

Лабораторна робота № 13

ВИЗНАЧЕННЯ СЕЧОВИНИ В БІОЛОГІЧНИХ РІДИНАХ

ДІАЦЕТИЛМОНООКСИМНИМ МЕТОДОМ

Мета роботи: засвоїти метод визначення концентрації сечовини в біологічних рідинах діацетилмонооксимним методом.

Практичне значення роботи: найчастіше показником білкового обміну та функціонального стану нирок і печінки з діагностичною метою є вміст сечовини в крові й сечі.

Підвищення концентрації сечовини в крові спостерігається при порушенні видільної функції нирок, посиленому розкладі білків, надлишковому білковому харчуванні. **Зниження рівня сечовини** в крові та виділення її із сечею спостерігається при цирозі печінки.

Матеріал: сироватка.

Реактиви: реагент діацетилмонооксиму, реагент тіосемікарбазиду, калібрувальний розчин сечовини ($16,65 \pm 0,832$ ммоль/л), розчин трихлороцтової кислоти, сульфатна кислота, дистильована вода, фізіологічний розчин (0,9%-й розчин натрій хлориду).

Приготування робочих розчинів.

Розчин діацетилмонооксиму. В мірну колбу на 100 мл переносять вміст 1 ампули реагенту діацетилмонооксиму, об'єм доводять до мітки дистильованою водою. Розчин стійкий при температурі від 0°C до $+25^{\circ}\text{C}$ протягом не більше ніж 2 місяці.

Розчин сульфатної кислоти. В мірну колбу на 200 мл наливають 60-80 мл дистильованої води і додають при перемішуванні вміст флакона із сульфатною кислотою. Після охолодження об'єм розчину доводять до мітки дистильованою водою. Розчин стійкий.

Розчин тіосемікарбазиду. В мірну колбу на 100 мл переносять вміст 1 ампули реагенту тіосемікарбазиду й доводять розчином сульфатної кислоти до мітки. Розчин стійкий при температурі від 0°C до $+25^{\circ}\text{C}$ протягом не більше ніж 2 місяці.

Калібрувальний розчин сечовини – готовий до роботи.

Розчин трихлороцтової кислоти. В мірну колбу на 50 мл переносять 50%-й розчин трихлороцтової кислоти і доводять його при перемішуванні до мітки дистильованою водою. Розчин стійкий.

Хід роботи

Аналіз проводиться згідно зі схемою, поданою в таблиці 18.

Принцип методу: сечовина з діацетилмонооксимом у присутності іонів Fe^{3+} , та тіосемікарбазиду утворює комплекс *червоно-рожевого кольору*, що визначається фотометрично при довжині хвилі 520 нм.

Окремо пробірки холостої проби (контрольної проби), калібрувальної проби, дослідної проби закривають ковпачком (або накривають алюмінієвою

фольгою), перемішують вміст і одночасно поміщають у бурхливо киплячу водяну баню на 10 хвилин.

Потім пробірки швидко охолоджують під струменем проточної води.

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

Забарвлення стабільне протягом 15 хвилин. Якщо після нагрівання розчин у пробірці з дослідною пробєю мутніє, то його центрифугують протягом 5 хв або депротейнують розчином трихлороцтової кислоти.

Таблиця 18

Робоча схема проведення дослідів з визначення концентрації сечовини в біологічних рідинах діацетилмонооксимним методом

Фізіологічний розчин (мл)	Калібрувальний розчин сечовини (мл)	Матеріал, що аналізується (мл)	Розчин тіо-семі-карбазиду (мл)	Розчин діацетил монооксиму (мл)	Показники оптичної щільності	
					Е калібрувальної проби	Е дослідної проби
Холоста проба (контрольна проба)						
0,02	–	–	2,00	2,00	–	–
Калібрувальна проба						
–	0,02	–	2,00	2,00	0,23	–
Дослідна проба (1, 2, 3, ... 10)*						
–	–	0,02	2,00	2,00	–	0,11

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

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

$$C = 16,65 \cdot \text{Е дослідної проби} / \text{Е калібрувальної проби},$$

де 16,65 – концентрація сечовини в калібрувальному розчині, ммоль/л;

Е дослідної проби – оптична щільність дослідної проби;

Е калібрувальної проби – оптична щільність калібрувальної проби.

Контроль якості: достовірність одержаних результатів контролюють за допомогою атестованих контрольних сироваток «Ліонорм» (Чехія).

У нормі концентрація сечовини в сироватці венозної крові становить 3,53-8,3 ммоль/л.

За результатами лабораторної роботи зробіть загальний висновок.