

Úloha č. 1:

CHEMICKÁ ANALÝZA MOČI

A) KVALITATIVNÍ A SEMIKVALITATIVNÍ REAKCE

Analýza moči má značný význam zejména pro posuzování funkce ledvin, ale i jiných orgánů (jater, pankreatu atd.). Proveďte určení těchto parametrů ve vzorcích pomocí speciálních papírků, případně tablet firem Lachema, Boehringer, Ames - viz příslušné návody; chemismus a některé interpretace najdete v brožurce "Kleine Teststriefen-Fibel". Podle návodu proveďte se vzorky dále některé zkumavkové reakce, které slouží ke kvalitativnímu posouzení uvedených parametrů.

Hlavní sledované parametry:

1. pH

Fyziologické pH moči zdravých osob se pohybuje v rozmezí 5-6, v maximálním rozpětí 4.5-8. Hodnota závisí na složení přijímané potravy; převážně masitá strava vede k acidurii (< 5.5), laktovegetabilní strava má alkalizující vliv (alkalurie > 6.5). Při horečkách se stává kyselejší, onemocnění močových cest je doprovázeno alkalizací moče.

pH moči hraje mj. významnou úlohu při utváření močových kamenů nebo krystalů. Močové konkrementy tvořené kyselinou močovou precipitují v kyselém prostředí a jsou více rozpustné v alkalickém pH. Naopak alkalická moč precipituje vápenaté či fosfátové sloučeniny, zatímco kyselá moč má tendenci je rozpouštět.

2. Bílkoviny v moči

Zdravá osoba denně močí vyloučí asi 100 mg bílkoviny (většinu bílkovin moče tvoří plasmový albumin, přítomny mohou být i nízkomolekulární látky jako globuliny). Proteinurie signalizuje onemocnění ledvin a močových cest, bílkovinu v moči nalézáme ve větším množství při otravách rtutí, olovem, při diabetu, ikteru, velké tělesné námaze.

Princip: Kys. sulfosalicylová ireversibilně sráží bílkoviny. Nízké koncentrace bílkovin (ještě ne patologické) dávají opalescenci, vyšší koncentrace zákal až sraženinu. Zdravá moč obsahuje méně než 75 mg/ml bílkovin, zákal není patrný.

Provedení: k cca 2 ml vzorku přidáme několik kapek 20% kys. sulfosalicylové. Hodnotí se podle starého způsobu "na křížky", podle nového "arbitrární stupnicí".

3. Glukosa

Na rozdíl od koncentrace glukosy v krevní plasmě je glukosa v moči velmi špatným ukazatelem v diagnostice diabetes mellitus. Vylučovací limit pro glukosu v ledvinách je 1800 mg/ml, tzn. že hladina glukosy v krvi musí vzrůst nad tuto hodnotu, aby se objevila v moči.

4. Acetonové látky v moči - "test na diabetes"

Ketonové látky (aceton, acetoctová kys., b-hydroxymáselná kys.) jsou v moči detegovatelné při diabetu a dále při hladovění, zvracení, gastrointestinálních onemocněních či po narkóze.

Princip: Zkouška s Lestradetovým činidlem je založena na podobném principu jako klasická zkouška Legalova, je však citlivější. Nitroprusid sodný se barví v alk. prostředí v přítomnosti acetonu a podobných látek fialově červeně.

Reagencie: Lestradetovo činidlo (síran amonný 200 dílů, uhličitán sodný 200 dílů, nitroprusid sodný 1 díl se rozetřou na jemný prášek).

Provedení: Na dno zkumavky se dá na špičku nože činidla a převrství se vzorkem. V přítomnosti acetonu vzniká fialové zbarvení. Hodnotí se arbitrární stupnicí, po staru na křížky.

5. Bilirubin v moči - "test funkce jater"

i. Gmelinova reakce (test s kys. dusičnou)

Na dno zkumavky dáme asi 1 ml konc. HNO_3 a opatrně převrstvíme vzorkem moči. V přítomnosti bilirubinu se vytvoří prstenec zelené barvy (oxidační produkt bilirubinu-biliverdin).

ii. Rosinova zkouška (jodovou tinkturou):

Moč převrstvíme roztokem jodové tinktury (I_2 v ethanolu). Je-li přítomen bilirubin, vzniká na rozhraní zelený prstenec biliverdinu.

Moč zdravých lidí bilirubin neobsahuje. Falešně negativní výsledky mohou být způsobeny dlouhým stáním moče, protože močový bilirubin může hydrolyzovat nebo vystaven světlu oxidovat.

6. Urobilinogen v moči

Urobilinogen a sterkobilinogen jsou produkty odbourání bilirubinu, které vznikají v zažívacím traktu činností bakterií. Částečně se ve střevě opět vstřebávají. Normální moč obsahuje malá množství urobilinogenu. Snížené hladiny nalézáme u dětí, u pacientů požívajících antibiotika, která potlačují střevní flóru, a u pacientů s obstrukčním poškozením jater. Zvýšené hladiny doprovází hemolytickou anémii (zvýšená tvorba bilirubinu) či jaterní dysfunkci.

Princip: Tyto látky dávají s tzv. Ehrlichovým činidlem červené zbarvení. Reakce je málo specifická, podobně reagují i indol, skatol, různá barviva a léky.

Provedení: K několika ml vzorku přidáme několik kapek Ehrlichova činidla (2g dimethyl-p-aminobenzaldehydu ve 100 ml 20% HCl).

7. Nitrity

Dusitany se vylučují močí při infekci močových cest a vznikají bakteriálně z dusičnanů. Stanovení dusitanu v moči se používá k detekci bakteriurie.

Diagnostické proužky jsou založeny na enzymové redukci NO_3^- na NO_2^- některými bakteriemi přítomnými v moči. V kyselém pH nitrit reaguje s p-arsanilovou kyselinou za vzniku diazoniové sloučeniny a následně kopuluje s N-1-naftylethylendiaminem za tvorby růžového zbarvení.

8. Leukocyty

Přítomnost leukocytů v moči indikuje zánět. Reagenční papírky detegují jak lyzované tak intaktní leukocyty a jsou založeny na přítomnosti intracelulárních esterů.

Falešně pozitivní výsledky mohou být pozorovány v přítomnosti některých trichomonád či oxidačních činidel, falešně negativní naopak v přítomnosti vysokých koncentrací bílkovin nebo kys. askorbové.

B/ KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ BÍLKOVIN V MOČI (biuretovým činidlem)

Proveďte se vzorkem, kde jste kvalitativními zkouškami našli zvýšený obsah bílkovin.

Princip: Bílkoviny se vysrážejí kys. chloristou, pak se provede stanovení biuretovým činidlem.

Reagencie: 0.66 M vychlazená kys. chloristá, biuretové činidlo, standard.

Provedení: 1 ml vzorku, blank (fysiol. roztok) a standardu (sérum naředěné fysiол. roztokem, aby konc. bílkovin byla 2 g/l) smícháme s 1 ml kys. chloristé. Promícháme, necháme stát 10 min., odstředíme. Supernatanty se odlijí a ke sraženinám se přidá po 2 ml biuretového činidla, promíchá se a nechá se stát 30 min. Pak se měří absorbance při 546 nm vzorku a standardu proti blanku.

Výpočet: $A(vz) / A(st) \cdot 2 = [bílka] (g/l)$

Patologické hodnoty jsou nad 0.25 g/l.

C/ MOČOVÉ KONKREMENTY

Za určitých patologických podmínek dochází v ledvinách a močových cestách k vylučování pevné fáze, tzv. močových konkrementů. Mohou být jemné ("ledvinový písek") nebo hrubší ("ledvinové a močové kameny"). Podle chemické povahy jsou buď jednoduché nebo složené (z více krystalických látek), organické nebo anorganické. Hlavní složky jsou: oxaláty, uráty, fosfáty a karbonáty, příp. cystin, xanthin aj.

Správná analýza složení konkrementů je hlavním předpokladem vysvětlení jejich vzniku a volby terapeutického zásahu. K orientačnímu stanovení složení konkrementu lze použít chem. analýzu - její výhodou je rychlost, jednoduchost a nenáročnost na přístrojové vybavení.

Proveďte jednoduchou analýzu základních složek konkrementů "na suché cestě" i "na mokré cestě"!

I. Část rozmelněného kamene zahřívejte ve zkumavce nebo porcelánovém kelímku za sucha (v digestoři!). Je-li organické povahy, zčerná a posléze shoří. Jesliže zanechá značný zbytek, je převážně anorganický.

II. Analýza organických složek:

Část prášku rozpustěte v několika kapkách 10% HNO₃ v porc. kelímku a odpařte. Ke zbytku přidejte po vychladnutí 25% hydroxid amonný. Utvoří-li se purpurové zbarvení, šlo o kámen močanový (murexidová reakce - srov. zákl. praktikum). Cystin a xantin zbarvení netvoří, jejich rozlišení se dá provést zjištěním přítomnosti síry.

III. Analýza anorganických složek (včetně oxalátů):

Část prášku zahřívejte s 12% HCl. V té se rozpustí anorg. část kamene. Roztok zfiltrujte, filtrát alkalizujte amoniakem. Vznikne-li nyní sraženina, jde o fosfát nebo oxalát. O kterou látku jde, rozhodneme tím, že sraženinu odcentrifugujeme a přidáme k ní ledovou kys. octovou. Jde-li o fosfáty, sraženina se rozpustí, oxaláty nikoliv (zda se nejedná o směsný typ s fosfátem je možno rozhodnout reakcí s fosfomolybdenanem). Uhličitany po přidání HCl šumí.