

# Προσδιορισμός Γλυκόζης με τη μέθοδο Προσθήκης Γνωστής Ποσότητας (**standard addition method**)

- ✓ Εφαρμόζεται όταν το μητρικό υλικό του δείγματος ασκεί μεγάλη επίδραση στη συνάρτηση βαθμονόμησης (στατιστικά διαφορετική κλίση  $b$ ) και είναι αδύνατη η παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων παρόμοιας συστάσεως με τα διαλύματα των αγνώστων
- ✓ Είναι η καλύτερη μέθοδος όταν οι επιδράσεις της μήτρας του δείγματος είναι σημαντικές.
- ✓ Τα πρότυπα προστίθενται απ' ευθείας σε τμήματα του δείγματος, οπότε η επίδραση της μήτρας εξουδετερώνεται.

# Προσδιορισμός Γλυκόζης με τη μέθοδο Προσθήκης Γνωστής Ποσότητας (standard addition method)

## Πορεία:

- Μετρείται το διάλυμα του άγνωστου δείγματος
- 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 μικρό ή αμελητέο το  $\Delta V$ ).

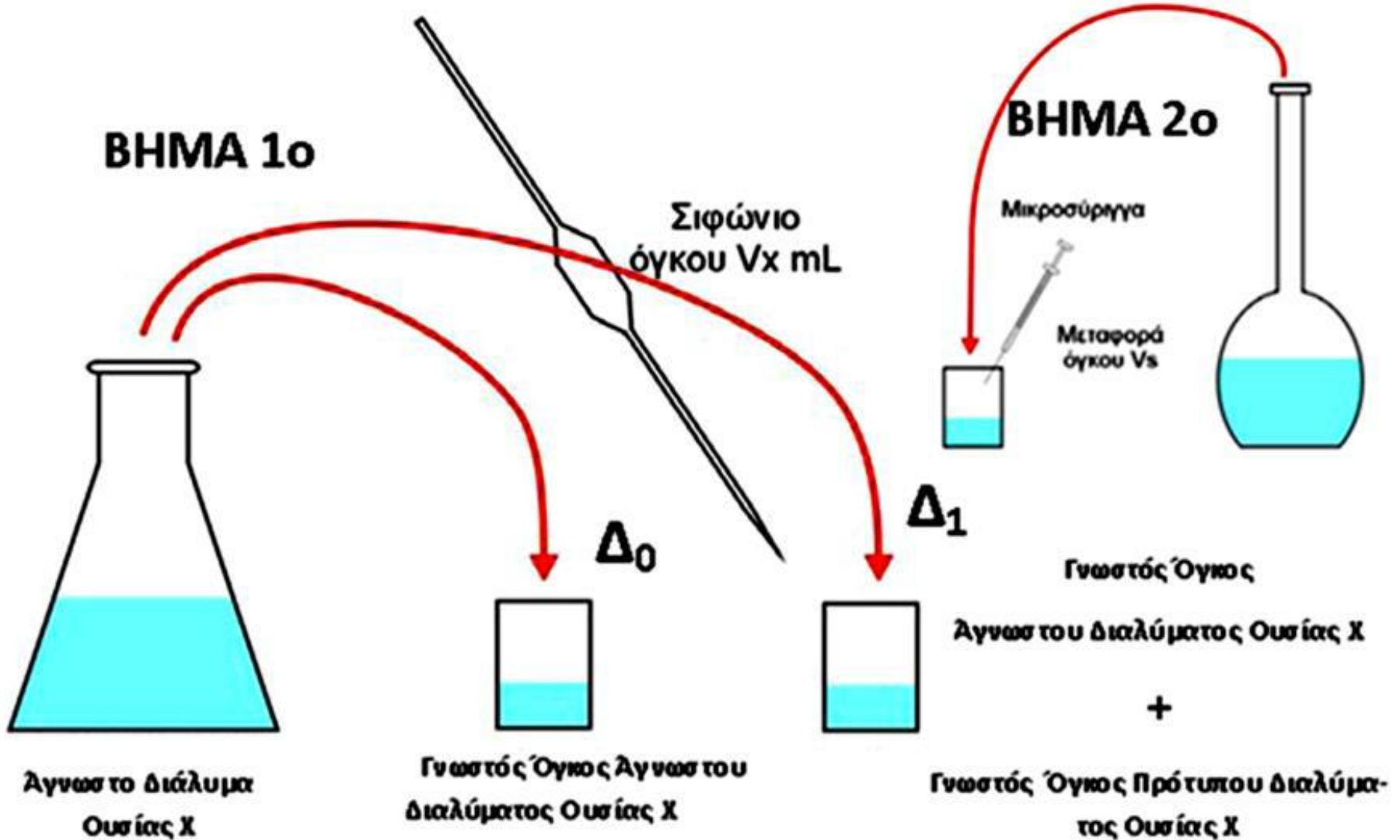
Συνεπώς, χρησιμοποιείται σε εκείνες τις περιπτώσεις που ισχύουν τα παρακάτω:

1. Εάν η σχέση που συνδέει τη μετρούμενη φυσική/χημική παράμετρο  $P$  και τη συγκέντρωση  $C_x$  της ουσίας  $X$  που μας ενδιαφέρει να προσδιορίσουμε, είναι αναλογική, δηλ. εάν

$$P = k * C_x$$

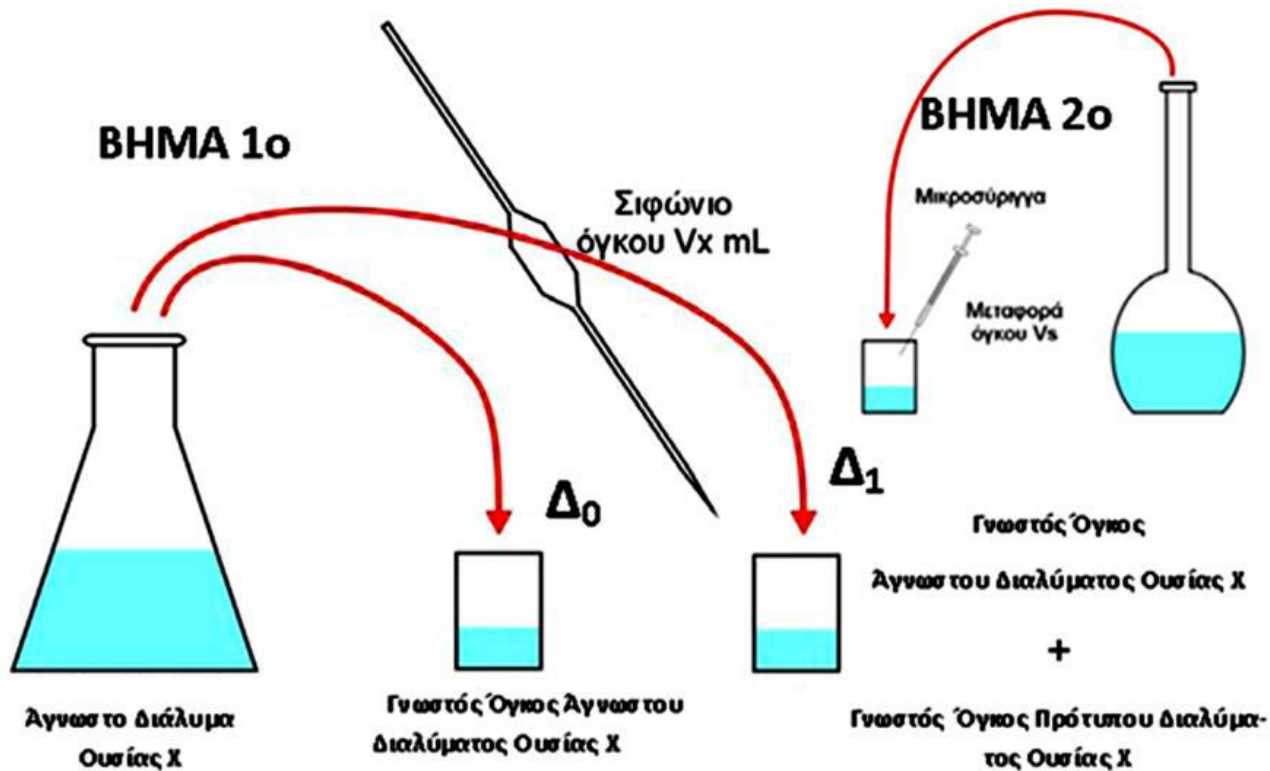
2. Εάν ο συντελεστής αναλογίας  $k$  επηρεάζεται έντονα από τη σύσταση του δείγματος μας (όλες οι άλλες ουσίες που υπάρχουν στο μετρούμενο διάλυμα).
3. Εάν έχουμε να αναλύσουμε πολλά δείγματα με διαφορετική σύσταση ή έστω και ένα δείγμα αλλά με άγνωστη σύσταση, τότε είναι πρακτικά αδύνατη η χρησιμοποίηση καμπύλης αναφοράς.

# Πειραματικό μέρος



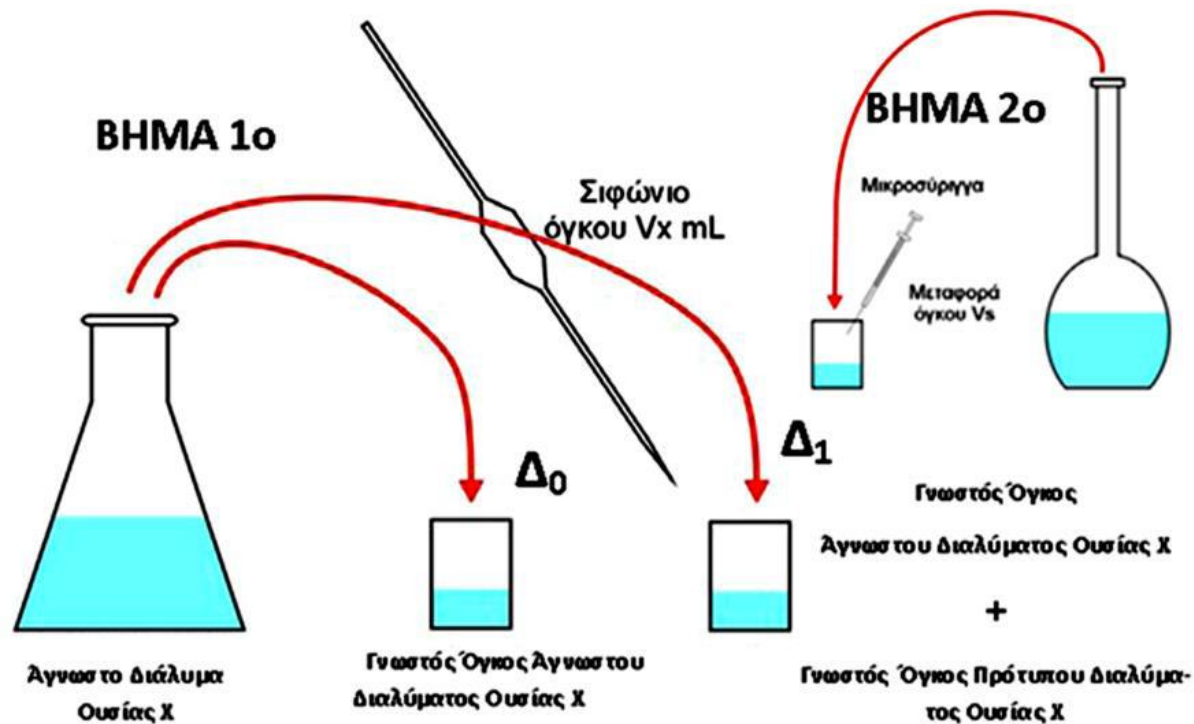
## Βήμα 1<sup>ο</sup>

Από το άγνωστο διάλυμα της ουσίας X, με άγνωστη συγκέντρωση  $C_x$ , λαμβάνουμε γνωστό όγκο  $V_x$  δείγματος με σιφώνιο (π.χ.  $V_x = 20,00 \text{ mL}$ ) και τον μεταφέρουμε σε δύο μικρά ποτήρια ζέσεως ( $\Delta_0$  και  $\Delta_1$ )



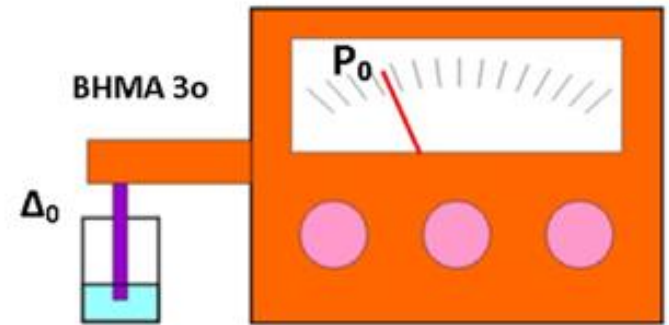
## Βήμα 2<sup>ο</sup>

Με σιφώνιο μεταφέρουμε 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.  $V_s = 0,100 \text{ mL}$ )



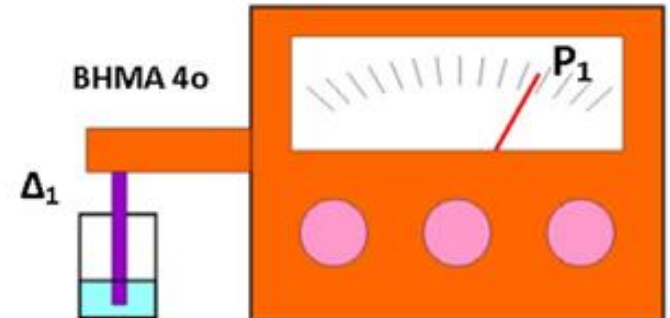
## Βήμα 3<sup>ο</sup>

Μετρούμε με το όργανο τη φυσική/χημική παράμετρο  $P_0$  στο ποτήρι  $\Delta_0$ . 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  $P_0 = 35,0$ . (αγνώστου)



## Βήμα 4<sup>ο</sup>

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



## Υπολογισμός συγκέντρωσης με εξίσωση

- Επειδή Νπροτύπου μικρό, στο ποτήρι **Δ1**, 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 **ΔC1** υπολογίζεται εύκολα και ως εξής:
- Η ποσότητα της Χ ( $n$  moles) που προσθέσαμε στο ποτήρι **Δ1** είναι  $C_s \times V_s$ .
- Αυτή αραιώθηκε σε τελικό όγκο:  $V_x + V_s$ , οπότε η «γνωστή» αύξηση της συγκέντρωσης 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,

$$P_0 = k C_x$$

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

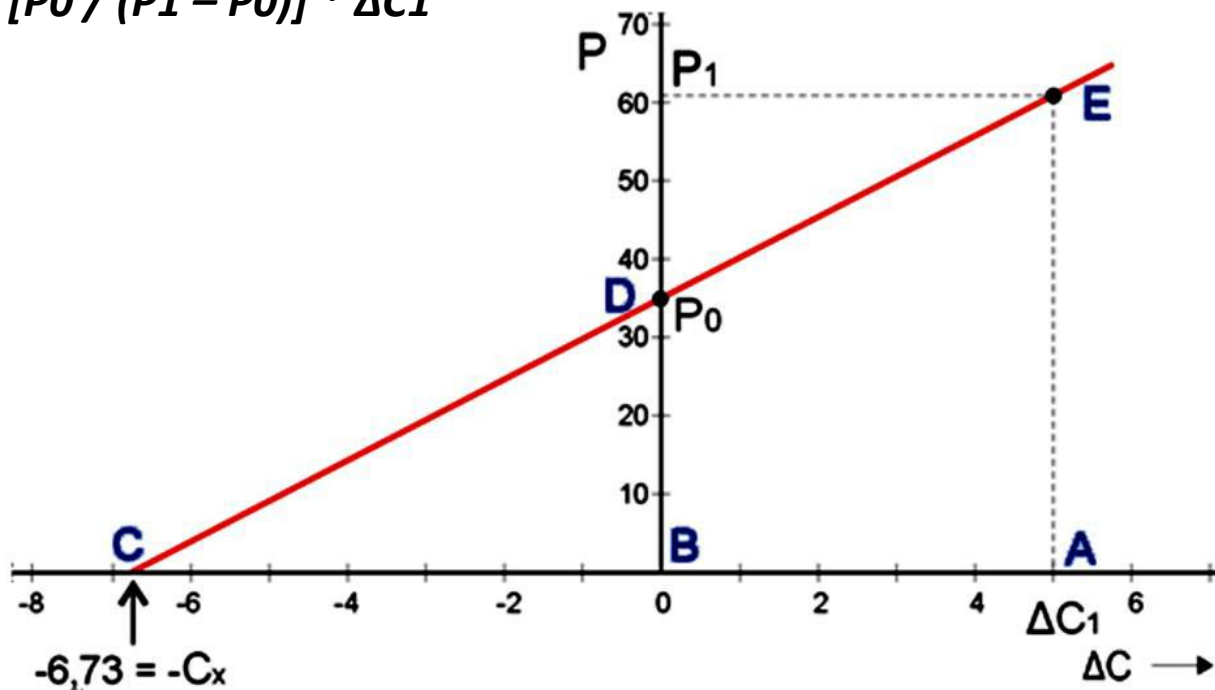
Από τις οποίες με διαίρεση κατά μέλη και επίλυση ως προς  $C_x$  προκύπτει ότι:

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



## Υπολογισμός συγκέντρωσης με γραφική παράσταση

$$C_x = [P_0 / (P_1 - P_0)] * \Delta C_1$$

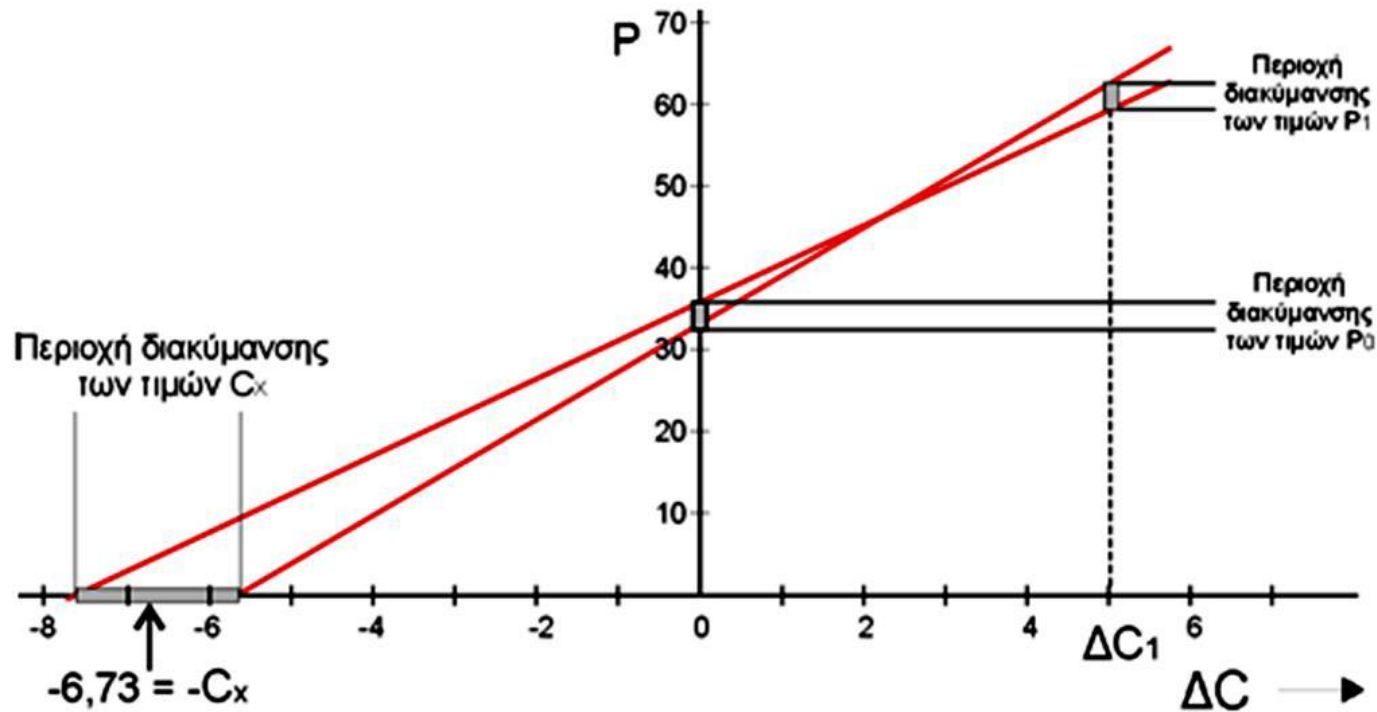


Διάγραμμα των τιμών της μετρούμενης παραμέτρου  $P$  ως προς τις τιμές  $\Delta C$ . Η προέκταση της ευθείας, η οποία ορίζεται από τα δύο πειραματικά σημεία  $(P_0, 0)$  και  $(P_1, \Delta C_1)$ , θα τμήσει τον άξονα των τιμών  $\Delta C$  σε σημείο  $(C)$  που αντιστοιχεί στην τιμή  $-C_x$ .

## Περιορισμοί της μεθόδου

- Η μέθοδος αυτή πρέπει να χρησιμοποιείται, όταν δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάποια καλύτερη τεχνική ποσοτικοποίησης. Γενικά, δεν είναι ιδιαίτερα ακριβής.
- Η γνωστή προσθήκη  $\Delta C1$  δεν πρέπει να είναι ούτε μεγάλη, ούτε μικρή. Ιδανικά θα πρέπει η  $\Delta C1$  να είναι στην περιοχή:  
 $0,5 Cx < \Delta C1 < 1,5 Cx$ .
- Τα όρια γραμμικότητας με τη μέθοδο αυτή είναι σχετικά περιορισμένα, οπότε υπάρχει ενδεχόμενο η μέτρηση της P1 να πραγματοποιηθεί σε περιοχή συγκεντρώσεων της X, όπου δεν ισχύει πλέον η γραμμική σχέση.

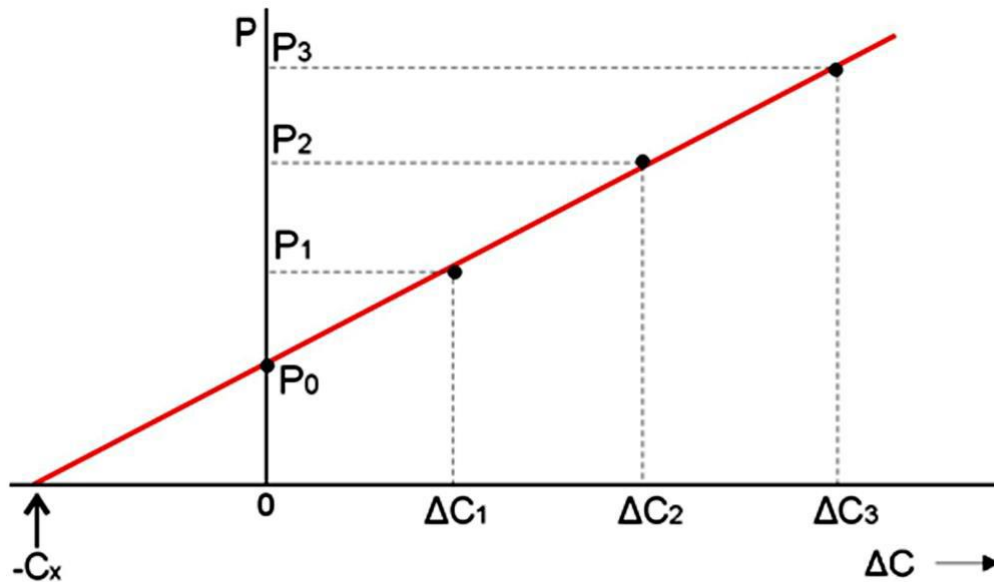
## Περιορισμοί της μεθόδου



Από την παραπάνω γραφική παράσταση είναι προφανές πως μικρές σχετικά διακυμάνσεις στις τιμές  $P_0$  μια  $P_1$  δημιουργούν μια μεγάλη (σχετικά) διακύμανση στις τιμές  $C_x$ .

# Η μέθοδος των Πολλαπλών Προσθηκών

- 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).



Γραφική παράσταση της παραμέτρου  $P$  συναρτήσει του  $\Delta C_x$  με προσθήκη 3 γνωστών ποσοτήτων

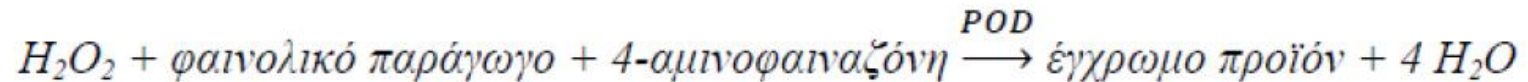
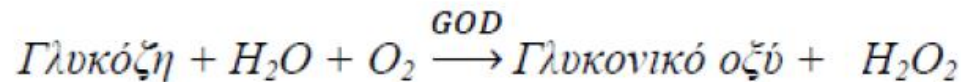
# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ

- Φωτομετρικές μέθοδοι: εύχρηστες, γρήγορες, κοινός εργαστηριακός εξοπλισμός ⇒ ευρεία εφαρμογή στην κλινική ανάλυση.
- Στην πλειοψηφία οι αναλύτες κλινικού ενδιαφέροντος δεν είναι έγχρωμοι. Έτσι, δεν απορροφούν στο ορατό (Vis), αλλά στο υπεριώδες (UV) (κυρίως μεταξύ 220 και 315 nm), όπου απορροφάται και πλήθος άλλων μορίων που περιέχονται σε κάποιο κλινικό δείγμα.
- Αύξηση εκλεκτικότητας προσδιορισμού: ποσοτικός προσδιορισμός μίας έγχρωμης ένωσης, που παράγεται όταν το προς ανάλυση κλινικό δείγμα αναμιγνύεται με κατάλληλα αντιδραστήρια, υπό καθορισμένες πειραματικές συνθήκες.

# ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ

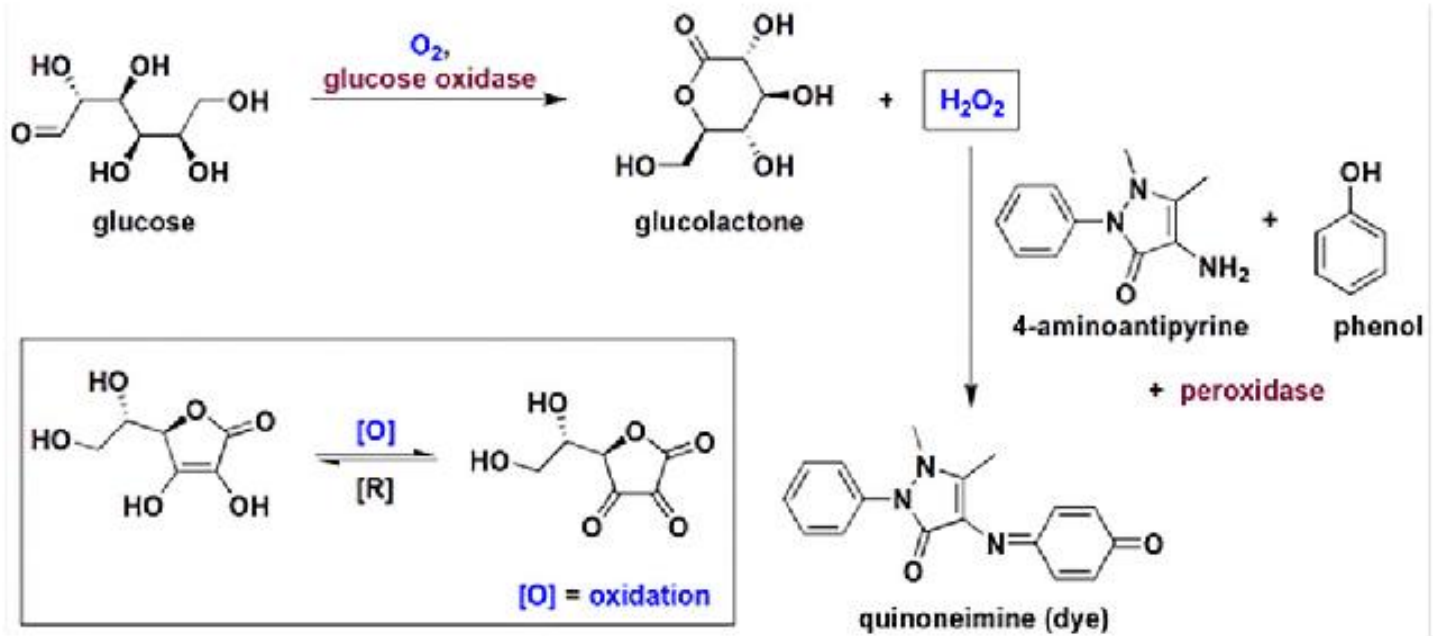
## Αρχή της μεθόδου της οξειδάσης της γλυκόζης (Glucose oxidase)

Παρουσία του ενζύμου γλυκόζο οξειδάση (GOD) η γλυκόζη οξειδώνεται και παράγει  $H_2O_2$ . Η αντίδραση του  $H_2O_2$  με φαινολικό παράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος.

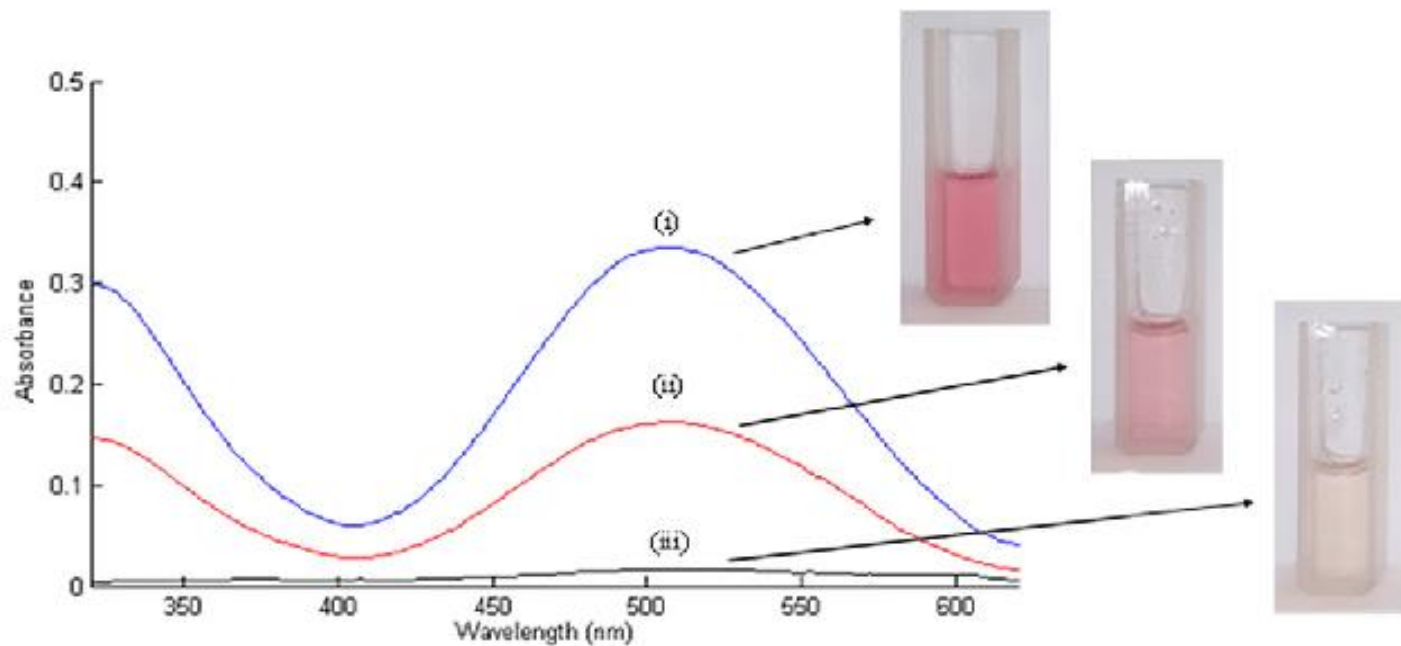


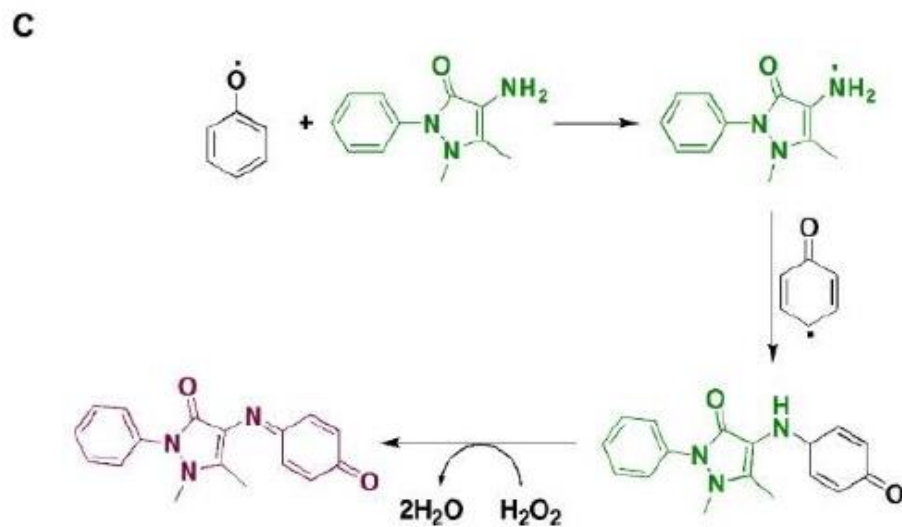
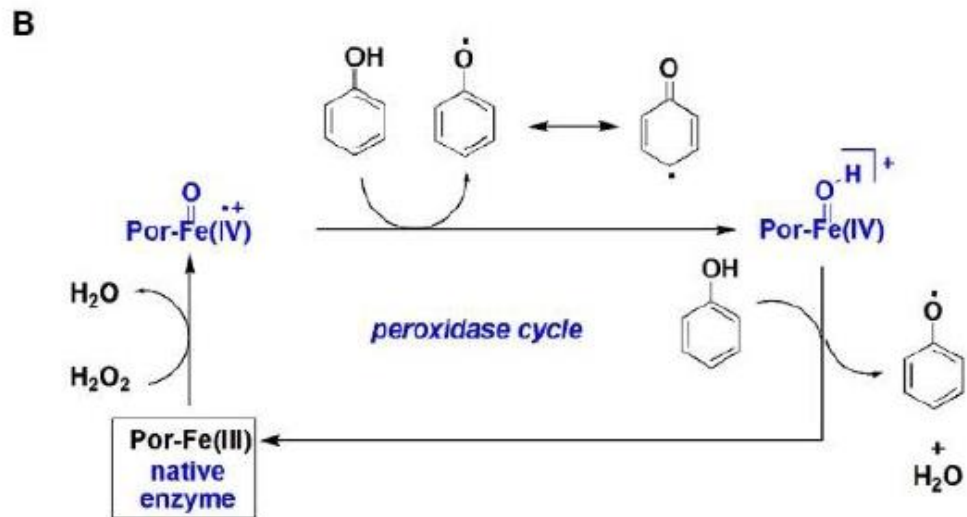
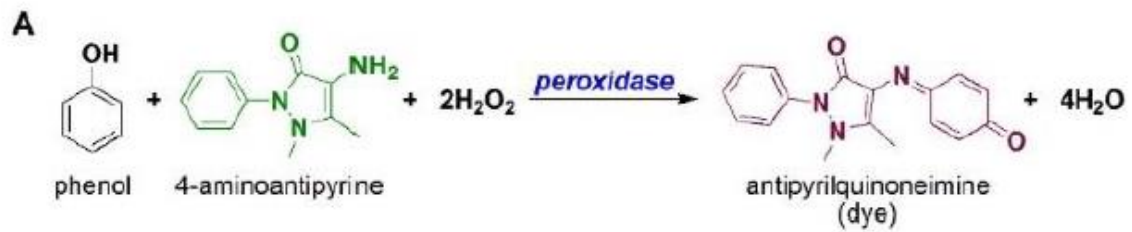
Η ένταση του χρώματος (510 nm) είναι ανάλογη με την συγκέντρωση της γλυκόζης στο δείγμα

a.



b.







# Οργανολογία - Συσκευές

- Φασματοφωτόμετρο UV-VIS σε μήκος κύματος 510 nm.  
Η ρύθμιση του μηδενός γίνεται με το τυφλό αντιδραστήριο.
- Υδρόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας  $37 \pm 0.10^\circ\text{C}$ .
- Αναδευτήρας τύπου δίνης (Vortex).
- Μικροσιφώνια ακριβείας (πιπέττες).

# Πορεία εργασίας

- Σηματοδότηση των δοκιμαστικών σωληναρίων: T (τυφλό), Δ (δείγμα) και Δ+S (standard: πρότυπο **70mg/100ml**).
- Προετοιμασία σωληναρίων σύμφωνα με τον επόμενο πίνακα:

	T	Δ	Δ+S
Διάλυμα εργασίας	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Άγνωστο διάλυμα		10 μl	10 μl
Γνωστό διάλυμα			10 μl
Απεσταγμένο H <sub>2</sub> O	10 μl		

# Πορεία εργασίας

- Ανάδευση δειγμάτων σε Vortex.
- Επώαση δειγμάτων στους  $37 \pm 0.1$  °C για 15 min.
- Μηδενισμός του φασματοφωτομέτρου με το τυφλό και μέτρηση απορρόφησης στα 510 nm.  
Σταθερότητα χρώματος: 2 ώρες.
- Υπολογισμός συγκέντρωσης αγνώστου με εξίσωση και με γραφική παράσταση.

Χειρισμός φασματοφωτομέτρου: <https://youtu.be/V2lkVFUBsX8>

# ΠΡΟΣΟΧΗ!!!

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

## Επεξεργασία αποτελεσμάτων – Υπολογισμοί

Συγκέντρωση $\Delta C_1$	P
	$P_0$ : Απορρόφηση αγνώστου ( $\Delta C_1=0$ )
	$P_1$ : Απορρόφηση αγνώστου+γνωστής προσθήκη

- Υπολογίστε την συγκέντρωση του αγνώστου από την γραφική παράσταση και από την εξίσωση

$$C_X = [P_0 / (P_1 - P_0)] * \Delta C_1$$