

Polarimetrické stanovení glukózy, mutarotace glukózy

TEORIE

➤ POLARIMETRIE

Polarimetrie je metoda umožňující zjistit koncentraci opticky aktivní látky rozpuštěné v roztoku. Optická aktivita látky rozpuštěné v roztoku je dána přítomností chirálního, tj. asymetrického uhlíku, na který jsou vázány čtyři různé substituenty. Nejčastěji se jedná o organické látky – např. některé cukry, aminokyseliny, nebo alkoholy. Polarimetr je přístroj, který se skládá ze dvou nikolových hranolů vybroušených z islandského vápence, kdy první je pevně umístěn a propouští pouze světlo v jedné rovině kmitání, tedy polarizuje světlo. Polarizovaný paprsek prochází vzorkem a stáčí rovinu kmitání. Úhel otočení je závislý na měřené látce, její koncentraci, teplotě prostředí a vzdálenosti, kterou paprsek prochází, tj. délce polarizační trubice. Druhý nikolův hranol je spojený se stupnicí a slouží k měření stupně otočení paprsku. Pokud je proměřována opticky neaktivní látka, např. destilovaná voda, paprsek polarizovaného světla prochází ve stejné rovině a na stupnici odečítáme 0°. Jakmile paprsek projde opticky aktivním vzorkem, otáčíme s druhým nikolovým hranolem o tolik stupňů, aby mohl paprsek projít, tj. abychom viděli rovnoměrně osvětlené pozadí – polostín. Jako zdroj osvětlení se v polarimetrii využívá sodíková výbojka o konstantní vlnové délce.

Závislost stupně otočení na koncentraci opticky aktivní látky v roztoku lze vyjádřit vztahem:

$$\alpha = \alpha_D^{20} \cdot l \cdot c,$$

kde α_D^{20} je specifická optická otáčivost charakteristická pro danou látku; je to úhel, o který se otočí rovina polarizovaného světla při délce kyvety $l = 1$ dm a koncentraci roztoku $c = 1$ g · ml⁻¹. Zpravidla se udává pro čáru sodíkového dubletu D ($\lambda = 589,3$ nm) a teplotu 20 °C.

➤ MUTAROTACE

Čerstvě připravený roztok glukózy (a jiných sacharidů) mění v průběhu času svou optickou aktivitu. Tento jev se nazývá mutarotace a je způsoben vznikem různých opticky aktivních forem, tj. anomerů. Rychlost změny lze ovlivnit hodnotou pH prostředí a pokračuje až do ustálené hodnoty.

ÚKOL

- Sestrojte kalibrační křivku závislosti stupně otočení glukózy na její koncentraci v roztoku. Polarimetricky zjistěte koncentraci neznámých vzorků glukózy.
- Pro čerstvě připravený roztok glukózy stanovte závislost stupně otočení glukózy na čase (sledování mutarotace).

POMŮCKY A CHEMIKÁLIE

- Automatický polarimetr; manuální polarimetr + zdroj světla (sodíková výbojka); 2× polarimetrická kyveta; 6× 50ml odměrná baňka; dělená pipeta (25 ml); pipetovací nástavec; 3× kádinka; lžička; navažovací lodička; tyčinka; zásobní roztok glukózy ($2,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$); glukóza ($M_r = 180,1559$); neznámý vzorek I a II.

POSTUP

➤ POLARIMETRICKÉ STANOVENÍ GLUKÓZY

- Ze zásobního roztoku glukózy ($2,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) připravíme řadu 5 kalibračních roztoků o koncentracích 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 a $2,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do 50ml odměrných baněk. Před odebráním potřebného množství zásobního roztoku tento roztok důkladně promícháme!
- Provedeme naplnění polarimetrické kyvety následujícím způsobem: Nejprve odšroubujeme uzávěr kyvety na jedné straně a dáme pozor, aby nevypadlo kruhové sklíčko volně vložené v uzávěru. Poté naplníme kyvetu měřeným roztokem (nejprve destilovanou vodou, poté postupně všemi kalibračními roztoky a nakonec neznámými vzorky). Dále sklíčko z boku nasuneme na trubici a uzavřeme uzávěrem. Nakonec kyvetu osušíme buničitou vatou. Především sklíčka, kterými prochází světelný paprsek, by měla být čistá a suchá. Správně naplněná kyveta nesmí obsahovat bubliny vzduchu!
- Provedeme měření na **automatickém polarimetru**: Odklopíme víko přístroje a vložíme kyvetu. Vyčkáme, až se hodnota na displeji ustálí a odečteme ji.
- Provedeme měření na **manuálním polarimetru**: U vzorku s destilovanou vodou se naučíme najít polostín, na stupnici bychom měli odečíst hodnotu $0 \pm 2^\circ$. Při měření ostatních roztoků lehce pootočíme šroubem do objevení polostínu.

➤ MUTAROTACE GLUKÓZY

- Do 50ml odměrné baňky připravíme čerstvý roztok glukózy o koncentraci $0,25 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ rozpuštěním glukózy v destilované vodě. Glukózu navážíme na lodičku na analytických vahách a za stálého míchání tyčinkou ji přispáváme do polovičního množství vody v kádince. Mícháme, dokud se všechna glukóza nerozpustí. Poté převedeme roztok do odměrné baňky a doplníme vodou po rysku. Připravený roztok si odlijeme do kádinky a kápneme do něj 2 kapky 0,1M hydroxidu sodného; roztok zamícháme tyčinkou.
- Ihned po přípravě roztoku provedeme jeho naplnění do polarimetrické kyvety. Provedeme měření na **automatickém polarimetru**: Odklopíme víko přístroje, vložíme kyvetu a kyvetový prostor opět uzavřeme. Každou 1 min odečteme hodnotu stupně otočení na displeji a pokračujeme takto v měření až do dosažení ustálené hodnoty (měření by mělo trvat přibližně 20 min).
- Po skončení měření polarimetrickou kyvetu dokonale propláchneme destilovanou vodou.

PROTOKOL

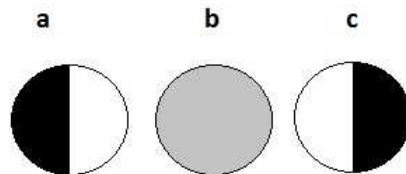
- Výpočet ředění/navážky pro přípravu veškerých roztoků.
- Pro manuální polarimetr: Naměřené hodnoty pro všechny roztoky.
- Pro automatický polarimetr: Kalibrační tabulka a graf: závislost stupně otočení glukózy na koncentraci kalibračních roztoků c ($\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$). Výpočet koncentrace neznámých vzorků z rovnice lineární regrese kalibrační přímky.
- Pro mutarotaci: Tabulka a graf závislosti stupně otočení glukózy na čase t (min).

Návod na obsluhu manuálního polarimetru

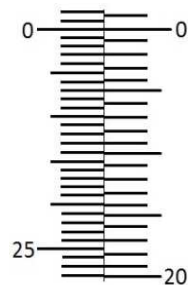
- Jedná se o manuální polarimetr s otočným hranolem. Stupeň otočení se odečítá na kruhové stupnici pomocí nastavení vhodného polostínu přes okulár.
- Součástí přístroje jsou okulár (1), stupnice pro odečet stupně otočení (2), měrný šroub (3), kyvetový prostor (4), zdroj světla (5).



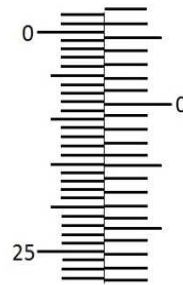
- Zdroj světla se zapojí do sítě.
- Do kyvetového prostoru se vloží kyveta s destilovanou vodou a prostor se uzavře víkem.
- Měrný šroub se snažíme nastavit do takové polohy, abychom v okuláru dosáhli polostínu.
- Průchod paprsků polarimetrem: a, c – světlo neprochází, b – světlo prochází (žádaný polostín):



- Poté provedeme odečet stupně otočení. Stupnice polarimetru se skládá ze dvou částí. Stupnice nalevo je fixní; stupnice napravo je posuvná pomocí měrného šroubu. Nejprve na levé stupnici nalezneme hodnotu 0, poté odečteme z pravé stupnice hodnotu, na kterou tato nula ukazuje. Pro blank (destilovaná voda) bychom měli na stupnici odečíst asi 0° . Pro vzorek glukózy to může být např. $5,5^\circ$.



$$\alpha = 0^\circ$$

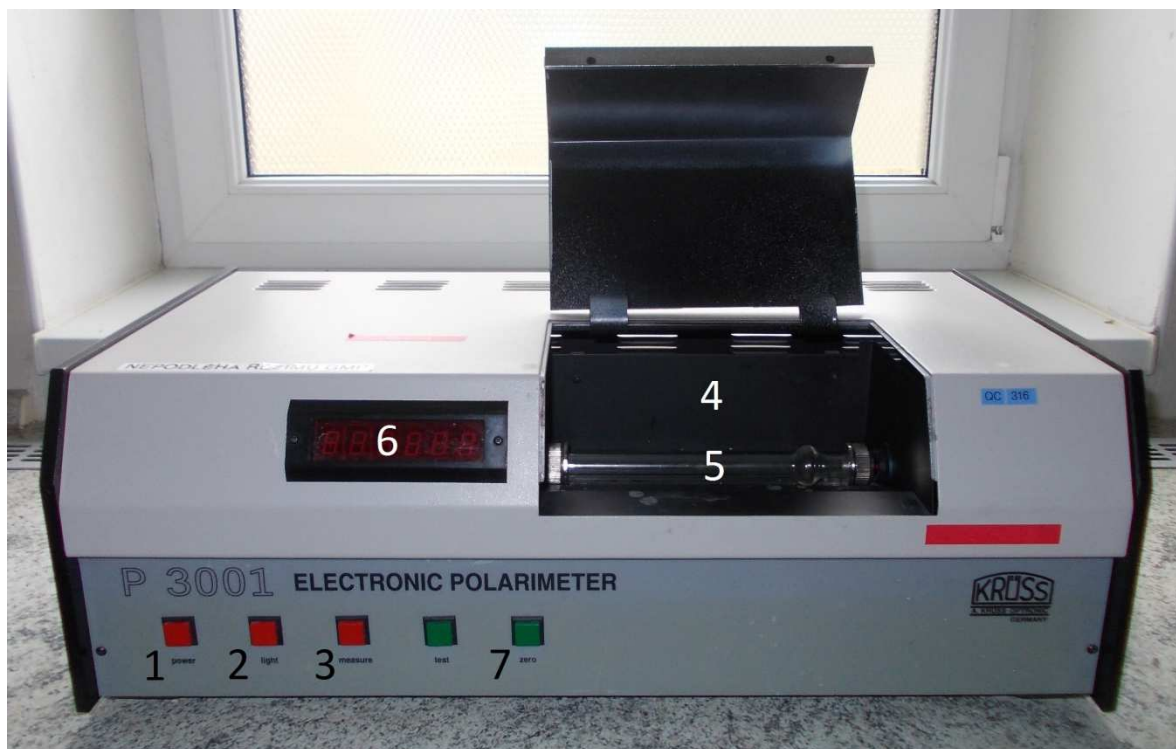


$$\alpha = 5,5^\circ$$

- Po skončení měření se zdroj světla odpojí ze sítě.

Návod na obsluhu polarimetru KRÜSS P 3001

- Polarimetr Krüss je stolní polarimetr sloužící na měření optické aktivity rozpustných substancí.
- Přístroj se síťovou zástrčkou zapojí do sítě. Zapne se tlačítkem (1).
- Přístroj se nechá 20 minut temperovat a stabilizovat. Poté je lampa přístroje vyhřátá a je možné ji zapnout tlačítkem (2). Režim měření zahájíme tlačítkem (3).
- Do měřicí komory (4) se vloží polarimetrická kyveta (5) naplněná destilovanou vodou, komora se uzavře a po ustálení hodnoty stupně otočení na displeji (6) se stiskne tlačítko (7), čímž se přístroj automaticky vynuluje. Displej ukáže hodnotu 0,000 a přístroj je připraven k měření vzorků.
- Při měření sady vzorků je dále pouze nutné vyměnit roztok v kyvetě a odečíst hodnotu na displeji.
- Po skončení měření se ukončí měřicí režim, přístroj se vypne a zhasne se lampa v pořadí tlačítky (3,1,2).



Refraktometrie

TEORIE

Monochromatické světlo, které prochází z jednoho prostředí do druhého, mění svou rychlost. Poměr rychlosti světla ve vakuu c k rychlosti světla v dalším prostředí v se nazývá absolutní index lomu n .

$$n = \frac{c}{v}$$

Při přechodu z prostředí s indexem lomu n_1 do prostředí s indexem lomu n_2 se používá relativní index lomu a odpovídá poměru: sinus úhlu dopadu lomeno sinus úhlu lomu na rozhraní prostředí.

$$n = \frac{n_1}{n_2} = \frac{v_1}{v_2} = \frac{\sin\alpha_1}{\sin\alpha_2}$$

Rychlost světla ve vzduchu a ve vakuu se liší poměrně málo, proto lze index lomu na rozhraní zkoumané látky a vzduchu považovat prakticky za absolutní index lomu.

K měření refrakce se používají přístroje zvané refraktometry. Ve cvičení se seznámíte s ručním refraktometrem, který se často používá v potravinářství při zjišťování cukernatosti ovoce, obsahu cukru ve šťávách a moštích, původním extraktu pивní mladiny aj. Stupnice % Brix, která je přepočtem indexu lomu, představuje hmotnostní procenta cukru v roztoku, tj. gramy cukru ve 100 g roztoku. Přístroj obsahuje automatickou korekci na teplotu prostředí.

ÚKOL

- Stanovte hodnotu % Brix všech připravených roztoků a vytvořte graf závislosti % Brix na koncentraci glukózy v roztoku.

POMŮCKY A CHEMIKÁLIE

- Refraktometr; 5× 50ml odměrná baňka; 2× kádinka; dělená pipeta (25 ml); pipetovací nástavec; umělohmotné kapátko; zásobní roztok glukózy ($2,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$); neznámý vzorek I a II.

POSTUP

- Ze zásobního roztoku glukózy ($2,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) připravíme řadu 5 kalibračních roztoků o koncentracích 0,50; 0,75; 1,00; 1,25 a 1,50 $\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do 50ml odměrných baněk. Před odebráním potřebného množství zásobního roztoku tento roztok důkladně promícháme!
- Postup měření na refraktometru: Na hranol nanese kapátkem destilovanou vodu a přiklopíme krycí destičkou tak, aby nevznikly bubliny. Refraktometr otočíme na zdroj světla (směrem k oknu) a pozorujeme ostré rozhraní protínající stupnici v bodě 0. V jiném případě upozorníme vyučujícího, který nám následně refraktometr seřídí. Poté na hranol nanese připravený roztok a odečteme z levé stupnice refraktometru hodnotu % Brix. Po každém měření osušíme povrch

hranolu buničitou vatou. Pro každou měřenou kapalinu (všechny kalibrační roztoky a neznámé vzorky) měření provedeme 3×.

PROTOKOL

- Tabulka naměřených hodnot pro každý vzorek a vypočítané průměrné hodnoty.
- Graf závislosti % Brix na koncentraci glukózy. Odečtení hodnoty koncentrace neznámých vzorků.