

Völlig egal, um welches chromatographische Methode es sich genau handelt: Die Quantifizierung eines Analyten erfolgt stets nach einem der unten vorgestellten Verfahren. Alle diese Verfahren beruhen auf eine Kalibrierung mit Stoffen, deren Gehalt genau bekannt ist. Bei der Kalibrierung unterscheidet man zwischen einem **externen Standard** und einem **internen Standard**.

1. Externer Standard

„**Externe Standardisierung**“ bzw. „**externer Standard**“ bedeutet, dass die Kalibriersubstanz nicht direkt zur Probe gegeben wird, sondern in einem separaten chromatographischen Lauf gemessen wird. Hierzu wird eine Kalibrierlösung bekannter Konzentration chromatographiert und die resultierende Peakfläche (seltener: Peakhöhe) gemessen. So kann man einen mathematischen Zusammenhang zwischen Stoffmenge oder Konzentration der Kalibriersubstanz und der Signalintensität (z.B. Flächeneinheiten) aufstellen. Hat man einen solchen Zusammenhang, so kann man nun in einem separaten chromatographischen Lauf die Probe analysieren. Anhand der gemessenen Signalintensität kann man nun mithilfe der Kalibrierkurve die in der Probe vorliegende Stoffmenge des Analyten berechnen. Statt nur einer Kalibrierlösung werden häufig viele Kalibrierlösungen benutzt, so dass man eine Kalibriergerade/Kalibrierkurve erhält.

Beispielaufgabe 1.1 Eine Fluoranthen-Kalibrierlösung mit $\beta(\text{Fluoranthen}) = 16,49 \text{ ng/mL}$ erzeugt in einem Kalibrierchromatogramm die Fläche von 17184 Flächeneinheiten.

- a) Welche Konzentration hat eine Fluoranthenprobe, wenn sie einen Peak von 14357 Flächeneinheiten erzeugt?
Hinweis: Es wurde in beiden Fällen das gleiche Probevolumen injiziert

Berechnung mit dem Dreisatz:

- b) Welche Nachteile ergeben sich durch diese Kalibriermethode. Wie lassen sie sich beseitigen?

Statt mit dem Dreisatz zu rechnen, kann man auch mit einem **Kalibrierfaktor f** rechnen. **Er gibt den Gehalt (z.B. ng/mL, mmol/L, g, mmol o.ä.) pro Signaleinheiten A (z.B. Flächeneinheiten) an.** Er kann aus den Daten der Kalibrierlaufs berechnet werden. Mit Hilfe von f lässt sich dann auf den Gehalt in der Probe schließen. Allgemeine Formeln:

$f =$

$\text{Probengehalt} =$

Konkretisierung für Beispielaufgabe 1.1:

Beispiel: Erzeugen 2 mol eines Stoffs Y beim Detektor die Fläche 1000 AU, so beträgt der Kalibrierfaktor $f(Y) = 0,002 \text{ mol/AU}$. Erzeugt 1 mol eines anderen Stoffs Z beim Detektor dieselbe Fläche (1000 AU), so beträgt der Kalibrierfaktor $f(Z) = 0,001 \text{ mol/AU}$. *Welcher der beiden Stoffe wird empfindlicher detektiert? Welchen (mathematischen) Zusammenhang gibt es also zwischen dem Kalibrierfaktor und Detektionsempfindlichkeit (= „Response-Faktor“ – wegen Mehrdeutigkeit Begriff vermeiden)?*

Flächenprozent-Methode, Methode der 100%-Normierung

A Einfache 100%-Methode (Flächenprozentmethode)

Erfasst der Detektor alle Probenbestandteile, und geht man davon aus, dass der Detektor alle Komponenten mit gleicher Empfindlichkeit detektiert, so entspricht der prozentuale Massenanteil $w(X)$ einer Komponente dem prozentualen Flächenanteil $A(X)$ des entsprechenden Peaks an der Gesamtfläche. Die Gesamtfläche wird also gleich 100% gesetzt (100%-Normierung). In der Praxis ist eine annähernd gleiche Detektionsempfindlichkeit für verschiedene Komponenten nur selten gegeben. Beispiele für solche Fälle wären Untersuchungen von Isomergemischen oder Gemischen mit chemisch ähnlichen Analyten (z.B. verschiedene Kohlenwasserstoffe). Nutzt man einen UV/VIS-Detektor, kann man z.B. für Aromaten eine Detektionswellenlänge wählen, bei der alle Aromaten ungefähr gleich stark absorbieren, d.h. ungefähr denselben Absorptionskoeffizienten besitzen. Die einfache Flächenprozentmethode nimmt also an, dass die Responsefaktoren (Kalibrierfaktoren) für alle Komponenten identisch sind. Will man nur die Masseanteile der Komponenten in der Probe berechnen, ist ein Kalibrierlauf gar nicht nötig und der Wert des Kalibrierfaktors gar nicht bekannt.

Beispielaufgabe 1.2: Bei der Analyse eines Carbonylgemisches aus Acetaldehyd, Propionaldehyd und Acetons ergaben sich die unten stehenden Peakflächen. Berechnen Sie den Massenanteil an Propionaldehyd, wenn davon ausgegangen wird, dass der Detektor für alle drei Stoffe bezüglich der Analytmasse die gleiche Empfindlichkeit zeigt.

Acetaldehyd: $A = 54792$ AU

Propionaldehyd: $A = 45480$ AU

Aceton: $A = 70078$ AU

B korrigierte 100%-Methode (Berücksichtigung der unterschiedlichen Detektorempfindlichkeit).

Werden die einzelnen Komponenten unterschiedlich empfindlich durch den Detektor erfasst, so muss dies noch rechnerisch berücksichtigt werden. Auch hier wird davon ausgegangen, dass die Summe aller rechnerisch ermittelten Gehalte dem Wert 100% zugeordnet werden, mit anderen Worten, dass alle Probenbestandteile erfasst wurden.

Beispielaufgabe 1.3 In einem Kalibrierchromatogramm wurden unten stehende Daten erhalten. Berechnen Sie den Massenanteil $w(\text{Propionaldehyd})$.

Kalibrierchromatogramm

$\beta(\text{Acetaldehyd}) = 1,5$ g/100 mL $A = 77155$ AU

$\beta(\text{Propionaldehyd}) = 0,9$ g/100 mL $A = 48456$ AU

$\beta(\text{Aceton}) = 1,3$ g/100 mL $A = 65173$ AU

Probechromatogramm

Acetaldehyd: $A = 54792$ AU

Propionaldehyd: $A = 45480$ AU

Aceton: $A = 70078$ AU

Berechnung mit dem Dreisatz:

Berechnung mithilfe der *Kalibrierfaktoren* f : Der Gehalt an Analyt beträgt $f(X) \cdot A(X)$. Der Gesamtgehalt entspricht der Summe aller Einzelgehälter, also $f_1 \cdot A_1 + f_2 \cdot A_2 + f_3 \cdot A_3 + \dots$. Der Gehaltsanteil des Analyts am Gesamtgehalt entspricht seinem Massenanteil. Allgemeine Formeln:

$w(X) =$

Konkretisierung für Beispielaufgabe 1.3:

Der Kutscher aus dem alten Arabien hat ein Problem

Ein Kutscher im alten Arabien befördert Zuckersirup und Wasser in ein entlegenes Dorf gegen Geld. Neben seinem Zuckersirupfass steht das Wasserfass, in das er 45 Liter füllt. So macht er sich auf die mehrtägige Reise über holprige Pfade. Dabei geht immer etwas der Ware verloren, immer unterschiedlich viel. Auf dem Basar wiegt der Zuckersirup auf der Waage („Detektor“) diesmal 32 Kilo, das Wasser wiegt 42 Kilo. Erschrocken stellt er fest, dass er das Volumen Zuckersirup nicht notiert hat, das er zu Beginn mitgenommen hatte. Er braucht es jedoch für die Abrechnung.

2.1a) Berechnen Sie die verlorene Masse Wasser. Schießen Sie auf die verlorene Masse Zuckersirup und geben Sie das geschätzte Startvolumen an Zuckersirup an.

2.1b) Fassen Sie die Berechnung des Startvolumens an Zuckersirup von 2.1a) zu einer einzigen Dreisatzrechnung zusammen.

2.1c) Warum kann es sich nur um eine Schätzung handeln? Man sollte lieber von „Startvolumen an Wasseräquivalenten“ sprechen und nicht von „Startvolumen an Zucker“. Ist das geschätzte Volumen eher zu hoch oder eher zu klein?

Da kommt dem Kutscher eine Idee. Er erinnert sich an seinen vorletzten Transport. Er hatte 21 Liter Zuckersirup in sein Fass gefüllt und zusätzlich ein Wasserfass mit 30 Liter Wasser mitgenommen. Als er einige Tage später im Dorf ankam, wog der Zuckersirup auf dem „Detektor“ 20 Kilo, das Wasser hingegen 25 Kilo. Wie kann er seine Schätzung mithilfe dieser Werte deutlich verbessern? *Tipps: Berechnen und vergleichen Sie die „Kalibrierfaktoren (f) für Wasser und Zuckersirup anhand dieses vorletzten Transports. Um welchen Faktor (Methodenfaktor (MF) genannt) unterscheiden sich beide Werte? Wenden Sie Ihre Erkenntnisse dann auf den „Probelauf“ an.*

Beim internen Standard gibt man zu der Probe eine bekannte, der zu messenden Substanz ähnliche Substanz, in einer genau bekannten Stoffmenge hinzu. Diese Substanz dient als *interner* Standard, da sie sich in der Probe befindet. Ab dem Zeitpunkt der Zugabe bis zur Messung macht der interne Standard alles mit, was auch die Probenkomponenten mitmachen. Man bestimmt die **Wiederfindungsrate des internen Standards** (z.B. 93,33%). Der prozentuale Substanzverlust an innerem Standard entspricht auch dem Substanzverlust an Analyt. Man kann diesen Verlust rechenstechnisch berücksichtigen und so genauere Ergebnisse für den Analyten erhalten.

Eine Verbindung, die als interner Standard einer Probe zugesetzt wird, ...

- ...darf nicht selbst in der ursprünglichen Probe enthalten sein.
- ...muss im Chromatogramm einen eigenständigen Peak ergeben, d.h. es darf keine Probenkomponente mit gleicher Retentionszeit vorhanden sein.
- ...darf mit keiner Probenkomponente reagieren
- ...soll in ihren chemischen Eigenschaften ähnlich dem Analyten sein (wegen vergleichbarem Substanzverlust)

Vorteile des internen Standards: Wenn man versehentlich etwas weniger Probe aufgegeben hat oder der Detektor aufgrund der Voreinstellungen etwas weniger empfindlich ist, so werden die Peakflächen von Standardsubstanzen und Probesubstanzen in gleichem Ausmaß etwas kleiner ausfallen. So kommen diese Verluste rechnerisch nicht zum tragen.

Die Berechnung erfolgt entweder mit dem Dreisatz und den Kalibrierfaktoren, oder man nutzt eine vorgefertigte Formel.

a) Berechnung mit Dreisatz und Methodenfaktor

Zuerst wird anhand den Signalen/Flächen die sich mit der Referenzlösung ergeben haben, berechnet, um welchen Faktor (MF) die Standardsubstanz (S) empfindlicher detektiert wird als der Analyt (X). Dieser Faktor wird **Methodenfaktor (MF = „relativer Responsefaktor“ = „relativer Kalibrierfaktor“)** bezeichnet. Er entspricht, wie der Name schon sagt, dem Verhältnis der Kalibrierfaktoren f:

$$MF = \frac{f(X)}{f(S)} = \frac{\frac{\text{Gehalt}(X)}{\text{Signal}(X)}}{\frac{\text{Gehalt}(S)}{\text{Signal}(S)}} = \frac{\text{Gehalt}(X) \cdot \text{Signal}(S)}{\text{Signal}(X) \cdot \text{Gehalt}(S)}$$

Wenn bei gleichem Gehalt, das Signal von S größer, ist als das von X, dann wird S empfindlicher detektiert. Der Bruch unten ist dann kleiner als der Bruch oben, da Signal(S) größer ist als Signal(X). Insgesamt ist also dann deshalb $MF > 1$.

Anschließend rechnet man mit den Daten der Probelösung (Signal(X), Signal (S) und Gehalt (S)) aus, welcher Gehalt an X als S-Äquivalente vorhanden ist, d.h. man tut so, als ob X dasselbe wie S ist. Dieses Ergebnis multipliziert man anschließend noch mit dem Methodenfaktor MF.

b) Berechnung mithilfe einer vorgefertigten Formel

Hier werden alle Daten direkt in folgende Formel eingesetzt und nach dem Gehalt von X in der Probe aufgelöst werden. Als Gehalte können hier auch Massen, Volumina, Konzentrationen oder Anteile benutzt werden.

$$\frac{\text{Gehaltverhältnis}(X/S)_{\text{in Probe}}}{\text{Signalverhältnis}(X/S)_{\text{in Probe}}} = \frac{\text{Gehaltverhältnis}(X/S)_{\text{in Referenz}}}{\text{Signalverhältnis}(X/S)_{\text{in Referenz}}} \quad \text{Der Doppelbruch rechts ist der MF!}$$

Beispielaufgabe 4 (ähnlich einer Prüfungsaufgabe, Winter 2010/2011): In einer Probe soll der Xylen-Gehalt chromatographisch ermittelt werden. Zur Herstellung der Referenzlösung wurden zuerst 140 µL Xylen in einem 20 mL-Messkolben bis zur Marke mit Lösungsmittel aufgefüllt. 250 µL dieser Xylen-Lösung werden mit 50 µL einer Isodurool-Kalibrierlösung (Volumenkonz. = 10 µL/mL) versetzt. Zur Herstellung einer Probelösung wurden 250 µL der Probe mit 50 µL der Isodurool-Kalibrierlösung versetzt. Nach Einlass in den Chromatographen ergaben sich die unten angegebenen Peakflächen. Berechnen Sie das Volumen und den Volumenkonzentration von Xylen in der ursprünglichen Probe.

	Referenzlösung		Probelösung	
Substanz	Peakfläche	Substanz	Peakfläche	
Isodurool (S)	16072	Isodurool (S)	18433	
Xylen (X)	22035	Xylen (X)	21048	

1. Ermitteln Sie mit dem Dreisatz aus den Peakflächen der Probelösung das Volumen des Analyten als „Isoduroläquivalent“ (als ob es Isodurool wäre).

2. Rechnen Sie in das Xylenvolumen um. Welche Größe benötigen Sie hierfür?

3. Berechnen Sie die Volumenkonzentration in der ursprünglichen Probe.

4. Weshalb braucht der Verdünnungseffekt durch die Zugabe von internem Standard nicht berücksichtigt werden?

Alternative Auswertung mit vorgefertigter Formel: X: Analyt, S: Standardsubstanz

$$\frac{\text{Gehaltverhältnis (X/S) in Probe}}{\text{Signalverhältnis (X/S) in Probe}} = \frac{\text{Gehaltverhältnis (X/S) in Referenz}}{\text{Signalverhältnis (X/S) in Referenz}}$$
 Werte einsetzen und nach Unbekannter auflösen!

Weitere Rechenaufgaben zum internen Standard

1. Bei einer chromatographische Untersuchung zur Bestimmung eines Analyten (X) wurde mit einem inneren Standard (S) gearbeitet. Dazu wurde eine Referenzlösung mit bekannten Konzentrationen an X (0,0837 mol/L) und S (0,0666 mol/L) angefertigt und die bei der Chromatographie erhaltenen Flächen vermessen (in willkürliche Einheiten). Um die Probe zu analysieren, wurden 10 mL einer Lösung mit $c(S) = 0,146 \text{ mol/L}$ zu 10 mL Probelösung gegeben und anschließend auf ein Gesamtvolumen von 25 mL verdünnt. Nach einer chromatographischen Trennung wurden auch hier die Peakflächen vermessen. Insgesamt ergaben sich unten stehende Flächen (in nicht weiter spezifizierten Flächeneinheiten). Berechnen Sie die Konzentration $c(X)$ in der unverdünnten Probe.

Referenzlösung		Verdünnte Probelösung	
S:	A = 347 AU	S:	A = 582 AU
X:	A = 423 AU	X:	A = 553 AU

2. In einer Urinprobe wird der Glucoseanteil chromatographisch analysiert. Dazu wird Fructose als interner Standard verwendet. Beim Kalibrierlauf ergaben sich unten stehende Daten (incl. Konzentration). Zu 100 mL Urinprobe wurden 55 mg Fructose gegeben. Das Chromatogramm ergab mit demselben Auftragungsvolumen wie beim Kalibrierlauf unten stehende Peakflächen. Berechnen Sie den Glucosegehalt in Urin.

Kalibrierlauf		Urinprobe	
$\beta(\text{Fructose}) = 0,60 \text{ mg/mL}$	A = 24185 AU	Fructose	A = 22170 AU
$\beta(\text{Glucose}) = 0,85 \text{ mg/mL}$	A = 37028 AU	Glucose:	A = 17395 AU

Musterlösungen

Beispielaufgabe 1.1

Dreisatz: 13,78 ng/mL

$$f = \frac{\text{Gehalt}}{\text{Signaleinheiten}} = \frac{16,49 \frac{\text{ng}}{\text{mL}}}{17184 \text{ AU}} \approx 9,6 \cdot 10^{-4} \frac{\text{ng}}{\text{mL} \cdot \text{AU}} \quad \beta = f \cdot A \approx 9,6 \cdot 10^{-4} \frac{\text{ng}}{\text{mL} \cdot \text{AU}} \cdot 14357 \text{ AU} \approx 13,78 \frac{\text{ng}}{\text{mL}}$$

Beispielaufgabe 1.2

$$w(\text{Propionaldehyd}) = \frac{45480 \text{ AU}}{54792 \text{ AU} + 45480 \text{ AU} + 70078 \text{ AU}} \approx 0,267$$

Beispielaufgabe 1.3

DREISATZ:

Acetaldehyd

1,5 g/100 mL ~ 77155 AU

x ~ 54792 AU \Rightarrow x \approx 1,06523 g/100 mL

Propionaldehyd

0,9 g/100 mL ~ 48456 AU

x ~ 45480 AU \Rightarrow x \approx 0,844746 g/100 mL

Aceton

1,3 g/100 mL ~ 65173 AU

x ~ 70078 AU \Rightarrow x \approx 1,39784 g/100 mL

Massenanteil Propionaldehyd

100% ~ 3,307816 g/100 mL

x ~ 0,844746 g/100 mL \Rightarrow x \approx 25,5%

MIT KALIBRIERFAKTOREN

$$w(X) = \frac{f_x A_x}{f_1 A_1 + f_2 A_2 + f_3 A_3} = \frac{1,857355 \cdot 10^{-5} \cdot 45480}{1,944138 \cdot 10^{-5} \cdot 54792 + 1,857355 \cdot 10^{-5} \cdot 45480 + 1,994691 \cdot 10^{-5} \cdot 70078} \approx 0,255$$

2.1

2.1a) Es sind nur noch ca. 93,33% des Wassers vorhanden, also ca. 6,67% des Wassers verloren gegangen. Wenn man davon ausgeht dass auch nur noch 93,33 % des Zuckers vorhanden sind, kann man das 100% hochrechnen.

93,33% $\hat{=}$ 32 Kilo

100% $\hat{=}$ x \Rightarrow x \approx 34,286 Kilo.

Es sind also 2,286 Kilo (2,286 Liter) Zuckersirup verloren gegangen.

2.1b)

45 Liter Wasser $\hat{=}$ 42 Kilo Wasser

x Liter Zuckersirup $\hat{=}$ 32 Kilo Zuckersirup $\Rightarrow x \approx 34,286$ Liter.

2.1c) Dies ist nur eine grobe Schätzung, da es sich um unterschiedliche Stoffe handelt, die vom Detektor (Waage) nicht gleich empfindlich detektiert werden (hier: Da die Dichte unterschiedlich ist).

2,286 Kilo Zuckersirup-Verlust entsprechen in Wirklichkeit weniger als 2,286 Liter Zuckersirup. Es ist also in Wirklichkeit weniger Zuckersirup-Volumen verloren gegangen. Das Anfangsvolumen an Zuckersirup ist also zu hoch geschätzt. 1 Kilo Zucker entspricht weniger Volumen als 1 Kilo Wasser. Die Waage (Detektor) ist bezüglich Zuckersirup empfindlicher.

$$f_{\text{Wasser}} = \frac{\text{Gehalt}}{\text{Signal}} = \frac{30 \text{ Liter}}{25 \text{ Kilo}} = 1,2 \frac{\text{Liter}}{\text{Kilo}} \quad f_{\text{Zuckersirup}} = \frac{\text{Gehalt}}{\text{Signal}} = \frac{21 \text{ Liter}}{20 \text{ Kilo}} = 1,05 \frac{\text{Liter}}{\text{Kilo}}$$

Man erkennt dass Zuckersirup durch den Detektor empfindlicher (!) detektiert wird. Das Empfindlichkeitsverhältnis beträgt:

$$\frac{f_{\text{Zuckersirup}}}{f_{\text{Wasser}}} = \frac{1,05 \frac{\text{Liter}}{\text{Kilo}}}{1,2 \frac{\text{Liter}}{\text{Kilo}}} \approx 0,875$$

Das Ergebnis der Schätzung muss noch mit 0,875 multipliziert werden (da es noch zu hoch ist)..

$$\text{Zuckervolumen} = 34,286 \text{ Liter} \cdot 0,875 = 30,000 \text{ Liter}$$

Auswertung für Beispielaufgabe 4 (interner Standard)

1. Ermitteln Sie aus nun aus den Peakflächen der Probelösung das Volumen des Analyten als „Isoduroläquivalent“ (als ob es Isodurool wäre).

21048 ~ x

18433 ~ 0,5 μ L $x = 0,5709325666 \mu$ L Isodurool-Äquivalente

2. Rechnen Sie in das Xylenvolumen um. Welche Größe benötigen Sie hierfür?

Volumen an Xylen in Referenzlösung: 1,75 μ L

$$MF = \frac{\text{Gehalt}(X) \cdot \text{Signal}(S)}{\text{Signal}(X) \cdot \text{Gehalt}(S)} = \frac{1,75 \mu\text{L} \cdot 16072 \text{ AU}}{22035 \text{ AU} \cdot 0,5 \mu\text{L}} \approx 2,5528477$$

$$V(X) = 2,5528477 \cdot 0,5709325666 \mu\text{L} \approx 1,457503889 \mu\text{L}$$

3. Berechnen Sie die Volumenkonzentration in der Probe.

$$\varphi(X) = V(X)/V(\text{Lsg.}) = 1,457503889 \mu\text{L} / 250 \mu\text{L} \approx 0,00583 \hat{=} 0,583\%$$

Alternative Berechnung mit vorgefertigter Formel: X: Analyt, S: Standardsubstanz

$$\frac{\text{Gehaltverhältnis}(X/S)_{\text{in Probe}}}{\text{Signalverhältnis}(X/S)_{\text{in Probe}}} = \frac{\text{Gehaltverhältnis}(X/S)_{\text{in Referenz}}}{\text{Signalverhältnis}(X/S)_{\text{in Referenz}}}$$

$$\frac{\frac{x}{0,5 \mu L}}{\frac{21048}{18433}} = \frac{\frac{1,75 \mu L}{0,5 \mu L}}{\frac{22035}{16072}} \Rightarrow x = 1,457503889 \mu L$$

Nr. 1.

Dreisatz: $c(S)$ in der fertigen Probelösung: $0,146 \text{ mol/L} : 2,5 = 0,0584$

$582 \text{ AU} \sim 0,0584 \text{ mol/L}$

$553 \text{ AU} \sim x \Rightarrow x = 0,0555 \text{ mol/L S-Äquivalente}$

2. Berechnung Methodenfaktor (anhand der Daten der Referenzlösung)

$$MF = \frac{\text{Gehalt}(X) \cdot \text{Signal}(S)}{\text{Signal}(X) \cdot \text{Gehalt}(S)} = \frac{0,0837 \text{ mol/L} \cdot 347 \text{ AU}}{423 \text{ AU} \cdot 0,0666 \text{ mol/L}} = 1,030956488$$

3. Multiplikation $c(X) = MF \cdot 0,0555 \frac{\text{mol}}{\text{L}} = 0,0572 \frac{\text{mol}}{\text{L}}$

Nr. 2

$$\frac{\text{Gehaltverhältnis}(X/S) \text{ in Probe}}{\text{Signalverhältnis}(X/S) \text{ in Probe}} = \frac{\text{Gehaltverhältnis}(X/S) \text{ in Referenz}}{\text{Signalverhältnis}(X/S) \text{ in Referenz}}$$

$$\frac{\frac{x}{0,55 \text{ mg/mL}}}{\frac{17395}{22170}} = \frac{\frac{0,85 \text{ mg/mL}}{0,6 \text{ mg/mL}}}{\frac{37028}{24185}} \Rightarrow x = \beta(\text{Gluc}) = 0,3993 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}$$