reakce je velice bouřlivá a již v jejím průběhu dochází k destilaci vznikajícího bromu. Po ukončení reakce vydestilujeme zbývající brom z baňky zahřátím na 60 °C. Aparatura musí být dobře sesazená a jímadlo je vhodné umístit do nádoby s ledem. Unikající plyny je dále vhodné vést do promývací baňky s koncentrovaným KOH. Je třeba pracovat v dobře táhnoucí digestoři!) Bromovou vodu můžete také připravit reakcí bromidu s bromičnanem v kyselém prostředí.



Obr. 8: Absorpční spektrum benzínového extraktu lykopenu

Extrakce a koncentrace lykopenu

Vzhledem k tomu, že rajčatový protlak může být různě zahuštěn a obsah lykopenu tak může být v různých výrobcích různý, je dobré předem vyzkoušet potřebné ředění (viz část 1, bod e). Ukázalo se, že pokud je extrakt příliš koncentrovaný, nejsou dostatečně rozlišitelná jednotlivá absorpční maxima (píky při 443 nm, 471 nm a 502 nm). Při použití konzervovaného zahuštěného rajčatového protlaku Ortomio (140 g) bylo nutné zředit extrakt 3×.

Provedení v odměrném válci

Pokud provádíme experiment přímo s bromem, k barevným změnám dochází nejdříve dole (brom klesne dolů). Je tak možné otáčkami velice dobře kontrolovat postupné barevné změny ve spodní části válce. Závěrečné promíchání tyčinkou vertikálně pak vytvoří pozvolný barevný přechod přes několik barev. V případě, že nechceme pracovat s bromem, ale pouze s bromovou vodou, můžeme experiment realizovat se 150 ml rozmíchaného protlaku, ke kterému přidáme 100 ml bromové vody. Experiment pak probíhá podstatně pomaleji a ke změnám dochází nejdříve v horní části.

Postup práce

1) Sledování změn pomocí spektrofotometru PASCO Amadeus

- Nejdříve si připravte spektrofotometr PASCO Amadeus (viz „Nastavení HW a SW“ a „Příprava měření“).
- Do 100 ml kádinky dejte 2 velké lžičky pastovitého rajčatového protlaku.
- Přidejte 25 ml benzínu a alespoň 3 minuty intenzivně míchejte skleněnou tyčinkou.
- Slijte benzínovou frakci do 25 ml kádinky.
- Do skleněné (!) kyvety odpipetujte 1,5 ml vašeho extraktu a vložte ji do měřicí cely spektrofotometru. Zobrazené spektrum by mělo vypadat obdobně jako na obrázku č. 8 (hodnota maximální absorbance by se měla pohybovat pod hodnotou 2, pokud je absorbance vyšší, je vhodné extrakt naředit do připravených zkumavek a otestovat vhodné ředění).
- Zobrazené absorpční spektrum v grafu zaznamenejte v SW Quantum stisknutím tlačítka s ikonou *Fotoaparát*. Vhodné je také spektrum uložit do souboru pro pozdější použití. To udělejte pomocí tlačítka s ikonou *Disketa*.
- Nyní napipetujte do kyvety 1 ml optimálně naředěného extraktu a vložte kyvetu do měřicí cely. Měli byste vidět stejné spektrum jako v předchozím případě. Nyní přímo do kyvety napipetujte 200 μ l bromové vody.
- Paralelně provádějte experiment ve zkumavce tak, aby žáci viděli případné barevné změny (je třeba použít větších objemů a přidat bromovou vodu současně s přidáním bromové vody do kyvety).
- Sledujte, zda dochází k nějaké změně ve zobrazeném spektru a postupné změny zaznamenávejte vždy stiskem tlačítka s ikonou *Fotoaparát*.
- Jakmile se spektrum již nemění, přelijte obsah kyvety do prázdné zkumavky a posuďte barevnost pouhým okem.
- Experiment opakujte s tím, že do kyvety přidáte 2 \times 200 μ l bromové vody.
- Průběh experimentů s menším a větším množstvím bromové vody porovnejte.

2) Sledování změn okem v odměrném válci

- Ve 250 ml vody rozmíchejte 2 velké lžičky pastovitého rajčatového protlaku.
- Přelijte rozmíchaný obsah do 250 ml odměrného válce.
- Na dno válce vhoďte magnetické míchadlo, válec postavte na magnetickou míchačku a spusťte míchání pomalejší rychlostí.
- Opatrně napipetujte přímo do válce 0,5 ml bromu.
- Sledujte barevné změny.
- Zvyšte otáčky na magnetické míchačce (několikrát až k maximu) a pokaždé opět sledujte barevné změny.
- Vypněte míchačku a pomocí skleněné tyčinky vertikálně promíchejte obsah válce.
- Svá pozorování zaznamenejte a vyhodnoťte.

Nastavení HW a SW

- Ke svému počítači (netbooku) připojte USB kabel (konektor A) dodávaný se spektrofotometrem Amadeus. Druhou stranu kabelu připojte ke spektrofotometru (konektor B).

- 2) Dále propojte světlovodičem analyzátor se zdrojem s měřicí celou. Dbejte na to, abyste propojovací místa neznečistili.
- 3) Pomocí přiloženého adaptéru připojíme zdroj el. napětí k měřicí cele se světelným zdrojem. Pokud je vše v pořádku, je šachtou měřicí cely vidět rozsvícené světlo.

Příprava měření

- 1) Na počítači spusťte program Quantum.
- 2) Klikněte na tlačítko s písmenem *A*, budete měřit absorpční spektrum.
- 3) Automaticky se spustí průvodce nastavením měření.
- 4) V dialogu *Integration time* klikněte na tlačítko *Set Automatically*.
- 5) Hodnotu *Pixel Smoothing* nastavte na 3. Hodnotu *Average Scans* na 30.
- 6) Klikněte na tlačítko *Next*.
- 7) Pro základní nastavení spektrofotometru potřebujete nyní „zhasnout“. To uděláte vložením černého hranolku, který je součástí příslušenství, do měřicí cely.
- 8) V následujícím dialogu klikněte na tlačítko se symbolem *zhasnuté žárovky*. Tím jste si uložili tzv. „temné spektrum“.
- 9) Klikněte na tlačítko *Next*.
- 10) Nyní černý hranolek z měřicí cely vyjměte a klikněte na tlačítko se symbolem *rozsvícené žárovky*. Tím jste si uložili referenční spektrum vašeho světelného zdroje.
- 11) Klikněte na tlačítko *Finish*.
- 12) Nyní můžete začít proměřovat absorpční spektrum vašeho extraktu.

Vlastní měření a záznam dat

V SW Quantum je pouze několik nástrojů, které jsou umístěny v horní tlačítkové liště.

- 1) Z přítomných tlačítek budete potřebovat především tlačítko s ikonou *Fotoaparát*, kterým můžete kdykoli „zmrazit“ právě zobrazené spektrum. Měření však probíhá dále, a tak je možné tímto způsobem získat v jednom grafu několik různých absorpčních spekter.
- 2) Pokud chcete upravit měřítko zobrazeného grafu, použijte tlačítko s ikonou *Lupa* (v dialogu ručně zadáte minimum a maximum na osách *x* a *y*). Můžete také vyzkoušet automatické přizpůsobení měřítka grafu *tlačítkem s ikonou šipek*.
- 3) Vhodné je aktuálně zachycené spektrum uložit do souboru pro pozdější použití. To udělejte pomocí tlačítka s ikonou *Disketa*.

Analýza naměřených dat

Porovnáme absorpční maxima lykopenu na začátku a za určitý čas po přidání bromové vody. Všimáme si nejen změny „tvaru“ absorpčního spektra, ale také hodnot absorbance. Případné změny v absorpčním spektru dáme do vztahu s barevností získaného extraktu.

Hodnocení práce žáků

- Nastudovali si žáci teorii předem?
- Sestavili a použili žáci měřicí aparaturu správně?
- Postupovali žáci korektně podle pracovního návodu?
- Porozuměli žáci uvedené problematice?

Pozor na světlovodiče

Při použití světlovodného kabelu je třeba dbát na ochranu jeho koncových částí i šroubovacích míst pro napojení na spektrofotometr a na měřicí cele (k ochraně slouží gumové čepičky).

Nastavení spektrofotometru

Vyšší hodnota *Average Scans* má význam především pro snížení nežádoucího šumu v oblasti vlnových délek mezi 350–450 nm. A právě tuto oblast při studiu rozdělených rostlinných barviv potřebujeme nejvíce.

Nezhasínejte žárovku

Není vhodné odpojovat elektrický zdroj. Nejen, že tím snižujete životnost žárovky, ale po zapnutí vždy nějakou dobu trvá, než se výkon žárovky ustálí.

Kontinuální sledování změn

Zajímavé je sledovat také časovou změnu celkové absorbance. K tomu je možné využít průvodce kinetikami – tlačítko s ikonou grafu s časem na ose *x* (*Kinetics*). Tím se současně zobrazí dvě okna – jedno s absorpčním spektrem a druhé pak se záznamem změny absorbance v čase. Výborné je, že v tomto průvodci můžete nastavit rozsah vlnových délek, ve kterém budete změnu absorbance sledovat. (Můžete tak sledovat třeba pouze jeden z absorpčních píků lykopenu.)

Hodnocení výsledků

Vzhledem k tomu, že rajčatový protlak je materiálem s vysokým obsahem lykopenu, patří uvedený experiment k jednoduše proveditelným demonstracím. Spektrofotometr nám dává ideální možnost ukázat žákům souvislost barevnosti se změnou absorpčního spektra při „odstranění“ určitých vazeb v molekule lykopenu.

Syntéza a závěr

Na závěr je vhodné žákům shrnout:

- Proč jsou vlastně látky barevné, jak barvy vznikají a jak je vnímáme.
- Jakým způsobem barvy objektivně popisujeme.
- Co je to lykopen, kde se s ním můžeme setkat a proč jsme si ho vybrali pro náš experiment.
- Co se děje při reakci lykopenu s bromem a jak to souvisí s barevností?

- Vypracovali žáci správně své pracovní listy?
- Získali žáci předpokládané výsledky?
- Interpretovali žáci výsledky správně?
- Shrnuli žáci nové poznatky v závěru?

Informační zdroje

- <http://en.wikipedia.org/wiki/Color>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Color_vision
- http://en.wikipedia.org/wiki/Human_eye
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Retina>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Rod_cell
- http://en.wikipedia.org/wiki/Cone_cell
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Rhodopsin>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Theory_of_Colours
- http://en.wikipedia.org/wiki/Primary_color
- <http://cs.wikipedia.org/wiki/RGB>
- <http://cs.wikipedia.org/wiki/CMYK>
- <http://en.wikipedia.org/wiki/Lycopene>
- <http://cs.wikipedia.org/wiki/Spektrofotometrie>
- Lichtenthaler H.K.: *Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes*. Methods in Enzymology, 148, 350-382 (1987)
- Rodriguez-Amaya, Della B.: *A guide to carotenoid*. Washington, D.C.: ILSI Press, 2001. ISBN 15-788-1072-8
- http://en.wikipedia.org/wiki/Photosynthetic_Pigments