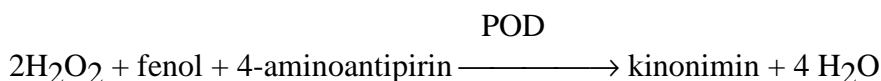


DOLOČANJE KONCENTRACIJE GLUKOZE V SERUMU S PAP METODO

Princip:

Glukoza se pod vplivom encima glukoza-oksidadaza (GOD) in kisika iz zraka oksidira. Pri tem nastaja tudi vodikov peroksid, ki s pomočjo encima peroksidaza (POD) povzroči kondenzacijo fenola s 4-aminoantipirinom. Pri tem nastaja obarvan kinonimin katerega količino merimo.

Reakcije:



Postopek:

V 10mL epruvete pipetiramo v mL:

	Sl	St	Vz	K
demineral. voda	0,01	—	—	—
standardna razt. glukoze	—	0,01	—	—
vzorec (serum)	—	—	0,01	—
kontrolni vzorec	—	—	—	0,01
<u>delovni reagent</u>	<u>1,00</u>	<u>1,00</u>	<u>1,00</u>	<u>1,00</u>

Premešamo in merimo absorbanco pri 500 nm (492-550nm) med 20 - 30min (20-25°C).

Račun:

$$c_{VZ} = (A_{VZ} - A_{Sl}) / (A_{St} - A_{Sl}) \times c_{St}$$

Referentne vrednosti:

S, P: 3,9 - 5,8 mmol/L
Kapilarna kri: 2,8 - 5,6 mmol/L
CSF: 2,8 - 3,9 mmol/L

Reagenti:

Delovni reagent je raztopina 4-aminoantipirina, GOD, POD in fenola v fosfatnem pufru s pH 7,4.

Opozorila:

Postopek ni specifičen. V povišanih koncentracijah lahko motijo: sečna kislina, kreatinin, askorbinska kislina, glutation, antikoagulantni in bilirubin.

Koncentracija glukoze je v vzorcu seruma ali plazme stabilna 8 ur pri sobni temp. in 3 dni v hladilniku.

Vzorcu polne krvi dodamo K- oz Na-fluorid ali Li jodoacetat, ki inhibirajo glikolizo.

Rezultati praktičnega dela

Številka vzorca:

1. *Opis vzorcev, materiala in opreme*

2. *Meritve:*

a) pogoji merjenja:

b) rezultati meritev:

kontrolni vzorec:

preiskovani vzorec:

standardni vzorec:

slepi vzorec:

ostalo:

c) podane vrednosti:

kontrolni vzorec:

standardni vzorec:

ostalo:

3. *Izračuni:*

4. *Rezultati:*

DOLOCANJE GLIKIRANEGA HEMOGLOBINA HbA_{1c} S KROMATOGRAFSKO METODO

Princip:

Pri pripravi hemolizata najprej odstranimo labilno frakcijo Hb, preostale vrste Hb pa ločimo s pomočjo kationske izmenjevalne smole. Najprej speremo s kolone frakcijo HbA_{1a+b} nato pa končno še HbA_{1c}. Koncentracijo HbA_{1c} določimo tako, da v zadnjem eluatu direktno izmerimo absorbanco pri 415nm in jo primerjamo z absorbanco hemolizata pri 415nm.

Postopek:

1. Priprava hemolizata in odstranjevanje labilne frakcije

K 50 μ L polne venske krvi dodamo 200 μ L reagenta 1, dobro premešamo in pustimo 10 - 15 min na sobni temperaturi.

2. Priprava kolone

Najprej odstranimo gornji, nato pa še spodnji pokrovček kolone. S stekleno palčko potisnemo disk na smolo (vendar ne preveč!) in pustimo, da odteče odvečni pufer.

3. Ločevanje in merjenje HbA_{1c}

Na kolono pipetiramo:

hemolizat vzorca 50 μ L

reagent 2 200 μ L

pustimo, da tekočina steče čez kolono ter na kolono pipetiramo še:

reagent 2 2,0 mL

pustimo, da tekočina odteče. Podstavimo novo epruveto in začnemo z eluiranjem HbA_{1c} tako, da na kolono dodamo:

reagent 3 4,0 mL

Po končanem eluiranju vsebino epruvete dobro premešamo in izmerimo absorbanco pri 415nm ($A_{HbA_{1c}}$).

4. Merjenje celokupnega hemoglobina v hemolizatu

V 16 mL epruvete pipetiramo:

reagent 3 6,0 mL

hemolizat 25 μ L

Dobro premešamo, prelijemo v 10 mL epruveto in izmerimo absorbanco pri 415nm proti destilirani vodi (A_{cel}).

Račun: $\%HbA_{1c} = (A_{HbA_{1c}} / 3 \times A_{cel}) \times 100$

Referentne vrednosti: polna venska kri: 4,2 - 6,2%

Reagenti:

Reagent 1: kalijev biftalat 50 mmol/L, detergent, pH=5,0

Reagent 2: fosfatni pufer 48 mmol/L, pH=6,5, Na-azid 1g/L

Reagent 3: fosfatni pufer 72 mmol/L, pH=6,4, Na-azid 1g/L

Mikrokolone vsebujejo določeno količino izmenjevalca v fosfatnem pufru.

Rezultati praktičnega dela

Številka vzorca:

1. Opis materiala, opreme in vzorcev:

2. Meritve:

a) pogoji merjenja:

b) rezultati meritev:

celokupni Hb

glikirani Hb

3.1 zračuni:

4. Rezultati:

Komentar rezultatov

Komentirajte rezultate določanja glukoze in glikiranega Hb **SKUPAJ!**

Pregledal-a:

Datum:

Pripombe: