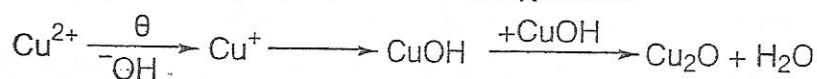


σιμοποιείται συνήθως, γιατί αφ' ενός η γλυκόζη δεν είναι πολύ σταθερή όπως είναι στο πλάσμα και αφ' ετέρου γιατί μεταβάλλονται οι τιμές της, με μεταβολή του αιματοκρίτη. Επιπλέον, το ολικό αίμα είναι δύσχρηστο όταν χρησιμοποιείται αυτόματος αναλυτής, γιατί είναι διφασικό σύστημα – κύτταρα και πλάσμα – και πρέπει να αναμιχθεί πολύ καλά, πριν την ανάλυση. Οι περισσότεροι προσδιορισμοί γλυκόζης γίνονται σε ορό ή σε πλάσμα. Απαιτείται διαχωρισμός αυτών από τα ερυθρά κύτταρα, αμέσως μετά τη δειγματοληψία, γιατί η γλυκόζη περνάει τη μεμβράνη των ερυθρών κυττάρων και μεταβολίζεται με την πορεία της αναερόβιας γλυκόλυσης. Λόγω του φαινομένου αυτού, η γλυκόζη μειώνεται στο ολικό αίμα κατά 7% ανά ώρα. Πρέπει επίσης να αναφερθεί ότι τα επίπεδα της γλυκόζης στον ορό επηρεάζονται σημαντικά από τα γεύματα, γι' αυτό το δείγμα για τον προσδιορισμό της γλυκόζης πρέπει να λαμβάνεται από άτομο που είναι νηστικό για τουλάχιστον 8–12h. Όταν απομακρυνθούν τα κύτταρα από το πλάσμα με ήπια φυγοκέντρηση, τότε παραμένουν στο πλάσμα λευκά κύτταρα, τα οποία επίσης μεταβολίζουν τη γλυκόζη. Για να παραμείνουν σταθερά τα επίπεδα της γλυκόζης πρέπει να ανασταλλεί η γλυκόλυση, συνήθως με την προσθήκη φθοριούχου νατρίου (NaF) στο δείγμα. Τα ιόντα φθορίου σχηματίζουν σύμπλοκο με τα ιόντα Mg^{2+} και τα ανόργανα φωσφορικά. Το σύμπλοκο αυτό, παρεμποδίζει τη σύνδεση της γλυκόζης στην ενολάση και επιπλέον αναστέλλει τη δράση της ενολάσης αφού το ένζυμο αυτό απαιτεί Mg^{2+} για τη δράση του.

Πολλές αναλυτικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης, οι οποίες διακρίνονται σε χημικές και ενζυμικές μεθόδους.

Οι περισσότερες χημικές μέθοδοι βασίζονται στις αναγωγικές ιδιότητες της γλυκόζης. Οι μέθοδοι αυτές δεν είναι εξειδικευμένες, γιατί στον ορό υπάρχουν και άλλες αναγωγικές ουσίες, που επίσης αντιδρούν. Επειδή όμως χρησιμοποιούνται αρκετά συχνά για μέτρηση της γλυκόζης στα ούρα, ακολουθεί μία σύντομη περιγραφή της αρχής των μεθόδων αυτών.

- i) Η αλδεϋδομάδα της γλυκόζης ανάγει τα ιόντα χαλκού Cu^{2+} , σε θερμό αλκαλικό περιβάλλον προς οξείδιο του υποχαλκού:

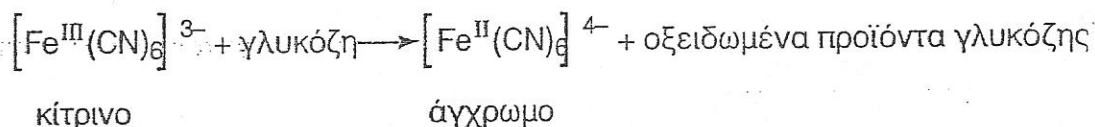


Η αντίδραση δεν είναι στοιχειομετρική και εξαρτάται από την ισχύ του αλκαλικού διαλύματος, το χρόνο και τη θερμοκρασία της θέρμανσης καθώς και από τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων. Στο επόμενο στάδιο, προστίθεται φωσφομολυβδαινικό οξύ, το οποίο ανάγεται από τα ιόντα χαλκού Cu^+ προς σχηματισμού έγχρωμων προϊόντων που φωτομετρούνται.

- ii) Στη μέθοδο της νεοκουπροΐνης, η γλυκόζη ανάγει το Cu^{2+} σε Cu^+ σε θερμό αλκαλικό περιβάλλον. Τα ιόντα Cu^+ αντιδρούν με τη 2,9-διμεθυλο-

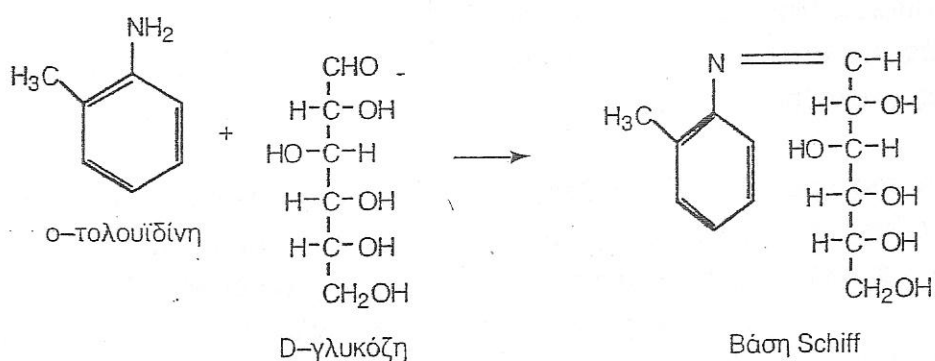
1,10-φαινανθρολίνη (νεοκουπροΐνη) και σχηματίζεται πορτοκαλόχρουν σύμπλοκο, το οποίο φωτομετρείται.

iii) Τα σιδηρικούανιούχα ιόντα ανάγονται σε θερμό αλκαλικό περιβάλλον από τη γλυκόζη σε σιδηροκυανιούχα.



Στη μέθοδο αυτή παρακολουθείται η ελάττωση της απορρόφησης των σιδηρικών ανιούχων ιόντων, στα 420nm.

Στις χημικές μεθόδους ανήκει και η μέθοδος της ο-τολουϊδίνης. Διάφορες αρωματικές αμίνες όπως η ανιλίνη, το 2-αμινοδιφαινύλιο και η ο-τολουϊδίνη αντιδρούν με τη γλυκόζη σε θερμό διάλυμα οξικού οξέος προς σχηματισμό έγχρωμων παραγώγων. Επειδή οι άλλες αρωματικές ενώσεις είναι καρκινογόνες γι' αυτό χρησιμοποιείται μόνο η ο-τολουϊδίνη. Η ο-τολουϊδίνη αντιδρά με την αλδεϋδομάδα της γλυκόζης προς σχηματισμό γλυκοζυλαμίνης και της αντίστοιχης βάσης Schiff, η οποία έχει πράσινο χρώμα και απορροφά στα 630nm.



Η παραπάνω αντίδραση δεν είναι ειδική για τη γλυκόζη, γιατί και οι άλλοι υδατάνθρακες παράγουν έγχρωμες ενώσεις. Αυτό όμως δεν αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου, γιατί αφ' ενός μεν οι εξόζες π.χ. γαλακτόζη βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σε φυσιολογικά δείγματα, αφ' ετέρου δε οι πεντόζες παράγουν ενώσεις πορτοκαλόχρωμες, που απορροφούν σε άλλη περιοχή, στα 480nm.

Για τον προσδιορισμό της γλυκόζης χρησιμοποιούνται κυρίως οι ενζυμικές μέθοδοι, δύο από τις οποίες θα αναπτυχθούν στη συνέχεια. Αν και η γλυκόζη μπορεί να υπολογισθεί με διαφορετικές αναλυτικές μεθόδους, οι φυσιολογικές τιμές αυτής δε διαφοροποιούνται στις μεθόδους. Συγκεκριμένα, η γλυκό-

ζη στο πλάσμα και στον ορό κυμαίνεται από 70 έως 105 mg/100mL (3.89–5.83 mmol/L), στο ολικό αίμα είναι 60–95 mg/100mL (3.6–5.3 mmol/L) και στα ούρα 24ώρου είναι μικρότερη από 500mg/100mL.

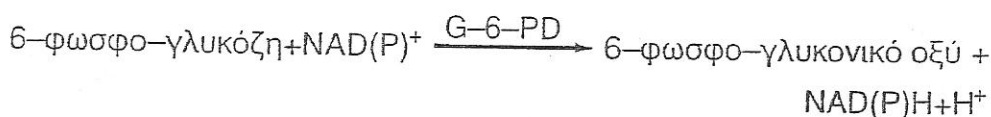
Πειραματικό Μέρος

4α. Προσδιορισμός της γλυκόζης με τη μέθοδο της εξοκινάσης

Η γλυκόζη φωσφορυλιώνεται παρουσία ATP και ιόντων Mg^{2+} , από την εξοκινάση.



Η 6-φωσφο-γλυκόζη που σχηματίζεται, οξειδώνεται στη συνέχεια από την αφυδρογονάση της 6-φωσφο-γλυκόζης (G-6-PD) παρουσία του $NADP^+$.



Το ποσό του NADPH που παράγεται, είναι ανάλογο της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο δείγμα και υπολογίζεται με φωτομέτρηση στα 340nm.

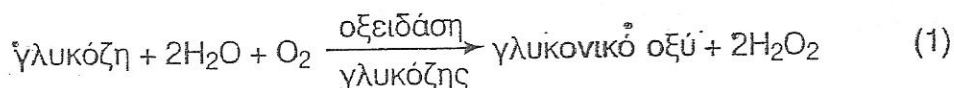
Τα δείγματα ορού ή πλάσματος που θα χρησιμοποιηθούν, πρέπει πρώτα να αποπρωτεϊνωθούν με προσθήκη διαλύματος υδροξειδίου του βαρίου ($Ba(OH)_2$) και θειϊκού ψευδαργύρου ($ZnSO_4$). Στη συνέχεια, αναμιγνύεται το διαυγές υπερκείμενο με το μίγμα της αντίδρασης και ακολουθείται η πορεία της μεθόδου. Η διαδικασία της αποπρωτεϊνώσης, αν και οδηγεί σε πολύ ακριβή αποτελέσματα, είναι επίπονη και χρονοβόρα, για μέθοδο ρουτίνας στα κλινικά εργαστήρια. Γι' αυτό το λόγο, η μέθοδος προσδιορισμού της γλυκόζης με την εξοκινάση, εφαρμόζεται απευθείας στα δείγματα ορού ή πλάσματος, με ταυτόχρονη χρήση τυφλού προσδιορισμού, για τυχόν υπάρχουσες ουσίες που απορροφούν στα 340nm. Σαν αντιπηκτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν, το EDTA, η ηπαρίνη, τα οξαλικά και τα κιτρικά. Αιμολυμένα δείγματα που περιέχουν πάνω από 0.5g αιμογλοβίνης στα 100mL δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν, γιατί οι φωσφορικοί εστέρες και τα ένζυμα, που απελευθερώνονται από τα ερυθρά κύτταρα, παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό της γλυκόζης. Επίσης, τα λιπαιμικά και ικτερικά δείγματα οδηγούν σε τιμές με θετική απόκλιση από τις πραγματικές, η οποία όμως μπορεί να αφαιρεθεί με χρήση του τυφλού.

Τέλος, όταν η συγκέντρωση της γλυκόζης στο δείγμα είναι μεγαλύτερη από 500mg/100mL, τότε επιβάλλεται αραιώση του δείγματος με φυσιολογικό ορό και στη συνέχεια, προσδιορισμός του αραιωμένου δείγματος.

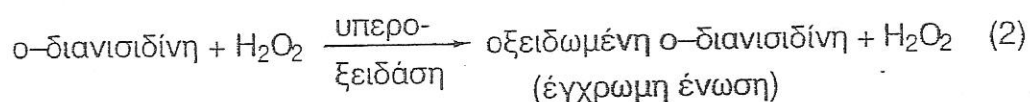
46. Προσδιορισμός της γλυκόζης με τη μέθοδο της οξειδάσης της γλυκόζης

Αρχή της μεθόδου

Η οξειδάση της γλυκόζης καταλύει την οξείδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ και υπεροξειδίο του υδρογόνου:



Το υπεροξειδίο του υδρογόνου, που παράγεται, παρουσία της υπεροξειδάσης αντιδρά με την ο-διανισιδίνη, προς σχηματισμό έγχρωμης ένωσης

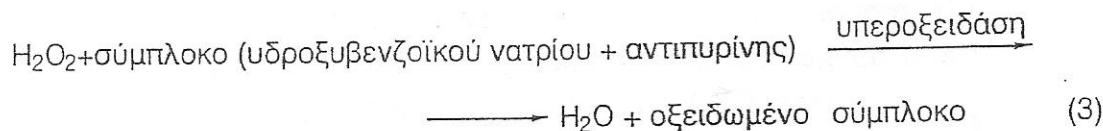


Η οξειδάση της γλυκόζης έχει υψηλή εξειδίκευση για τη β-D-γλυκόζη. Η γλυκόζη στα διαλύματα βρίσκεται με τη μορφή α-σε ποσοστό 36% και με τη μορφή β-σε ποσοστό 64%. Άρα, για να αντιδράσει πλήρως η γλυκόζη απαιτείται αλλαγή της διαμόρφωσης της α-μορφής της σε β-μορφή. Το τελευταίο, επιτυγχάνεται είτε με την προσθήκη ενός επιπλέον ενζύμου, της μουταροτάσης, στο διάλυμα της αντίδρασης, είτε με αύξηση του χρόνου επώασης, που επίσης οδηγεί σε αναστροφή της δομής της γλυκόζης.

Το δεύτερο στάδιο που γίνεται παρουσία της υπεροξειδάσης είναι λιγότερο εξειδικευμένο, απ' ό,τι το στάδιο με την οξειδάση της γλυκόζης. Διάφορες ουσίες όπως το ουρικό οξύ, το ασκορβικό οξύ, η αιμογλοβίνη, η τετρακυκλίνη και η γλουταθειόνη παρεμποδίζουν την αντίδραση του δευτέρου σταδίου, πιθανώς γιατί ανταγωνίζονται το H_2O_2 στην αντίδραση με την ο-διανισιδίνη και λαμβάνονται χαμηλότερες τιμές.

Σε μερικές μεθόδους, η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη ασθενούς οξέος και το τελικό μίγμα εμφανίζει κίτρινο χρώμα, που φωτομετρείται στα 400nm. Όταν το τελικό διάλυμα είναι ισχυρά όξινο, τότε το χρώμα του είναι ροζ και η μέγιστη απορρόφησή του είναι στα 540nm.

Επίσης, μία τροποποίηση της μεθόδου αυτής, είναι να προσδιοριστεί το παραγόμενο H_2O_2 , με βάση την ακόλουθη αντίδραση:



Στην αντίδραση αυτή, το H_2O_2 οξειδώνει το σύμπλοκο της 4-αμινο-αντιπυρίνης με το υδροξυβενζοϊκό νάτριο, παρουσία της υπεροξειδάσης. Το σύμπλοκο αυτό στην οξειδωμένη μορφή του, είναι κινοειδής έγχρωμη ένωση, που απορροφά στα 510nm. Στη συνέχεια ακολουθεί περιγραφή της εργαστηριακής άσκησης του προσδιορισμού της γλυκόζης που βασίζεται στις ενζυμικές αντιδράσεις (1) και (3).

Πρέπει να αναφερθεί ότι ο προσδιορισμός της γλυκόζης με τη μέθοδο της οξειδάσης της γλυκόζης δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε δείγματα ούρων, τα οποία περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις των ενώσεων, που παρεμποδίζουν την αντίδραση της υπεροξειδάσης.

Αντιδραστήρια:

1. Χρησιμοποιείται προκατασκευασμένο διάλυμα (Kit) που περιέχει τα εξής αντιδραστήρια.
 - α) Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.5, 150mM
 - β) Οξειδάση της γλυκόζης (από *Aspergillus niger*) 18U/mL
 - γ) Υπεροξειδάση (από αγριοράπανο, horseradish) 1U/mL
 - δ) 4-αμινοαντιπυρίνη 0.4mM
 - ε) Υδροξυβενζοϊκό νάτριο 10mM
 - στ) Νατραζίδιο 0.1g/100mL
2. Πρότυπο διάλυμα γλυκόζης 2mg/mL

Εκτέλεση:

1. Αριθμούνται 5 δοκιμαστικοί σωλήνες, οι 3 δοκιμαστικοί σωλήνες (Σ_1 - Σ_3) χρησιμοποιούνται για τα πρότυπα διαλύματα γλυκόζης, ο ένας δοκιμαστικός σωλήνας για το δείγμα, άγνωστης περιεκτικότητας σε γλυκόζη (Δ) και ο τελευταίος δοκιμαστικός σωλήνας για το τυφλό (T).
2. Στους δοκιμαστικούς σωλήνες Σ_1 - Σ_3 προστίθεται ποσότητα 50μL, 75μL και 100μL, αντίστοιχα από το πρότυπο διάλυμα γλυκόζης. Στο Δ προστίθεται ποσότητα 50μL από το άγνωστης περιεκτικότητας δείγμα.
3. Σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται κατάλληλη ποσότητα H_2O , έτσι ώστε ο τελικός όγκος να είναι ίδιος.
4. Στη συνέχεια προστίθεται ποσότητα 2.5mL από το αντιδραστήριο (1) σε όλους τους σωλήνες και ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο 37°C για 15min.
5. Τα δείγματα φωτομετρούνται στα 510nm.

Αποτελέσματα – Υπολογισμοί:

1. Κατασκευάζεται Πίνακας με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα καθώς και το διάγραμμα πορείας της άσκησης.
2. Υπολογίζονται τα μg γλυκόζης που περιέχονται στους δοκιμαστικούς σωλήνες $\Sigma_1 - \Sigma_3$.
3. Κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς $\text{Abs} = f(\mu\text{g} \text{ γλυκόζης})$
4. Υπολογίζεται η συγκέντρωση της γλυκόζης στο δείγμα άγνωστης συγκέντρωσης, με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς και η οποία μετατρέπεται σε $\text{mg γλυκόζης}/100\text{mL}$ δείγματος. Εάν το τελικό αποτέλεσμα δίνει τιμή γλυκόζης μεγαλύτερη από $300\text{mg}/100\text{mL}$ (όριο γραμμικότητας της μεθόδου), αραιώνεται το αρχικό δείγμα και προσδιορίζεται ξανά.

5. Προσδιορισμός Βιταμίνης Α

Θεωρητικό Μέρος

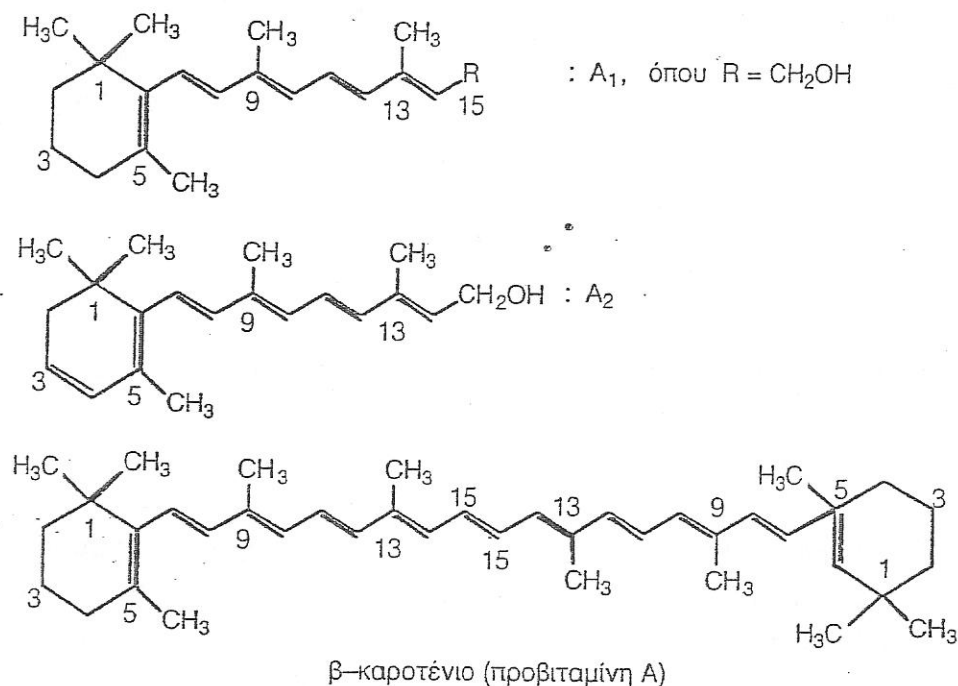
Οι βιταμίνες θεωρούνται από τους πιο σημαντικούς παράγοντες, που επηρεάζουν την υγεία και την ανάπτυξη του ανθρώπου. Οι περιπτώσεις, κατά τις οποίες εμφανίζεται ανεπάρκεια μίας μόνο βιταμίνης είναι σχετικά σπάνιες και είναι αποτέλεσμα, είτε γενετικού προβλήματος, είτε ασυνήθιστης διατροφής. Πιο συνηθισμένες είναι οι περιπτώσεις που εμφανίζεται ανεπάρκεια σε πολλές βιταμίνες και η οποία είναι αποτέλεσμα, είτε κακής διατροφής, είτε συγκεκριμένων παθολογικών καταστάσεων, ειδικά αυτών που επηρεάζουν την απορρόφηση της τροφής, είτε μεγάλης απώλειας αίματος, είτε τέλος λόγω χρήσης συγκεκριμένων φαρμάκων.

Οι βιταμίνες, όπως είναι γνωστό, είναι οργανικές ενώσεις, που είναι απαραίτητες για τον ανθρώπινο οργανισμό, σε μικρά ποσά (μg – mg ανά μέρα). Είναι φυσικά συστατικά που απομονώνονται από οργανισμούς όπως τα φυτά ή μπορεί να συντεθούν χημικά.

Οι δύο φυσικές μορφές της βιταμίνης Α είναι η ρετινόλη (A_1) και η 3-δεϋδρορετινόλη (A_2) (σχήμα 70).

Τα δεδομένα από κλινικές μελέτες σε ανθρώπους δείχνουν ότι 500 – $600\mu\text{g}$ ρετινόλης (ή αρκετά μεγαλύτερη ποσότητα β -καροτένιου), είναι η μικρότερη ποσότητα που απαιτείται στους ενήλικες, έτσι ώστε να διατηρείται ικανοποιητική συγκέντρωση βιταμίνης Α στο αίμα και να μην εμφανίζονται συμπτώματα ανεπάρκειας. Όταν προσλαμβάνονται μεγαλύτερα ποσά ρετινόλης τότε μπορεί να αποθηκεύονται στο συκώτι. Η προτεινόμενη ημερήσια πρόσληψη για τους άνδρες ενήλικες, έχει ορισθεί στα 100 R.E. και για τις γυναίκες στα 800 R.E. , όπου 1 R.E. ισοδυναμεί με $1\mu\text{g}$ ρετινόλης ή $6\mu\text{g}$ β -καροτένιου. Επίσης,

1IU (International unit) της δραστηριότητας της βιταμίνης A, ισοδυναμεί με 0.3μg trans-ρετινόλης ή 0.6μg trans-β-καροτένιου.



Σχήμα 70: Χημικές δομές βιταμίνης A και β-καροτενίου.
R = CHO: ρετινάλη, R = COOH: ρετινοϊκό οξύ

Ο κυριότερος φυσιολογικός ρόλος της βιταμίνης A, είναι η συμμετοχή της ρετινόλης στην όραση καθώς και η συμμετοχή στην αναπαραγωγή και στην ανάπτυξη.

Όταν υπάρχει ανεπάρκεια της βιταμίνης A, παρατηρούνται αλλαγές στα μάτια και στο δέρμα, οι οποίες μπορεί να είναι αντιστρεπτές μετά από χορήγηση βιταμίνης A ενώ υπάρχουν και σοβαρότερες επιπτώσεις που μπορεί να οδηγήσουν και σε τύφλωση. Από την άλλη πλευρά, η υπερβιταμίνωση A, δηλαδή όταν η συγκέντρωση της βιταμίνης A στο πλάσμα είναι μεγαλύτερη από 140μg/100mL, έχει τοξικά αποτελέσματα όπως έντονους πονοκεφάλους, τάση για εμετό, ζαλάδες και σε ακόμα μεγαλύτερες συγκεντρώσεις και για μεγάλο χρονικό διάστημα, ανορεξία, απώλεια βάρους, πόνο στα κόκκαλα, ξηρότητα στα χείλη κ.λ.π.

Στη συνέχεια, θα αναπτυχθεί ο προσδιορισμός βιταμίνης A και β-καροτενίου με τη μέθοδο Neeld-Pearson, η οποία αν και εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία από την κλασική μέθοδο Carr-Price, δε δίνει πολύ ακριβή αποτελέσματα.

Τα τελευταία χρόνια, με την ανάπτυξη της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ή πίεσης (HPLC, high performance or pressure liquid

chromatography), έχουν αναπτυχθεί ποσοτικοί μέθοδοι προσδιορισμού καρο-
τενοειδών και ρετινοειδών, σε πολλά βιολογικά δείγματα. Οι μέθοδοι αυτοί
είναι απλοί, γρήγοροι και εξειδικευμένοι και επιτρέπουν τον ταυτόχρονο
προσδιορισμό των βιταμινών A και E. Χρησιμοποιούνται στήλες κανονικής
φάσης (normal-phase) καθώς και ανάστροφης φάσης (reverse-phase) με ανι-
χνευτή υπεριώδους, συνήθως στα 280nm.

Πειραματικό Μέρος

Προσδιορισμός βιταμίνης A και β-καροτενίου με τη μέθοδο Neeld-Pearson

Αρχή της μεθόδου

Το τριφθοροοξικό οξύ αντιδρά με τους συζυγείς διπλούς δεσμούς που
υπάρχουν στο μόριο της βιταμίνης A και του β-καροτενίου και παράγεται προϊ-
όν με μπλε χρώμα που φωτομετρείται στα 620nm. Για το προσδιορισμό της
βιταμίνης A και του καροτενίου, χρησιμοποιείται ορός από νηστικό άνθρωπο.
Οι οροί πρέπει να φυλάσσονται στους -20°C και μακριά από φως, όταν ο
προσδιορισμός δεν μπορεί να γίνει άμεσα. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, η
βιταμίνη A και το β-καροτένιο είναι σταθερά για τουλάχιστον 2 εβδομάδες.

Αντιδραστήρια:

1. Αιθανόλη, 95% (v/v)
2. Πετρελαϊκός αιθέρας
3. Χλωροφόρμιο
4. Διάλυμα τριφθοροοξικού οξέος
Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται με ανάμιξη 1 όγκου CF_3COOH και 2
όγκων CHCl_3 , λίγο πριν τη χρήση του. Το διάλυμα είναι σταθερό για 4 h
στους 25°C
5. Πυκνό (stock) διάλυμα βιταμίνης A, $160\mu\text{g/mL}$
Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 16mg trans-οξικού
εστέρα ρετινόλης στα 100mL με CHCl_3
6. Πρότυπα διαλύματα βιταμίνης A, 4, 8, 12 και $16\mu\text{g/mL}$
Τα διαλύματα αυτά παρασκευάζονται με κατάλληλη αραιώση του πυκνού
διαλύματος ($160\mu\text{g/mL}$). Συγκεκριμένα:
2.5mL πυκνού διαλύματος αραιώνονται στα 100mL με CHCl_3 και προκύπτει
διάλυμα συγκέντρωσης $4\mu\text{g/mL}$.

- 5.0mL πυκνού διαλύματος αραιώνονται στα 100mL με CHCl_3 και προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 8μg/mL.
- 7.5mL πυκνού διαλύματος αραιώνονται στα 100mL με CHCl_3 και προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 12μg/mL.
- 10.0mL πυκνού διαλύματος αραιώνονται στα 100mL με CHCl_3 και προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 16μg/mL.
- Τα πρότυπα διαλύματα είναι σταθερά για 1 εβδομάδα στους 4–8°C και όταν προστατεύονται από το φως.
7. Πυκνό διάλυμα β-καροτένιου, 200μg/mL
Το διάλυμα αυτό παρασκευάζεται με διαλυτοποίηση 20mg συνθετικού κρυσταλλικού β-καροτένιου με 4mL CHCl_3 . Ο όγκος συμπληρώνεται στα 100mL με πετρελαϊκό αιθέρα.
8. Πρότυπα διαλύματα β-καροτένιου με 0.5, 1, 2, 3 και 4μg/mL
Αρχικά, αραιώνεται το πυκνό διάλυμα β-καροτένιου 1:10 με πετρελαϊκό αιθέρα, έτσι ώστε να προκύψει διάλυμα συγκέντρωσης 20μg/mL. Στη συνέχεια, ακολουθούν κατάλληλες αραιώσεις του διαλύματος 20μg/mL, για να προκύψουν τα πρότυπα διαλύματα β-καροτένιου. Συγκεκριμένα:
2.5mL διαλύματος 20μg/mL αραιώνονται στα 100mL με πετρελαϊκό αιθέρα και προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 0.5μg/mL.
5.0mL διαλύματος 20μg/mL αραιώνονται στα 100mL με πετρελαϊκό αιθέρα και προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 1μg/mL.
10.0mL διαλύματος 20μg/mL αραιώνονται στα 100mL με πετρελαϊκό αιθέρα και προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 2μg/mL.
15.0mL διαλύματος 20μg/mL αραιώνονται στα 100mL με πετρελαϊκό αιθέρα και προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 3μg/mL.
20.0mL διαλύματος 20μg/mL αραιώνονται στα 100mL με πετρελαϊκό αιθέρα και προκύπτει διάλυμα συγκέντρωσης 4μg/mL.

Εκτέλεση:

Α' μέρος : Πρότυπη καμπύλη αναφοράς β-καροτένιου

1. Αριθμούνται 6 δοκιμαστικοί σωλήνες, οι 5 δοκιμαστικοί σωλήνες για τα πρότυπα διαλύματα β-καροτένιου (K_1 – K_5) και ο έκτος σωλήνας για το τυφλό (T_K).
2. Στους K_1 – K_5 τοποθετούνται 5mL από τα πρότυπα διαλύματα β-καροτένιου 0.5, 1, 2, 3 και 4μg/mL. Στον T_K τοποθετούνται 5mL πετρελαϊκού αιθέρα.
3. Φωτομετρούνται στα 450nm.

Β' μέρος : Υπολογισμός του συντελεστή διόρθωσης F

1. Αριθμούνται 6 κυψελίδες φωτομέτρου, οι 5 κυψελίδες για τα πρότυπα διαλύματα β-καροτενίου ($K'_1-K'_5$) και η άλλη κυψελίδα για το τυφλό (T'_K).
2. Στις $K'_1-K'_5$ τοποθετούνται 2mL από τα πρότυπα διαλύματα β-καροτενίου (0.5–4μg/mL).
3. Τα δείγματα εξατμίζονται με ρεύμα αζώτου σε υδατόλουτρο 50°C.
4. Στη συνέχεια, προστίθεται στις $K'_1-K'_5$ ποσότητα 0.1mL $CHCl_3$, ακολουθεί ανάδευση στο vortex και προσθήκη 1mL CF_3COOH με έντονο τρόπο (με αυτόματη πιπέττα) έτσι ώστε να γίνει ταυτόχρονη ανάμιξη.
5. Στην T'_K προστίθενται 0.1mL $CHCl_3$ και 1mL CF_3COOH , όπως περιγράφεται στο προηγούμενο στάδιο (4).
6. Φωτομετρούνται στα 620nm. Επειδή η φωτομέτρηση πρέπει να γίνει ακριβώς 2sec μετά την προσθήκη του CF_3COOH , η προσθήκη αυτού γίνεται σε μία κυψελίδα κάθε φορά και όχι σε όλες μαζί.

Γ' μέρος : Πρότυπη καμπύλη αναφοράς βιταμίνης A

1. Αριθμούνται 4 σωλήνες φυγοκέντρου για τα πρότυπα διαλύματα βιταμίνης A (B_1-B_4) και μία κυψελίδα για το τυφλό (T_B).
2. Στους B_1-B_4 προστίθεται ποσότητα 0.1mL από τα πρότυπα διαλύματα βιταμίνης A 4, 8, 12 και 16μg/mL.
3. Στη συνέχεια προστίθενται 2mL αιθανόλης 95% σε κάθε ένα σωλήνα, ακολουθεί ανάδευση και προσθήκη 3mL πετρελαϊκού αιθέρα στον κάθε ένα σωλήνα.
4. Οι B_1-B_4 φυγοκεντρούνται για 10min στα 2500xg.
5. Από την πάνω φάση (πετρελαϊκός αιθέρας) της φυγοκέντρωσης παραλαμβάνονται 2mL, τα οποία μεταφέρονται σε καθαρές στεγνές κυψελίδες φωτομέτρου.
6. Εξατμίζεται το περιεχόμενο σε όλες τις κυψελίδες, με ρεύμα αζώτου σε υδατόλουτρο 50°C.
7. Ακολουθεί προσθήκη 0.1mL $CHCl_3$ σε κάθε κυψελίδα και ανάδευση στο vortex.
8. Σε όλες τις κυψελίδες προστίθεται 1mL CF_3COOH με έντονο τρόπο.
9. Στην κυψελίδα του τυφλού (T_B) προστίθενται με τον ίδιο τρόπο, 0.1mL $CHCl_3$ και 1mL CF_3COOH .
10. Φωτομέτρηση στα 620nm, ακριβώς 2sec μετά την προσθήκη του CF_3COOH .

Δ' μέρος : Προσδιορισμός βιταμίνης Α και β-καροτενίου στο δείγμα άγνωστης συγκέντρωσης

1. Σε ένα σωλήνα φυγοκέντρου (Δ) προστίθεται 1mL από το άγνωστο δείγμα (π.χ. ορός) και ακολουθείται η διαδικασία, που περιγράφεται στα στάδια 3-5 του Γ' μέρους.
2. Το δείγμα φωτομετρείται στα 450nm γρήγορα, έτσι ώστε να μην εξατμιστεί ο διαλύτης και να μην καταστραφούν τα καροτενοειδή από το φως. Σαν τυφλό χρησιμοποιείται πετρελαϊκός αιθέρας. Σημειώνεται η τιμή της απορρόφησης (A_1).
3. Στη συνέχεια, ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφεται στα στάδια 6-10, του Γ' μέρους. Για τη φωτομέτρηση στα 620nm χρησιμοποιείται το τυφλό T_B και σημειώνεται η τιμή της απορρόφησης (A_2).

Αποτελέσματα – Υπολογισμοί:

Κατασκευάζεται πίνακας με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και γίνεται το διάγραμμα πορείας της άσκησης.

Α' μέρος

Σχεδιάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς β-καροτενίων δηλαδή $Abs=f(\mu g/mL)$.

Β' μέρος

Υπολογίζεται ο μέσος όρος των λόγων της απορρόφησης στα 620nm προς τη συγκέντρωση του β-καροτενίου σε $\mu g/mL$. Ο μέσος όρος είναι ο συντελεστής διόρθωσης F.

Γ' μέρος

1. Υπολογίζονται τα μg του οξικού εστέρα της ρετινόλης σε κάθε κυψελίδα.
2. Κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς της βιταμίνης Α δηλαδή $Abs=f(\mu g \text{ οξικού εστέρα ρετινόλης/κυψελίδα})$.

Δ' μέρος

1. Από την A_1 με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς β-καροτενίων, υπολογίζεται το ποσό των καροτενίων ανά mL.
2. Μετατρέπεται σε μg καροτενίων/100mL δείγματος με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$$\mu g \text{ καροτενίων/100mL δείγματος} = \mu g \text{ καροτενίων/mL} \times 3 \times 100$$

όπου, 3 = ο όγκος πετρελαϊκού αιθέρα που περιέχει τα καροτένια από 1.0mL δείγματος μετά την εκχύλιση και

100 = συντελεστής διόρθωσης μονάδων από $\mu\text{g/mL}$ σε $\mu\text{g}/100\text{mL}$.
3. Για τον ακριβή προσδιορισμό της ποσότητας της βιταμίνης A στο άγνωστο δείγμα, πρέπει να γίνει διόρθωση στην τιμή της απορρόφησης στα 620nm (A_2), στην οποία συμπεριλαμβάνεται και η απορρόφηση των καροτενίων. Η διόρθωση γίνεται με βάση τον ακόλουθο τύπο:

$$A_3 = A_2 - (F \times A_1)$$

όπου, A_1 =τιμή απορρόφησης του δείγματος στα 450nm, που οφείλεται στα καροτένια,
 A_2 =τιμή απορρόφησης του δείγματος στα 620nm, που οφείλεται στα καροτένια και στη βιταμίνη A,
 A_3 =τιμή απορρόφησης του δείγματος στα 620nm, που οφείλεται μόνο στη βιταμίνη A και
 F = συντελεστής διόρθωσης F.

4. Από την A_3 με βάση την πρότυπη καμπύλη αναφοράς της βιταμίνης A, υπολογίζεται η συγκέντρωση αυτής στο δείγμα, σύμφωνα με τον παρακάτω τύπο:

$$\mu\text{g βιταμίνης A} / 100\text{mL δείγματος} = \mu\text{g οξικού εστέρα ρετινόλης} / \text{κυψελίδα} \times \frac{3}{2} \times 100 \times 0.872$$

όπου, 3=ο όγκος πετρελαϊκού αιθέρα που εκχύλισε το 1mL δείγματος,
2=ο όγκος πετρελαϊκού αιθέρα που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό,
100=συντελεστής διόρθωσης μονάδων και
0.872=ο λόγος μοριακού βάρους της ρετινόλης προς το μοριακό βάρος του οξικού εστέρα ρετινόλης.

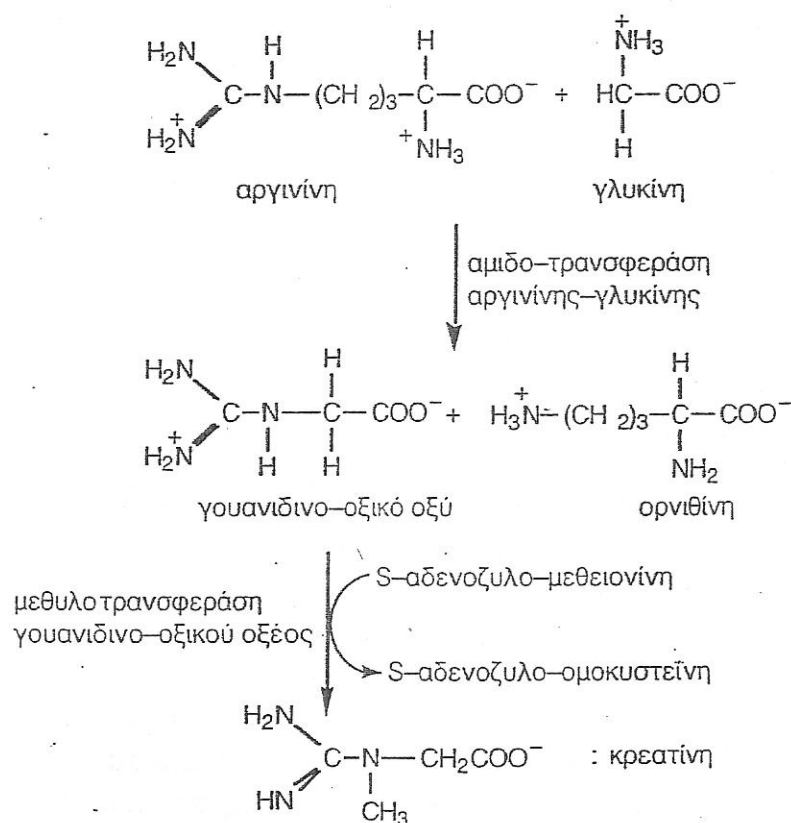
Παρατηρήσεις:

1. Οι φυσιολογικές τιμές της συγκέντρωσης της βιταμίνης A στον ορό παιδιών και ενηλίκων, είναι 30–80 και 30–65 $\mu\text{g}/100\text{mL}$, αντίστοιχα. Τιμές συγκέντρωσης βιταμίνης A πάνω από 100 $\mu\text{g}/100\text{mL}$, υποδεικνύουν τοξικότητα.
2. Οι φυσιολογικές τιμές των καροτενοειδών του ορού (κυρίως β-καροτενίου και ξανθοφύλλης) είναι 60–200 $\mu\text{g}/100\text{mL}$, όταν χρησιμοποιείται για την εκχύλισή τους πετρελαϊκός αιθέρας και 50–300 $\mu\text{g}/100\text{mL}$, όταν εκχυλίζεται ο ορός με ισο-οκτάνιο. Αυξημένες τιμές καροτενοειδών, εμφανίζονται σε υποθυροειδικές καταστάσεις και σε ασθενείς με υπερλιπιδαιμία, που σχετίζεται με σακχαρώδη διαβήτη.

6. Προσδιορισμός κρεατίνης

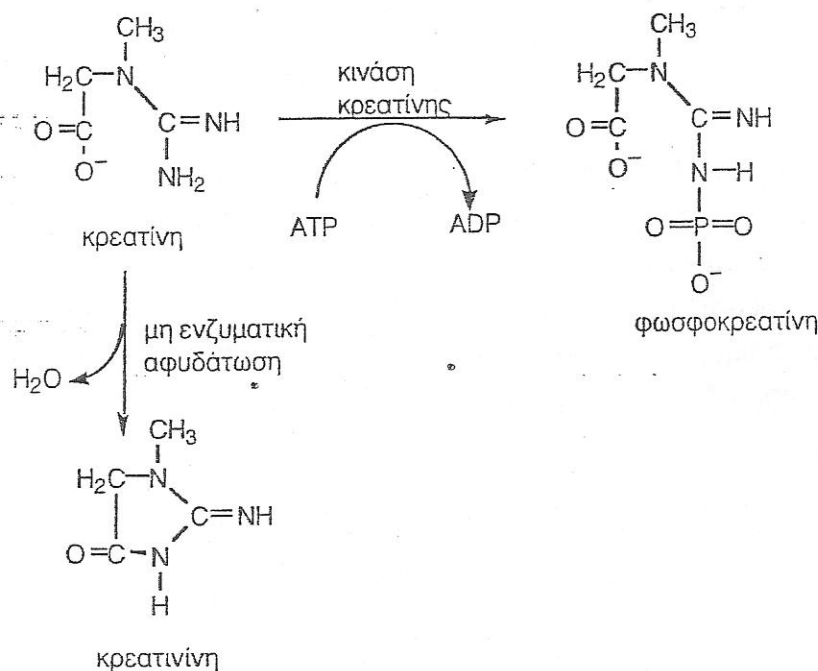
Θεωρητικό Μέρος

Η κρεατίνη συντίθεται στο νεφρό, στο συκώτι και στο πάγκρεας από δύο ενζυμικές αντιδράσεις. Στην πρώτη αντίδραση, σχηματίζεται γουανιδινο-οξικό οξύ από αργινίνη και γλυκίνη με τη δράση της αμιδο-τρανσφεράσης αργινίνης-γλυκίνης (σχήμα 71). Στη δεύτερη αντίδραση, μεθυλιώνεται το γουανιδινο-οξικό οξύ, παρουσία της μεθυλοτρανσφεράσης του γουανιδινο-οξικού οξέος, όπου δότης της μεθυλο-ομάδας είναι η S-αδενοζυλο-μεθειονίνη (σχήμα 71)



Σχήμα 71: Αντιδράσεις της σύνθεσης της κρεατίνης.

Στη συνέχεια, η κρεατίνη μεταφέρεται μέσω του αίματος σε άλλα όργανα όπως μύες και εγκέφαλος, όπου με τη δράση της κινάσης της κρεατίνης φωσφορυλιώνεται σε φωφο-κρεατίνη, μια ένωση υψηλής ενέργειας. Ένα μέρος της ελεύθερης κρεατίνης μετατρέπεται σε κρεατινίνη, στους μύες (σχήμα 72), σε ποσοστό 1-2%, καθημερινά.



Σχήμα 72: Αντιδράσεις μετατροπής της κρεατίνης σε φωσφοκρεατίνη και κρεατινίνη, στους μύες.

Επειδή, το ποσό της κρεατινίνης που παράγεται ενδογενώς είναι ανάλογο της μυϊκής μάζας, η συγκέντρωση αυτή ποικίλλει ανάλογα με την ηλικία και το φύλο. Στους άνδρες, η κρεατινίνη που εκρίνεται είναι περίπου 1.5g/ημέρα και στις γυναίκες 1.2g/ημέρα. Επιπλέον, η καθημερινή έκκριση της κρεατινίνης μπορεί να είναι 10 με 30% μεγαλύτερη, σαν αποτέλεσμα της διατροφικής πρόσληψης κρεατίνης και κρεατινίνης από κρέατα.

Η κρεατινίνη που παράγεται, απελευθερώνεται με σταθερό ρυθμό στο αίμα, το οποίο στη συνέχεια διηθείται από το νερό και η κρεατινίνη μεταφέρεται στα ούρα. Επειδή ένα μικρό ποσό της κρεατινίνης, επαναρροφάται από τα σωληνάρια του νεφρού, το 7-10% της κρεατινίνης που υπάρχει στα ούρα, οφείλεται στην έκκριση αυτής από τα σωληνάρια. Θεωρείται όμως ότι η κρεατινίνη των ούρων προέρχεται πρακτικά μόνο από τη σπειραματική διήθηση. Το ποσό της κρεατινίνης που διηθείται (σε mg/min) ισούται με το γινόμενο της ταχύτητας της σπειραματικής διήθησης (GFR) επί τη συγκέντρωση της κρεατινίνης στον ορό (S_c), δηλαδή είναι:

$$\text{GFR (mL/min)} \times S_c \text{ (mg/mL)}.$$

Το ποσό αυτό ισούται με το ποσό της κρεατινίνης, που αποβάλλεται στα ούρα δηλαδή με το γινόμενο της ροής των ούρων (V) επί τη συγκέντρωση της κρεατινίνης στα ούρα (U_c), δηλαδή είναι:

$$V \text{ (mL/min)} \times U_c \text{ (mg/mL)}.$$

Από τα παραπάνω ισχύει:

$$\text{GFR (mL/min)} = V \text{ (mL/min)} \times \frac{U_c}{S_c} = \frac{K}{S_c}$$

δηλαδή, η συγκέντρωση της κρεατινίνης του ορού είναι αντιστρόφως ανάλογη της ταχύτητας της σπειραματικής διήθησης, αφού η κρεατινίνη αποβάλλεται με σταθερή ταχύτητα στα ούρα.

Οι μέθοδοι, που χρησιμοποιούνται ευρύτατα για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης, βασίζονται στην αντίδραση Jaffé, περιγραφή της οποίας θα γίνει στη συνέχεια. Το σημαντικό μειονέκτημα των μεθόδων αυτών, είναι ότι προσδιορίζουν την κρεατινίνη, χρησιμοποιώντας τη μη εξειδικευμένη αντίδραση του πικρικού ανιόντος, με αποτέλεσμα να λαμβάνονται τιμές της κρεατινίνης στο πλάσμα, αυξημένες κατά 30% όταν η συγκέντρωσή αυτής στον ορό είναι μικρότερη από 1mg/100mL και 10% όταν η συγκέντρωσή της είναι μεγαλύτερη από 1mg/100mL.

Για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης έχουν αναπτυχθεί και ενζυμικές μέθοδοι, οι οποίες βασίζονται σε δύο ένζυμα: α) την κρεατινάση, η οποία καταλύει την αποικοδόμηση της κρεατινίνης, σε N-μεθυλο-υδαντοΐνη και ιόν αμμωνίου και β) την υδρολάση της κρεατινίνης, η οποία καταλύει την υδρόλυση της κρεατινίνης σε κρεατίνη. Οι μέθοδοι, που χρησιμοποιούν την κρεατινάση μειονεκτούν στις περιπτώσεις, που το δείγμα έχει υψηλή συγκέντρωση αμμωνίας και κρεατίνης.

Πιο συνηθισμένη είναι η χρήση της υδρολάσης της κρεατινίνης. Η κρεατίνη, που παράγεται προσδιορίζεται φωτομετρικά, αφού προηγηθεί μετατροπή της, είτε σε φωσφοκρεατίνη με την κινάση της κρεατίνης, είτε σε σαρκοσίνη. Στη δεύτερη περίπτωση, η σαρκοσίνη οξειδώνεται προς γλυκίνη, φορμαλδεϋδη και υπεροξείδιο του υδρογόνου, με τη δράση της οξειδάσης της σαρκοσίνης. Στη συνέχεια, ακολουθεί ποσοτικός προσδιορισμός του H_2O_2 .

Τέλος, για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης χρησιμοποιείται και HPLC με στήλες ιοντο-ανταλλαγής, ισοκρατικά συστήματα έκλουσης και ανιχνευτής υπεριώδους στα 234nm.

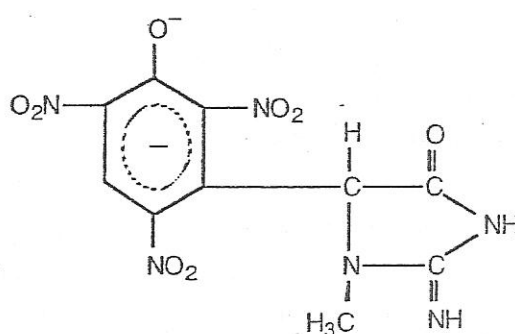
Οι φυσιολογικές τιμές της κρεατινίνης στον ορό ή στο πλάσμα με τη μέθοδο Jaffé είναι 0.7–1.2mg/100mL (62–115μmoles/L) στους άνδρες και 0.6–1.1mg/100mL (53–97μmoles/L) στις γυναίκες. Η συγκέντρωση της κρεατινίνης στα ούρα είναι 14–26mg/Kg/ημέρα (124–230μmoles/Kg/ημέρα) στους άνδρες και 11–20mg/Kg/ημέρα (97–177μmoles/Kg/ημέρα) στις γυναίκες.

Πειραματικό Μέρος

Προσδιορισμός κρεατίνης με τη μέθοδο Jaffé

Κατά την αντίδραση Jaffé, η κρεατινίνη αντιδρά με το πικρικό ανιόν σε αλκαλικό περιβάλλον, προς σχηματισμό συμπλόκου με πορτοκαλέρυθρο χρώμα. Η πιθανή δομή αυτού του συμπλόκου, παρουσιάζεται στο σχήμα 73. Η

Η συγκέντρωση του αλκαλικού διαλύματος, παίζει σημαντικό ρόλο στην αντίδραση Jaffé. Η σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης, είναι γραμμικά ανάλογη της συγκέντρωσης των ιόντων υδροξυλίου, για μεγάλη περιοχή συγκεντρώσεων των ιόντων του πικρικού οξέος. Η συγκέντρωση των ιόντων υδροξυλίου, δεν επηρεάζει μόνο την ταχύτητα της αντίδρασης αλλά προσδιορίζει σε σημαντικό βαθμό και το μήκος κύματος, που απορροφά το σύμπλοκο και το οποίο βρίσκεται στην περιοχή των 480–520nm. Στις πιο πρόσφατες μεθόδους, η συγκέντρωση του NaOH είναι μικρότερη από 1mole/L και το πικρικό οξύ είναι σε περίσσεια.



Σχήμα 73: Πιθανή δομή του συμπλόκου κρεατινίνης–πικρικού.

Όπως αναφέρθηκε νωρίτερα, η αντίδραση Jaffé δεν είναι ειδική για τον προσδιορισμό της κρεατινίνης στο πλάσμα, επειδή οι πρωτεΐνες, η γλυκόζη, το ασκορβικό οξύ, γουανιδίνη, η ακετόνη, οι κεφαλοσπορίνες και τα α–κετο–οξέα αντιδρούν και σχηματίζουν χρωμογόνα. Οι ενώσεις αυτές οδηγούν σε δεδομένα όπου η κρεατινίνη είναι αυξημένη κατά 0.2–0.4mg/100mL. Για το λόγο αυτό, απαιτείται προκατεργασία του δείγματος, για να εξαλειφθεί το σφάλμα. Έτσι, οι πρωτεΐνες απομακρύνονται, είτε σε αυτοματοποιημένα συστήματα με διάλυση, είτε με μετατροπή αυτών σε ίζημα, είτε τέλος με προσθήκη κατάλληλου αντιδραστήριου, που τις μετατρέπει σε μη ενεργά σύμπλοκα. Η γλυκόζη και το ασκορβικό οξύ επίσης μετατρέπονται σε σύμπλοκα, με την προσθήκη βορικού οξέος στο ρυθμιστικό διάλυμα.

-7. Προσδιορισμός χοληστερόλης

Θεωρητικό Μέρος

Η χοληστερόλη, όπως είναι γνωστό, ανήκει στα λιποειδή, ο μεταβολισμός των οποίων παρουσιάζει σημαντικό βιοχημικό και κλινικό ενδιαφέρον κυρίως λόγω της συμμετοχής τους σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις όπως η αθηρωμάτωση.

Στο κλινικό εργαστήριο αναλύονται συνήθως μόνο η ολική χοληστερόλη και τα τριγλυκερίδια του ορού. Το δείγμα αίματος, που θα χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της ολικής χοληστερόλης, πρέπει να έχει ληφθεί από άτομο νηστικό για περίπου 12 ώρες.

Οι τιμές της συγκέντρωσης χοληστερόλης εμφανίζουν διακυμάνσεις που εξαρτώνται από το αν η μέτρηση γίνεται σε ορό ή σε πλάσμα, η δε φαινομενική συγκέντρωση ολικής χοληστερόλης του πλάσματος εξαρτάται από το αντιπηκτικό που χρησιμοποιήθηκε, γι' αυτό για τη μέτρηση ολικής χοληστερόλης έχει προταθεί η χρησιμοποίηση του ορού. Εάν η ολική χοληστερόλη προσδιοριστεί σε πλάσμα με EDTA ως αντιπηκτικό, η τιμή που θα βρεθεί πρέπει να μετατραπεί σε τιμή ορού, με πολλαπλασιασμό της τιμής χοληστερόλης του πλάσματος με 1.03. Τα δείγματα πρέπει να αναλύονται την ημέρα της συλλογής αλλιώς αποθηκεύονται στους 4°C για 3–4 ημέρες πριν την ανάλυση. Τα δείγματα είναι σταθερά στους 20°C για αρκετούς μήνες και στους –70°C για πολλά χρόνια.

Οι φυσιολογικές τιμές χοληστερόλης ποικίλλουν ανάλογα με την ηλικία (Πίνακας IV).

Πίνακας IV: Φυσιολογικές τιμές χοληστερόλης στον ορό.

<u>Ηλικία</u>	<u>Φυσιολογικές τιμές (mg/100mL)</u>
0–19	120–230
20–29	120–240
30–39	140–270
40–49	150–310
50–59	160–330

Πρέπει όμως να αναφερθεί ότι για την περίπτωση της ολικής χοληστερόλης του ορού, δεν υπάρχουν σαφή ανώτατα φυσιολογικά όρια, δηλαδή η αξιολόγηση της τιμής της είναι εξαιρετικά δύσκολη. Σύμφωνα άλλωστε με τις τελευταίες απόψεις για την παθογένεια της αθηρωμάτωσης, τα επίπεδα της χοληστερόλης στο αίμα δεν παίζουν σημαντικό ρόλο, αφού μείωση αυτών, είτε με τροποποίηση της διατροφής, είτε με χορήγηση υπολιπιδαιμικών φαρμάκων, δεν οδηγεί στην αναμενόμενη μείωση του αριθμού των καρδιαγγειακών επεισοδίων. Άλλωστε, πώς μπορεί να ερμηνευτεί η εξαιρετική άμυνα των Κρητικών έναντι των καρδιαγγειακών παθήσεων, τη στιγμή που το ποσοστό χοληστερόλης τους απέχει πολύ από τα γενικά παραδεκτά πρότυπα.

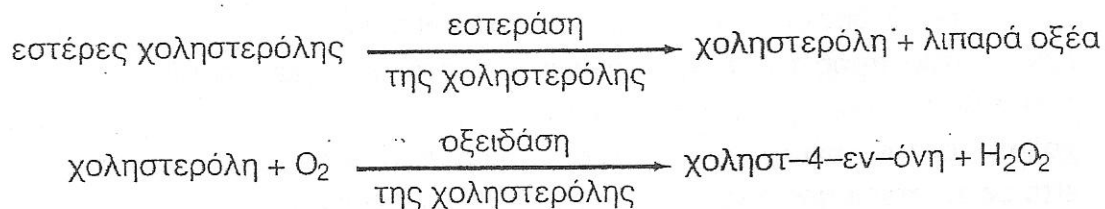
Η χοληστερόλη προσδιορίζεται ποσοτικά, είτε με ενζυμικές, είτε με χημι-

κές μεθόδους. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι είτε άμεσοι, δηλαδή εφαρμόζονται κατευθείαν σε όρο ή πλάσμα, είτε έμμεσοι, δηλαδή προηγείται κατεργασία του δείγματος π.χ. εκχύλιση ή άλλη μέθοδος απομόνωσης της χοληστερόλης. Οι άμεσες μέθοδοι, οι οποίες είναι πιο απλές και πιο εύκολες να χρησιμοποιηθούν για αναλύσεις πολλών δειγμάτων, περιλαμβάνουν χημικές διεργασίες που χρησιμοποιούν άλατα σιδήρου (αντίδραση Salkowski) και το αντιδραστήριο Liebermann-Burchardt καθώς επίσης και ενζυμικά συστήματα.

Θα πρέπει να αναφερθεί ότι στις άμεσες μεθόδους παρατηρούνται θετικές ή αρνητικές αποκλίσεις στις τιμές χοληστερόλης όταν τα δείγματα είναι π.χ. αιμολυμένα, ικτερικά κλπ. καθώς επίσης και στις περιπτώσεις εκείνες όπου συνυπάρχουν άλλες στερόλες με 3-β υδροξυ-ομάδα και διπλό δεσμό στη θέση 4-5 ή 5-6. Τα προβλήματα μειώνονται όταν η χοληστερόλη παραλαμβάνεται από το δείγμα με εκχύλιση. Κλασικές μεθόδους στην κατηγορία αυτή, είναι η Abell-Kendall/Levey-Brodie μέθοδος και η ημι-αυτοματοποιημένη μέθοδος LBC.

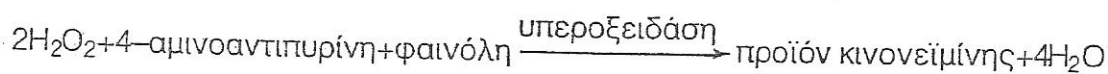
Στις χημικές μεθόδους, η χοληστερόλη αντιδρά (ως τυπική αλκοόλη) με ισχυρά, πυκνά οξέα, τα δε προϊόντα της αντίδρασης είναι έγχρωμες ενώσεις. Σχεδόν στις περισσότερες διεργασίες, το οξικό οξύ και ο οξικός ανυδρίτης χρησιμοποιούνται ως διαλύτες και ως αφυδατικά μέσα, το δε θειικό οξύ χρησιμοποιείται σαν αντιδραστήριο αφυδάτωσης και οξειδωσης. Η αντίδραση επιταχύνεται με την προσθήκη διαφόρων μεταλλικών ιόντων. Τα γενικά στάδια μίας από τις πιο συνηθισμένες χημικές διεργασίες, της αντίδρασης Liebermann-Burchardt, εμφανίζονται στο σχήμα 74.

Στα κλινικά εργαστήρια, οι χημικές μέθοδοι έχουν αντικατασταθεί από τις ενζυμικές διεργασίες. Τα αρχικά στάδια, τα οποία είναι κοινά σε όλες τις ενζυμικές διεργασίες, είναι η υδρόλυση των εστέρων χοληστερόλης στον C-3, με σκοπό την παραλαβή ελεύθερης χοληστερόλης και το στάδιο οξειδωσής της με τη βοήθεια του οξυγόνου προς σχηματισμό υπεροξειδίου του υδρογόνου.

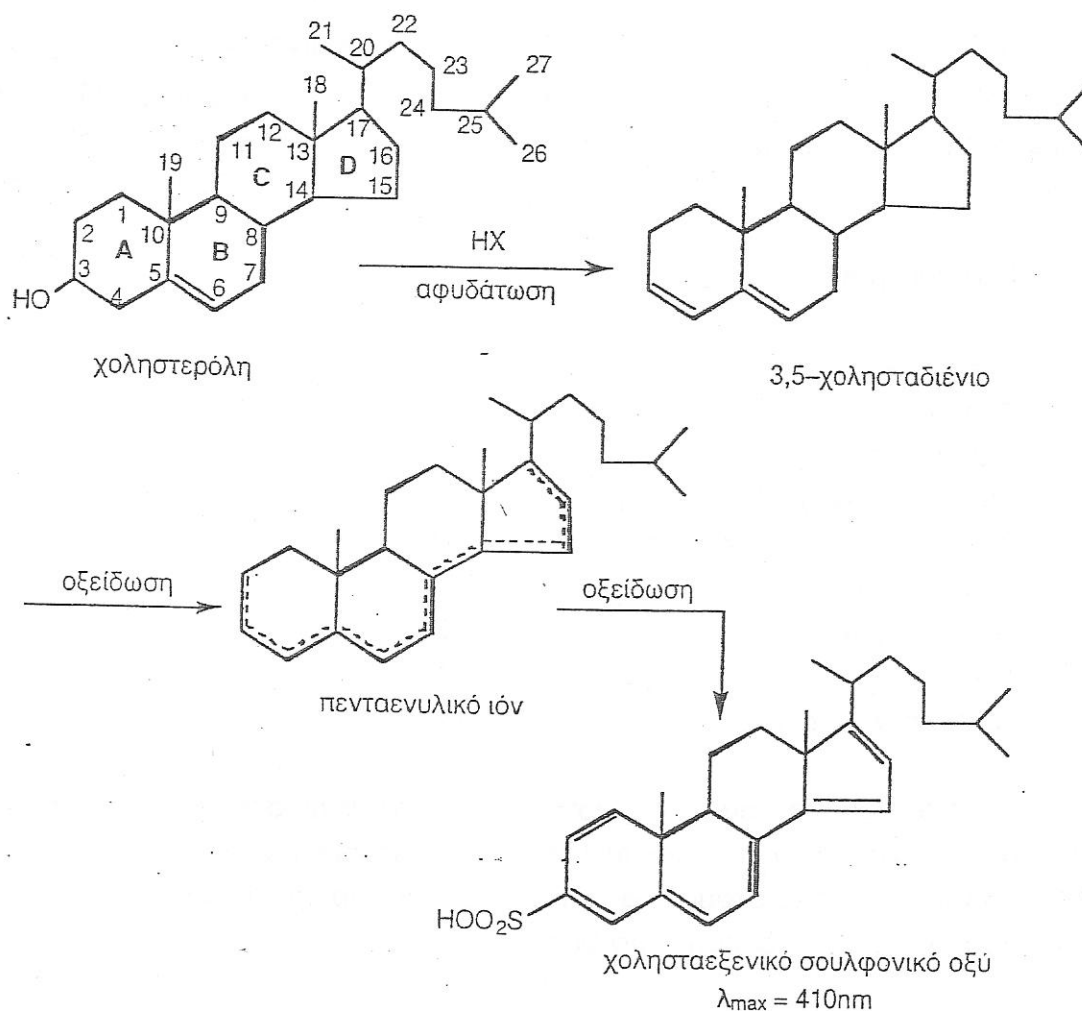
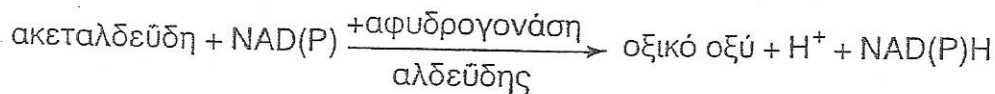
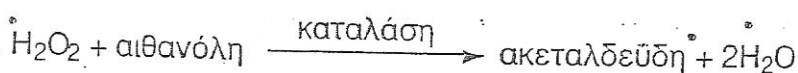


Η διαφοροποίηση των ενζυμικών μεθόδων, έγκειται στο ότι σε κάποιες από αυτές, μετριέται το ποσό του O_2 που καταναλώνεται με αμπερόμετρο ενώ στις πιο συνηθισμένες μεθόδους προσδιορίζεται ποσοτικά το H_2O_2 που παράγεται. Ο προσδιορισμός του H_2O_2 βασίζεται στο σχηματισμό, είτε έγχρωμου οξειδωμένου προϊόντος, είτε ανηγμένου νουκλεοτιδίου πυριδίνης.

Στην παρακάτω αντίδραση το προϊόν κινονειμίνης απορροφά στα 510nm.



Στις αντιδράσεις με το νουκλεοτίδιο πυριδίνης η αύξηση στην απορρόφηση μετρίεται στα 340nm.



Σχήμα 74: Γενικά στάδια της αντίδρασης Liebermann-Burchardt.

Τέλος η χοληστερόλη και οι εστέρες της μπορούν να απομονωθούν και να προσδιοριστούν με διάφορες τεχνικές χρωματογραφίας όπως αέρια χρωματο-

γραφία (GC, gas chromatography) και υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

Πειραματικό Μέρος

Προσδιορισμός ολικής χοληστερόλης με ενζυμική μέθοδο

Αρχή της μεθόδου

Οι εστέρες χοληστερόλης υδρολύονται ποσοτικά και μετατρέπονται σε ελεύθερη χοληστερόλη και λιπαρά οξέα, με τη δράση της εστεράσης της χοληστερόλης. Παρουσία οξυγόνου, η ελεύθερη χοληστερόλη οξειδώνεται στη συνέχεια από την οξειδάση της χοληστερόλης σε χοληστ-4-ενε-3-όνη και H_2O_2 . Το H_2O_2 αντιδρά με τη φαινόλη και την 4-αμινοφαιναζόνη παρουσία υπεροξειδάσης και σχηματίζεται έγχρωμο προϊόν κινονεϊμίνης (Trinder's reaction). Η ένταση του χρώματος που σχηματίζεται είναι ανάλογη της συγκέντρωσης χοληστερόλης και μετριέται φωτομετρικά από τα 480 έως τα 520nm.

Αντιδραστήρια:

1. Ρυθμιστικό φωσφορικών	50mM
Φαινόλη	5mM
χολικό νάτριο	5mM
2. Εστεράση της χοληστερόλης	200UI
Οξειδάση της χοληστερόλης	200UI
Υπεροξειδάση	1300UI
4-αμινοφαιναζόνη	0.4mM
ATP	0.18mM
3. πρότυπο χοληστερόλης	2mg/mL

Το περιεχόμενο του αντιδραστήριου 2 διαλύεται στο περιεχόμενο του αντιδραστήριου 1 και προκύπτει το αντιδραστήριο 4 που παραμένει σταθερό για 50 ημέρες στους 2–8°C. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης πρέπει να είναι προστατευμένο από φως.

Εκτέλεση:

1. Αριθμούνται 5 δοκιμαστικοί σωλήνες από τους οποίους οι 3 (Σ_1 – Σ_3) θα χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς, ο 1 δοκιμαστικός σωλήνας (T) θα χρησιμοποιηθεί για το “τυφλό” και ο τελευταίος

ταίος για το άγνωστο δείγμα (Δ).

2. Σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται ποσότητα 1mL αντιδραστηρίου 4. Στους δοκιμαστικούς σωλήνες που θα χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς προστίθεται ποσότητα, 5, 10, 20μL από το πρότυπο διάλυμα χοληστερόλης. Στο δοκιμαστικό σωλήνα του αγνώστου δείγματος προστίθεται ποσότητα 15μL από το προς μέτρηση δείγμα. Συμπληρώνονται μέχρι σταθερού όγκου οι δοκιμαστικοί σωλήνες με την κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού.
3. Επωάζονται όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες στους 37°C για 5min ή στους 20-25°C για 15min. Το χρώμα που εμφανίζεται, είναι σταθερό για 90min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Φωτομετρούνται τα δείγματα στα 520nm.

Αποτελέσματα – Υπολογισμοί:

1. Κατασκευάζεται Πίνακας με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα και γίνεται το διάγραμμα πορείας της άσκησης.
2. Κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς $A=f(\text{mg χοληστερόλης/mL})$.
3. Προσδιορίζεται η συγκέντρωση χοληστερόλης του δείγματος.

Παρατήρηση:

Η γραμμικότητα της μεθόδου ισχύει μέχρι τιμή συγκέντρωσης χοληστερόλης ίση με 5mg/mL εφόσον χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό, ποσότητα δείγματος περίπου 10μL. Πυκνότερα δείγματα αραιώνονται κατάλληλα με διάλυμα φυσιολογικού ορού.

8. Προσδιορισμός τριγλυκεριδίων

Θεωρητικό Μέρος

Ο προσδιορισμός των τριγλυκεριδίων του ορού, όπως αναφέρθηκε στον προσδιορισμό της χοληστερόλης, γίνεται σε βάση ρουτίνας, στα κλινικά εργαστήρια. Τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στον ορό, επηρεάζονται από πολλούς παράγοντες όπως η ηλικία και το φύλο. Στον ακόλουθο Πίνακα (Πίνακας V) παρουσιάζονται τα ανώτατα φυσιολογικά όρια για τα επίπεδα των τριγλυκεριδίων στον ορό. Πρέπει όμως να αναφερθεί ότι και η αξιολόγηση της τιμής των τριγλυκεριδίων σε σύγκριση με τους πίνακες αναφοράς, είναι ένα δύσκολο πρόβλημα.

Τα δείγματα που θα χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό των τριγλυκεριδίων πρέπει να προέρχονται από άτομα που θα είναι νηστικά για 10 με 14 ώρες. Για τον προσδιορισμό μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε ορός είτε πλάσμα με EDTA. Στην δεύτερη περίπτωση, η τιμή τριγλυκεριδίων πρέπει να πολλαπλασιασθεί με 1.03 για να μετατραπεί στην ισοδύναμη τιμή του ορού. Τα δείγματα πρέπει να είναι αποθηκευμένα στους 4°C πριν την ανάλυση.

Πίνακας V: Ανώτατο φυσιολογικό όριο για τα επίπεδα τριγλυκεριδίων (σε mg/100mL) στον ορό:

<u>Ηλικία</u>	<u>Άνδρες</u>	<u>Γυναίκες</u>
0-19	103	121
20-29	157	100
30-39	182	110
40-49	193	122
50-59	197	134
≥ 60	199	147

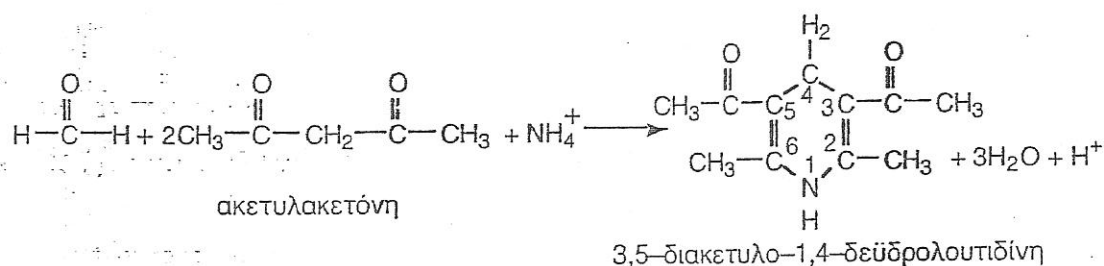
Στην θερμοκρασία των 4°C, τα δείγματα μπορούν να παραμείνουν για 3 ημέρες, στους -20°C για αρκετές εβδομάδες ενώ όταν αποθηκεύονται για μεγάλο χρονικό διάστημα η κατάλληλη θερμοκρασία είναι -70°C. Δείγματα λιπιδαιμικών ασθενών μπορεί να χρειασθούν επώαση στους 37°C και έντονη ανάδευση πριν την ανάλυση, ειδικά όταν έχουν ψυχθεί.

Για τον προσδιορισμό των τριγλυκεριδίων έχουν αναπτυχθεί διάφορες χημικές ενζυμικές μέθοδοι, οι αρχές των οποίων συνοψίζονται στον Πίνακα VI.

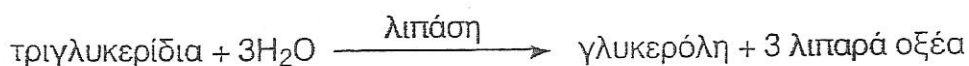
Στις χημικές μεθόδους απαιτείται εκχύλιση του πλάσματος για παραλαβή των τριγλυκεριδίων και για διαχωρισμό τους από τις πρωτεΐνες. Στη συνέχεια το εκχύλισμα κατεργάζεται με ένα προσροφητικό υλικό για την απομάκρυνση των φωσφολιποειδών καθώς και άλλων ενώσεων που παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό (π.χ. χλωροφορμικά εκχυλίσματα κατεργάζονται με πυριτικό οξύ, ισόπροπανολικά εκχυλίσματα με αλουμίνα). Μετά την απομόνωση και τον καθαρισμό, τα τριγλυκερίδια προσδιορίζονται, είτε με χημικές, είτε με ενζυμικές αντιδράσεις.

Στις χημικές αντιδράσεις, τα τριγλυκερίδια διασπώνται σε γλυκερόλη με αλκαλική υδρόλυση, η δε παραγόμενη γλυκερόλη διασπάται στη συνέχεια σε φορμαλδεΰδη με την επίδραση υπερϊωδικού νατρίου. Η φορμαλδεΰδη, είτε αντιδρά με μίγμα χρωμοτροπικού-θειικού οξέος, προς σχηματισμό προϊόντος που απορροφά στα 570nm, είτε κατεργάζεται με ακετυλακετόνη και οξικό αμμώνιο, προς παραγωγή φθορίζοντος προϊόντος (αντίδραση Hantzsch's), το

οποίο μπορεί να προσδιορισθεί, είτε φθορισμομετρικά, είτε φωτομετρικά.

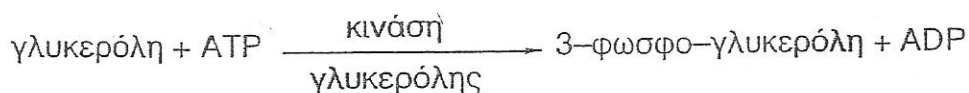


Στις ενζυμικές μεθόδους η υδρόλυση επιτυγχάνεται με τη χρήση της λιπάσης:



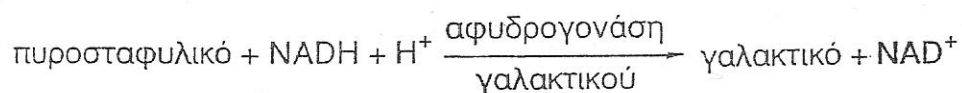
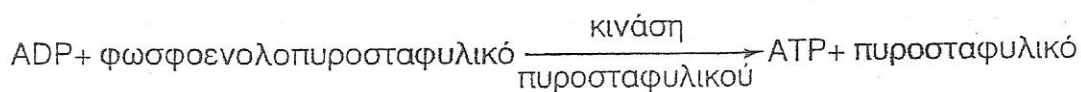
Στην παραπάνω περίπτωση πρέπει να χρησιμοποιηθεί και χολικό νάτριο (γαλακτωματοποιητής) για να επιτευχθεί η γαλακτωματοποίηση όλης της ποσότητας των τριγλυκεριδίων του δείγματος, αφού το ένζυμο δρα μόνο σε υπόστρωμα που βρίσκεται με τη μορφή γαλακτώματος.

Η γλυκερόλη που παράγεται από την υδρόλυση, μπορεί να προσδιορισθεί με διάφορες συζευγμένες ενζυμικές αντιδράσεις. Στις περισσότερες απ'αυτές τις αντιδράσεις, το πρώτο βήμα είναι η μετατροπή της γλυκερόλης σε 3-φωσφο-γλυκερόλη.



Το τελικό προϊόν των διαδοχικών συζευγμένων αντιδράσεων (αυτό που προσδιορίζεται ποσοτικά) είναι ανάλογο με το ποσό της γλυκερόλης, το οποίο είναι επίσης ανάλογο με το ποσό των τριγλυκεριδίων.

Σε κάποιες από τις μεθόδους το ADP που παράγεται από το πρώτο βήμα, χρησιμοποιείται για την παραγωγή πυροσταφυλικού οξέος, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ:

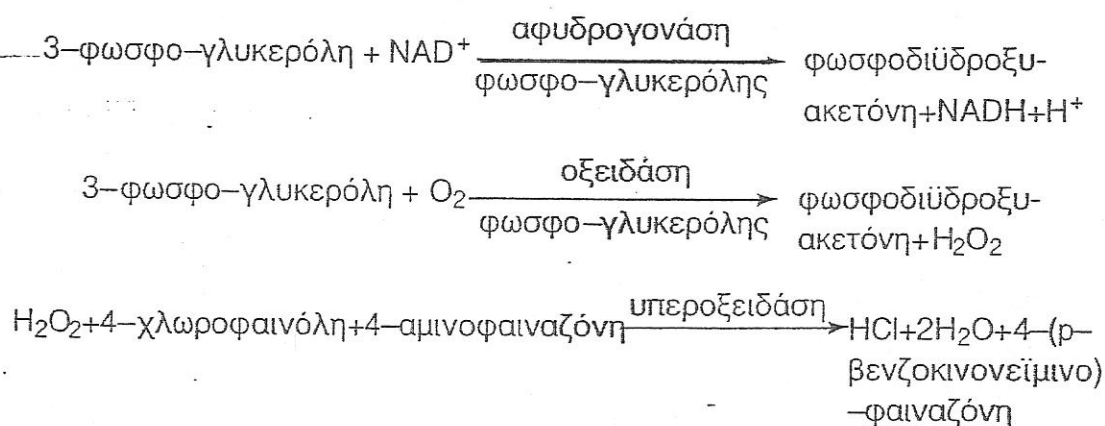


Πίνακας VI: Αρχή των μεθόδων ανάλυσης των τριγλυκεριδίων.

α/α Μεθόδου	Αρχή του προσδιορισμού
A	1. Εκχύλιση TGI με οργανικό διαλύτη Απομάκρυνση PL με προσρόφηση
	2. $\text{TGI} \xrightarrow{\text{ROH/OH}^-} \text{γλυκερόλη}$
	3. $\text{γλυκερόλη} + \text{IO}_4^- \longrightarrow \text{HCHO} + \text{HCOOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{IO}_3^-$
	4. $\text{HCHO} + \text{χρωμοτροπικό οξύ} + \text{H}_2\text{SO}_4 \longrightarrow \text{χρωμοφόρο}$
B	1-3 όπως στη μέθοδο A
	4. $\text{HCHO} + \text{NH}_4^+ + \text{ακετυλακετόνη} \longrightarrow \text{3,5-διακετυλο-1,4 διϋδρολουτιδίνη (φθορίζον)}$
Γ	1-2 όπως στη μέθοδο A
	3. $\text{γλυκερόλη} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{GK}} \text{3-φωσφο-γλυκερόλη} + \text{ADP}$
	4. $\text{3-φωσφο-γλυκερόλη} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{G-3-PD}} \text{φωσφοδιϋδροξυ-ακετόνη} + \text{NADH} + \text{H}^+$
	1-3 όπως στη μέθοδο Γ
Δ	4. $\text{ADP} + \text{φωσφοενολοπυροσταφυλικό} \xrightarrow{\text{PK}} \text{ATP} + \text{πυροσταφυλικό}$
	5. $\text{πυροσταφυλικό} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LD}} \text{γαλακτικό} + \text{NAD}^+$
E	1. $\text{TGL} \xrightarrow{\text{λιπάση}} \text{γλυκερόλη}$
	2-5 όπως στη μέθοδο Δ ή 2-4 όπως στη μέθοδο Γ
ΣΤ	1-2 όπως στη μέθοδο A ή 1 όπως στη μέθοδο E
	$\text{γλυκερόλη} + \text{NAD}^+ \xrightarrow[\text{γλυκερόλης}]{\text{αφυδρογονάση}} \text{διϋδροξυακετόνη} + \text{NADH} + \text{H}^+$
Z	1. $\text{TGL} \xrightarrow{\text{λιπάση}} \text{γλυκερόλη}$
	2. $\text{γλυκερόλη} + \text{O}_2 \xrightarrow[\text{γλυκερόλης}]{\text{οξειδάση}} \text{διϋδροξυακετόνη} + \text{H}_2\text{O}_2$
	3. $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{παράγωγο φαινόλης} + \text{4-αμινοαντιπυρίνη} \xrightarrow{\text{HPO}} \text{χρωμοφόρο}$

Συντμήσεις: TGI:τριγλυκερίδια, GK:κινάση λιπάσης, G-3-PD:αφυδρογονάση 3-φωσφογλυκερόλης, PK:κινάση πυροσταφυλικού, LD:αφυδρογονάση γαλακτικού, HPO:οξειδάση 3-φωσφογλυκερόλης.

Στην τελευταία αντίδραση η κατανάλωση της ανηγμένης μορφής του νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου παρακολουθείται φωτομετρικά στα 340nm. Σε άλλες μεθόδους χρησιμοποιείται η 3-φωσφο-γλυκερόλη, η οποία μετατρέπεται σε φωσφοδιϋδροξυακετόνη, είτε με σύγχρονη αναγωγή του NAD^+ , είτε με παραγωγή H_2O_2 , το οποίο αντιδρά στη συνέχεια παρουσία υπεροξειδάσης, προς σχηματισμό κόκκινου κινονεϊμικού προϊόντος, που φωτομετρείται στα 505nm.



Η παρουσία ελεύθερης γλυκερόλης στα δείγματα, αποτελεί πηγή σφάλματος τόσο στις χημικές όσο και στις ενζυμικές μεθόδους. Επίσης, η συγκέντρωση της ελεύθερης γλυκερόλης μπορεί να αυξηθεί στο πλάσμα όταν υπάρχουν υψηλές συγκεντρώσεις τριγλυκεριδίων, σε δείγματα που δεν έχουν συλλεγεί πρόσφατα. Η παρουσία γλυκερόλης στη σύσταση αρκετών προϊόντων, που βρίσκονται σε εργαστηριακούς χώρους, μπορεί επίσης να προκαλέσει σφάλμα στις μετρήσεις. Το τελευταίο μπορεί να αναιρεθεί με τη χρήση του "τυφλού".

Τέλος, τα τριγλυκερίδια μπορούν να απομονωθούν και να προσδιορισθούν με διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές, όπως η HPLC.

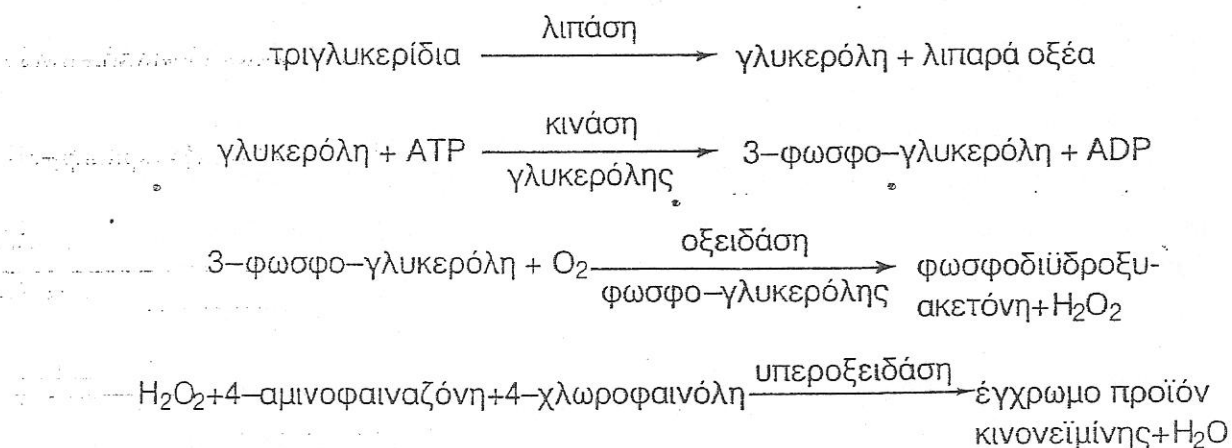
Πειραματικό Μέρος

Προσδιορισμός τριγλυκεριδίων με ενζυμική μέθοδο

Αρχή της μεθόδου

Τα τριγλυκερίδια υδρολύονται με την επίδραση λιπάσης, σε γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα. Η γλυκερόλη συμμετέχει σε μια σειρά συζευγμένων

ενζυμικών αντιδράσεων, η τελευταία από τις οποίες οδηγεί στη δημιουργία ενός σταθερού-έγχρωμου προϊόντος της κινονείμινης που απορροφά στα 510nm. Οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι οι ακόλουθες:



Αντιδραστήρια:

1. Ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.5	50mmoles/L
4-χλωρο-φαινόλη	5mmoles/L
2. Λιποπρωτεϊνική λιπάση	> 120.000U/L
Κινάση γλυκερόλης	> 1.200U/L
Οξειδάση της 3-φωσφο-γλυκερόλης	> 2.500U/L
Υπεροξειδάση	> 400U/L
4-αμινοφαιναζόνη	0.7mmoles/L
ATP	0.18mmoles/L
3. Πρότυπο τριγλυκεριδίων	2mg/mL
	2.26mmoles/L

Το περιεχόμενο του αντιδραστήριου 2 διαλύεται στο περιεχόμενο του αντιδραστήριου 1 και προκύπτει το αντιδραστήριο 4 που παραμένει σταθερό για 40 ημέρες στους 2-8°C. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης πρέπει να είναι προστατευμένο από φως.

Εκτέλεση:

- Αριθμούνται 5 δοκιμαστικοί σωλήνες από τους οποίους οι 3 (Σ_1 - Σ_3) θα χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς, ο 1 δοκιμαστικός σωλήνας (T) θα χρησιμοποιηθεί για το "τυφλό" και ο τελευταίος για το άγνωστο δείγμα (Δ).

2. Σε όλους τους δοκιμαστικούς σωλήνες προστίθεται ποσότητα 1mL αντιδραστηρίου 4. Στους δοκιμαστικούς σωλήνες που θα χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης αναφοράς προστίθεται ποσότητα, 5, 10, 20μL από το πρότυπο διάλυμα τριγλυκεριδίων. Στο δοκιμαστικό σωλήνα του αγνώστου δείγματος προστίθεται ποσότητα 15μL από το προς μέτρηση δείγμα. Συμπληρώνονται μέχρι σταθερού όγκου οι δοκιμαστικοί σωλήνες με την κατάλληλη ποσότητα απιονισμένου νερού.
3. Επωάζονται όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες στους 37°C για 5min ή στους 20-25°C για 15min. Το χρώμα που εμφανίζεται είναι σταθερό για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Φωτομετρούνται τα δείγματα στα 520nm.

Αποτελέσματα – Υπολογισμοί:

1. Κατασκευάζεται Πίνακας με τις ποσότητες των αντιδραστηρίων για κάθε δοκιμαστικό σωλήνα καθώς και το διάγραμμα πορείας της άσκησης.
2. Κατασκευάζεται η πρότυπη καμπύλη αναφοράς $A=f(\text{mg τριγλυκεριδίων/mL})$.
3. Προσδιορίζεται η συγκέντρωση τριγλυκεριδίων του δείγματος άγνωστης συγκέντρωσης.

Παρατήρηση:

Η μέθοδος είναι γραμμική μέχρι τιμή συγκέντρωσης τριγλυκεριδίων ίση με 5mg/mL εφόσον χρησιμοποιηθεί ποσότητα δείγματος περίπου 10μL. Πιο πυκνά δείγματα αραιώνονται κατάλληλα με διάλυμα φυσιολογικού ορού.