

# **Použití nových voltametrických metod v oblasti analýzy polymerů**

Bc. Jana Grebeníčková

---

Diplomová práce  
2006



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

\*\*\*nascannované zadání s. 1\*\*\*

\*\*\*nascannované zadání s. 2\*\*\*

## **ABSTRAKT**

Tato práce se zabývá modifikací staré voltametrické metody, která byla využita pro stanovení řetězové hmotnosti hydrolyzátu kolagenu. Jelikož se hydrolyzát kolagenu přidává např. do směsi pro výrobu folií, byla oblast zkoumání rozšířena o polyvinylalkohol a Xanthan. Tyto látky také tvoří komplex s  $\text{Cu}^{2+}$  a stanovení ruší. Z poznatků byla získána nová metoda stanovení těchto vybraných látek. Tato metoda je velmi přesná, ale není selektivní.

Klíčová slova:

Diferenčně pulsní voltametrie, hydrolyzát kolagenu, polyvinylalkohol, Xanthan, měď, DPV, PVA

## **ABSTRACT**

In this work is dealt with old voltammetric method, which was utilized for determination of chain weight of hydrolysate of collagen. Hydrolysate of collagen is adding to e.g. plastic film. Therefore the area of investigation was expanded about polyvinyl alcohol and Xanthan. These matters also form complex with  $\text{Cu}(2+)$  and the determination is upset. There was obtain new method of determination of these matters. This method is very specific, but is not sensitive.

Keywords:

Differential pulse voltammetry, hydrolysate of collagen, Xanthan, polyvinyl alcohol, copper, DPV, PVA

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu své diplomové práce Ing. Josefu Houserovi, Ph.D. za odborné vedení, věcné připomínky a trvalý zájem při vypracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí za poskytnutí zázemí pro vypracování této práce, stejně tak mé díky patří celému kolektivu.

Prohlašuji, že jsem na celé diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala.

Ve Zlíně 26.5.2006

.....

Podpis diplomanta

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
<b>1 HYDROLYZÁT KOLAGENU</b> .....	<b>10</b>
1.1 VLASTNOSTI .....	10
1.2 SLOŽENÍ.....	10
1.3 POUŽITÍ.....	10
1.4 STANOVENÍ.....	11
<b>2 POLYVINYLALKOHOL</b> .....	<b>15</b>
2.1 VLASTNOSTI A POUŽITÍ.....	15
2.2 STANOVENÍ.....	16
<b>3 XANTHAN</b> .....	<b>19</b>
3.1 VÝSKYT A STRUKTURA .....	19
3.2 VLASTNOSTI .....	19
3.3 STANOVENÍ.....	20
<b>4 MĚĎ</b> .....	<b>21</b>
4.1 VÝSKYT A VÝROBA .....	21
4.2 VLASTNOSTI A POUŽITÍ.....	21
4.3 STANOVENÍ.....	22
<b>5 ZHODNOCENÍ LITERATURY</b> .....	<b>25</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>26</b>
<b>6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>27</b>
6.1 CHEMIKÁLIE .....	27
6.2 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ.....	28
6.3 CHARAKTERISTIKA ANALYZOVANÝCH VZORKŮ.....	29
6.4 ROZTOKY A JEJICH PŘÍPRAVA .....	29
6.4.1 Základní elektrolyty .....	30
6.5 PRACOVNÍ POSTUPY .....	31
<b>7 VÝSLEDKY A DISKUZE</b> .....	<b>34</b>

7.1	VLIV PROSTŘEDÍ.....	35
7.2	VLIV HYKOLU.....	40
7.3	VLIV POLYVINYLALKOHOLU .....	44
7.4	VLIV XANTHANU.....	46
7.5	ANALÝZA VZORKŮ .....	48
7.5.1	Stanovení koncentrace .....	49
7.5.2	Stanovení řetězové hmotnosti peptidů.....	51
	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>56</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>57</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>60</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>61</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>63</b>

## ÚVOD

Téma životního prostředí se stává novým komplexnějším pohledem na svět oproti pohledu minulosti. Dříve byl výzkum zaměřen na hledání nových postupů a strategií, které nám mají zlepšit, usnadnit a zpříjemnit život bez ohledu na okolí. S novými objevy však vyvstala otázka, do jaké míry nové technologie náš život ovlivňují a zda pod vidinou obrovských zisků dokážeme zachovat svět i pro další generace.

Odpovědí nám může být rozvoj analytických metod, které jsou součástí každého procesu. Už předvýrobní a výzkumné etapy se bez přesných analýz neobejdou a i do právního prostředí pronikají závazky plynoucí z těchto aspektů. Za pozitivní přístup můžeme také považovat změny na žebříčku hodnot posouzení kvality. I přesto že finanční stránka má zatím své prvenství, druhé místo pomalu a snad i jistě obsazuje vliv na člověka a životní prostředí.

Proto se v 21. století vědecký zájem stále intenzivněji soustředí na hledání nových materiálů, jejichž vlastnosti budou lépe vyhovovat očekávaným ekologickým, strategickým a ekonomickým nárokům. Hlavními kritérii jsou biologická rozložitelnost, nevyčerpatelnost a také se upřednostňuje přírodní charakter před syntetickým. Mezi takové látky patří mimo jiné ty, na něž se zaměřuje tato práce – tedy hydrolyzát kolagenu xanthan a polyvinylalkohol.

Dosavadní výzkum uvedených polymerů vyjma PVA se zabýval spíše stanovováním jejich vlastností, nikoli jejich kvantitativní analýzou, která je nepostradatelným předpokladem pro vhodné užití těchto látek např. v potravinářském, obalovém nebo stavebním průmyslu.



## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

# 1 HYDROLYZÁT KOLAGENU

## 1.1 Vlastnosti

Hydrolyzát kolagenu se získává dvoustupňovou hydrolýzou chromočiněných postružin katalyzovanou proteolytickými enzymy (alkalázy). Hlavní výhodou tohoto procesu jsou nízké reakční podmínky, dané maximální teplotou 80°C, alkalitou směsi o pH v rozmezí 8-9 a atmosférickým tlakem. Vzniklý produkt (hydrolyzát) se odpaří a používá se jako suchý, ve formě bílého prášku, nebo jako 30-50% roztok. Množství chromu ve vzniklém produktu dosahuje hodnot 20-30 mg.g<sup>-1</sup>. Na trh je dodáván pod obchodním označením Hykol E [1]. Jedná se o přírodní nízkomolekulární směs oligopeptidů. Z hlediska aerobního biologického rozkladu ve vodném a půdním prostředí se jedná o snadno biologicky odbouratelnou látku s minimálním dopadem na ekosystém [2].

## 1.2 Složení

Hykol E obsahuje cca 95% sušiny

cca 10% dusíku

cca 8% popele

MH = 10 000-16 000

Největší procentuální zastoupení z aminokyselin v tomto bílkovinném hydrolyzátu má glycin (33,0%), prolin (12,5%) a hydroxyprolin (10,0%).

## 1.3 Použití

30-50% roztok hydrolyzátu lze použít :

- jako dusíkaté organické hnojivo
- spolu s fosforem a draslíkem jako NPK hnojivo
- k modifikaci aminoplastů
- na výrobu biodegradabilních fólií

Práškový produkt lze využít :

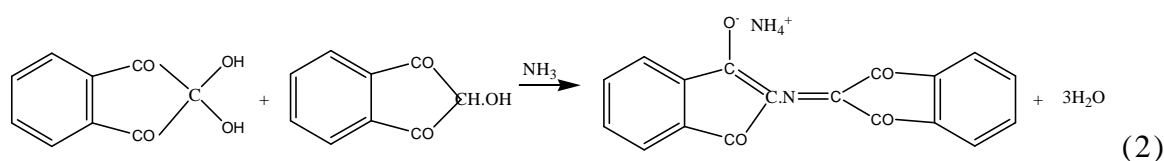
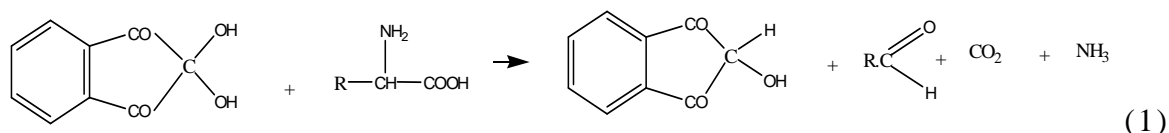
- jako stabilizátor tuhnutí
- jako přísadu k sádrovým a betonovým směsím pro modifikaci reologických vlastností [3]

Hykol se ve směsích s PVA používá i jako modifikátor, zlepšující biodegradační vlastnosti. Do určité míry zlepšuje mechanické vlastnosti a je vhodný také z důvodů ekonomických. Pokud je ovšem přidán ve vyšší koncentraci, způsobuje problémy během výrobního procesu, neboť dochází k nárůstu viskozity v tavenině [4].

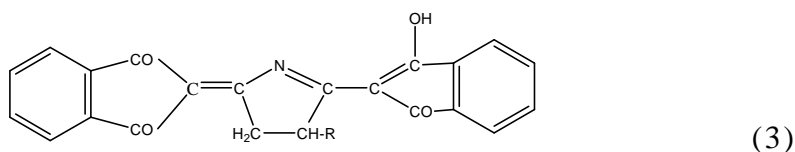
## 1.4 Stanovení

### Stanovení volných $\text{NH}_2^-$ skupin

Zjišťování bílkovinného podílu pomocí stanovení volných  $\text{NH}_2^-$  skupin provedli autoři [5] u folií PVA/hydrolyzát kolagenu. Jedná se o reakci s ninhydrinem nebo s kyselinou 2,4,6-trinitrobenzensulfonovou. Reakce se řídí pravděpodobně těmito rovnicemi:



Látky s volnou aminoskupinou poskytují s ninhydrinem modře až fialově zbarvené kondenzační produkty, různého odstínu i intenzity stanovitelné spektrofotometricky. Výjimku v barvě tvoří pouze prolin a hydroxyprolin. Reagují s ninhydrinem za vzniku žlutého kondenzačního produktu:



Do malých zkumavek se odpipetuje 1 ml vzorku a 0,5 ml ninhydrinového činidla. Zkumavky se vloží na 15 minut do vroucí vodní lázně. Poté se zkumavky ochladí a jejich obsah se zředí 5 ml 50% ethanolu; v případě příliš intenzivního zbarvení i větší objemem.

Intenzita modrofialového zbarvení se proměří při 570 nm proti slepému pokusu – destilované vodě. Jako kalibrační standard se používá L-leucin.

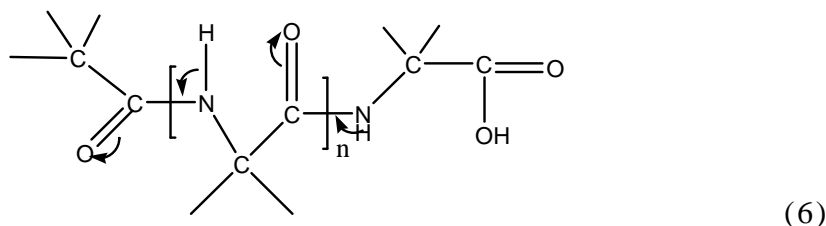
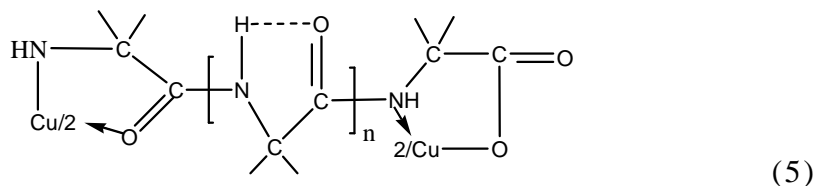
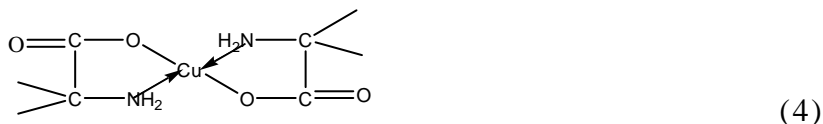
### Kapilární elektroforéza

Jinou metodou stanovení kolagenu a jeho hydrolyzátu popsali B. Vallejo-Cordoba a kol. [6] ve své práci, kde sledovali pravost masných výrobků. Mimo popisu DNA jednotlivých druhů masa se také zaměřili na určení množství kolagenu, který se přidává do výrobků jako nadstavovadlo. Podle množství tohoto kolagenu rozhodovali o autenticitě produktů. Velké množství kolagenu v masných produktech může indikovat přítomnost většího obsahu masa horší kvality.

Kolagen obsahuje značné množství hydroxyprolinu a podle tohoto množství určovali množství kolagenu ve vzorku. Pro stanovení použili micelární elektrokinetickou kapilární elektroforézu. Aminokyseliny z hydrolyzované tkáně byly „označeny“ pomocí dvoukrokového procesu, kde v první fázi probíhá reakce s o-ftalaldehydem k modifikování primárních aminů a následně jejich vysrážení v kyselém prostředí. V druhé fázi pak reagují iminokyseliny s fenylosokyanátem. Takto označené látky se nechají snadno stanovit elektroforézou, přičemž „značkovácí“ metoda je rychlá a detekce hydroxyprolinu je srovnatelná s běžnými metodami.

### Polarografie

Podle Buděšínského [7] aminokyseliny a peptidy vytvářejí s mnoha dvojmocnými kovy komplexy analogické měďnatým komplexům (4). Nejvyšší konstanty komplexity mají komplexy rtuťnaté, měďnaté, beryllnaté, nikelnaté a zinečnaté. Orientačními pokusy však zjistili, že pro stanovení aminokyselin mají největší význam komplexy měďnaté.



Z chování peptidů za podmínek stanovení aminokyselin je možno předpokládat, že měďnaté komplexy peptidů mají strukturu znázorněnou vzorcem 5. Ze vzorce je patrné, že komplexotvornost peptidů je tu podmíněna sterickým uspořádáním řetězce a specifickou nukleofilností dusíku a kyslíku v koncových skupinách  $\text{>N}^-\text{H}$  a  $\text{>C}=\text{O}^-$ . N-acylace vede téměř k úplnému potlačení komplexotvornosti aminokyselin a peptidů. K vysvětlení tohoto jevu lze předpokládat ovlivnění karbonylové skupiny elektronovým mechanismem znázorněným schématem 6. U neacylovaných peptidů by byl takovýto elektronový posun potlačován nukleofilností koncové aminoskupiny.

Tyto měďnaté komplexy lze využít mimo jiné ke stanovení řetězové hmotnosti peptidů [8]. To je, podobně jako stanovení jodometrické (viz stanovení PVA) založeno na převedení mědi z nerozpustné suspenze do rozpustných měďnatých komplexů a stanovení takto komplexně vázané mědi. V boraxovém prostředí o  $\text{pH}=9,2$  vznikají komplexy peptidů, které mají vzhledem k mědi poměr 1:1 a komplexy aminokyselin s molárním poměrem převážně 2:1. Na tomto základě je možno interpretovat výsledky naměřené koncentrace mědi v hodnotách molární koncentrace peptidů a po hydrolýze na volné aminokyseliny určit molární koncentraci aminokyselin. Podíl obou koncentrací potom vyjadřuje přímým způsobem řetězovou

hmotnost peptidu. Tak se metoda stává jednoduchou analytickou záležitostí. Měď je možno stanovit spektrofotometricky, polarograficky nebo chelatometrickou titrací.

Vzorek rozpuštěný ve vodě se smíchá se suspenzí fosforečnanu měďnatého. Po protřepání a stání 5 minut se suspenze odstředí, odebere se supernatant a přidá se kyselina chlorovodíková, zředěný amoniak a nasycený roztok siřičitanu sodného, 0,5% roztok želatiny, promíchá se a měří se na polarografu na vzduchu od 0,2 do 0,8 V. U téhož vzorku se provede hydrolyza s koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou v zatavené ampuli 18 až 24 hodin při teplotě 110°C. Po ochlazení se odpaří do sucha a destilovanou vodou se doplní na původní objem. Tento roztok se také třepe se suspenzí fosforečnanu měďnatého a další postup je stejný jako v případě vodného roztoku vzorku.

Současně se vzorkem je nutné provést slepý pokus s roztokem obsahujícím všechny chemikálie kromě vzorku, aby se korigoval obsah mědi v produktu rozpustnosti měďnaté suspenze a použitých roztocích.

Popsaná metoda se osvědčila pro rozpustné peptidy o malé až střední molekulové hmotnosti. Nedokáže rozlišovat mezi dipeptidem a aminokyselinou, protože obě látky rozpustí stejná množství mědi. Postup je rychlý a jednoduchý, velmi vhodný pro technologické studie i výzkumné práce.

## 2 POLYVINYLALKOHOL

### 2.1 Vlastnosti a použití



Polyvinylalkohol (PVA) je ve vodě rozpustný polymer, vyráběný hydrolýzou polyvinylacetátu [9]. Zatímco rozpustnost ve vodě se u PVA zvyšuje se snižováním molekulové hmotnosti, stabilita, protažení, strukturální pevnost a flexibilita se naopak se vzrůstající molekulovou hmotností zvyšují. Povrchové napětí PVA roztoků se mění s koncentrací, stupněm hydrolýzy a s molární hmotností. PVA vykazuje dobrou adhezi k hydrofilním materiálům.

PVA je oxidován peroxidem vodíku, kyselým roztokem dichromanu draselného, dusičnanem ceričitým a jodistanem. Botná v polyhydrických alkoholech, zejména za vysoké teploty. Je odolný vůči uhlovodíkům (včetně benzínu), chlorovaným uhlovodíkům, alkoholu, acetonu, esterům karboxylových kyselin, rostlinným a živočišným tukům a olejům.

Malé koncentrace silných kyselin a zásad PVA z roztoku nevysráží. Avšak u PVA, částečně hydrolyzovaného ve vodném roztoku, může přídavek silné kyseliny nebo zásady způsobit zvýšení stupně hydrolýzy. Za extrémních podmínek pH se hydrolýza ukončuje. Úplně hydrolyzované vzorky PVA jsou v podstatě neovlivnitelné hodnotou pH. PVA může absorbovat velké množství vody. Při vyšších koncentracích reaguje s vodnými alkáliemi za vzniku gelů.

Ve své struktuře vždy obsahuje proměnlivé množství acetátových skupin, které mohou značně ovlivnit jeho vlastnosti. PVA je odolný vůči abiogenním degradačním procesům. V suchém stavu je odolný vůči plísním i bakteriím, ale jeho vodné roztoky podléhají mikrobiální degradaci.

O PVA byl nedávno projeven opětovný zájem díky výrobě ekologicky neškodných plastů. Vlastnosti výrobků z PVA závisejí na vlastnostech a

strukturu polymeru sloužící k jeho přípravě. Stupeň hydrolyzy se obvykle pohybuje v rozmezí asi od 79 do 99% [10]. Aplikace PVA v průmyslu mohou být rozděleny do těchto hlavních skupin: obalové materiály, adheziva a folie. Rozložitelné výrobky založené na bázi PVA se mohou nacházet v prostředí aniž by měly vliv na integrovaný systém zpracování odpadů. Základní vlastnosti těchto směsí závisí na stupni polymerace, stupni hydrolyzy, distribuci hydroxylových skupin, krystalinitě PVA [11].

### Modifikovaný polyvinylalkohol

PVA jako poměrně rozšířený polymer byl modifikován řadou přírodních polymerů jako je odpadní želatina, cukrová třtina, škrob atd. a syntetických látek např. kyselinou poly(3-hydroxymou). Tyto látky se používají ve směsích s PVA nejen jako plnivo, ale také jako modifikátory zlepšující biologický rozklad v různých inkubačních podmínkách.

## **2.2 Stanovení**

### Turbidimetrie

V minulosti bylo popsáno několik stanovení polyvinylalkoholu. Jednou z nich je i analýza s využitím turbidimetrie [12]. Nefelometrická metoda byla použita ke stanovení PVA v průmyslových roztocích. Prvním krokem je oxidace PVA s přebytkem  $\text{KMnO}_4$  v přítomnosti  $\text{HCl}$  za zvýšené teplotě, kdy vzniká stálá suspence. Oxidační parametry (čas, teplota, koncentrace  $\text{HCl}$  a poměr polymer- $\text{KMnO}_4$ ) byly optimalizovány a stabilní a reprodukovatelná suspence byla získána zahříváním roztoku po dobu 15-20 minut při teplotě  $90^\circ\text{C}$  s 2-4násobným přebytkem  $\text{KMnO}_4$ . Druhým krokem pak bylo samotné měření stupně zákalu.

Tento postup byl aplikován pro monitorování paliv, kde se PVA přidává jako gelační činidlo.

### Spektrofotometrie

Polyvinylalkohol spolu s jodem a kyselinou boritou reaguje za vzniku komplexu modrého zbarvení, jehož intenzita je závislá na koncentraci [13].



Do 50 ml odměrné baňky s pipetuje příslušné množství vzorku a doplní se do 25 ml destilovanou vodou. Vzniklý roztok se promíchá. Poté se přidá 15 ml kyseliny borité (40 g/l), 3 ml roztoku jodu (připraveného z 12,7 g jodu a 25 g KI v litru v uvedeném pořadí) a doplní se destilovanou vodou po rysku.

Absorbance se měří při 658 nm [14]. Detekční limit je 2 nebo 5 mg.l<sup>-1</sup> nebo v přítomnosti kyseliny glutarové až 0,02 mg.l<sup>-1</sup>, který je ovlivněn interferencí škrobu, který se pojí s PVA a stanovení musí předcházet časově náročná hydrolýza.

### Polarografie

Polarografické stanovení popsali autoři [13], kde PVA vytváří komplex s Cu<sup>2+</sup>. V uhličitanovém pufru se vzorek obsahující minimálně 10 µg PVA měří v rozsahu potenciálu od 0 mV do -500 mV. Silně alkalickou oblast autoři zvolili, protože Cu<sup>2+</sup> komplexy při vyšším pH jsou odolnější proti redukcii těchto komplexů při stanovení. Jako standard pro kalibrační křivku jim sloužil čistý PVA (MH=85 000-146 000, hydrolyzovaný z 87-89%). Při nízkých koncentracích PVA výsledky mohou ovlivňovat např. Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ionty a další.

### Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvou chromatografií lze stanovit PVA použitím silikagelu nebo křemeliny jako stacionární fáze [15]. Pro stanovení pomocí silikagelu se přidává roztok propanol-voda (1:1) jako vyvíjecí soustava s tím, že nezáleží na stupni polymerace polyvinylalkoholu ani na stupni saponifikace. Detekční limit uvádějí 0,03 µg. Pro chromatografii s použitím křemeliny se pracuje v systému křemelina-HClO<sub>4</sub><sup>-</sup> (HClO<sub>4</sub><sup>-</sup> je 30%). Zde také nemá vliv stupeň polymerace, ale byl zjištěn vliv saponifikace.

### Size exclusion chromatografie

Metoda analýzy PVA v polymerních mikročasticích zahrnuje úplné rozpuštění mikročastic a uvolnění enkapsulovaného PVA, který je následně rozpuštěn v horkém vodném roztoku. Analýza vzorku je zakončena size

exclusion chromatografií doplněnou evaporative light scattering (ELS) detektorem. Vysokou návratnost autoři [16] pozorovali na malém množství vzorku s detekčním limitem v rozsahu od 0,8 do 4  $\mu\text{g}$  na koloně, v závislosti na použitém detektoru.

Práce popisuje stanovení PVA ve vzorcích PLGA (polyDL-laktid-co-glikolid), kde se PVA používá jako přísada při výrobě kopolymeru a jeho množství může ovlivnit průběh procesu. Zkoumaný vzorek připravili rozpuštěním 50 mg PLGA v acetonitrilu mícháním a ponořením do ultrazvukové lázně. Pak k roztoku přidali roztok trifluoroctové kyseliny za zvýšené teploty. Poslední fází přípravy vzorku bylo jeho přefiltrování přes PFTE filtr a vysušení. Pokud vzorek obsahoval jen stopové množství PVA, byla jeho koncentrace zvýšena na 0,1-0,3% w/w.

Výhodou této metody je nízká koncentrace PVA, která může být stanovena s minimální interferencí. Postup je velmi jednoduchý a lze ho použít pro širokou škálu polymerních matic.

## 3 XANTHAN

### 3.1 Výskyt a struktura

Producentem extracelulárního Xanthanu jsou bakterie rodu *Xanthomonas* (nejčastěji se průmyslově využívá *Xanthomonas campestris*) [17].

Hlavní řetězec Xanthanu je tvořen  $\beta$ -D-(1 $\rightarrow$ 4) glukosovými jednotkami stejně jako u celulosy. Postranní řetězce (obvykle trisacharidy) jsou tvořeny zbytkem D-glukuronové kyseliny a dvěma zbytky D-mannosy.

K termální D-mannosové jednotce postranního řetězce je glycidovou vazbou  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) vázána  $\beta$ -D-glukuronová kyselina, k níž je vazbou (1 $\rightarrow$ 2) připojena  $\alpha$ -D-mannosa. Tyto postranní řetězce se váží v poloze C-3 na glukosovou jednotku hlavního řetězce. Struktura je dále komplikovaná přítomností pyrohroznové kyseliny vázané jako ketal, v polohách C-4 a C-6 na koncovou jednotku  $\beta$ -D-mannosy, tedy jako 4,6-O-(1'-karboxyethyliden)- $\beta$ -D-mannopyranosa. Vnitřní mannosová jednotka v postranním řetězci je v poloze C-6 acetylována (6-O-acetyl- $\alpha$ -D-mannopyranosa). Struktura se může lišit stupněm substituce v závislosti na produkčním kmenu bakterií. Relativní molekulová hmotnost bývá kolem 12 000 g $\cdot$ mol $^{-1}$ .

Xanthanové molekuly tvoří jednoduchou nebo dvojitou šroubovici stabilizovanou postranními řetězci.

### 3.2 Vlastnosti

Xanthan je rozpustný ve vodě, střední molekulová hmotnost se uvádí 4,80 $\cdot$ 10 $^5$  g $\cdot$ mol $^{-1}$  [18]. Disperze jsou vysoce viskózní a již při nízkých koncentracích vykazují thixotropní chování. Viskozita silně závisí na teplotě. Při ohřevu nejprve klesá, ale při dalším ohřevu opět roste (souvislost se změnami konformace molekul). Disperze Xanthanu jsou stabilní v kyselém i alkalickém prostředí a při zvýšené teplotě (do 80°C).

V přítomnosti guarové gumy se zvyšuje viskozita disperze, čehož se využívá u výrobků, kde se vyžaduje stabilní viskozita v široké oblasti koncentrací solí, pH a teplot.

Samotný Xanthan netvoří gely, avšak termoreverzibilní gely vznikají ve směsích s některými polysacharidy, např. s galaktomannany (lokustovou gumou), glukomannany (konjakovou gumou) a  $\kappa$ -karagenanem. Vznik gelu vyžaduje interakci molekul Xanthanu (uspořádaných v dvojitéch šroubovicích) s nevětvenou částí molekuly jiného polysacharidu (s jeho vazebnou zónou). Kvalitnější, elastické, soudržné gely vznikají z deacetylovaného Xanthanu.

Xanthan slouží především jako zahušřovadlo, stabilizátor emulzí, v kombinaci s jinými hydrokoloidy i jako tělotvorná látka. Jako přídatná látka má označení E 415. Termostability xanthanu se běžně využívá při přípravě instantních polévek, omáček a jako pojidla v různých konzervách.

### 3.3 Stanovení

#### Kapalinová chromatografie

Quemener a spol. [19] uvedli stanovení Xanthanu ve vzorcích potravin pomocí tří kroků. Jednalo se o homogenizaci a sušení vzorku jídla, přímá methanolysa suchého vzorku a posledním krokem byla HPLC s obrácenou fází určitého základního hydrokoloidu. Návratnost těchto stanovení byla vyšší než 80% s citlivostí detekce okolo 0,03%. Hydrokoloidy mohou být takto stanovovány bez předchozí delipidace, deprotenizace nebo hydrokoloidní extrakce.

## 4 MĚĎ

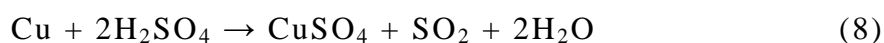
Tato práce se věnuje metodě, která využívá schopnosti vybraných polymerů tvořit komplexy s mědí. Z toho důvodu jen krátce o mědi.

### 4.1 Výskyt a výroba

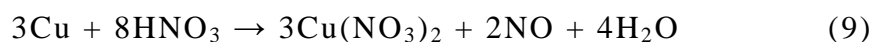
Ryzí měď se v přírodě nachází vzácně a vyskytuje se tedy převážně ve sloučeninách. Nejčastěji ji nacházíme ve formě sulfidů mezi něž patří například chalkosin ( $\text{Cu}_2\text{S}$  - sulfid měďný) nebo chalkopyrit ( $\text{CuFeS}_2$  - sulfid měďnato-železnatý). Dalšími významnými minerály jsou kuprit ( $\text{Cu}_2\text{O}$  - oxid měďný), malachit ( $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$ ) a jemu velice podobný azurit ( $2\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$ ). Měď patří také mezi biogenní prvky, protože je součástí hemocyaninu obsaženého v "krvi" měkkýšů. Měď se ale jinak vyskytuje i v lidském organismu.

### 4.2 Vlastnosti a použití

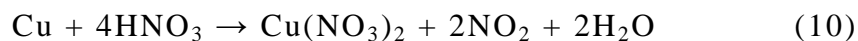
Měď je měkký a ušlechtilý kov načervenalé barvy, který výborně vede elektrický proud. Na vzduchu je měď málo stálá. Ve vlhkém prostředí se působením kyslíku, oxidu uhličitého a vzdušné vlhkosti pokrývá tenkou vrstvičkou, která se nazývá měděnka ( $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$ ). V kyselině chlorovodíkové ( $\text{HCl}$ ) a ve zředěné kyselině sírové ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) se měď nerozpouští, ale s koncentrovanou kyselinou sírovou reaguje:



Se zředěnou kyselinou dusičnou ( $\text{HNO}_3$ ) reaguje měď za vzniku oxidu dusnatého ( $\text{NO}$ ):



Naproti tomu s koncentrovanou kyselinou dusičnou reaguje za vzniku oxidu dusičitého ( $\text{NO}_2$ ):



Objevení mědi se datuje do roku 5 000 př. n. l. Limitní hodnota koncentrace pro pitnou vodu je  $0,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Jelikož je měď velmi dobrým vodičem elektrického proudu využívá se hlavně na výrobu různých vodičů. Dále se používá např. na výrobu měděných plechů nebo jako součást různých slitin. Nejznámější jsou mosazi (Cu + Zn) a bronzy (Cu + Sn). Měď ještě tvoří slitinu s niklem, která se nazývá Monelův kov, a tzv. mincovní slitiny, což jsou slitiny mědi se stříbrem nebo hliníkem. Přidává se také do klenotnického zlata a stříbra [20].

Potřebná denní dávka mědi pro dospělé je asi 1-3 mg, pro děti méně, u kojenců asi 0,5 mg. Řada potravin obsahuje měď ve zvýšeném množství například čokoláda. Přirozený obsah mědi v pitné vodě je velmi nízký. Pitná voda z veřejných vodovodů má v České republice obsah mědi v 1 litru vody asi 100 až 1000 krát menší než je potřebná denní dávka pro lidský organizmus a tak se tato voda nepodílí na příjmu mědi.[21]

### 4.3 Stanovení

#### Polarografie

Polarografické stanovení mědi lze použít pro stanovení uvedeného prvku v pitných, podzemních, povrchových a odpadních vodách [22]. Citlivost a mez stanovitelnosti měření je určována dobou elektrochemického vylučování na povrchu elektrody při definované hodnotě potenciálu. Tato doba se pohybuje v rozsahu od několika sekund do 15 minut. Mez stanovitelnosti se tedy uvádí  $3 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$  dosažitelné diferenčně pulzní anodickou rozpouštěcí voltametrií s použitím rtuťové filmové elektrody. Stanovení ruší organické (často povrchově aktivní) látky i malých koncentracích ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a vyšší). Odstraňují se mineralizací vzorku s kyselinou dusičnou a malého množství peroxidu vodíku.

Po odběru a úpravě vzorku (odběr, uchování a úprava vzorku jsou popsány českou státní normou) se provede mineralizace. 10 ml mineralizovaného vzorku se odpipetuje do elektrolytické měrné nádoby a

nechá se proudem dusíku probublávat, aby se odstranil kyslík. Měří se v rozsahu potenciálu od  $-850$  mV do  $150$  mV s dobou akumulace  $100-200$  s. Poté, co je vzorek řádně změřen, se pokračuje metodou standardního přídávku, kdy se ke vzorku přidává známá koncentrace mědi. Její objem závisí na obsahu tohoto kovu ve vzorku, např. pro koncentrace blížíící se hodnotám požadovaným pro pitnou vodu se přidává nejmenší objem, tj.  $100$   $\mu$ l pracovního roztoku mědi.

Obdobné metodiky uvádí samotný program polarografu. V prvním případě se jedná o stanovení mědi, olova a kadmia diferenčně pulsní anodickou rozpouštěcí voltametrií na visící rtuťové kapkové elektrodě (DP stripping - HMDE). Rozsah potenciálu je od  $-900$  mV do  $150$  mV s dobou akumulace  $15-300$  s.  $50$  ml vzorku se převede do  $100$  ml odměrné baňky, přidá se  $1$  ml koncentrovaná  $\text{HNO}_3$  (suprapur) a doplní se vodou na  $100$  ml.  $10$  ml se poté převede do elektrolytické nádoby a provede se měření. Měď se vyloučí při potenciálu  $10$  mV.

Je nutné provést slepý pokus při nízkých obsazích stanovovaných kovů. V případě vod obsahujících rozpuštěné organické látky apod. je nutno použít mineralizace

Druhý postup je určen pro stanovení kadmia, olova, mědi a zinku. Opět se jedná o DPASV na visící rtuťové kapkové elektrodě. Rozsah potenciálu je od  $-1200$  mV do  $150$  mV s dobou akumulace  $15-300$  s. Vyloučení mědi zůstává stejné jako u předešlé metody na  $10$  mV. Jiný je postup přípravy vzorku.  $50$  ml vzorku se převede do  $100$  ml odměrné baňky, přidá se  $0,5$  ml koncentrovaná  $\text{HNO}_3$  (suprapur) a  $1$  ml octanu sodného ( $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a doplní se vodou po rysku.  $10$  ml se poté převede do elektrolytické nádoby, přidá se  $100$   $\mu$ l roztoku Ga ( $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a provede se měření.

Podmínky pro stanovení jsou stejné jako u předchozí metody. Při současném stanovení Zn a Cu dochází k tvorbě intermetalické sloučeniny Cu-Zn-Hg, která vzniká ve rtuťové elektrodě během elektrolytické akumulace. Za těchto podmínek se většinou získají nižší výsledky pro Zn a

vyšší pro Cu, neboť elektrochemické rozpouštění intermediátu Cu-Zn probíhá při potenciálu velice blízkém rozpouštěcímu potenciálu Cu a oba signály nelze rozlišit. Vzniku této sloučeniny lze zabránit přidávkem Ga, které tvoří s mědí intermetalickou sloučeninu Cu-Ga, která je mnohem stabilnější než Cu-Zn. Samotné ionty  $\text{Ga}^{3+}$  se projeví anodickým rozpouštěcím píkem při potenciálu  $-830 \text{ mV}$ , což je hodnota dostatečně odlišná od hodnot rozpouštěcích potenciálů Zn a Cd. [23]

Existují i jiná normovaná stanovení z nichž je například norma ČSN ISO 8288 (TNV 75 7382): Jakost vod - Stanovení mědi bezplamenovou technikou AAS, která platí pro stanovení koncentrace mědi ve vodách bezplamenovou technikou atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ETA AAS). Metodu lze užít ke stanovení mědi ve všech druzích vod v koncentracích od  $2 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  do  $50 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  při objemu dávkovaného vzorku 20 l. Vyšší koncentrace je možno stanovovat při dávkování menšího objemu vzorku nebo po jeho naředění. Vody s vysokým obsahem organických látek je nutno předem minimalizovat.[21] Tato norma má široké působení a nevztahuje se jen pro vody. K dalším normám pro stanovení mědi jen jmenovitě: ČSN ISO 795 - Stanovení mědi metodou fotometrickou s oxalyldihydrazidem, ČSN 42 0689-6 - Stanovení mědi metodou fotometrickou, ČSN EN 24946 42 0515 06/94 Stanovení mědi. Spektrofotometrické stanovení 2,2-bichinolynem a jiné.



## 5 ZHODNOCENÍ LITERATURY

Při zpracování dosavadních poznatků v oblasti analýzy polyvinylalkoholu, hydrolyzátu kolagenu, Xanthanu bylo využito databází Web of Science, SciFinder a Science direct. Tyto databáze poskytly mnoho odkazů na odborné články pojednávající o tématice polymerů, ale většina z nich se odkazovala pouze na jejich aplikaci. Další velkou skupinou bylo stanovení vlastností polymerů jako jsou gelační schopnosti a fixační indexy nebo metody strukturní analýzy. Pokud se v databázi objevil odkaz na kvantitativní metodiky, byly to články a publikace převážně o obecném stanovení například pomocí stanovení celkového organického kyslíku nebo dusíku nebo pomocí chemické spotřeby kyslíku.

Polyvinylalkohol je polymer, který se na trhu objevuje už řadu let a existuje několik analytických metod stanovení. Do rešerše byla vybrána pouze ta stanovení, která popisovala odlišné způsoby stanovení, protože hlavním záměrem této práce bylo pouze voltametrické metody.

V případě stanovení Xanthanu se databáze odkázovaly na malou část odborných publikací, které popisovaly obecné stanovení, jak již bylo zmiňováno výše. Tyto makromolekulární látky teprve čekají na svůj zájem širokou vědeckou obcí, a proto zatím chybí širší oblast analytických metod.

Tato diplomová práce v experimentální části vychází z práce Galatíka [8], který popsal stanovení peptidů a aminokyselin pomocí klasické voltametrie. Tato, dnes již historická metoda byla podkladem pro tuto práci a její snaze aplikovat toto stanovení na hydrolyzát kolagenu a stanovení jeho řetězové hmotnosti. Polyvinylalkohol a Xanthan poskytují s  $\text{Cu}^{2+}$  rovněž komplexní sloučeniny, které ve směsi hydrolyzátem kolagenu ruší jeho stanovení. Proto jim ve zbývajícím čase byla věnována nemalá pozornost.

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 6 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 6.1 Chemikálie

CH <sub>3</sub> COOK	- octan draselný Mr = 98,1428 g/mol Lachema a.s., o.z., Neratovice, ČR
Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · 10 H <sub>2</sub> O	- dekahydrát tetraboritanu sodného, p.a. Mr = 381,43 g/mol Lachema a.s., o.z., Neratovice, ČR
CuCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	- dihydrát chloridu měďnatého, p.a. Mr = 170,486 g/mol Lachema a.s., o.z., Neratovice, ČR
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> · 12 H <sub>2</sub> O	- dodekahydrát fosforečnanu sodného Mr = 380,14 g/mol Lachema a.s., o.z., Neratovice, ČR
CH <sub>3</sub> COOH	- kyselina octová, p.a., 99% Mr = 60,05 g/mol Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR
NH <sub>3</sub>	- amoniak, p.a., 32% Mr = 17,03 g/mol Onex, Rožnov pod Radhoštěm, ČR
HNO <sub>3</sub>	- kyselina dusičná, 65% Mr = 63,01 g/mol Lachema a.s., o.z., Neratovice, ČR
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	- kyselina sírová, extra čistá, 90% Mr = 98,08 g/mol Ing. Petr Lukeš, Osvooboditelů 1815, Uherský Brod, ČR
HCl	- kyselina chlorovodíková, p.a., 35% Mr = 36,46 g/mol Ing. Petr Lukeš, Osvooboditelů 1815, Uherský Brod, ČR
Ar	- argon 4.8 (čistoty 99,998%) Mr = 39,948 g/mol

	Linde technoplyn a.s., ČR
HClO <sub>4</sub>	- kyselina chloristá, 70%, p.a. Mr = 100,4585 g/mol Ing. Petr Lukeš, Osvooboditelů 1815, Uherský Brod, ČR
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	- pentahydrát síranu měďnatého, p.a. Mr = 249,6796 g/mol Ing. Petr Lukeš, Osvooboditelů 1815, Uherský Brod, ČR
NaHCO <sub>3</sub>	- hydrogenuhličitan sodný, p.a. Mr = 84,01 g/mol Penta, Chrudim, ČR
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	- uhličitan draselný, p.a. Mr = 138,211 g/mol Lachema a.s., o.z., Neratovice, ČR
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	- peroxid vodíku, extra čistý, 30% Mr = 34,02 Ing. Petr Lukeš, Osvooboditelů 1815, Uherský Brod, ČR
NH <sub>4</sub> Cl	- chlorid amonný, p.a. Mr = 53,49 g/mol Lachema a.s., o.z., Neratovice, ČR

## 6.2 Přístroje a zařízení

- Eco-Tribo Polarograf s visící rtuťovou kapkovou elektrodou (HMDE) a nasycenou argentchloridovou elektrodou RAE 113, ECO-TREND PLUS s.r.o., Praha, ČR
- Centrifuga typ MPW-340, Mechanika precyzyjna, Varšava, Polsko
- Centrifuga typ MPW-310, Mechanika precyzyjna, Varšava, Polsko
- Mikrovlnný mineralizátor MLS 1200, Milestone s.r.l., Sorisole, Itálie
- pH/mV/metr MPH 61 s kombinovanou pH elektrodou pHk 01-32, Monokrystaly s.r.o., Trutnov, ČR

### 6.3 Charakteristika analyzovaných vzorků

Hydrolyzát kolagenu (hykol) –E Hykol – obsah dusíku 14%, obsah uhlíku 47,2%, sušina 97,38%,  $M_r=1\ 00\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , prášková forma, výrobce Tanex, Jaroměř a.s., ČR, ostatní vzorky byly připraveny dvoustupňovou enzymatickou hydrolýzou chromčinených postružin. Byly dodány Hasákovou z Ústavu potravinářského inženýrství a chemie a byly označeny jako H-KOL, H-HOL, VY, ICrA, E-HYKOL, VZ, HYKOL 2002 a MH

PVA – Sloviol P 88-08, viskozita 8% vodného roztoku při teplotě 20°C, 8 mPa·s, stupeň hydrolýzy 88 mol%, obsah acetátových skupin 12%, prášková forma, obsah uhlíku 47,48%, sušina 98,26%, výrobce Novácke chemické závody a.s., SR

Xanthan Gum– obsah uhlíku 31,31%, sušina 94,36%, výrobce Fluka, ČR

### 6.4 Roztoky a jejich příprava

#### Zásobní roztok mědi [22] o koncentraci $1\ \text{g}\cdot\text{l}^{-1}$

V odměrné 100 ml baňce se v kyselině chlorovodíkové (3,09 ml HCl v 1 000 ml dest.vody) rozpustí 0,3929 g  $\text{CuSO}_4\cdot 5\ \text{H}_2\text{O}$  a doplní se touto kyselinou po rysku.

#### Pracovní roztok mědi [22] o koncentraci $10\ \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$

Do 100 ml odměrné baňky se odměří 1,00 ml zásobního roztoku mědi a doplní se kyselinou dusičnou (4,5 ml konc.  $\text{HNO}_3$  v 1 000 ml dest. vody) po rysku. Tento roztok je stálý 3 dny.

#### Suspenze fosforečnanu měďnatého [8]

Do roztoku fosforečnanu sodného (5,4 g  $\text{Na}_3\text{PO}_4\cdot 12\ \text{H}_2\text{O}$  rozpuštěno ve 40 ml) byl za stálého míchání tenkým proudem vlit roztok chloridu měďnatého (1,12 g  $\text{CuCl}_2\cdot 2\ \text{H}_2\text{O}$  rozpuštěno ve 20 ml). Vzniklá suspenze byla odstředěna na centrifuze při 3 000 ot./min po dobu 5 min. Horní roztok byl odstraněn a nahrazen tímž objemem boraxového tlumiče, suspenze byla mícháním znovu rozptýlena a opět odstředěna. Takto bylo postupováno ještě

jednou a sraženina byla nakonec suspendována ve 100 ml boraxového tlumiče. Trvanlivost a použitelnost takto připravené suspenze byla asi 14 dní.

#### 6.4.1 Základní elektrolyty

Jako základní analytický elektrolyt byl vždy odpipetován 1 ml zásobního roztoku elektrolytu a doplněn do 10 ml.

##### **Zásobní roztok amoniakálního elektrolytu I o koncentraci $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$**

Do 100 ml odměrné baňky bylo pipetováno 5,87 ml konc.  $\text{NH}_3$  a přidáno 5,3491 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a následně doplněno vodou po rysku.

##### **Zásobní roztok dusičnanového elektrolytu o koncentraci $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$**

Do 100 ml odměrné baňky bylo pipetováno 6,97 ml 65%  $\text{HNO}_3$  a doplněno vodou po rysku.

##### **Zásobní roztok boraxového elektrolytu o koncentraci $0,05 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$**

4,775 g  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$  bylo rozpuštěno ve 250 ml vody.

##### **Zásobní roztok uhličitanového elektrolytu o koncentraci $0,75 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$**

Ve 100 ml destilované vody se rozpustí 8,4007 g  $\text{NaHCO}_3$  a 3,4551 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$ .

##### **Zásobní roztok elektrolytu kyseliny chlorovodíkové o koncentraci $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$**

Do 200 ml odměrné baňky bylo pipetováno 17,75 ml 35% kyseliny chlorovodíkové a doplněno vodou po rysku.

##### **Zásobní roztok elektrolytu kyseliny sírové o koncentraci $0,5 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$**

Do 250 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 6,97 ml 90%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a doplněno vodou po rysku.

##### **Zásobní roztok amoniakálního elektrolytu II o koncentraci $4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$**

1 M  $\text{HClO}_4$  bylo smícháno s 8,9 M  $\text{NH}_3$  v poměru  $\text{HClO}_4 : \text{NH}_3 = 2:1$

**Zásobní roztok amoniakálního elektrolytu III o koncentraci  $4 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$** 

0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  byla smíchána s 8,9 M  $\text{NH}_3$  v poměru  $\text{H}_2\text{SO}_4 : \text{NH}_3=4:1$ .

**Zásobní roztok elektrolytu kyseliny chloristé o koncentraci  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$** 

9,96 ml 65%  $\text{HClO}_4$  bylo doplněno na objem 100 ml.

**6.5 Pracovní postupy****Příprava vzorku se suspenzí**

Do centrifugační plastové zkumavky bylo odpipetován 1 ml vzorku a 3 ml suspenze fosforečnanu měďnatého. Směs byla protřepána a nechána 5 minut stát. Poté byla odstředěna na centrifuze při 3 000 ot./min po dobu 5 minut, načež byl odebrán čirý roztok (supernatant) k mineralizaci.

**Mineralizace**

Do methoxylové nádoby mikrovlnného karuselu byly odpipetovány 2 ml supernatantu a přidány 2 ml koncentrované  $\text{HNO}_3$  a 1 ml 30% peroxidu vodíku a mineralizováno při programu:

250 W – 5 minut

400 W – 5 minut

500 W – 10 minut

0 W ventilace – 10 minut

Karusel byl ochlazen ve studené vodě a MW mineralizát byl z nádoby kvantitativně převeden do odměrné 10 ml baňky.

**Vlastní stanovení**

Do analytické voltametrické nádoby byl odměřen 1 ml roztoku základního elektrolytu  $\text{HNO}_3$  o koncentraci  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a 9 ml destilované vody. Po 10 minutovém intenzivním probublávání argonem (odstranění rozpuštěného kyslíku z roztoku) byla změřena voltametrická křivka (takzvané pozadí). Potom byl přidán vzorek, tedy depolarizátor, o objemu 100  $\mu\text{l}$ , krátce probuláno Ar a opět změřena voltametrická křivka. Při použití metody standardních přídavek byl přidán standard a opět provedeno měření. Byly používány 4 přídávky.

Pokud bylo použito metody kalibrační přímky byl do voltametrické nádoby dávkován 1 ml roztoku základního elektrolytu a 9 ml destilované vody. Po 10 minutovém probublávání argonem bylo změřeno pozadí, načeš byl pipetován standard respektive vzorek v dávce 100  $\mu\text{l}$  a provedena analýza. Ke standardu byl přidán další přídavek standardního roztoku mědi a opět po krátkém probublání změřen. Takto bylo dále přidáno 4-6 přídavek.

Měření bylo provedeno metou diferenční pulzní voltametrie s visící kapkovou rtuťovou elektrodou a parametrů viz. tab.I.

Tab. I. : Parametry stanovení

Potenciál		Parametry metody	
Počáteční [mV]	200	Doba bublání [s]	5
Konečný [mV]	-600	Počet scanů [l]	1
Rychlost [ $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ]	20	Potenciál akumulace [mV]	200
		Doba akumulace [mV]	0
		Klidová doba [s]	10
		Výška pulzu [mV]	50
		Šířka pulzu [ms]	80

## Měření pH

Před měřením byla provedena kalibrace pH metru pomocí tlumivých roztoků o  $\text{pH}=7$  a  $\text{pH}=9$ . Korekce na teplotu během měření nebyla prováděna.

## Hydrolýza vzorků [24]

Roztoky hydrolyzátů byly připraveny rozpuštěním 0,25 g vzorku v 50 ml destilované vody. Před zahájením analýzy bylo potřeba provést totální hydrolýzu roztoku hydrolyzátů, aby bylo možno stanovit jednotlivé aminokyseliny. Základní roztoky byly připraveny v doporučeném poměru 5 mg hydrolyzátu : 1 ml 6 N HCl. Z nich bylo pipetováno po 10 ml vzorku do jednotlivých ampulí, kde byly probublávány dusíkem po dobu minimálně 5-i minut. Ampule byly zataveny a hydrolýza probíhala 72 hodin



v termostatu při teplotě 110<sup>0</sup>C. Vzorke, které nebyly ihned analyzovány, byly neotevřené skladovány v chladničce maximálně 24 hodin.

Kyselina chlorovodíková byla ze vzorku po totální hydrolýze odpařena v rotační vakuové odparce za sníženého tlaku při teplotě 50<sup>0</sup>C. Odpařování bylo prováděno za přídavku destilované vody a celkem třikrát zopakováno. Nakonec byl vzorek rozpuštěn v malém množství destilované vody, kvantitativně přenesen a doplněn v 10 ml odměrné baňce po značku.

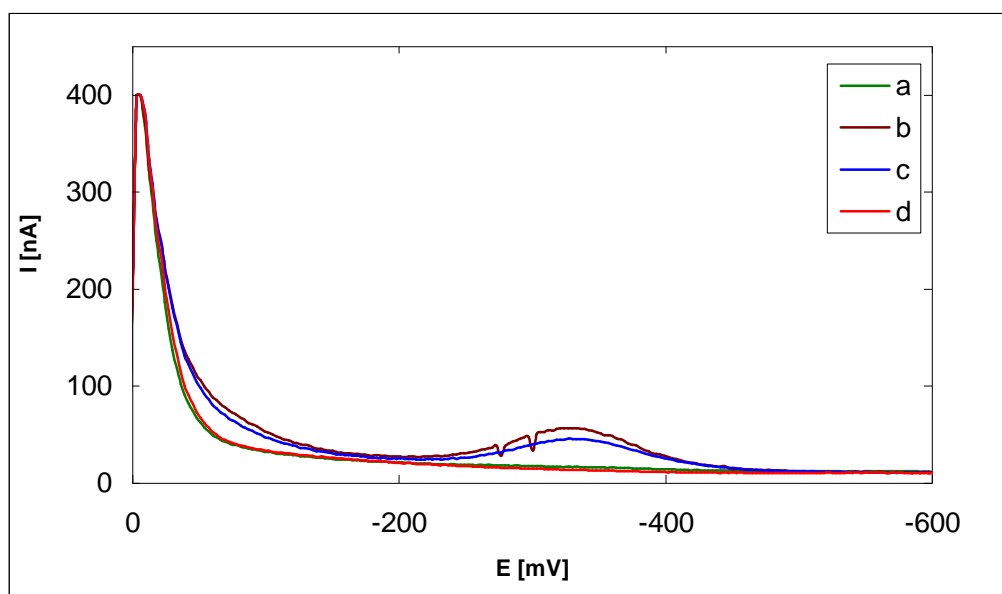
Hydrolýza byla provedena Hasákovou na pracovišti Ústavu potravinářského inženýrství a chemie

### **Chelatometrie [24]**

5 ml vzorku bylo odpipetováno do 10 ml odstředivací zkumavky. Po přídavku 5 ml čerstvě protřepané suspenze fosforečnanu měďnatého byla směs dobře promíchána. Obsah zkumavek se po 5-i minutách stání 5 minut odstředoval při 2 500 ot/min. Z horního čirého roztoku bylo odpipetováno 7 ml do titrační baňky. Po přidání 1 ml 1 M HCl a 3 kapek indikátoru PAN (pH roztoku musí být menší než 3) byla směs titrována 0,01 M chelatonem III z červenofialové do žlutozelené barvy. Spotřeba slepého pokusu byla menší než 0,05 ml 0,01 M chelatonu III.

## 7 VÝSLEDKY A DISKUZE

Na počátku práce byla snaha modifikovat dnes již historickou metodu Galatíka [8], který použil ke stanovení dvojmocné mědi klasickou polarografií, užitím moderní diferenční pulzní voltametrie s visící rtuťovou kapkovou elektrodou, která má cca o 3 řády nižší detekční limit. Měďnatý ion vázáný do komplexu s hydrolyzátem kolagenu dvěma aminokyselinami byl rozbit kyselinou chlorovodíkovou a po přidání amoniakálního pufru stanovoval údajně  $\text{Cu}^{2+}$  z amoniakálního komplexu. Jak je vidět na obr.1, nebylo možno tuto metodu přímo použít, neboť přítomnost hydrolyzátu kolagenu (Hykol-E) způsobí menší odezvu měďnatého iontu, který je pravděpodobně vázán do pevnějšího komplexu s přítomným Hykolem E.



Obr. 1:

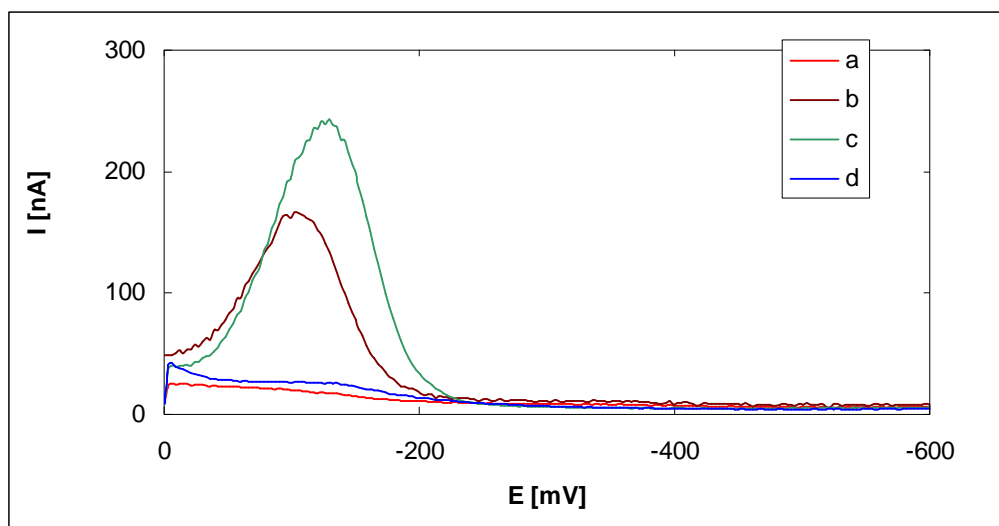
- a) Základní  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  amoniakální elektrolyt I ; b) a +  $0,05 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ,  
c) a +  $0,05 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  +  $0,05 \text{ g l}^{-1}$  Hykol E, d) a +  $0,05 \text{ g l}^{-1}$  Hykol E

Příčinu lze hledat v tom, že v klasické polarografii se přidávalo poměrně značné množství siřičitanu a především želatiny na potlačení kyslíkového maxima, který by stanovení rušil, ba možno říci, přímo znemožňoval. Při použití diferenční pulzní voltametrie však tyto vysoké přídatky chemikálií nelze přidávat. Díky podstatně vyšší citlivosti by byly potíže (což se projevilo v přítomnosti hydrolyzátu kolagenu, tedy látek

velmi obdobného složení a charakteru jako želatina) se stanovením, kdy může docházet k sorpci polymerních látek na rtuťovou elektrodu. Samotný Hykol se v amoniakálním pufru (pH=9,60) nijak neprojeví.

## 7.1 Vliv prostředí

V první fázi diplomové práce tedy byly odzkoušeny různé typy základních elektrolytů a to od alkalických až po silně kyselé, jak je vidět na následujících obrázcích. Je-li katodická redukce realizována v silně kyselém prostředí (0,1 M HCl o pH=1,06), je rozdíl mezi píkem měďnatého iontu a měďnatého iontu vázaného do komplexu s Hykolem markantní (obr.2) a to nejen co se týče potenciálu  $E_p$ , ale i výšky píku  $i_p$ . Chování Hykolu v roztoku kyseliny chlorovodíkové je bez výrazných projevů.

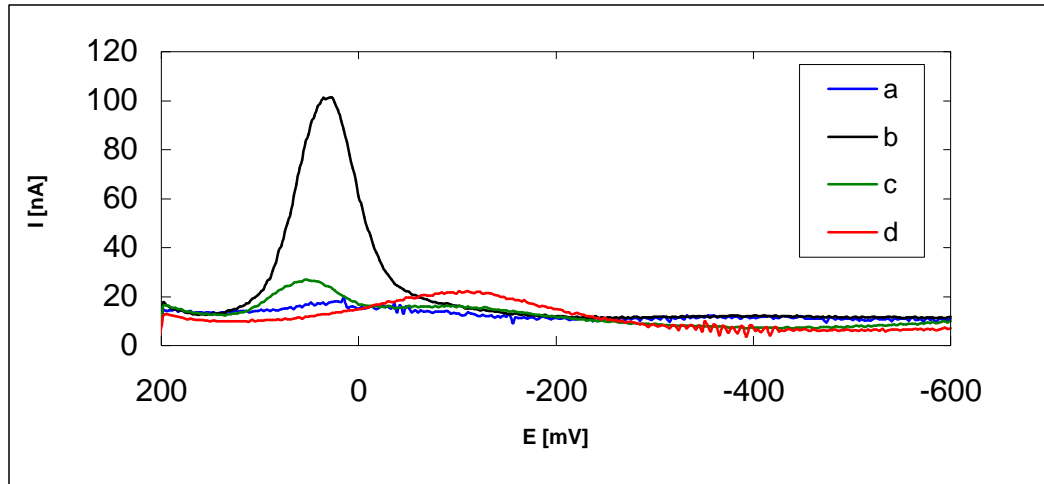


Obr. 2.:

- a) Základní 0,1 mol.l<sup>-1</sup> elektrolyt HCl; b) a + 0,05 mg l<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>,  
c) a + 0,05 mg l<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> + 0,05 g l<sup>-1</sup> Hykol E, d) a + 0,05 g l<sup>-1</sup> Hykol E

Jestě větší změny mezi měďnatým píkem a píkem měďnatého iontů s Hykolem E zobrazuje obr. 3, kde v 0,1 M disičnanovém elektrolytu o pH=1,06 se vlivem vytvoření komplexu měďnatého iontu s ligandem voltamerická křivka téměř ztrácí na pozadí základního elektrolytu. V tomto elektrolytu se měďnatý ion redukuje při potenciálu blízké 0 mV, a proto je nutné z roztoku vytěsnit všechny rozpuštěný kyslík, který se při tomto

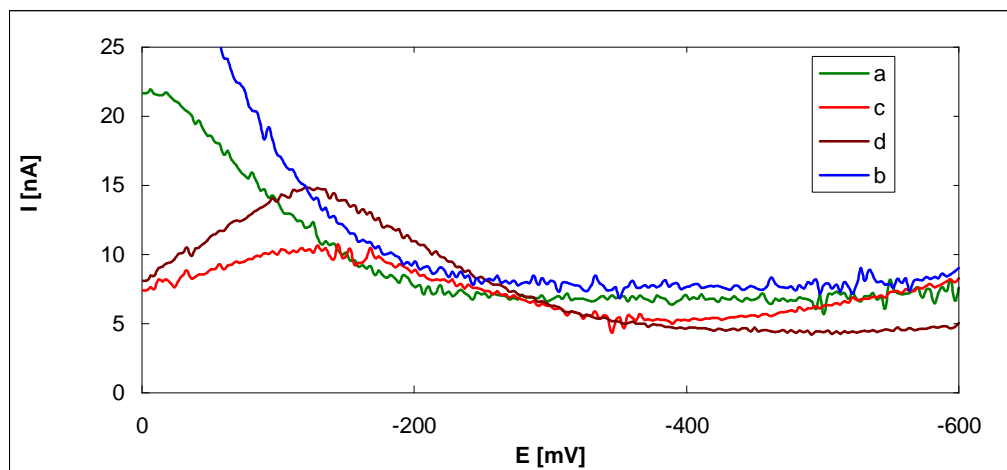
potenciálu redukuje také. Toho lze docílit delším a intenzivnějším probubláváním argonem.



**Obr. 3.:**

- a) Základní elektrolyt  $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HNO}_3$ ; b) a +  $0,05 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ,  
c) a +  $0,05 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  +  $0,05 \text{ g l}^{-1} \text{ Hykol E}$ , d) a +  $0,05 \text{ g l}^{-1} \text{ Hykol E}$

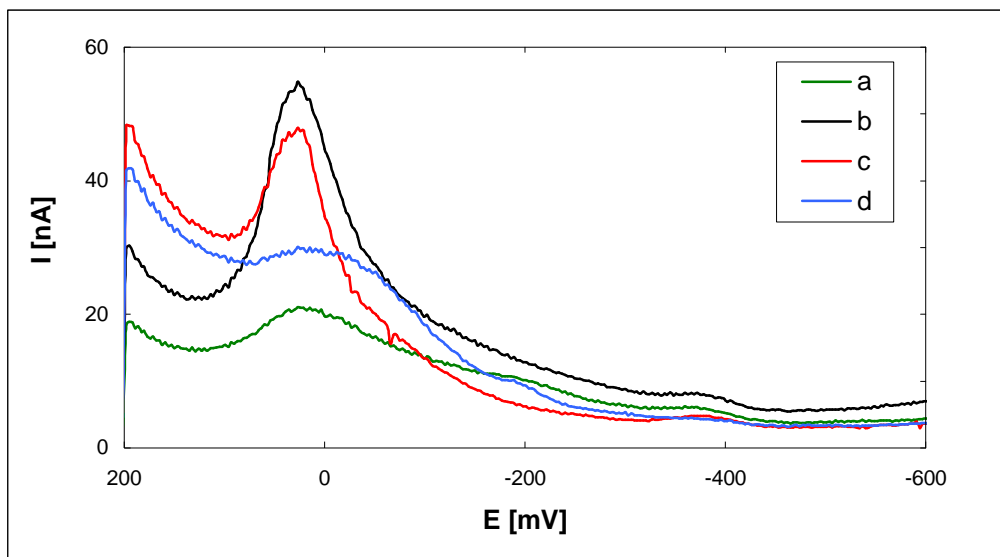
Také byl vybrán základní elektrolyt  $0,1 \text{ M}$  kyseliny chloristé, kde bylo  $\text{pH}=1,01$ . Zde výsledky nebyly vůbec uspokojivé a jak je vidět z obrázku 4 už samotné stanovení mědi se na záznamu křivky neprojevovalo. U křivky Hykolu je sice vidět pík, ale jeho odezva velmi nízká a nelze vyloučit, že se jedná o nečistoty z Hykolu.



**Obr. 4.:**

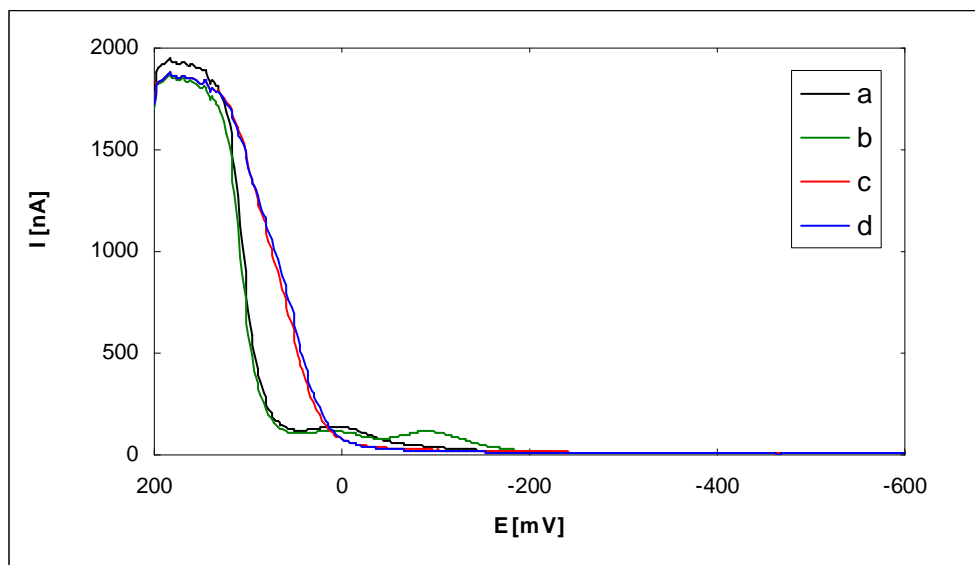
- a) Základní elektrolyt  $0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HClO}_4$ ; b) a +  $0,05 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ,  
c) a +  $0,05 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  +  $0,05 \text{ g l}^{-1} \text{ Hykol E}$ , d) a +  $0,05 \text{ g l}^{-1} \text{ Hykol E}$

V základním elektrolytu kyseliny sírové (obr. 5), pH=1,22, je citlivost měření malá. Hykol ovlivňuje stanovení a také mění tvar píku tak, že z něj lze špatně určit jeho hodnota. Daleko vyšší citlivosti bylo dosaženo při užití metody anodické oxidace s velkou dobou akumulace (120 s).



**Obr. 5.:**

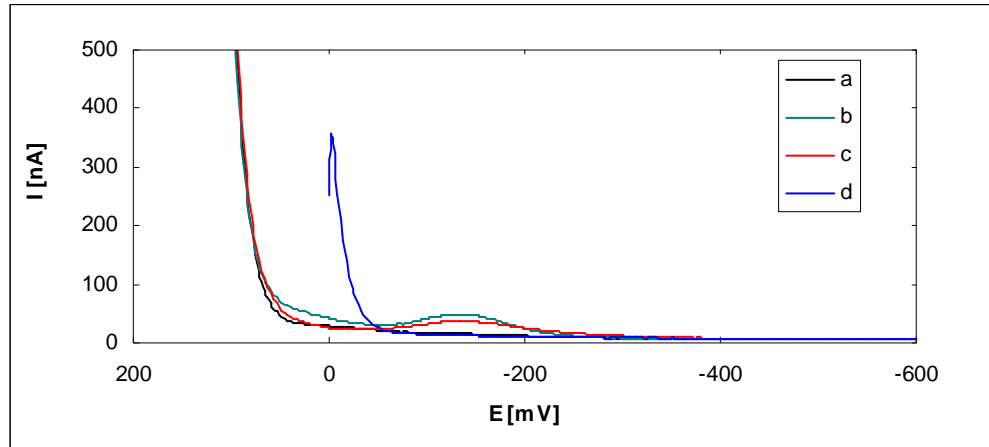
- a) Základní elektrolyt  $0,05 \text{ mol.l}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ ; b) a +  $0,05 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ,  
c) a +  $0,05 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  +  $0,05 \text{ g l}^{-1} \text{ Hykol E}$ , d) a +  $0,05 \text{ g l}^{-1} \text{ Hykol E}$



**Obr. 6.:**

- a) Základní elektrolyt  $0,005 \text{ mol.l}^{-1} \text{ boraxu}$ ; b) a +  $0,05 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ,  
c) a +  $0,05 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  +  $0,05 \text{ g l}^{-1} \text{ Hykol E}$ , d) a +  $0,05 \text{ g l}^{-1} \text{ Hykol E}$

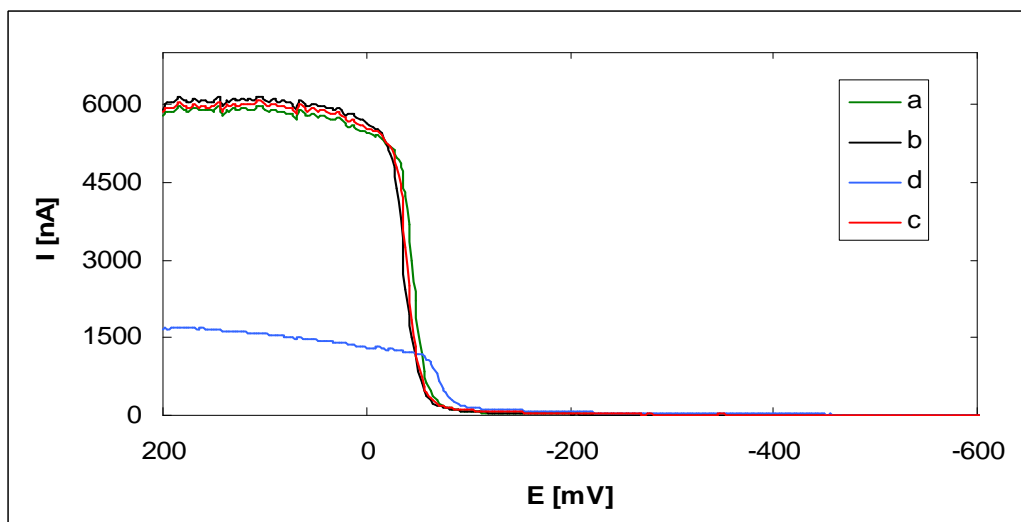
V alkalickém prostředí byl zvolen boraxový roztok,  $\text{pH} = 9,19$ , který slouží jako médium pro suspenzi fosforečnanu měďnatého. (obr. 6) Zde však Hykol zcela potlačil stanovení mědi a původně naměřený voltametrický pík se po přidavku neobjevil.



**Obr. 7:**

- a) Základní  $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$  amoniakální elektrolyt III;  
 b) a +  $0,05 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ , c) a +  $0,05 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  +  $0,05 \text{ g l}^{-1}$  Hykol E,  
 d) a +  $0,05 \text{ g l}^{-1}$  Hykol E

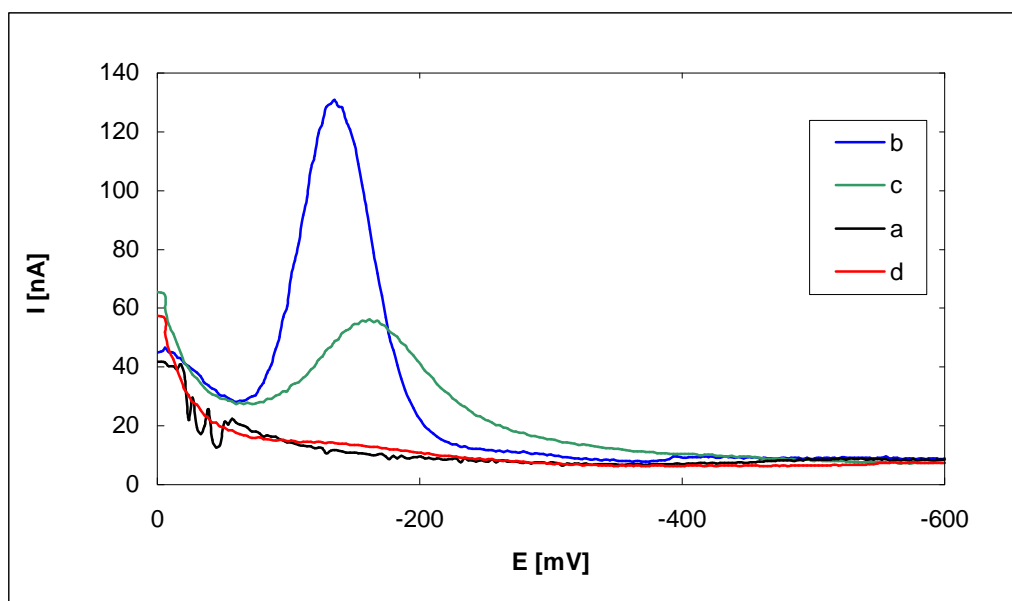
Stejných výsledků bylo docíleno v základním amoniakálním elektrolytu III,  $\text{pH}=8,13$  (obr.7). V alkalické oblasti se potenciál redukce měďnatého iontu posouvá k záporným hodnotám a například u tohoto elektrolytu je to okolo  $E = -100 \text{ mV}$ .



**Obr. 8.:**

- a) Základní  $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$  amoniakální elektrolyt II; b) a +  $0,05 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$ ,  
 c) a +  $0,05 \text{ mg l}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  +  $0,05 \text{ g l}^{-1}$  Hykol E, d) a +  $0,05 \text{ g l}^{-1}$  Hykol E

Základní amoniakální elektrolyt II, pH = 9,30, měl ze zvolených elektrolytů nejhorší citlivost. Na obrázku 8 je vidět, že zde bylo mnoho rušivých vlivů a už samotné stanovení měďnatých iontů nebylo možné realizovat.



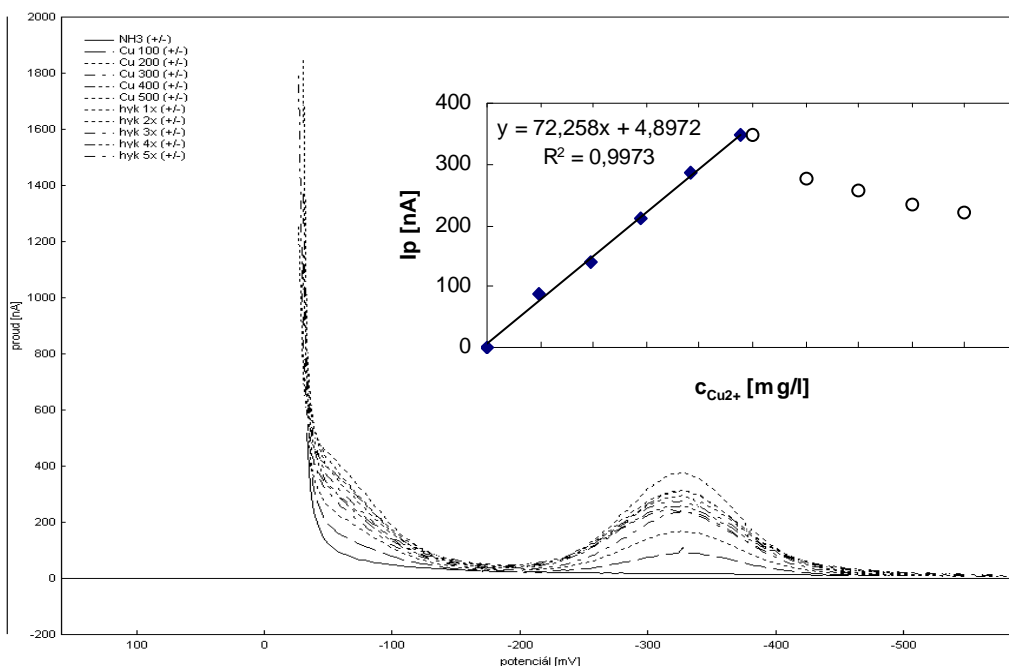
Obr. 9.:

- a) Základní 0,1 mol.l<sup>-1</sup> uhličitanový elektrolyt ;b) a + 0,05 mg l<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>,  
c) a + 0,05 mg l<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>+ 0,05 g l<sup>-1</sup> Hykol E, d) a + 0,05 g l<sup>-1</sup> Hykol E

Jako poslední byl vybrán uhličitanový pufr, pH = 9,40. V něm se měďnatý ion redukuje při potenciálu E=-135 mV, ale po přidavku Hykolu se maximum potenciálu posouvá k více záporným hodnotám (tento trend lze pozorovat u alkalických elektrolytů) a výška píku se sníží.

V každém zvoleném elektrolytu Hykol vytvořil komplex s měďnatým iontem ať už silnější (který více ovlivňovala stanovení Cu<sup>2+</sup>) nebo slabší vazbou. Nakonec byl vybrán elektrolyt kyseliny dusičné. Jednak je v tomto elektrolytu popsána metoda pro stanovení mědi, která je velmi citlivá a také z důvodu, že bylo rozhodnuto vzorky zmineralizovat před další analýzou.

## 7.2 Vliv hykolu



Obr. 10 :

Kalibrační křivka mědi s přidavky Hykolu v amoniakálním elektrolytu I

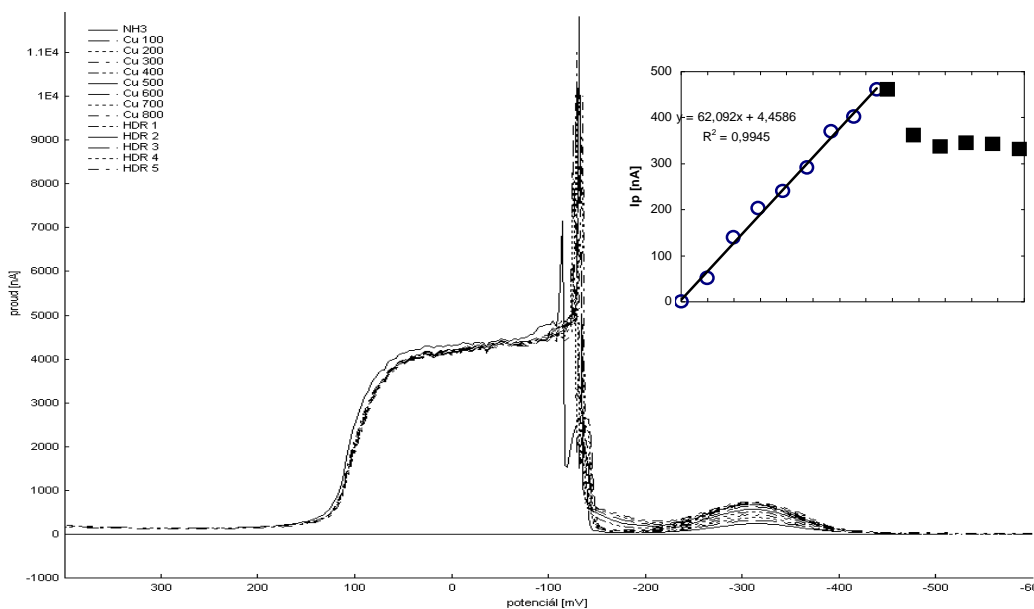
Na obrázku 10 je záznam voltametrických křivek, kdy v základnímu amoniakálního elektrolytu I,  $\text{pH} = 9,56$ , byla sestavena kalibrační křivka a k nejvyšší hodnotě bylo přidáno pět přidavků Hykolu (tab. II). Přidávky Hykolu neměnily maximum potenciál píku, pouze snižoval jeho velikost v důsledku vzniku komplexu s měďnatým iontem, jak je vidět ve velkém grafu. Výraznější vliv měl první přidavek, ostatní změna byla mírnější a měla lineární tendenci.

Tab. II: Hodnoty kalibrační křivky s přidavky Hykolu v amon. elektr. I

$c_{\text{Cu}^{2+}} [\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}]$	$I_p [\text{nA}]$	$c_{\text{Hykol}} [\text{g}\cdot\text{l}^{-1}]$	$I_p [\text{nA}]$
0,0000	0,0	0,0000	347,6
0,9901	87,87	0,0472	275,7
1,9608	139,8	0,0935	256,2
2,9126	212,9	0,1389	233,4
3,8462	286,9	0,1835	219,6
4,7619	347,6	0,2273	207,7



Velmi obdobný vliv v amoniakálním elektrolytu I na kalibrační křivku hydrolyzovaný Hykol (obr. 11). Zde opět první přídavek 100  $\mu\text{l}$  hydrolyzátu o koncentraci  $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  snížil výšku píku měďnatého iontu, ale další změny byly nepatrné. (tab. III)



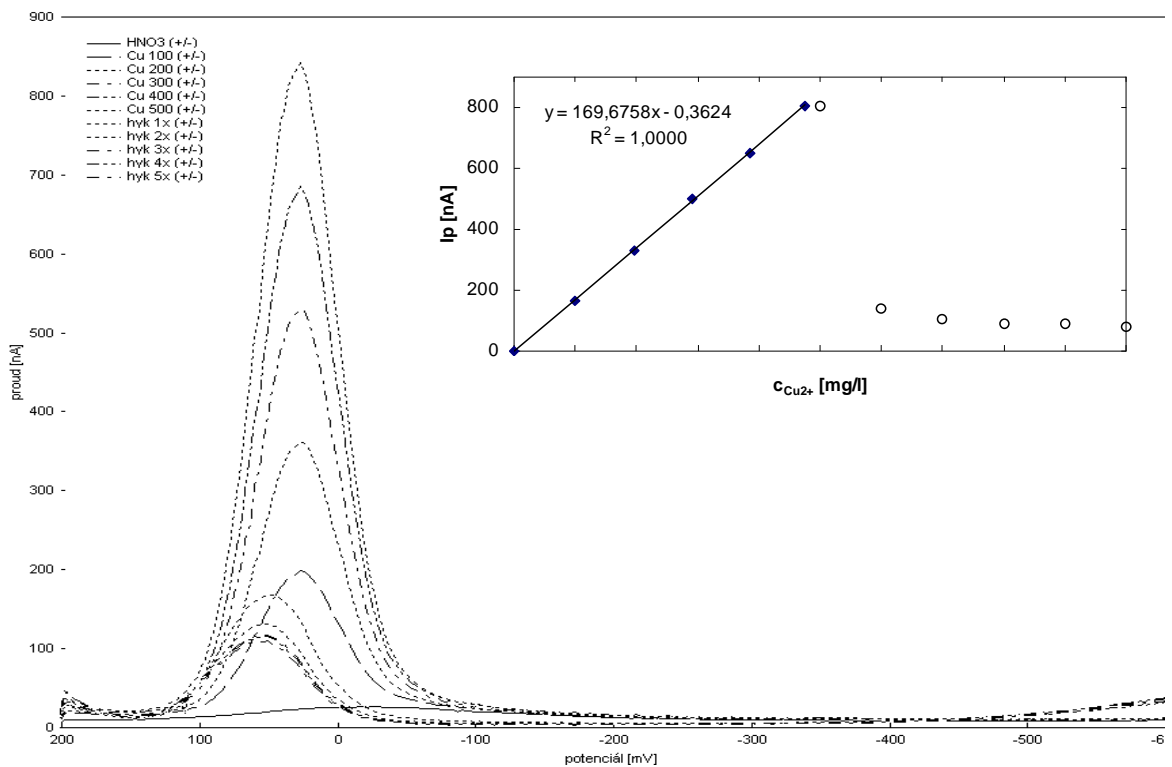
Obr. 11 :

Kalibrační křivka mědi s přídavky hydrolyzovaného Hykolu v amoniakálním elektrolytu I

Tab. III: Hodnoty kalibrační křivky s přídavky hydrolyzovaného Hykolu v  $\text{HNO}_3$  elektrolytu

$c_{\text{Cu}^{2+}} [\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}]$	$I_p [\text{nA}]$	$c_{\text{Hydrolyzátu}} [\text{g}\cdot\text{l}^{-1}]$	$I_p [\text{nA}]$
0	0	0	1022
0,9901	158,6	0,0463	1136
1,9609	313,5	0,0917	1149
2,9126	463,8	0,1364	1132
3,8462	635,9	0,1802	1146
4,7620	764,7	0,2232	1017
5,6604	885,3		
6,5421	1022		

Stejně bylo postupováno i v kyselé oblasti kyseliny dusičné, kde bylo podle očekávání dosaženo velmi dobrých výsledků při sestavení kalibrační křivky (obr. 12 malý graf). Avšak v tomto elektrolytu rušil Hykol daleko více než v alkalické oblasti, jak to dokazuje záznam voltametrických křivek, kde se výška píku snížila již po prvním přidavku až pod hodnotu nejnižší koncentrace měďnatých iontů. (tab. IV) Další přidavky pak neměly vliv na další změny (všechny měďnaté ionty vešly v komplex), ale potvrdily, že Hykol v komplexu měďnatým iontem posouvá maximum potenciálu směrem doleva.



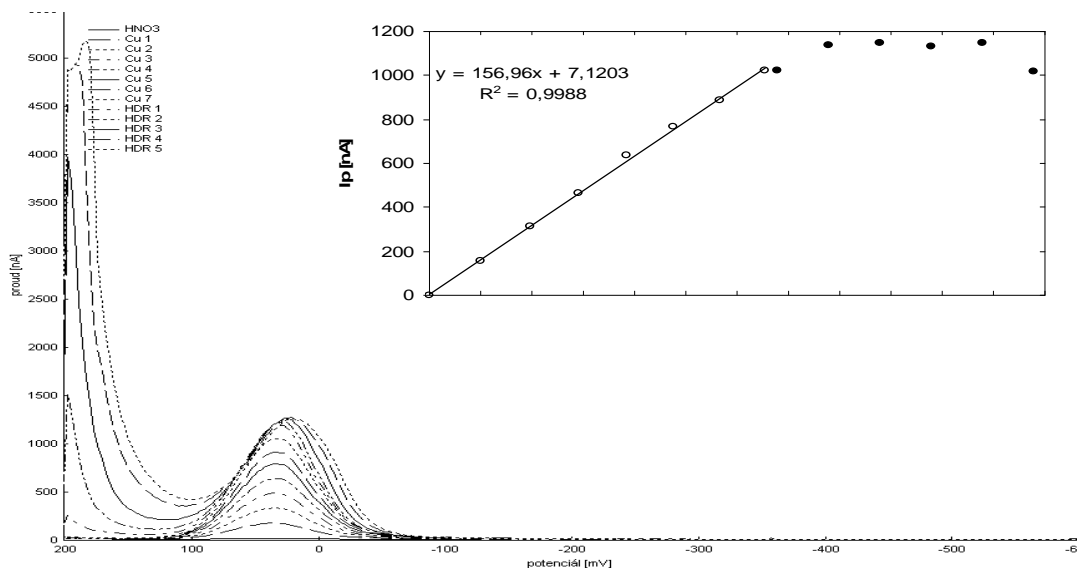
**Obr. 12 :**

Kalibrační křivka mědi s přidavky Hykolu v HNO<sub>3</sub> elektrolytu

Tab. IV: Hodnoty kalibrační křivky s přidavky Hykolu v HNO<sub>3</sub> elektr.

$c_{\text{Cu}^{2+}} [\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}]$	$I_p [\text{nA}]$	$c_{\text{Hykol}} [\text{g}\cdot\text{l}^{-1}]$	$I_p [\text{nA}]$
0,0000	0	0,0000	806,8
0,9901	166,8	0,0472	140,6
1,9608	330,5	0,0935	103,4
2,9126	497,8	0,1389	90,77
3,8462	651,4	0,1835	87,57
4,7619	806,8	0,2273	82,44

Nakonec byla sestrojena kalibrační přímka mědi v 0,1M kyselině dusičné a k ní bylo postupně přidáváno 5krát 100  $\mu\text{l}$  roztoku hydrolyzátu Hykolu o koncentraci  $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . (tab. V) V tomto prostředí výška píku od píku s největší koncentrací vzrostla a posunulo se maximum potenciálu doprava.(obr. 13) Přítomnost hydrolyzovaného Hykolu má na měďnaté ionty vliv, ale netvoří s nimi komplex (malý graf).



Obr. 13 :

Kalibrační křivka mědi s přidavky hydrolyzovaného Hykolu v HNO<sub>3</sub> elektrolytu

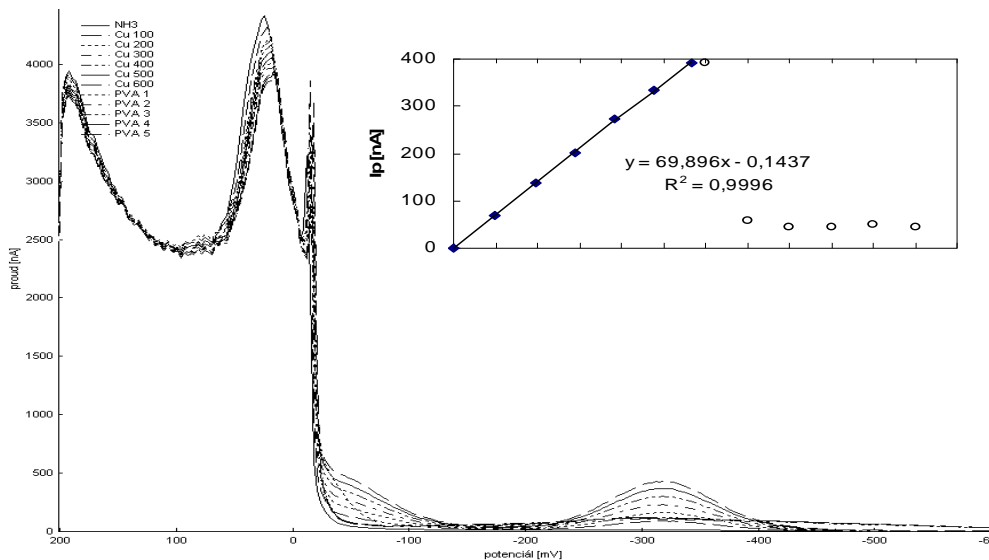
Tab. V: Hodnoty kalibrační křivky mědi s přidavky hydrolyzovaného Hykolu v dusičnanovém elektrolytu

$c_{\text{Cu}^{2+}}$ [mg.l <sup>-1</sup> ]	$I_p$ [nA]	$c_{\text{Hydrolyzátu}}$ [g.l <sup>-1</sup> ]	$I_p$ [nA]
0,0000	0	0	460,8
0,9901	51	0,04630	362,3
1,9608	139,2	0,0917	337,4
2,9126	202,5	0,1364	345,3
3,8462	239,7	0,1802	342,3
4,7619	291,3	0,2232	331,9
5,6604	370		
6,5421	401,8		
7,4074	460,8		

Tyto výsledky potvrdily rozhodnutí další úpravy mikrovlnnou mineralizací vzorku před jeho stanovením na polarografu.

### 7.3 Vliv polyvinylalkoholu

Hydrolyzát kolagenu se přidává slouží jako modifikátor při výrobě PVA folií, a proto lze předpokládat přítomnost PVA při stanovení Hykolu. Z tohoto důvodu byl ověřen vliv PVA na toto stanovení. Jako v případě hydrolyzátu kolagenu byla nejprve stavena kalibrační křivka mědi a k nejvyšší koncentraci ( $c_{\text{Cu}^{2+}}=0,566 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  roztoku PVA o koncentraci 5 g.l<sup>-1</sup>. Takto byly přidány ještě dalších čtyři přidavky roztoku PVA, aby bylo možno sledovat odezvy voltametrických křivek mědi na rostoucí koncentraci PVA.



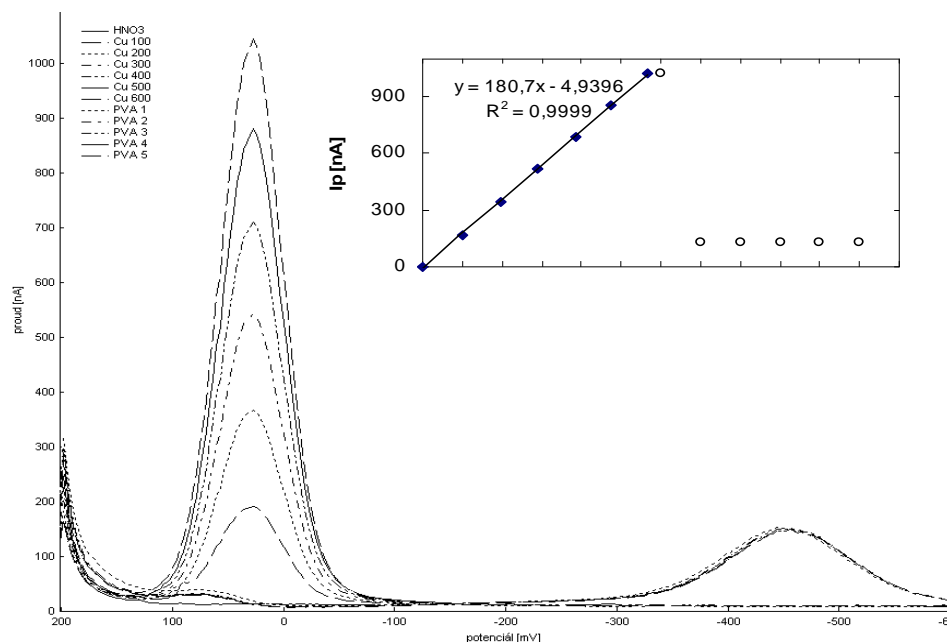
Obr. 14:

Kalibrační křivka mědi s přídatky PVA v amoniakálním elektrolytu I

Tento postup byl nejprve proveden v prostředí 0,1 M amoniakálním elektrolytu (obr. 14). Na záznamu voltametrických křivek je patrné, že po přídatcích roztoku PVA nedochází v alkalickém prostředí k posunu maxima potenciálu měďnatého iontu, které je zde při potenciálu  $E = -318$  mV. Avšak z grafu kalibrační křivky je jasně vidět rušivý vliv PVA, kdy po prvním přídatku roztoku výrazně kleslo napětí píku až pod hodnotu nejmenší koncentrace mědi v tomto případě  $c = 0,99$  mg·l<sup>-1</sup>. Další přídatky na stanovení neměly vliv, neboť lze předpokládat, že všechna měď v roztoku přešla v komplex.

Také bylo provedeno měření v kyselé oblasti 0,1 M HNO<sub>3</sub> elektrolytu, kde jako v předchozím případě byl nakonec přidán PVA k nejvyšší hodnotě měďnatých iontů. V tomto případě se po prvním přídatku snížil měďnatý pík došlo k výraznému posunu maxima potenciálu a to z hodnot 28 mV na -455 mV. (obr. 15) Další přídatky PVA nerozhodovaly o dalších změnách voltametrických křivek, protože všechna měď opět přešla v komplex

PVA-Cu, který podle M. Songa [13] tvoří čtyři hydroxylové skupiny PVA a jedna měď.

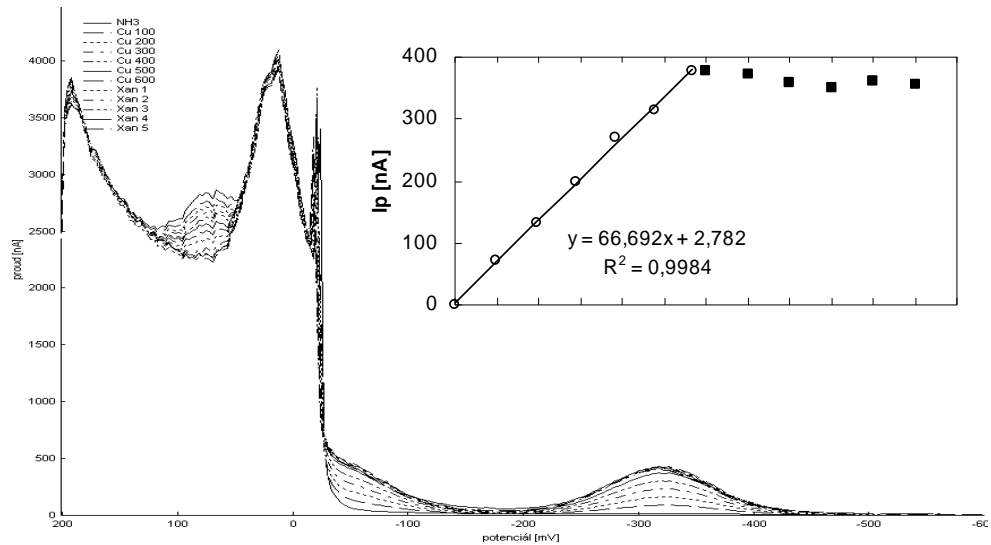


Obr. 15:

Kalibrační přímka mědi s přidavky PVA v  $\text{HNO}_3$  elektrolytu

## 7.4 Vliv xanthanu

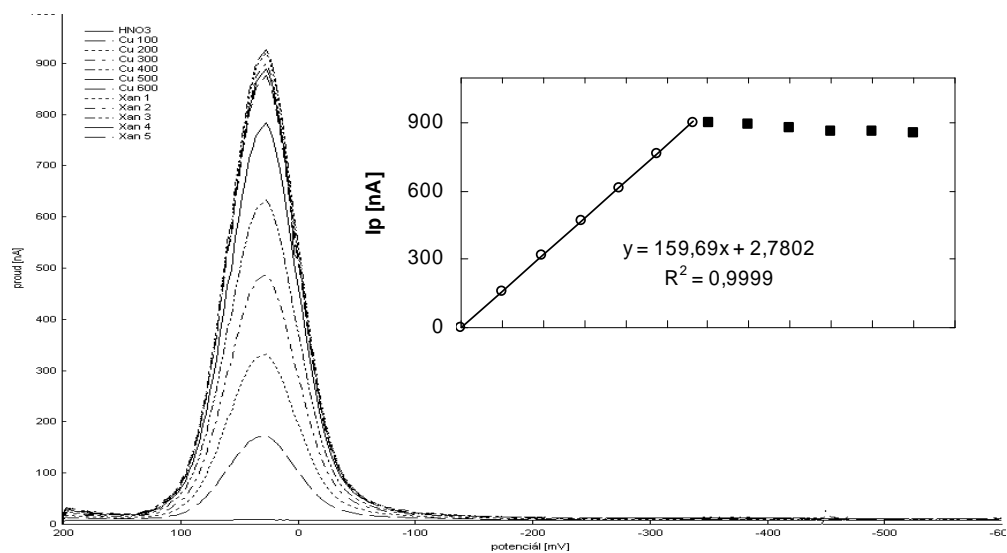
Jako poslední byl ověřen vliv Xanthanu nejprve v alkalickém amoniakálním elektrolytu I, kde přidavky byly o objemu  $100 \mu\text{l}$  a koncentraci  $1 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ . (obr. 16) Zde se vytvoření komplexu Xanthan-Cu neprojevil na změně výšky měďnatého píku. Z toho lze usuzovat, že komplex byl slabý a jen nepatrně ovlivnil stanovení měďnatých iontů, nebo se mohl redukovat při potenciálu mimo rozsah měření.



Obr. 16:

Kalibrační přímka mědi s přidavky Xanthanu v amoniakálním-elektrolytu I

Nepatrný vliv na stanovení měďnatých iontů oproti předchozím látkám se potvrdil i v kyselé oblasti dusičnanového elektrolytu. (obr.17) V tomto elektrolytu se potvrdilo, že komplex Xanthan-Cu je slabý a stanovení měďnatých iontů ruší málo.

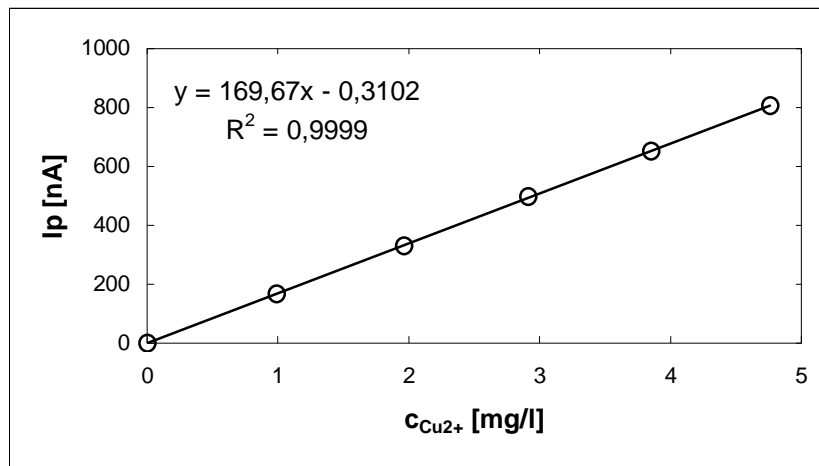


Obr. 17:

Kalibrační přímka mědi s přidavky Xanthanu v HNO<sub>3</sub> elektrolytu

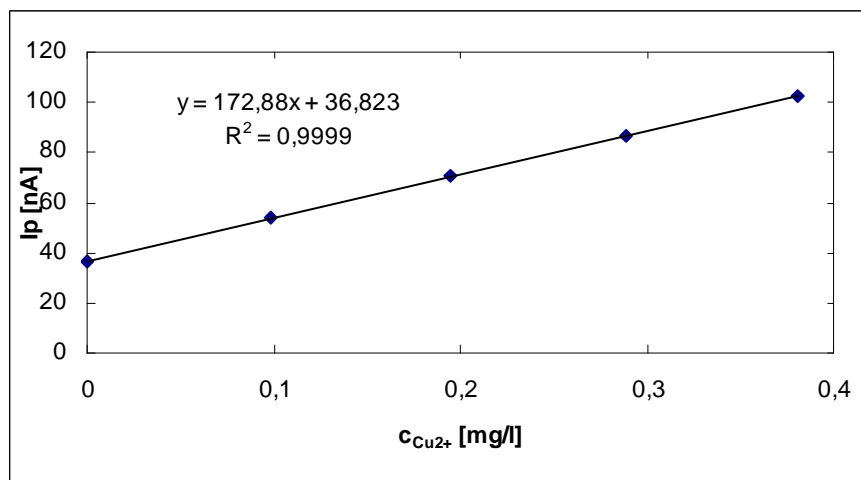
## 7.5 Analýza vzorků

Všechny analyzované vzorky byly protřepány se suspenzí fosforečnanu měďnatého, zmineralizovány a stanoveny na polarografu metodou katodické redukce. Nakonec byly vyhodnoceny výšky píků voltametrických křivek a byl sestaven graf vzorku se svými standardními přídávky mědi.(obr. 19) Správnost stanovení byla posouzena jednak koeficientem přesnosti ze spojnice trendu dána možností grafu a také ze směrnice přímky která se v mnoha případech nelišila od směrnice kalibrační přímky mědi (obr. 18).



Obr. 18:

Kalibrační křivka mědi



Obr. 19 :

Metoda standardních přídávků pro Hykol  $c=35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$

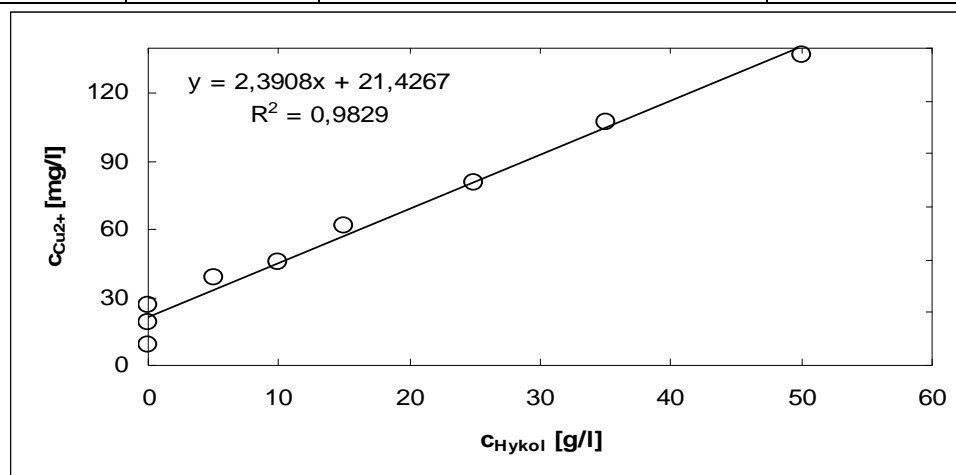


### 7.5.1 Stanovení koncentrace

U vzorků hydrolyzátu kolagenu byla zvolena řada koncentrací. (tab. VI) Zde jsou vedle těchto koncentrací uvedeny hodnoty stanovené mědi. Směrnice přímky a koeficient spolehlivosti je uvedena z důvodu ukázky přesnosti stanovení voltametrií. Z hodnot koncentrace Hykolu a stanovené mědi byl sestrojen graf (obr. 20), ze kterého je zřejmé, že závislost má lineární průběh. Tento poznatek tak může být využit při stanovení koncentrace roztoku Hykolu a to dosažením stanovené mědi do rovnice přímky. Jako nulová koncentrace je zde uvedena hodnota slepého pokusu, což v tomto případě byla destilovaná voda. Zde jsou zobrazeny tři slepé pokusy z důvodu velkého rozptylu hodnot při stanovení.

Tab. VI: Hodnoty stanovení řady koncentrace hydrolyzátu kolagenu

$c_{\text{Hykol}}$ [g/l]	$c_{\text{Cu}^{2+}}$ [mg/l]	Rovnice přímky z stand.příd.	koef. spolehlivosti
0	0,0182	$y = 166,35x + 3,0195$	$R^2 = 0,9998$
5	0,0768	$y = 181,3x + 13,918$	$R^2 = 0,9999$
10	0,0911	$y = 162,0319x + 14,7676$	$R^2 = 0,9996$
15	0,1226	$y = 176,23x + 21,612$	$R^2 = 0,9973$
25	0,1604	$y = 175,79x + 28,193$	$R^2 = 0,9999$
35	0,2130	$y = 172,88x + 36,823$	$R^2 = 0,9999$
50	0,2718	$y = 173,71x + 47,221$	$R^2 = 0,9992$



Obr. 20:  
Kalibrace Hykolu

Také bylo provedeno stanovení polyvinylalkoholu pro koncentrace 5, 25, 35 a 50 g·l<sup>-1</sup>. V tabulce VII jsou uvedeny výsledky měření. Směrnice rovnice přímků a koeficient spolehlivosti opět ukazují přesnost měření, ale pokud by se vynesla závislost koncentrace polyvinylalkoholu na množství stanovené mědi je první hodnota (pro PVA 5 g·l<sup>-1</sup>) velmi nízká a od koncentrace 25 g·l<sup>-1</sup>, u které byla nalezeno největší množství mědi, pozorujeme mírný pokles a dále převážně rovnoměrnou tendenci.

Tab. VII: Hodnoty stanovení polyvinylalkoholu

$c_{PVA}$ [g/l]	$c_{Cu^{2+}}$ [mg/l]	Rovnice přímků z stand. příd.	koef. spolehlivosti
5	0,0529	$y = 163,2230x + 4,2744$	$R^2 = 1,0000$
25	0,3226	$y = 174,13x + 27,807$	$R^2 = 0,9996$
35	0,2473	$y = 176,49x + 21,604$	$R^2 = 0,9996$
50	0,2478	$y = 172,49x + 21,158$	$R^2 = 0,9999$

Toto měření bylo provedeno pouze jednou, a proto nelze říct, zda nedošlo k chybě měření nebo je u polyvinylalkoholu tendence růstu stanovené mědi a od koncentrace okolo 25 g/l převažuje setrvalý stav.

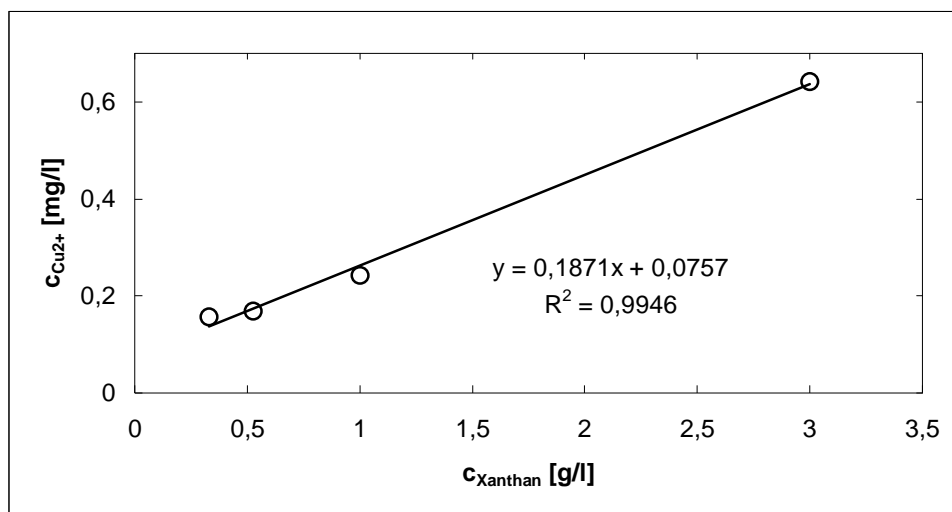
Výsledky stanovení Xanthanu o koncentracích 0,33, 0,53, 1 a 3 g·l<sup>-1</sup> jsou uvedeny v tabulce VIII. Tak jako u předchozích látek byla přesnost metody velmi přesvědčivá a lze usuzovat její správnost.

Tab. VIII: Hodnoty stanovení Xanthanu

$c_{Xanthan}$ [g·l <sup>-1</sup> ]	$c_{Cu^{2+}}$ [mg·l <sup>-1</sup> ]	Rovnice přímků z stand. příd.	koef. spolehlivosti
0,3286	0,1569	$y = 173,91x + 13,511$	$R^2 = 0,9998$
0,5266	0,1693	$y = 172,37x + 14,446$	$R^2 = 0,9997$
1	0,2424	$y = 218,36x + 21,24$	$R^2 = 0,9997$
3	0,6424	$y = 165,25x + 52,551$	$R^2 = 0,9995$

Jak je vidět na obrázku 21, je možné stejně jako v případě

hydrolyzátu kolagenu zhotovit kalibrační závislost mezi koncentrací  $\text{Cu}^{2+}$  přešlých do roztoku (vznik komplexu) a koncentrací Xanthanu. V nepřítomnosti Hykolů a PVA lze pravděpodobně použít toto stanovení, které by však pravděpodobně nebylo příliš selektivní.



Obr. 21:

Kalibrace Xanthanu

### 7.5.2 Stanovení řetězové hmotnosti peptidů

Stanovení řetězové hmotnosti peptidů, které je možno vyjádřit středním počtem aminokyselinových zbytků v peptidu, je jinou možností využití výše popsaných vlastností hydrolyzátu kolagenu. Bylo zvoleno osm vzorků vodného roztoku Hykolu o koncentraci  $5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$  a vedle nich byly připraveny jejich hydrolyzáty o stejné koncentraci výše popsanou hydrolyzou. Dále byly všechny vzorky protřepány se suspenzí fosforečnanu měďnatého, zmineralizovány, stanoveny voltametriky a vyhodnoceny metodou standardních přídavek.

V tabulce IXa jsou zobrazeny stanovené hodnoty pro každý vzorek. První sloupec (označen  $K_1$ ) vyjadřuje hodnoty mědi pro vodné roztoky Hykolů a druhý sloupec (označen  $K_2$ ) hodnoty mědi pro hydrolyzáty těchto Hykolů.

Tab. IXa: Průměrný počet aminokyselinových zbytků v hydrolyzátech stanovené voltametricky

	<b>koncentrace Cu u aminokyselin K<sub>1</sub> (mg/10ml)</b>	<b>koncentrace Cu u polypeptidu K<sub>2</sub> (mg/10ml)</b>	<b>průměrný počet AK zbytků</b>
<b>H-HOL</b>	3,3669	0,3989	16,9
<b>HYKOL 2002</b>	1,7837	0,2437	14,6
<b>MH</b>	3,6098	0,2029	35,6
<b>VZ</b>	3,643	0,2507	29,1
<b>ICrA</b>	6,4645	0,178	72,6
<b>VY 1</b>	2,7599	0,1995	27,7
<b>E-HYKOL</b>	3,0457	0,1855	32,8
<b>H-KOL</b>	3,1078	0,2729	22,8

Řetězová hmotnost peptidů se vypočítá podle vzorce:

$$AK_{zb} = \frac{2K_1}{K_2} \quad (13)$$

kde  $AK_{zb}$  je střední počet aminokyselinových zbytků v peptidu

$K_1$  koncentrace mědi (opravená o hodnotu slepého pokusu) u hydrolyzovaného peptidu

$K_2$  koncentrace mědi (opravená o hodnotu slepého pokusu) u peptidu bez hydrolýzy

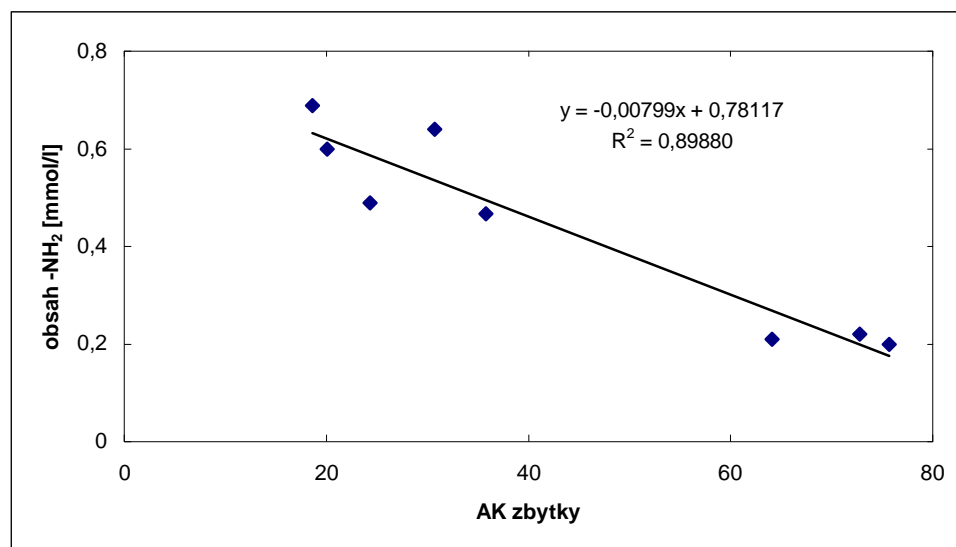
Pro ověření správnosti metody byly tyto výsledky konfrontovány s chelatometrickou metodou. Tato metoda byla provedena Hasákovou z Ústavu potravinářského inženýrství a chemie. Metoda je založena na stejném principu s obměnou koncovky stanovení, kdy se 5 ml vzorku

protřepal s 5 ml suspenzí fosforečnanu měďnatého a nechal s 5 minut stát. Po odstředění této směsi se odebralo 7 ml čirého roztoku, přidala se kyselina chlorovodíková a indikátor PAN, nakonec byla tato směs titrována chelatonem III z červenofialové do žlutozelené barvy. Výsledky tohoto stanovení jsou uvedeny v tabulce IXb.

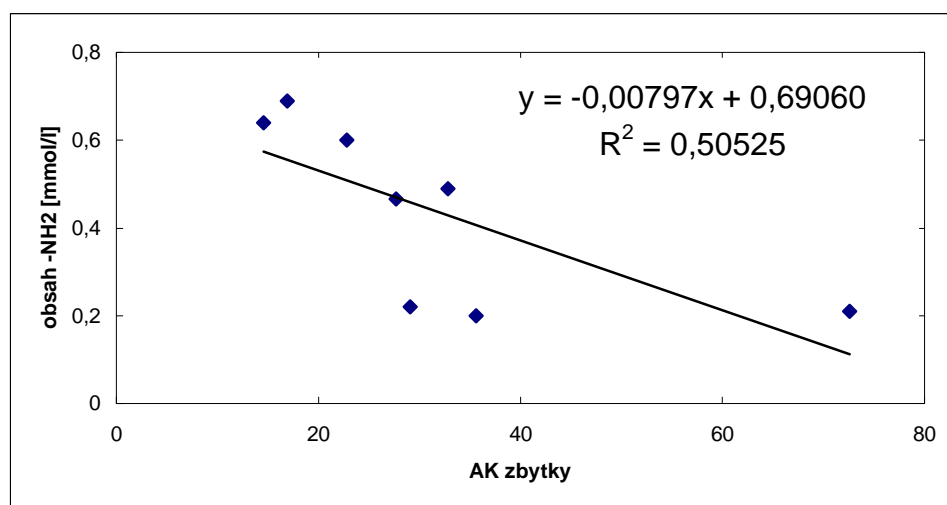
Tab. IXb: Průměrný počet aminokyselinových zbytků v hydrolyzátech stanovené chelatometricky [24]

	<b>koncentrace Cu u aminokyselin K<sub>1</sub> (mg/10ml)</b>	<b>koncentrace Cu u polypeptidu K<sub>2</sub> (mg/10ml)</b>	<b>průměrný počet AK zbytků</b>
<b>H-HOL</b>	4,067	0,4373	18,6
<b>HYKOL 2002</b>	3,971	0,2587	30,7
<b>MH</b>	4,082	0,1078	75,7
<b>VZ</b>	4,035	0,1109	72,8
<b>ICrA</b>	3,431	0,1071	64,1
<b>VY 1</b>	2,875	0,1606	35,8
<b>E-HYKOL</b>	3,066	0,2523	24,3
<b>H-KOL</b>	3,061	0,3046	20,1

Hodnoty stanovené řetězové hmotnosti peptidů (průměrný počet aminokyselinových zbytků) získané chelatometrickou metodou sloužil Hasákové [24] k ověření teoretického předpokladu, že se snižujícím se obsahem aminokyselinových zbytků stoupá obsah aminokyselin v daném hydrolyzátu.. Tento trend potvrzuje obrázek 22, přestože rozptyl dosažených hodnot je poměrně velký (koeficient korelace).

**Obr. 22:**

Závislost obsahu  $-NH_2$  skupin na počtu AK zbytků stanovených chelatometricky [24]

**Obr. 23:**

Závislost obsahu  $-NH_2$  skupin na počtu AK zbytků stanovených voltametricky

Hodnoty stanovené koncovou voltametrickou metodou se lišily v některých případech výrazně (např. VZ) a jindy jen nepatrně (např. E-Hykol). Porovnáním výsledků se nedal určit zřejmý důvod, proč tomu tak je. Sestavením stejné závislosti (obr. 23) bylo docíleno stejného trendu jako u Hasákové, ale korelační koeficient byl tomto případě ještě horší.

Současně se stanovením vzorků byl vždy proveden slepý pokus, kde byl zachován celý postup, ale vzorek byl nahrazen destilovanou vodou. Množství mědi v těchto slepých pokusech měly docela široké rozpětí a pohybovaly se cca od 0,02 do 0,06 mg·l<sup>-1</sup> (množství mědi získané ze standardních přídavek). Jelikož koeficienty spolehlivosti dosahovaly hodnot až 0,9999, lze usuzovat přesnost stanovení koncovou voltametrickou metodou a tedy chyba stanovení vzniká již dříve. Toto se však během práce nepodařilo ověřit, ale získané poznatky jistě stojí za další úvahy a pozornost v této oblasti bádání.

## ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo modifikovat starou voltametrickou metodu, která vyžívá schopnosti vybraných látek tvořit komplexní sloučeniny s měďnatým iontem. Přes počáteční obtíže se podařilo zvolit vhodný elektrolyt (0,1 M kyselina dusičná), ve kterém přesnost stanovení dosahovala velmi vysoké úrovně. Jelikož analyzované látky, tedy hydrolyzát kolagenu, PVA a Xanthan, měly vliv na stanovení měďnatých iontů právě díky tvorbě komplexu, byla do této metody zařazena mikrovlnná mineralizace.

Toto stanovení bylo původně navrženo na stanovení řetězové hmotnosti hydrolyzátu kolagenu. To se také po úpravách metody podařilo ověřit, ale po srovnání s chelatometrickou metodou se získané hodnoty v některých případech lišily a během práce se nepodařilo najít příčinu těchto nesrovnalostí.

Ze získaných poznatků lze tuto metodu aplikovat na stanovení koncentrace Xanthanu a hydrolyzátu kolagenu, a to z kalibrační závislosti koncentrace těchto látek a množství mědi, která se váže s těmito látkami do komplexu. Metoda však není selektivní a stanovení ruší jak tyto látky ve směsi tak i PVA.

Voltametrické stanovení popisovaných látek a její aplikace se v této práci potýkají s několika nedostatky, které nebyly z časových důvodů odstraněny. Avšak do budoucna by mohly přinést cenné informace pro tuto oblast zkoumání a metody by pak mohly nalézt své uplatnění ve vědeckých a výzkumných činnostech.



**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] TAYLOR, MM *et. al.*: Processing of leather waste: Pilot scale studies on chrome shavings. Part I. Isolation and characterization of protein products and separation of chrome cake. Journal of the American Leather Chemists Association, 1998, Vol. 93, Iss 3, str. 61-82.
- [2] ALEXY P. *et. al.*: Blends of polyvinylalkohol with collagen hydrolysate: Thermal degradation and processing properties, Macromolecular Symposia, 2001, vol. 170. str. 41-49
- [3] KOLOMAZNÍK K. *et. al.*: Příspěvek k použití hydrolyzátu kolagenu do lepicích směsí močovino-formaldehydových pryskyřic. Chemický průmysl, 1998, č. 11, str. 25-26.
- [4] CHARVÁTOVÁ H.: Analýza průběhu anaerobního rozkladu modifikovaných plastů, UTB Fakulta technologická, ÚIŽP, Zlín, 2004, str.22-23
- [5] DAVÍDEK J. a kol.: Laboratorní příručka analýzy potravin, SNTL, Praha 1981, str. 199-201
- [6] B. VALLEJO-CORDOBA *et. al.*: Capillary electrophoresis of meat authenticity, J. Sep. Sci., 28, 2005, str. 826-836
- [7] B. BUDĚŠÍNSKÝ: Komplexometrie v organické analýze II.: Stanovení aminokyselin a peptidů, Chemické listy, svazek 50, 1956, str. 1236-1240
- [8] A. GALATÍK *et. al.*: Stanovení řetězové hmotnosti peptidů, Chemický průmysl, 23/46, 1978, str. 364-365
- [9] ELLIS B.: Polymers / A Property Database, Chapman and Hall, 2002
- [10] JOHN WILEY AND SONS: Hawley's Condensed Chemical Dictionary, Inc., 2002
- [11] CHIellini E. *et. al.*: Biodegradation of PVA-based formulations. Macromol. Symp. 144, 1999, str. 127-139

- [12] KARPYUK A. D *et. al.*: Determination of polyacrylamide and polyvinyl alcohol by turbidimetry with potassium permanganate in process solution, 1993
- [13] M. SONG a spol.: Determination of polyvinyl alcohol by adsorptive stripping voltammetry based on its copper(II) complex, *Analytica chimica acta*, 338, 1997, str. 103-108
- [14] HOFFMAN J. *et. al.*: Technologická cvičení z Ochrany prostředí II, VUT v Brně, Fakulta technologická ve Zlíně, Zlín, 2000
- [15] ISHIKAWA *et. al.*: Thin-layer chromatography of polyvinyl alcohol, 1966
- [16] E. LILLY a spol.: Determination of polyvinyl alcohol in a poDL-lactide-co-glycolide matrix by size exclusion chromatography using evaporate light scattering detection, *Journal of Pharmaceutical and biomedical analysis*, 25, 2001, str. 539-543
- [17] VELÍŠEK JAN: *Chemie potravin 1*, vydala firma OSSIS – V. Šedivý, Tábor, 1999, str. 246-247
- [18] K.NISHINARI *et. al.*: Interaction in polysaccharide solutions and gels, *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, Vol. 8, Issues 4-5, 2003, str. 396-400
- [19] QUEMENER B, *et. al.*: Quantitative analysis of hydrocolloids in food systems by methanolysis coupled to reverse HPLC. Part 2. Pectins, alginates and xanthan, *FOOD HYDROCOLLOIDS* 14 (1): 19-28 JAN 2000
- [20] Periodická tabulka, <http://www.tabulka.cz/prvky/ukaz.asp?id=29>, 1998-2004, Jan Straka, 14.3.2006
- [21] JAROSLAV KINKOR, Sdělení odboru ochrany vod MŽP o vydání následujících technických norem vodního hospodářství, *Věstník* 4/98 -18,  
[http://www.env.cz/osv/edice.nsf/117810CF5A7D1C20C1256FC8003F04BC/\\$file/18.htm](http://www.env.cz/osv/edice.nsf/117810CF5A7D1C20C1256FC8003F04BC/$file/18.htm)

- [22] FREMROVÁ L *et. al.*: Jakost vod – Stanovení rozpuštěné mědi, olova, kadmia, selenu, thalia, kobaltu, niklu, chromu a rtuti rozpouštěcí (stripping) voltametrií, Odvětvová technická norma vodního hospodářství, Hydroprojekt CZ,a.s.a Ústav fyzikální chemie J. Heyrovského AV ČR, Praha, 2001, str. 1-18
- [23] Aplikační listy stanovení mědi, Metodiky Eco-tribo Polarograf verze (Pro) v.5, Eco-trend plus s.r.o., Praha
- [24] IVANA HASÁKOVÁ: Možnosti stanovení molekulové hmotnosti bílkovinných hydrolyzátů, diplomová práce, Univerzita Tonaše Bati, Ústav potravinářského inženýrství a chemie, Zlín, 2006

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

ELSD	Evaporative light scattering detector
PAN	1-(2-pyridylazo)-2-naftol
PLGA	Polymer polyDL-laktid-co-glikolid
HPLC	Vysoko účinná kapalinová chromatografie
PFTE	Polytetrafluoretylen
NPK	Hnojivo s obsahem dusíku, fosforu a draslíku
PVA	Polyvinylalkohol
DPV	Diferenční pulsní voltametrie
HMDE	Visící rtuťová kapková elektroda
DPASV	Diferenčně pulsní anodická rozpouštěcí voltametrie
AAS	Atomová absorpční spektroskopie
ETA	Elektrotermická atomizace
M	Jednotka látkové koncentrace [ $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ]
AK	Aminokyselina

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1	Základní 0,1 mol·l <sup>-1</sup> amoniakální elektrolyt I.....	34
Obr. 2	Základní 0,1 mol·l <sup>-1</sup> elektrolyt HCl.....	35
Obr. 3	Základní elektrolyt 0,1 mol·l <sup>-1</sup> HNO <sub>3</sub> .....	36
Obr. 4	Základní elektrolyt 0,1 mol·l <sup>-1</sup> HClO <sub>4</sub> .....	36
Obr. 5	Základní elektrolyt 0,05 mol·l <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	37
Obr. 6	Základní elektrolyt 0,005 mol·l <sup>-1</sup> boraxu.....	37
Obr. 7	Základní elektrolyt 0,05 mol·l <sup>-1</sup> amoniakální elektrolyt III...	38
Obr. 8	Základní elektrolyt 0,05 mol·l <sup>-1</sup> amoniakální elektrolyt II....	38
Obr. 9	Základní 0,1 mol·l <sup>-1</sup> uhličitanový elektrolyt.....	39
Obr. 10	Kalibrační křivka mědi s přísávkou Hykolu v amoniakálním elektrolytu I .....	40
Obr. 11	Kalibrační křivka mědi s přísávkou hydrolyzovaného Hykolu v amoniakálním elektrolytu I .....	41
Obr. 12	Kalibrační křivka mědi s přísávkou Hykolu v HNO <sub>3</sub> elektrolytu.....	42
Obr. 13	Kalibrační křivka mědi s přísávkou hydrolyzovaného Hykolu v HNO <sub>3</sub> elektrolytu .....	43
Obr. 14	Kalibrační křivka mědi s přísávkou PVA v amoniakálním elektrolytu I .....	44
Obr. 15	Kalibrační křivka mědi s přísávkou PVA v HNO <sub>3</sub> elektrolytu .....	45
Obr. 16	Kalibrační křivka mědi s přísávkou Xanthanu v amoniakálním elektrolytu I .....	46
Obr. 17	Kalibrační křivka mědi s přísávkou Xanthanu	

---

v HNO <sub>3</sub> elektrolytu .....	46
Obr. 18 Kalibrační křivka mědi .....	47
Obr. 19 Metoda standardního přídávku pro Hykol $c=35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ .....	47
Obr. 20 Kalibrace Hykolu .....	49
Obr. 21 Kalibrace Xanthanu .....	50
Obr. 22 Závislost obsahu –NH <sub>2</sub> skupin na počtu AK zbytků stanovené chelatometricky .....	53
Obr. 23 Závislost obsahu –NH <sub>2</sub> skupin na počtu AK zbytků stanovené voltametricky .....	53

**SEZNAM TABULEK**

Tab. I	Parametry stanovení .....	32
Tab. II	Hodnoty kalibrační křivky s přidavky Hykolu v amoniakálním elektrolytu .....	40
Tab. III.	Hodnoty kalibrační křivky s přidavky hydrolyzovaného Hykolu v amoniakálním elektrolytu .....	41
Tab. IV	Hodnoty kalibrační křivky s přidavky Hykolu v HNO <sub>3</sub> elektrolytu .....	42
Tab. V	Hodnoty kalibrační křivky s přidavky hydrolyzovaného Hykolu v HNO <sub>3</sub> elektrolytu .....	43
Tab. VI	Stanovení řady koncentrace hydrolyzátu kolagenu .....	48
Tab. VII	Stanovení PVA .....	49
Tab. VIII	Stanovení Xanthanu .....	50
Tab. IXa	Průměrný počet aminokyselinových zbytků v hydrolyzátech stanovené voltamericky .....	51
Tab. IXb	Průměrný počet aminokyselinových zbytků v hydrolyzátech stanovené chelatometricky .....	52