

TADEUSZ GARBULIŃSKI

OZNACZANIE MOCZNIKA MOCZU W REAKCJI Z PODBROMINEM W OPARCIU O METODĘ BADANIA GAZÓW KRWI WG KLISIECKIEGO

Z Zakładu Fizjologii A. M. we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr A. Klisiecki

Rozpowszechniona w klinice metoda oznaczania mocznika w reakcji z podbrominem, może być znacznie uproszczona przez zastąpienie aparatu *Kowarskiego* (wzgl. *Borodina*) naczynkiem o prostej budowie, połączonym z kalibrowaną pipetą [3]. Czas pojedynczego oznaczenia tym nowym sposobem wynosi około 1 min., licząc od chwili zmieszania moczu z podbrominem, podczas gdy starymi metodami 15—20 min.

Reakcję z podbrominem można ograniczyć prawie wyłącznie do mocznika, strącając uprzednio inne ciała azotowe moczu, za pomocą kwasu fosforowolframowego. Strąca on substancje purynowe, kreatynę, kreatyninę, barwniki moczu i ewentualnie obecnie białko [1]. Sole amonowe usuwa się z moczu przez wytrząsanie z permutytem w ciągu 5 min. [5]; 5 ml moczu: 2 g permutytu. W diagnostyce klinicznej można pominąć zabieg z permutytem.

Wyniki są bardzo zbliżone do oznaczeń mocznika za pomocą ureazy [2], ale nieco wyższe. Niejednokierunkowość reakcji mocznika z podbrominem jest ujemną stroną metody podbrominowej [6]. Natomiast za pomocą ureazy można oznaczyć najwyżej 97% mocznika (*Folin*), a nawet mniej, np. *Lustig* i *Bromberg* oznaczali w moczach patologicznych tylko 90% całkowitego mocznika [4].

Znane ilości mocznika dodawane do moczu, są wykrywane nową modyfikacją metody podbrominowej z dopuszczalnym błędem.

DANE METODYCZNE

Oznaczanie mocznika za pomocą podbrominu wykonuje się w szklanym naczynku (ryc. 1), które składa się z dwóch pojemników (3 ml i 1 ml), komunikujących się z sobą w górnej części naczynka. Tworzą one jeden

system, zamknięty szklanym korkiem. Za pomocą drenu gumowego łączy się szyjkę naczynka zgiętą pod kątem prostym z 1 ml pipetą kalibrowaną do 0,01 ml. Do oznaczeń małych ilości mocznika stosuje się odpowiednio mniejsze i dokładniejsze pipety. Azot wyparty z mocznika podczas reakcji

Tabela 1.

Table 1.

| Lp. | Mocznik w moczu oznaczony za pomocą: 1) | | | Lp. | Mocznik w moczu oznaczony za pomocą; | | |
|-----|--|-----------|-----------------|-----|---|--------|-----------|
| | podbrominu 2) | ureazy 3) | różnica % 4) | | podbrominu | ureazy | różnica % |
| 1 | 1310,0 | 1270,0 | 3,2 | 6 | 1288,0 | 1247,0 | 3,3 |
| 2 | 1036,0 | 1021,0 | 1,4 | 7 | 1285,0 | 1238,0 | 3,9 |
| 3 | 812,0 | 789,0 | 2,9 | 8 | 1134,0 | 1111,0 | 2,1 |
| 4 | 20,0 | 20,0 | — | 9 | 812,0 | 783,0 | 3,7 |
| 5 | 826,0 | 798,0 | 3,5 | 10 | 346,0 | 340,0 | 1,8 |

Urine urea as determined with: 1); hypobromite 2); urease 3); difference % 4).

Tabela 2.

Table 2.

| Lp. | Zawartość mocznika w moczu w mg‰ 1) | Dodano mocznika mg na 100 ml 2) | Znaleziono razem mocznika w mg‰ 3) | Błąd % 4) |
|-----|--|------------------------------------|---------------------------------------|-----------|
| 1 | 1450 | 100 | 1545 | 5% |
| 2 | 1712 | 50 | 1760 | 4% |
| 3 | 810 | 20 | 829 | 5% |
| 4 | 919 | 40 | 957 | 5% |
| 5 | 1605 | 150 | 1751 | 2% |

Urea content in urine in mg‰ 1); urea added in mg per 100 ml 2); total urea found, in mg‰ 3); error % 4).

z podbrominem, powiększa objętość gazowej atmosfery w naczynku i przesuwają kroplę alkoholu w pipecie miarowej. Ilość uwolnionego azotu odczytuje się w ml na podziałce pipety, z długości drogi przebytej przez kroplę. Szczelność tego systemu (naczynko + pipeta miarowa) sprawdza się przez uniesienie pipety w górę. W szczelnym aparacie, nawet w pionowym ustawieniu pipety, kropla alkoholu znajdująca się w niej nie

zmieni pozycji, w przeciwnym razie spada w dół. Przed wykonaniem oznaczenia należy sprowadzić kroplę do początku pipety. Ten zabieg umożliwia igła manipulacyjna (obcięta igła lekarska do strzykawki) wkluta na stałe w dren gumowy, jak na ryc. 1. Podczas wstępnych manipulacji, igła jest drożna; przed pomiarem zamyka się ją koreczkiem.

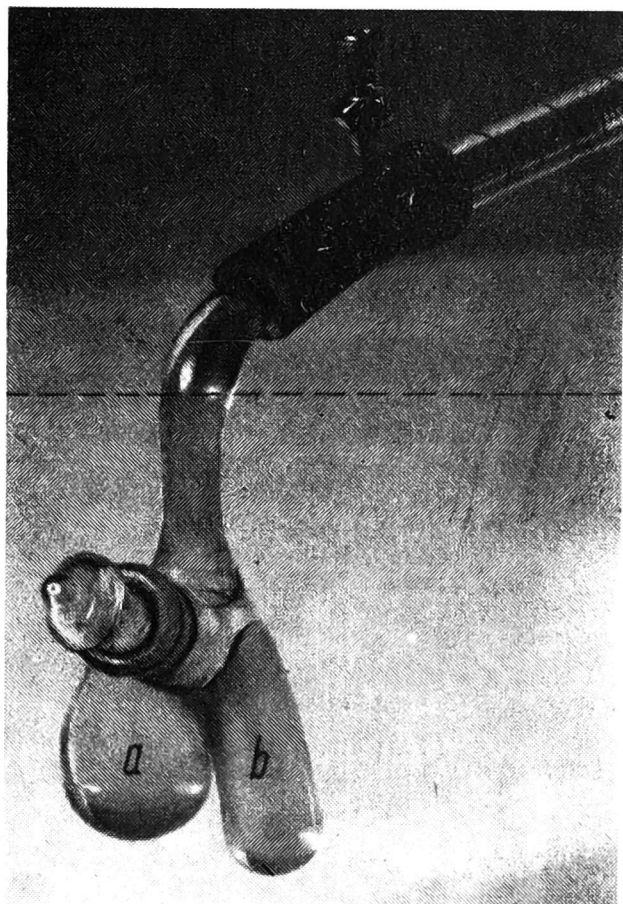
WYKONANIE OZNACZENIA

Odczynniki: 1) podbromin (30% ług sodowy + brom) świeżo przygotowany, 2) ług sodowy 40%, 3) kwas fosforowolframowy 10%, 4) kwas solny 10%, 5) permutyt (jeżeli pożądane jest wyłączyć amoniak z oznaczenia).

5 ml moczu zadaje się 0,5 ml 10% HCl oraz kwasem fosforowolframowym i sączy. Potrzebną ilość kwasu fosforowolframowego ustala się na podstawie ciężaru właściwego moczu (1,4). Mocz o c. wł. 1,010 wymaga zużycia 2 ml tego kwasu. Przy wzroście ciężaru właściwego o 5 mg ilość kwasu fosforowolframowego należy zwiększyć o 1,5 ml (do moczu o ciężarze właściwym 1,015 należy dodać 3,5 ml kwasu). Z przesączu pobiera się 2,1 ml i uzupełnia się wodą destylowaną do 5 ml. Ostatecznie mocz rozcieńczamy 5-krotnie. Przy ciężarze właściwym ponad 1,025 mocz winien być 10-krotnie rozcieńczony.

Do oznaczenia pobiera się 0,5 ml definitywnie rozcieńczonego moczu i wprowadza do pojemnika „a” za pomocą 1 ml pipety zakończonej igłą lekarską do strzykawki (jako łącznika można użyć cienkiego drenu gumowego lub igielitowego). Z kolei do tego samego pojemnika wkrapla się za pomocą innej pipety 1,5 ml 40% ługu sodowego. Ług z moczem winien być w naczynku możliwie dokładnie zmieszany. Otrzymujemy wówczas roztwór ługu równy stężeniu podbrominu. Sprowadzenie obu roztworów do zbliżonych stężeń przed ich zmieszaniem, decyduje o dokładności oznaczenia. Unika się tym sposobem niepożądaną zmianę objętości mieszaniny, gdy łączone są roztwory ługu o różnych dużych stężeniach.

Do pojemnika „b” wprowadzamy około 0,5 ml podbrominu za pomocą



Ryc. 1

pipety, strzykawki lub zakraplacza. Należy zwrócić uwagę, aby podczas wprowadzania podbrominu, nie rozlewać go na ściankach naczynka poza pojemnik „b”. Z kolei zamknąć otwór naczynka szklanym korkiem, naczynko połączyć z drenem pipety miarowej i zanurzyć w łaźni wodnej o temperaturze pokojowej, aż po zgięcie szyjki. Na łaźnię wodną wybrać niską kiuwetę ze sztucznego tworzywa. Naczynko winno dotykać dna kiuwety, a pipeta spoczywać poziomo na jej krawędzi. Około 2 min. trwa wyrównywanie się temperatury naczynka z ciepłotą łaźni wodnej. Proces ten przyspiesza przesuwanie naczynka po dnie kiuwety. W tym celu nie należy dotykać naczynka, lecz posługiwać się dalszym końcem pipety. Przechylając pipetę, sprowadzić zawartą w niej kroplę alkoholu do początku skali i wtedy zamknąć korkiem igłę manipulacyjną. Sprawdzić czy kropla ustaliła się, zanotować początkową pozycję, a następnie trzymając za koniec pipety unieść naczynko ponad wodą i zmieszać zawartość obydwóch pojemników.

Reakcja mocznika z podbrominem zachodzi szybko i cały pomiar od chwili rozpoczęcia reakcji trwa niespełna jedną minutę. W tym czasie uwalniany azot przesuwa kroplę w pipecie miarowej na nowe miejsce. Pomiar kończy się z chwilą, gdy ustali się nowa pozycja kropli, mimo dalszego mieszania i poruszania naczynkiem w łaźni wodnej. Droga przebyta przez kroplę w pipecie, odpowiada objętości azotu wypartego w reakcji.

Po dokończeniu pomiaru starannie umyć naczynko pod strumieniem wody wodociągowej, a następnie wodą destylowaną. W dłuższych okresach czasu pomiędzy oznaczeniami, naczynka winny być wypełnione mieszanką chromową.

Obliczanie wyniku: Teoretycznie z jednego grama mocznika powstaje 373 ml azotu. Jednakże w procesie reakcji mocznika z podbrominem ulega on częściowo utlenieniu do kwasu cyjanowego i azotowego, tak że ostateczna objętość wolnego azotu wynosi w przybliżeniu 357 ml [6].

W badanym moczu znajduje się nieznaczną ilość gramów mocznika (X), którą oblicza się ze znanej ilości ml wypartego azotu (a), dzieląc ją przez 357.

$$X = \frac{a}{357} \text{ g mocznika}$$

W otrzymanym wyniku winno się uwzględnić współczynnik redukcji objętości gazu dla 0° C, 760 mm Hg i suchości

$$V_0 = V_t \left(\frac{273}{273 + t} \cdot \frac{B - p}{760} \right),$$

który waha się około 0,9.

Przykład: Wskutek wyparcia azotu w reakcji mocznika z podbrominem, kropla w pipecie miarowej przesunęła się o 0,595 ml. Wynik ten mno-

żymy przez 10, ponieważ do badania zużyto 0,5 ml moczu 5-krotnie rozcieńczonego, a następnie mnożymy przez współczynnik, który np. dla 19° C i 748 mm Hg wynosi 0,9.

$$X = \frac{0,595 \cdot 10 \cdot 0,9}{357} = 0,015 \text{ g mocznika}$$

Zatem w 1 ml badanego moczu stwierdzono 15 mg mocznika co wynosi 1500 mg⁰/₀.

Przedstawiona w pracy metoda przewyższa dotychczas używane metody prostotą, dokładnością, szybkością oznaczenia i oszczędnością odczynników. Zbędny jest stężony roztwór soli (NaCl, KSO₄) oraz wirowanie moczu przy odbiałczaniu kwasem fosforowolframowym. Badanie gazów metodami typu Kowarskiego cechuje mniejsza dokładność, aniżeli oznaczanie w łaźni wodnej. Poza tym posługując się ureometrem Kowarskiego, trzeba długo czekać, aż wydobywające się z głębi mieszaniny banieczki gazu przedostaną się do atmosfery ponad cieczą. Osiadają one na ściankach aparatu i trudno sobie z nimi poradzić, co bardzo przedłuża czas oznaczenia. Ten problem staje się nieistotny w naszej metodzie, ponieważ bez względu na to gdzie się znajdują banieczki azotu, w cieczy lub ponad nią, biorą udział w pomieszczeniu kropli w pipecie, zaś możliwość mieszania reagujących substancji w naczynku, znacznie przyspiesza reakcję. Również mycie naczynka, jest nieporównanie łatwiejsze.

Posiadając do dyspozycji więcej naczynek, można bez szczególnego kłopotu wykonać kilka pomiarów jednocześnie.

Koszt naczynka nie jest duży, a pomyślane do oznaczeń gazów w ułamkach mililitra krwi przez *Klisieckiego*, służyć może również do oznaczeń mocznika.

T. Garбулинский

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОЧЕВИНЫ В МОЧЕ РЕАКЦИЕЙ С ГИПОБРОМИТОМ ПРИ ПОМОЩИ МЕТОДА КЛИСЕЦКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ГАЗОВ КРОВИ.

Содержание

Описывается упрощенный метод определения мочевины в моче реакцией с гипобромитом; время одного определения укорочено при этом методе до 1 минуты считая с момента смешания мочи с реагентом.

При означении употребляется стеклянный аппарат (рис. I) соединенный с горизонтально уложенной калиброванной пипеткой ёмкости 1 мл. В пипетку помещается капельку алкоголя, которая продвигается по мере вытеснения азота указывая его объём. Из объёма азота вычисляют количество мочевины, деля этот объём на 357 и умножая его на коэффициент редукции объёма. Аппарат имеет две баночки. а=3 мл и в=1 мл. В баночку „а” вливают 1,5 мл 40% едкого натрия и 0,5 мл 5-10-кратно разведенной мочи, из которой белок удалили при помощи фосфорновольфрамовой кислоты. Баночка „в” предназначена на гипобромит. Аппарат за-

крывают стеклянной пробкой, помещают в водяную баню и определяют исходное положение капли алкоголя в пипетке, открывая иглу вколотую в резиновую трубку соединяющую аппарат с пипеткой.

Непосредственно перед смешиванием мочи с гипобромитом иглу затыкают пробочкой и записывают исходное положение капли в пипетке. Реакция происходит быстро и через 1 минуту капля принимает другую позицию, указывая объём вытесненного азота.

Описанный метод по сравнению с применяемыми до сих пор более простой, точный, быстрый и экономный ввиду небольшого количества используемых реагентов. Аппарат предложенный Клысецким с целью определения газов в очень мелких объёмах вполне применим к данному методу.

T. Garbuliński

DETERMINATION OF URINE UREA IN REACTION WITH HYPOBROMITE AS BASED ON KLISIECKI'S METHOD OF MEASURING BLOOD GASES

Summary

A simplified method for the determination of urine urea in reaction with hypobromite is described. It enables the time of a single determination to be reduced to one minute, counted since the mixing of urine with hypobromite.

The equipment consists of a vessel (Fig. 1) which is connected to a horizontal calibrated 1 ml. pipette containing a drop of alcohol. As nitrogen is displaced, the drop shifts and indicates the volume of the former. This volume is divided by 357 and multiplied by the coefficient of volume reduction, whereby the amount of urea is obtained. The vessel has two containers: a — 3 ml. and b — 1 ml. Container „a” holds 1.5 ml. of 40% NaOH and 0.5 ml. of urine diluted 5—10 times and deproteinized with phosphotungstic acid. Container „b” is for hypobromite. The vessel, glass-stoppered is placed on a water bath and the drop of alcohol in the pipette is set by means of a hypodermic needle implanted in the rubber tube connecting the vessel to the pipette.

Prior to mixing the urine with hypobromite, the needle is stoppered and the position of the alcohol drop in the pipette recorded. The chemical reaction is rapid and within roughly 1 min. the alcohol drop becomes fixed in this new position and indicates the volume of the nitrogen displaced.

The method described exceeds currently used techniques in simplicity, accuracy, speed, and economy of reagents. The vessel devised by Klisiecki and used for investigating gases in fractions of a millilitre of blood may also serve for urea determinations.

PIŚMIENNICTWO

1. Bauer K. H.: Die organische Analyse, Leipzig 1954.
2. Conway E.: Biochem. J., 1933, 27, 430; 1942, 36, 655.
3. Klisiecki A.: Acta Physiol. Pol., 1956, 2, 229.
4. Lustig B., Bromberg H.: Biochem. Z., 1931, 238, 321.
5. Rona P.: Praktikum der Physiologischen Chemie. Teil Blut-Harn, Berlin 1929.
6. Zakrzewski K.: Pracownia Chemii Fizjologicznej. PZWL, Warszawa 1951.

Otrzymano: 17. 10. 1959.