

Verifikácia mikrometódy na stanovenie jódového čísla

ŠTEFAN SCHMIDT – VÁCLAV KOMAN

Súhrn. V práci sa porovnáva Hanušova metóda na stanovenie jódového čísla tukov a olejov s mikrometódou podľa Yasudu. Pomocou regresnej analýzy a korelačného koeficientu sa zistila veľmi dobrá zhoda oboch metód, s korelačným koeficientom $r = 0,99$. Verifikovaná mikrometóda umožňuje stanoviť jódové číslo i s obmedzeným množstvom vzorky, navyše pri značne skrátenom celkovom čase analýzy a pri úspore chemikálií.

Napriek novým metódam inštrumentálnej analýzy nachádzajú chemické metódy pre svoju spoľahlivosť a malé nároky na prístrojové vybavenie stále uplatnenie pri bežnej kontrole výroby, ba naďalej sa využívajú i v oblasti základného a aplikovaného výskumu.

Metóda stanovenia jódového čísla je nesporne jednou z najdôležitejších klasických chemických metód používaných pri analýze lipidov a zároveň najrozšírenejším meradlom stupňa nenasýtenosti mastných kyselín a ich derivátov.

Stanovenie obsahu nenasýtených väzieb v lipidoch a príbuzných organických zlúčeninách sa u nás i v zahraničí pokladá za najznámejší výsledok činnosti československého chemika akademika Hanuša. Hoci metódu publikoval už pred osemdesiatimi rokmi, zaiste i naďalej bude patriť k najbežnejším postupom analýzy lipidov, či už v oblasti teoretického výskumu alebo pri kontrole jednotlivých technologických stupňov výroby jedlých a technických tukov.

Podrobný a veľmi informatívny prehľad postupov stanovenia jódového čísla poskytol vo svojej práci Pokorný [1]. Okrem základných postupov podľa Hübla, Wijsa a Hanuša uviedol metódy založené na adícii halogénanov, bromačné metódy, metódy stanovenia vo vodnom prostredí, metódy s prídavkom ortuťnatých solí ako katalyzátora, mikrometódy a analýzu špeciálnych typov lipidov, keď bežné metódy stanovenia jódového čísla zlyhávajú.

Už dlhší čas možno pozorovať rozvoj analytických metód v mikromeradle, čo súvisí predovšetkým so zavedením nových prístrojov, ktoré zodpovedajú súčasným vedecko-technickým poznatkom. Tieto umožňujú posudzovať i tie

Ing. Štefan Schmidt, doc. Ing. Václav Koman, CSc., Katedra technickej mikrobiológie a biochémie, Chemickotechnologická fakulta SVŠT, Jánska 1, 812 37 Bratislava.

prípady, keď je k dispozícii iba obmedzené množstvo vzorky. Najmä všeobecné rozšírenie chromatografie a jej aplikácia v biochémii sa nevyhnutne opiera o spoľahlivú analýzu frakcií v mikrohladinových množstvách.

Takmer všetky modifikácie stanovenia jódového čísla boli upravené aj ako mikrometódy, či už inštrumentálne alebo chemické. Z mnohých napr. možno určiť množstvo nespotrebovaného brómu polarograficky [2], veľmi citlivé sú rádiometrické metódy — na adíciu sa používa izotop ^{131}I [3, 4]. Koman určil jódové číslo z plynovochromatografického záznamu metylesterov mastných kyselín pomocou kombinovaných nomogramov [5, 6] alebo výpočtového programu [7], v prípade ktorého okrem jódového čísla možno vyjadriť aj všetky teoreticky a priemyselne významné fyzikálnochemické hodnoty triacylglycerolov. Rosenmundova—Kuhnennova [8] metóda patrí k bromáčnym metódam. Činidlom je v tomto prípade dibrómpyridínsulfát, ktorý sa pripraví jednoducho zmiešaním brómu, pyridínu a kyseliny sírovej v prostredí kyseliny octovej. Metódu uvedených autorov modifikoval na mikroverziu Yasuda [9] a pôvodnú Yasudovu mikrometódu neskôr mierne upravil Kates [10].

Cieľom príspevku je informovať o možnosti nahradiť klasickú metódu stanovenia jódového čísla podľa Hanuša Yasudovou mikrometódou najmä v tých prípadoch, keď popri malom množstve vzorky stredobodom záujmu je celkový čas analýzy, jednoduchosť, prípadne i úspora chemikálií.

Experimentálna časť

V experimentálnej časti sme použili vzorky rastlinných a živočíšnych tukov, odobraných z n. p. Palma, Bratislava alebo extrahovaných v laboratórnych podmienkach. Jódové číslo (ďalej JČ) tukov a olejov sme stanovili podľa platnej ČSN [11] a porovnali s výsledkami získanými mikrometódou uvedenou v literatúre [10]. Stanovenie je vhodné pre lipidy alebo mastné kyseliny.

Postup: v 50 ml kónickej banke so zábrusom sa k 5 ml lipidického roztoku v chloroforme obsahujúcom 2—5 mg lipidov (prípadne priamo navážených na mikrováhe) pridá 5 ml roztoku dibrómpyridínsulfátu. Po zamiešaní sa zmes nechá pri laboratórnej teplote 15 min v tme. Potom sa pridá 0,5 ml 10-percentného roztoku jodidu draselného, 0,5 ml destilovanej vody a niekoľko kvapiek jednoperceného škrobového roztoku v 13-percentnom roztoku KCl. Uvoľnený jód sa titruje štandardizovaným 0,02 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Za rovnakých podmienok sa robí slepý pokus.

Príprava dibrómpyridínsulfátu: tzv. Damsovo činidlo sa pripraví zmiešaním roztoku pyridínu (2 g) v ľadovej kyseline octovej (5 ml) so zmesou konc. kyselina sírová (2,5 g) a ľadová kyselina octová (5 ml). Po vychladnutí sa

k roztoku pridajú 2 g brómu a roztok sa doplní na 500 ml ľadovou kyselinou octovou.

Výpočet:

$$J\check{C} = \frac{a-b}{c} \cdot \frac{1,27}{5} \quad (\text{g I}_2 \text{ na } 100 \text{ g tuku}),$$

kde a je spotreba v ml na slepý pokus, b je spotreba v ml na vzorku a c je hmotnosť lipidov v g. Všetky použité chemikálie boli čistoty p. a.

Štatistické hodnotenie: pri štatistickom hodnotení oboch metód sme použili regresnú analýzu a korelačný koeficient [12]. Koeficienty oboch regresných rovníc $x_A = a_A + b_{Ax_B}$ a $x_B = a_B + b_{Bx_A}$ sa určili podľa vzťahov:

$$a_B = \frac{1}{k} (Sx_B - b_B Sx_A), \quad a_A = \frac{1}{k} (Sx_A - b_A Sx_B),$$

$$b_B = \frac{(Sx_A) \cdot (Sx_B) - kS_{x_Ax_B}}{(Sx_A)^2 - kS_{x_A}^2},$$

$$b_A = \frac{(Sx_A) \cdot (Sx_B) - kS_{x_Ax_B}}{(Sx_B)^2 - kS_{x_B}^2},$$

kde k je počet vzoriek, Sx_A , Sx_B súčet hodnôt súborov (x_A, x_B) , $S_{x_A}^2$, $S_{x_B}^2$ súčet štvorcov hodnôt členov súborov (x_A, x_B) a $S_{x_Ax_B}^2$ kvadrát súčtov hodnôt členov súborov (x_A, x_B) .

Na výpočet korelačného koeficientu sme použili vzťah $r = \sqrt{(b_A b_B)}$, pričom vo všetkých prípadoch A označuje Hanušov postup a B Yasudovu mikrometódu. Každý druh oleja alebo tuku sme analyzovali obidvoma metódami 6-krát. Zhodnosť výsledkov obidvoch metód sa posúdila grafickou Youdenovou metódou, ktorá sa zakladá na vynášaní výsledkov x_A a proti x_B v pravouhlých súradniciach. Interval spoľahlivosti sme vypočítali z rozpätia R podľa Deana a Dixona: $L_{1,2} = x \pm K_n R$, kde hodnoty koeficientu K_n pre dané n a zvolenú hladinu významnosti 0,95 sú tabelované. Smerodajnú odchýlku s a relatívnu smerodajnú odchýlku s_r sme vyjadrili podľa známych vzťahov [12].

Výsledky a diskusia

Podľa podmienok uvedených v experimentálnej časti sme JČ stanovili Hanušovou metódou (A) a Yasudovou mikromodifikáciou (B) Rosenmundovho—Kuhnenovho postupu. Výsledky analýz i základné štatistické vyhodnotenia uvádza tabuľka 1. Priemerná hodnota rozpätia pre postup A (Hanuš) je 0,93 a pre postup B (Yasuda) 2,43, relatívna smerodajná odchýlka 0,48 versus 1,36 %. To poukazuje na to, že v prípade Yasudovej mikrometódy sa pre opakované stanovenia dá logicky očakávať väčší rozptyl výsledkov okolo

Tabuľka 1. Štatistické zhodnotenie stanovenia JČ Hanušovou metódou a Yasudovou mikrometódou
Table 1. The regression line of iodine values obtained by the Hanuš and Yasuda methods

Vzorka ⁽¹⁾	Jódové číslo ⁽²⁾		R		s		s _r	
	A	B	A	B	A	B	A	B
Sľnečnicový olej ⁽³⁾	132,74 ± 0,51	129,14 ± 2,24	1,27	5,60	0,47	2,26	0,35	1,75
Repkový olej ⁽⁴⁾	96,90 ± 0,46	96,36 ± 1,73	1,14	4,32	0,39	2,23	0,40	2,31
Ricínový olej ⁽⁵⁾	87,51 ± 0,19	87,08 ± 0	0,47	0	0,17	0	0,19	0
Orechový olej ⁽⁶⁾	144,96 ± 0,39	146,83 ± 0,03	0,97	0,06	0,32	0,02	0,22	0,02
Mandľový olej ⁽⁷⁾	94,48 ± 0,18	93,15 ± 0	0,45	0	0,16	0	0,17	0
Makový olej ⁽⁸⁾	133,15 ± 0,34	131,92 ± 1,77	0,86	4,43	0,32	2,42	0,24	1,84
Palmový tuk sur. ⁽⁹⁾	53,40 ± 0,40	54,40 ± 2,58	1,01	6,44	0,47	2,14	0,87	3,93
Palmový tuk raf. ⁽¹⁰⁾	48,78 ± 0,54	49,91 ± 0,86	1,35	1,69	0,51	0,86	1,04	1,72
Bravčová masť ⁽¹¹⁾	61,76 ± 0,42	63,01 ± 0,13	1,04	0,32	0,40	0,16	0,66	0,25
Hovädzí loj ⁽¹²⁾	42,47 ± 0,29	40,40 ± 0,57	0,73	1,42	0,30	0,71	0,70	1,75

A — Hanušova metóda,⁽¹³⁾ B — Yasudova metóda,⁽¹⁴⁾ R — rozpätie,⁽¹⁵⁾ s — smerodajná odchýlka,⁽¹⁶⁾ s_r — relatívna smerodajná odchýlka (%).⁽¹⁷⁾

(1)Sample; (2)Iodine value; (3)Sunflower oil; (4)Rape oil; (5)Castor oil; (6)Nut oil; (7)Almond oil; (8)Poppy oil; (9)Raw palm fat. (10)Refined palm fat; (11)Lard; (12)Tallow (bovine); (13)A — Hanuš method; (14)B — Yasuda method; (15)R — span; (16)s — standard deviation; (17)s_r — relative standard deviation (%).

strednej hodnoty. Samozrejme, pri použití mikrometódy treba mať určitú prax na dosiahnutie uspokojivej reprodukovateľnosti.

Obrázok 1 ilustruje zhodnosť výsledkov obidvoch metód pomocou grafickej Youdenovej metódy. Získala sa množina bodov rovnomerne a veľmi tesne rozložená okolo priamky prechádzajúcej začiatkom a so smernicou $b = 1$.

Zisťovanie spoľahlivosti mikrometódy porovnaním s klasickou metódou vychádzalo z regresnej závislosti obidvoch metód. Regresné rovnice nadobudli tvar:

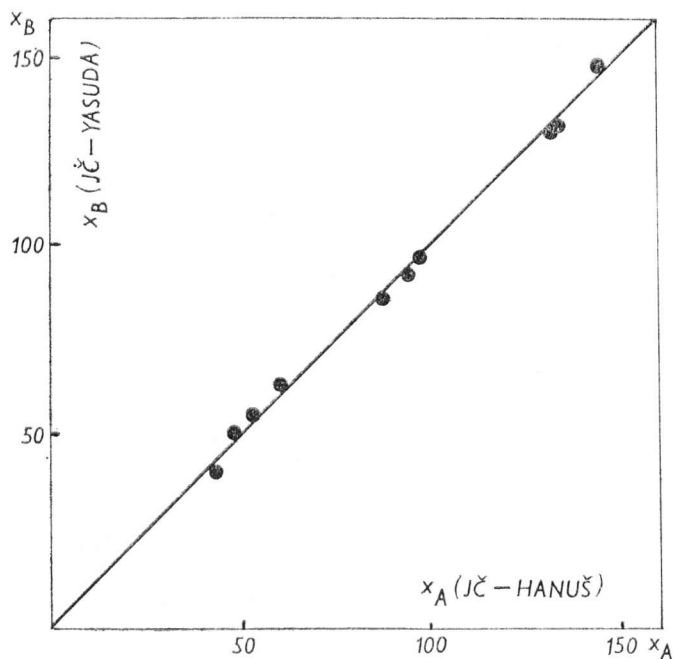
$$\begin{aligned}x_A &= -0,3649 + 1,0085 x_B, \\x_B &= 0,5403 + 0,9896 x_A.\end{aligned}$$

Porovnanie a_B s a_A informuje, že metóda B je proti metóde A zaťažená nepatrnou kladnou sústavnou chybou, nie však v zmysle štatisticky významného rozdielu. Podiel $b_B/b_A \neq 1$ predpokladá proporcionálnu sústavnú chybu, avšak z hodnoty korelačného koeficientu $r = 0,99$ vyplýva zanedbateľná veľkosť náhodných chýb.

Z podrobného štatistického zhodnotenia obidvoch metód možno konštatovať vhodnosť použitia Yasudovej metódy, ktorá výsledkami tesne sleduje Hanušov postup. Jej výhody v porovnaní s klasickou metódou sú tieto:

- zhruba dvojnásobne kratší čas celkovej analýzy,
- použitie veľmi malých množstiev vzoriek (2—5 mg),
- znížená spotreba činidiel, najmä ľadovej kyseliny octovej.

Dosiahnutie reprodukovateľných výsledkov vyžaduje dodržanie podmienok metódy a celkove analyticky „čistejší“ prístup ako pri klasickej Hanušovej metóde.



Obr. 1. Regresná priamka jódových čísiel stanovených podľa Hanušovej a Yasudovej metódy.

Fig. 1. The regression line of iodine values obtained by the Hanuš and Yasuda methods.

Za technickú pomoc pri vypracovaní príspevku autori ďakujú M. Bystrickej a V. Grmanovej.

Literatúra

1. POKORNÝ, J.: Chem. Listy, 66, 1972, s. 21.
2. KOMAN, V., POMIKALEKOVÁ, A.: In: Zborník prác Chemickotechnologickej fakulty SVŠT, 1, 1962, s. 151.
3. KAUFMANN, H. P. — BUDWIG, J.: Fette u. Seifen, 53, 1950, s. 253.
4. KOMAN, V.: Príspevok k štúdiu vyšších nenasýtených mastných kyselín a ich izomérov. Kand. dizertačná práca. Bratislava, Chemickotechnologická fakulta SVŠT 1963.
5. KOMAN, V. — DANIELOVÁ, E.: Chem. Zvesti, 28, 1974, s. 218.
6. KOMAN, V. — DANIELOVÁ, E.: Chem. Zvesti, 29, 1975, s. 256.

7. KOMAN, V. — KOTŮČ, J.: J. Amer. Oil Chem. Soc., 53, 1976, s. 563.
8. ROSENMUND, K. W. — KUHNEN, W.: Z. Unters. Nahrungs-Genussm., 46, 1923, s. 154.
9. YASUDA, H.: J. Biol. Chem., 94, 1931, s. 401.
10. KATES, M.: Technique of Lipidology. New York, American Elsevier Publ. Co. 1972.
11. ČSN 58 0101: Metody zkoušení tuků a olejů. 1965.
12. ECKSCHLAGER, K. — HORSÁK, I. — KODEJŠ, Z.: Vyhodnocování analytických výsledků a metod. Praha 1980.

Верификация микрометода для определения иодного числа

Р е з ю м е

В работе сравнивается метод для определения иодного числа жиров и масел Гануша с микрометодом по Yasuda. При помощи регрессионного анализа и коэффициента корреляции было обнаружено очень хорошее совпадение обоих методов, коэффициент корреляции $r = 0,99$. Верифицированный микрометод позволяет определять иодное число и по ограниченному количеству образца, причем значительно сокращается общее время анализа и экономятся химические реактивы.

A verification of the micromethod for iodine value determination

Summary

The Hanuš method for iodine value determination of fats and oils was compared with the Yasuda micromethod. By means of regression analysis and correlation coefficient a very good agreement between the above methods was found, correlation coefficient value $r = 0.99$. The verified micromethod enables to state the iodine value even in a reduced quantum of sample and at considerably shortened total time of analysis. It saves chemicals, too.