

Metode de dozare a glicemiei in sange

Pentru determinarea glucozei din sange in laboratorul clinic, se utilizeaza mai frecvent modelele colorimetrice bazate pe reactii intre glucoza si o substanta cromogena. Substanta cromogena poate fi antrona sau o-toluidina. Aceste metode sunt rapide, iar valorile obtinute sunt mai apropiate de valoarea glucozei reale, obtinuta prin metoda enzimatica.

Recoltarea sangelui pentru determinarea glicemiei se face pe fluorura de sodiu (0.01g pentru 1ml sange recoltat) pentru preintampinarea coagularii si a fenomenului de glicoliza.

1. Dozarea glucozei prin metoda colorimetrica cu o-toluidina

Principiu:

Prin conjugarea aldo- si cetohezozelor cu amine aromatice se obtin compusi colorati a caror intensitate se poate determina prin colorimetrie sau fotometrie.

Pentru dozarea glucozei, amina cea mai potrivita este o-toluidina care da cu aldohezozele un compus intens colorat in verde.

Reactivi:

-solutie de acid tricloracetic 20%

-solutie de acid tricloracetic 5%

-solutie de o-toluidina 0.75M

Preparare :

Se amesteca 80ml o-toluidina cu 920ml acid acetic glacial si se adauga 2,5g tiouree.

Se conserva in sticle brune maximum o luna

-solutie standard de glucoza 100mg%

Preparare :

Se dizolva 100mg glucoza in 80ml solutie saturata de acid benzoic si dupa dizolvare se completeaza cu aceeasi solutie pana la 100ml. Solutia se poate conserva foarte bine cateva luni.

Tehnica de lucru :

Se pregatesc 2 eprubete de centrifuga, una pentru proba de analizat si una pentru proba standard :

	Exprimarea cantitatii	Proba de analizat	Proba standard
Sange total, ser sau plasma	MI	0.2	-
Solutie standard de glucoza	MI	-	0.2
Apa distilata	MI	1.5	1.5
Acid tricloracetic 20%	MI	0.5	0.5

Fiecare eprubeta se agita pentru omogenizare, se lasa in repaus 5 minute, dupa care se centrifugheaza timp de 10 minute la 3500-4000 turatii pe minut. Din supernatantul rezultat in fiecare eprubeta, se pregatesc :

	Exprimarea cantitatii	Proba De analizat	Proba standard	Proba In alb
Supernatant de la proba cu sange	MI	0.5	-	-

Supernatant de la proba standard	Ml	-	0.5	-
Solutie de acid tricloracetic 5%	Ml	-	-	0.5
Solutie o-toluidina	Ml	0.5	2.5	2.5

Se agita eprubetele si se tin timp de 8 minute in baia de apa la fierbare, dupa care se racec la robinet. Dupa racire se masoara extinctiile probelor de analizat si proba standard in raport cu proba alb. Citirile se fac la 635nm .

Calcularea rezultatelor :

$$Ml\ glucoza/100ml\ sange\ (ser\ sau\ plasma)=PA/PS \times 100$$

In care PA=extinctia citita la proba de analizat

PS=extinctia citita la proba standard

Observatii :

-ceto-sau aldopentozele dau coloratie cu o-toluidina dar de intensitate foarte slaba, neglijabila pentru concentratia acestor substante in sange. Galactoza poate interfera in cazurile de galactozemie.

-daca determinarea glucozei se face in mai putin de 3 ore de la recoltarea probei, atunci nu este obligatorie recoltarea pe substante anticoagulante.

2. Dozarea glucozei prin metode colorimetrice cu antrona

Principiu :

Glucoza este deshidratata cu acid sulfuric obtinandu-se hidroximetilfurfurol, care cu antrona formeaza un compus de condensare colorat in galben-rosiatic. Extinctia se citeste la 620nm.

Reactivi :

-solutie de acid tricloracetic 5%

-reactiv cu antrona

Preparare:

La 280ml apa distilata se adauga 720ml acid sulfuric concentrat. Se adauga 500 mg antrona si 10g tiouree. Se incalzeste la 80 grade C pe baia de apa pana la dizolvarea completa. Reactivul se pastreaza la +4 grade C timp de cateva saptamani.

-solutie standard de glucoza (200mg%).

Tehnica de lucru :

Se pipeteaza in 3 eprubete de centrifuga pentru proba de analizat, proba standard si proba in alb :

	Exprimarea cantitatii	Proba De analizat	Proba standard	Proba In alb
Solutie de acid tricloracetic 5 %	Ml	0.9	0.9	0.9
Sange total, plasma sau ser	Ml	0.1	-	-
Solutie standard de glucoza	Ml	-	0.1	-
Apa distilata	Ml	-	-	0.1

Continutul fiecarei probe se amesteca prin agitare, dupa care se centrifugheaza numai eprubeta cu proba de analizat.

Din supernatantul probelor se fac urmatoarele amestecuri :

	Exprimarea cantitatii	Proba De analizat	Proba standard	Proba In alb

Supernatant cu proba de analizat	MI	0.5	-	-
Din amestecul cu proba standard	MI	-	0.5	-
Din amestecul cu proba in alb	MI	-	-	0.5
Reactiv cu antrona	MI	5.0	5.0	5.0

Se incalzez eprubetele timp de 15 minute pe baia de apa la fierbere. Dupa racire se fotometreaza la 620nm.

Calcularea rezultatelor :

$$\text{Mg glucoza/100ml sange(ser sau plasma)} = \text{PA/PS} \times 100$$

In care PA=extinctia citita la proba de analizat

PS=extinctia citita la proba standard

3. Dozarea glucozei din sange prin metoda tritrimetrica (tehnica Hagedorn si Jensen)

Principiu :

Glucoza din sange, prezinta in filtratul de sange deproteinizat in prealabil prin incalzire cu un amestec de sulfat de Zn si hidroxid de Na, reduce fericianura de K la ferocianura de K. fericianura de K in exces , elibereaza I dintr-o solutie de iodura de K, in mediu acid. I eliberat este titrat cu o solutie de tiosulfat de Na in prezenta solutiei de amidon ca indicator.

Pentru ca reactia sa fie completa, ferocianura de K si de Na se precipita cu sulfatul de Zn :

Excesul de ferocianura de K va reactiona cu iodura de K in mediu acid :

Iodul se titreaza cu solutie de tiosulfat de Na :

Reactivi :

-solutie de sulfat de Zn 0.45% . se pastreaza aproximativ 3 saptamani

-solutie de NaOH 0.1 N

-solutie de fericianura de K 0.01 N

Preparare :

0.329g fericianura de K se dizolva in 80ml apa distilata si se completeaza apoi la 100ml. Solutia se pastreaza in sticle brune si la intuneric (solutia A).

-solutia de sulfat de Zn 7.5% in solutie de clorura de Na 25% (solutia B).

-solutie de iodura de K 7.5% in solutie de clorura de Na 25% (solutia C)

-solutie de clorura de Na 25%

-solutie de acid acetic 3%

Preparare :

3ml acid acetic glacial p.a., apa distilata pana la 100ml (solutia D)

-solutie de tiosulfat de Na 0.005N

a) solutie de tiosulfat Na 0.1N : 26g Na₂S₂O₃ · 5H₂O, apa distilata pana la 1000ml, 2 picaturi NaOH 40%. Se lasa 2-3 zile sa stea in repaus la intuneric dupa care se stabileste titrul solutiei.

b) 5ml solutie de tiosulfat de Na 0.1 N se dilueaza cu apa distilata la 1000 ml.

-solutie de carbonat de Na 2.12g%

-solutie de amidon 1% in solutie saturata de NaCl.

Tehnica de lucru :

In doua eprubete se pipeteaza cate 5 ml solutie de sulfat de Zn 0.45% si 1 ml solutie de NaOH 0.1 N. Intra o eprubeta care contine proba de analizat, se adauga 0.1 ml sange. Cele doua eprubete se tin intr-o baie de apa la fierbere timp de 3 minute, dupa care se filtreaza. Eprubetele se spala cu 3 ml apa fierbinte trecuta prin hartia de filtru. In filtrat se adauga 1 ml solutie fericianura de K 0.01 N si 1 ml solutie de carbonat de Na 2.12g%, se amesteca prin agitare si se incalzeste la fierbere pe baia de apa, timp de 15 minute. Se raceste imediat. Daca fericianura s-a decolorat, se mai adauga un ml solutie fericianura de K 0.01 N si se mai incalzeste 15 minute. Se raceste si se adauga apoi 2 ml sulfat de Zn 7.5%, 1 ml iodura de K 7.5% si 2 ml acid acetic 3%. Imediat se titreaza iodul eliberat cu o solutie de tiosulfat de Na 0.005 N, folosind o microbiureta de 2 ml. Titarea se face in prezenta de 5 picaturi din solutia de amidon 1% ca indicator pana la disparitia culorii albastre.

Calcularea rezultatelor :

Afland prin titrare volumul de tiosulfat de Na folosit , se citeste din tabel mg de glucoza la 100 ml.

Daca se folosesc 2 ml solutie de fericianura de K 0.01 N la titrare, atunci se adauga 385mg la 100 ml. totdeauna se va folosi si o proba martor care ne ofera o masura a impuritatilor reducatoare din reactivi. Daca nu exista impuritati reducatoare, titrarea blancului se va face cu 2 ml tiosulfat de Na 0.005 N. valoarea martorului exprimata in mg glucoza/100 ml se scade din valoarea probei.

De exemplu, daca s-a titrat proba de analizat cu 1.43 ml Na₂S₂O₃ 0.005 N si proba martor cu 1.9 ml, atunci obtinem :

La 1.43ml.....101mg glucoza

La 1.9ml.....17mg glucoza

Deci mg glucoza/100ml=101-17=84

Na ₂ S ₂ O ₃	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
0.0	385	382	379	376	373	370	367	364	361	358
0.1	355	352	350	348	345	343	341	338	336	333
0.2	331	329	327	325	323	321	318	316	314	312
0.3	310	308	306	304	302	300	298	296	294	292
0.4	290	288	286	284	282	280	278	276	274	272
0.5	270	268	266	264	262	260	259	257	255	253
0.6	251	249	247	245	243	241	240	238	236	234
0.7	232	230	228	226	224	222	221	219	217	215
0.8	213	211	209	208	206	204	202	200	199	197
0.9	195	193	191	190	188	186	184	182	181	179
1.0	177	175	173	172	170	168	166	164	163	161
1.1	159	157	155	154	152	150	148	146	145	143
1.2	141	139	138	136	134	132	131	129	127	125
1.3	124	122	120	119	117	115	113	111	110	108
1.4	106	104	102	101	99	97	95	93	92	90
1.5	88	86	84	83	81	79	77	75	74	72
1.6	70	68	66	65	63	61	59	57	56	54
1.7	52	50	48	47	45	43	41	39	38	36
1.8	34	32	31	29	27	25	24	22	20	19

1.9	17	15	14	12	10	8	7	5	3	2
-----	----	----	----	----	----	---	---	---	---	---

BIBLIOGRAFIE:

*Manual de lucrari practice de biochimie-Luminita Jerca

*Biochimie clinica - Denisa Mihele / Maria Pavlovici

*Internet