

## **Лабораторна робота №10**

### **ВИЗНАЧЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ ГЛЮКОЗИ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ ГЛЮКОЗООКСИДАЗНИМ МЕТОДОМ**

**Мета роботи:** навчитися визначати концентрацію глюкози в біологічних рідинах глюкозооксидазним методом.

**Практичне значення роботи:** найчастіше показником вуглеводного обміну з діагностичною метою є вміст глюкози в крові та сечі. Підвищення рівня глюкози досить часто відзначається при цукровому діабеті, пухлинах кори наднирників, гіперфункції щитовидної залози, захворюваннях печінки, ураженнях ЦНС.

**Матеріал:** сироватка (концентрація глюкози стабільна протягом 24 год при температурі від +2 до +8<sup>0</sup>С; за умови, що сироватку або плазму приготовлено не пізніше ніж через 30 хв після забору крові. Якщо вміст глюкози в сироватці крові або плазмі перевищує 27,7 ммоль/л, її необхідно розбавити фізіологічним розчином у співвідношенні 1:5 та повторити дослід); штатив для пробірок, біохімічні пробірки.

**Реактиви:** ензими (розчин): пероксидаза, β,D-глюкооксидаза, 4-амінофеназон, стабілізатори, активатори, буферний розчин (фосфатний буфер – рН = 7,2-7,4), фенол, калібрувальний розчин глюкози (10±0,5 ммоль/л), фізіологічний розчин (0,9%-й розчин натрій хлориду).

#### **Приготування робочих розчинів.**

Для варіанта аналізу з використанням БІРЕАГЕНТУ всі розчини готові до роботи та стабільні до закінчення гарантійного терміну придатності (при дотриманні умов зберігання – температура від +2 до +16<sup>0</sup>С).

**Калібрувальний розчин глюкози розбавляють у 10 разів** (0,1 мл калібрувального розчину глюкози – 10 ммоль/л – змішують із 0,9 мл фізіологічного розчину).

#### **Хід роботи**

Аналіз проводиться згідно зі схемою, поданою в таблиці 14.

**Принцип методу:** глюкоза в присутності глюкозооксидази окиснюється киснем повітря до глюконової кислоти й гідроген пероксиду, який у присутності пероксидази реагує з фенолом та 4-амінофеназоном з утворенням хіноніміну *червоно-фіолетового кольору*, який визначається фотометрично при довжині хвилі 540 нм.

Робоча схема проведення дослідів із визначення концентрації глюкози в біологічних рідинах глюкозооксидазним методом

Буферний розчин (мл)	Ензими (мл)	Фізіологічний розчин (мл)	Розведений калібрувальний розчин глюкози (мл)	Матеріал, що аналізується (мл)	Показники оптичної щільності	
					Е калібрувальної проби	Е дослідної проби
Холоста проба (контрольна проба)						
2,00	2,00	0,04	–	–	–	–
Калібрувальна проба						
2,00	2,00	–	0,4	–	–	–
Дослідна проба (1, 2, 3, ... 10)*						
2,00	2,00	–	–	0,04	–	–

Примітка. \* – кількість дослідних проб має коливатися від 3-х до 10-и відповідно до достовірності результатів; мінімум 1, 2, 3.

Окремо пробірки холостої проби (контрольної проби), калібрувальної проби, дослідної проби змішати, витримати протягом 20 хв при кімнатній температурі від +18<sup>0</sup>С до +25<sup>0</sup>С або протягом 12 хвилин при температурі +37<sup>0</sup>С.

**Проти холостої проби** вимірюють оптичну щільність калібрувальної проби (Е калібрувальної проби) та дослідної проби (Е дослідної проби).

**Розрахунок концентрації глюкози (С, ммоль/л)** проводять за формулою:

$$C = 10,0 \cdot E \text{ дослідної проби} / E \text{ калібрувальної проби} ,$$

де 10 – концентрація глюкози в калібрувальному розчині (ммоль/л);

Е дослідної проби – оптична щільність дослідної проби;

Е калібрувальної проби – оптична щільність калібрувальної проби.

#### Контроль якості.

Достовірність отриманих результатів контролюють за допомогою атестованих контрольних сироваток «Ліонорм» (Чехія) або «Біоконт С» (Росія).

**У нормі вміст глюкози** в сироватці венозної крові становить 4,1-6,11 ммоль/л.

**За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.**

## ✍ Завдання для домашнього виконання

1. Заповнити таблицю 15:

Таблиця 15

Перетравлення вуглеводів у шлунково-кишковому тракті

Назва ферменту	Місце знаходження ферменту	pH середовища	Місце дії ферменту, в молекулі вуглеводу	Що утворюється в результаті розщеплення
1	2	3	4	5

2. Написати реакції (стадії) синтезу (глікогенезу) та розщеплення глікогену.
3. Поясніть, до чого призводить порушення вуглеводного обміну.

### ? Питання для самоконтролю

1. Обмін речовин як особливість живої матерії. Дві сторони обміну речовин – асиміляція (анаболізм) та дисиміляція (катаболізм). Загальні закономірності.
2. Сучасна теорія біологічного окиснення. Аеробне та анаеробне окиснення.
3. Субстратне та окислювальне фосфорилування. Наведіть приклади реакцій.
4. Шляхи утворення АТФ в організмі. Наведіть приклади реакцій. Макроергічні сполуки.
5. Перетравлення вуглеводів у шлунково-кишковому тракті. Дія ферментів.
6. Всмоктування моносахаридів та гомеостаз глюкози крові.
7. Гліколіз: реакції, ферменти. Енергетичні ефекти окиснення.