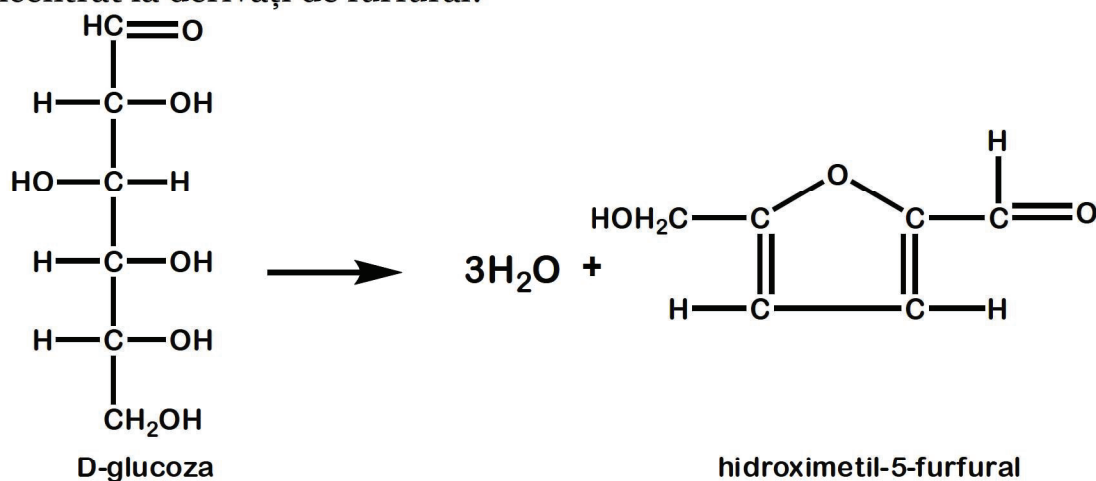


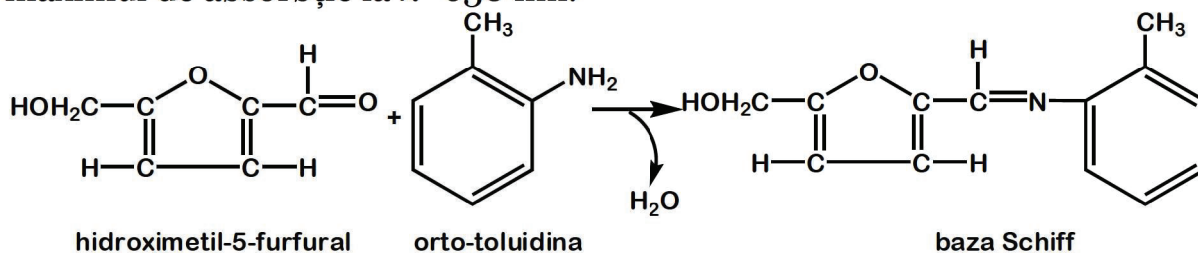
I.1.3. DOZAREA GLUCOZEI ÎN SÂNGE (MICROMETODA COLORIMETRICĂ CU ORTO-TOLUIDINĂ)

În condiții normale, în sângele omului și animalelor se găsește o cantitate relativ constantă de D-glucoză, cunoscută și sub denumirea de *zahăr sanguin* sau *glicemie*. De fapt, alături de D-glucoză, în sânge se mai găsesc cantități neglijabile și de alte glucide (D-fructoză, glicogen etc.). În unele stări fiziologice și patologice, pentru aprecierea stării metabolismului glucidic în organismul uman sau animal, este importantă cunoașterea glicemiei.

Principiul metodei. Glucoza, precum și alte aldohexoze, prezente în sânge, se dehidratează prin încălzire în prezența acidului acetic concentrat la derivați de furfural:



Hidroximetil-5-furfuralul format se condensează cu **orto-toluidina (2-aminotoluenul)** dând un compus colorat în verde cu maximul de absorbție la $\lambda=630$ nm:



Reacția cu orto-toluidina este stabilizată prin adăugarea de tiouree. Deși reacția cu orto-toluidina nu este strict specifică pentru glucoză, interferența altor aldohexoze este neglijabilă, ele existând doar sub formă de urme în sânge.

Reactivi. 1) *orto-Toluidină pură (ATENȚIE! TOXIC !)*. Substanța trebuie să fie incoloră sau slab colorată în galben. Se păstrează la frigider, în sticle de culoare închisă (brună), cu închidere etanșă. Orto-toluidina de culoare galbenă sau roșietică se va purifica prin distilare (pe o plită electrică cu sită de azbest sau pe baie electrică cu nisip). Se recomandă

distilarea în vid pentru a nu se depăși temperatura de descompunere a substanței (p.f. = 200,2°C la care substanța se descompune; în vid, la 80 mm Hg, compusul are p.f. = 121°C, temperatură la care este stabil).

2) *Acid acetic glacial.*

3) *Tiouree.*

4) *Reactiv orto-toluidinic (ATENȚIE! TOXIC !).* Într-un balon cotat de 50 (100) ml se introduc 0,075 (0,15) g de tiouree. Se adaugă 3 (6) ml de orto-toluidină incoloră sau slab colorată în galben. Se completează volumul soluției la 50 (100) ml cu acid acetic glacial. Pentru măsurarea orto-toluidinei, acidului acetic sau a reactivului orto-toluidinic se va utiliza **O PIPETA AUTOMATĂ SAU O PIPETA PREVĂZUTĂ CU PARĂ DE CAUCIUC SAU O BIURETĂ CU ROBINET !**

5) *Soluție de acid tricloracetic 3 %.*

6) *Soluție de acid benzoic 0,2 %.* Se dizolvă 0,2 g acid benzoic cristalizat în 50 ml apă distilată prin încălzire pe baia de apă. După răcire soluția se va transvaza cantitativ într-un balon cotat de 100 ml și se va completa la semn cu apă distilată.

7) *Soluție etalon de glucoză 100 mg %.* Se prepară în momentul utilizării. Se dizolvă 100 mg glucoză anhidră în 100 ml soluție de acid benzoic 0,2 %. Se va conserva în frigider.

Modul de lucru. Într-o eprubetă de centrifugă se vor măsura 0,9 ml acid tricloracetic 3 % (reactiv 5) și 0,1 ml sânge. Se agită și se centrifughează 10 minute la 3000 rotații/minut. În paralel se va efectua o probă etalon care conține 0,9 ml acid tricloracetic 3 % (reactiv 5) și 0,1 ml soluție etalon de glucoză (reactiv 7) (*dacă sângele are un conținut prea mare de glucoză se va folosi o soluție etalon corespunzător mai concentrată: 200 mg % sau 300 mg %*).

Pentru efectuarea reacției de culoare se vor folosi eprubete uscate de 16×160 mm, în care se pipetează:

Reactivi	Eprubetele		
	Control	Etalon	Proba de analizat
Supernatant (ml)	-	-	0,5
Soluție etalon de glucoză (ml)	-	0,5	-
Soluție de acid tricloracetic 3 % (ml)	0,5	-	-
Reactiv orto-toluidinic (ml)	3	3	3
Fierbere pe baia de apă exact 10 minute			
Răcire cu apă de robinet			
Citire la spectrofotometru la $\lambda=630$ nm față de control sau apă distilată			

OBSERVAȚII. În scopul economisirii de reactivi se recomandă adăugarea a 2 ml de reactiv orto-toluidinic (reactiv 4) la 0,5 ml supernatant. Această variantă se poate aplica și în cazul sângelui cu un conținut ridicat de zahăr, dacă un volum determinat de supernatant (0,1 - 0,2 ml) se diluează cu ser fiziologic la 0,5 ml, volum final care se supune

mai departe operațiilor descrise. La calculul rezultatelor se va ține seama de gradul de diluție.

Dacă extincția probei de analizat depășește valoarea de 0,8 se va proceda la diluarea corespunzătoare a sângelui (a supernatantului).

Calculul rezultatelor. Cantitatea de glucoză, exprimată în mg la 100 ml de sânge, se poate calcula după formula:

$$X = \frac{E_S}{E_E} \cdot 100, \text{ unde: } E_S - \text{extincția probei de analizat;}$$

E_E - extincția etalonului;

100 - concentrația glucozei în etalon.

Variații fiziopatologice. Glicemia omului sănătos variază între 60 - 110 mg glucoză/100 ml sânge.

Determinarea glicemiei are o importanță deosebită pentru explorarea modificărilor metabolismului glucidelor sub influența diferiților factori de natură fiziologică sau patologică. Creșterea cantității de glucoză în sânge (*hiperglicemia*) este cauzată de emoții, frig, altitudine, schimbarea climatului, precum și de alimentație. Folosirea unor medicamente cum sunt morfina, atropina, anestezia cu eter și cloroform induc o ușoară hiperglicemie. Scăderea cantității de glucoză din sânge (*hipoglicemia*) este cel mai adesea observată în cazul unui efort muscular prelungit.

În patologie, variația cantității de glucoză se întâlnește într-o serie de boli. Hiperglicemia apare în diabetul zaharat, hiperfuncția medulosuprarenalei sau adenohipofizei, unele tulburări ale sistemului nervos central etc. Hipoglicemia este asociată cu hiperinsulinismul, inaniția, boala Addison, insuficiența funcțională a hipofizei, diferite boli ale ficatului etc.