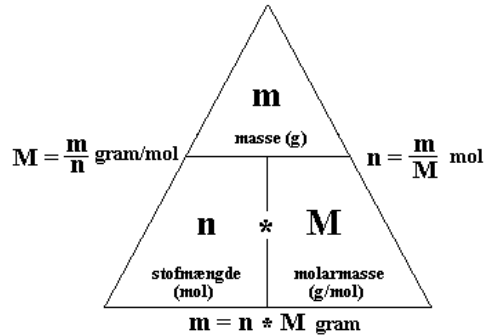


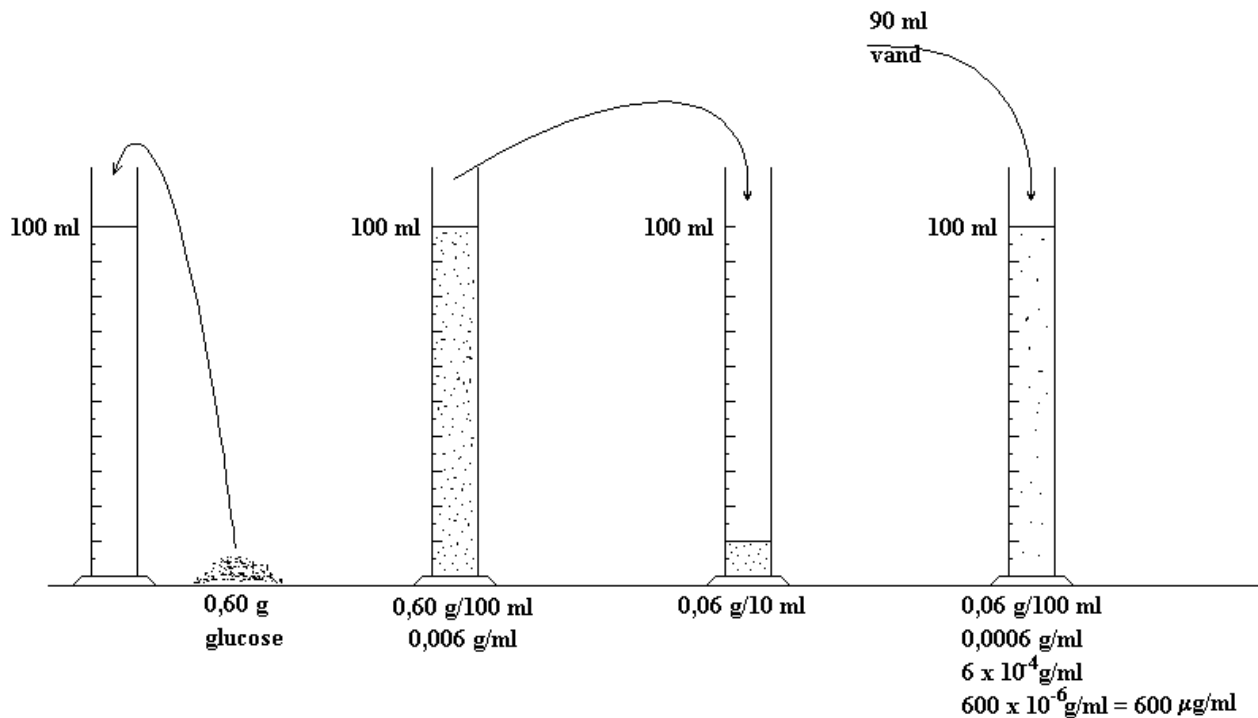
Bilag til Kvantitativ bestemmelse af glucose

Det "synlige" formål med øvelsen er at lære, hvorledes man helt præcist kan bestemme små mængder af glucose i en vandig opløsning ved hjælp af målepipetter, spektrofotometer og en indikatorvæske. Det "skjulte", men lige så vigtige formål er, at lære at håndtere begreberne: **masse** (gram), **stofmængde** (mol), **molar masse** (gram/mol) og **koncentration** (masse/liter (g/l); mængde/liter (mol/l)). De tre første begreber er bundet sammen i en simpel huskeregel ("trekantmodellen"), der har følgende udseende og løsninger:



Trekanten fortæller at $n = m$ "over" M ; $M = m$ "over" n og $m = n$ "gange" M .

Da vi i øvelsen skal benytte en glucoseopløsning, der kun indeholder en koncentration på 600 μg glucose per milliliter, må den fremstilles i to trin, da vi ikke kan afveje så små mængder glucose.



Figuren oven for viser, hvorledes glucoseopløsningen, der indeholder 600 μg glucose/ml, fremstilles.

① Der afvejes 0,60 gram glucose, som opløses i 100 ml demineraliseret vand. Dvs. der i måleglasset er 0,60 g/100 ml. Det svarer til en massekoncentration på 0,006 g/ml. Denne stamopløsning var færdigblandet da forsøget startede. Vi kan også udtrykke stamopløsningens molære koncentration, det gøre med formlen:

$$c_A = \frac{n}{v} \text{ mol/liter,} \quad (\text{formel 1})$$

hvor c_A er antal mol af stoffet A (glucose), der er anvendt til at fremstilling af 1 liter opløsning.

For at beregne c_A er det nødvendigt at kende stofmængden (n). Ifølge huskereglen beregnes den ved hjælp af formlen $\text{mol} = \text{vægt i gram af stoffet/stoffets molarmasse}$, eller som den mere *formelt* kan skrives:

$$n = \frac{m}{M}. \quad (\text{formel 2})$$

M , der er molarmassen, har dimensionerne gram/mol. Molarmassen for glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) er 180g/mol; den findes ved hjælp af *atomvægten i det periodiske system*, hvor massen regnes i units (u): $(6 \cdot 12 \text{ u}) + (12 \cdot 1 \text{ u}) + (6 \cdot 16 \text{ u}) = 180 \text{ u}$. (se også det udelte bilag: **Begrebet mol**). Ved at indsætte de kendte værdier kan vi nu finde n :

$$n = \frac{0,60}{180} = 0,0033 \text{ mol}$$

Da vi har opløst denne stofmængde på 0,0033 mol i 100 ml demineraliseret vand, kan vi nu beregne den molære koncentration af glucose i stamopløsningen ved at benytte formel 1:

$$c_{\text{glucose}} = \frac{0,0033}{100 \cdot 10^{-3}} = 0,033 \text{ mol/liter}$$

Formel 1 og formel 2 kan sættes sammen til et enkelt formeludtryk for den molære koncentration, som det er gjort i det udelte bilag: **Begrebet mol**. Formlen får følgende udseende:

$$c_A = \frac{\frac{m}{M}}{v \cdot 10^{-3}} = \frac{m}{v \cdot 10^{-3} \cdot M} = \frac{m \cdot 1000}{v \cdot M} \text{ mol/liter} \quad (\text{formel 3}),$$

hvor m er massen (“vægten”) af det opløste stof A (glucose) i gram, v er mængden af opløsningsmiddel i ml og M er molarmassen af det opløste stof A (glucose).

② Hvert hold afpipetterede 10 ml af opløsningen og overførte disse til et tomt måleglas. Når der i hver ml af opløsningen er 0,006 g glucose, må der selvsagt i de 10 ml være 0,06 g glucose. Bemærk at stofmængden stadig er den samme: nemlig 0,033 mol/liter.

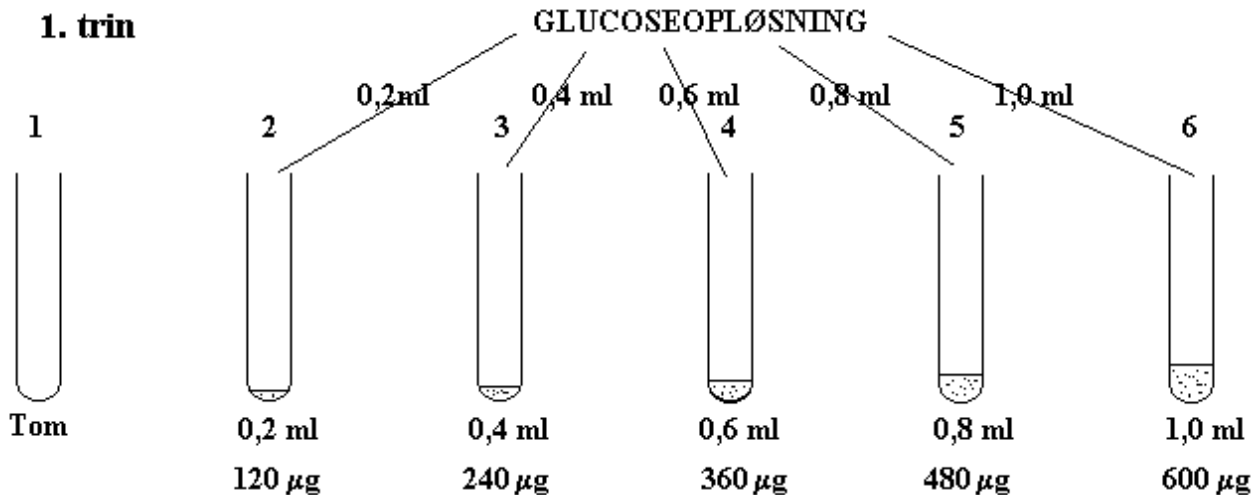
Måleglasset med de 0,06 g glucose påfyldes nu 90 ml vand, hvorved det samlede rumfang er 100 ml. De 0,06 gram glucose er nu fordelt i 100 ml vand. Koncentrationen udtryk i g/ml er nu: 0,0006g/ml, eller hvis vi ganger med 10^6 : 600 $\mu\text{g/ml}$.

For øvelsens skyld kan denne massekoncentration også udtrykkes som en molær koncentration. Ved at benytte formel 3 ovenfor finder man:

$$c_{\text{glucose}} = \frac{0,06 \cdot 1000}{100 \cdot 180} = 0,0033 \text{ mol/l}$$

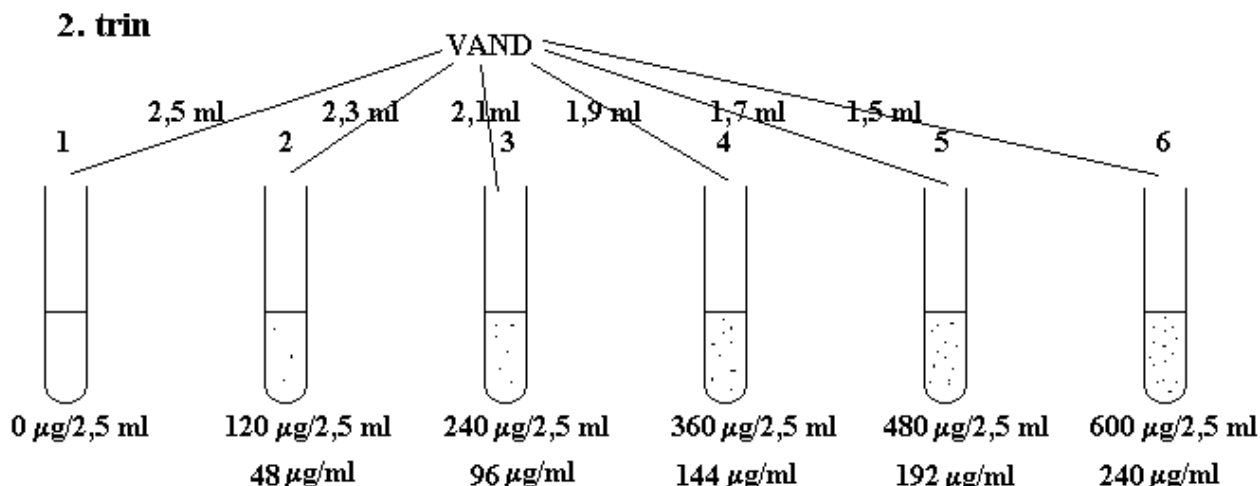
Næste led i øvelsen er at fremstille 6 reagensglas, der indeholder kendte glucosekoncentrationer, samt to reagensglas, der indeholder ukendte koncentrationer af glucose.

I det følgende skal vi nøje følge, hvorledes de seks reagensglas med kendte, men forskellige koncentrationer af glucose, tilberedes. Det foregår i to i to trin som vist i nedenstående figurer.



❶ Reagensglas nr. 1 tilføres ikke glucoseopløsning. I reagensglas nr. 2 overføres meget omhyggeligt 0,2 ml glucoseopløsning ved hjælp af en 1 ml målepipette. Da der i stamopløsningen er 600 µg glucose/ml, må der i de 0,2 ml, der overføres, være 1/5 af denne vægtmængde nemlig 120 µg glucose. I reagensglas nr. 3, hvor der overføres 0,4 ml, må der være 2/5 af de 600 µg glucose = 240 µg glucose. I glas 4, 5 og 6, hvor der henholdsvis overføres 0,6 ml, 0,8 ml og 1,0 ml, må der være 360, 480 og 600 µg glucose.

❷ Nu fyldes der demineraliseret vand i alle glassene, så der er det samme volumen i alle 6 reagensglas. Ved at påfylde glassene vand, ændres der ikke på glucosemængden i de 6 glas. **Men koncentrationen er ændret!** Påfyldningen, der foretages med en 5 ml målepipette, sker efter skemaet i nedenstående figur:



Efter påfyldningen af vand er der 2,5 ml vand i hvert glas. I Reagensglas 1 er der ingen glucose, det er tomt, eller som man siger "blank", det skal bruges, når spektrofotometeret skal indstilles.

I reagensglas nr. 2 er de 120 µg glucose fordelt i 2,5 ml vand; det giver målt i µg/ml en koncentration på $120/2,5 = 48 \mu\text{g/ml}$. I glas nr. 2 er koncentrationen $240/2,5 = 96 \mu\text{g/ml}$ osv. Vi har nu gode oplysninger om, hvor meget der er i hvert af de 6 reagensglas. Den eneste, men væsentlige usikkerhedsfaktor er den menneskelige: Hvor præcis og omhyggeligt har jeg afpipetteret stamopløsningen og vandet? Da målingerne altid foregår i spektrofotometerets cuvetteglas, har jeg i øvelsen valgt, at udtrykke de kendte koncentrationer per glas, men det er vigtigt, at I kan foretage de andre omregninger til mikrogram/l (g/l) og mol/l (millimol/l).

Hvis vi ønsker at kende den molære koncentration i hver glas, sker beregningen med formel 3. Benyttet på glas nr.2 ser beregningen således ud:

$$c_{\text{glucose}} = \frac{120 \cdot 10^{-6} \cdot 1000}{2,5 \cdot 180} = 0,0002667 \text{ mol/l} = 0,2667 \text{ mmol/l (millimol/l)}$$

i glas nr 3, hvor koncentrationen er dobbelt så stor er den molære koncentration = 0,000533 mol/l eller 0,533 mmol/l. Ved små koncentrationer ser det pænere ud at skrive koncentrationerne i millimol.

De 6 kendte prøver, skal nu blandes med salicylatreagens. Ved tilberedningen af denne, er der bla. benyttet en 2 molær natriumhydroxid (NaOH) opløsning (det fremgår af øvelsesvejledningen). Prøv din viden efter, om du også kommer til, at det er en 2 molær opløsning, der fremkommer, når der er opløst 8,0 g NaOH i 100 ml vand).

Med en 5 ml målepipette tilsættes der 1,0 ml salicylatreagens (indikatorvæske) til hvert glas. Det samlede indhold i hvert glas er nu 3,5 ml. Jeg håber, at alle kan indse, at den sidste tilsætning af salicylat ikke på nogen måde påvirker beregningerne over, hvad der er af glucose i de 6 reagensglas. Det, vi skal måle er, hvorledes den samme mængde salicylat ragerer med forskellige koncentrationer af glucose opløst i 2,5 ml vand.

Alle 6 reagensglas koges i vandbad i 5 minutter. Ved den høje temperatur vil glucose reducere salicylatreagensen. Den reducerede reagens ændrer farve fra gul til en rød-gul farve. Jo mere glucose, der er i et glas, jo mere reduceret salicylat dannes der, og jo mørkere rødfarvet bliver indholdet i glasset.

I glas nr.1, hvor der ikke er glucose, haves den ureducerede salicylatreagens farve. Denne reagens tilbageholder alle bølgelængder i det synlige lys undtagen den bølgelængde, der svarer til gult lys: væskens farve. Det gule lys, har en bølgelængde på 540 nanometer ($540 \cdot 10^{-9}$ meter). Lys, der kun består af én bestemt bølgelængde, kaldes *monokromatisk* ("en farve").

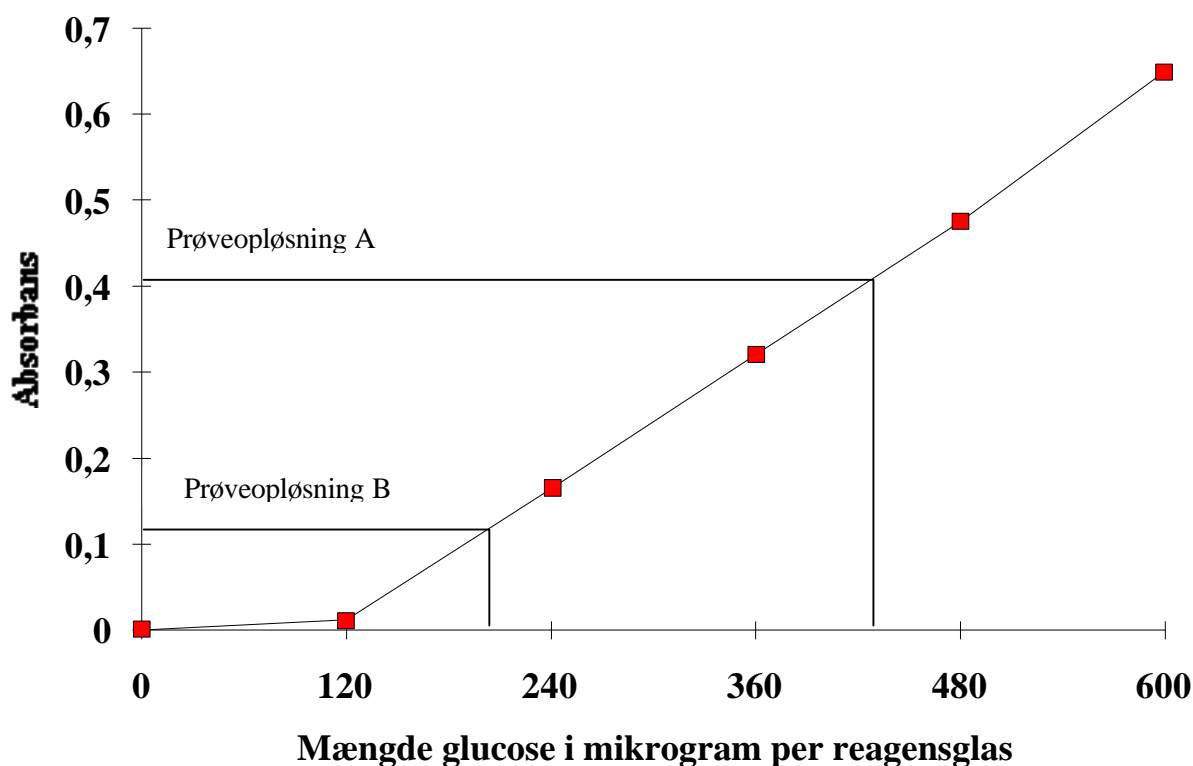
Da indholdet i glas nr. 1 ikke tilbageholder gult lys, men tværtom sender det igennem (transmitterer det), benytter vi dette glas til at justere spektrofotometeret. Proceduren er: Først tændes spektrofotometeret. Det opvarmes i ca. 2 minutter. Med tom, lukket cuvetteholder indstilles fotometeret til 0% transmittans, dvs. intet lys kommer igennem cuvetteholderen. Dernæst isættes glas nr 1 med den gule ikke-reducerede salicylat. Cuvetteholderens låg lukkes og skalaen indstilles til 100% transmittans. Nu er instrumentet kalibreret. Da der sendes 100% lysenergi igennem prøven, absorberes der ikke lys, dvs. absorbansen er lig med nul. Når transmittansen er 0% er absorbansen tilsvarende uendelig stor. Absorbansen er fundet til at være logaritmen til forholdet mellem intensiteten af det lys der går gennem ureducerede salicylat, svarende til 100% transmittans, og intensiteten af det lys, der slipper gennem en prøve med reduceret salicylat. Det er sandt i alle de tilfælde, hvor "tykkelsen" af prøven er konstant. Tykkelsen af prøven er tykkelsen af de cuvetter, der passer nøje ned i spektrofotometeret. Se iøvrigt i øvelsesvejledningen

Når spektrofotometeret aflæses kan man vælge at aflæse transmittansen. Gøres det, skal man afbilde sit resultat på semilogaritmisk papir. Man kan istedet aflæse absorbansen på apparatets logaritmiske skala, og afbilde sit resultat på almindeligt milimeterpapir.

Sammenhængen mellem absorbansen og koncentrationen af prøverne er lineær bortset fra helt tynde koncentrationer.

Et resultat af målingerne på de seks kendte glas kan se ud som følger:

Absorbansens afhængighed af glucosekoncentrationen



Parallelt med tilberedningen af de seks reagensglas med kendte glucosekoncentrationer, er der tilberedt to reagensglas af to prøveopløsninger (A og B) med ukendte glucosekoncentrationer. Til reagensglassene (nr. 7 og nr. 8) er der tilført 1 ml af hver af de to prøveopløsninger plus 1,5 ml vand og 1,0 ml salicylatreagens. Begge glas har således en vandig opløsning af glucose på 2,5 ml svarende til de seks kendte reagensglas. Glassene koges på samme vis som de kendte glas. Absorbansen aflæses på fotospektrometeret.

Ved hjælp af diagrammet over sammenhængen mellem de kendte glucosemængder og absorbansen, kan I grafisk aflæse mængden af glucose i de ukendte prøveopløsninger A og B. Husk at angive hvad det er for en koncentration i har bestemt ($\mu\text{g}/\text{glas}$, $\mu\text{g}/\text{ml}$ eller mol/l).