

Oznaczanie glukozy w płynach ustrojowych metodą kolorymetryczną z oksydazą glukozy

Wprowadzenie

Glukoza jest monosacharydem o wzorze $C_6H_{12}O_6$ należącym do aldoheksoz (w formie łańcuchowej). Może również występować w formie cyklicznej, jako heterocykliczny półacetal. Glukoza w naturze występuje w formie D, a jej wodne roztwory skręcają płaszczyznę polaryzacji światła w prawo $[+109.6^\circ]$.

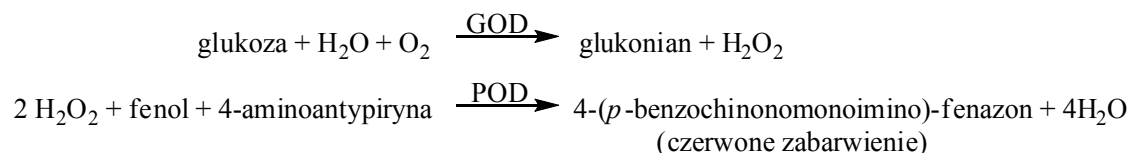
Rośliny wytwarzają glukozę w procesie fotosyntezy, podczas gdy zwierzęta uzyskują ją z sacharydów i skrobi dostarczanej w pokarmach. Glukoza jest podstawowym źródłem energetycznym organizmu ludzkiego. Utrzymuje się we krwi w stałym stężeniu 80-120 mg dzięki regulacji hormonów trzustki, gł. insuliny (obniża poziom glukozy) i glukagonu będącego jej fizjologicznym antagonistą.

Duże ilości glukozy występują w owocach, miodzie, częściach wegetatywnych roślin. W przemyśle otrzymuje się glukozę ze skrobi ziemniaczanej i kukurydzianej.

Wzrost stężenia glukozy spowodowany jest cukrzycą, chorobami trzustki, podaniem adrenaliny, oparzeniami (pierwsze 24h) i innymi stanami i zespołami chorobowymi. Hipoglikemię czyli niedocukrzenie powoduje przedawkowanie insuliny lub niejedzenie posiłku po podaniu leku, niedoczynność hormonalna przysadki, nadnerczy; alkoholizm, toksyczne uszkodzenie wątroby; wpływ trucizn - chloroform, czterochlorek węgla, etanol, paracetamol.

Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości glukozy w badanym roztworze enzymatyczną metodą kolorymetryczną z oksydazą glukozy. W metodzie tej wykorzystuje się zdolność aldoheksoz do tworzenia barwnych połączeń.



Metodą kolorymetryczną można oznaczyć zawartość glukozy w badanej próbce, która pozostaje w prostej zależności od intensywności zabarwienia roztworu (max. absorpcji 500 nm).

Sprzęt i materiały:

- Roztwór wzorcowy glukozy o stężeniu 100mg/dl (5.5 mmol/l),
- Surowica krwi ludzkiej,
- Zestaw diagnostyczny do oznaczania stężenia glukozy
Lquick Cor-GLUCOSE-skład:
 - Bufor fosforanowy (pH 7.0) 250 mmol/l
 - fenol 5 mmol/l
 - oksydaza glukozy (GOD) >250 μ kat/l
 - peroksydaza (POD) >20 μ kat/l
 - 4-aminoantypiryna 500 μ mol/l
- 6 Probówek typu eppendorf,
- Pipety automatyczne, końcówki do pipet,
- 1 Kuweta polistyrenowa (poj. 800 μ l) do pomiarów spektrofotometrycznych (d = 10 mm),
- Wytrząsarka typu Vortex,
- Spektrofotometr SPECORD M-40.

Wykonanie ćwiczenia:

1. Próba zerowa: odczynnik do oznaczeń pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej. Do kuwety pobrać 800 μ l. Wykonać pomiary absorbancji przy długości fali 500 nm.
2. Próba wzorcowa: do probówki typu eppendorf dodać 1 ml odczynnika do oznaczeń. Pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej. Następnie dodać 10 μ l roztworu wzorcowego. Wymieszać i pozostawić na 10 min. Przenieść 800 μ l roztworu do kuwetki. Wykonać pomiar absorbancji przy długości fali 500 nm względem próby zerowej jako próby odniesienia. Pomiar wykonać dla czterech niezależnych prób.

3. Próbką badana: do probówki typu eppendorf dodać 1 ml odczynnika do oznaczeń. Pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej. Następnie dodać 10µl roztworu badanego. Wymieszać i pozostawić na 10 min. Przenieść 800 µl roztworu do kuwetki. Wykonać pomiar absorbancji przy długości fali 500 nm względem próby zerowej jako próby odniesienia. Pomiar wykonać dla czterech niezależnych prób.

Próba Składnik próbki	Zerowa (PZ)	Wzorcowa (PW)	Badana (PB)
Odczynnik do oznaczeń	800 µl	1 ml	1 ml
Pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej			
Roztwór wzorcowy	---	10µl	---
Roztwór badany	---	---	10µl
Wymieszać i pozostawić na 10 min. w temperaturze pokojowej. Przenieść 800 µl roztworu do kuwetki. Trzykrotnie wykonać pomiar absorbancji przy długości fali 500 nm względem próby zerowej jako próby odniesienia. Pomiar wykonać dla czterech niezależnych prób.			

Opracowanie wyników:

- Obliczyć stężenie glukozy w badanej próbce korzystając ze wzoru:

$$\text{Stężenie glukozy} = A(\text{PB}) / A(\text{PW}) \times \text{stężenie wzorca}$$

WARTOŚCI PRAWDŁOWE

Surowica, osocze	74-106 mg/dl (4.1-5.9 mmol/l)
Krew pełna	65-95 mg/dl (3.5-5.3 mmol/l)
Płyn mózgowo-rdzeniowy	40-70 mg/dl (2.2-3.9 mmol/l)

Zalecane jest opracowanie przez każde laboratorium własnych zakresów wartości prawidłowych charakterystycznych dla lokalnej populacji.

- Przeprowadzić analizę statystyczną wyników, obliczając średnią zawartość glukozy w próbce, odchylenie standardowe oraz procentowy błąd oznaczenia.

Literatura uzupełniająca:

1. W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN Warszawa 1996.
2. L. Kłyszajko-Stefanowicz, *Ćwiczenia z biochemii*, PWN Warszawa 1999.
3. L. Stryer, *Biochemia*, PWN Warszawa 1999.

Zagadnienia:

1. glukoza (budowa, poznanie zagrożeń wynikających z zachwiania równowagi glukozy w organizmie, metody oznaczania glukozy we krwi).
2. Spektrofotometria UV-Vis (prawa absorpcji i odchylenia od tych praw, aparatura).
3. Opracowanie wyników i ich ocena statystyczna.