

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΡΧΩΝ ΕΝΟΡΓΑΝΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 1

**Προσδιορισμός Γλυκόζης με τη μέθοδο Προσθήκης
Γνωστής Ποσότητας
(standard addition method)**

Σημασία προσδιορισμού γλυκόζης στο αίμα

Η συγκέντρωση σακχάρου στο αίμα ή το επίπεδο γλυκόζης στο αίμα είναι η ποσότητα της γλυκόζης στο αίμα των ανθρώπων και των ζώων.

Η γλυκόζη είναι η απλή ζάχαρη (μονοσακχαρίτης) και αποτελεί την πρωταρχική πηγή ενέργειας για τους ιστούς του σώματος. Προσλαμβάνεται από την τροφή και μπαίνει στην κυκλοφορία του αίματος κατά τη διαδικασία της πέψης στο έντερο. Κατά τη διαδικασία της πέψης η ποσότητα της γλυκόζης στο αίμα αυξάνεται σε ανεπιθύμητα για τον οργανισμό επίπεδα.

Σε αυτό το στάδιο επεμβαίνει η λειτουργία της μεταβολικής ομοιόστασης για να αποθηκεύσει τη γλυκόζη, που δεν χρησιμοποιείται άμεσα, στο ήπαρ και στους σκελετικούς μύες έτσι ώστε να κατεβάσει τα επίπεδα σε επιθυμητά για τον οργανισμό επίπεδα.

Τα επιθυμητά επίπεδα για το ανθρώπινο σώμα, αλλά και με μικροδιαφορές από άτομο σε άτομο, κυμαίνονται μεταξύ 72 και 110 mg ανά 100 ml (dl) αίματος. Μετά τη λήψη τροφής το επίπεδο γλυκόζης μπορεί να αυξηθεί πάνω από τα 110mg αλλά σε δύο με τρεις ώρες επανέρχεται στα όρια του με την αποθήκευση της γλυκόζης. Σταθερά χαμηλά ή υψηλά επίπεδα είναι ένδειξη πάθησης.

Συχνή πάθηση είναι ο σακχαρώδης διαβήτης

Η Φασματοφωτομετρία UV-Vis

Στην πράξη το φως που χρησιμοποιείται στο φασματοφωτόμετρο επιλέγεται να είναι συγκεκριμένου μήκους κύματος λ . Όπως ήδη γνωρίζουμε, το ορατό φως αποτελεί τμήμα ενός μεγάλου αριθμού ηλεκτρομαγνητικών ακτινοβολιών που καλύπτουν ένα πολύ μεγάλο φάσμα μηκών κύματος. Το φάσμα του φωτός που αξιοποιείται στα βιοϊατρικά εργαστήρια, μπορεί να διακριθεί σε δύο περιοχές:

1. στην υπεριώδη περιοχή (ultraviolet ή UV) που είναι αόρατη στον οφθαλμό, με μήκος κύματος 185 -380 nm,
2. στην ορατή περιοχή (visible ή Vis) που είναι ορατή στον οφθαλμό, με μήκος κύματος ακτινοβολίας 380 -780 nm.

Τα πιο συνηθισμένα φασματόμετρα που συναντώνται στα βιοϊατρικά εργαστήρια είναι τα φασματοφωτόμετρα ορατής-υπεριώδους ακτινοβολίας, που χρησιμοποιούν τα μήκη κύματος 180 -780 nm.

Το **φάσμα της μετρούμενης ουσίας** δίνεται συνήθως ως διάγραμμα της απορρόφησης συναρτήσει του μήκους κύματος,

Η Βαθμονόμηση των οργάνων

Συχνά ο όρος «Βαθμονόμηση» συγχέεται με τον όρο «Διακρίβωση», επειδή ο αγγλικός όρος είναι ο ίδιος «Calibration».

Η βαθμονόμηση (calibration) ενός οργάνου, είναι μια απαραίτητη διαδικασία για τον έλεγχο της αξιοπιστίας του οργάνου (εκτός λίγων περιπτώσεων, π.χ. σταθμική ανάλυση και κουλομετρία).

Για να γίνει βαθμονόμηση πρέπει να υπάρχει αναμφισβήτητη εμπειρική ή θεωρητική σχέση μεταξύ αναλυτικής παραμέτρου (σήματος) και συγκεντρώσεως ή ποσότητας (x).

Παραδείγματα

Φασματοφωτομετρία (Νόμος Lambert – Beer):

$$A \text{ (απορρόφηση)} = \epsilon b C$$

Φλογοφασματομετρία εκπομπής:

$$P \text{ (ισχύς εκπεμπόμενης ακτινοβολίας)} = k C$$

Υγρή και Χρωματογραφία:

$$A \text{ (εμβαδόν κορυφής)} = k C$$

Η βαθμονόμηση είναι η διαδικασία ρύθμισης των παραμέτρων ενός οργάνου, ώστε το αποτέλεσμα μιας εξέτασης - παραμέτρου για ένα συγκεκριμένο δείγμα (βαθμονομητής) να βρεθεί εντός ενός αποδεκτού εύρους τιμών.

Η Βαθμονόμηση των Ενόργανων μεθόδων

Όλοι οι τύποι αναλυτικών μεθόδων, με δύο εξαιρέσεις (σταθμική ανάλυση και κουλομετρία), απαιτούν βαθμονόμηση.

Η καμπύλη βαθμονόμησης (calibration curve), κατασκευάζεται με τη βοήθεια πρότυπων διαλυμάτων με ακριβώς γνωστές συγκεντρώσεις του αναλύτη (προσδιοριζόμενη ουσία). Τα διαλύματα αυτά μετρούνται (π.χ. φωτομετρούνται) και καταγράφεται η ένδειξη του οργάνου (π.χ. P). Με τις μετρήσεις που λαμβάνονται σχεδιάζεται διάγραμμα της ένδειξης του οργάνου (P) ως προς τη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας (C). Συνήθως τα διαγράμματα που προκύπτουν είναι γραμμικά σε μια αρκετά μεγάλη περιοχή συγκεντρώσεων (δυναμική περιοχή - γραμμικότητα).

1. Η καμπύλη Αναφοράς (ή Πρότυπη καμπύλη)

Η κατασκευή της καμπύλης αναφοράς πραγματοποιείται με τα ακόλουθα βήματα:

1. Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα του μετρούμενου συστατικού, κατά το δυνατόν παρόμοιας συστάσεως με τα διαλύματα των προς προσδιορισμό δειγμάτων στη χρήσιμη αναλυτική περιοχή, και μετρούνται οι τιμές της αναλυτικής παραμέτρου.
2. Από τις μετρήσεις των πρότυπων διαλυμάτων κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς, δηλαδή γραφική παράσταση της αναλυτικής παραμέτρου (P) ως προς συγκέντρωση (ή ποσότητα συστατικού) των προτύπων διαλυμάτων.

2. Η μέθοδος Προσθήκης Γνωστής Ποσότητας (standard addition method)

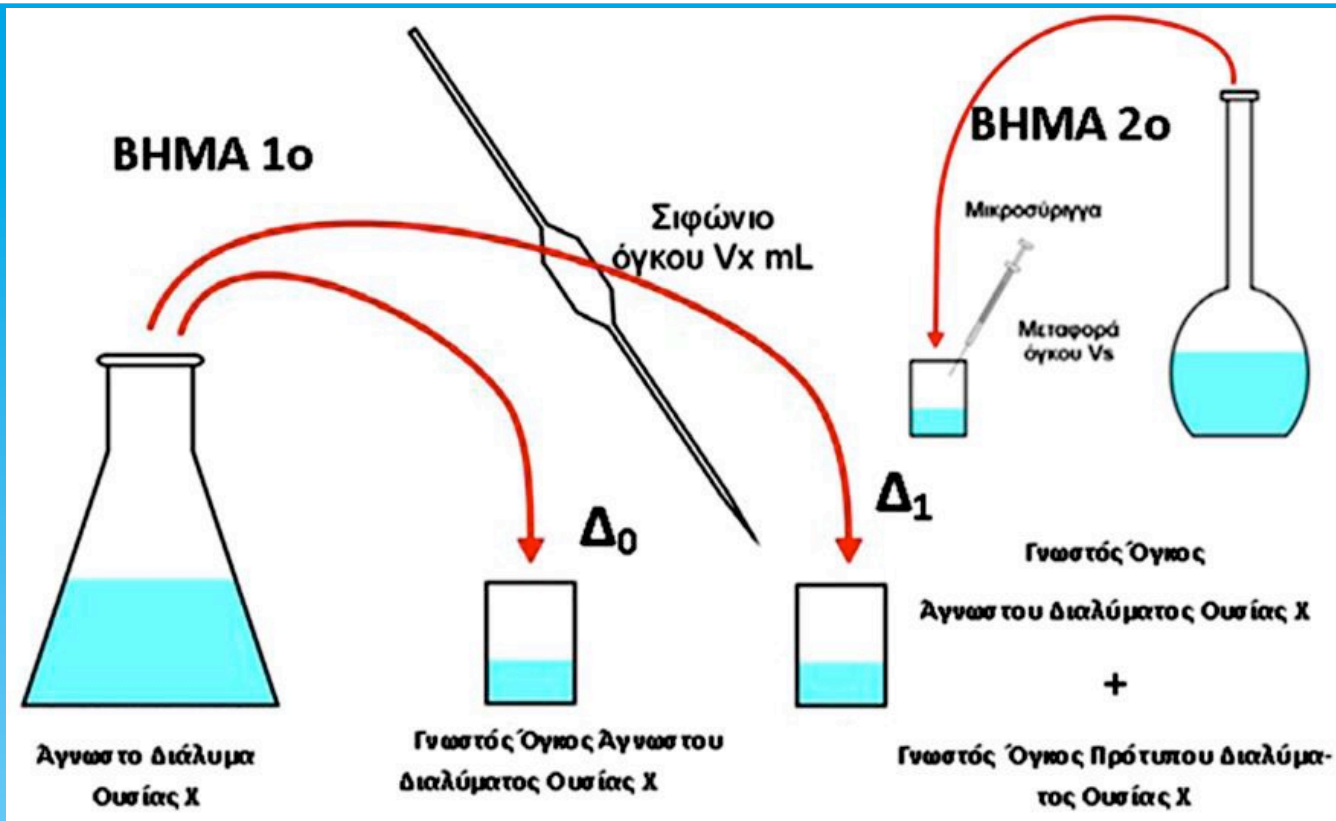
Εφαρμόζεται στις περιπτώσεις στις οποίες το μητρικό υλικό του δείγματος ασκεί μεγάλη επίδραση στη συνάρτηση βαθμονόμησης (στατιστικά διαφορετική κλίση b) και είναι αδύνατη η παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων παρόμοιας συστάσεως με τα διαλύματα των αγνώστων, είτε διότι είναι άγνωστη η σύστασή τους, ή ποικίλλει από δείγμα σε δείγμα, είτε επειδή υπάρχουν ουσίες που παρεμποδίζουν.

Πορεία

1. Κατά τη μέθοδο αυτή, μετρείται το διάλυμα του άγνωστου δείγματος
2. Μετρείται το ίδιο ή άλλο τμήμα του διαλύματος του δείγματος, στο οποίο έχει προστεθεί μικρός όγκος πρότυπου διαλύματος, ώστε να προκαλέσει αύξηση της συγκεντρώσεως του συστατικού κατά ΔC (θεωρείται μικρή ή αμελητέα η αύξηση του όγκου του διαλύματος ΔV).

Συνεπώς, χρησιμοποιείται σε εκείνες τις περιπτώσεις που ισχύουν τα παρακάτω:

1. Εάν η σχέση που συνδέει τη μετρούμενη φυσική/χημική παράμετρο P και τη συγκέντρωση C_X της ουσίας X που μας ενδιαφέρει να προσδιορίσουμε, είναι αναλογική, δηλ. εάν $P = k \cdot C_X$.
2. Εάν ο συντελεστής αναλογίας k επηρεάζεται έντονα από τη σύσταση του δείγματος (όλες οι άλλες ουσίες που υπάρχουν στο μετρούμενο διάλυμα) του δείγματός μας.
3. Εάν έχουμε να αναλύσουμε πολλά δείγματα με διαφορετική σύσταση ή έστω και ένα δείγμα αλλά με άγνωστη σύσταση, τότε είναι πρακτικά αδύνατη η χρησιμοποίηση καμπύλης αναφοράς.



Βήμα 1ο

Από το άγνωστο διάλυμα της ουσίας X, με άγνωστη συγκέντρωση C_x , λαμβάνουμε γνωστό όγκο V_x δείγματος με σιφώνιο (π.χ. $V_x = 20,00$ mL) και τον μεταφέρουμε σε δύο μικρά ποτήρια ζέσεως (Δ_0 και Δ_1), όπως φαίνεται στο Σχήμα.

Βήμα 2ο

Με ένα σιφώνιο μεταφέρουμε ακριβώς γνωστό όγκο V_s πρότυπου διαλύματος της ουσίας X, συγκέντρωσης C_s (π.χ. $C_s = 1000$ $\mu\text{g X/ mL}$) στο ποτήρι Δ_1 . Ο όγκος αυτός θα πρέπει να είναι πολύ μικρότερος [τυπικά το 1/100 ή ακόμη λιγότερο] από τον όγκο V_x (π.χ. $V_s = 0,100$ mL).

Βήμα 3ο

Μετρούμε με το όργανο τη φυσική/χημική παράμετρο P στο ποτήρι Δ_0 , όπως φαίνεται στην παραπάνω εικόνα. Στην περίπτωση μας, δεν ενδιαφέρει η τεχνική που χρησιμοποιούμε και το όργανο ανάλυσης, αρκεί να ισχύει η αναλογική σχέση μεταξύ του μετρούμενου μεγέθους και της συγκέντρωσης.

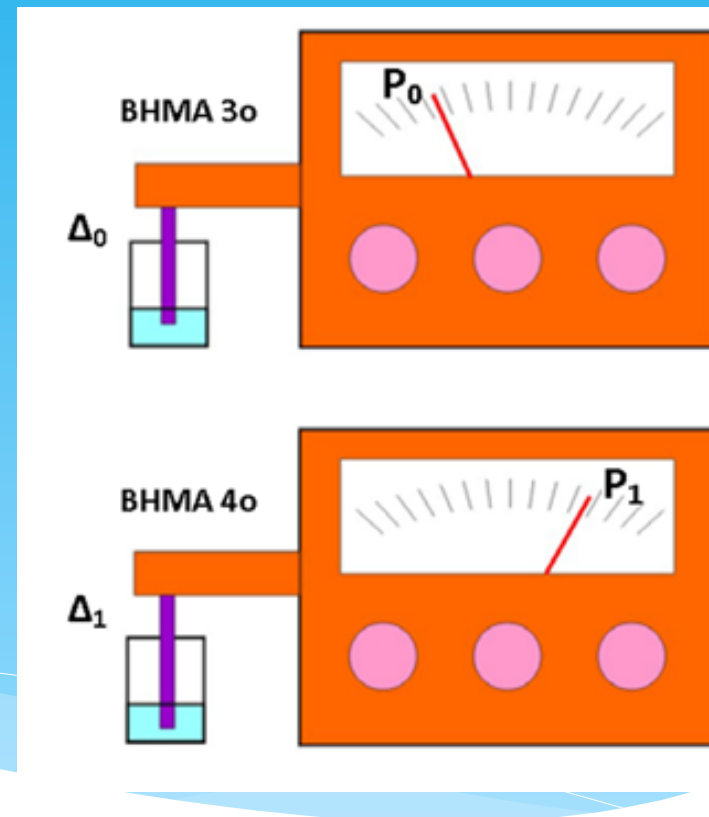
Έστω ότι βρίσκουμε $P_0 = 35,0$. (αγνώστου)

Βήμα 4ο

Μετρούμε με το όργανο την παράμετρο P στο ποτήρι Δ_1 . $P_1 > P_0$, αφού στο ποτηράκι Δ_1 βάλουμε επιπλέον ποσότητα της ουσίας X («γνωστή προσθήκη»). Έστω ότι τη βρίσκουμε $P_1 = 61,0$. (αγνώστου +γνωστής προσθήκης)

Επειδή Νπροτύπου μικρό, στο ποτήρι Δ_1 , η αραίωση ήταν αμελητέα και δεν διαταράξαμε τη σύσταση του δείγματος. Οπότε ο συντελεστής k είναι ο ίδιος και στις δύο μετρήσεις.

Η «γνωστή» αύξηση της συγκέντρωσης ΔC_1 υπολογίζεται εύκολα και ως εξής:



Η ποσότητα της X (n moles) που προσθέσαμε στο ποτήρι **Δ1** είναι $n = C_s \times V_s$.

Αυτή αραιώθηκε σε τελικό όγκο: $V_x + V_s$, οπότε η «γνωστή» αύξηση της συγκέντρωσης είναι:

$$\Delta C_1 = (C_s \times V_s) / (V_x + V_s)$$

και επειδή $V_x \gg V_s$, πρακτικά είναι: $\Delta C_1 = (C_s \times V_s) / V_x$

Επιπλέον

$$P_0 = k C_x \text{ (απορρόφηση αγνώστου)}$$

$$P_1 = k (C_x + \Delta C_1) \text{ (απορρόφηση αγνώστου+ γνωστής προσθήκης)}$$

Από τις οποίες με διαίρεση κατά μέλη και επίλυση ως προς C_x προκύπτει ότι:

$$C_x = [P_0 / (P_1 - P_0)] * \Delta C_1$$

Με τις τιμές που έχουμε δώσει σαν παράδειγμα θα είναι:

$$\Delta C_1 = (V_s \times C_s) / V_x = (0,100 \text{ mL}) \times (1000 \text{ } \mu\text{g X/mL}) / (20,00 \text{ mL}) = 5,00 \text{ } \mu\text{g X/mL}$$

Αντικαθιστώντας τις πειραματικές τιμές, υπολογίζουμε τελικά την άγνωστη συγκέντρωση της ουσίας X στο δείγμα:

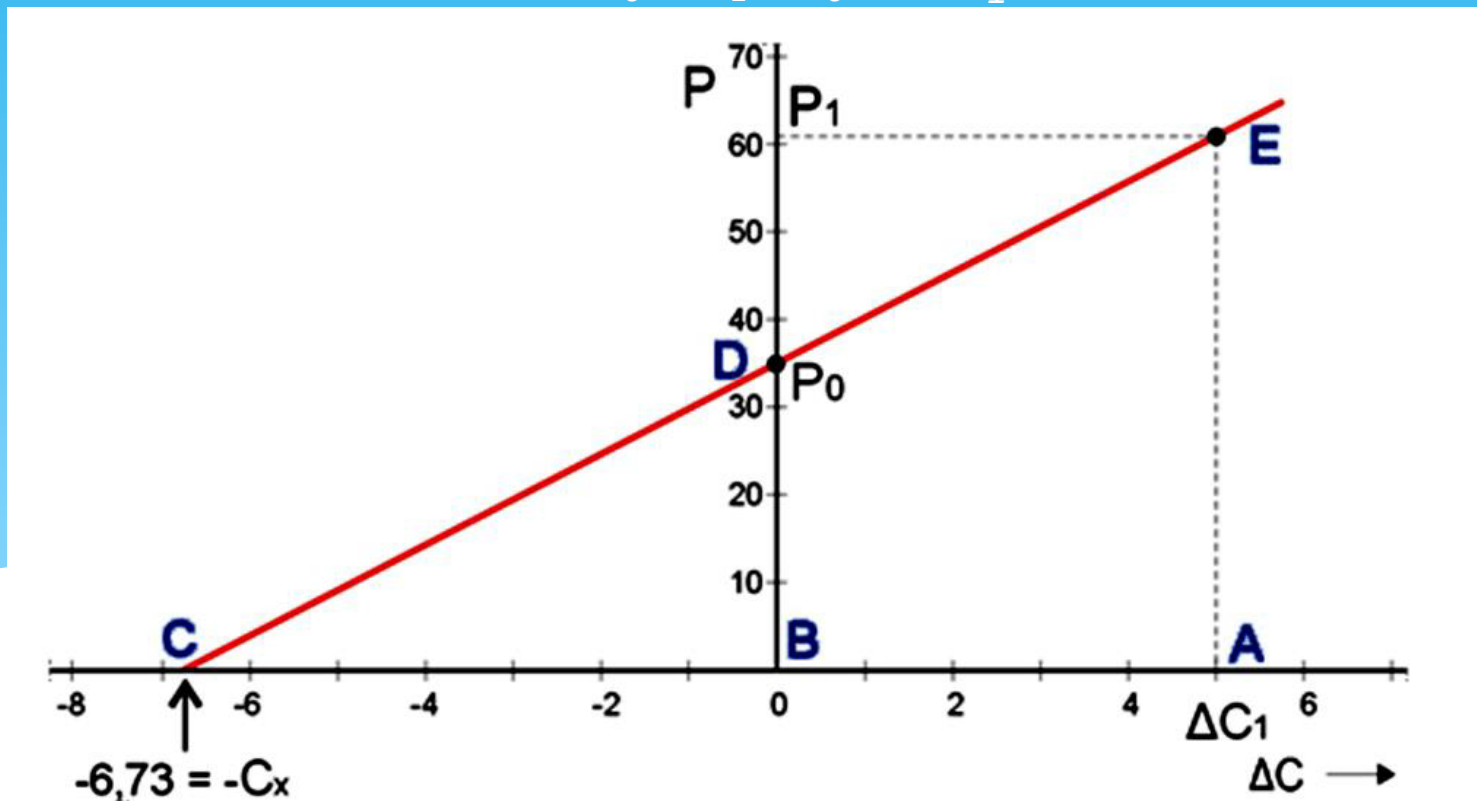
$$C_x = [35,0 / (61,0 - 35,0)] * (5,00 \text{ } \mu\text{g X/mL}) = 6,73 \text{ } \mu\text{g/mL}$$

Ο Γραφικός Υπολογισμός

Το παραπάνω αποτέλεσμα μπορεί να προκύψει και γραφικά ως εξής.

Σχεδιάζουμε ένα διάγραμμα των τιμών της μετρούμενης παραμέτρου P ως προς τις τιμές ΔC_x . Η προέκταση της ευθείας, η οποία ορίζεται από τα δύο πειραματικά σημεία $(P_0, 0)$ και $(P_1, \Delta C_1)$, θα τμήσει τον άξονα των τιμών ΔC_x σε σημείο (C) που αντιστοιχεί στην τιμή $-C_x$.

$$C_x = [P_0 / (P_1 - P_0)] * \Delta C_1$$

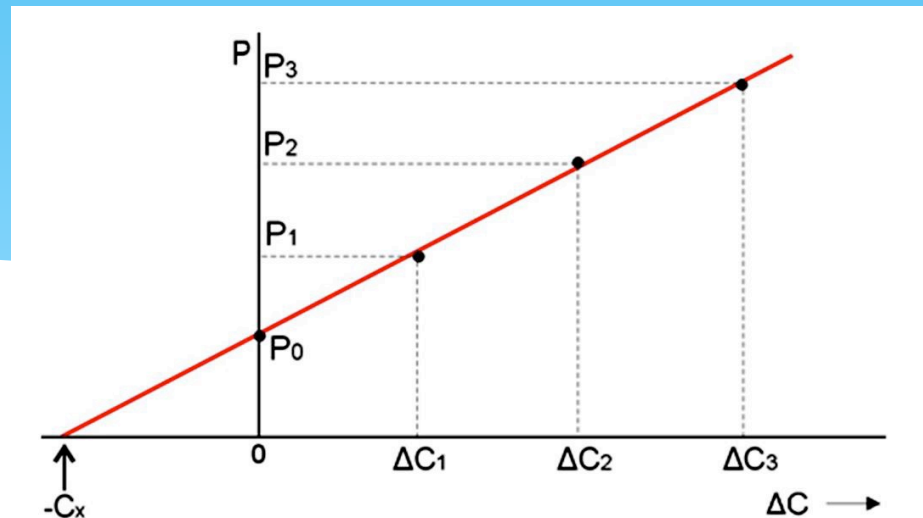


Η μέθοδος αυτή πρέπει να χρησιμοποιείται, όταν δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάποια καλύτερη τεχνική ποσοτικοποίησης. Γενικά, δεν είναι ιδιαίτερα ακριβής.

Η γνωστή προσθήκη ΔC_1 δεν πρέπει να είναι ούτε μεγάλη, ούτε μικρή. Ιδανικά θα πρέπει η ΔC_1 να είναι στην περιοχή $0,5 C_x < \Delta C_1 < 1,5 C_x$.

Η μέθοδος των Πολλαπλών Προσθηκών

Αντί μίας γνωστής προσθήκης πραγματοποιούνται 2 ή 3 γνωστές προσθήκες για καλύτερη ακρίβεια και κυρίως για να είμαστε βέβαιοι ότι όλες οι μετρούμενες τιμές της φυσικής παραμέτρου (P) βρίσκονται στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης βαθμονόμησης (όλα τα σημεία θα βρίσκονται σε μία ευθεία).



ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΕ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΓΡΑ

- Στην κλινική ανάλυση, ο προσδιορισμός μίας κλινικής παραμέτρου βασίζεται στην εκλεκτική απορρόφηση του προσδιοριζόμενου αναλύτη σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Αυτό ισχύει γιατί στην πλειοψηφία τους οι αναλύτες κλινικού ενδιαφέροντος δεν είναι έγχρωμοι. Έτσι, δεν απορροφούν στο ορατό (Vis), αλλά απλώς στο υπεριώδες (UV) και κυρίως μεταξύ 220 και 315 nm, όπου επίσης απορροφάται και πλήθος άλλων μορίων που περιέχονται σε κάποιο κλινικό δείγμα.
- Προκειμένου να αυξηθεί η εκλεκτικότητα του προσδιορισμού, η μεγάλη πλειοψηφία των αναλυτικών μεθόδων στην κλινική ανάλυση βασίζεται στον ποσοτικό προσδιορισμό μίας έγχρωμης ένωσης, που παράγεται όταν το προς ανάλυση κλινικό δείγμα αναμιγνύεται με κατάλληλα αντιδραστήρια, υπό καθορισμένες πειραματικές συνθήκες.
- **Συζευγμένη μέθοδος (coupled assay):** αυτή στην οποία μία δεύτερη αντίδραση επιστρατεύεται (συχνά ενζυμικά καταλυόμενη) το προϊόν μιας πρώτης αντίδρασης, όπου συμμετέχει ο αναλύτης ως αντιδρών, μετατρέπεται σε έγχρωμη ένωση.

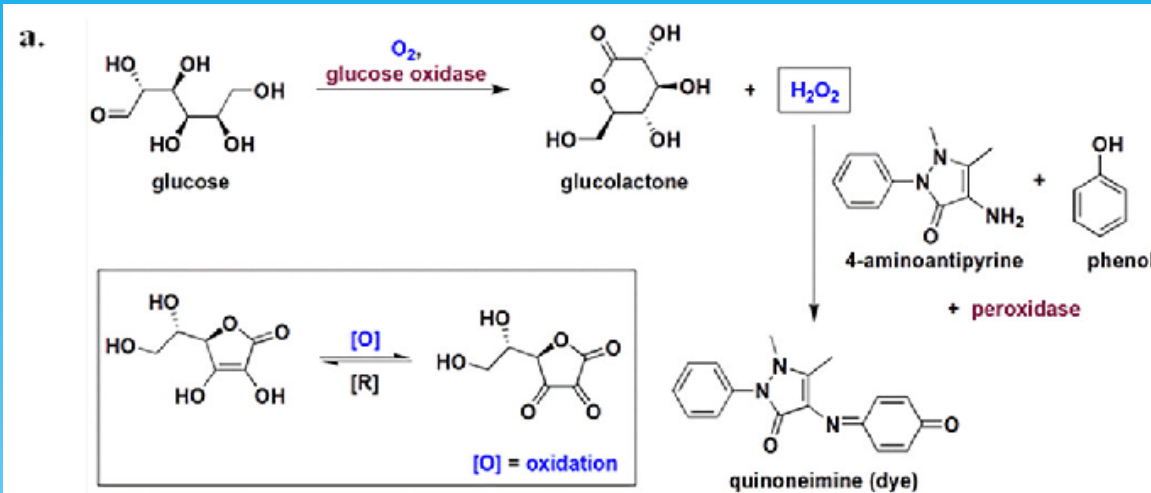
Αρχή της μεθόδου της οξειδάσης της γλυκόζης (Glucose oxidase)

Παρουσία του ενζύμου γλυκόζο οξειδάση (GOD) η γλυκόζη οξειδώνεται και παράγει H_2O_2 . Η αντίδραση του H_2O_2 με φαινολικό παράγωγο και 4-αμινοφαιναζόνη καταλύεται από το ένζυμο υπεροξειδάση (POD) και παράγει έγχρωμο προϊόν ερυθρού χρώματος. Η αύξηση της απορρόφησης στα 510 nm είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο δείγμα.

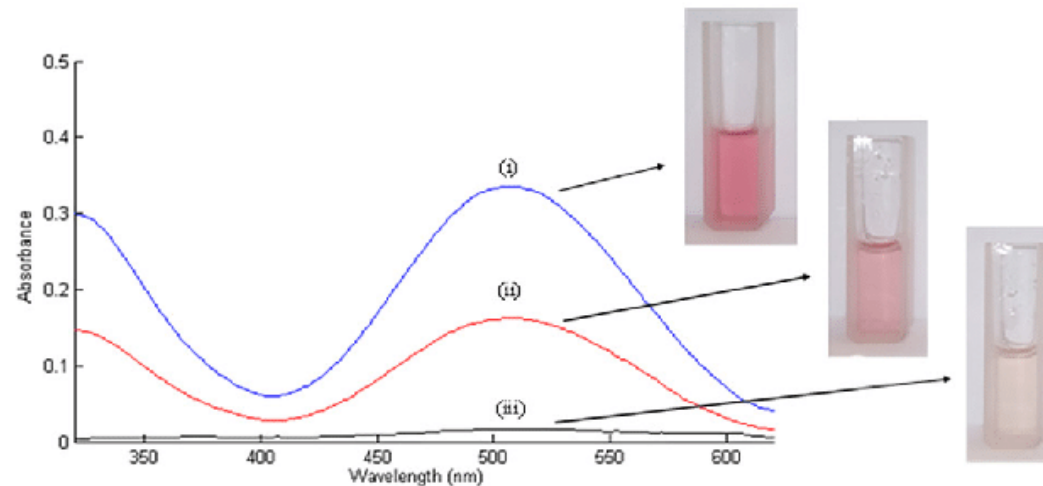
$\text{Γλυκόζη} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{GOD}} \text{Γλυκονικό οξύ} + 2\text{H}_2\text{O}_2$

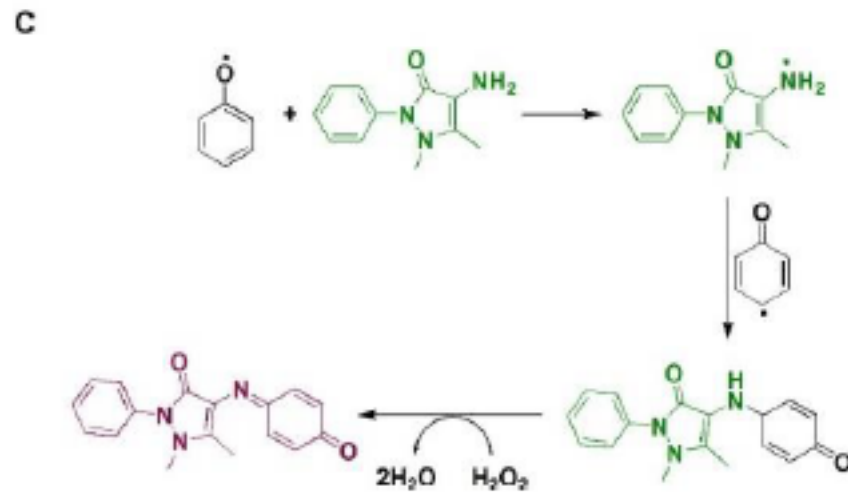
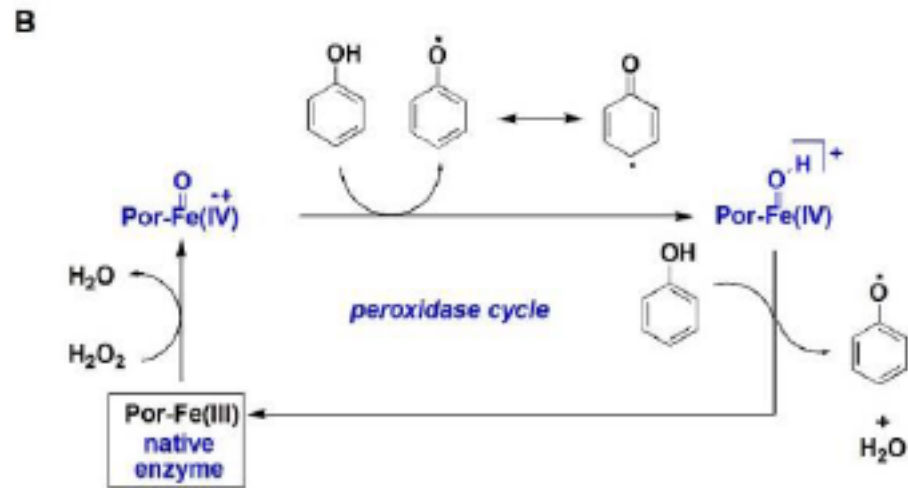
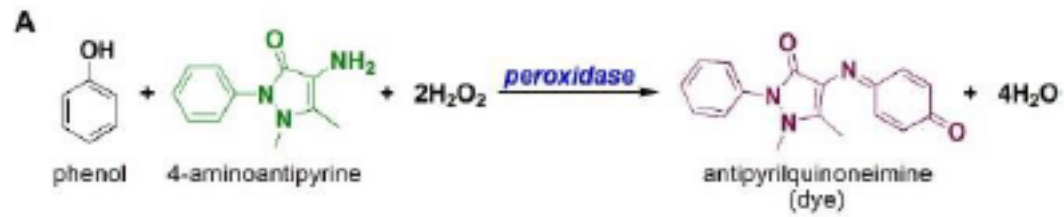
$2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Αμινοφαιναζίνη} + \text{Φαινολικό παράγωγο} \xrightarrow{\text{POD}} \text{Προϊόν ερυθρού χρώματος} + 4\text{H}_2\text{O}$

Η ένταση του χρώματος (510 nm) είναι ανάλογη με την συγκέντρωση της γλυκόζης στο δείγμα



b.





Όργανα – Σκεύη – Αντιδραστήρια

Φασματοφωτόμετρο UV-vis (μετράμε σε μήκος κύματος 510 nm)

Δοκιμαστικοί σωλήνες

Κυψελίδες

Υδρόλουτρο σταθερής θερμοκρασίας ~37°C

Αναδευτήρας τύπου Vortex

Πιπέτες (μικροσιφώνια) ακριβείας διαφόρων όγκων

Διάλυμα εργασίας

Πρότυπο δ/μα γλυκόζης **70 mg / dL** (ή mg / 100mL)

Άγνωστο δ/μα γλυκόζης

Πορεία Εργασίας

1. Προετοιμάζονται και σηματοδοτούνται οι δοκιμαστικοί σωλήνες (T: τυφλό, Δ: δείγμα, Δ+S: δείγμα και standard – 70 mg/100 mL) σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα

	T	Δ	Δ+S
Διάλυμα εργασίας	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
Άγνωστο διάλυμα		10 μL	10 μL
Γνωστό διάλυμα			10 μL
Απεσταγμένο νερό	10 μL		

2. Αναδεύονται τα δείγματα σε Vortex.
3. Επωάζονται στους 37°C για 15 min.
4. Μεταφέρονται τα 3 δείγματα σε 3 διαφορετικές κυψελίδες.
5. Μηδενίζεται το όργανο με το τυφλό και μετράται η απορρόφηση στα 510 nm για τα δύο δείγματα.
6. Υπολογίζεται η συγκέντρωση του αγνώστου με την εξίσωση και με γραφική παράσταση.

Επεξεργασία αποτελεσμάτων – Υπολογισμοί

	Τυφλό	Δείγμα	Δείγμα+Πρότυπο
Διάλυμα εργασίας	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
Άγνωστο διάλυμα	-	20 μL	20 μL
Γνωστό διάλυμα	-	-	20 μL
Απ. H ₂ O	20 μL	-	-
Απορρόφηση	0,000	X	X

- Να συμπληρωθεί ο παραπάνω πίνακας
- Να υπολογίσετε την ΔC_1 σε mg/dL
- Να υπολογίσετε την συγκέντρωση του αγνώστου (στην κυψελίδα) από:

1) την εξίσωση:

$$C_x = [P_0 / (P_1 - P_0)] * \Delta C_1$$

II) την γραφική παράσταση $A = f(C)$

- Να υπολογίσετε την συγκέντρωση του αγνώστου στο αρχικό δείγμα.
- Να απαντήσετε στις ερωτήσεις – ασκήσεις της επόμενης σελίδας

Εάν η συγκέντρωση της γλυκόζης είναι 100,00 mg/dL (θεωρητική συγκέντρωση) να υπολογίσετε το σφάλμα (%) της μέτρησης με βάση τη σχέση:
$$\text{σφάλμα \%} = \left(\frac{C_{\text{πειραματικό}} - C_{\text{θεωρητικό}}}{C_{\text{θεωρητικό}}} \right) \times 100\%$$

Videos

Πως χρησιμοποιούμε τις μικροπιπέτες

https://www.youtube.com/watch?v=uEy_NGDfo_8&t=332s

Πως εργαζόμαστε με το φασματοφωτόμετρο

<https://www.youtube.com/watch?v=V2lkVFUBsX8>

ΕΡΩΤΗΣΕΙΣ – ΑΣΚΗΣΕΙΣ

1. Διάλυμα $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$ παρουσιάζει απορρόφηση 0,680 στα 645 nm με πάχος κυψελίδας 1,0 cm; Ποια θα είναι η νέα απορρόφηση του εάν το διάλυμα αραιωθεί σε διπλάσιο όγκο και τοποθετηθεί σε κυψελίδα πάχους 2,0 cm;

2. Ένα διάλυμα Βιταμίνης-A έχει απορρόφηση $A = 1.4$ στα 328nm. Ποια είναι η συγκέντρωση του?

$$\epsilon_{(\text{VitaminA})} = 1550 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Πάχος κυψελίδας $l = 1 \text{ cm}$

Απ. 0,9 mM