

6. POLARYMETRIA CUKRÓW

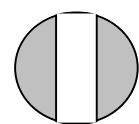
1. Obsługa polarymetru i odczytanie kąta skręcenia rozpuszczalnika

Zasada:

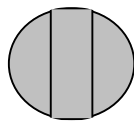
Większość związków organicznych, występujących w organizmach żywych należy do optycznie czynnych, które cechuje zdolność skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego. Polarymetria wykorzystuje zjawisko skręcania płaszczyzny światła spolaryzowanego do wykrywania lub oznaczania stężenia substancji optycznie czynnej. Pomiar taki są stosowane m.in. w analizie środków leczniczych. Przyrządem służącym do oznaczania kąta skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego jest polarymetr. Posiada on dwa pryzmaty Nicola (nikole), z których pierwszy jest nieruchomy i służy do wytwarzania wiązki światła spolaryzowanego. Drugi natomiast – ruchomy wokół osi optycznej i sprzężony ze skalą kątową – służy do odczytu wielkości kąta skręcenia. Światło spolaryzowane wykazuje maksymalne natężenie, gdy płaszczyzny polaryzacji obu pryzmatów Nikola są do siebie ustawione równoległe. Maksymalne zaciemnienie, czyli wygaszenie światła osiąga się wówczas, gdy płaszczyzny polaryzacji obu pryzmatów są do siebie prostopadłe (skrzyżowane). Zasada działania polarymetru opiera się na tym, że jeśli między skrzyżowane nikole umieści się substancję optycznie czynną, która skręca płaszczyznę światła spolaryzowanego o kąt α , to pole widzenia w okularze rozjaśni się proporcjonalnie do stężenia tego związku. W polarymetrze źródłem światła jest lampa sodowa połączona z zasilaczem doprowadzającym prąd. Pole widzenia w okularze polarymetru podzielone jest na trzy pionowe części, które mogą być różnie oświetlone:

- a) wszystkie pola są jednakowo i maksymalnie przyciemnione,
- b) wszystkie pola są jednakowo i maksymalnie rozjaśnione,
- c) środkowe pole jest ciemne, a boczne oba pola są jasne,
- d) środkowe pole jest jasne, a boczne oba pola są ciemne.

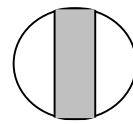
Rodzaje pól widzenia w polarymetrze



a
lewoskrętna
substancja



b
wygaszenie całkowite



c
prawoskrętna
substancja

Polarymetr jest standardowo tak wyregulowany, że jeśli w rurce polarymetrycznej nie ma substancji optycznie czynnej i jeśli zerowa kreska podziałki kątownej pokrywa się z zerową kreską podziałki noniusza, wówczas wszystkie części pola widzenia w okularze są jednolicie szaro oświetlone (wygaszone), tak jak w pozycji „b” na rysunku.

Wykonanie:

- Zasilacz włączyć na 15 min przed pomiarem.
- Przygotowanie polarymetru do pomiaru polega na takim ustawieniu pola widzenia (obracając pokrętkę analizator), które będzie jednakowo i maksymalnie przyciemnione. W takim położeniu tarcza z podziałką kątową wskazuje zero.
- Przygotować rurkę polarymetryczną: wymyć, przepłukać wodą destylowaną i osuszyć.
- Porcelanowa rurka polarymetryczna na obu końcach jest nagwintowana, a brzegi są gładko zeszlifowane, dzięki czemu można je zamknąć płaskimi krążkami szklanymi, dociskając specjalnymi nakrętkami z otworem pośrodku.
Uwaga! Między szklanym krążkiem a nakrętką umieszcza się miękką podkładkę, aby nie uszkodzić szklanego krążka przy dokręcaniu nakrętki.
- Przed napełnieniem rurki zamknąć jeden jej koniec, sprawdzić szczelność wodą destylowaną i ustawić pionowo.
- Rurkę polarymetru napełnić rozpuszczalnikiem, wodą, wlewając jej na tyle, aby nad otworem utworzył się wyraźny wypukły menisk. Szklany krążek trzymany poziomo oprzeć samym brzegiem o brzeg rurki i szybkim ruchem nasunąć na otwór.
- Sprawdzić, czy nie ma bańki powietrza, jeśli jest, należy zdjąć szklany krążek i powtórzyć staranniej wszystkie czynności, wcześniej dolewając rozpuszczalnika do wyraźnego wypukłego menisku.
- Jeśli pod krążkiem brak bańki powietrza, rurkę można zamknąć; na krążek położyć podkładkę, po czym docisnąć nakrętkę.

- Osuszyć starannie bibułą zewnętrzne powierzchnie szklanych krążków w otworach nakrętek.
- Napełnioną rurkę starannie osuszyć przed włożeniem do przygotowanego polarymetru ze skrzyżowanymi nikolami. Sprawdzić, czy nastąpiła zmiana w obrazie widzianym w okularze. Jeśli rozpuszczalnik zmienił obraz w okularze, należy pokrętkiem obrócić analizator na tyle, aby przywrócić wyjściowe pole widzenie, czyli jednakowo i maksymalnie przyciemnione.
- Kąt, o który należało obrócić analizator, odczytać ze skali: górnej wskazującej całe stopnie i dolnej, czyli noniusza, z ułamkami stopni.
- Kąt skręcenia α odczytać 5-krotnie. Obliczyć średni kąt skręcenia α .
- W celu opróżnienia rurki po pomiarze wystarczy odkręcić tylko jedną nakrętkę, wylać rozpuszczalnik i rurka jest gotowa do następnego ćwiczenia.

2. Wyznaczanie skręcalności właściwej; identyfikacja cukrów

Zasada:

Wartością charakteryzującą dany związek optycznie czynny jest skręcalność

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{c(\text{g / ml}) \cdot l(\text{dm})}$$

właściwa:

gdzie:

$[\alpha]_D^{20}$ – skręcalność właściwa rozpuszczonej substancji wyrażona w stopniach, indeks górny ²⁰ oznacza temperaturę pomiaru; indeks dolny _D oznacza światło monochromatyczne, linia D lampy sodowej (589,3 nm);

α – zmierzony kąt skręcenia płaszczyzny światła spolaryzowanego wyrażony w stopniach;

c – stężenie roztworu wyrażone w g/ml;

l – grubość warstwy roztworu, wyrażona w dm, przez którą przechodzi światło spolaryzowane.

Znając stężenie cukru w roztworze oraz wartość kąta skręcenia α płaszczyzny światła spolaryzowanego, można obliczyć skręcalność właściwą, na podstawie której identyfikuje się nieznaną cukier.

Wykonanie:

- Postępując zgodnie z instrukcją zawartą w ćwiczeniu 1 – napęlnić rurkę polarymetru badanym roztworem nieznanego cukru o stężeniu 10% (w/v).
- Napęlnioną rurkę umieścić w polarymetrze.
- Odczytać 5-krotnie kąt skręcenia α analizowanego roztworu.
- Obliczyć średni kąt skręcenia α .
- Obliczyć skręcalność właściwą.
- Obliczoną skręcalność właściwą porównać z tabelarycznymi wartościami i zidentyfikować analizowany sacharyd.

3. Oznaczanie stężenia D-monocukru

Zasada:

W polarymetrii nie trzeba przygotowywać wykresu kalibracyjnego. Związek między mierzoną wartością kąta skręcenia płaszczyzny polaryzacji a wartością szukaną, czyli stężeniem, wyznacza wartość skręcalności właściwej (którą można odczytać z odpowiednich tabel, załączonych w *Dodatkach* na końcu *Praktikum*) i jest prostym równaniem matematycznym. Łatwo można zapewnić warunki stosowania tej matematycznej zależności.

Wykonanie:

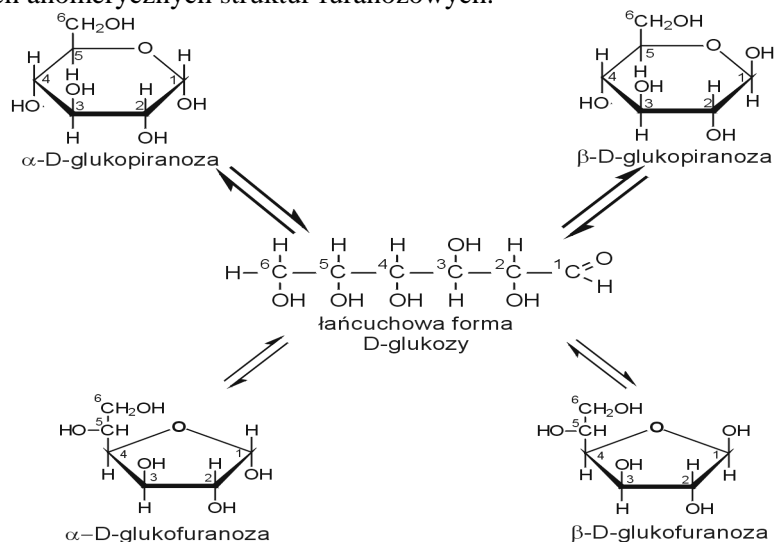
- Postępując zgodnie z instrukcją zawartą w ćwiczeniu 1 – rurkę polarymetryczną napęlnić wskazanym przez asystenta roztworem cukru o nieznanym stężeniu.
- Napęlnioną rurkę umieścić w polarymetrze.
- Odczytać w polarymetrze 5-krotnie kąt skręcenia α .
- Obliczyć średni kąt skręcenia α .
- Obliczyć stężenie (g/ml) analizowanej próby.

4. Analiza zjawiska mutarotacji

Zasada:

Monosacharydy w stanie krystalicznym i prawie całkowicie w roztworach wodnych mają strukturę pierścieniową. Struktury pierścieniowe są konsekwencją utworzenia wewnątrzcząsteczkowego hemiacetalu lub hemiketalu. Podczas cyklizacji monosacharydów powstaje nowe centrum asymetrii, którym jest półacetalowy atom węgla, tj. C-1 w aldozach i C-2 w ketozach. Nowe asymetryczne atomy węgla nazywane są anomerycznymi. Monocukry pierścieniowe wystę-

pują zatem w dwóch dodatkowych postaciach izomerów przestrzennych, które nazywają się anomerami. Anomery różnią się położeniem grupy –OH przy anomerycznym atomie węgla oraz takimi właściwościami, jak temperatura topnienia i skręcalność właściwa. Anomer α , monocukru przedstawionego wzorem Hawortha, oznacza ten izomer, w którym grupa –OH przy anomerycznym atomie węgla znajduje się pod płaszczyzną pierścienia, czyli po innej stronie płaszczyzny pierścienia niż ostatnia grupa –CH₂OH w szeregu D. Anomer β oznacza ten, w którym grupa –OH znajduje się nad płaszczyzną pierścienia, czyli po tej samej stronie płaszczyzny pierścienia, co ostatnia grupa –CH₂OH w szeregu D. Mutarotacja to zjawisko zachodzące krótko po rozpuszczeniu krystalicznego monosacharydu w wodzie i polega na przechodzeniu jednej formy anomerycznej w drugą za pośrednictwem formy łańcuchowej monocukru. Towarzyszy temu postępująca zmiana skręcalności właściwej roztworu (wzrost lub spadek), aż do ustalenia się stanu równowagi, w której skręcalność właściwa przyjmie już stałą wartość. Mutarotacja jest podstawowym dowodem pierścieniowej budowy monosacharydów, można ją obserwować w świeżo sporządzonych roztworach, ponieważ oba anomery różnią się skręcalnością właściwą. W stanie równowagi jedynie około 36% cząsteczek D-glukopiranozy pozostanie w postaci anomeru α , około 64% cząsteczek będzie w formie β -D-glukopiranozy, jedynie 0.02% cząsteczek wystąpi w formie łańcuchowej. Ilościowa przewaga β -D-glukopiranozy w roztworze wodnym wynika z faktu, że w tej formie wszystkie grupy OH przyjmują korzystne pod względem energetycznym położenia ekwatorialne. W roztworach wodnych D-glukozy występują również śladowe ilości dwóch anomerycznych struktur furanozowych.



Wykonanie:

- Postępując zgodnie z instrukcją zawartą w ćwiczeniu 1 – przygotować rurkę polarymetryczną do napełnienia.
- 2,5 g D-glukozy rozpuścić w małej ilości wody i uzupełnić do 25 ml. Świeżo sporządzonym 10% roztworem D-glukozy napełnić rurkę, umieścić ją w polarymetrze i natychmiast odczytać kąt skręcenia α . Odczyty powtarzać w 15-minutowych odstępach czasu, aż do ustalenia równowagi.
- Dla każdego punktu pomiarowego obliczyć skręcalność właściwą roztworu D-glukozy.
- Wykreślić zależność skręcalności właściwej od czasu trwania mutarotacji.
- Wyjaśnić zaobserwowane zmiany oraz zidentyfikować formę anomeryczną D-glukozy, którą rozpuszczono w wodzie.

ODCZYNNIKI

10% roztwory nieznanymi D-cukrów; 4 roztwory D-fruktozy i 4 roztwory D-glukozy o różnych nieznanymi stężeniach, które przygotowano przynajmniej 1 godzinę przed ćwiczeniem; D-glukoza *in subst.*;

NOTATKI