

PŘÍRODNÍ POLYMERY

Laboratorní metody stanovení přírodních polymerů

**RNDr. Ladislav Pospíšil, CSc.
POLYMER INSTITUTE BRNO
spol. s r.o.**

LITERATURA – pouze ta, obsahující alespoň něco o stanovení přírodních polymerů

- J. Kodet, S. Štěřba, L. Šlechta: **Modifikované škroby**, SNTL Praha, 1982
- P. Mokrejš: **Aplikace přírodních polymerů – Návody k laboratorním cvičením z předmětu**, skripta UTB Zlín, 2008
- Z. Holzbecher, J. Churáček a kol.: **Analytická chemie** (kap. 13.6), SNTL/ALFA, Praha 1987

Návody k laboratorním cvičením z předmětu
APLIKACE PŘÍRODNÍCH POLYMERŮ

PAVEL MOKREJŠ



ZLÍN 2008

**Obsahuje
hodně metod
na bílkoviny &
aminokyseliny
a na dřevo,
málo na škrob**

- 1. Stanovení dusíku**
- 2. Škrob**
- 3. Celulóza**
- 4. Perspektivy stanovení přírodních polymerů**

Základní problémy stanovení přírodních polymerů

- Nejsou to chemická individua
- Reakce nejsou vždy kvantitativní a používají se přepočítavací koeficienty
- Některé reakce nejsou úplně selektivní
- Neexistuje souhrnná učebnice či příručka, nutno hledat v různých zdrojích (analytických reakcí byly alespoň jedna příručka a jedna učebnice v češtině)
- Zahraniční literatura obtížně dostupná, pokud vůbec existuje

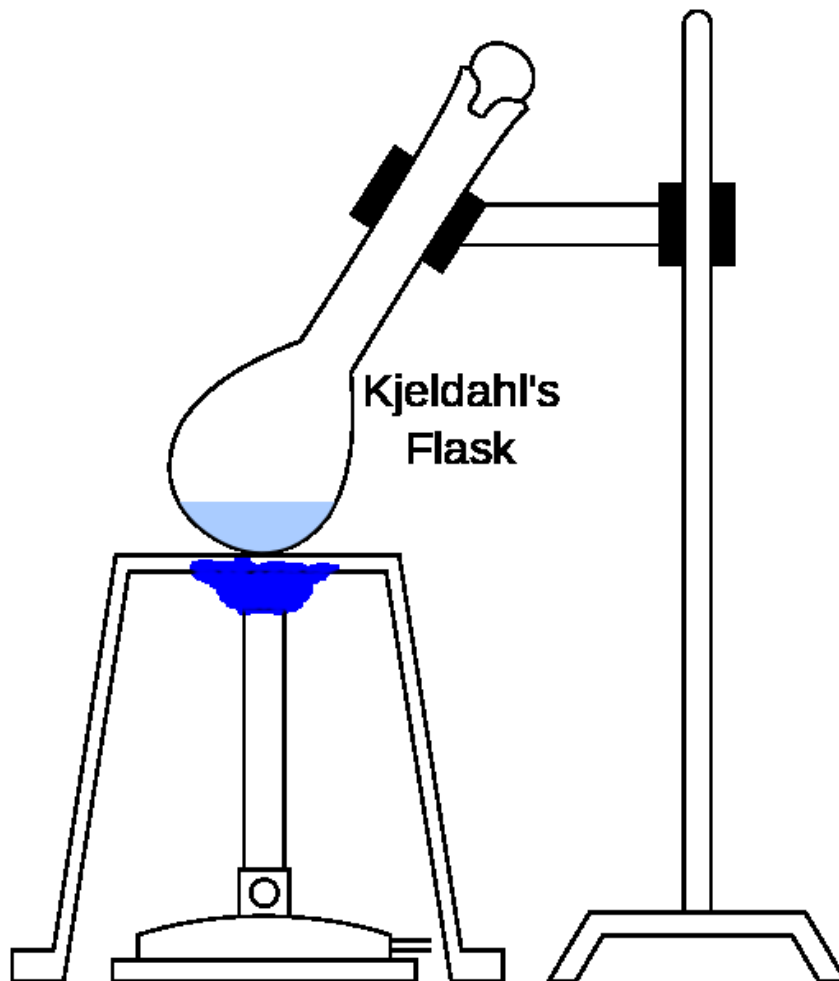
Stanovení ORGANICKY VÁZANÉHO dusíku

- Metoda podle KJEDAHLA
- Metoda podle JODLBAUERA
(organický dusík vedle anorganického, např. vedle NO_3^- či NH_4^+)
- Metoda podle DUMASE
-

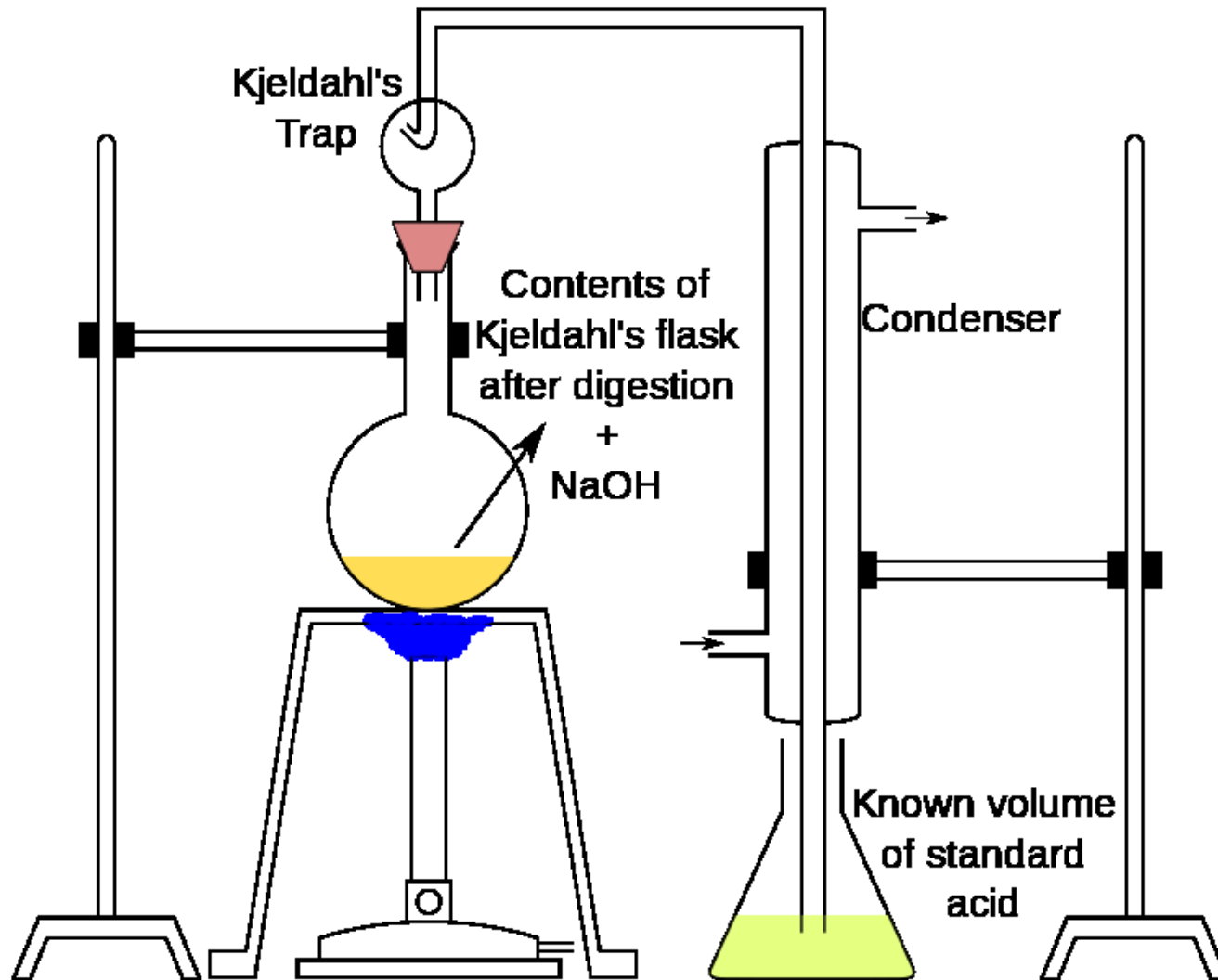
Stanovení ORGANICKY VÁZANÉHO dusíku podle KJELDAHLA

- Mineralizace na amoniak (NH_3 , přesněji NH_4^+) - H_2SO_4 konc. + K_2SO_4 (na zvýšení b.v.) + katalyzátor (CuO , CuSO_4 bezv., Hg , sloučeniny Se) cca. $400\text{ }^\circ\text{C}$
- Vydestilování NH_3 vařením s NaOH do H_2SO_4
- Titrace přebytku H_2SO_4 na methylčerveň

Stanovení **ORGANICKY VÁZANÉHO** dusíku podle KJELDAHLA - mineralizace



Stanovení **ORGANICKY VÁZANÉHO** dusíku podle **KJELDAHLA** – vydestilování amoniaku



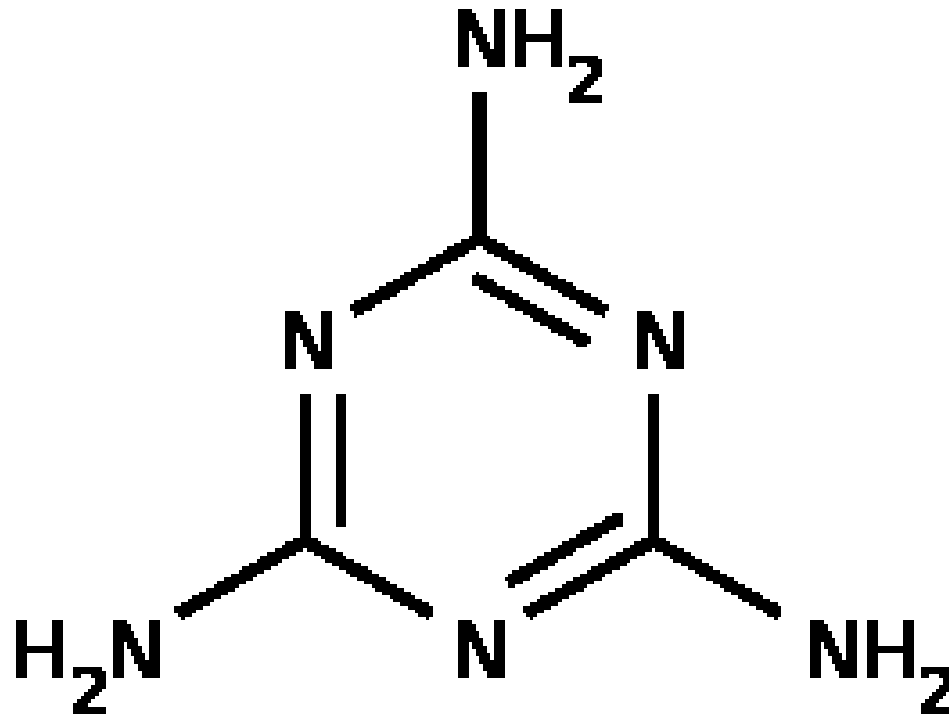
Převodní faktory na obsah bílkovin podle celkového dusíku podle KJELDAHLA

(Total KJELDAHL Nitrogen = TKN)

- **Bílkoviny různého původu mají různé složení aminokyselin > nutnost použít **Převodní faktory****
- **Mléko: TKN x 6,38**
- **Maso: TKN x 6,25**
- **Vejsce: TKN x 5,83**
-

Jak v Číně falšovali obsah bílkovin v mléce

- Stanovuje se jako organický dusík
- Přidáme trochu MELAMINU a je hotovo!



Škrob

- Řada metod na hodnocení vstupních surovin (brambory, obilí)
- Metody hodnocení použitelnosti výrobku k danému účelu a ne chemického složení výrobku
- **Chemické metody jsou založeny na hydrolýze a následujících reakcích oxidačně-redukčních**
-

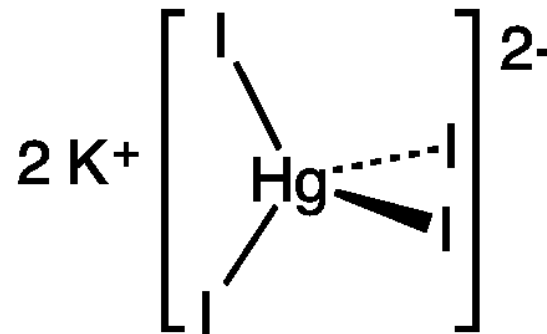
Činidla k reakcím oxidačně-redukčním

- Fehlingovo činidlo

- I (A): 69,28 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, doplnit do 1000 ml H_2O

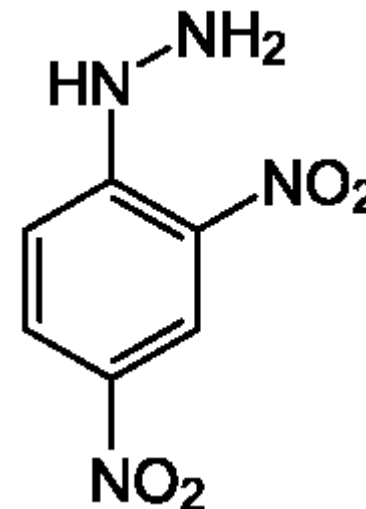
- II (B): 346 g vlnanu sodno-draselného + 120 g NaOH, doplnit do 1000 ml H_2O

- Nesslerovo činidlo pro detekci NH_3



- Tollensovo činidlo $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{NO}_3$ (aq)

- Bradyho činidlo



Reakce Fehlingova činidla

Keton

Neredukuje
komplex mědi



Aldehyd

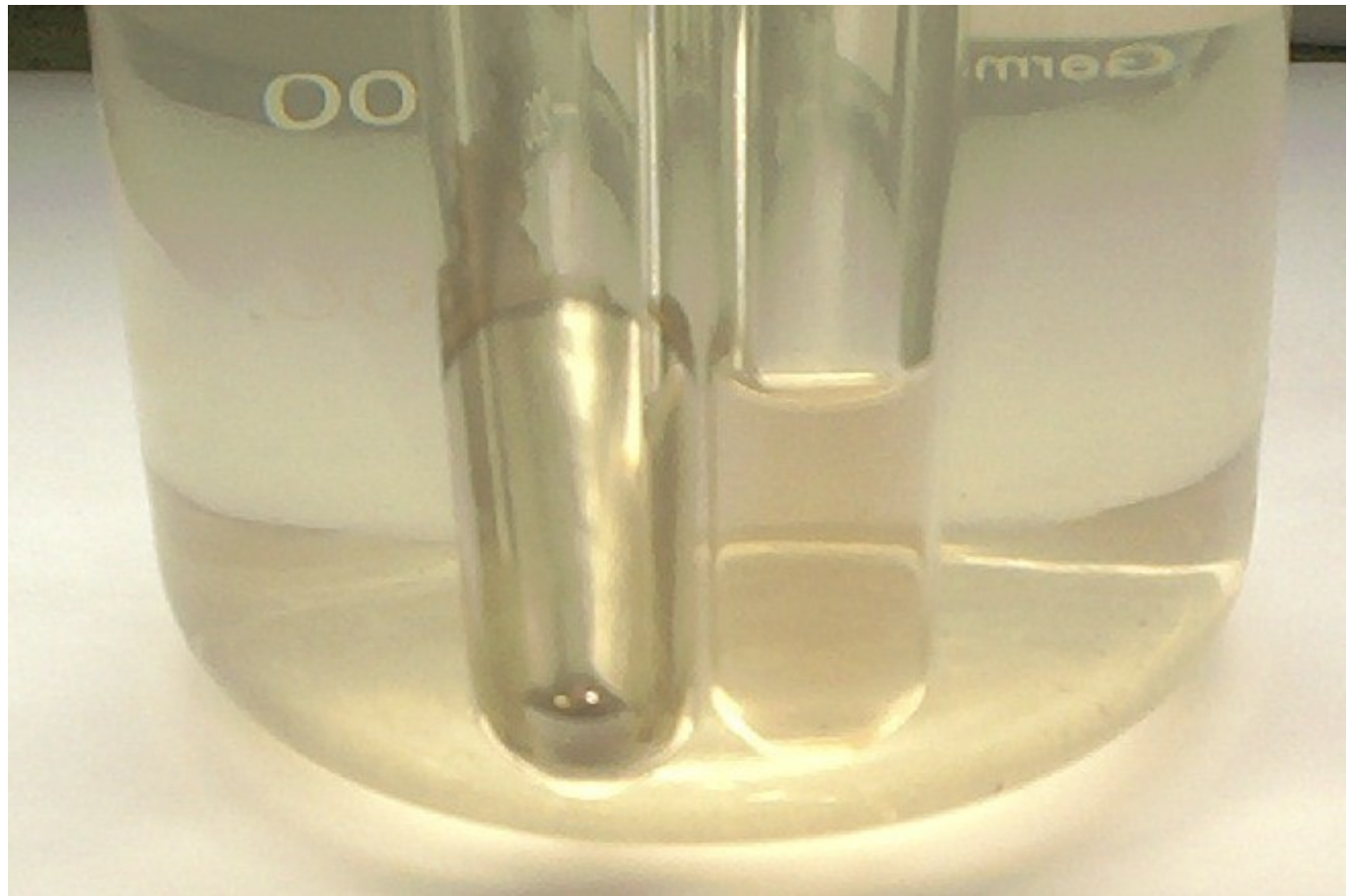
Redukuje

komplex mědi
na Cu_2O

Reakce Tollensova činidla

Keton

Neredukuje
komplex Ag



Aldehyd

Neredukuje
komplex Ag
na kovové Ag

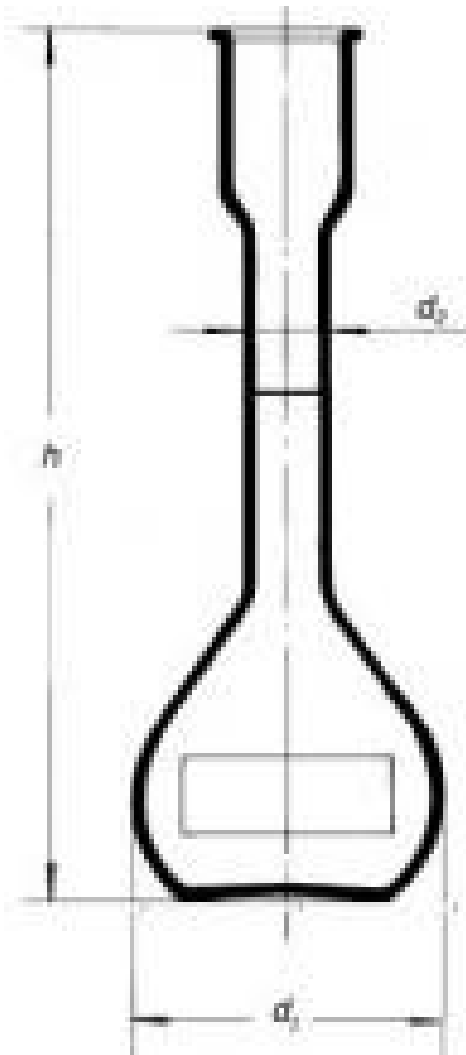
Analytika škrobu

- **Polarimetrické stanovení škrobu podle Ewerse**
- **Stanovení aldehydických skupin ve škrobu**
- **Stanovení substituce karboxymethyl derivátů ve škrobu**
- **Stanovení glukózového (dextrózového) ekvivalentu škrobu**
- **Stanovení veškerého cukru jako glukózy ve škrobu**
-

Kohlrauschova baňka

V ní se dělá
hydrolýza
škrobu

Má široké
hrdlo na
nalévání
viskózních
kapalin



Analytika škrobu - Polarimetrické stanovení škrobu podle Ewerse

1. Hydrolýza varem s HCl (5 g škrobu + 2x 25 ml 1,124 % HCl) po dobu 15 minut, přidat 15 ml vody
2. Vyčiření kyselinou fosfowolframovou - $H_3[P(W_3O_{10})_4] \times H_2O$ (4 %, 10 ml)
3. Filtrace atd.
4. Polarimetrické měření > **úhel otočení α**
5. **Výpočet obsahu škrobu X (% % hmot.)**

(může se vzorec lišit pro různé přístroje)

$$X = (10000 \times \alpha) / (l \times m \times \beta)$$

β – specifická otáčivost

l – délka trubice polarimetru (dm)

m – navážka škrobu na stanovení

5.2.5. Stanovení obsahu aldehydických skupin

Roztoky: roztok jódu 0,02 mol/l.

roztok thiosíranu sodného 0,02 mol/l,

kyselina chlór vodíková 1 mol/l,

hydroxid sodný 1 mol/l,

roztok bisulfitu - 4 g NaHSO₃/l.

Postup: A. Naváží se 15 g sušiny škrobu a zmazovává se s 300 ml vody. Po ochlazení se přidá 25 ml roztoku bisulfitu a v odměrce doplní vodou na 500 ml. Tento roztok se ponechá 30 min. v klidu.

B. Do Erlenmeyerovy baňky se napipetuje 20 ml roztoku jódu $c\left(\frac{1}{2} I_2\right) = 0,02 \text{ mol/l}$ a 15 ml kyseliny chlorovodíkové $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$. Dále se odměří 100 ml roztoku A a směs zředí destilovanou vodou na 300 ml. Přebytek jódu se titruje roztokem thiosíranu sodného $c(\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3) = 0,02 \text{ mol/l}$. Stanoví se volný SO₂. Spotřeba ml = B.

C. Ke 100 ml roztoku A se přidá 25 ml roztoku hydroxidu sodného $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$ a po 15 min. se kvantitativně převede do Erlenmeyerovy baňky, do níž již bylo odměřeno 20 ml roztoku jódu a 40 ml kyseliny chlorovodíkové. Po zředění na 300 ml se přebytek jódu titruje zpět roztokem thiosíranu. Stanoví se celkové množství volného a vázaného SO₂. Spotřeba v ml = C.

Výpočet: mmol aldehydu/100 g suš. = $(B - C) \cdot 0,667 \cdot f$,
kde je f - faktor roztoku thiosíranu sodného.

Analytika škrobu – Stanovení aldehydických skupin

Analytika škrobu – Stanovení glukóзовého ekvivalentu

5.2.7. Stanovení glukóзовého ekvivalentu

Glukóзовým ekvivalentem ("dextrose equivalent" - DE) se rozumí celkové množství redukujících látek ve škrobu vyjádřené procentově jako množství glukózy ve škrobové sušině. Toto stanovení se shoduje se Schoorlovou metodou.

Roztoky: Fehlingův roztok I,
Fehlingův roztok II,
jodid draselný - 30 % roztok,
kyselina sírová 1 : 6,
thiosíran sodný 0,05 mol/l,
škrobový indikátor.

Postup: do 300 ml Erlenmeyerovy baňky se napipetuje po 10 ml roztoků Fehling I a II. Přidá se 20 - 25 ml vzorku o obsahu přesně asi 200 mg škrobu a doplní destilovanou

vodou na 50 ml. Baňka se uzavře nálevkou a zahřívá tak, aby po 3 min. začala kapalina vřít. Po dvouminutovém varu se baňka rychle ochladí na 25 °C, přidá se 10 ml roztoku jodidu draselného a 10 ml roztoku kyseliny sírové. Ihned se titruje roztokem thiosíranu do žlutého zbarvení, přidá se škrobový roztok a titruje do odbarvení.

Slepý pokus se provede stejným způsobem bez přídavku škrobu.

Výpočet: k rozdílu spotřeby thiosíranu při slepém pokusu a vlastním stanovení se odečte z tabulky množství glukózy v mg. Tato hodnota vztažená na množství škrobu udává glukóзовý ekvivalent v %.

Tabulka 9

Množství glukózy v závislosti na spotřebě roztoku
0,05 mol/l thiosíranu sodného (podle Schoorla)

Škrob > 0
GLUKÓZA = 100
MALTODEXTRINY cca. 3 AŽ 20
GLUKÓZOVÝ SIRUP min. 20

**Analytika škrobu –
Stanovení
glukózového
ekvivalentu**

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (ml)	Glukóza (mg)	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (ml)	Glukóza (mg)
1	3,2	14	45,8
2	6,3	15	49,3
3	9,4	16	52,8
4	12,6	17	56,3
5	15,9	18	59,8
6	19,2	19	63,3
7	22,4	20	66,9
8	25,6	21	70,7
9	28,9	22	74,5
10	32,3	23	78,5
11	35,7	24	82,6
12	39,0	25	86,6
13	42,4	26	90,7
14		27	94,8

Analytika škrobu

Stanovení celkových cukrů jako glukózy

1. Hydrolýza na glukózu
 2. Redukce Fehlingova roztoku $> \text{Cu}_2\text{O}$
 3. Přežihání $> \text{CuO}$
 4. Přepočet na Cu
 5. Vyhledání obsahu glukózy podle tabulky Allihnovy
- Postup obsahuje i časy pro jednotlivé operace**

Cu	D-glukóza	Cu	D-glukóza	Cu	D-glukóza	Cu	D-glukóza
[mg]							
1,1	0,5	36,2	18	88,2	46	136,3	74
2,2	1,0	38,1	19	90,0	47	137,9	75
3,3	1,5	40,1	20	91,8	48	139,6	76
4,0	2,0	42,2	21	93,6	49	141,2	77
5,5	2,5	43,9	22	95,4	50	142,8	78
6,5	3,0	45,8	23	97,1	51	144,5	79
7,5	3,5	47,7	24	98,9	52	146,1	80
8,5	4,0	49,6	25	100,6	53	147,7	81
9,5	4,5	51,5	26	102,3	54	149,3	82
10,5	5,0	53,4	27	104,1	55	150,9	83
11,5	5,5	55,3	28	105,8	56	152,5	84
12,5	6,0	57,1	29	107,6	57	154,0	85
13,5	6,5	59,1	30	109,3	58	155,0	86
14,5	7,0	60,9	31	111,1	59	157,2	87
15,5	7,5	62,8	32	112,8	60	158,8	88
16,5	8,0	64,6	33	114,5	61	160,4	89
17,5	8,5	66,5	34	116,2	62	162,0	90
18,5	9,0	68,3	35	117,9	63	163,6	91
19,5	9,5	70,1	36	119,6	64	165,2	92
20,4	10	72,0	37	121,3	65	166,7	93
22,4	11	73,8	38	123,0	66	168,3	94
24,3	12	75,7	39	124,7	67	169,9	95
26,3	13	77,5	40	126,4	68	171,5	96
28,3	14	79,3	41	128,1	69	173,1	97
30,2	15	81,1	42	129,8	70	174,6	98
32,2	16	82,9	43	131,4	71	176,2	99
34,2	17	84,7	44	133,1	72	177,8	100
		86,4	45	134,7	73		

Analytika škrobu

Stanovení celkových cukrů jako glukózy

d/ Stanovení přímo redukujících cukrů

Do kádinky o obsahu asi 600 ml se odměrným válečkem odměří 30 ml Fehlingova roztoku I, 30 ml Fehlingova roztoku II a 60 ml vody.

Kádinka se přikryje hodinkovým sklem, postaví se na azbestovou desku s kruhovým výřezem a její obsah se zahřeje k varu; pipetou se přidá 25 ml zkoušeného roztoku, připraveného podle odstavce a/ /odpovídá 5 g původní látky/, který neobsahuje více než 1 % cukrů, a vaří se přesně 2 minuty. Doba varu se počítá od začátku nového varu po přidavku cukerného roztoku a měří se stopkami. Po ukončení dvouminutového varu se k zastavení další reakce přidá válečkem 100 ml převařené studené vody, kterou se může opláchnout i hodinkové sklo. Po skončeném varu musí Fehlingovy roztoky zůstat modré. Jsou-li zbarveny hnědě, je nutné část cukerného roztoku zředit v odměrné baňce vodou a k redukci použít zase jen 25 ml takto zředěného roztoku.

Vyloučený Cu_2O se nechá asi 5 minut usazovat a poté se zfiltruje za použití vakua vyžítaným a zvažným porcelánovým kelímek s porovitým dnem. Cu_2O se z kádinky splachuje do kelímku horkou vodou. Spláchnutí se musí provést kvantitativně a po promytí musí z kelímku odtékat čistá voda. Potom se sraženina v kelímku promyje asi 2 ml etanolu, kelímek se vloží do vyhřáté sušárny, po vysušení se v elektrické peci přežíhá a po vychladnutí v exsikátoru se zvaží kysličník měďnatý CuO .

TECHNICKÁ PUBLIKACE Č. 307

LIHOVARY A KONZERVÁRNY, OBOROVÉ ŘEDITELSTVÍ
BRATISLAVA

**LABORATORNÍ KONTROLA SUROVIN,
POMOCNÝCH LÁTEK A VÝROBKŮ
V LIHOVARSKÉM OBORU
II. DÍL**

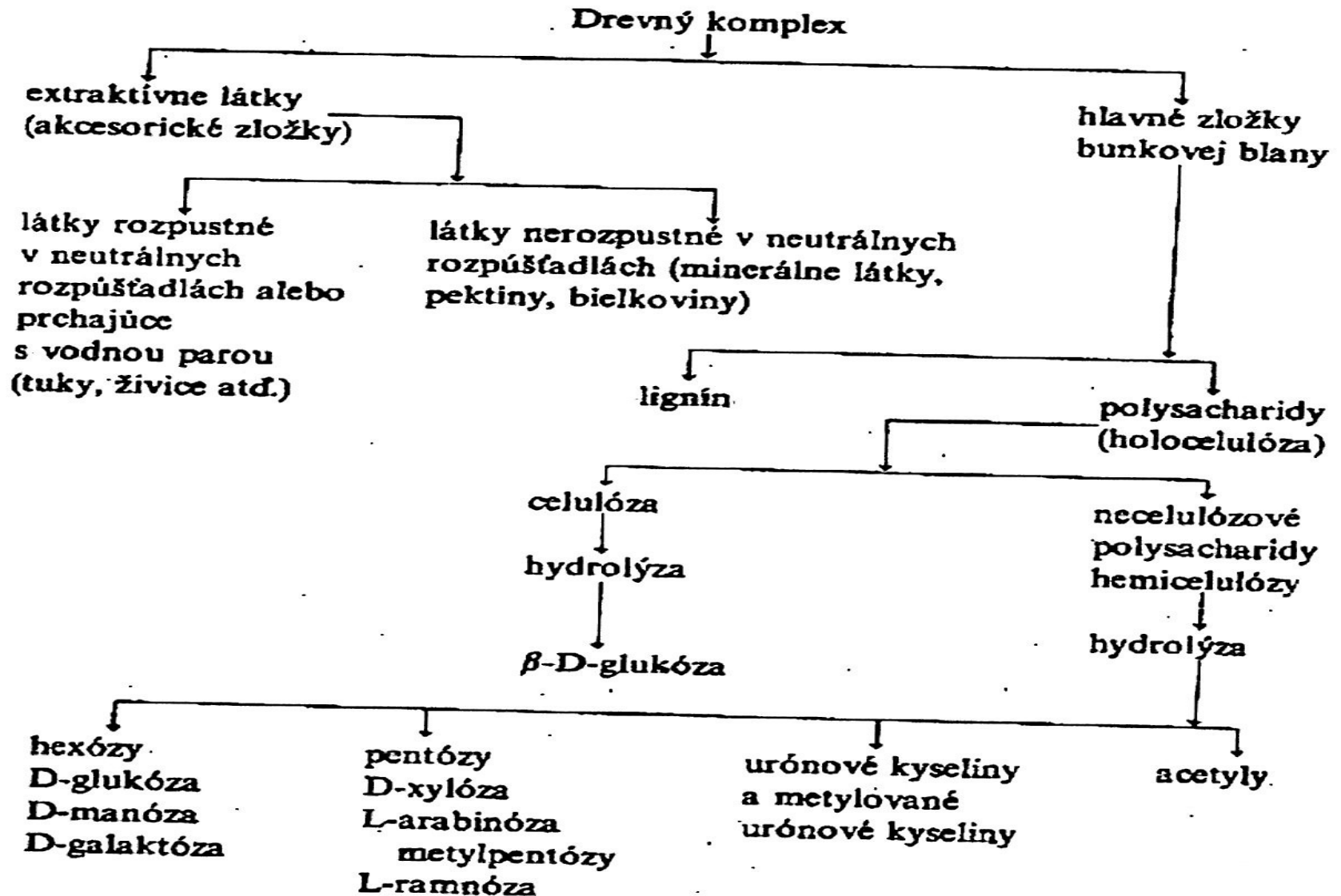


URČENO PRO VNITŘNÍ POTŘEBU

1968

ÚVÚPP
STŘEDISKO TECHNICKÝCH INFORMACÍ
POTRAVINÁŘSKÉHO PRŮMYSLU
PRAHA

Celulóza



Celulóza

1. Lehce hydrolyzovatelné polysacharidy (hemicelulózy)
2. TĚŽCE hydrolyzovatelné polysacharidy (celulóza a část hemicelulóz)

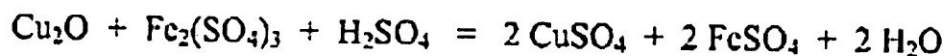
II.1.1 STANOVENÍ LEHCE HYDROLYSOVATELNÝCH POLYSACHARIDŮ DŘEVA

Princip metody

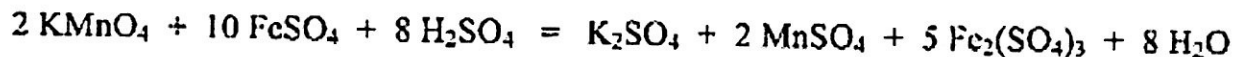
Metoda je založena na hydrolýse vzorku zředěnou kyselinou a získání monosacharidů. Množství vzniklých monosacharidů se stanoví podle jejich redukční schopnosti např. metodou podle Bertranda.

Bertrandova metoda stanovení redukujících sacharidů:

Je založena na reakci Fehlingova roztoku, při které se Cu^{2+} redukuje na Cu^{1+} a vypadává ve formě sraženiny Cu_2O . Ten se rozpouští v $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, přičemž Cu^{1+} přejde na Cu^{2+} a Fe^{3+} na Fe^{2+} podle rovnice:



Vzniklý FeSO_4 se v kyselém prostředí H_2SO_4 oxiduje zpět na $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ pomocí standardního roztoku KMnO_4 :



Lehká hydrolyzovatelnost je dána PODMÍNKAMI HYDROLÝZY:

- **Koncentrace kyseliny (2 % HCl)**
- **Doba hydrolýzy (90 minut)**

II.1.2 STANOVENÍ TĚŽCE HYDROLYSOVATELNÝCH POLYSACHARIDŮ DŘEVA

Princip metody

Metoda je založena na hydrolýse vzorku koncentrovanou kyselinou a získání monosacharidů. Množství vzniklých monosacharidů se stanoví podle jejich redukční schopnosti např. metodou podle Bertranda.

Přístroje a pomůcky

Erlenmayerova baňka 250 ml (2x), varná baňka 1000 ml (2x), 250 ml titrační baňka (2x), odměrný válec 50 ml, vodní lázeň + zpětný chladič, pipeta 50 ml, vaříč, kádinka 100 ml (2x), Büchnerova nálevka, filtrační papír KA-2, odměrná baňka 1000 ml se zátkou (2x), nálevka velká (3x), střední, stopky, hodinové sklíčko (2x), špachtle, skleněná tyčinka.

Použitý vzorek

Tuhý zbytek po stanovení lehce hydrolysovatelných polysacharidů.

Použité chemikálie

- ◆ 80 % H_2SO_4 (při manipulaci dbáme opatrnosti!);
- ◆ 20 % NaOH;
- ◆ Fehlingův roztok I;
- ◆ Fehlingův roztok II;
- ◆ Roztok $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$;
- ◆ 2 N H_2SO_4 ;
- ◆ 0,1 N KMnO_4 (titrační roztok).

II.2 STANOVENÍ α - CELULOSY, β - CELULOSY A γ - CELULOSY

Polymersační stupeň celulosy a také charakter frakcí α , β a γ , které se v ní nacházejí, mají skutečný vliv na její rozpustnost v hydroxidech.

α -celulosa je vlastně vysokomolekulární celulosa, která však obsahuje také příměsi jiných polysacharidů, které jsou pravděpodobně s ní strukturně orientované, a proto se neodstraní působením hydroxidu na celulosu.

β -celulosa je vlastně degradovaná část celulosy s příměsi jiných polysacharidů. Vzniká jako výsledek hydrolytického a oxidačního působení na celulosu. Má nízký polymerisační stupeň.

γ -celulosa je nízkomolekulární frakce hemicelulos s malými příměsemi produktů rozpadu celulosy.

Chemické složení frakcí α , β a γ celulosy závisí na druhu dřeva, na rozložení hemicelulos v buněčných blánách a na způsobu izolace celulosy.

II.2.1 STANOVENÍ α -CELULOSY podle metodiky TAPPI

Princip metody

Metoda je založena na působení 17,5 % roztoku NaOH na celulosu při 20 °C, přičemž nerozpustný podíl po zkoušce se označuje jako α -celulosa.

Použitelnost metody

Při stanovení mohou vznikat chyby způsobené zejména dobou a teplotou při zpracování, fyzikálním složením celulosy, dokonalostí promíchávání celulosy s hydroxidem, stupeň rozmělnění vzorku a způsob filtrace.

Přístroje a pomůcky

Kádinka 250 ml (2x), odměrný válec 10 ml (2x), 50 ml, 100 ml, lžička, stopky, hodinové sklíčko, odsávačka, filtrační kelímek SI, (2x), kádinka 500 ml, nálevka střední (3x), sušárna, exsikátor.

Použitý vzorek

Celulosa.

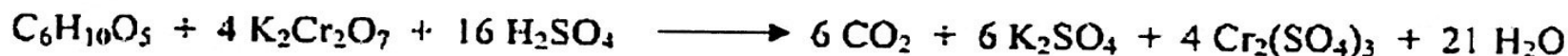
Použité chemikálie

- ◆ 10 % CH_3COOH ;
- ◆ 17,5 % NaOH.

II.2.3 STANOVENÍ β - CELULOSY A γ - CELULOSY

Princip metody

Metoda je založena na oxidaci filtrátu po stanovení α -celulosity (podle Klaudítze) $K_2Cr_2O_7$ v prostředí koncentrované kyseliny sírové. Reakce probíhá podle schématu:



Použitelnost metody

Uvedenou metodou se stanoví současně β -celulosa a γ -celulosa. γ -celulosa by se stanovila tak, že filtrát po stanovení α -celulosity se okyselí, β -celulosa se nechá usadit a poté se odfiltruje a ve filtrátu se po oxidaci stanoví γ -celulosa.

Přístroje a pomůcky

Odměrný válec 5 ml, 10 ml (2x), 50 ml, 100 ml, lžička, stopky, odměrná baňka 250 ml (3x), pipeta 50 ml, titrační baňka 250 ml (2x), Erlenmayerova baňka 250 ml (3x).

Použité chemikálie

- ◆ 96 % H_2SO_4 , p.a. (při manipulaci dbáme opatrnosti!);
- ◆ 5 % KI;
- ◆ 0,1 N $Na_2S_2O_3$;
- ◆ 5 % KI;
- ◆ 0,5 N NaOH;
- ◆ Škrobový maz;
- ◆ 0,2 N $K_2Cr_2O_7$.

Pracovní postup

1. Do 250 ml Erlenmayerovy baňky odpipetujeme 50 ml filtrátu po stanovení α -cclulosity metodou podle Klaudivize
2. Přidáme 20 ml 0,2 N $K_2Cr_2O_7$ a 50 ml koncentrované H_2SO_4 (dbáme zásad bezpečnosti, ochranný kryt na oči!)
3. Necháme 30 minut stát
4. Postupně přilijeme 100 ml vody (dbáme zásad bezpečnosti, ochranný kryt na oči!)
5. Po ochlazení roztok přelijeme do 250 ml odměrné baňky, doplníme vodou po značku a promícháme (=směs)
6. Odpipetujeme 50 ml směsi do titrační baňky, přidáme 100 ml vody a 10 ml 5% KI a necháme stát ve tmě 5 minut
7. Titrujeme 0,1 N roztokem $Na_2S_2O_3$ do žlutého zbarvení roztoku, poté přidáme 5 ml škrobového mazu a dotitrujeme z přechodu modrého (až černého) zbarvení na světle modré (zaznameníme spotřebu titračního činidla, V_2)

Slepý pokus: Provede se týmž způsobem, jen místo filtrátu po stanovení α -celulosity pipetujeme 50 ml 0,5 N NaOH (poté zaznamnáme spotřebu titračního činidla, V_3)

Vyhodnocení

Obsah β -celulosity a γ -celulosity (*BGC*) v % se vypočte ze vztahu:

$$BGC = \frac{(V_3 - V_2) N f 0,000675}{n_2} z_1 z_2 100$$

kde je V_2 ... spotřeba 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ při titraci vzorku v ml,
 V_3 ... spotřeba 0,1 N $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ při titraci slepého pokusu v ml,
 N ... normalita standardního roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$,
 f ... faktor standardního roztoku $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$,
0,000675... přepočítávací faktor na celulosu,
 z_1 ... zředění filtrát \rightarrow pipetované množství,
 z_2 ... zředění směs \rightarrow pipetované množství,
 n_2 ... navážka celulosity na stanovení α -celulosity podle Klauditze v g.

Závěr

Obsah β -celulosity + γ -celulosity se vyjádří aritmetickým průměrem ze dvou souběžných stanovení.

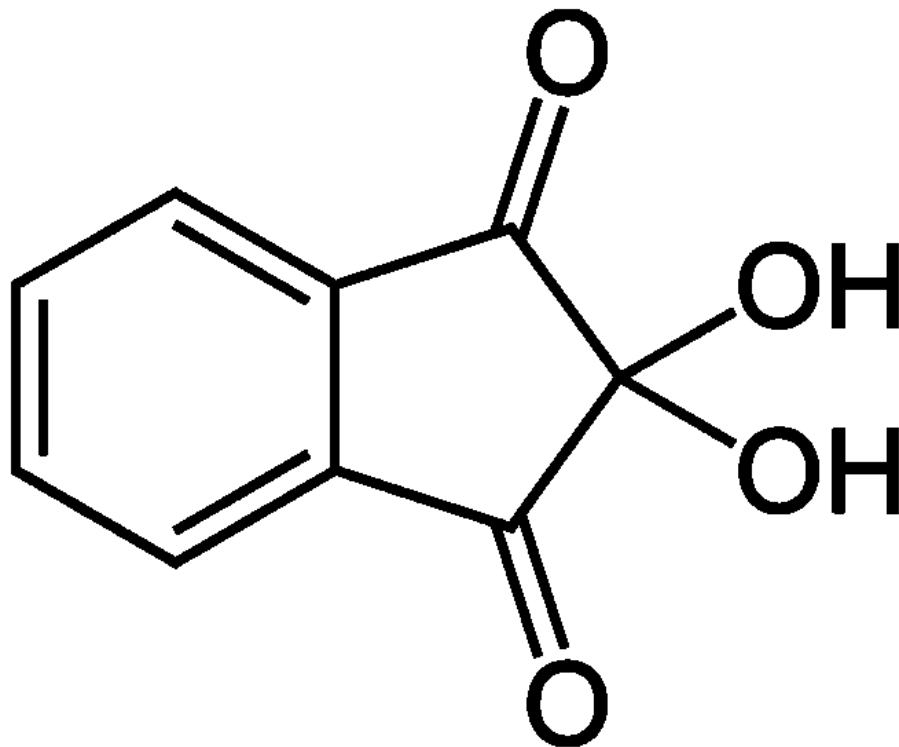
Perspektivy stanovení přírodních polymerů

OBECNĚ

- **Nástup automatických analyzátorů („vložím vzorek a čekám na čísla na počítači“)** bude dále pokračovat
- **Vzestup fotometrických metod, např. na stanovení bílkovin**
- **Použití enzymatických reakcí**
- **Hnací silou je KLINICKÁ BIOCHEMIE**
 - Minimální či žádné instrumentální vybavení,
 - Minimální požadavky na **SPECIÁLNÍ** kvalifikaci (*sestra u praktického lékaře*)
 - Minimální či žádné požadavky na přípravu vzorku
 - Jednoduché vyhodnocení, např. podle barevné stupnice

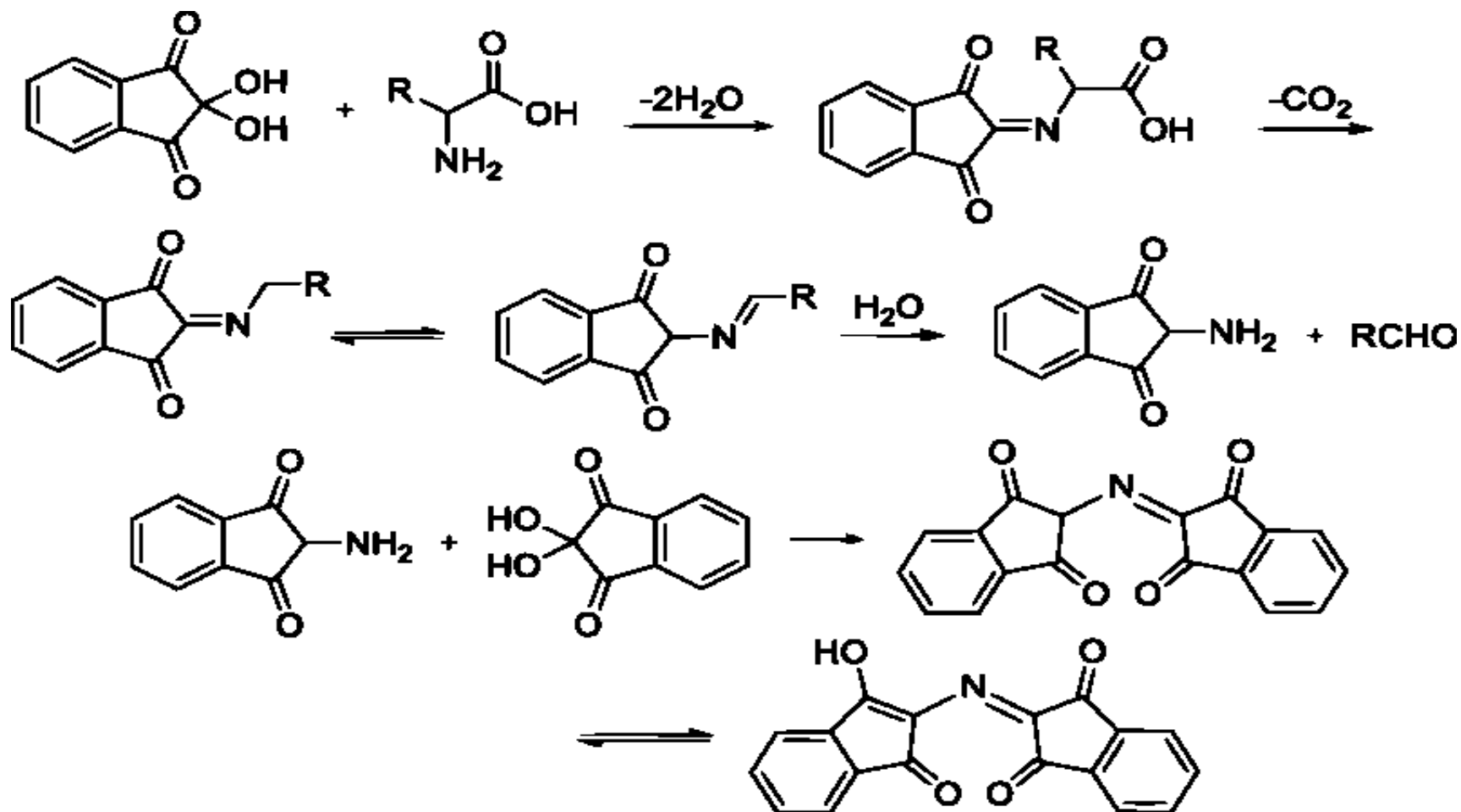
Fotometrické metody stanovení bílkovin

- Kyselá hydrolýza > barevná reakce s ninhydrinem



Fotometrické metody stanovení bílkovin

- Kyselá hydrolýza > barevná reakce s ninhydrinem



Fotometrické metody stanovení bílkovin

- Kyselá hydrolýza > barevná reakce s amidočerní B10

