الجلوكوز، ويُسمى أيضًا الدكستروز، هو نوع فرعي من الكربوهيدرات، المعروفة بالسكريات البسيطة (السكريات الأحادية). الصيغة الجزيئية للجلوكوز هي $C_6H_{12}O_6$، ويحتوي على ست ذرات كربون ومجموعة ألدهيد، ولذلك فهو سكر ألدوهكسوز، أي سكر مُختزل. يُعد الجلوكوز مصدر الطاقة في وظائف الخلايا، وتنظيم استقلابه ذو أهمية بالغة. تُخزن جزيئات السكر الزائدة على شكل جليكوجين في الكبد والعضلات (تكوين الجليكوجين). إذا لم نستهلك كمية كافية من الكربوهيدرات لفترة طويلة، فسيتم تكسير الدهون والبروتينات لإنتاج الطاقة (استحداث الجلوكوز)، بينما يُطلق الجلوكوز عند الحاجة من تكسير الجليكوجين في عملية تُعرف باسم تحلل الجليكوجين.

Experiment 10

Quantitative Determination of Carbohydrates and Lipids

PART 1: Quantitative Determination of Carbohydrates

DETERMINATION OF GLUCOSE in plasma

Glucose, also called dextrose, a subcategory of carbohydrates. known as simple sugars (monosaccharides). Glucose has the molecular formula C6H12O6. containing six carbon atoms and an aldehyde group, and is therefore an aldohexose, reducing sugar. It is the source of energy in cell function, and the regulation of its metabolism is of great. Excess sugar molecules are stored as **glycogen** in liver and muscles (**Glycogenesis**). If we do not consume enough carbohydrates for a prolonged period of time, fat and protein will be degraded to produce energy **(gluconeogenesis)** while glucose is released when needed from the breakdown of glycogen in a process known as **glycogenolysis.**

Glucose level in blood is kept within a narrow range through a variety of process. The primary hormone of blood sugar regulation is **insulin (basal, bolus)**. Insulin has a blood glucose reducing effect secreted by pancreatic beta cell.

يُحافظ على مستوى الجلوكوز في الدم ضمن نطاق ضيق من خلال مجموعة متنوعة من العمليات. الهرمون الأساسي لتنظيم سكر الدم هو الأنسولين (الأساسي، والبلعة). للأنسولين تأثير خافض لسكر الدم، ويُفرز من خلايا بيتا في البنكرياس.

Although there is some variation in blood glucose as circumstances change (feeding, prolonged fasting, exercise), levels above or below the normal range usually indicate a disease. **Glucose determinations in serum or blood** are ordered for the diagnosis and follow-up of abnormalities of carbohydrate metabolism (**diabetes mellitus, hypoglycemia**), and **cerebrospinal fluid glucose determinations** are performed in conditions such as: An increased CSF glucose level is seen in **hyperglycemia** while Decreased CSF glucose in **Bacterial Infection** (suspected meningitis) and **Hypoglycemia.**

على الرغم من وجود بعض التباين في مستوى سكر الدم مع تغير الظروف (تناول الطعام، الصيام لفترات طويلة، ممارسة الرياضة)، فإن المستويات الأعلى أو الأدنى من المعدل الطبيعي تشير عادةً إلى وجود مرض. تُطلب فحوصات الجلوكوز في المصل أو الدم لتشخيص ومتابعة اضطرابات استقلاب الكربوهيدرات (داء السكري، نقص سكر الدم)، وتُجرى فحوصات الجلوكوز في السائل النخاعي في حالات مثل: ارتفاع مستوى الجلوكوز في السائل النخاعي في حالة فرط سكر الدم، بينما ينخفض مستوى الجلوكوز في السائل النخاعي في حالة العدوى البكتيرية (الاشتباه في التهاب السحايا) ونقص سكر الدم.

Main purpose of the determination of blood glucose is the diagnoses of diabetes. Increased fasting blood glucose levels are an indication for diabetes. The aim of further diagnostics is a differentiation between **type I and type II diabetes**. Whereas type I diabetes has its roots in an insulin deficiency and sometime normal or even increased insulin levels are observed in type II diabetes in case of **insulin resistance.** Type I basically necessitates an insulin substitution therapy, whilst type II can be treated by dietary measures or medication, depending on its severity.

تشخيص مرض السكري. الهدف الرئيسي من تحديد مستوى الجلوكوز في الدم هو ارتفاع مستوى الجلوكوز في الدم أثناء الصيام، وهو مؤشر على الإصابة بمرض السكري. يهدف التشخيص الإضافي إلى التمييز بين النوع الأول والنوع الثاني من مرض السكري. في حين أن النوع الأول من مرض السكري ينشأ عن نقص الأنسولين، وفي بعض الأحيان تُلاحظ مستويات طبيعية أو حتى مرتفعة من الأنسولين في النوع الثاني من مرض السكري في حالة مقاومة الأنسولين. يتطلب النوع الأول بشكل أساسي العلاج ببدائل الأنسولين. بينما يمكن علاج النوع الثاني عن طريق التدابير الغذائية أو الأدوية، اعتمادًا على شدته.

يتأكسد الجلوكوز بواسطة إنزيم جلوكوز أوكسيداز (GOD) إلى حمض الجلوكونيك وبيروكسيد الهيدروجين. يتفاعل بيروكسيد الهيدروجين، الذي يتفاعل في وجود إنزيم بيروكسيداز (POD)، مع الكلورو-4-فينول (الكروموجين) و4-أمينو-أنتيبيرين لتكوين صبغة كينين إيمين حمراء كمركب ملون. يتم قياس امتصاص المركب الملون. تتناسب شدة اللون المتكون مع تركيز الجلوكوز في العينة.

Blood glucose determination using the enzymatic colorimetric method

Principle:

Glucose is oxidized by glucose oxidase (GOD) to gluconic acid and hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide reacts, which in the presence of peroxidase (POD) , react with with chloro- 4-phenol(chromogen) and 4-amino-antipyrine to form a red **quinine imine dye as a colored complex**. The absorbance of the colored complex is measured, the intensity of the color formed is proportional to the glucose concentration in the sample.

$$\text{Glucose} + O_2 + H_2O \xrightarrow{\text{Glucose oxidase}} \text{Gluconic acid} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{Reduced Chromogen} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{Oxidized Chromogen} + H_2O$$

احتياطات أثناء العمل مع عينات المصل/البلازما:

Caution while working with serum/plasma samples:

1) Assume that every sample is hazardous and use appropriate protection at all times.
2) Serum sample may contain viruses such as hepatitis A, B, C or HIV, bacteria and other microorganisms.
3) Make sure to wear personal protective equipment (PPE) – mask, gloves, protective clothing, glasses/goggles, face shields, shoe covers.
4) Dispose micropipettes, cuvettes, and tips in an autoclavable bag in the designated area. Make sure to ask your lab supervisor if you do not know how to dispose biological waste.
5) Make sure to you are using biocides such as 70% ethanol to sterilize and clean up your working area and devices used in the experiment (micropipette and glassware)
6) Before you leave the lab make sure to follow personal hygiene aspects, including hand washing and other good practices to reduce the spread of infections and viruses.

1) افترض أن كل عينة خطرة واستخدم وسائل الحماية المناسبة في جميع الأوقات.
2) قد تحتوي عينة المصل على فيروسات مثل التهاب الكبد A وB وفيروس نقص المناعة البشرية، وبكتيريا وكائنات دقيقة أخرى
3) تأكد من ارتداء معدات الوقاية الشخصية (PPE) - قناع، قفازات، ملابس واقية، نظارات/ نظارات واقية، واقيات للوجه، أغطية للأحذية..
٤) تخلص من الماصات الدقيقة، والأنابيب، والأطراف في كيس قابل للتعقيم في المنطقة المخصصة. تأكد من سؤال مشرف المختبر إذا كنت لا تعرف كيفية التخلص من النفايات البيولوجية.
5) تأكد من استخدام مبيدات حيوية مثل الإيثانول بنسبة 70% لتعقيم وتنظيف منطقة عملك والأجهزة المستخدمة في التجربة (الماصة الدقيقة والأواني الزجاجية).
6) قبل مغادرة المختبر، تأكد من اتباع قواعد النظافة الشخصية، بما في ذلك غسل اليدين وغيرها من الممارسات الجيدة للحد من انتشار العدوى والفيروسات.

Procedure:

1. Bring reagents (kit) and sample (serum) at room temperature.
2. Use micropipettes P10, P1000, and use 3 Eppendorf labeled as B (G), S(G), Std (G) to prepare the assay as follow:

Pipette into test tube	Blank **B (G)**	Sample **S(G)**	Standard **Std (G)**
Reagent	1 ml	1 ml	1 ml
Demineralized water	10 µl	-	-
Sample	-	10 µl	-
Standard	-	-	µl

3. Mix and incubate for **20 minutes at room temperature** or 10 minutes at 37°C
   Note: mix by flipping the tube upside down smoothly, do not shake vigorously as this will results in bubbles and will interfere with your measurements).
4. Measure the absorbance of sample and standard **at 500 nm** within 60 minutes against reagent blank.

Why is a reagent blank value maintained? *In order to eliminate the influence of the intrinsic colour of the reagent on the result.* لماذا يتم الاحتفاظ بقيمة مرجعية للكاشف؟ من أجل التخلص من تأثير اللون الذاتي للكاشف على النتيجة. الحساب:

Calculation:

The equation for Beer's Ambert Law: $A = E \times C \times L$

Where:

A= absorbance (no units) A = الامتصاص (بدون وحدات)

E = a Greek Letter (ε) Epsilon, the molar absorption coefficient or molar absorptivity with units of Liter/ (cm x mole) E = الحرف اليوناني (e) (سم x مول) إبسيلون، معامل الامتصاص المولي أو الامتصاصية المولية بوحدات لتر/

L = the path length of a sample usually expressed in cm L = طول مسار العينة، ويُعبر عنه عادةً بالسنتيمتر

C= the concentration of the compound in solution, expressed in M (mol/l) C= تركيز المركب في المحلول، معبراً عنه بوحدة مول/لتر

If we have **two concentrations** of the same solution, then they have the same molar

إذا كان لدينا تركيزان لنفس المحلول، فإنهما لهما نفس التركيز المولي

extinction coefficient (E), and the length path (l) is 1 cm in most spectrophotometers.

$A = (E\ l)\ C$

$(E\ l) = A/C$

➢ E x l (1st concentration) = E x l (2nd concentration)

➢ E 1= E2

➢ **A/C 1= A/C2**

Let C1 be the standard concentration and A1 be the absorbance of standard, C2 is the sample concentration and A2 is the absorbance of sample.

ليكن C1 هو التركيز القياسي و A1 هو امتصاص المعيار، و C2 هو تركيز العينة و A2 هو امتصاص العينة.

Therefore, the absorbance/concentration relationship can be applied using the same linear equation we got for the standard. As follow,

$$\frac{(A2)\ absorbance\ of\ sample}{(C2)\ concentration\ of\ sample} = \frac{(A1) absorbance\ of\ standard}{(C1)\ concentration\ of\ standard}$$

لذلك، يمكن تطبيق علاقة الامتصاص/التركيز باستخدام نفس المعادلة الخطية التي حصلنا عليها للمعيار. كما يلي،

Therefore

$$Concertation\ of\ sample\ (C2) = \frac{absorbance\ of\ sample\ (A2)}{absorbance\ of\ standard\ (A1)}\ x\ Concentration\ of\ standrad\ (C1)$$

The Glucose concentration is mg/dl. Subsequently, the concentration may be converted into SI-units (mmol/l). the conversion factor includes the molar mass of the glucose.

Glucose [mg/dl] x 0,05551 = Glucose [mmol/l]

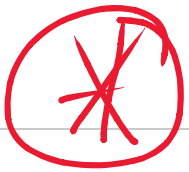
تركيز الجلوكوز هو ملغم/ديسيلتر. بعد ذلك، يمكن تحويل التركيز إلى وحدات النظام الدولي (مليمول/لتر). يتضمن عامل التحويل الكتلة المولية للجلوكوز.

- Concentration of standard solution = 100 mg/dl.
- The reaction is linear up to at least 500 mg/dl. If higher concentration, dilute the specimen with saline solution and re-assay taking into account dilution factor to calculate the result.

Normal glucose range:

- Random Blood Sugar : < 140 mg/dl
- 2 hr-Post Prandial Blood Sugar : <140 mg/dl
- CSF : 40 to 70 mg/dl (1/3 of plasma glucose)
- Urine : Absent

• سكر الدم العشوائي: < 140 ملغم/ديسيلتر
• سكر الدم بعد ساعتين من تناول الطعام: <140 ملغم/ديسيلتر
• السائل النخاعي: من 40 إلى 70 ملغم/ديسيلتر (ثلث جلوكوز البلازما)
• البول: غائب



Fasting blood glucose level	
70-100 mg/dl (5.6 mmol/L)	Normal
100-125 mg/d (5.6–6.9 mmol/L).	impaired blood glucose level (prediabetic)
> = 126 mg /dl (≥7.0 mmol/L)	hyperglycemia (diabetes)
Fasting or at any time < 70 mg/dl (< 3.9 mmol/L	hypoglycemia

Example for the calculation

A patient visits ambulatory clinic for routine follow-up, where the lab takes a blood sample for glucose test. Lab result where:

Absorbance Standard (Std) = 0.26. Absorbance of sample = 0.24

Calculate the patient's glucose concentration and give interpretation.

Glucose concentration= (0.24 / 0.26) * 100mg/dl = 92.3 mg/dl

Patient has a normal glucose level .

The control sample thus has a glucose content of 92.3 mg/dl, corresponding to a concentration of 5.12 mmol/l.

1. تحديد الكوليسترول في البلازما - طريقة قياس الألوان الإنزيمية. الكوليسترول مادة شمعية، توجد فقط في الأطعمة ذات المصدر الحيواني. كما يتم تصنيع الكوليسترول في الكبد. وهو أساس لتصنيع الستيرويدات الأخرى، بما في ذلك الهرمونات الجنسية الإستراديول والتستوستيرون، بالإضافة إلى ستيرويدات أخرى مثل الكورتيزون وفيتامين د.

PART 2: Quantitative Determination of Lipids

1. Cholesterol determination in plasma-enzymatic colrimetric method

Cholesterol is a wax-like substance, found only in animal source foods. Also cholesterol is synthesized in the liver. It the basis for the synthesis of other steroids, including the sex hormones estradiol and testosterone, as well as other steroids such as cortisone and vitamin D.

البروتينات الدهنية هي جزيئات مصنوعة من البروتين والدهون (الليبيدات). وهي تحمل الكوليسترول عبر مجرى الدم إلى الخلايا. البروتينات الدهنية مثل الكيلوميكرون، VLDL، LDL، HDL، هي أنواع مختلفة من الكوليسترول الموجودة في خلايا الدم. وهي تحمل الكوليسترول عبر مجرى الدم. تُسمى المجموعتان الرئيسيتان من البروتينات الدهنية HDL (البروتين الدهني عالي الكثافة) أو الكوليسترول "الجيد" (ينقل الكوليسترول من الأنسجة إلى الكبد) والبروتين الدهني منخفض الكثافة (LDL) أو الكوليسترول "الضار" الذي ينقل الكوليسترول من الكبد إلى أنسجة الجسم.

Lipoproteins are particles made of protein and fats (lipids). They carry cholesterol through blood stream to cells. Lipoproteins such as Chylomicron, VLDL, LDL, HDL, are different types of cholesterol found in the blood cells. They carry cholesterol through your blood stream. The two main groups of lipoproteins are called HDL (high-density lipoprotein) or "good" cholesterol (carries cholesterol from tissues to liver) and LDL (low-density lipoprotein) or "bad" cholesterol which carries cholesterol from liver to body tissues.

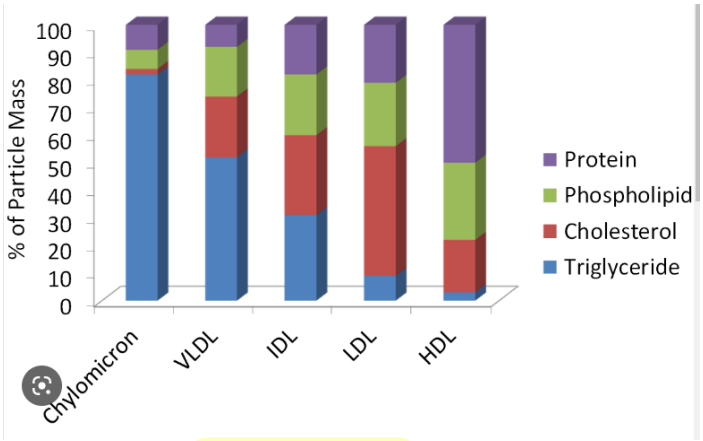


TABLE 15.3 Adult Reference Ranges For Lipids

Analyte	Reference Range
Total cholesterol	140–200 mg/dL (3.6–5.2 mmol/L)
HDL-C	40–75 mg/dL (1.0–2.0 mmol/L)
LDL-C	50–130 mg/dL (1.3–3.4 mmol/L)
Triglycerides	60–150 mg/dL (0.7–1.7 mmol/L)

HDL-C, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-C, low-density lipoprotein cholesterol.

Clinical significance

These lipoproteins carry cholesterol to the cells through arteries. If high levels of LDL particles, cholesterol can build up in body arteries and form blockages called **plaques**. This condition is known as **atherosclerosis** or "hardening of the arteries." It can lead many serious medical conditions including: Coronary artery disease, narrow or blocked arteries in heart as ischemic heart disease, myocardial infarction, Stroke, Peripheral arterial disease, blocked arteries in your legs or arms, Other blood vessel diseases.

تحمل هذه البروتينات الدهنية الكوليسترول إلى الخلايا عبر الشرايين. إذا كانت مستويات جزيئات البروتين الدهني منخفض الكثافة (LDL) مرتفعة، فقد يتراكم الكوليسترول في شرايين الجسم ويشكل انسدادات تُسمى اللويحات. تُعرف هذه الحالة بتصلب الشرايين أو "تصلب الشرايين". يمكن أن تؤدي إلى العديد من الحالات الطبية الخطيرة، بما في ذلك: مرض الشريان التاجي، وضيق أو انسداد الشرايين في القلب مثل مرض القلب الإقفاري، واحتشاء عضلة القلب، والسكتة الدماغية، ومرض الشرايين المحيطية، وانسداد الشرايين في الساقين أو الذراعين، وأمراض الأوعية الدموية الأخرى.

يعكس مستوى الكوليسترول في البلازما تركيز البروتينات الدهنية فيها. يُعد كل من البروتين الدهني عالي الكثافة (HDL) والبروتين الدهني منخفض الكثافة (LDL) جزءًا غنيًا بالكوليسترول، لذا فإن ارتفاع أو انخفاض مستوى الكوليسترول في البلازما يعكس ارتفاع أو انخفاض مستوى البروتينات الدهنية.

The level of cholesterol in plasma reflects the concentration of lipoproteins in plasma. The HDL and LDL are the cholesterol rich lipoprotein fraction therefore high or low level of cholesterol in plasma will reflect high or low level of lipoproteins.

Management for high lipid level **(hypercholesteremia or hyperlipidemia)** is lifestyle change, exercise, diet, smoking cessation and lipid lowering agent (statins).

تشمل إدارة ارتفاع مستوى الدهون (فرط كوليسترول الدم أو فرط شحميات الدم) تغيير نمط الحياة، وممارسة الرياضة، واتباع نظام غذائي صحي، والإقلاع عن التدخين، وتناول أدوية خفض الدهون (الستاتينات).

Principle of cholesterol test:

Cholesterol is determined after hydrolysis (by cholesterol esterases) and oxidation (by cholesterol oxidase). The indicator quinoneimine is produced from hydrogen peroxide and 4-aminoantipyrine in the presence of phenol and peroxidase.

يتم تحديد الكوليسترول بعد التحلل المائي (بواسطة إسترازات الكوليسترول) والأكسدة (بواسطة أوكسيداز الكوليسترول). يتم إنتاج الكينونيمين المؤشر من بيروكسيد الهيدروجين و4-أمينو أنتيبيرين في وجود الفينول والبيروكسيداز.

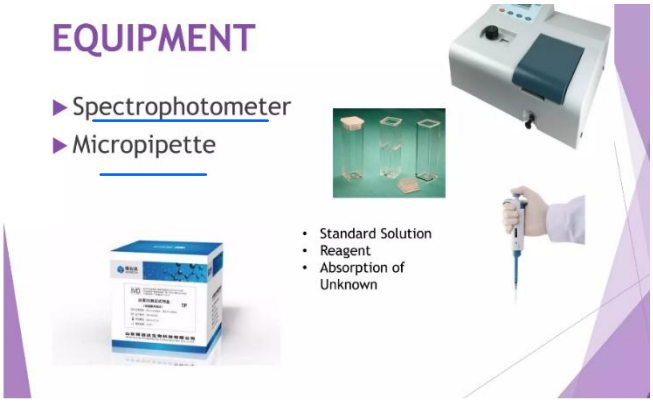
$$\text{Cholesteryl esters} \xrightarrow{\text{CE}} \text{Cholesterol + Fatty acids}$$

$$\text{Cholesterol + } O_2 \xrightarrow{\text{CO}} \text{Cholestenone + } H_2O_2$$

$$\text{4-AA + Phenol} \xrightarrow[\text{POD}]{H_2O_2} \text{Quinoneimine + } 4H_2O$$

Procedure:

1. Bring reagent and sample at room temperature.
2. Use micropipettes P10, P1000, and use 3 Eppendorf labelled as B (Ch), S(Ch), Std (Ch) to prepare the assay as follow:



	Blank B (Ch)	Sample S(Ch)	Standard Std(Ch)
Reagent	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml
Sample	--	0.01 ml	--
Standard	--	--	0.01 ml

3. *Mix, incubate at 25° C for **10 minutes** at **room temperature** or 5 minutes at 37° C for 10 minutes.*

   Note: mix by flipping the tube upside down smoothly, do not shake vigorously as this will results in bubbles and will interfere with your measurements).

ملاحظة: امزج بقلب الأنبوب رأسًا على عقب برفق، لا ترجه بقوة لأن ذلك سيؤدي إلى فقاعات وسيؤثر على قياساتك).

4. *Read absorbance of sample and standard at **500 nm** against reagent blank.*

The color is stable for at least 30 min protected from light

Concentration of standard 200 mg/dl (5.17 mmol/L)

Reference Values:

Updated clinical values of total cholesterol used to classify risk groups.

Total cholesterol level		Interpretation (risk classification)
< 200 mg/dL	< 5.18 mmol/L	Desirable
200-239 mg/dL	5.18-6.18 mmol/L	Borderline high
240 mg/dL and above	> 6.2 mmol/L	High

$$Concertation\ of\ sample\ (C2) = \frac{absorbance\ of\ sample\ (A2)}{absorbance\ of\ standard\ (A1)} x\ Concentration\ of\ standrad\ (C1)$$

If result need to be expressed as SI unit: conc. in mg/ dl x 0.0259= conc. in mmol/L

Example:

The following measurements were obtained: sample absorbance= 0.262, standard absorbance= 0.239, standards concentration =200 mg/dl. Calculate the concentration of cholesterol (mmol/ L) in your sample and give an interpretation.?

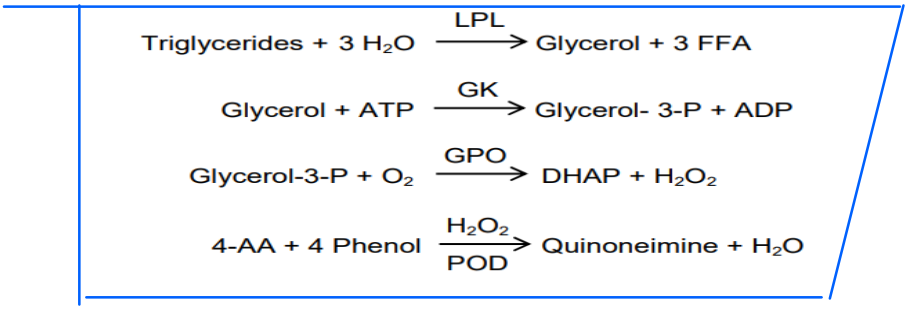
Concentration of cholesterol= (0.262 / 0.239) x 200 mg/dl = 219mg/ dl >> borderline high cholesterol level.

Conc. Cholesterol= 5.67 mmol/ L >> borderline high cholesterol level.

المبدأ: الدهون الثلاثية: هي إسترات الأحماض الدهنية والجليسرول. يمكن تحللها بواسطة قلوي أو حمضي قوي، أو بواسطة إنزيم الليباز، الموجود في جميع الأنسجة مثل بلازما الدم. التحلل الإنزيمي للدهون الثلاثية في المصل بواسطة الليبوبروتين ليباز (LPL) إلى جليسرول و٣ أحماض دهنية حرة. يتم فسفرة الجليسرول إلى جليسرول-٣-فوسفات في وجود جليسرول كيناز (GK) وATP، ثم يتم تحويله بواسطة جليسرول-٣-فوسفات أوكسيداز (GPO) إلى ثنائي هيدروكسي أسيتون فوسفات وبيروكسيد الهيدروجين. يتفاعل بيروكسيد الهيدروجين، بوجود 4-أمينو-أنتيبيرين (4-AA) والفينول، مُكوِّنًا مُلوِّنًا أحمر اللون بواسطة البيروكسيداز (POD)، وتتناسب شدة اللون طرديًا مع تركيز الدهون الثلاثية في العينة.

3.Triglyceride determination using the Enzymatic/ colorimetric method

Principle: Triglycerides: are esters of fatty acids & glycerol. they can be hydrolyzed by strong alkali or acid, or by lipase enzyme, which is found in all tissues like blood plasma. Enzymatic hydrolysis of serum triglyceride by lipoproteinlipase (LPL) to glycerol and 3 free fatty acids. The glycerol is phosphorylated to glycerol-3-phosphate in presence of glycerol kinase (GK) and ATP and then convened by glycerol-3-phosphate oxidase (GPO) into dihydroxyacetonephosphate and hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide reacts, in the presence of 4-Amino-Antipyrine (4-AA) and phenol thus forming a red chromogen by peroxidase (POD) , the colour intensity of which is proportional to the concentration of triglycerides in the sample.



Procedure:

1. Bring reagent and sample at room temperature.
2. Use micropipettes P10, P1000, and use 3 Eppendorf labeled as B (TG), S(TG), Std (TG) to prepare the assay as follow:

	Blank B (TG)	Sample S(TG)	Standard S(TG)
Reagent	**1.0 ml**	**1.0 ml**	**1.0 ml**
Sample	-	**0.01 ml**	-
standard	-	-	**0.01l**

3. *3.Mix, and let the tubes stand 15 minutes at room temperature (16 -25 ° C) OR 5 minutes at 37° C.*

   Note: mix by flipping the tube upside down smoothly, do not shake vigorously as this will results in bubbles and will interfere with your measurements).

ملاحظة: امزج عن طريق قلب الأنبوب رأسًا على عقب برفق، لا ترجه بقوة لأن ذلك سيؤدي إلى فقاعات وسيتداخل مع قياساتك).

4. *4.Read absorbance of sample and standard at 500 nm (against the reagent blank).*
   - Concentration of standard 200 mg/dl (2.26 mrnol/L)

Updated clinical values of total cholesterol used to classify risk groups:

Triglycerides level		Interpretation (Risk classification)
Below 150 mg/dL	Below 1.7 mmol/L	Desirable
150-199 mg/dL	1.7-2.2 mmol/L	Borderline high
200-499 mg/dL	2.3-5.6 mmol/L	High
500 mg/dL and above	Above 5.6 mmol/L	Very high

$$Concertation\ of\ sample\ (C2) = \frac{absorbance\ of\ sample\ (A2)}{absorbance\ of\ standard\ (A1)} x\ Concentration\ of\ standrad\ (C1)$$

Sample with concentration higher than 800 mg/ dl should be diluted 1 : 2 with saline and assayed again. Multiply result by 2.

If result need to be expressed as SI unit: conc. In mg/ dl x 0.0113= conc. mmol/L

Example:

The following measurements were obtained: sample absorbance= 0.083, standard absorbance= 0.219, standards concentration =200 mg/dl. Calculate the concentration of TG (mmol/ L) in your sample and give an interpretation.?

Concentration of triglycerides= (0.083 / 0.219) x 200 mg/dl = 75.8 mg/ dl >>>> normal (desirable) TG level.

Conc. TG = 75.8 X 0.0113 = 8.7 mmol/ L

1 الجلوكوز في البلازما (Glucose Determination in Plasma)

النوع/التخليل	تقدير الجلوكوز في البلازما – الطريقة الإنزيمية اللونية
الأهمية السريرية	تشخيص ومتابعة اضطرابات استقلاب الكربوهيدرات مثل السكري، فرط سكر الدم، ونقص سكر الدم.
المبدأ المختصر	يُؤكسد الجلوكوز بوساطة إنزيم Glucose Oxidase (GOD) ليعطي حمض الجلوكونيك وبيروكسيد الهيدروجين. ثم يتفاعل H_2O_2 بوجود Peroxidase (POD) مع 4-aminoantipyrine و chloro-4-phenol لتكوين صبغة حمراء، وشدة اللون تتناسب طرديًا مع تركيز الجلوكوز.
شروط القياس	1.0 mL reagent + 10 µL sample or standard, تحضين 20 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة أو 10 دقائق عند 37°C، القراءة عند 500 nm ضد Reagent blank.

سلسلة التفاعلات

$$Glucose + O_2 + H_2O \xrightarrow{GOD} Gluconic\ acid + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + 4\text{-aminoantipyrine} + chloro\text{-}4\text{-}phenol \xrightarrow{POD} Red\ quinoneimine\ dye + H_2O$$

الكواشف/الإنزيمات

GOD، POD، 4-aminoantipyrine، chloro-4-phenol، Standard = 100 mg/dL

المعادلة والحساب

تركيز العينة = (امتصاصية العينة / امتصاصية القياسي) × تركيز القياسي

Glucose [mg/dL] × 0.05551 = mmol/L

القيم المرجعية/التفسير

- صائم طبيعي: 70–100 mg/dL
- مرحلة ما قبل السكري: 100–125 mg/dL
- سكري: ≥126 ≥126
- نقص سكر الدم: <70 mg/dL
- RBS: <140 mg/dL
- 2 hr PPBS: <140 mg/dL
- CSF: 40–70 mg/dL
- Urine: Absent

الناتج النهائي

صبغة حمراء Quinoneimine، وازدياد شدة اللون يعني زيادة تركيز الجلوكوز.

2 الكوليسترول الكلي في البلازما (Total Cholesterol Determination)

النوع/التخليل	تقدير الكوليسترول الكلي في البلازما – الطريقة الإنزيمية اللونية
الأهمية السريرية	تقييم خطر فرط كوليسترول الدم وتصلب الشرايين وأمراض القلب والشرايين.
المبدأ المختصر	يُحلّل كوليسترول الإستر بوساطة Cholesterol esterase، ثم يُؤكسد الكوليسترول بوساطة Cholesterol oxidase مولدًا H_2O_2، والذي يتفاعل مع phenol و 4-aminoantipyrine بوجود Peroxidase لتكوين صبغة quinoneimine.
شروط القياس	1.0 mL reagent + 0.01 mL sample or standard, تحضين 10 دقائق عند 25°C أو 5 دقائق عند 37°C، القراءة عند 500 nm ضد Reagent blank. اللون ثابت 30 دقيقة بعيدًا عن الضوء.

سلسلة التفاعلات

$$Cholesterol\ esters \xrightarrow{Cholesterol\ esterase} Cholesterol + Fatty\ acids$$

$$Cholesterol + O_2 \xrightarrow{Cholesterol\ oxidase} Cholestenone + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + 4\text{-aminoantipyrine} + phenol \xrightarrow{POD} Red\ quinoneimine\ dye + H_2O$$

الكواشف/الإنزيمات

Cholesterol esterase، Cholesterol oxidase، Peroxidase، phenol، 4-aminoantipyrine، Standard = 200 mg/dL

المعادلة والحساب

تركيز العينة = (امتصاصية العينة / امتصاصية القياسي) × 200 mg/dL

Cholesterol [mg/dL] × 0.0559 = mmol/L

القيم المرجعية/التفسير

- مرغوب: <200 mg/dL (Desirable)
- حدي: 200–239 mg/dL (Borderline high) مرتفع
- مرتفع: >=240 mg/dL (High)

الناتج النهائي

تكوّن صبغة حمراء Quinoneimine، زيادة اللون تعكس زيادة تركيز الكوليسترول.

3 الدهون الثلاثية (Triglycerides Determination)

النوع/التخليل	تقدير الدهون الثلاثية – الطريقة الإنزيمية اللونية
الأهمية السريرية	تقييم اضطرابات الدهون وخطر المتلازمة الأيضية وأمراض القلب والينكرياس.
المبدأ المختصر	تُحلّل الدهون الثلاثية بوساطة Lipoprotein lipase (LPL) إلى جلسرول وأحماض دهنية حرة. يُفسفر الجلسرول بوساطة Glycerol kinase (GK) إلى Glycerol-3-phosphate، ثم يُؤكسد بوساطة Glycerol-3-phosphate oxidase (GPO) مولدًا H_2O_2، يتفاعل H_2O_2 مع 4-aminoantipyrine و phenol بوجود Peroxidase (POD) لتكوين صبغة حمراء.
شروط القياس	1.0 mL reagent + 0.01 mL sample or standard, تحضين 15 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة (16–25°C) أو 5 دقائق عند 37°C، القراءة عند 500 nm.

سلسلة التفاعلات

$$Triglycerides \xrightarrow{LPL} Glycerol + 3\ Free\ fatty\ acids$$

$$Glycerol + ATP \xrightarrow{GK} Glycerol\text{-}3\text{-}phosphate$$

$$Glycerol\text{-}3\text{-}phosphate + O_2 \xrightarrow{GPO} Dihydroxyacetone\ phosphate + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + 4\text{-aminoantipyrine} + phenol \xrightarrow{POD} Red\ chromogen + H_2O$$

الكواشف/الإنزيمات

LPL، GK، GPO، POD، 4-aminoantipyrine، phenol، Standard = 200 mg/dL

المعادلة والحساب

تركيز العينة = (امتصاصية العينة / امتصاصية القياسي) × 200 mg/dL

Triglycerides [mg/dL] × 0.0113 = mmol/L

ملاحظة: إذا كانت العينة >800 mg/dL تُخفف 1:2 ويُضرب الناتج × 2.

القيم المرجعية/التفسير

- مرغوب: <150 mg/dL
- حدي مرتفع: 150–199 mg/dL
- مرتفع: 200–499 mg/dL
- مرتفع جداً: >=500 mg/dL

الناتج النهائي

تكوّن صبغة حمراء (Red chromogen)، وشدة اللون تتناسب طرديًا مع تركيز الدهون الثلاثية.

ملاحظات

1. Blank يُستخدم لإلغاء تأثير لون الكاشف نفسه.
2. في التحاليل الثلاثة يتم القياس طيفيًا عند 500 nm.
3. العلاقة الأساسية للحساب: تركيز العينة = (Abs sample / Abs standard) × تركيز standard.
4. كلما زادت شدة اللون الأحمر زاد تركيز المادة المقاسة.