

Определение мочевины

Принцип метода определения содержания мочевины в плазме (сыворотке) крови, моче и гомогенате тканей, основан на способности мочевины в присутствии диацетилмонооксида, тиосемикарбазида и трехвалентного железа образовывать в кислой среде комплекс красного цвета, интенсивность окраски которого зависит от концентрации мочевины.

Необходимая аппаратура:

- спектрофотометр;
- водяная баня.

Необходимые реактивы (набор фирмы «Ляхема»):

1. **Основной стандартный раствор** мочевины с концентрацией 16,65 ммоль/л (м.в. $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 60,055);
 - рабочие стандартные растворы с концентрацией мочевины 8,325 и 4,16 ммоль/л готовят из основного путём разведения в 2 и 4 раза, соответственно;
2. **Раствор I**, состоящий из 0,5 ммоль диацетилмонооксида, 0,08 ммоль тиосемикарбазида и 2,5 мкмоль трехвалентного железа, готовят из таблетки, входящей в набор, которую растворяют в 30-40 мл подогретой дистиллированной воде 50-мл колбы, объём которого после охлаждения доливают до метки;
3. **1,8 ммоль/л раствор серной кислоты** (в 500 мл дистиллированной воды приливают 50,0 мл концентрированной серной кислоты);
4. **Раствор II – рабочий раствор**, состоящий из равных долей растворов I и серной кислоты, готовят перед работой (*устойчив в течение дня*).

Ход определения Исследуемый образец плазмы крови предварительно развести в 5 раз, а мочи – в 50 раз. Отобрать 0,05 мл (50 мкл) и внести в 2,0 мл рабочего раствора. Пробирки закрыть (*желательно фольгой*) и точно на 10 минут поместить в кипящую водяную баню. Затем их быстро охладить и в течение 15 минут измерить оптическую плотность при длине волны 535 нм.

Реактивы и действия	Проба (мл)	Стандарт (мл)			Контроль (мл)
		I 16,65 мМ/л	II 8,325 мМ/л	III 4,16 мМ/л	
Исследуемая проба	0,05	–	–	–	–
Стандарт	–	0,05	0,05	0,05	–
Дистиллированная вода	–	–	–	–	0,05
Рабочий раствор II	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
	1. Поместить на 10 минут в кипящую водяную баню. 2. Охладить пробы. 3. Определить оптическую плотность при 535 нм				

Расчёт При линейной зависимости показаний стандартов можно при расчёте использовать любой из них. Показания оптической плотности проб разделить на показания стандартного раствора и умножить или на 16,65, или на 8,325, или на 4,16. В том случае если зависимость нелинейная, то использовать более близкий стандарт и, соответственно, умножать на его концентрацию (ммоль/л или мкмоль/л).

При работе с гемолизированной или липемической плазмой крови её необходимо предварительно, в соотношении 1:5, депротеинизировать 5% раствором трихлоруксусной кислоты, центрифугировать и отобрать 0,05 мл надосадочной жидкости. Далее проводить исследования как в остальных пробах, но при этом стандарт готовится аналогично. Таким же способом можно анализировать цельную кровь.