

# Εργαστήριο Αρχών Ενόργανης Ανάλυσης

## Εργαστηριακή Άσκηση 4: Προσδιορισμός γλυκόζης με τη μέθοδο προσθήκης γνωστής ποσότητας

Η παρουσίαση που ακολουθεί προορίζεται για συμπληρωματικό ενημερωτικό υλικό των φοιτητών που παρακολούθησαν το εργαστήριο.

Οι εικόνες, η ύλη και το υλικό δεν είναι στο σύνολό τους πρωτότυπα και βασίζονται στις σημειώσεις και σε αρχεία που είναι ανεβασμένα στο eclass του μαθήματος και/ή στο διαδίκτυο.

Ματιάδης Δημήτρης  
Χημικός

# Στόχοι εργαστηριακής άσκησης

Μετά την ολοκλήρωση του μαθήματος θα είστε σε θέση να γνωρίζετε:

- ✓ τις βασικές μεθόδους ποσοτικής ανάλυσης
- ✓ τη μέθοδο προσθήκης γνωστής ποσότητας
- ✓ την εφαρμογή μίας ή περισσοτέρων αντιδράσεων για την πραγματοποίηση ποσοτικής ανάλυσης
- ✓ την εφαρμογή των ανωτέρω για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης σε βιολογικά υγρά



\* Η ακόλουθη παρουσίαση βασίζεται στο βιβλίο «ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ» (Επιμέλεια: Καθηγητής Π. Καρκαλούσος, Κεφ. 1.13.1, σελ. 27-30) που μπορείτε να βρείτε στο διαδίκτυο στο αποθετήριο «Κάλλιπος»

# Ποσοτικός Προσδιορισμός

1. Με πρότυπο διάλυμα
2. Με κατασκευή πρότυπης καμπύλης
3. Με τη μέθοδο προσθήκης γνωστής ποσότητας
4. Με τη μέθοδο πολλαπλών προσθηκών

# Ποσοτικός Προσδιορισμός

## 1. Με πρότυπο διάλυμα

Έστω ότι το πρότυπο διάλυμα  $\Delta\pi$  έχει συγκέντρωση  $C\pi$  και η απορρόφησή του είναι ίση με  $A\pi$ . Η απορρόφηση του άγνωστου διαλύματος  $\Delta\chi$  συγκέντρωσης  $C\chi$  έστω ότι είναι ίση με  $A\chi$ .

Με εφαρμογή του νόμου των Lambert-Beer για τα δύο διαλύματα, έχουμε:

$$\text{Άγνωστο Διάλυμα: } A\chi = k l C\chi \quad (k = \varepsilon)$$

$$\text{Πρότυπο Διάλυμα: } A\pi = k l C\pi$$

Με διαίρεση κατά μέλη έχουμε:

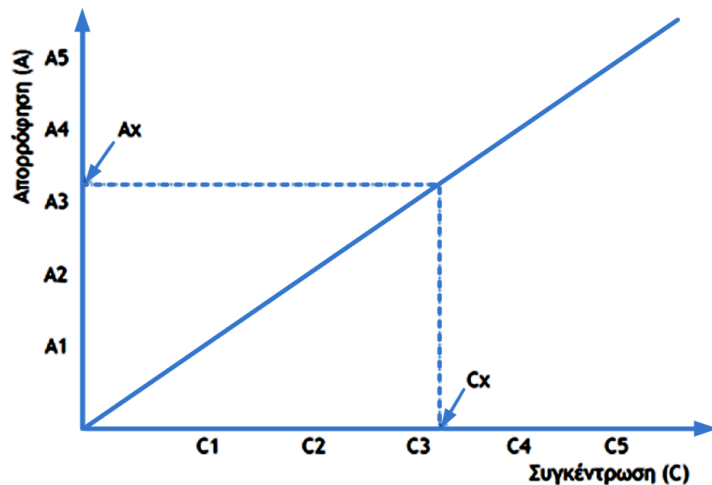
$$\frac{A\chi}{A\pi} = \frac{C\chi}{C\pi}$$

$$\text{Λύνοντας ως προς } C\chi \text{ έχουμε: } C\chi = \frac{A\chi}{A\pi} C\pi$$

# Ποσοτικός Προσδιορισμός

## 2. Με κατασκευή πρότυπης καμπύλης

Χρησιμοποιούνται πρότυπα διαλύματα της ουσίας που θέλουμε να αναλύσουμε. Με φωτομέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων λαμβάνουμε τις απορροφήσεις τους ( $A_i$ ). Με γραφική παράσταση, σε σύστημα ορθογώνιων αξόνων, των ζευγών ( $A_i, C_i$ ) κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη



Εικόνα: Κατασκευή πρότυπης καμπύλης

# Ποσοτικός Προσδιορισμός

## 3. Με τη μέθοδο προσθήκης γνωστής ποσότητας

Εφαρμόζεται στις περιπτώσεις:

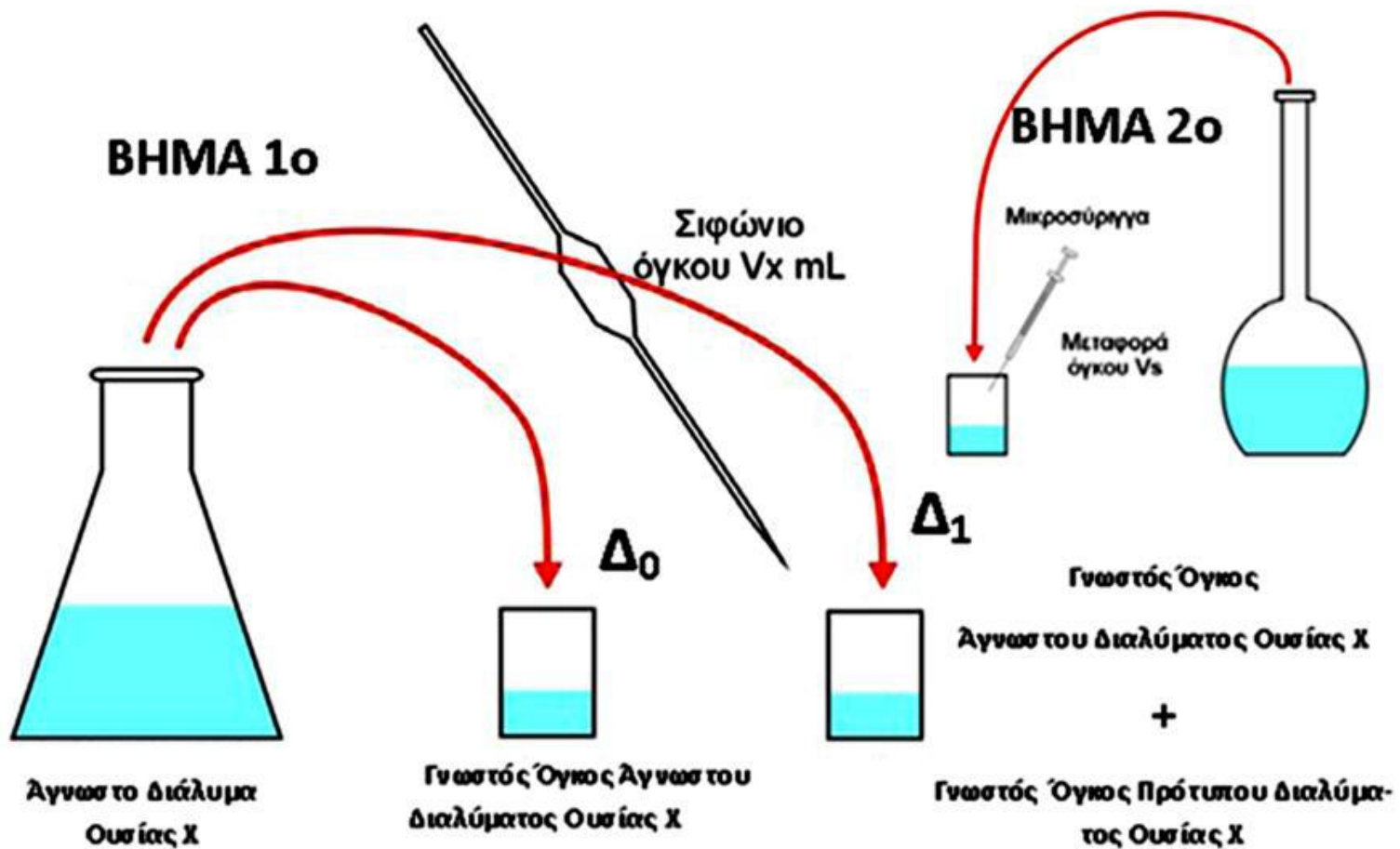
- Στις οποίες το μητρικό υλικό του δείγματος ασκεί μεγάλη επίδραση στη συνάρτηση βαθμονόμησης (στατιστικά διαφορετική κλίση) → επηρεάζεται έντονα ο συντελεστής  $k$ .
- Είναι αδύνατη η παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων παρόμοιας συστάσεως με τα διαλύματα των αγνώστων, είτε διότι είναι άγνωστη η σύστασή τους, ή ποικίλλει από δείγμα σε δείγμα, είτε επειδή υπάρχουν ουσίες που παρεμποδίζουν → πρακτικά αδύνατη η χρήση καμπύλης αναφοράς
- Απαιτείται γραμμική σχέση της καμπύλης βαθμονόμησης (πχ σχέση  $P = k \cdot Cx$ )

# Προσθήκη γνωστής ποσότητας

## Διαδικασία:

- μετρείται το διάλυμα του άγνωστου δείγματος.
- Στη συνέχεια μετρείται το ίδιο ή άλλο τμήμα του διαλύματος του δείγματος, στο οποίο έχει προστεθεί μικρός όγκος πρότυπου διαλύματος, ώστε να προκαλέσει αύξηση της συγκεντρώσεως του συστατικού κατά  $\Delta C$  (θεωρείται μικρή ή αμελητέα η αύξηση του όγκου του διαλύματος).

# Προσθήκη γνωστής ποσότητας



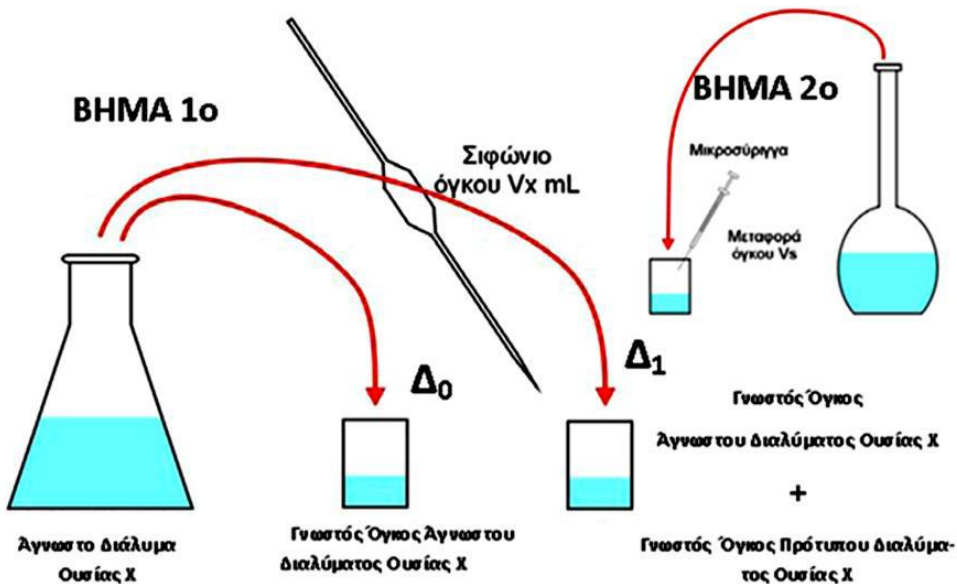


# Προσθήκη γνωστής ποσότητας

## Πειραματικό Μέρος

### Βήμα 1ο

Από το άγνωστο διάλυμα της ουσίας X, με άγνωστη συγκέντρωση  $C_X$ , λαμβάνουμε γνωστό όγκο  $V_X$  δείγματος με σιφώνιο (π.χ.  $V_X = 10,00 \text{ mL}$ ) και τον μεταφέρουμε σε δύο μικρά ποτήρια ζέσεως ( $\Delta_0$  και  $\Delta_1$ ), όπως φαίνεται στο σχήμα.

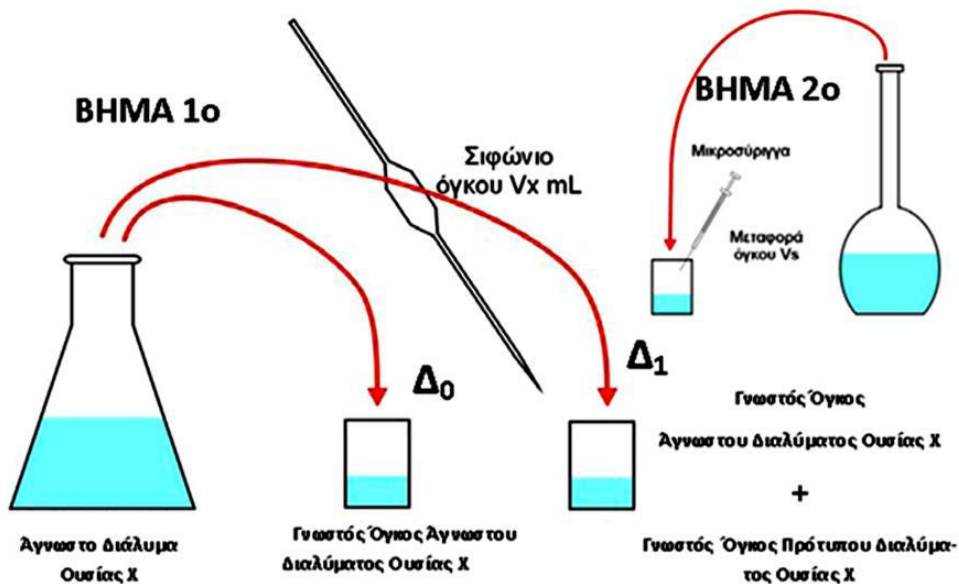


# Προσθήκη γνωστής ποσότητας

## Πειραματικό Μέρος

### Βήμα 2ο

Με ένα σιφώνιο μεταφέρουμε ακριβώς γνωστό όγκο  $V_s$  πρότυπου διαλύματος της ουσίας  $X$ , συγκέντρωσης  $C_s$  (π.χ.  $C_s = 1000 \mu\text{g } X/\text{mL}$ ) στο ποτήρι  $\Delta_1$ . Ο όγκος αυτός θα πρέπει να είναι πολύ μικρότερος [τυπικά το 1/100 ή ακόμη λιγότερο] από τον όγκο  $V_x$  (π.χ.  $V_s = 0,100 \text{ mL}$ ).

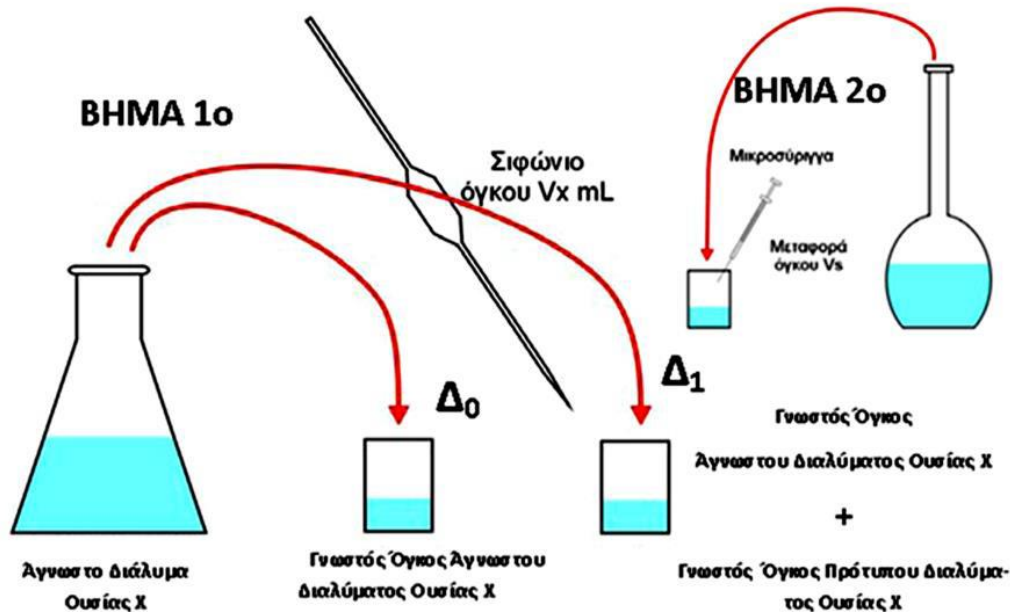


# Προσθήκη γνωστής ποσότητας

## Πειραματικό Μέρος

### Βήμα 3ο

Μετρούμε με το όργανο τη φυσική/χημική παράμετρο  $P_0$  στο ποτήρι  $\Delta_0$ . Στην περίπτωση μας, δεν ενδιαφέρει η τεχνική που χρησιμοποιούμε και το όργανο ανάλυσης, αρκεί να ισχύει η αναλογική σχέση μεταξύ του μετρούμενου μεγέθους και της συγκέντρωσης. Έστω ότι βρίσκουμε  $P_0 = 35,0$ .

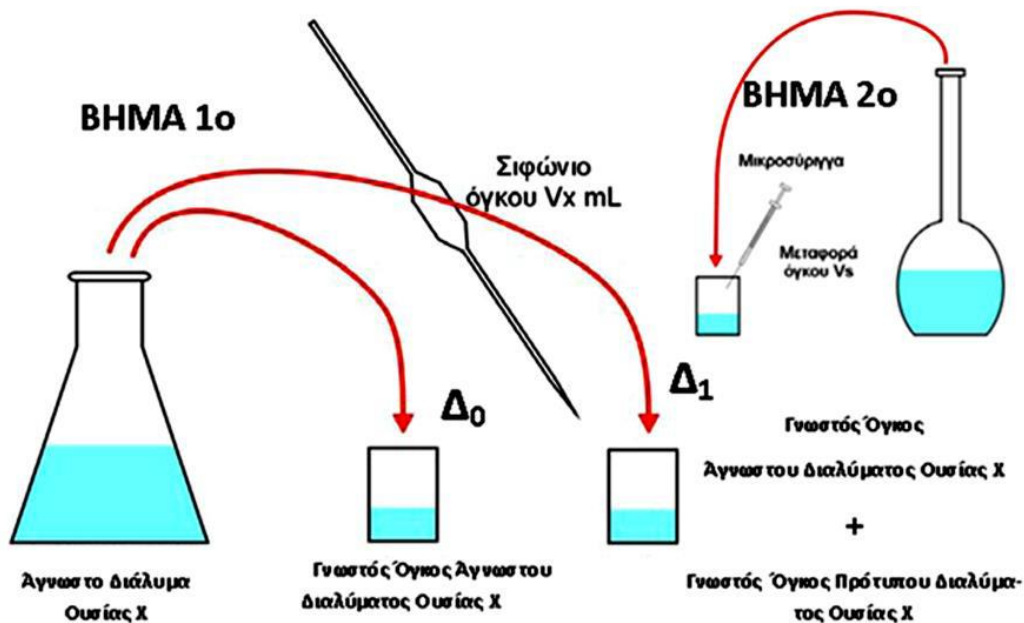


# Προσθήκη γνωστής ποσότητας

## Πειραματικό Μέρος

### Βήμα 4ο

Μετρούμε με το όργανο την παράμετρο  $P$  στο ποτήρι  $\Delta_1$ . Προφανώς θα είναι  $P_1 > P_0$ , αφού στο ποτηράκι  $\Delta_1$  βάλαμε επιπλέον ποσότητα της ουσίας  $X$  («γνωστή προσθήκη»). Έστω ότι τη βρίσκουμε  $P_1 = 61,0$ .



# Προσθήκη γνωστής ποσότητας

## Υπολογισμός συγκέντρωσης με εξίσωση

Επειδή προσθέσαμε πολύ μικρό όγκο προτύπου στο ποτήρι  $\Delta_1$ , ουσιαστικά η αραιώση ήταν αμελητέα και δεν διαταράξαμε τη σύσταση του δείγματος. Οπότε ο συντελεστής  $k$  είναι ο ίδιος και στις δύο μετρήσεις.

Η «γνωστή» αύξηση της συγκέντρωσης  $\Delta C_X$  υπολογίζεται εύκολα, ως εξής:

Η ποσότητα της  $X$  που προσθέσαμε στο ποτήρι  $\Delta_1$  είναι  $C_S \times V_S$ .

Αυτή αραιώθηκε σε τελικό όγκο:  $V_X + V_S$ , οπότε η «γνωστή» αύξηση της  $C$  είναι:

$$\Delta C_1 = \frac{C_S V_S}{V_X + V_S} \quad (\text{Από εξίσωση } C_1 V_1 = C_2 V_2)$$

και επειδή  $V_X \gg V_S$ , πρακτικά είναι:  $\Delta C_1 = \frac{C_S V_S}{V_X}$

Ακόμη,

$$P_0 = k C_X$$

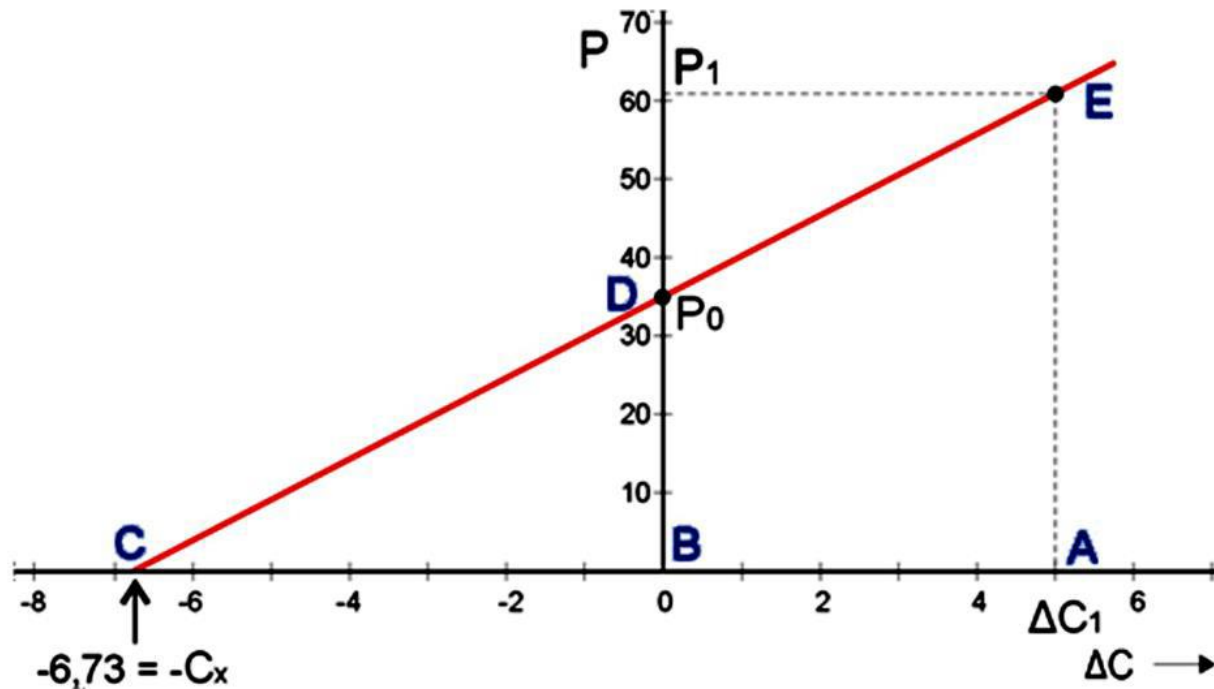
$$P_1 = k (C_X + \Delta C_1)$$

Από τις οποίες με διαίρεση κατά μέλη και επίλυση ως προς  $C_X$  προκύπτει ότι:

$$C_X = \frac{P_0}{P_1 - P_0} \Delta C_1$$

# Προσθήκη γνωστής ποσότητας

Υπολογισμός συγκέντρωσης με γραφική παράσταση

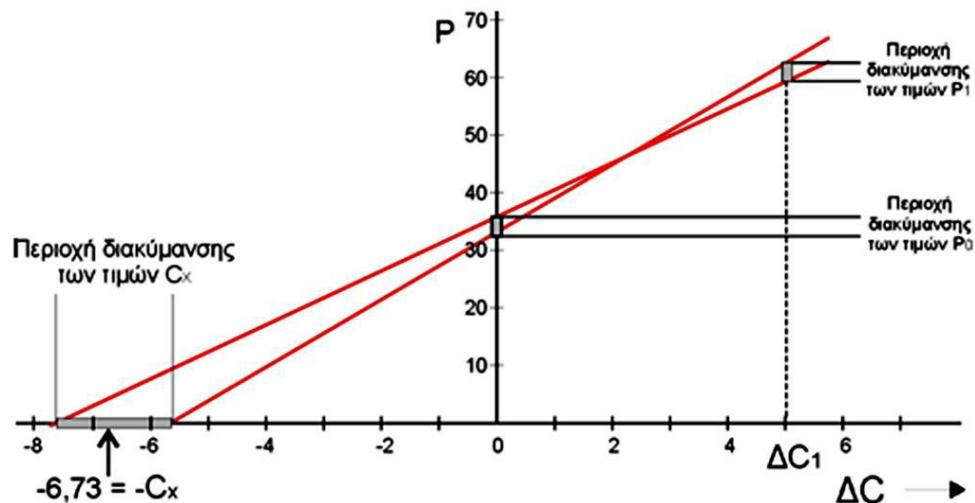


**Εικόνα.** Διάγραμμα των τιμών της μετρούμενης παραμέτρου  $P$  ως προς τις τιμές  $\Delta C_x$ . Η προέκταση της ευθείας, η οποία ορίζεται από τα δύο πειραματικά σημεία  $(P_0, 0)$  και  $(P_1, \Delta C_1)$ , θα τμήσει τον άξονα των τιμών  $\Delta C_x$  σε σημείο  $(C)$  που αντιστοιχεί στην τιμή  $-C_x$ .

# Προσθήκη γνωστής ποσότητας

## Περιορισμοί Μεθόδου

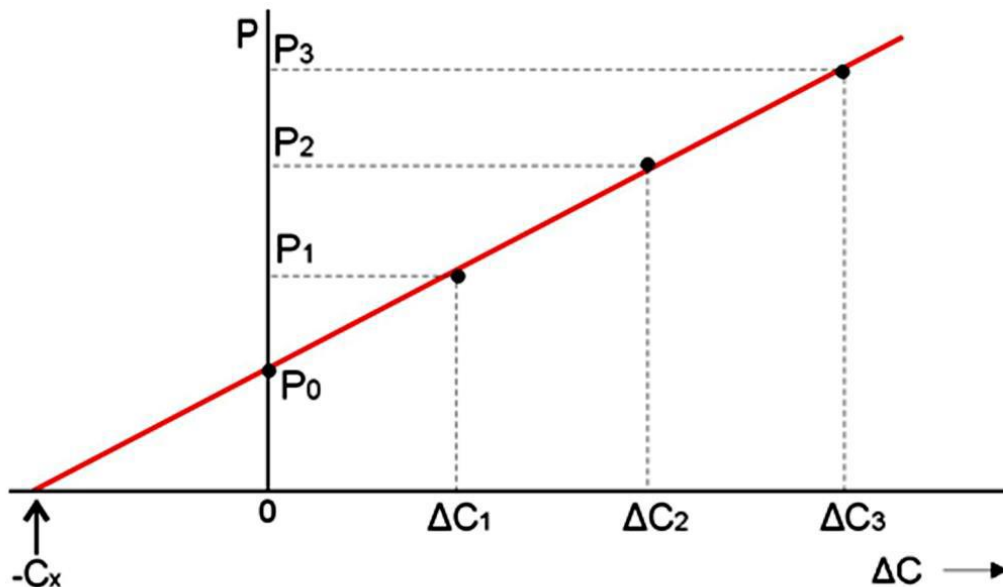
- Η μέθοδος αυτή πρέπει να χρησιμοποιείται, όταν δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάποια καλύτερη τεχνική ποσοτικοποίησης. Γενικά, δεν είναι ιδιαίτερα ακριβής.
- Η γνωστή προσθήκη  $\Delta C_1$  δεν πρέπει να είναι ούτε μεγάλη, ούτε μικρή. Ιδανικά θα πρέπει η  $\Delta C_1$  να είναι στην περιοχή  $0,5 C_x < \Delta C_1 < 1,5 C_x$ .
- Συνεπώς τα όρια γραμμικότητας με τη μέθοδο αυτή είναι σχετικά περιορισμένα, οπότε υπάρχει ενδεχόμενο η μέτρηση της  $P_1$  να πραγματοποιηθεί σε περιοχή συγκεντρώσεων της  $X$ , όπου δεν ισχύει πλέον η γραμμική σχέση, με αποτέλεσμα να έχουμε στη μέτρησή μας συστηματικά σφάλματα.



# Προσθήκη γνωστής ποσότητας

## 4. Με τη μέθοδο των πολλαπλών προσθηκών

Βελτιωμένη εφαρμογή της μεθόδου προσθήκης γνωστής ποσότητας. Συχνά, αντί μίας γνωστής προσθήκης πραγματοποιούνται 2 ή 3 γνωστές προσθήκες για καλύτερη ακρίβεια και κυρίως για να είμαστε βέβαιοι ότι όλες οι μετρούμενες τιμές της φυσικής παραμέτρου ( $P$ ) βρίσκονται στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης βαθμονόμησης (όλα τα σημεία θα βρίσκονται σε μία ευθεία).





# Προσδιορισμός γλυκόζης σε βιολογικά υγρά

## Γενικά

- Οι φωτομετρικές μέθοδοι προσδιορισμού επειδή είναι εύχρηστες, γρήγορες, και απαιτούν κοινό εργαστηριακό εξοπλισμό, βρίσκουν ευρύτατη εφαρμογή στην κλινική ανάλυση.
- Πολύ σπάνια όμως, στην κλινική ανάλυση, ο προσδιορισμός μίας κλινικής παραμέτρου βασίζεται στην εκλεκτική απορρόφηση του προσδιοριζόμενου αναλύτη σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Αυτό ισχύει γιατί στην πλειοψηφία τους οι αναλύτες κλινικού ενδιαφέροντος δεν είναι έγχρωμοι. Έτσι, δεν απορροφούν στο ορατό (Vis), αλλά απλώς στο υπεριώδες (UV) και κυρίως μεταξύ 220 και 315 nm, όπου επίσης απορροφάται και πλήθος άλλων μορίων που περιέχονται σε κάποιο κλινικό δείγμα.
- Προκειμένου να αυξηθεί η εκλεκτικότητα του προσδιορισμού, η μεγάλη πλειοψηφία των αναλυτικών μεθόδων στην κλινική ανάλυση βασίζεται στον ποσοτικό προσδιορισμό μίας έγχρωμης ένωσης, που παράγεται όταν το προς ανάλυση κλινικό δείγμα αναμιγνύεται με κατάλληλα αντιδραστήρια, υπό καθορισμένες πειραματικές συνθήκες.

# Προσδιορισμός γλυκόζης σε βιολογικά υγρά

## Γενικά

- Γενική Αντίδραση

*Δείγμα + Χρωμογόνο  $\longrightarrow$  Έγχρωμη ένωση*

# Προσδιορισμός γλυκόζης σε βιολογικά υγρά

## Γενικά

- Γενική Αντίδραση

*Δείγμα + Χρωμογόνο  $\longrightarrow$  Έγχρωμη ένωση*

- Συχνά γίνεται προσθήκη ενζύμου

# Προσδιορισμός γλυκόζης σε βιολογικά υγρά

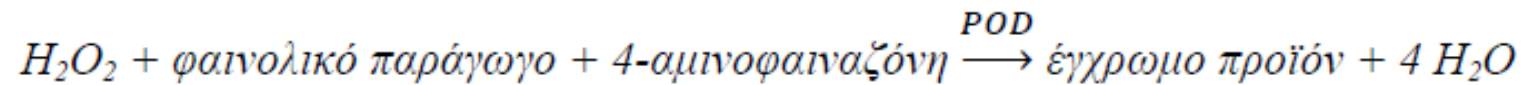
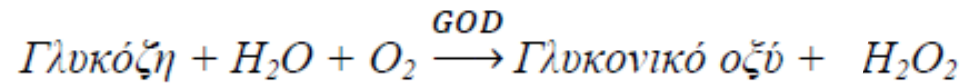
## Γενικά

- Γενική Αντίδραση

*Δείγμα + Χρωμογόνο  $\longrightarrow$  Έγχρωμη ένωση*

- Συχνά γίνεται προσθήκη ενζύμου
- **Συζευγμένη μέθοδος** (coupled assay): αυτή στην οποία μία δεύτερη αντίδραση επιστρατεύεται (συχνά ενζυμικά καταλυόμενη) το προϊόν μιας πρώτης αντίδρασης, όπου συμμετέχει ο αναλύτης ως αντιδρών, μετατρέπεται σε έγχρωμη ένωση.

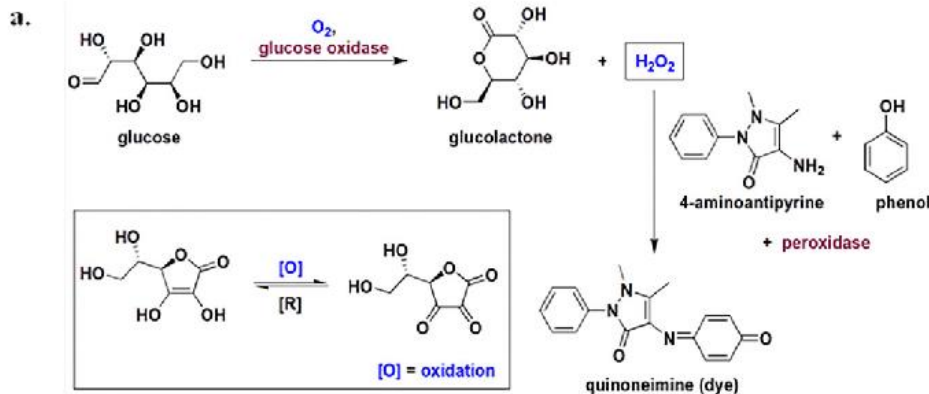
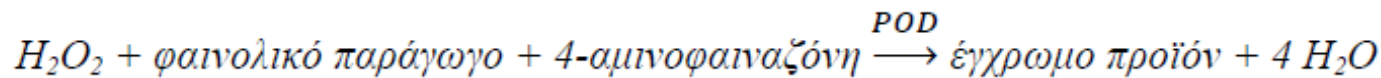
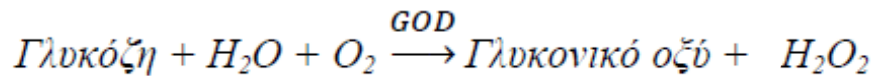
# Προσδιορισμός γλυκόζης σε βιολογικά υγρά



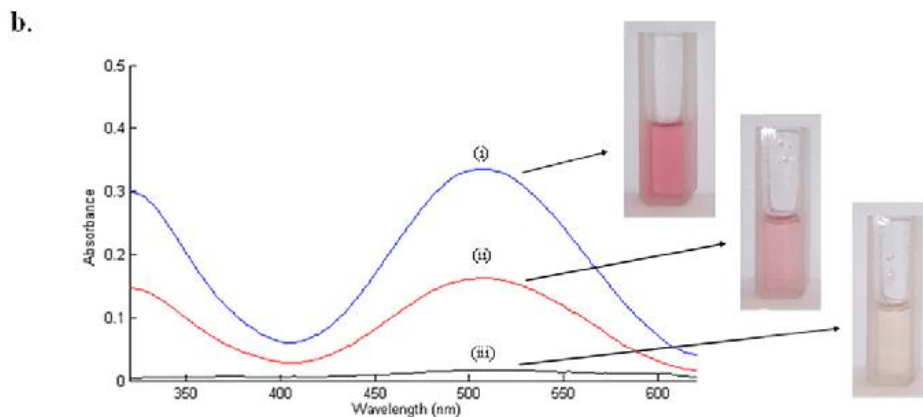
**GOD:** ένζυμο γλυκοζοοξειδάση (Glucose oxidase)

**POD:** ένζυμο υπεροξειδάση (Peroxidase)

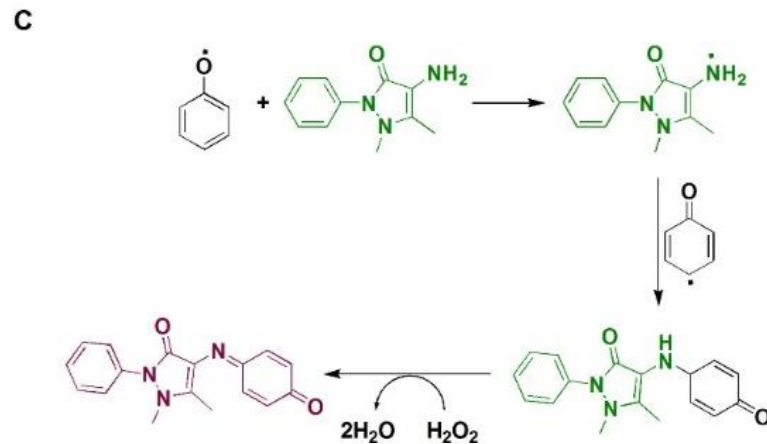
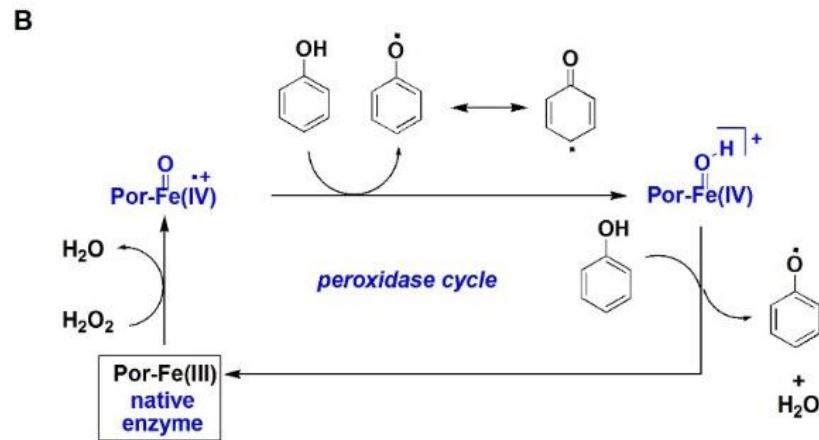
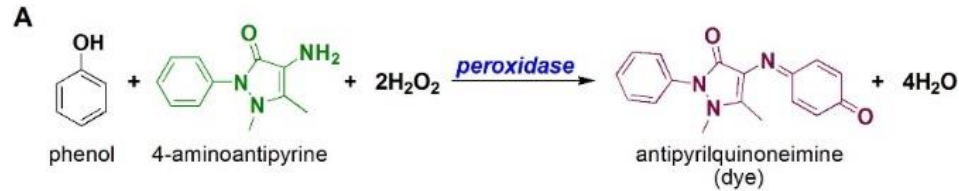
# Προσδιορισμός γλυκόζης σε βιολογικά υγρά



Η ένταση της απορρόφησης στα 510 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο δείγμα



# Προσδιορισμός γλυκόζης σε βιολογικά υγρά



# Προσδιορισμός γλυκόζης σε βιολογικά υγρά

## Οργανολογία

1. Φασματοφωτόμετρο UV-vis σε μήκος κύματος 510 nm. Ο μηδενισμός γίνεται με το τυφλό αντιδραστήριο.
2. Υδρόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας  $\sim 37^{\circ}\text{C}$
3. Αναδευτήρας τύπου Vortex
4. Πιπέτες ακριβείας



## Πειραματική πορεία

1. Προετοιμάζονται και σηματοδοτούνται οι δοκιμαστικοί σωλήνες (T: τυφλό, Δ: δείγμα, Δ+S: δείγμα και πρότυπο (standard) – 70 mg/dL) σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα

	T	Δ	Δ+S
Διάλυμα εργασίας	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL
Άγνωστο διάλυμα		20 μL	20 μL
Γνωστό (πρότυπο) διάλυμα			20 μL
Απεσταγμένο νερό	20 μL		
Απορρόφηση	0,000	0,144	0,250

2. Αναδεύονται τα δείγματα σε Vortex.
3. Επωάζονται στους 37°C για 15 min.
4. Μηδενίζεται το όργανο με το τυφλό και μετράται η απορρόφηση στα 510 nm.
5. Υπολογίζεται η συγκέντρωση του αγνώστου με την εξίσωση και με γραφική παράσταση.

## Σημεία που πρέπει να προσέξετε!!!

	T	Δ	Δ+S
Διάλυμα εργασίας	2.0 mL	2.0 mL	2.0 mL
Άγνωστο διάλυμα		20 μL	20 μL
Γνωστό (πρότυπο) διάλυμα			20 μL
Απεσταγμένο νερό	20 μL		
Απορρόφηση	0,000	0,144	0,250

1. Συγκέντρωση προτύπου: 70 mg / **dL** (dL = 100 mL)
2. Όγκος αγνώστου ( $V_x = 20 \mu\text{L}$ ) και γνωστού ( $V_s = 20 \mu\text{L}$ ) → αμελητέοι σε σχέση με αυτόν του διαλύματος εργασίας ( $V_{\text{εργ}} = 2.0 \text{ mL}$ )
3. Ξεκινάτε **βρίσκοντας πρώτα τη συγκέντρωση ΔC του πρότυπου διαλύματος στην κυψελίδα!!** Αυτό το ΔC θα χρησιμοποιήσετε στην εξίσωση και στο γράφημα.
4. Βρίσκετε τη συγκέντρωση ( $C_x$ ) στην κυψελίδα και στη συνέχεια στο αρχικό άγνωστο διάλυμα
5. Να έχετε στο μυαλό σας ότι πρέπει να βρείτε τιμή στην τάξη μεγέθους του προτύπου (70 mg / dL) → δηλαδή όχι πχ 5 mg / dL ή 500 mg / dL