

# ÅRHUS AKADEMI



## BIOLOGI ØVELSE

### Øvelse 1: Kvantitativ bestemmelse af glukose

**Formålet** er ved hjælp af absorbansmålinger af kendte glukoseopløsninger at konstruere en kalibreringskurve, der viser sammenhængen mellem absorbansen og glukosekoncentrationen, samt at benytte kurven til at bestemme glukosekoncentrationen i to ukendte opløsninger.

#### Materialer

Spektronic (spektrofotometer) med tilhørende cuvetter	20	Måleglas 100 ml Erlenmeyerkolbe (200 ml) Glukose stamopløsning
8 reagensglas		Salicylatreagens
Reagensglasstativ		Ukendte prøver A og B
1 målepipette (1 ml)		Demineraliseret vand
1 fuldpipette (1 ml)		Gryde
1 målepipette (5 ml)		Varmeplade
1 fuldpipette (5 ml)		Millimeterpapir
1 fuldpipette (10 ml)		

#### Metode til bestemmelse af glukosekoncentrationen.

Den gule forbindelse 3,5-dinitrosalicylat reduceres af glukose til en rødgul forbindelse. Målingerne udføres med gult monokromatisk lys med bølgelængden 540 nm ( $1 \text{ nm} = 10^{-9}$  meter), hvor den reducerede forbindelse har en god absorption. Tilbageværende ureduceret salicylatreagens absorberer ikke dette gule lys. Bortset fra meget lave glukosekoncentrationer er de målte absorbansværdier direkte proportionale med glukosekoncentrationen.

**Salicylatreagens:** 5g 3,5-dinitrosalicylsyre opløses under opvarmning i 100 ml 2M NaOH (8g NaOH i 100 ml). Desuden opløses 150 g NaK-tartrat i 250 ml vand under opvarmning. De to opløsninger blandes og fortyndes til 500 ml med vand. Reagensen, der er holdbar i længere tid, findes færdigblandet i laboratoriet..

**Glukoseopløsning,** indeholdende 600  $\mu\text{g}$  glukose/ml, laves på følgende måde: I et måleglas opløses 0,60 g glukose i 100 ml destilleret vand. Denne stamopløsning findes færdigblandet i laboratoriet. Hvert hold fortynder denne opløsning 10 gange ved med en pipette at overføre 10 ml til et 100 ml måleglas og fortynde med destilleret vand til 100 ml. Opløsningen hældes derefter over i en tør 200 ml konisk kolbe og omrystes. (Regn efter om du nu har en opløsning med 600  $\mu\text{g}$  glukose/ml).

**De ukendte prøveopløsninger A og B** findes færdiglavede i to brune flasker mærket A og B.

**Vandbad,** bestående af vandhanevand i en gryde, opvarmes til kogepunktet.

#### Fremgangsmåde:

Til otte nummererede reagensglas tilsættes opløsninger efter tabellen, som er på side 4.

# ÅRHUS AKADEMI



## BIOLOGI ØVELSE

Glukoseopløsning, ml	1	2	3	4	5	6	8	9	Egnet pipette 1 ml målepipette
Prøveopløsning A, ml	-	-	-	-	-	-	1,0	-	1 ml fuldpipette
Prøveopløsning B, ml	-	-	-	-	-	-	-	1,0	1 ml fuldpipette
Destilleret vand, ml	2,5	2,3	2,1	1,9	1,7	1,5	1,5	1,5	5 ml målepipette
Salicylatreagens, ml	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	5 ml fuldpipette
Glukosemængde i µg/glas	-	120	240	360	480	600	....	....	
Samlede volumen, ml	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	3,5	
Absorbans	0,0	....	....	....	....	....	....	....	

Efter tilsætningen af de forskellige opløsninger omrystes reagensglassene omhyggeligt. Samtlige reagensglas anbringes i det kogende vandbad og gennemvarmes i 5 minutter, hvorved den tilstedeværende glukose reducerer salicylatreagensen. Glassene afkøles i et bægerglas med vand til de når stuetemperatur. Dernæst hældes indholdet over i 8 tørre cuvetteglas, der er anbragt i rækkefølge i en reagensglasholder. Hvert glas måles i spektrofotometeret ved 540 nm. Cuvetteglas nr. 1 er "den blanke" og indstilles til 100% transmittans.

En graf tegnes over sammenhængen mellem de kendte glukosemængder og absorbansen. Aflæs på grafen mængden af glukose/ml som findes i prøveopløsningerne A og B. Sammenlign med de korrekte værdier som udleveres af Niels R. efter forsøget er afsluttet.

I rapporten ønskes der ud over resultaterne af øvelsen en nærmere redegørelse for, hvorfor glukose virker reducerende på salicylsyren. Du skal benytte din viden om monosakkaridernes kemiske opbygning, og du kan inddrage følgende korte forklaring på begreberne oxidation og reduktion.

### **Oxidation-reduktion**

I levende organismer foregår der et stort antal **redoxprocesser**, hvorunder **elektroner** overføres fra en forbindelse til en anden. Hvis elektroner forskydes væk fra den atomkerne, de er bundet til, eller helt løsrives fra den, siger man, at atomet er blevet **oxideret** (iltet). Hvis omvendt elektronerne er blevet bundet stærkere til kernen, eller der er optaget elektroner udefra, siger man, at atomet er blevet **reduceret**.

I cellen er det enzymer som katalysere disse reaktioner. Enzymerne kaldes oxidoreduktaser; de kan katalysere processen ved lav temperatur. I øvelsen ovenfor indgår der ikke hjælpende enzymer, men da der opvarmes til kogepunktet i 5 minutter kan oxidationen og reduktionen ske uden hjælp. I den levende celle sker det ofte, at elektronerne overføres sammen med protoner (H<sup>+</sup>), dvs. som Hydrogen (Brint). Husk at 1 elektron + 1 proton = Hydrogen.

# ÅRHUS AKADEMI



## BIOLOGI ØVELSE

Den forbindelse, der får tilført Hydrogen (elektroner), bliver reduceret. Den forbindelse, der afgiver Hydrogen (elektroner) bliver oxideret. Den forbindelse, der reduceres, dvs. den der har fået tilført elektroner, er blevet energiberiget. Den, der afgiver elektroner, er blevet fattigere på energi. Reducerede organiske forbindelser, dvs. dem der er rige på Hydrogen, er altså energirige. Hvis de

som kan afgive elektroner, kaldes et reduktionsmiddel eller en **reduktor**, og et stof, som kan optage elektroner et oxidationsmiddel eller en **oxidator**.