

## Ethanolbestemmelse med en spektrofotometrisk analysemetode

---

### Teori:

Der er mange metoder til at bestemme ethanol-indholdet i en opløsning – f. eks. ved destillation og forskellige redox-titreringer. Hvis man ønsker at bestemme indholdet i opløsninger, hvor koncentrationen er meget lille, kan det være praktisk at benytte denne biokemiske analysemetode.

Øvelsen benytter samme metode som kroppen anvender til nedbrydning af alkohol i leveren, hvor coenzymet  $\text{NAD}^+$  reduceres til  $\text{NADH}$  samtidig med at ethanol oxideres til ethanal efter følgende reaktionsskema:



Processen katalyseres af enzymet alkohol-dehydrogenase (pH-maximum = 9,0).

Denne ligevægt er ved normale betingelser forskudt mod venstre, hvorved denne reaktion ikke umiddelbart kan benyttes til bestemmelse af ethanol-koncentrationer. Dette problem løses ved at tilsætte enzymet aldehyd-dehydrogenase, som katalyserer den videre oxidation af ethanal til ethansyre:



Dette tvinger ifølge Le Chateliers princip ligevægten (I) mod højre, hvorved alt ethanol omdannes til ethansyre, hvis man sørger for at tilsætte enzymer og anvende  $\text{NAD}^+$  i overskud.

Den forbrugte mængde  $\text{NAD}^+$  bestemmes spektrofotometrisk. Da alle reaktionsdeltagere er farveløse måler man i det ultraviolette område, hvor det viser sig, at  $\text{NADH}$  har et absorptionsmaximum ved ca. 340 nm, hvorimod ingen andre reaktionsdeltagere absorberer i dette område.

Analysemetoden er udviklet til at kunne måle mængden af alkohol i blodet, men her benyttes den til at bestemme alkohol-koncentrationer på alkoholiske drikke. Da metoden er meget specifik (enzymet katalyserer kun omdannelsen af ethanol) undgår man fejlkilder stammende fra de andre organiske stoffer i drikken.

### Apparatur og kemikalier:

UV-spektrofotometer med tilhørende kuvetter

Computer med Logger-Pro installeret.

Vægt, diverse pipetter med tilhørende sugbold, bægerglas.

Ethanol. Analyse indeholdende ethanol ( f.eks øl og vodka).

Analysesæt til ethanolbestemmelse indeholdende pufferopløsning (pH = 9,0), opløsning af alkohol-dehydrogenase og tabletter, som indeholder aldehyd-dehydrogenase og NAD<sup>+</sup> (Boehringer Mannheim kat. nr. 176290 – bestilles på tlf. 42912266).

### Ekperimentelt:

For at få brugelige resultater er det nødvendigt at arbejde meget omhyggeligt og renligt! Af økonomiske grunde vil det være rimeligt at dele arbejdet, så hvert hold kun laver en enkelt måling.

Forbind spektrofotometret til computeren, opstart Logger Pro og lad spektrofotometret varme op.

Da analysemetoden er meget følsom skal vi arbejde med meget fortyndede opløsninger. Man starter laver først en stamopløsning i en 1 liters målekolbe, som indeholder 5,00 g ethanol pr. liter – sørg for at ethanolen overføres kvantitativt og at målekolben rystes grundigt efter blandingen. Denne opløsning benyttes til at lave nye fortyndinger (100-300 gange), som skal bruges til at lave en standardkurve, der viser sammenhængen mellem ethanolkoncentration og absorbans. Disse standardopløsninger fremstilles i henhold til skemaet nedenfor – find selv ud af, hvordan dette gøres mest præcist (husk: brug pipetter og målekolber!)

Derefter laver der fortyndinger af de opløsninger, som skal analyseres. Øl fortyndes en faktor 1000 (husk at afbruse øllen inden den afmåles) og vodka fortyndes en faktor 10000. Overvej hvordan I vil gøre dette mest nøjagtigt (brug rimelige mængder og lav fortyndingen i 2 omgange!).

Der fremstilles en reagensopløsning fra analysesættet ved at opløse 16 tabletter i 30 mL pufferopløsning.

Først kalibreres spektrofotometret på en opløsning af demineraliseret vand.

Bland i en kuvette en opløsning bestående af 3,00 mL reagens-opløsning, 100 µL dem. vand og 50 µL enzymesuspension (alkohol-dehydrogenase). Lad prøven stå i 8-13 min. Optag derefter et spektrum af denne opløsning i bølgelængdeområdet 200-500 nm. Gem dette spektrum (spektrum\_nad+). Opstart et nyt eksperiment i Logger Pro, indstil til at måle ved 340 nm, hvorefter der nu kalibreres på denne prøve.

Oversigtsskema:

Opløsning	Fortyndingsfaktor	Absorbans	Ethanolindhold - fortyndet	Ethanolindhold - ufortyndet
stamopløsning	100		0,0500 g/L	5,00 g/L
stamopløsning	150			
stamopløsning	200			
stamopløsning	250			
stamopløsning	300			
øl	1000			
vodka	10000			

For hver af ovenstående standard-opløsninger gøres følgende:

- Overfør 3,00 mL reagensopløsning til en kuvette og tilsæt 100  $\mu$ L standard-opløsning (ifølge skema)
- Lad kuvetten stå ca. 3 min.
- Tilsæt 50  $\mu$ L enzymesuspension og rør forsigtigt med en lille spatel.
- Lad stå 5-10 min.
- Mål absorbansen ved 340 nm

Gem resultaterne (abs\_340nm) og opstart et nyt eksperiment. Spektrofotometret kalibreres igen på demineraliseret vand, hvorefter der optages et spektrum i bølgelængdeområdet 200-500 nm – gem spektret (spektrum\_nadh).

### Efterbehandling:

1. Forklar hvad de 2 optagne spektre viser og kommenter forskellen mellem dem
2. Hvorfor vælges bølgelængden 340 nm til eksperimentet?
3. Anvend de første 5 målinger ved 340 nm til at tegne en standardkurve – benyt ligefrem regression i Logger Pro. Kommenter resultatet – Er det i overensstemmelse med Lambert-Beers lov?
4. Aflæs ethanolindholdet i de fortyndede øl- og vodkaopløsninger.
5. Beregn ethanolindholdet i de ufortyndede drikke udtrykt i g/L.
6. Beregn ethanolindholdet i drikken i vol % - her skal I benytte ethanols densitet.
7. Sammenlign med varedeklarationen og beregn afvigelsen i procent.
8. Kommenter resultaterne.
9. Vurder analysemetoden.
10. Stoffet antabus (disulfiram) er en dansk opfindelse, som benyttes til alkoholafvænnning. Stoffet blokerer enzymet aldehyd-dehydrogenase. Forklar hvorfor antabus virker mod alkoholmisbrug.