

Ćwiczenie - Oznaczanie stężenia magnezu w surowicy krwi metodą kolorymetryczną

Wprowadzenie

Magnez występuje we wszystkich tkankach i płynach ustrojowych, a znaczna część znajduje się w tkance kostnej. Razem z wapniem uczestniczy w prawidłowym funkcjonowaniu tkanki nerwowej i mięśniowej. Bierze udział w przekazywaniu impulsów nerwowych. Uczestniczy w syntezie i stabilizacji kwasów nukleinowych. Jest niezbędnym kofaktorem wielu enzymów. Zasadniczo wszystkie enzymy działające na nukleotydy, tj. ATP, są aktywne w obecności jonów Mg^{2+} ; jony te odgrywają szczególną rolę w wiązaniu i stabilizowaniu fragmentów polifosforanowych.

Na stężenie magnezu ma wpływ podaż w pokarmach, wchłanianie w przewodzie pokarmowym oraz wydalanie z moczem. Pomiar stężenia magnezu w surowicy jest badaniem przydatnym w diagnostyce zaburzeń nerwowo-mięśniowych i zaburzeń rytmu serca, w monitorowaniu terapii diuretykami i lekami nefrotoksycznymi, niewydolności nerek i żywienia pozajelitowego. Zarówno niedobór magnezu (hipomagnezemia) jak i nadmiar magnezu (hipermagnezemia) prowadzą do zaburzeń układu nerwowego i mięśniowego, a szczególnie mięśnia sercowego (zaburzenia rytmu i przewodzenia).

- Hipomagnezemia najczęściej jest efektem działania niepożądanym leków moczopędnych (wzrost wydalania nerkowego) i zwykle prowadzi do hipokalcemii oraz jest związana z hipokalemią. Objawy kliniczne niedoboru magnezu obserwuje się, jeżeli jego stężenie jest niższe niż 0,5 mmol/l.
- Hipermagnezemia jest najczęściej konsekwencją zwiększonej podaży lub niewydolności nerek. Kliniczne objawy hipermagnezemi występują powyżej 2,5 mmol/l, zaś przy stężeniu powyżej 5 mmol/l dochodzi do porażenia mięśni oddechowych.

Co istotne, prawidłowe stężenie magnezu w surowicy nie wyklucza jego niedoboru wewnątrzkomórkowego.

Cel ćwiczenia:

Celem ćwiczenia jest wykonanie praktycznego oznaczenia stężenia magnezu w surowicy krwi ludzkiej metodą spektrofotometryczną. W metodzie tej wykorzystuje się reakcję magnezu z błękitem ksylidylowym w środowisku alkalicznym, w wyniku której tworzy się purpurowo zabarwiony związek. Intensywność zabarwienia jest wprost proporcjonalna do stężenia magnezu w badanej próbie. Oznaczenia absorbancji wykonuje się wobec próby zerowej przy 520 nm.

Sprzęt i materiały:

- Wzorcowy roztwór magnezu o stężeniu 2 mg/dL (0,82 mmol/L) 2-STANDARD,
- Surowica krwi ludzkiej,
- Zestaw diagnostyczny do oznaczania stężenia MAGNEZU *Lquick Cor-MG*. Skład i stężenie składników w odczynniku roboczym :

- Błękit ksylidylowy 0,15 mmol/l
- EGTA 0,1 mmol/l
- Bufor (pH 11,5)
- Detergent

- 6 Probówek typu eppendorf,
- Pipety automatyczne o pojemności 1000 µl, 10 µl oraz końcówki do pipet,
- 1 Kuweta polistyrenowa (poj. 800 µl) do pomiarów spektrofotometrycznych (d = 10 mm),

- Wytrząsarka typu Vortex,
- Spektrofotometr UV-Vis

Wykonanie ćwiczenia:

1. Próba zerowa: do probówki typu eppendorf dodać 1 ml odczynnika 1-MG. Pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej (około 10 min). Następnie dodać 10 µl roztworu wody dejonizowanej. Wymieszać i przenieść 800 µl roztworu do kuwetki.

2. Próba wzorcowa: do probówki typu eppendorf dodać 1 ml odczynnika 1-MG. Pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej. Pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej. Następnie dodać 10µl roztworu wzorcowego. Wymieszać i pozostawić na 5 min. Przenieść 800 µl roztworu do kuwetki. Wykonać pomiar absorbancji przy długości fali 520 nm względem próby zerowej jako próby odniesienia. Pomiar wykonać czterokrotnie.

3. Próba badana: do probówki typu eppendorf dodać 1 ml odczynnika 1-MG. Pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej. Następnie dodać 10µl surowicy krwi ludzkiej. Wymieszać i pozostawić na 5 min. Przenieść 800 µl roztworu do kuwetki. Wykonać pomiar absorbancji przy długości fali 520 nm względem próby zerowej jako próby odniesienia. Pomiar wykonać czterokrotnie.

Składniki	Próba badana	Próba wzorcowa	Próba zerowa
Odczynnik roboczy 1-MG	1000 µL	1000 µL	1000 µL
Surowica krwi ludzkiej	10 µL	-	-
Wzorzec	-	10 µL	-
H ₂ O destylowana	-	-	10 µL
Dokładnie wymieszać. Po 5minutach przenieść 800 µl roztworu do kuwetki			

spektrofotometrycznej. Odczytać absorbancję przy $\lambda=520$ nm dla próby badanej (A_{PB}) i wzorcowej (A_{PW}) wobec próby zerowej. Pomiar powtórzyć czterokrotnie.

Opracowanie wyników:

- Obliczyć stężenie magnezu w badanej próbce korzystając ze wzoru:

$$\text{Stężenie magnezu} = A_{PB} / A_{PW} \times \text{stężenie wzorca}$$

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

WARTOŚCI PRAWDIŁOWE (surowica/osocze)

Noworodki	2 – 4 dni	1,5 – 2,2 mg/dl (0,62 – 0,91 mmol)
Dzieci	5 m-cy – 6 lat	1,7 – 2,3 mg/dl (0,70 – 0,95 mmol)
	6 – 12 lat	1,7 – 2,1 mg/dl (0,70 – 0,86 mmol/l)
	12 – 20 lat	1,7 – 2,2 mg/dl (0,70 – 0,91 mmol/l)
Dorośli	powyżej 20 lat	1,7 – 2,3 mg/dl (0,66 – 1,07 mmol/l)

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

Literatura uzupełniająca:

1. W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN Warszawa 1996.
2. S. J. Lippard, J. M. Berg *Podstawy chemii bionieorganicznej*, PWN Warszawa 1998.
3. A. Dembińska Kieć, J.W Naskalski, *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej*, Elsevier Urban & Partner, 2002.
4. L. Kłyszajko-Stefanowicz, *Ćwiczenia z biochemii*, PWN Warszawa 1999.
5. L. Stryer, *Biochemia*, PWN Warszawa 1999.

Zagadnienia:

1. Magnez (znaczeniu jonów magnezu dla organizmu ludzkiego, poznanie zagrożeń wynikających z zachwiania równowagi magnezu w organizmie, metody oznaczania magnezu we krwi).
2. Spektrofotometria UV-Vis (prawa absorpcji i odchylenia od tych praw, aparatura).
3. Opracowanie wyników i ich ocena statystyczna.