

OSNOVNA ŠOLA PETROVČE

Petrovče 32, 3310 Petrovče

MLADI RAZISKOVALCI ZA RAZVOJ ŠALEŠKE DOLINE

RAZISKOVALNA NALOGA

ANTOCIANI

Tematsko področje: NARAVOSLOVNE VEDE

Avtorica:

Ana Gril, 9. razred

Mentorica:

Polonca Počivalšek, prof.

Petrovče, 2015

Gril, A. Antociani.
Raziskovalna naloga, OŠ Petrovče, 2015

Raziskovalna naloga je bila opravljena na Osnovni šoli Petrovče.

Mentorica: Polonca Počivalšek, prof.

Datum predstavitve: marec, 2015

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD OŠ Petrovče, šolsko leto 2014/2015

KG antociani/naravna barvila/kromatografija/ekstrakcija

AV GRIL, Ana

SA POČIVALŠEK, Polonca

KZ 3320 Velenje, SLO, Vodnikova 3

ZA OŠ Petrovče

LI 2015

IN **ANTOCIANI**

TD Raziskovalna naloga

OP IV, 45 str., 9 pregl., 35 sl., 23 vir.

IJ SL

JI sl/en

AI Pogosto se sprašujemo, ali so barvila, ki so dodana živilom, naravna ali umetna. Prav tako nas zanimajo njihovi učinki na naše zdravje. Moj namen je bil dokazati, da lahko z naravnimi barvili, pridobljenimi iz antocianov, živila zelo atraktivno pobarvamo. To skupino barvil sem izbrala, ker so lepih in živih barv ter imajo pozitivne zdravstvene učinke.

Antociani so najpomembnejša skupina vodotopnih rastlinskih barvil. Nahajajo se lahko v različnih delih višje razvitih rastlin. Rastlinske dele obarvajo rdeče-vijolično-modro. Barvni ton je odvisen od pH vrednosti. V kislem so roza-rdeči, v nevtralnem in rahlo bazičnem pa vijolično-modri.

Najprej sem izbrala rastline, ki vsebujejo večje količine antocianov in so široko dostopne. Iz njih sem z različnimi postopki (stiskanje, filtriranje, ekstrakcija ...) pridobila barvila.

S papirno kromatografijo sem se prepričala, da so antociani velika skupina barvil.

Za barvanje različnih gotovih napitkov in jedi sem uporabila le nekatera barvila. Izbrala sem barvila tistih delov rastlin, ki se že tradicionalno uporabljajo v prehrani. Tako sem izbrala nekatere vrste sadja in cvetov (črni ribez, aronija, hibiskus ...), s katerimi sem obarvala različne gotove napitke in jedi (mleko, jogurt, jajčni beljak ...), ki se razlikujejo po kislosti. Dodatek barvila, bogatega z antociani, tako povzroči nastanek različnih odtenkov barv. Ko sem s posameznim barvilom barvala živila z različnimi pH vrednostmi, sem dobila barvno paleto roza-vijoličnih tonov. Dokazala sem, da se vsa barvila iz skupine antocianov, ki sem jih pridobila, obnašajo kot pH indikator.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND OŠ Petrovče, 2014/2015

CX anthocyanins/natural pigment/ chromatography/extraction

AU GRIL, Ana

AA POČIVALŠEK, Polonca

PP 3320 Velenje, SLO, Vodnikova 3

PB OŠ Petrovče

PY 2015

TI **Anthocyanins**

DT RESEARCH WORK

NO IV, 45 p., 9 tab., 35 fig., 23 ref.

LA SL

AL sl/en

AB We often ask ourselves if dyes added to food are natural or artificial. We are also interested in their effects on our health. My purpose was to prove that we can with natural dyes, which we get from anthocyanins, colour the food very attractively. I chose this group of dyes because their colours are beautiful and vivid and they also have positive health effects. Anthocyanins are the most important group of water-soluble plant pigments. They can be located in different parts of higher developed plants. Plants' parts are coloured red-purple-blue. The tint depends on pH value. In the acidic pH atmosphere they are pink-red, in neutral and slightly basic area they are purple-blue. At first I chose plants that contain larger quantities of anthocyanins and are widely available. By using various different processes (pressing, filtering, extraction ...) I obtained a dye. With the paper chromatography I convinced myself that anthocyanins are a huge group of dyes. For colouring different drinks and ready-made meals I used only some dyes. I chose them from the exact plants' parts, which have already traditionally been used in the nutrition. Therefore I selected certain fruit and flowers (blackcurrant, aronia, hibiscus ...) and coloured different ready-made drinks and meals (milk, yoghurt, egg white ...) which differ in acidity. The dye supplement that is rich in anthocyanins leads to the different shade formation of colours. As I chose the exact dye and coloured the food with different pH values, I got a colourful palette of pink-purple tones. I have proved that all the dyes from the group of anthocyanins, which I obtained, behave as pH indicator.

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	10
1.1	NAMEN	10
1.2	HIPOTEZE.....	11
2	TEORETIČNI DEL.....	12
2.1	ANTOCIANI ali ANTOCIANINI	12
2.1.1	PRISOTNOST V NARAVI	12
2.1.2	ŽIVILA, BOGATA Z ANTOCIANI	13
2.1.3	NALOGE ANTOCIANOV	17
2.1.4	KEMIJSKA STRUKTURA	17
2.1.5	STABILNOST	22
2.1.6	UPORABA.....	22
2.2	KROMATOGRAFIJA	23
2.2.1	PAPIRNA KROMATOGRAFIJA	24
2.2.2	RETENZIJSKI FAKTOR	25
2.3	EKSTRAKCIJA	25
2.4	pH.....	26
3	EKSPERIMENTALNI DEL	27
3.1	PRIPOMOČKI IN MATERIALI	27
3.2	KROMATOGRAFIJA	27
3.3	EKSTRAKCIJA	29
3.3.1	KONTROLNI POSKUS	29
3.3.2	EKSTRAKCIJA RAZISKOVANIH RASTLIN	29
3.3.3	PRIMERJAVA BARVIL PRED EKSTRAKCIJO IN PO NJEJ	31
3.4	pH.....	31
3.5	BARVANJE ŽIVIL.....	31
4	REZULTATI.....	33
4.1	KROMATOGRAFIJA	33
4.2	EKSTRAKCIJA	34
4.3	PRIMERJAVA BARVIL PRED EKSTRAKCIJO IN PO NJEJ	35
4.4	BARVA VODNIH RAZTOPIN	36
4.5	BARVANJE ŽIVIL.....	37
5	RAZPRAVA	41

5.1	POTRDITEV HIPOTEZ.....	41
5.2	UGOTOVITVE.....	41
6	ZAKLJUČEK.....	42
7	POVZETEK.....	42
8	ZAHVALA.....	43
9	VIRI IN LITERATURA.....	43

KAZALO TABEL

Tabela 1: Vsebnosti antocianov v nekaterih živilih	13
Tabela 2: Najbolj pogosti antocianidini in njihove stranske skupine.....	19
Tabela 3: Retenzijski faktorji najpogostejših antocianidinov (aglikonov).....	25
Tabela 4: Količina barvila, dodanega posameznemu živilu.....	32
Tabela 5: Retenzijski faktorji najintenzivnejših lis na mojih kromatogramih; lise predstavljajo skupine antocianov (aglikoni in glukozidi)	34
Tabela 6: Barvne lestvice pri posameznih pH raztopinah	36
Tabela 7: Izmerjen pH.....	37
Tabela 8: Pridobljeni barvni toni v mleku in jogurtu	38
Tabela 9: Obarvanost beljakovih poljubčkov.....	39

KAZALO SLIK

Slika 1: Hrana, bogata z antociani	10
Slika 2: "Indigo Rose" paradižnik.....	14
Slika 3: Črna kuzuza.....	14
Slika 4: Plod aronije.....	15
Slika 5: Grozdne jagode.....	15
Slika 6: Cvet hibiskusa.....	15
Slika 7: Glava rdečega zelja.....	16
Slika 8: Plodovi črnega ribeza.....	16
Slika 9: Črni koren	16
Slika 10: Skeletna formula cianidin aglikona (antocianidin brez vezanega sladkorja) v kislem pH	18
Slika 11: Skeletna formula cianidin-3-glukozida (antocianidin z vezano molekulo sladkorja).....	18
Slika 12: Skeletna formula cianidin-3,5-glukozida (antocianidin z vezanima dvema molekulama sladkorja).....	18
Slika 13: Zgradba antocianidinov s prikazom stranske skupin (R).....	19
Slika 14: Barvni toni različnih antocianidinov	20
Slika 15: Skeletna formula pelargonidina	20
Slika 16: Skeletna formula cianidina	20
Slika 17: Skeletna formula delphinidina.....	21
Slika 18: Skeletna formula poenidina	21
Slika 19: Skeletna formula petunidina	21
Slika 20: Skeletna formula malvidina	22
Slika 21: Primer papirne kromatografije.....	24
Slika 22: Prikaz trenja listov divje trte	28
Slika 23: Razvijanje kromatogramov	28
Slika 24: Obarvana plast heksana	29
Slika 25: Sočenje grozdnega soka preko sokovnika	30
Slika 26: Ekstrakcija rdečega zelja v lij ločniku	30
Slika 27: Kromatogrami pripravkov, bogatih z antociani	33
Slika 28: Rahlo rumeno-zeleno obarvan heksan po ekstrakciji borovničevih tropin.....	35
Slika 29: Ekstrahirane tropine borovnic (levo) in neekstrahirane tropine borovnic (desno).....	35
Slika 30: (od leve proti desni) Črni ribez, črni koren in hibiskus pri pH 7 (levo) in pri pH 3 (desno)	36

Slika 31: Obarvano mleko z barvilom hibiskusa in črnega ribeza	38
Slika 32: Obarvan jogurt z antociani	38
Slika 33: Beljakovi poljubčki, pobarvani z različnimi barvili.....	39
Slika 34: Beljakovi poljubčki, pobarvani z barvilom črni koren.....	40
Slika 35: Beljakovi poljubčki, pobarvani z barvilom črni ribez.....	40

1 UVOD

V razvitem svetu, kjer je hrane dovolj, si ljudje izbiramo hrano, ki nas pritegne že na prvi pogled. Naše oči se pogosto ustavijo na živo pisanih živilih. Tudi sama opažam, da me na policah s sadjem in zelenjavo bolj privlačijo lepo obarvana živila. Zanimalo me je, zakaj so nekatera živila tako zanimivih barv. Odločila sem se, da to raziščem. V okviru raziskovanja sem ugotovila, da so za rdeče-vijolične tone pogosto odgovorna naravna barvila, imenovana antociani.

Ker to ni redna učna snov v osnovni šoli, sem pred začetkom raziskovanja morala preučiti kar nekaj literature, da sem osvojila teoretične osnove.



Slika 1: Hrana, bogata z antociani

(Vir: <http://www.cravebits.com/eat-food-rainbow-colour-healthy>)

1.1 NAMEN

V prehrani se nenehno srečujemo z živili, ki vsebujejo barvila. Velikokrat se za barvanje uporabljajo umetna barvila. Varnost nekaterih umetnih barvil pa je vprašljiva, zato je bilo v zadnjih nekaj letih s seznama dovoljenih barvil umaknjenih že kar nekaj barvil. V prehranski industriji se vedno bolj povečuje zahteva za zamenjavo umetnih živilskih barvil z naravnimi. Zato je bil moj namen dokazati, da lahko s povsem naravnimi barvili živila zelo atraktivno pobarvamo. Izbrala sem si antociane, eno izmed skupin naravnih barvil. So vodotopna barvila v rdeče-modrih tonih.

1.2 HIPOTEZE

Na začetku raziskovanja sem predvidela naslednje hipoteze:

Hipoteza 1: S pomočjo kromatografije bom ločila posamezne antociane.

Hipoteza 2: Pri ekstrakciji s heksanom bo heksan odstranil iz tekočine napolarna barvila (beta-karotene in klorofil) in se pri tem obarval rumeno-zeleno.

Hipoteza 3: Ker so antociani vodotopna barvila, se bodo živila, ki vsebujejo vodo, obarvala.

Hipoteza 4: Pri različnih pH vrednostih bodo antociani spreminjali barvne tone.

2 TEORETIČNI DEL

2.1 ANTOCIANI ali ANTOCIANINI

Antociani ali antocianini so najpomembnejša skupina vodotopnih rastlinskih barvil. Izraz izhaja iz grških besed anthos – cvet in kyanos – črnkasto-moder.

Antociani se nahajajo raztopljeni v vakuolah rastlinskih celic. So brez vonja in okusa. Lahko so rdeče, vijolične ali modre barve, kar je odvisno od pH vrednosti.

Ludwig Clamor Marquart je leta 1835 skoval izraz anthokyan za poimenovanje določene spojine, ki daje cvetovom modro barvo, izraz pa se je kasneje razširil za poimenovanje celotne skupine tovrstnih kemijskih spojin.

Richard Willstätter je pomembno prispeval k sami pojasnitvi kemične strukture antocianov, za kar je leta 1915 prejel Nobelovo nagrado za kemijo.¹

Antocianini so vodotopni pigmenti. Spadajo v razred flavonoidov, ti pa med fenole. Njihova glavna funkcija je priskrbeti barvo predvsem rastlinskim cvetovom in sadju. Barva pomaga privlačiti opraševalce cvetov in živali, ki se prehranjujejo s semeni. Na ta način pomaga pri razmnoževanju rastlin. Antociani pomagajo tudi pri zaščiti listov pred ultravijoličnim sevanjem. Barve, kot so oranžna, rdeča, roza, vijolična in modra, v glavnem temeljijo na antocianih.

2.1.1 PRISOTNOST V NARAVI

Antociani so prisotni samo v rastlinah. Nahajajo se v celicah, natančneje v vakuolah. Običajno so v obliki glikozidov, kar pomeni, da so vezani z molekulo oziroma molekulami sladkorja. Nahajajo se v vseh tkivih višje razvitih rastlin, torej v listih, stebli, koreninah, predvsem pa v cvetovih in sadju.

V živalih in mikroorganizmih antociani niso prisotni. Prav tako tudi ne v vodnih rastlinah, saj je za njihovo biosintezo nujno potrebna fotosinteza. Jakost svetlobe, ki jo rastline prejmejo v vodi, je nezadostna, prav tako je nezadostna tudi produkcija sladkorjev in njihovih derivatov, flavonoidov, ki se pretvorijo v antociane.

¹ Wikipedija prosta enciklopedija

Najpogostejši antociani v naravi so glukozi: cianidina, delfinidina, pelargonidina, malvidina, peonidina, petunidina, rozinidina.

Vse rastline pa ne vsebujejo antocianov, med njimi so na primer kaktusi in pesa.² Te rastline namesto antocianov vsebujejo betalanine. Antocianov in betalaninov nikoli ne najdemo v isti rastlini.

2.1.2 ŽIVILA, BOGATA Z ANTOCIANI

Zelo bogate z antociani so borovnice, brusnice, črne in rdeče maline, robide, črni ribez, aronija, češnje, rdeče grozdje, jajčevci, rdeče zelje, črna koruza, črni riž. V semenskih ovojih črne soje so doslej odkrili največjo količino antocianov (20 mg/g). Zelo visoka koncentracija pa je bila izmerjena tudi v jagodah aronije.²

Tabela 1: Vsebnosti antocianov v nekaterih živilih.^{3, 4, 5, 6, 7}

živilo	količina antocianov (mg/100 g)
črni ribez	190–270
aronija	1480
jajčevec	750
pomaranča	200
robida	317
malina	365
gozdna borovnica	558
češnja	350–400
rdeče grozdje	888
rdeče vino	24–35
vijolična koruza	1642

² Clifford, M. 2000. Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden.

³ Wu X. s sod.. 2004. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity.

⁴ Siriwoharn T. s sod. 2004. Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (Rubus L. Hybrids) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties.

⁵ Hosseinian, F.S., Beta, T. 2007. Saskatoon and wild blueberries have higher anthocyanin contents than other Manitoba berries.

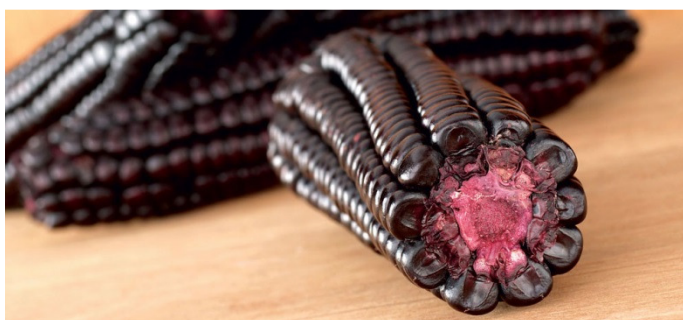
⁶ Muñoz-Espada A.C. s sod. 2004. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch grapes and wines.

⁷ Lieberman, S. 2007. The antioxidant power of purple corn: a research review.

Strokovnjaki so s pomočjo selekcije in genskega inženiringa razvili že celo vrsto novih, neobičajnih vrst rastlin s povečano vsebnostjo antocianinov. Taki so na primer krompir z modrim in rdečim mesom, vijolični brokoli, cvetača, korenje, koruza in črn "Indigo Rose" paradižnik. Ker antociani delujejo tudi kot antioksidanti, ima zaradi visoke vsebnosti antocianov tak paradižnik kar dvakrat daljšo življenjsko dobo od običajnega.



Slika 2: "Indigo Rose" paradižnik (Vir: Wikipedija)



Slika 3: Črna koruza (Vir: Wikipedija)

Antociane se lahko doda kot barvilo različnim živilom, kot so marmelada, sladoled, sadni želeji in druge slaščice. Tako se jih lahko obravnava tudi kot aditive. Njihovo aditivno število je E 163.

Aronija (E163)



Slika 4: Plod aronije (Vir: Wikipedija)

Sok aronije je naravno barvilo, ki se dandanes široko uporablja v živilski industriji. Aronija je grm, ki spada v rod rožnic in izvira iz vzhoda Severne Amerike. Aronija ima temno modre plodove z zelo dobrimi antioksidativnimi lastnostmi. Sok, pridobljen iz jagod aronije, je intenzivne rdeče-vijolične barve.

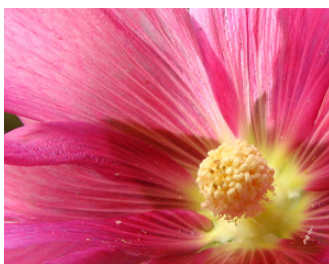
Rdeče grozdje (E163i)



Slika 5: Grozdne jagode (Vir: Wikipedija)

Sok rdečega grozdja je zelo bogat z antocianini, barvni ton soka pa je zelo odvisen od pH.

Hibiskus (E163)



Slika 6: Cvet hibiskusa (Vir: Wikipedija)

Ekstrakt hibiskusa vsebuje največ antocianinov cianidina in delfinidina ter nam daje rdeče do vijolične odtenke.

Rdeče zelje (E163)



Slika 7: Glava rdečega zelja (Vir: Wikipedija)

Rdeče zelje raste predvsem v severnem delu Evrope in v Aziji. Antociani tega zelja spadajo med najbolj stabilne, zato se veliko uporabljajo v živilski industriji.

Črni ribez (E163)



Slika 8: Plodovi črnega ribeza (Vir: Wikipedija)

Črni ribez uvrščamo med jagodičaste sadne vrste. Plodovi so v grozd združene jagode (grozdičje), sok pa je bogat z antociani. Pogosto ga najdemo na naših vrtovih.

Črni koren (E163)



Slika 9: Črni koren (Vir: Wikipedija)

Črni oz. vijolični koren je bogat izvor antocianov, ki se pogosto uporablja v živilski industriji za barvanje hrane in pijače. Raste predvsem na jugu Evrope in v Aziji. Barvna lestvica gre iz rdeče preko vijolične do modre. Je zelo stabilen v širokem območju pH, zato je idealen za uporabo v jogurtih in mlečnih proizvodih.

2.1.3 NALOGE ANTOCIANOV

Antociani v cvetovih so zelo pomembni za privabljanje žuželk. Antociani s svojimi živimi barvami intenzivno obarvajo cvetove. Tako privlačijo opraševalce in s tem poskrbijo za opraševanje (zoofilijo). Prav tako lepo obarvano sadje pritegne pozornost živali in s tem pomaga pri raznašanju semen (zoohorija). Antociani na ta način pomagajo pri ohranjanju in širjenju rastlin.

Po drugi strani pa naj bi rdeče obarvani listi odbijali določene živalske vrste. Tako se na primer kalifornijske listne uši, ki rade kolonizirajo na rumeno-oranžnih listih pahljačastega javorja, izogibajo drevesom iste vrste, ki ima rdeče liste.^{8,9}

Antociani v listih opravljajo tudi nekakšno funkcijo "senčnika". Celice v listih ščitijo pred povzročanjem škode zaradi premočne svetlobe. Absorbirajo modro-zeleno in ultravijolično svetlobo ter tako ščitijo tkiva.⁸

Antociani so poleg tega tudi močni antioksidanti.⁸

2.1.4 KEMIJSKA STRUKTURA

Antociani so glikozidi antocianidinov in derivati antocianidinov, pri čemer je na alkoholno skupino vezan določen sladkor.

Antociani so sestavljeni iz antocianidov in vezanih sladkornih enot, ki so navadno 3-glikozidi. Nekateri antociani pa obstajajo v prosti obliki, torej nimajo vezanega sladkorja. Tako delimo antociane v dve večji skupini:

- antocianidni aglikone, ki nimajo vezanega sladkorja
- antocianski glukozidi, ki imajo vezane molekulo/molekule sladkorja

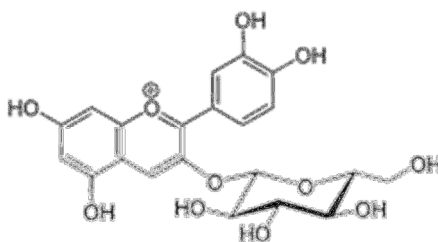
Poznanih je že okoli 600 različnih antocianov, ki se med seboj razlikujejo v kemijski strukturi.¹⁰

⁸ Gould, K.S. 2004. The Diverse Protective Roles of Anthocyanins in Leaves.

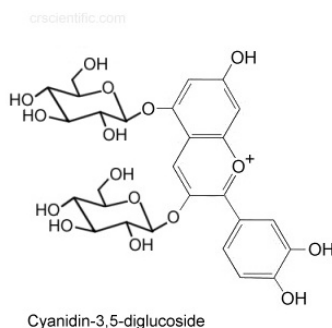
⁹ Sullivan, J. 1998. Anthocyanin.



Slika 10: Skeletna formula cianidin aglikona (antocianidin brez vezanega sladkorja) v kislem pH
(Vir: Wikipedija)



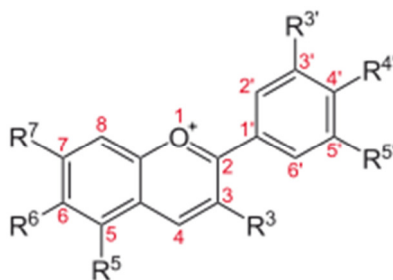
Slika 11: Skeletna formula cianidin-3-glukozida (antocianidin z vezano molekulo sladkorja)
(Vir: Wikipedija)



Slika 12: Skeletna formula cianidin-3,5-glukozida (antocianidin z vezanima dvema molekulama sladkorja)
(Vir: Wikipedija)

Kljub velikemu številu antocianov pa jih kar 90 % izhaja iz šestih najbolj pogostih antocianidinov: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina in malvidina.

¹⁰ He, J., Giusti, M. 2010. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties.



Slika 13: Zgradba antocianidinov s prikazom stranske skupin (R)
(Vir: Wikipedija)

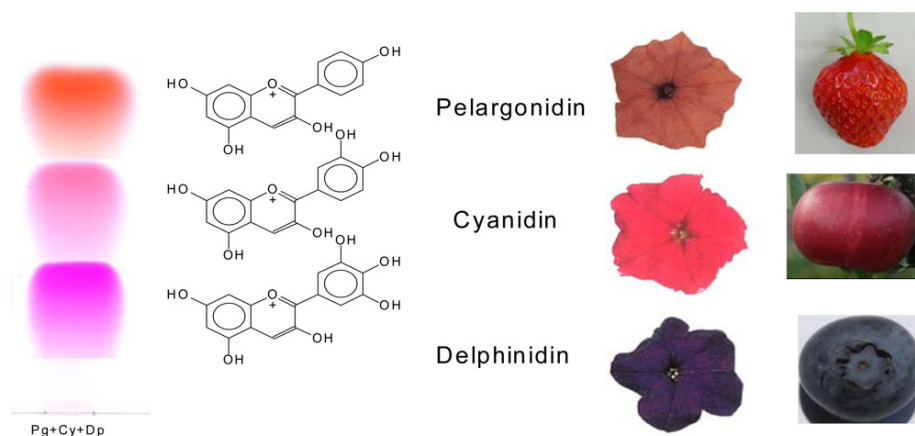
Tabela 2: Najbolj pogosti antocianidini in njihove stranske skupine¹¹

antocianidini	R ^{3'}	R ^{4'}	R ^{5'}	R ³	R ⁵	R ⁶	R ⁷
cianidin	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
delfinidin	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
pelargonidin	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
malvidin	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
peonidin	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
petunidin	-OH	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH

Iz tabele je razvidno, da imajo antocianidini na tretjem ogljikovem atomu navadno vezano hidroksilno skupino. Nanjo se molekule sladkorja preko kisikove vezi vežejo na določeni antocianidin. V vlogi monosaharidov lahko nastopajo glukoza, galaktoza, arabinoza, ramnoza ter ksiloza. Omenjeni sladkorji se lahko povežejo skupaj v različnih kombinacijah v di- ali tri-saharide. Vezani sladkorji dajejo molekulam antocianov večjo topnost, kar je pomembno pri prenosu oziroma transportu v različne dele rastline, in za večjo stabilnost antocianov.¹²

¹¹ Wikipedija proste enciklopedije

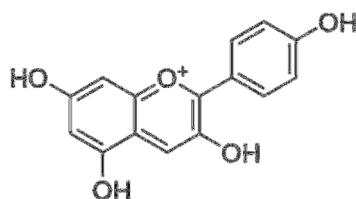
¹² Bayer, E. 1996. Komplexbildung und Blütenfarbe.



Slika 14: Barvni toni različnih antocianidinov¹³

Pelargonidin (oranžni toni)

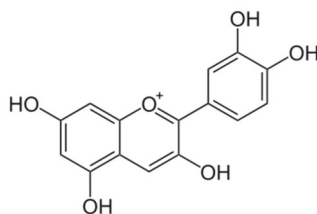
Pelargonidin se nahaja v jagodičevju, predvsem v jagodah in malinah pa tudi v borovnicah, robidah in brusnicah. Daje značilno barvo cvetovom pelargonij in kurje češnjice.



Slika 15: Skeletna formula pelargonidina (Vir: Wikipedija)

Cianidin (roza rdeči toni)

Cianidin se nahaja predvsem v rdečih jagodah grozdja, češenj, brusnic, jagodah acai, malinah, borovnicah, robidah, jagodah bezga, rdečem ribezu in šipku, manj pa v jabolkih in slivah ter rdečem zelju in rdeči čebuli.

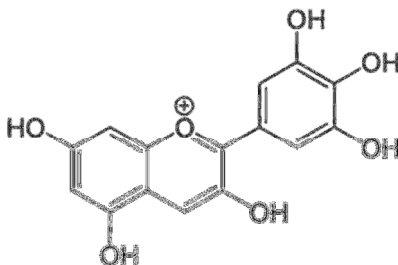


Slika 16: Skeletna formula cianidina (Vir: Wikipedija)

¹³ Halbwirth, H. 2010. The Creation and Physiological Relevance of Divergent Hydroxylation Patterns in the Flavonoid Pathway.

Delfinidin (modri in rdeči toni)

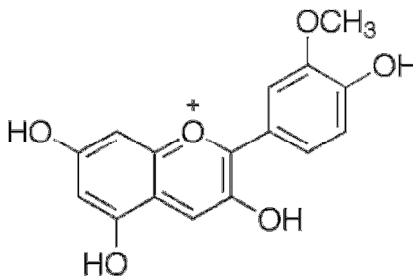
Delfinidin se nahaja v rdečem grozdju, brusnicah, črnem ribezu, borovnicah, soku rdečih pomaranč. Daje značilno modro barvo cvetovom ostrožnika.



Slika 17: Skeletna formula delfinidina (Vir: Wikipedija)

Peonidin

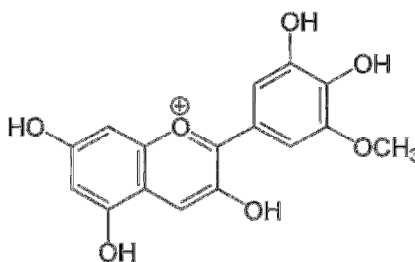
Peonidin se nahaja v cvetovih vrtnic. Najdemo ga tudi v nekaterem sadju, borovnicah, slivah, grozdju, češnjah in v brusnicah (v relativno visokih koncentracijah). Daje značilno roza-rdečo barvo peonijam (peony), po katerih je dobil tudi ime.



Slika 18: Skeletna formula poenidina (Vir: Wikipedija)

Petunidin

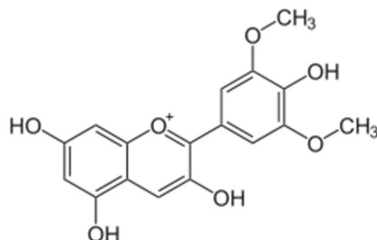
Petunidin se nahaja v aroniah in mnogih vrstah rdečega grozdja. Odgovoren je za skoraj črno barvo "Indigo Rose" paradižnika.



Slika 19: Skeletna formula petunidina (Vir: Wikipedija)

Malvidin

Malvidin se nahaja v jagodah aronije. Cvetovom trobentic daje modre tone, vinu pa rdečo barvo.



Slika 20: Skeletna formula malvidina (Vir: Wikipedija)

2.1.5 STABILNOST

Stabilnost antocianov je odvisna od različnih fizikalno-kemijskih dejavnikov. Na stabilnost antocianov vplivajo temperatura, pH vrednost, svetloba (predvsem UV), količina kisika in količina kovinskih ionov. Vse to vpliva tudi na barvo antocianov.¹⁴

Antociani so občutljivi na temperaturo. Povišanje le te lahko vodi do razpada flavonijevega iona, ta pa do razbarvanja. Prav tako lahko antociane uničita prisotnost kisika in vitamina C, saj lahko molekule oksidirajo.

2.1.6 UPORABA

Antocianini so vodotopna naravna barvila. Najdemo jih tako v sadju in zelenjavi kakor tudi v cvetovih, koreninah in listih rastlin. Uporaba antocianov sega že daleč v zgodovino; prav tako jih tudi ljudje uživamo že od nekdaj. Dandanes se kot barvilo najpogosteje uporabljajo ekstrakti bezga in aronije (E163), grozdnih kožic (E163(i)) in črnega ribeza (E163(iii)).

V prehrambeni industriji se vedno bolj povečuje zahteva za zamenjavo umetnih živilskih barvil z naravnimi. Varnost vsaj nekaterih umetnih je namreč zelo vprašljiva. V zadnjih nekaj letih jih je bilo zaradi tega s seznama dovoljenih umaknjenih že kar nekaj.

¹⁴ Andersen, M., Jordheim, M. 2008. Anthocyanins- food applications.

Antociani so s svojo veliko paleto oranžno-rdeče-roza-vijolično-modrih barvnih tonov in z ugodnimi zdravstvenimi učinki v zadnjih letih tako vedno bolj v ospredju kot ustrezna zamenjava umetnim barvilom. Uporabljajo se za obarvanje sokov, marmelad in drugih živil. Zaradi vodotopnosti je njihova uporaba omejena na živila, ki vsebujejo dosti vode.¹⁵

Antociani naj bi imeli ugodni učinek na zdravljenje oziroma blaženje nekaterih bolezni in stanj, kot so rakasta obolenja, nevrodegenerativne bolezni, sladkorna, bakterijske okužbe, srčno-žilne bolezni, debelost, staranje in vnetja.^{16, 17}

Rastline z visokimi deležem antocianov so zaradi intenzivno obarvanih cvetov zelo popularne kot okrasne rastline.

Zaradi sposobnosti absorbiranja svetlobe in pretvorbe v elektrone potekajo raziskave za uporabo pigmentov v sončnih celicah.^{18, 19}

2.2 KROMATOGRAFIJA

S kromatografijo ločujemo in čistimo trdne, tekoče in plinaste spojine. Pri kromatografiji vedno nastopata dve fazi. Ena je stacionarna (mirujoča), druga pa mobilna (gibljiva) faza. Spojine potujejo z mobilno fazo glede na to, kako dobro se v njej raztapljajo. Pri svojem potovanju pa se porazdelijo med obe fazi.

Za uporabo v kemijskih analiznih laboratorijih so razvili veliko število kromatografskih tehnik in inštrumentov. V šoli najpogosteje uporabljamo papirno kromatografijo.

Glede na stacionarne faze razlikujemo:

- kolonsko kromatografijo; stacionarna faza je v koloni – primerne oblike in velikosti
- tankoplastno kromatografijo; stacionarna faza je nanešena na stekleno, kovinsko ali plastično ploščo
- papirno kromatografijo; zmes se ločuje s potovanjem mobilne faze po poroznem papirju

¹⁵ Giusti M., Wrolstad, R. 2003. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems.

¹⁶ Garzon G. 2009. Anthocyanins As Natural Colorants And Bioactive Compounds.

¹⁷ Ghiselli A. s sod. 1998. Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated From an Italian Red Wine.

¹⁸ Cherepy, N.J. s sod. 1997. Ultrafast Electron Injection.

¹⁹ Grätzel, M. 2003. Dye-sensitized solar cells.

Kromatografske tehnike uporabljamo za:

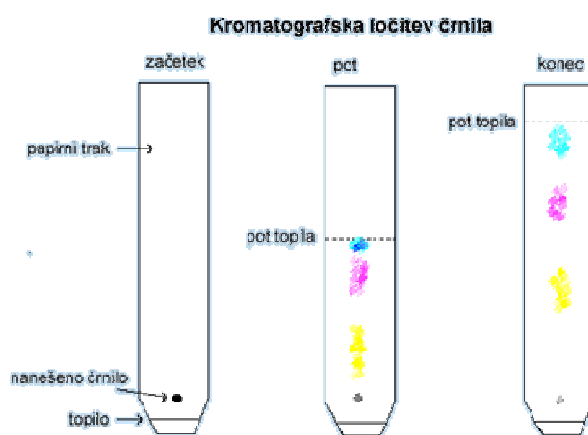
- ugotavljanje čistosti in prepoznavanje spojin
- preverjanje uspešnosti postopkov izolacije in čiščenja spojin
- ločevanje zmesi, ki jih ni mogoče ločiti z ostalimi metodami, kot so: kristalizacija, destilacija, sublimacija in podobno.²⁰

2.2.1 PAPIRNA KROMATOGRAFIJA

Pri papirnati kromatografiji se zmes loči na sestavine zaradi njihove različne topnosti v topilu in njihove različne mase. Snov – ekstrakt, ki ga ločujemo, potuje po papirju skupaj s topilom z različno hitrostjo. Ekstrakt, ki je obarvan, pusti na papirju obarvane sledi. Topilo torej predstavlja mobilno fazo, ki »vleče« s seboj komponente, ki jih želimo ločiti.²¹

Zaradi kapilarnega učinka se topilo dviga po papirju in s seboj nosi tudi barvila, ki pa zaostanejo za fronto topila. Barvilo, ki se močneje veže, tj. adsorbira na papir, se tudi težje desorbira in zato bolj zaostane kot barvilo, ki se bolj šibko adsorbira.²²

Razviti kromatogram nam prikaže vrste prisotnih barvil v ekstraktu vzorca, ocenimo pa lahko tudi približno količino prisotnih barvil.²¹



Slika 21: Primer papirne kromatografije (Vir: Slovenski kemijski portal Kemija.org)

²⁰ Boh. B. s sod. 2000. Barvila in naravna barvila, Učbenik za izbirne vsebine kemije.

²¹ Zeba, K., Zibelnik, N. 2013. Uporaba kromatografije in spektrometrije.

²² Bohinc, N. 2015. Barve v kemiji.

2.2.2 RETENZIJSKI FAKTOR

Na razvitem kromatogramu posameznim lisam opredelimo položaj z zadrževalnim faktorjem (retenzijskim faktorjem – Rf). Pri popolnoma enakih pogojih ima spojina značilen in vedno enak retenzijski faktor.

Retenzijski faktor določimo tako, da razdaljo od začetne črte do središča lise delimo z razdaljo, ki jo prepotuje topilo med začetno črto in fronto.

$$Rf = \frac{\text{razdalja, ki jo je prepotovalo barvilo (središče lise)}}{\text{razdalja, ki jo je prepotovalo topilo}} \quad (1)$$

Čeprav je retenzijski faktor za določeno kombinacijo konstanten, je v praksi težko ponovljiv.²³

Tabela 3: Retenzijski faktorji najpogostejših antocianidinov (aglikonov)²⁴

antocianidin	Rf
delfinidin	0,30
petunidin	0,45
cianidin	0,56
malvidin	0,60
peonidin	0,63
pelargonidin	0,68

2.3 EKSTRAKCIJA

Ekstrakcija je metoda, s katero izvlečemo zelene snovi iz trdne zmesi ali raztopine. Pri ekstrakciji antocianov moramo uporabiti polarna topila, saj so antociani vodotopni. Glede na to, ali ekstrahiramo iz trdne zmesi ali iz raztopine, ločimo dve skupini ekstrakcijskih postopkov:

²³ Boh. B. s sod. 2000. Barvila in naravna barvila, Učbenik za izbirne vsebine kemije.

²⁴ Ahmedullah, M. 1953. Identification of anthocyanidin pigments in three varieties of pelargonium hortorum by chromatographic and jspectrophotometric methods.

- ekstrakcija trdno-tekoče; temelji na različni topnosti v danem topilu
- ekstrakcija tekoče-tekoče; temelji na različni topnosti komponent zmesi v dveh topilih

V ekstrakcijskem topilu je pogosto topnih več spojin, zato moramo za izolacijo čistih uporabiti še dodatne postopke ločevanja in čiščenja.²⁵

2.4 pH

pH je merilo za koncentracijo hidroksidnih ionov v raztopini in s tem posledično za njeno kislost ali bazičnost. Pojem pH je uvedel danski kemik Søren Peder Lauritz Sørensen. Kratica pH je zložena iz »potenz« (nemško potenca) in kemijske oznake za vodik, H:

Faktor pH je definiran kot:

$$\text{pH} = -\log_{10} [\text{H}_3\text{O}^+]$$

Pri tem je $[\text{H}_3\text{O}^+]$ molarna koncentracija oksonijevih ionov (pogosto zapisano tudi $[\text{H}^+]$)²⁶. pH se navadno izraža kot brezrazsežno število med 0 in 14. Raztopine s pH, manjšim od 7, so kisle, pri 7 nevtralne in nad 7 bazične.

²⁵ Boh, B. s sod. 2000. Barvila in naravna barvila, Učbenik za izbirne vsebine kemije.

²⁶ Wikipedije, proste enciklopedije

3 EKSPERIMENTALNI DEL

3.1 PRIPOMOČKI IN MATERIALI

Pri raziskovanju sem uporabila več različnih pripomočkov in laboratorijski pribor:

- pri kromatografiji: kromatografski papir, epruvete, stojalo za epruvete, kapalke, parafilm, kapilare, tanko žičko, steklene kapilare
- pri filtriranju: lijake, filtrirni papir, stojala za lijake, čaše
- pri ekstrakciji: lij ločnik, merilne valje, stojalo za lij ločnik
- pri merjenju pH vrtnosti: pH indikatorski lističi (območje 4,5–9 Detox pH strips)
- rastline: cvetovi pelargonij, vrtnic in hibiskusa, listi divje trte, plodovi gozdnih borovnic, črnega ribeza in aronije, glavo rdečega zelja in grozdje

3.2 KROMATOGRAFIJA

Za poskuse sem izbrala rastline, za katere sem iz literature izvedela, da so bogate z antociani oziroma tiste, ki so rdeče barve. Poiskala sem:

- cvetove pelargonij
- cvetove vrtnic
- cvetove hibiskusa
- liste divje trte
- plodove gozdnih borovnic
- plodove črnega ribeza
- plodove aronije
- glavo rdečega zelja
- grozdje

V terilnici sem strla zgoraj omenjene dele rastlin in tako pridobila nekaj kapljic tekočine. S kapilaro sem tekočino nanesla na kromatografski papir. V literaturi sem našla podatek, katera topila so primerna, zato sem izbrala mešanico topil butanol/voda/ocetna kislina/etanol (v razmerju 5:4:1:1).²⁷

²⁷Aksamit-Stachurska et al. BMC Biotechnology 2008



Slika 22: Prikaz trenja listov divje trte (Foto: A. Gril)

S pomočjo kromatografije sem se želela prepričati, da je v rastlinah, ki sem jih izbrala, prisotnih več različnih antocianov.

Uporabila sem kromatografski papir, dimenzij 150 mm x 7 mm. Na kromatografskem papirju sem narahlo s svinčnikom narisala dve črti. 13 mm nad spodnjim robom sem narisala črto, na katero sem s kapilaro nanese barvilo. 15 mm pod zgornjim robom pa črto, do katere sem nato pustila potovati topilo. V epruveto sem s kapalko dodala 1 ml topila. Kromatografski papir sem obesila tako, da je bil spodnji rob namočen v topilo, ki je potovalo do zgornje črte. Nato sem kromatografski papir vzela iz epruvete in ga na zraku posušila.

S kromatogramov je bilo razvidno, da so antociani velika skupina, ki se med seboj razlikujejo v kemijski strukturi. Kromatogrami uporabljenih delov rastlin so si bili po eni strani podobni, a hkrati tudi različni. Pri vseh je barvilo potovalo iz izhodišča in se med potjo ločevalo v posamezne barvne lise, hkrati pa so se pojavljala različno intenzivna obarvanja na različnih delih.

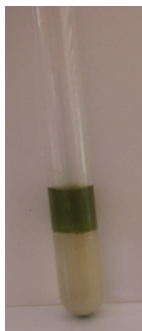


Slika 23: Razvijanje kromatogramov (Foto: A. Gril)

3.3 EKSTRAKCIJA

3.3.1 KONTROLNI POSKUS

Heksan sem izbrala za ekstrakcijo, ker ni strupen. Je nepolarno topilo in tako pri ekstrakciji iz tekočine ekstrahira beta-karotene in klorofil. Da bi se prepričala, da je ta metoda primerna in da heksan iz tekočine res »potegne« beta-karotene in klorofil, sem naredila kontrolni poskus. Uporabila sem korenček in špinačo, ki sem ju skuhalo in pretlačila. Pridobljeni kaši sem dodala malo vode. Vsebino sem prefiltrirala preko filtrnega papirja. S pomočjo merilnega valja sem v lij ločnik prenesla 50 ml obarvane raztopine in dodala 5 ml heksana. Vsebino sem močno pretresla, nato pa lij ločnik postavila v stojalo. Počakala sem, da so se plasti med seboj ločile. Na vrhu se je nabrala plast heksana, ki se je obarval rumeno-zeleno. Tako sem se prepričala, da ekstrakcija s heksanom ekstrahira nepolarne beta-karotene in klorofil.



Slika 24: Obarvana plast heksana (Foto: A. Gril).

3.3.2 EKSTRAKCIJA RAZISKOVANIH RASTLIN

Vzela sem 5 čajnih vrečk (1001 cvet, Žito d. d.) 2 g cvetov hibiskusa. Da sem pridobila barvilo, sem cvetove najprej prelila z 2 dl vroče vode. Tako sem pridobila 2 dl močno rdeče obarvanega čaja, bogatega z antociani.

Glavo (2,3 kg) rdečega zelja sem narezala in zmiksala. Polovico zelja sem tudi skuhalo s 5 dl vode. Surovo in kuhano zelje sem stisnila in pridobila vijolično tekočino.

S pomočjo sokovnika sem iz domačega rdečega grozdja sorte jurka, črnega ribeza in plodov aronije pridobila sok.



Slika 25: Sočenje grozdnega soka preko sokovnika (Foto: A. Gril)

Glavo (2,3 kg) rdečega zelja sem narezala in zmiksala. Polovico zelja sem tudi skuhala s 5 dl vode. Surovo in kuhano zelje sem stisnila in pridobila vijolično tekočino.

400 g zmrznjenih gozdnih borovnic sem odtalila in jih nato stisnila. Tako sem pridobila vijolično tekočino, bogato z antociani. Pridobljeno tekočino sem prefiltrirala preko filtrnega papirja, da sem odstranila večje delce. Tropine borovnic (50 ml), ki so ostale od stiskanja, sem zmiksala. Prelila sem jih s 50 ml vode in jih pustila namakati 3 ure, nato sem tropine stisnila in borovničevo tekočino še prefiltrirala preko filtrnega papirja.

Da sem odstranila vse večje delce, sem vse pridobljene tekočine prefiltrirala preko filtrnega papirja. Ker sem želela odstraniti morebitno prisotnost drugih barvil, na primer beta-karotene in klorofil, sem vse tekočine ekstrahirala s heksanom. S pomočjo merilnega valja sem v lij ločnik prenesla 50 ml prefiltriranih pridobljenih tekočin in dodala 5 ml heksana.

Vsebino sem močno pretresla, nato pa lij ločnik postavila v stojalo. Počakala sem, da so se plasti med seboj ločile.



Slika 26: Ekstrakcija rdečega zelja v lij ločniku (Foto: A. Gril)

Ekstrakta črnega korena nisem pripravila sama, ker se v naših krajih ne dobi, so mi pa ekstrakt podarili v podjetju Frutarom Etol d. o. o.

3.3.3 PRIMERJAVA BARVIL PRED EKSTRAKCIJO IN PO NJEJ

Po končani ekstrakciji sem naredila še primerjave med barvilom pred in po ekstrakciji. V epruvete sem s pomočjo kapalke iz merilnega valja prenesla 6 ml vode. V eno epruveto sem dala 0,5 ml barvila, ki ni bil ekstrahiran, v drugo pa 0,5 ml ekstrakta barvila. Vse sem pretresla. Nato sem barvili primerjala.

3.4 pH

Za antociane je značilno, da so njihovi toni močno odvisni od pH vrednosti medija. Tako sem želela preveriti, kako se antociani obnašajo v medijih z različnimi pH vrednostmi.

Podjetje Frutarom Etol d. o. o. sem prosila za pomoč. Priskrbeli so mi vode različnih kislosti: pH 2, pH 3, pH 4, pH 5 in nevtralen pH 7, torej kislosti, primerljive s kislostjo živil. Bazičnih (pH > 7) nisem testirala, saj sem se pri nalogi osredotočila na barvanje živil.

Za testiranje spremembe barvnih tonov v odvisnosti od pH vrednosti sem uporabila ekstrakte, pridobljene v predhodnih postopkih, ko sem iz različnih delov rastlin pridobila raztopine antocianov. Tako sem uporabila ekstrakte hibiskusa, črnega ribeza, grozdja, aronije, rdečega zelja in črnega korena.

Z omenjenimi ekstrakti sem pripravila barvno lestvico.

V 1 dl vode določene kislosti sem dodala 2 ml barvila, pridobljenega pri ekstrakciji. Opazovala sem spremembo barvnih tonov.

3.5 BARVANJE ŽIVIL

Za testiranje prej pridobljenih barvil sem izbrala živila, ki vsebujejo dovolj vode, da lahko v njih raztopimo antociane. Iz skupine tistih, ki vsebujejo dovolj vode, sem izbrala taka, ki imajo različne pH vrednosti. Tako sem lahko opazovala, katere barvne tone uspešno dobiti pri posameznem živilu. Na osnovi literature sem se odločila za jogurt, mleko in jajčni beljak.

pH vrednosti omenjenih živil sem izmerila s pH lističi, merilnega območja pH 4,5–9. pH lističe so mi podarili v podjetju Frutarom Etol d. o. o.

V 1 dl jogurta sem dodala 2 ml posameznega ekstrakta. Premešala sem in dobila lepo obarvan jogurt. Ekstrakt jogurtu ni dal vonja ali okusa, ampak le barvo. Posamezni ekstrakti so zaradi kislosti jogurta dajali različne odtenke rožnate barve.

V 1 dl mleka sem dodala 2 ml ekstrakta. Premešala sem in dobila lepo obarvano mleko. Ekstrakt mleku ni dal vonja ali okusa, ampak le barvo. Posamezni ekstrakti so »nevtralno« mleko obarvali v odtenkih modro-vijolične.

Vzela sem dva jajčna beljaka in dodala 100 g sladkorja. Vse skupaj sem zmiksala, da sem dobila homogeno maso.

Maso sem razdelila na dva enaka dela. En del sem pustila nespremenjen, drugega pa sem okisala z 1 ml sveže stisnjene limoninega soka in dobro premešala, da sem dobila homogeno maso. Tako sem dobila dve osnovi za izdelavo beljakovih poljubčkov z različnima pH vrednostma. Ugotoviti sem želela, kako bo pH vplival na barvo in stabilnost.

Vsako izmed mas za beljakove poljubčke sem razdelila na 6 delov. Vsakemu delu sem dodala 2 ml posameznega ekstrakta in barvilo enakomerno vmešala v maso. Pobarvane poljubčke sem dala na pladenj, obložen s peki papirjem, in pekla 3 ure pri 60 °C. Enako sem naredila z neokisanimi in okisanimi beljakovimi poljubčki.

Tabela 4: Količina barvila, dodanega posameznemu živilu

živilo	količina dodanega barvila (ml)			
	na 1 dl jogurta	na 1 dl mleka	na 1 jajčni beljak	na 1 jajčni beljak okisan*
črni ribez	2	2	2	2
kuhano rdeče zelje	10	10	10	10
črni koren	2	2	2	2
aronija	2	2	2	2
hibiskus cvet	2	2	2	2
rdeče grozdje	2	2	2	2

*okisan jajčni beljak (na 1 beljak 1 ml limoninega soka)

Ker sem želela primerjati barvne tone posameznih obarvanih živil, je morala biti primerljiva tudi jakost barve. Pripravek rdečega zelja je bil nekoliko šibkejši od ostalih, zato sem ga živilom dodala nekoliko več.

4 REZULTATI

4.1 KROMATOGRAFIJA

Pri kromatografiji so se barvila ločila po posameznih lisah. Pojavili so se pasovi različnih odtenkov roza-rdečih in modro-vijoličnih tonov. Toni so bili različno intenzivni.

Pri črnem ribezu sem opazila v osrednjem delu roza-rdečo, vijolično in modro barvo.

Pri grozdju se v začetnem delu pojavlja vinsko-rdeča barva.

Pri zelju je najintenzivnejša lisa v končnem delu. Barvni toni obsegajo roza-vijolično do vijolično-modro barvo.

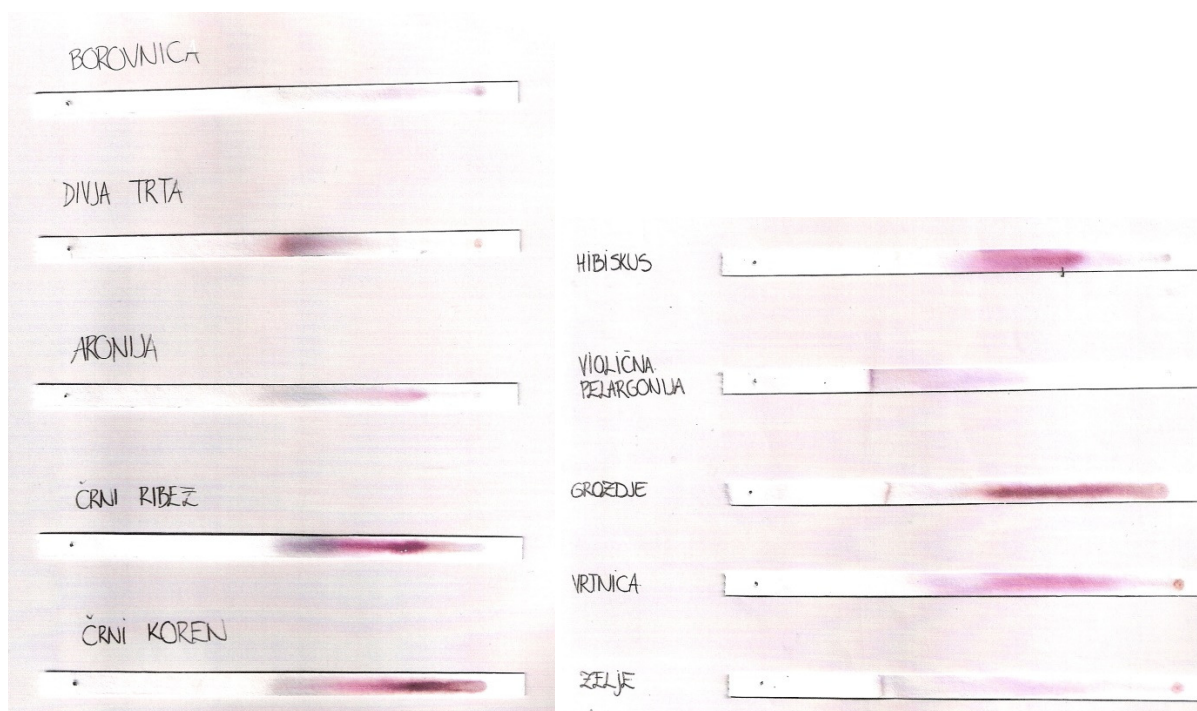
Pri vrtnici najdemo v osrednjem delu liso roza barve.

Pri vijolični pelargoniji se v končnem delu pojavljajo vijolično-modri toni.

Pri aroniji v osrednjem delu prevladuje roza-vijolično barva.

Listi divje trte imajo v osrednjem delu liso modro-vijolične barve.

Pri borovnici najdemo v začetnem in osrednjem delu lise vijolično-modre barve.



Slika 27: Kromatogrami pripravkov, bogatih z antociani (Foto: A. Gril)

Tabela 5: Retenzijski faktorji najintenzivnejših lis na mojih kromatogramih; lise predstavljajo skupine antocianov (aglikoni in glukozidi)

živilo	glavna lisa		dodatna lisa	
	Rf	barvni ton	Rf	barvni ton
črni ribez	0,19	roza-vijoličen	0,44	moder
rdeče zelje	0,35	rahlo roza-vijoličen		
divja trta	0,48	sivo-moder		
črni koren	0,17	temno vijoličen	0,35	roza-vijoličen
borovnica	0,09	temno vijoličen	0,44	roza
cvet pelargonije	0,52	vijoličen		
aronija	0,17	roza-vijoličen	0,48	sivo-moder
hibiskus cvet	0,26	intenzivno roza-vijoličen		
rdeče grozdje	0,39	vinsko rdeč		
cvet vrtnice	0,48	roza-vijoličen		

4.2 EKSTRAKCIJA

Proces ekstrakcije s heksanom sem želela uporabiti za čiščenje in na ta način pripraviti barvila, ki bi vsebovala izključno antociane. Ker so antociani vodotopni, sem s pomočjo heksana lahko iz tekočine odvzela nepolarne beta-karotene in klorofil. Pričakovala sem, da se nekaj nepolarnih barvil nahaja v vseh pripravljenih »antocianskih« pripravkih. Izkazalo se je, da jih v večini pripravkov sploh ni oziroma so v tako majhnih količinah, da obarvanosti heksana ni možno zaznati. V večini primerov sem dobila vodno raztopino antocianov, plast emulzije in plast heksana, ki pa se ni obarvala. Izjema je bil pripravek pridobljen iz zmiksanih in namočenih borovničevih tropin. V tem primeru se je heksan obarval rumeno-zeleno.



Slika 28: Rahlo rumeno-zeleno obarvan heksan po ekstrakciji borovničevih tropin (Foto: A. Gril)

Pri ekstrakciji hibiskusa, grozdja, rdečega zelja, črnega ribeza, aronije in borovnic se pripravljeno »antociansko« barvilo pred in po ekstrakciji s heksanom ni kaj dosti spremenilo. To je logično, saj se heksan ni obarval, torej razen antocianov v pripravku praktično ni drugih barvil. To pomeni, da barvil, pridobljenih iz teh živil, ne bi bilo potrebno ekstrahirati, saj v njih ni prisotnih beta-karoteni in klorofila, barvilo pa ima pred in po ekstrakciji praktično enak ton.

4.3 PRIMERJAVA BARVIL PRED EKSTRAKCIJO IN PO NJEJ

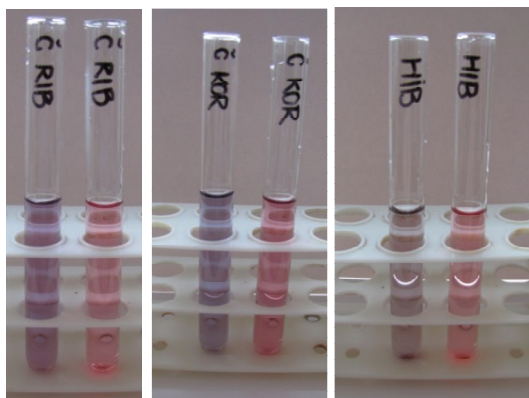
Ugotovila sem, da se barvni odtenek ne spremeni pri aronji, rdečem zelju, grozdju, črnem ribezu, hibiskusu in borovničevem soku. Barvni ton se je spremenil pri barvilu, pridobljenem iz namočenih borovničevih tropin. Iz rdeče je prešel v rdeče-vijolično, kar je posledica ekstrakcije rumeno-zelenih tonov, ki jih dajejo beta-karoteni in klorofil; s pomočjo ekstrakcije s heksanom sem jih odstranila iz tekočine.



Slika 29: Ekstrahirane tropine borovnic (levo) in neekstrahirane tropine borovnic (desno) (Foto: A. Gril)

4.4 BARVA VODNIH RAZTOPIN

V kislem so bile vse raztopine intenzivno rdeče, v bolj nevtralnem (pri višjem pH) pa so barvni toni prehajali v bolj vijolične odtenke.

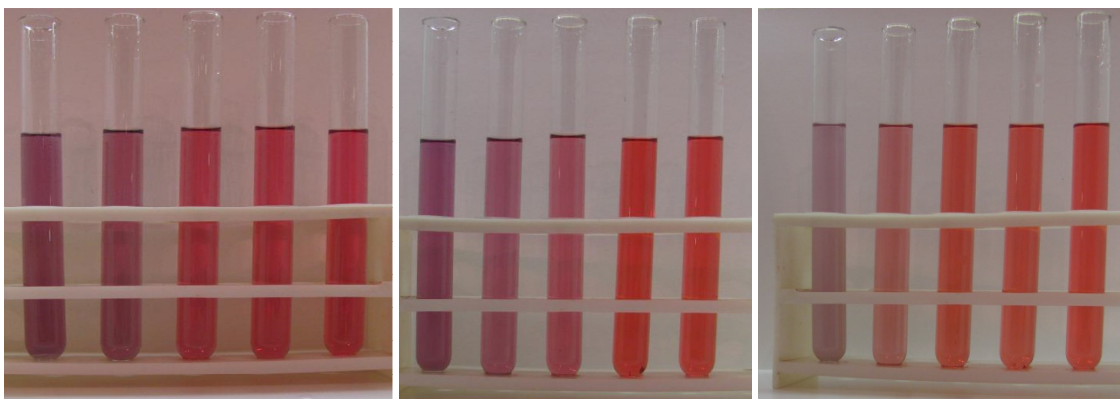


Slika 30: (od leve proti desni) Črni ribez, črni koren in hibiskus pri pH 7 (levo) in pri pH 3 (desno)

(Foto: A. Gril)

Tabela 6: Barvne lestvice pri posameznih pH raztopinah

barvilo	pH 2	pH 3	pH 4	pH5	pH 7
črni koren	intenzivno rdeča	rdeča	rdeče-vijolična	vijolična	intenzivno vijolična
kuhano rdeče zelje	roza-oranžna	roza-rdeča	svetlo vijolična	svetlo vijolična	svetlo vijolična
črni ribez	rdeča	rdeča	roza-vijolična	vijolična	intenzivno vijolična
aronija	Intenzivno rdeča	rdeča	rdeča	roza-vinsko rdeča	vinsko rdeče-vijolična
hibiskus cvet	intenzivno rdeča	živo rdeča	živo rdeča	roza	vijolična
rdeče grozdje	rdeča	rdeča	roza-rdeča	rdeče-vijolična	vinsko rdeče-vijolična



Slika 31: (od leve proti desni) Črni koren, črni ribez in hibiskus od nevtralnega proti kislem
(Foto: A. Gril)

4.5 BARVANJE ŽIVIL

Živila, kot so mleko, jogurt in jajčni beljak, vsebujejo dovolj vode, da sem jih lahko intenzivno obarvala z vsemi »antocianskimi« pripravki. Barvni toni posameznih so bili močno odvisni od pH posameznega živila.

Tabela 7: Izmerjen pH

živilo	pH
jogurt	4,5
mleko	6,8
jajčni beljak	8,1
jajčni beljak z limoninim sokom	5

Pri jogurtu so bili zaradi kislosti odtenki v roza pa tudi v roza-vijolični barvi. Črni ribez je jogurt obarval živo roza, hibiskus roza-vijolično, rdeče grozdje vijolično-roza, črni koren intenzivno temno roza, aronija svetlo roza, rdeče zelje pa nežno roza. Z antociani, pridobljenimi iz črnega ribeza, lahko jogurt pobarvamo v barvi »jagode« in »maline«, v primeru hibiskusa, grozdja in črnega korena pa lahko dosežemo barvo, primerljivo z barvo »gozdnih sadežev«.

Pri mleku sem zaradi nevtralnega pH lahko obarvala le v odtenke vijoličnih tonov.

Črni koren je mleko obarval vijolično-modrikasto, grozdje sivkasto-vijolično, črni ribez pa temno vijolično.

Tabela 8: Pridobljeni barvni toni v mleku in jogurtu

barvilo	mleko	jogurt
črni ribez	temno vijolično	živo roza
kuhano rdeče zelje	nežno vijolično	nežno roza
črni koren	vijolično-modrikasto	intenzivno temno roza
aronija	vijolično-roza	svetlo roza
hibiskus cvet	modro-vijolično	roza-vijolično
rdeče grozdje	sivkasto-vijolično	vijolično-roza

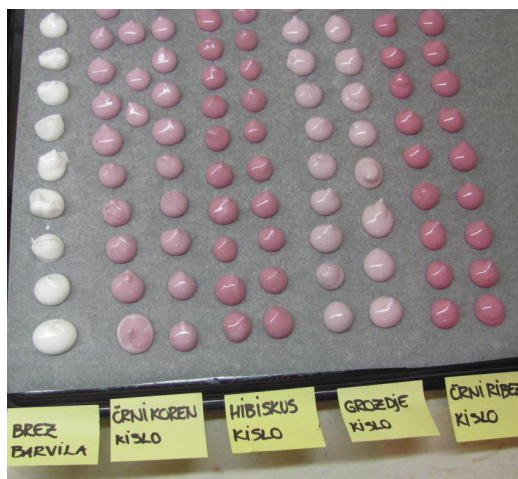


Slika 32: Obarvano mleko z antociani (Foto: A. Gril)



Slika 33: Obarvan jogurt z antociani (Foto: A. Gril)

Zaradi različne kislosti neokisanega in okisanega jajčnega beljaka so barvila tvorila različne barvne tone. Pri beljaku brez limone so bile barve v odtenkih modro-vijolične, pri beljaku z dodanim limoninim sokom pa so se obarvali rdeče-roza.



Slika 34: Beljakovi poljubčki, pobarvani z različnimi barvili (Foto: A. Gril)

Tabela 9: Obarvanost beljakovih poljubčkov

barvilo	neokisan beljakov poljubček	okisan beljakov poljubček
črni ribez	modro	roza-rdeče
kuhano rdeče zelje	nežno modro	svetlo vijolično
črni koren	modro	roza-vijolično
aronija	modro	vijolično
hibiskus cvet	nežno modro	temno vijolično
rdeče grozdje	svetlo modro	vijolično

Pri okisanih beljakovih poljubčkih so se barvni odtenki kar precej razlikovali (rdeče-roza-vijolični toni), dosti manjša pa je bila razlika pri neokisanih poljubčkih, kjer sem dobila le modre tone.



Slika 35: Beljakovi poljubčki, pobarvani z barviloma črnega korena (neokisani (levo) in okisani (desno))
(Foto: A. Gril)



Slika 36: Beljakovi poljubčki, pobarvani z barviloma črnega ribeza (neokisani (levo) in okisani (desno))
(Foto: A. Gril)

Obstojnost barvila pri jogurtu in mleku nisem mogla opazovati skozi daljše obdobje, saj so mlečni izdelki obstojni le kratek čas. V tednu dni, kolikor sem obarvane mlečne izdelke hranila v hladilniku, pa se barva ni spremenila.

Beljakove poljubčke sem spekla; pečeni so tako dalj časa obstojni. Ugotovila sem, da so antociani odporni na temperaturo – vsaj do 60 °C. Tako sem lahko opazovala obstojnost antocianov dalj časa. Po dveh mesecih se barva ni vidno spremenila, kar pomeni, da so antociani obstojni in stabilni pri višjih temperaturah.

5 RAZPRAVA

5.1 POTRDITEV HIPOTEZ

Predvidevala sem, da bom s papirno kromatografijo ločila barvila na več različnih tonov. To lahko potrdim, saj se na kromatografskem papirju nahajajo lise bolj in manj intenzivnih rozavijoličnih tonov.

Predvidevala sem, da se bo pri ekstrakciji »antocianskega« pripravka zaradi prisotnosti klorofila in beta-karotenov heksan obarval rumeno-zeleno. To drži, a le v primeru, ko so v pripravku dejansko prisotne dovolj velike količine beta-karotenov in klorofila. Z vodno ekstrakcijo živil, bogatih z antociani, v pripravek niso prišla nepolarna barvila, ampak le vodotopni antociani. V teh primerih se heksan ni obarval.

Ugotovila sem, da je pri izbranih živilih, ki vsebujejo velike količine antocianov, količina ostalih barvil (beta-karotenov in klorofila) izjemno nizka. Poleg tega sem tudi ugotovila, da s prelivanjem z vročo vodo (pri hibiskusu) iz živila ne ekstrahiram nepolarnih barvil, kot so beta-karoteni in klorofil.

Ker so antociani vodotopna barvila, se bodo živila, ki vsebujejo vodo, obarvala. Izbrana živila (jogurt, mleko in jajčni beljak) so se tako odlično obarvala.

Pri različnih pH vrednostih antociani spreminjajo barvne tone. Barvni ton je tako odvisen od pH vrednosti posameznega živila.

5.2 UGOTOVITVE

Sama sem testirala mnogo rastlin in ugotovila, da večina rdeče obarvanih rastlin oziroma njihovih delov vsebuje antociane. Med temi rastlinami je potrebno izbrati tiste z intenzivnim obarvanjem. Te morajo biti lahko dostopne v naših krajih, poceni, seveda pa morajo biti uporabne. Sama sem pregledala kar nekaj takih rastlin. Najprej sem izločila cvetove pelargonij, vrtnic in liste divje trte, saj ne vem, če so uporabni. S seznama sem izključila tudi borovnice, ki so sicer dale dobre rezultate, vendar so za pridobivanje barvila predrage. Rdeče zelje in grozdje nista bila tako intenzivna. Pri grozdju sem uporabila grozdni sok, a obarvana je le kožica. Če bi imela na voljo dovolj tropin, bi iz njih z ekstrakcijo morda uspela pridobiti bolj koncentriran pripravek za barvanje z antociani. Tudi hibiskus je dal krasne rezultate, a je način pridobivanja antocianov iz čajnih vrečk predrag. V delih sveta, kjer hibiskus uspeva, pa

ekstrakt s pridom uporabljajo. Podoben primer je tudi ekstrakt črnega korena. V krajih, kjer uspeva, je glavna surovina za antocianska barvila.

Vsem gornjim pogojem sta tako na koncu zadostila le sok črnega ribeza in aronije. To pa zato, ker uspevata v našem okolju in dajeta intenzivno barvo. Poleg tega sem s poskusi ugotovila, da pripravki praktično ne vsebujejo drugih barvil, zato dodatna obdelava (ekstrakcija s haksanom) ni potrebna.

6 ZAKLJUČEK

Pri raziskovalni nalogi sem se naučila veliko novega. Spoznala sem veliko novih metod in v praksi preizkusila svoje znanje. Prišla sem do zanimivih zaključkov. Marsikje v industriji bi se lahko namesto umetnih rdeče-vijoličnih barvil uporabljala naravna barvila na osnovi antocianov. Res pa je, da so lahko taka barvila velikokrat zelo (pre)draga.

7 POVZETEK

Pogosto se sprašujemo, ali so barvila, ki so dodana živilom, naravna ali umetna. Prav tako nas zanimajo njihovi učinki na naše zdravje. Moj namen je bil dokazati, da lahko z naravnimi barvili, pridobljenimi iz antocianov, živila zelo atraktivno pobarvamo. To skupino barvil sem izbrala, ker so lepih in živih barv ter imajo pozitivne zdravstvene učinke.

Antociani so najpomembnejša skupina vodotopnih rastlinskih barvil. Nahajajo se lahko v različnih delih višje razvitih rastlin. Rastlinske dele obarvajo rdeče-vijolično-modro. Barvni ton je odvisen od pH vrednosti. V kislem so roza-rdeči, v nevtralnem in rahlo bazičnem pa vijolično-modri.

Najprej sem izbrala rastline, ki vsebujejo večje količine antocianov in so široko dostopne. Iz njih sem z različnimi postopki (stiskanje, filtriranje, ekstrakcija ...) pridobila naravna barvila.

S papirno kromatografijo sem se prepričala, da so antociani velika skupina barvil.

Za barvanje različnih gotovih napitkov in jedi sem uporabila le nekatera barvila. Izbrala sem barvila tistih delov rastlin, ki se že tradicionalno uporabljajo v prehrani. Tako sem izbrala nekatere vrste sadja in cvetov (črni ribez, aronija, hibiskus ...), s katerimi sem obarvala

različne gotove napitke in jedi (mleko, jogurt, jajčni beljak ...), ki se razlikujejo po kislosti. Dodatek barvila, bogatega z antociani, tako povzroči nastanek različnih odtenkov barv. Ko sem s posameznim barvilom barvala živila z različnimi pH vrednostmi, sem dobila barvno paleto roza-vijoličnih tonov. Dokazala sem, da se vsa barvila iz skupine antocianov, ki sem jih pridobila, obnašajo kot pH indikator.

8 ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici Polonci Počivalšek za nasvete in pomoč pri delu, profesorici Marjani Lešnik za lektoriranje naloge, profesorici Nataliji Sevnik Leber za prevod in družini za podporo v času mojega raziskovalnega dela.

Posebna zahvala gre podjetju Frutarom Etol d.o.o. za podarjen material in opravljene meritve.

9 VIRI IN LITERATURA

1. Aksamit-Stachurska A., Korobczak-Sosna, A., Kulma, A., Szopa, J. 2008. Glycosyltransferase efficiently controls phenylpropanoid pathway. *BMC Biotechnology*.
2. Andersen, M., Jordheim, M. 2008. Anthocyanins- food applications. *Els*.
3. Antocian. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Antocian> (2. 12. 2014)
4. Bayer, E. Komplexbildung und Blütenfarbe. *Angewandte Chemie: september 1996, številka 18-19, letnik 78*.
5. Boh, B., Ferk, V., Cvirn, T. 2000. Barvila in naravna barvila, Učbenik za izbirne vsebine kemije. Tehniška založba Slovenije.
6. Bohinc, N. Barve v kemiji. <http://www.kemija.org/index.php/eksperimenthorij-mainmenu-60/114-barve-v-kemiji-1-papirna-kromatografija> (2. 12. 2014)
7. Cherepy, N.J. Ultrafast Electron Injection. *The Journal of Physical Chemistry: november 1997, številka 45, letnik 101*.
8. Clifford, M. 2000. Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture: maj 2000, številka 80, letnik 7*.

9. Garzon G. Anthocyanins As Natural Colorants And Bioactive Compounds. Food Chemistry: maj 2009, številka 1, letnik 114.
10. Ghiselli A. Antioxidant Activity of Different Phenolic Fractions Separated From an Italian Red Wine. Journal of Agricultural and Food Chemistry: januar 1998, številka 2, letnik 46.
11. Giusti M., Wrolstad, R. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems.
12. Biochemical Engineering Journal: junij 2003, številka 3, letnik 14.
13. Grätzel, M. Dye-sensitized solar cells. Journal of Photochemistry and Photobiology: oktober 2003, številka 2, letnik 4.
14. Gould, K.S. The Diverse Protective Roles of Anthocyanins in Leaves. Journal of Biomedicine and Biotechnology: december 2004, številka 5, letnik 2004.
15. Halbwirth, H. 2010. The Creation and Physiological Relevance of Divergent Hydroxylation Patterns in the Flavonoid Pathway. International Journal of Molecular Science: februar 2010, številka 2, letnik 11.
16. He, J., Giusti, M. 2010. Anthocyanins: natural colorants with health-promoting properties. Annual Review of Food Science and Technology: april 2010, številka 1.
17. Hosseinian, F.S., Beta, T. 2007. Saskatoon and wild blueberries have higher anthocyanin contents than other Manitoba berries. Journal of the Science of Food and Agriculture: november 2004, številka 26, letnik 52.
18. Lieberman, S. The antioxidant power of purple corn: a research review. Alternative and Complementary Therapies: April 2007, številka 2, letnik 13.
19. Muñoz-Espada A.C., Wood K.V., Bordelon B. in Watkins B.A. Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch grapes and wines". Journal of Agricultural and Food Chemistry: oktober 2004, številka 22, letnik 52.
20. Siriwoharn T., Wrolstad R.E., Finn C.E. in Pereira C.B. Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (Rubus L. Hybrids) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. Journal of the Science of Food and Agriculture: november 2004, številka 26, letnik 52.
21. Sullivan, J. Anthocyanin. Carnivorous Plant Newsletter: September, 1998.

22. Socaciu, C. 2008. Food colorants chemical and functional properties. CRC Press.
23. Wu X., Gu L., Prior R.L. in McKay S. Characterization of anthocyanins and proanthocyanidins in some cultivars of Ribes, Aronia, and Sambucus and their antioxidant capacity. Journal of the Science of Food and Agriculture: november 2004, številka 26, letnik 52.
24. Zeba, K., Zibelnik, N. 2013. Uporaba kromatografije in spektrometrije. Raziskovalna naloga. SGGOŠ, Ljubljana.