



OSNOVNA ŠOLA PRIMOŽA TRUBARJA LAŠKO

RAZVOJ IN UPORABA KVALITATIVNIH IN KVANTITATIVNIH METOD ZA DOLOČITEV KOMPONENT URINA

*RAZISKOVALNO DELO
PODROČJE: BIOLOGIJA*

AVTORICI: Eva Kodrin, Sara Sakić

RAZRED: 9.

MENTORJI:

Marko Jeran, kem. teh., Kemijski inštitut Ljubljana

Milena Žohar, prof., OŠ Primoža Trubarja Laško

Bianka Mertelj, dr. vet. med., BIC Ljubljana

Laško, 2016

Z A H V A L A

Iskreno se zahvaljujema mentorici, učiteljici **Mileni Žohar**, za nasvete in oskrbo dodatnega gradiva, mentorju g. **Marku Jeranu** za potrpežljivost in trud, s katerim se je lotil namena, da nama je pomagal pri najinem prvem raziskovalnem delu, ter ga. **Bianki Mertelj** za prijazen sprejem in posredovanje informacij veterinarske in medicinske stroke.

Hvala vsem darovalcem urina, ki so bili v raziskavo vključeni neobvezno in prostovoljno.

Hvala ga. **Tanji Drolec** za skrben pregled raziskovalnega dela.

Hvala OŠ Primoža Trubarja Laško za potrpežljivost in ponujeno možnost opravljanja raziskovalnega dela.

KAZALO

1. UVOD	5
1. 1 METODE DELA	6
2. TEORETIČNI DEL	7
2. 1 URIN	7
2. 2 UREA	8
2. 3 SEČNA KISLINA	9
2. 4 KREATININ	10
2. 5 METODE IN TEHNIKE DOLOČANJA KOMPONENT V URINU	12
3. EKSPERIMENTALNI DEL	19
3. 1 UVOD K EKSPERIMENTOM	19
3. 2 REAGENTI IN RAZTOPINE	19
3. 3 APARATURE	23
3. 4 KVALITATIVNO DOLOČANJE FUNKCIONALNIH SKUPIN	25
3. 5 KVALITATIVNI IN KVANTITATIVNI TESTI NA URIN	26
3. 6 KVANTITATIVNO DOLOČANJE KREATININA	28
4. REZULTATI IN DISKUSIJA	29
4. 1 OPAŽANJA	29
4. 2 REZULTATI KVALITATIVNIH TESTOV	29
4. 3 REZULTATI KVANTITATIVNIH DOLOČANJ	30
5. ZAKLJUČEK	31
6. LITERATURA	32
7. DODATEK	34
7. 1 VARNOSTNA OPOZORILA KEMIČALIJE	34

KAZALO SLIK

Slika 1: Skeletna formula sečne kisline	10
Slika 2: Skeletna formula kreatinina	10
Slika 3: Cielab sistem	15
Slika 5: Spektrometer Spektra™ in njegovi osnovni sestavni deli	24
Slika 6: Testni lističi po kontaktu z vzorcem	27

POVZETEK

V raziskovalnem delu smo preučevali urin in določevali njegove komponente. Poleg modelnih smo pri delu uporabljali še realne vzorce. Z dokaznimi reakcijami na funkcionalne skupine smo potrdili, da vzorec uree vsebuje amino in amidno funkcionalne skupine ter karbolnilne zvisi. Kvantitativno smo prilagodili metodo za določitev kreatinina v vzorcu urina darovalcev. Metoda s prenosnim spektrometrom je hitra, enostavna in razumljiva. Pri delu smo razvijali interakcijo alkalnega pikrinata z vzorcem urina oz. čistega (standardnega) kreatinina. Pomembno vlogo igrajo tudi mikrobiološki testi, iz katerih lahko razberemo prisotnost komponent, ki bi lahko bile za naše zdravje nevarne. Osredotočili smo se na meritve hemoglobina, bilirubina, urobilinogena, ketonov, glukoze, proteinov, nitritov, levkocitov, pH in specifične teže. Vzorci darovalcev urina so dosegali vrednosti, ki jih lahko predpišemo njihovem statusu.

Ključne besede: urin, urea, kreatinin, spektrometrija, realni vzorci, pikrinska kislina, mikrobiološke preiskave, veterinarska medicina

1. UVOD

Raziskovalno delo opisuje kvantitativni in kvalitativni pristop k analizi komponent v realnih vzorcih. Model vzorca in njegove okoliščine smo preiskovali skozi različne kemijske pretvorbe, na katerih danes temeljijo mnoge tehnike in metode. Omenimo le nekatere, kot so Fehlingov in Tollensov reagent, biuretska reakcija, uporaba 2,4-dinitrofenilhidrazina ter natrijevega hidrogensulfata. S slednjimi smo dokazovali in določali ustrezne funkcionalne skupine. Osnovni model je predstavljal model uree tako v trdni kot v fazi raztopine, saj je urea kot učinkovina prisotna v vzorcih urina.

Kvantitativni del je obsegal določitev kreatinina kot prisotne komponente v realnem vzorcu, ki smo ga ob dodatkih različnih reagentov predhodno obdelali.

Urin je zaradi svoje funkcije, ki jo predstavlja za organizem, eden prvih in najpomembnejših pokazateljev bolezni v telesu. Glede na dejstvo, da telo v urin že samo po sebi izpušča nekatere strupene snovi in odvečni sladkor, lahko na podlagi analiz ugotovimo, katere snovi so se poleg konstantnih izločkov še izločale iz telesa. Iz slednjega torej velja omeniti, da je vedno dobro nadzorovati svoj urin in biti pozoren na vsakršne nenavadne simptome, ki jih ob odvajanju seča morda začutimo. Pozorni moramo biti še na pogostost odvajanja seča in povečano žejo, saj lahko to, če se prekomerno pojavlja, prav zaradi zanesljivih in lažno pozitivnih pokazateljev komponent v urinu se dandanes zdravniki, poleg odvzema krvi, poslužujejo kontrolnega pregleda bolnikovega urina.

1. 1 METODE DELA

Poskusi so bili opravljeni v šolskem laboratoriju in raziskovalnem ter mikrobiološkem laboratoriju Biotehničnega izobraževalnega centra Ljubljana, Tehniške gimnazije in veterinarske šole. Nekatere od uporabljenih snovi so bile strupene, v nekaterih ozirih eksplozivne in okolju škodljive, zato smo pri njihovi uporabi upoštevali vsa predpisana pravila in delovali v skladu z varnimi delovnimi načeli.

Vsi odpadki so bili zbrani v posebnih posodah in po potrebi tudi oddani pristojnim službam. Ves raziskovalni proces je pod vodstvom mentorjev nadzorovalo tehnično osebje.

2. TEORETIČNI DEL

3. 1 URIN

Naše telo skladišči vrsto različnih snovi, ki jih zaužijemo s hrano in si tako zagotavljamo energijo za celice. Snovi, ki so za telo neuporabne, se iz njega izločijo skozi izločala organizma. Med kemijskimi procesi razgradnje in izgradnje snovi v celicah (metabolizem) pogosto nastajajo tudi mnoge strupene snovi, ki bi lahko celici škodovale, če se iz nje ne bi odstranjevale. Zato celična membrana, ki je prepustna tako za sprejemanje in izločanje snovi iz celice, poskrbi, da se ta odpadni material izloča v krvni obtok. Kri se prečisti v ledvicah in jetrih. Seč iz ledvic odteka v sečni meh, nadalje v sečevod, sečni mehur, nato se po sečnici dokončno izloči iz organizma. Nastajanje seča je zelo pomemben fiziološki proces v telesu, saj uravnava količino in sestavo telesnih tekočin ter drugih strupenih snovi. Zaradi vsebnosti vseh odvečnih snovi organizma je analiza urina ena pomembnejših diagnostičnih metod pokazateljev različnih bolezni [2].

Seč oz. urin je tekočina rumene barve in s pH navadno med 5,0 in 8,0, seveda je to odvisno od vrste in količine zaužite hrane. Sestavlja ga 95 % vode, ostalo so ioni in organske snovi. Najpomembnejša med njimi je sečnina ali urea, ki vsebuje tudi dušik. Sečnina nastaja v jetrih ob spajanju amonijaka in ogljikovega dioksida. V seču so raztopljeni amonijak, ogljikov dioksid in podobni plini. Urin ponavadi vsebuje približno 0,6 g sečne kisline, 2,7 g kreatinina, natrijeve, kalijeve, bikarbonatne in kloridne ione s skupno maso 15,1 g. Največji delež sestavin v urinu predstavlja sečnina s količino približno 25,5 g. Če je zdravje organizma stabilno, v urinu praviloma ne najdemo proteinov, krvnih celic ali glukoze, ki je lahko eden od pokazateljev sladkorne bolezni [2].

Pri analizi urina je treba upoštevati vse dejavnike, ki bi lahko vplivali na točnost produkta. Pomembno je, da se držimo navodil, ki jih nam da zdravnik, preden oddamo vzorec, oz. da povemo, če nas je v zadnjem času pestila kakšna bolezen. Ženske vzorca ne oddajajo v času mesečnega perila.

Zelo pomembna sta spremljanje in dokumentacija koncentracije urina (relativna gostota, količina kreatinina, osmolarnost), kar omogoča relativni izračun nekega analita glede na koncentriranost in klinično ovrednotenje rezultata analize. Kljub omenjenemu sledi, da morajo biti vzorci v laboratorij dostavljeni takoj po odvzemu. V primeru, da to ni mogoče transport traja več kot dve uri), je treba zagotoviti neokrnjenost vzorca in ga zaščititi tudi pred svetlobnimi vplivi in spremembami temperature. Pri kvantitativni analizi urina se uporabljajo epruvete, ki morajo biti med centrifugiranjem, hlajenjem pokrite z ustreznimi pokrovčki [2].

Zbiralniki za enkratni odzem urina so prozorni plastični ali stekleni lončki, ki morajo biti čisti in popolnoma suhi. Odprtina mora biti velika vsaj 5 cm, dno mora biti ravno, pokrov pa tesno prilegajoč, da se prepreči iztekanje.

Glavni sestavini urina sta še kreatinin in sečna kislina. Telo ju izloča zaradi njune toksičnosti. Najpomembnejši antioksidant urina je sečna kislina. Njena povečana količina lahko vodi do različnih obolenj, kot je npr. urični artritis [2].

2. 2 UREA

Urea je prva organska spojina, ki so jo uspeli sintetizirati. V čisti obliki je bela in nestrupena trdna snov. Njena molekulska formula je $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$. Nastaja pri katabolizmu proteinov aminokislin, ki se v jetrih oblikujejo pri razgradnji beljakovin. Pri tem nastane glutaminska kislina, iz nje pa še z deaminiranjem amonijak. Ker je ta nevrotoksičen, se v jetrih pretvori tako, da s CO_2 nastane sečnina. Njen cikel poteka v hepatocitih oz. jetrnih celicah v petih zaporednih reakcijah, in sicer se dve odvijata v mitohondrijih, preostale tri pa v citosolu [1].

Sečnina nastane pri tautomerni obliki iz izosečnine in se nato pretvori v sečnino. Za reakcijo, kjer nastane ATP-sečnina, je potrebno okoli 14 kcal/mol energije [1].

Za pokazatelja ocene ledvične funkcije se že več let uporablja določanje serumske koncentracije sečnine, ki je pomembno še posebej za bolnike z dializo in pri znakih ledvične odpovedi. Na koncentracijo sečnine lahko vpliva več neledvičnih dejavnikov, kot so na primer prehrana z visoko količino proteinov, povečan katabolizem proteinov, reabsorpcija proteinov po gastrointenstinalnih krvavitvah, terapija s

kortizolom in dehidracija. Omenjeni vzroki so prerenalni, pri katerih je koncentracija normalna, medtem ko je pri obstruktivnih postrenalnih vzrokih povečana koncentracija kreatinina in sečnine. Znižano koncentracijo sečnine zaznamo pri premajhnem vnosu proteinov, jetrni insuficienci, terapiji z androgeni in pri nosečnosti. Kreatinin in sečnina skupaj v serumu omogočata izračun razmerja koncentracije sečnine in kreatinina ter razlikovanje med prerenalno in postrenalno azotemijo. Zdravo razmerje za posameznike je med 49 in 81 sečnine/mol kreatinina [1].

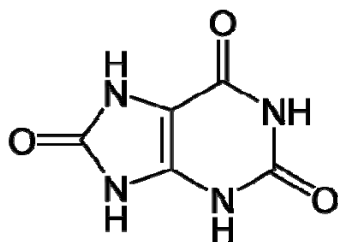
Skozi jetra se izloči približno 90 % sečnine, ki nam je pomembnejša za določevanje ravni dušika v telesu. Dnevno ga telo izloči med 12 in 20 g skupaj z urinom.

Poznamo več metod določevanja sečnine. Omenimo nekatere: kemijska metoda, encimske metode, spektrofotometrično določanje NH_4^+ ionov z glutamat dehidrogenazo (GLDH), spektrofotometrično določanje z Berthelotovo reakcijo, elektrokemijsko določanje NH_4^+ ionov in plinska kromatografija z izotopsko dilucijsko maso spektrometrijo oz. GC-IDMS [1].

2. 3 SEČNA KISLINA

Sečna kislina nastaja v jetrih pri razgradnji purinov in celičnih jeder. Izloča se skozi ledvice in je topna v krvi. Predstavlja glavni oksidant in končni produkt katabolizma. Nenavadna koncentracija sečne kisline v krvi ali urinu je znak različnih zdravstvenih težav, med drugimi uričnega artritisa, hiperurikemije, pljučnice, bolezni srca in ožilja, poškodb ledvic in podobno. V povečanih koncentracijah deluje kot prooksidant in pokazatelj oksidativnega stresa, pri antioksidantskem delovanju ji pripisujejo terapevtsko vlogo [2].

Sečna kislina je heterociklično aromatska spojina z molekulsko formulo $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$. Pri višjih vrednostih pH tvori dvojno nabit uratni ion, v prisotnosti ogljikove kisline oz. karbonatnih ionov odda le en proton.

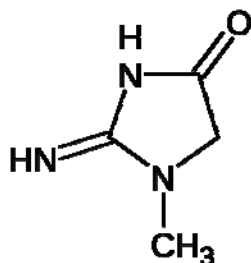


Slika 1: Skeletna formula sečne kisline

2. 4 KREATININ

Kreatinin je snov, ki stalno nastaja iz metabolizma v mišicah. Opišemo ga z molekulsko formulo $C_4H_7N_3O$. V čisti obliki se nahaja v trdnem agregatnem stanju. Struktura kreatinina lahko nastopa v več izomernih oblikah.

Sinteza kreatina poteka v ledvicah, jetrih in trebušni slinavki, in sicer v dveh encimskih reakcijah. Najprej v ledvicah iz arginina (α -aminokislina) in glicina (najenostavnejša aminokislina) nastaneta ornitin (α -aminokislina) in gvanidnocetna kislina (aminokislina). Reakcijo transamidinacije katalizira encim arginin-glicin amidinotransferaza, ki prenese amidno skupino iz arginina na glicin. Gvanidnocetna kislina preide v jetra, delno tudi v trebušno slinavko, kjer se metilira. Donor metilne skupine je S-adenozilmetionin. To reakcijo katalizira gvanidinoacetat-*N*-metiltransferaza, ki prenese metilno skupino iz S-adenozilmetionina na gvanidnocetno kislino in nastane kreatin. Slednji se po krvnem obtoku prenese v ledvici do glomerulov. Glomeruli so klobčiči ledvičnih kapilarnih zank, kjer se kreatin filtrira in v tubulih skoraj popolnoma reabsorbira [1].



Slika 2: Skeletna formula kreatinina

Kreatin se fosfolira v mišičnih celicah. Nastane fosfokreatin, ki služi kot nekakšen darovalec energije ob krčenju mišic. Kreatinin nastaja tudi ob odcepitvi fosfatne skupine in vode. Kreatin in fosfokreatin v kreatinin prehajata povsem spontano, dnevno se 1 do 2 % mišičnega kreatina pretvori v drugo obliko kreatinina.

Kreatin je predstavnik endogenih markerjev, ki se pogosto uporablja pri oceni glomerulne filtracije (GF). Izražen je lahko kot serumska koncentracija ali kot ledvični očistek. Ker je kot marker za GF primeren in dokaj poceni, je v medicini zelo pogost. Na njegovo koncentracijo vplivajo starost, spol, prehranske navade, predvsem vnesena količina mesa, vrsta telesne dejavnosti in mišična masa. 7 od 10 % kreatinina se v urin izloča s tubulnosekrecijo. Izločanje se še poveča, če je prisotna ledvična insuficienca, tj. kronična odpoved obeh ledvic.

Poleg omenjenega je pomembna tudi ustrezna izbira analizne metode. Serumska koncentracija je lahko še vedno v okviru referenčnih vrednosti, čeprav je morda GF že znižana. Ravno zaradi omenjenih omejitev je treba uporabiti še druge metode določanja. Danes je iz tega razloga nastalo več kot 25 matematičnih modelnih enačb, ki podajajo razmerje med serumsko koncentracijo kreatinina in GF. Pri tem se upoštevajo dejavniki, kot so spol, starost in površina telesa. Metoda serumske koncentracije kreatinina velja za nepopoln marker, enačbe niso natančne, ker se z njimi nekako še vedno ne moremo izogniti drugim vplivom optičnih motenj, katere so povezane s pristranostjo uporabljene metode. Tako je National Kidney Disease Education Program (NKDEP) v sodelovanju z drugimi mednarodnimi organizacijami razvila in izpopolnila načrt, ki nudi standardizacijo točnosti meritev serumske koncentracije kreatinina v laboratorijih po vsem svetu. Na oceno GF vpliva biološka variabilnost GF, intraindividualna biološka variabilnost kreatinina, analizna napaka in napaka v modelni enačbi. GF je torej odvisna od prehrane, telesne aktivnosti, spremembe krvnega tlaka in volumna izven celične tekočine, poleg tega tudi še nosečnosti, sladkorne bolezni, zdravljen in akutne ali kronične ledvične bolezni. Ob ustreznem upoštevanju vseh dejavnikov izmerjena ocena GF ne bi smela presegati 30 % odstopanja od izmerjene GF pri $60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$. Z omenjenim je mogoče ugotoviti, ali je celokupna napaka meritve serumske koncentracije kreatinina res dovolj majhna, da skupen vpliv nepravilnosti glede na oceno glomerulne filtracije (oGF) ne presega 30 %. Samo povišanost serumske koncentracije kreatinina je mogoče zaznati pri zmanjšanem delovanju ledvic in njihovih raznih obolenjih.

Neposredno lahko GF zmanjšajo tudi zdravila s svojimi učinki, ki enako vplivajo na tubulno sekrecijo. Zmanjšanje serumske koncentracije povzročajo dejavniki, kot so zmanjšanje mišične mase, prehrana s premalo beljakovinami in povečana GF [1, 2].

2. 5 METODE IN TEHNIKE DOLOČANJA KOMPONENT V URINU

Dokazovanje in proučevanje komponent v urinu (sečna kislina, kreatinin in sečnina) potekata na mnogo različnih načinov. Za določanje posameznih sestavin obstajajo različne metode in tehnike. Osredotočili smo se predvsem na spektrofotometrijo.

Metode določanja sečne kisline

- Fosfovolframova kislina je reagent, ki ima sicer veliko interferenc in je slabo specifičen. Sečna kislina obarva fosfovolframovo kislino v alkalnem mediju do modro obarvanega kromogena [1].
- Metoda z urikazo povzroči, da se sečna kislina ob delovanju encima urikaza oksidira v alantoin, kot stranski produkt nastane H_2O_2 . Neposredno pretvorbo lahko spremljamo v UV-območju. Sečna kislina ima absorpcijski maksimum 293 nm, alantoin pa pri tej valovni dolžine ne absorbira [1].
- Napredna tehnika HPLC (visokotlačna tekočinska kromatografija) je metoda, ki ima več različic za določanje serumske koncentracije v sečni kislini. Pri večini je potrebna deproteinizacija vzorca. Ena od različic je z eluatom, kjer določamo sečno kislino z merjenjem absorbance med 290 nm in 293 nm [1].
- Napredna plinska kromatografija (GC) z izotopsko dilucijsko masno spektrometrijo (GC-IDMS); izotopsko označeno sečno kislino damo vzorcu kot interni standard. Vzorec vodimo skozi anionsko izmenjevalno smolo, nato sečno kislino pretvorimo v derivat sečne kisline [1].

Metode določanja kreatinina

- Jaffejeva metoda, ki temelji na Jaffejevi reakciji, je ena najpogosteje uporabljenih za določanje kreatinina. Osnovana je na osnovi reakcije med

kreatininom in pikratom v alkalnem mediju, kjer nastane rdečeoranžen kromogenz absorpcijskim maksimumom pri 490 nm [1].

- Kinetična Jaffejeva metoda zahteva poleg natančnega poznavanja kinetike reakcije med kreatininom in pikratom še konstanto temperaturo in pH-vrednost. Z izbiro primerne časovnega obdobja meritve med 20 in 80 s bo izmerjen signalni prispevek reakcije [1].
- Encimske metode, ki so se razvile v času proučevanja encimov, ki so udeleženi pri metabolizmu kreatinina in vsebujejo nekoliko večjo specifičnost kot npr. Jaffejeva metoda [1].
- Napredna HPLC-metoda je metoda, ki ima več različic za določanje serumske koncentracije. Pri večini je potrebna deproteinizacija vzorca, kot pri sečni kislini in kreatininu. Postopek je podoben, vendar absorbanco kreatinina, ki sicer znaša 200 nm, zaradi stabilnosti in ločljivosti kreatinina od vrha topila ter drugih motečih snovi merimo pri 236 nm in 240 nm [1].
- Napredna tekočinska kromatografija (LC) z izotopsko dilucijsko masno spektrometrijo (LC-IDMS) je le ena od razvitih metod, ki se uporabljajo kot dejanski pokazatelji vsebnosti določene snovi v serumu, vendar te metode veljajo za zahtevne in zamudne [1].

Metode določanja sečnine

- Kemijska metoda temelji na Fearonovi reakciji, pri kateri diacetil kondenziramo s sečnino v rumeno obarvan kromogendiazil, ki absorbira pri 540 nm. Na to reakcijo se odzovejo še nekatere druge snovi, kot so npr. kreatini, zato ima ta metoda manjšo specifičnost [1].
- Encimske metode v prvi stopnji opravijo hidrolizo sečnine z encimom ureazo do nastanka CO₂ in amonijaka. Amonijeve ione je mogoče določiti s spektrofotometrijo. Zaradi ureaze metode veljajo za specifične [1].
- Napredna plinska kromatografija (GC) z izotopsko dilucijsko masno spektrometrijo (GC-IDMS) je, če ne upoštevamo predhodne zahtevne priprave vzorca. Pri določanju sečnine je lahko gotova v le nekaj urah pri sobni

temperaturi. Metoda med drugim zahteva vakuumsko izhlapevanje in obarjanje proteinov [1].

SPEKTROFOTOMETRIJA

Spektrofotometrija temelji na merjenju absorbance pri prehodu skozi raztopino vzorca. Ko svetloba potuje skozi vzorec, se del svetlobe absorbira, drugi del, ki je prišel skozi vzorec, doseže detektor. Treba je upoštevati Beer-Lambertov zakon, ki določa, da je koncentracija topljenca sorazmerna z absorbanco:

$$A = -\log T = \frac{I_0}{I} = \epsilon \cdot b \cdot c, \text{ kjer}$$

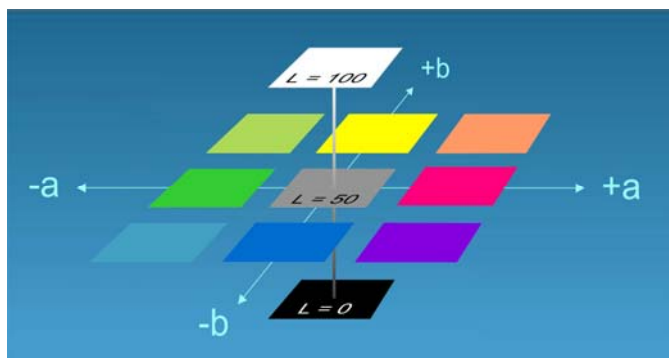
A predstavlja absorbanco, T transmitanco, razmerje I_0/I prepustnost, ki je enakovredna transmitanci [3].

Spektrofotometrijo delimo na infrardečo in ultravijolično. Ena boljnih metod je infrardeča. Vsaka molekulska vrsta ima edinstven infrardeči absorpcijski spekter. S pomočjo te posebnosti je možno vsak vzorec identificirati glede na podlago primerjanja spektra spojine znane strukture. Ta metoda je manj zanesljiva za kvantitativno analizo. Merjenje absorbance ni tako natančno.

Pri spektrofotometriji uporabljamo spektrometer, ki meri intenzivnost svetlobe, ki jo prepušča vzorec.

Pri ultravijolični spektrofotometriji uporabljamo fotometer in spektrofotometer. Dobre lastnosti fotometra so njegova nizka cena, enostavnost, lahko vzdrževanje in kompatibilnost ter je primeren v analiznih metodah, pri katerih spektralna čistoča ni najpomembnejša, saj je v drugih lastnostih podoben spektrofotometru. Kljub temu je s fotometrom težje zajeti celotni spekter in njegova kompatibilnost je dokaj omejena.

Večina teh naprav uporablja Cielab sistem, ki velja za enega najpopolnejših in najzanesljivejših za numerično vrednotenje barve. Omenjeno predstavlja matematično kombinacijo kartezijskega in cilindričnega koordinatnega sistema, kjer je barva opredeljena s tremi osnovnimi vrednostmi: L določa svetlost barve in zavzema vrednosti od 0 (absolutno črno) do 100 (absolutno belo), a določa lego barve na rdeče – zeleni osi in b določa lego barve na rumeno – modri osi [4].



Slika 3: Cielab sistem

Barvne razlike so izražene z vrednostjo ΔE , izračunamo pa jih po naslednji enačbi:

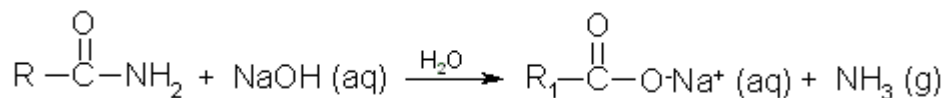
$$\Delta E = \sqrt{(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2} \quad [4].$$

2. 6 DOKAZNE REAKCIJE V ORGANSKI KEMIJI

Dokazne reakcije so metode kemijskega dela, pri katerih z različnimi eksperimenti dokazujemo posamezne snovi (funkcionalne skupine) oz. komponente, prisotne v vzorcih. Reakcije potečejo na različne načine. Lahko govorimo o barvni spremembi, izhajanju določenih plinov ali spremembi agregatnih stanj. Preučevali smo organske snovi z vzorci različnih raztopin uree in nekatere realne vzorce.

➤ Dokazovanje amino skupine

Amini so organske spojine s funkcionalno skupino, ki vsebuje dušikov atom s parom nevezanih elektronov. Med pomembne amine spadajo tudi aminokisliline, ki so osnovni gradniki beljakovin. Amini tvorijo obarvane produkte z bakrovimi ioni, zato jih najlažje dokažemo kar z raztopino bakrovega sulfata ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$). Alifatski amini (topni v organskih polarnih topilih) se delijo v tri skupine: primarni, sekundarni in terciarni. Alifatski amini tvorijo modro obarvane komplekse, aromatski (na dušikov atom imajo vezan aromatski obroč) zeleno obarvane komplekse. Zaradi različne obarvanosti lahko razlikujemo med alifatskimi in aromatskimi amini [7, 9].



Reakcijska shema hidrolize amida v bazičnem mediju.

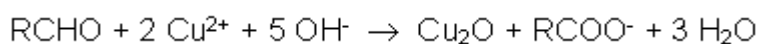
➤ *Dokazovanje amidne skupine*

Amidi so najstabilnejša karbonilna funkcionalna skupina. Gre za skupino, ki vsebuje karbonilni del (C=O), vezan na dušikov atom [8]. Amidov enako kot estrov ne dokazujemo neposredno, temveč je mogoče dokazovati njihove produkte, ki nastanejo pri bazični hidrolizi. Produkti so karboksilne soli in amonijak. Slednjega lahko dokažemo kot beli dim amonijevega klorida (NH₄Cl) ali z raztopino bakrovega sulfata (CuSO₄ × 5 H₂O). Med segrevanjem bazične raztopine nastaja amonijak. Njegovo izhajanje dokažemo z vlažnimi lakmusovimi lističi, ki se jih ne dotikamo z golimi rokami [9].

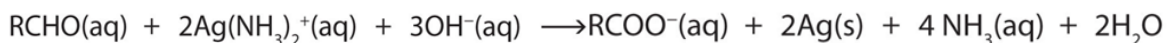
Amino skupina, ki je vezana s karbonilno skupino na ogljikov atom, ne daje obarvanih kompleksov z bakrovimi ioni. Na ta način lahko razlikujemo amine od amidov [9].

➤ *Dokazovanje aldehydov*

Aldehidi so organske kisikove spojine, ki vsebujejo karbonilno funkcionalno skupino oz. »-CHO« del. Slednjo pogosto imenujemo kar aldehydna skupina. Vedno se nahaja na začetku verige ogljikovih atomov, zato pozicijskih števil pri preprostejših aldehydih ne navajamo [10]. Aldehidi so močni reducenti, zato dajejo pozitivne rezultate že s šibkimi oksidanti (npr. Tollensov, Fehlingov reagent) [9].



Enačba oksidacije aldehydov s Fehlingovim reagentom.



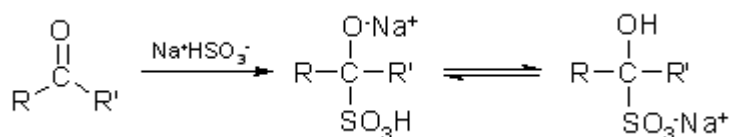
Oksidacija aldehydov s Tollensovim reagentom.

➤ *Dokazovanje ketonov*

Ketoni, ki so po strukturi zelo podobni aldehydom, vsebujejo karbonilno funkcionalno skupino, na katero ni vezan vodikov atom. Na karbonilno skupino sta vezani dve enaki ali različni organski skupini. Ketonsko skupino označujemo s »-CO« [10]. Ketoni ne oksidirajo oz. ne reagirajo na Tollensov in Fehlingov reagent, ker jih je mogoče oksidirati samo z močnimi oksidanti (npr. dušikova kislina) [9].

➤ *Dokazovanje celokupnih karbonilov*

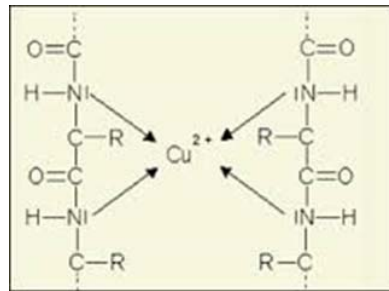
To je funkcionalni fragment, ki ga označujemo s »>CO-«. Gre za spojine, ki jih vsebujejo aldehydi in ketoni [10]. Prisotnost omenjene skupine dokazujemo na več načinov: z raztopino natrijevega hidrogensulfata ali z raztopino 2,4-dinitrofenilhidrazina (2,4-DPH). Pri prvem poteče polarna adicija, pri drugem po polarni adiciji poteče še eliminacija vode [9]. Slednji je tudi bolj primeren za vodotopne aldehyde in ketone [13, 14].



Enačba polarne adicije NaHSO₄ na karbonilno skupino.

➤ *Dokazovanje peptidne vezi z biuretsko reakcijo*

Peptidna vez je NH-vez, ki povezuje aminokislino v beljakovinah. V beljakovinah je s peptidnimi vezmi povezano nad 100 aminokislin [10]. Pri uporabi biuretskega reagenta se bakrov ion koordinativno veže na NH – fragment peptidne vezi [9].



Slika 4: Bakrov ion se veže z NH - skupinami peptidne vezi

2.7 HIPOTEZA

Predvidevamo, da lahko s kvalitativnimi testi dokažemo vsebnost komponent v modelnem in realnem vzorcu. S pomočjo urinskih testov lahko napovemo vsebnost specifičnih komponent v različnih tipih realnega primera. K tej hipotezi še dodajamo, da je vsebnost kreatinina kot pomembne komponente urina možno kvantitativno analizirati s prenosnim sistemom za spektrometrijo.

3. EKSPERIMENTALNI DEL

4. 1 UVOD K EKSPERIMENTOM

Pri delu smo uporabljali zaščitna sredstva. Reagente in raztopine smo shranjevali v temnih prostorih in reagentnih stekleničkah z namenom, da bi tako zagotovili čim manjše spremembe kemijske sestave zaradi zunanjih vplivov.

Delo z biološkimi vzorci je potekalo prav tako z ustreznimi zaščitnimi sredstvi v skladu protokolom za higieno.

Pri delu smo uporabljali inventar, ki je bil predhodno ustrezno očiščen in na koncu spran še z destilirano vodo.

Delo je bilo opravljeno na realnih vzorcih urina, ki so se razlikovali po času odvzema in osebi oz. darovalcu. Vzorec x je pripadal 17-letnemu dijaku, ki se je prehranjeval zelo nezdravo. Urin je bil odvzet ob osmi uri zjutraj. Vzorec 1 je pripadal 38-letnici, odvzet je bil na tešče ob sedmih zjutraj. 2. vzorec je bil od iste osebe odvzet po kosilu ob 14.30. Vzorec 3 je bil darovalcu odvzet po treningu ob 20.00.

3.2 REAGENTI IN RAZTOPINE

Fehlingov reagent

Sestavine:

- 6,93 g bakrovega sulfata pentahidrata ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$),
- 10,00 g natrijevega hidroksida (NaOH),
- 34,60 g kalij-natrijevega tartarata,
- destilirana voda.

Fehlingov reagent je raztopina iz Fehlinga I in Fehlinga II. Fehling I vsebuje v 100 mL destilirane vode 6,93 g bakrovega sulfata pentahidrata ($\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$). Fehling II vsebuje v 100 mL raztopljenega 10,00 g natrijevega hidroksida (NaOH) in 34,60 g kalij-natrijevega tartarata. Obe raztopini dodamo vzorcu v volumskem razmerju 1:1. Aldehidi bodo po nekaj minutah iz prvotne modre prešli v značilno oranžnorjavo barvo. Pri oksidaciji s tem reagentom torej modra raztopina bakrovega sulfata reducira do nastalega bakrovega oksida (Cu_2O) [9].

Tollensov reagent

Sestavine:

- destilirana voda,
- 30 mg AgNO_3 ,
- 25% raztopina amonijaka.

V 100 mL čaši najprej z destilirano vodo raztopimo v 60 mL destilirane vode 30 mg AgNO_3 . Dodamo toliko koncentrirane 25% raztopine amonijaka, da se rjavkasta oborina, ki medtem nastane, spet raztopi. Reagent je najbolje hraniti v temni steklenički.

Biuretski reagent

Sestavine:

- 1,50 g bakrovega(II) sulfata(VI) pentahidrata,
- 6,00 g K-Na tartrata,
- 150 mL 10% NaOH,
- destilirana voda.

V 500 mL bučko kvantitativno prenesemo 1,50 g bakrovega(II) sulfata(VI) pentahidrata in 6,00 g K-Na tartrata. Dodamo 150 mL 10% NaOH. Z destilirano vodo dopolnimo merilno bučko do oznake.

Raztopina 2,4-dinitrofenilhidrazina

Sestavine:

- 2,00 g 2,4 – DPH,
- 100 mL metanola,
- 4,0 mL žveplove(VI) kisline,
- 42 mL klorovodikove kisline,
- 100 mL destilirane vode.

2,00 g 2,4-dinitrofenilhidrazina raztopimo v 100 mL metanola. Dodamo 4,0 mL koncentrirane žveplove kisline. Nato 0,25 g pripravljenega reagenta zmešamo z 42,0 mL HCl in 50 mL destilirane vode. Mešanico segrevamo na vodni kopeli, nato razredčimo še s 50 mL destilirane vode.

10% raztopina uree v vodi

Sestavine:

- 10,00 g trdne uree (NH_2CONH_2),
- 100 mL destilirane vode.

10,00 g trdne uree kvantitativno prenesemo v 100 mL bučko, kjer do oznake 100 mL dolijemo destilirano vodo. Dobro premešamo, prelijemo v stekleničko in pokrijemo z zamaškom.

10% raztopina uree v vodi

Sestavine:

- 10,00 g trdne uree (NH_2CONH_2),
- 100 mL etanola.

10,00 g trdne uree kvantitativno prenesemo v 100 mL bučko, kjer do oznake 100 mL dolijemo etanol. Dobro premešamo, prelijemo v stekleničko in pokrijemo z zamaškom.

10% raztopina NaOH

Sestavine:

- 10,00 g trdnega NaOH,
- 100 mL destilirane vode.

10,00 g trdnega NaOH kvantitativno prenesemo v 100 mL bučko, kjer do oznake 100 mL dolijemo destilirano vodo. Dobro premešamo, prelijemo v stekleničko in pokrijemo z zamaškom.

10% raztopina natrijevega hidrogensulfata (NaHSO₄)

Sestavine:

- 10,0 g NaHSO₄,
- 100 mL destilirane vode.

10,00 g trdnega natrijevega hidrogensulfata(IV) kvantitativno prenesemo v 100 mL bučko, kjer do oznake 100 mL dolijemo destilirano vodo. Dobro premešamo, prelijemo v stekleničko in pokrijemo z zamaškom.

10% raztopina bakrovih ionov

Sestavine:

- 15,65 g modre galice (CuSO₄ × 5 H₂O),
- 100 mL destilirane vode.

15,65 g trdnega bakrovega(II) sulfata(VI) pentahidrata kvantitativno prenesemo v 100 mL bučko, kjer do oznake 100 mL dolijemo destilirano vodo. Dobro premešamo, prelijemo v stekleničko in pokrijemo z zamaškom.

Standardna raztopina kreatinina (40 mg/L)

Sestavine:

- 0,0080 g trdnega kreatinina,
- 200 mL destilirane vode.

0,0080 g trdne uree kvantitativno prenesemo v 200 mL bučko, kjer do oznake 200 mL dolijemo destilirano vodo. Dobro premešamo.

Z razredčevanjem osnovne raztopine pripravimo nadaljnje raztopine s koncentracijo 1,0, 4,0, 8,0, 12,0 in 16,0 mg/L.

3.3 APARATURE

Pri opravljanju eksperimentov smo uporabljali različne aparature in pripomočke, tako električne kot tiste splošne, ki so pri večini kemijskega dela nepogrešljivi. To so čaše, epruvete, merilni valj, pipete, kapalke, bučke, steklene palčke, žličke, spektrometer, analizna tehnica in drugo. Delo z aparaturami zahteva malo več natančnosti, vendar so pri znanstvenem delu električne naprave nujno potrebne, kadar želimo neko znanstveno delo temeljito opraviti.

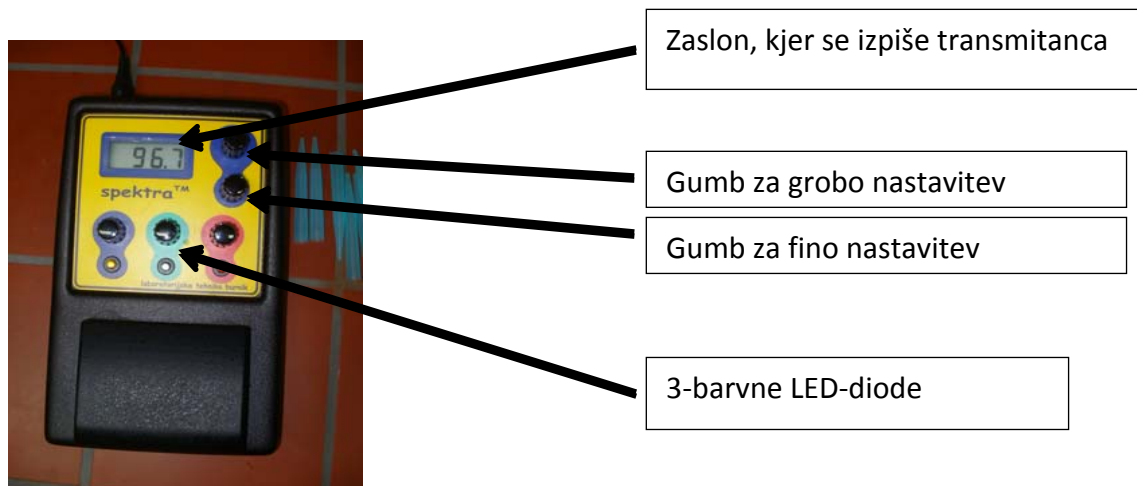
➤ Spektrometer

Spektrometer je naprava, ki meri intenziteto žarka, ki gre skozi vzorec, in ga primerja z intenzivnostjo vpadnega žarka. Valovna dolžina se izmeri na filtru oz. fotometru, monokromatorju, uklonski mrežici in prizmi. Del svetlobe se lahko absorbira. Če je vzorec razredčena raztopina, se uveljavi Beerov zakon [6]. Spektrometer je naprava za merjenje intenzivnosti svetlobe, ki jo prepušča vzorec. Poznamo več vrst spektrometrov, vsak je po svoje opremljen glede na zahteve posameznih uporabnikov. Uporabljali smo spektrometer Spektra™ z emisijskimi maksimumi 430 nm (modra), 565 nm (zelena) in 625 nm (rdeča). Deluje tako, da s tem, ko se skozi prizmo svetloba razcepi na mavrične barve, instrument izmeri količino svetlobe, ki pride skozi opazovani vzorec. Ta se nahaja v optični celici oz. kivetu. Od barve vzorca je odvisna valovna dolžina svetlobe, ki jo izberemo za merjenje [4]. Tem bolj pravilna je izbira valovne dolžine, tem bolj natančno in pravilno je izmerjena absorbanca snovi. Če opazimo, da je raztopina obarvana intenzivnejše, lahko sklepamo, da ima vzorec višjo absorbanco. Velja tudi obratno. Transmittanco oziroma delež prepuščene svetlobe, pri kateri so enota odstotki, se odčita na spektrometrovem zaslonu.

Sestavni deli so naslednji: tribarvna svetleča LED-dioda, svetlobni senzor, modra (430 nm) oz. zelena (565 nm) oz. rdeča svetloba (625 nm), katerih namen je doseg

senzorja preko plasti tekočine, svetilo, ki je ponavadi volframova žarnica, merilna komora in senzor.

Pri barvnih diodah izberemo tisto, ki predstavlja kontrast vzorca. Pri delu smo uporabljali rumenooranžni vzorce, zato smo izbrali modro diodo, saj v barvnem krogu predstavlja kontrastno barvo rumeni.



Slika 5: Spektrometer Spektra™ in njegovi osnovni sestavni deli

Spektrometer je treba pred meritvijo umeriti in nato počakati vsaj minuto. Nato z gumboma za grobo in fino nastavitev nastavimo številko na zaslonu na natančno 100,0. Šele nato kivete z vzorci vstavimo v instrument [3].

Za kvantitativno merjenje vedno izberemo maksimalno valovno dolžino pri že prej umerjeni napravi. Če spojina ne absorbira svetlobe, ji lahko dodamo reagente, ki bodo ustvarili obarvanost. Kiveta mora biti popolnoma čista. Pri vstavljanju kivete v spektrometer moramo paziti, da se ne dotikamo robov. Pri menjavi vzorca je kiveto treba vsaj trikrat sprati z destilirano vodo. Ko je absorbanca vzorcev izmerjena, jo lahko prikažemo s krivuljo. Na abscisno os narišemo koncentracije, na ordinatno os izmerjeno absorbanco pri določeni valovni dolžini. Ko točke povežemo, nastane linearna premica.

➤ Analizna tehcnica

Uporabljali smo analizno tehcnico Kern EW600-2M. Ta vrsta tehcnic se uporablja za izjemno natančno merjenje, lahko izmeri do 0,01 mg natančno. Maksimalna masa, ki jo lahko naprava odtehta, je 600 g. Električna napetost v napravi je 230 V. Njena

uporaba ni zahtevna, prednost je tudi večji LCD-zaslon, gumbi za nastavitve pa niso premajhni in so preprosti za uporabo.

3.4 KVALITATIVNO DOLOČANJE FUNKCIONALNIH SKUPIN

Dokazovanje amino skupine:

V posamezno epruveto odpipetiramo po 2,0 mL raztopine $\text{Cu}(2+)$ ionov. V epruveto dodamo 0,5 mL tekočega oz. 20 mg trdnega vzorca. Vsebino dobro premešamo in opazujemo dokaz. Vzorci so se obarvali v temno moder odtenek.

Dokazovanje amidne skupine:

V posamezno epruveto odpipetiramo po 2,0 mL tekoče vzorčne raztopine oz. 20 mg trdne snovi. Vsebini dodamo še 2,0 mL 10% raztopine NaOH. Epruvete postavimo v vodno kopel in opazujemo spremembo barve.

Razlikovanje med aldehidi in ketoni:

a) V posamezno epruveto odmerimo po 1,0 mL Fehliga I in 1,0 mL Fehlinga II. Fehlingov reagent se je takoj obarval v nekoliko temnejšo, sinje modro. Vsebini reagenta smo dodali 0,5 mL tekočega oz. 20 mg trdnega vzorca. Če na sobni temperaturi ne opazimo spremembe barve, vzorce postavimo za 30 minut na vodno kopel in spremljamo potek.

b) V posamezno epruveto odpipetiramo po 1,0 mL Tollensovega reagenta. Dodamo 0,5 mL tekočega ali 20 mg trdnega vzorca. Epruvete z vsebino postavimo za 20 minut na vodno kopel in opazujemo barvno spremembo.

Dokazovanje celokupnih karbonilov

a) V posamezno epruveto odpipetiramo po 0,5 mL tekočega ali vanj zatehtamo 20 mg trdnega vzorca.

Dodamo 0,5 mL tekočega ali 20 mg trdnega vzorca. Epruvete z vsebino postavimo za 20 minut na vodno kopel in opazujemo barvno spremembo. Vsebini smo dodali raztopino 2,4 – DPH, vsebino dobro premešali in opazovali barvno spremembo.

Biuretska reakcija

V vsako od epruvet odpipetiramo po 4,0 mL biuretskega reagenta in dodamo 2,0 mL tekočega ali 30 mg trdnega vzorca. Epruvete zamašimo in jih dobro pretresemo. Opazujemo barvno spremembo.

3.5 KVALITATIVNI IN KVANTITATIVNI TESTI NA URIN

V laboratoriju so bili opravljeni testi na štiri različne vzorce urina in 10% vodno raztopino uree. Določanje smo opravljali s testnimi lističi, ki v vzorcu pokažejo naslednje vsebnosti:

- *hemoglobin*,
- *bilirubin* – njegova vsebnost je pokazatelj jetrne bolezni, saj ga pri zdravem organizmu ne smemo zaslediti,
- *urobilinogena*, ki prikazuje delovanje jeter. Urobilinogen nastaja v tankem črevesju iz bilirubina s pomočjo črevesne flore. Delno se izloča skozi debelo črevo v blato, delno pa pride po resorpciji s krvnim obtokom do ledvic in s tem v seč.,
- *ketonov*, ki nastajajo pri pretiranem presnavljanju maščob, zato so najpogostejši v urinu diabetikov, spremljajo pa nas lahko tudi ob večjih naporih in stradanju,
- *glukoze*; njena vsebnost opozarja na previsok krvni sladkor,
- *proteinov* (beljakovin); prevelika vsebnost opozarja na različna bolezenska stanja, predvsem vnetja sečil,
- *nitritov*; njihova vsebnost lahko pomeni okvare sečil oz. bakteriurijo (prisotnost bakterij, ki reducirajo nitrate v nitrite). Odsotnost nitritov še ni poglobilni dejavnik, da bakterije niso prisotne v samem urinu.
- *levkocitov* (bele krvničke), ki kažejo na vnetje sečil,
- *pH*, ki se spreminja glede na prehrano. Za pH velja, da je od višjih vsebnostih bakterij večji.
- *specifično težo*.

S testnimi lističi torej lahko analiziramo obstoj nekega bolezenskega stanja ob pozitivnih rezultatih, ki se ujemajo s stanji barvne sheme, saj se polja na lističih obarvajo le v primeru odstopanj od normale.

Meritve so bile opravljene na petih vzorcih urina: vzorec x je pripadal 17-letnemu dijaku, ki živi izredno nezdravo. Prehranjuje se s pretežno škodljivo hrano in ne zaužije dovolj snovi, ki jih telo potrebuje. Vzorec je bil odvzet ob 8.00 zjutraj. Kandidat je pojedel že prvi obrok.

Vzorec 1 je predstavljal status 38-letne ženske, odvzet je bil ob 7.00 zjutraj na tešče. Vzorec 2 je predstavljal isto osebo, odvzet je bil po kosilu ob 15.3. Vzorec 3 je darovala prav tako 38-letna ženska. Odvzet ji je bil ob 20.00, in sicer po fizični vadbi (trening).

Vzorec 4 je predstavljal kontrolo, 10% vodno raztopino uree.

V vsaki testni steklenički z vzorci smo na hitro zmočili testne lističe, v prtiček obrisali spodnjo stran, nato barvo primerjali s testno shemo, priloženo k posameznemu testu. Vse podatke smo zapisovali v razpredelnico, kjer smo beležili opažanja.



Slika 6: Testni lističi po kontaktu z vzorcem

3.6 KVANTITATIVNO DOLOČANJE KREATININA

V vsako od epruvel odmerimo po 0,5 mL vzorca oz. raztopine. Dodamo po 0,5 mL destilirane vode, 0,5 mL nasičene vodne raztopine pikrinske kisline in 0,5 mL 10% raztopine NaOH. Epruvete pokrijemo in pretresemo, nato beležimo opažanja po 20 minutah. Po 20 minutah na spektrometru izmerimo transmitanco.

Pomembno pri eksperimentiranju je, da so vzorci vneseni v enakih količinah. Plastične merilne jamice, kamor smo nanegli vzorce, so morale biti med meritvijo za vse vzorce na istem mestu.

4. REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 OPAŽANJA

Pri dokaznih reakcijah so pozitivne rezultate ponavadi dajali vzorci z realnimi snovmi in raztopine z ureo, o prisotnosti beljakovin so nam najbolj uspeli rezultati biuretskega testa.

Pri delu s testnimi lističi, pri analizi urinskih vzorcev, odstopanja niso bila velika, kar pomeni, da so bili darovalci vzorcev popolnoma zdravi.

Pri spektrometriji smo z večjo koncentracijo kreatinina dosegali večje intenzivnosti v barvnih raztopinah. Bolj kot je bila barva vzorcev intenzivna, večjo vsebnost kreatinina so vsebovali.

4.2 REZULTATI KVALITATIVNIH TESTOV

Funkcionalne skupine

- Amino skupina. Vzorci so pokazali spremembo barve po 20 minutah segrevanja na vodni kopeli.
- Amidna skupina. Amonijak, ki smo ga pri eksperimentu dokazovali z lakmusovi lističi, je najbolj izhajal pri vzorcu raztopine s trdno ureo. Rdeč lakmusov papir je bil skoraj v celoti temno modre barve, pri drugih vzorcih so bile na njih komaj opazne modre lise. Pri slepi raztopini z destilirano vodo amonijak ni izhajal, kar potrjuje pozitiven rezultat.
- Karbonilne skupine, ki smo jih dokazovali z 10% raztopino natrijevega hidrogensulfata(IV), smo opazili v vzorcu z uree v etanolu.
- S testi nismo pokazali razlik na aldehidno in ketonsko funkcionalno skupino (Fehlingova in Tollensova reakcija), prav tako tudi nista potekli biuretska

reakcija in reakcija z 2,4-dinitrofenilhidrazinom. Omenjeno dejstvo pogojuje trditev glede strukture snovi, ki jo je vseboval vzorec.

Testni lističi za pregled vzorcev urina

Pri vseh vzorcih so bili hemoglobin, bilirubin, urobilinogen, ketoni, glukoza nitriti in levkociti normalni oz. negativni. Pri vzorcih x, 1 in 2 so proteini predstavljali barvno sliko trace, tj. sled, pri drugih dveh je bil rezultat tudi tu negativen. Vzorca x, 1 in 3 so imeli pH-vrednost 6, vzorca 2 in 4 pa vrednost 8. Specifično težo 1,010 so imeli vzorci x, 2 in 4, specifično težo 1,020 pa sta imela vzorca 1 in 3.

4.3 REZULTATI KVANTITATIVNIH DOLOČANJ

Preiskovan vzorec, kri se je najintenzivneje obarval, je vzorec 38-letnice, ki je darovala urin tik po končani fizični vadbi. Test je pokazal, da je v vzorcu prisotna večja količina kreatinina. V telesu se kopiči kot kreatinin-fosfat, med fizično vadbo se porablja, odda fosfatno skupino in postane prost v t. i. »prosti« obliki. Omenjeno prosto obliko kreatinina smo tudi detektirali (1,0 mg/L). Ostali vzorci (vzorec 1 in 2 0,7 mg/L in vzorec x 0,6 mg/L) so dosegali srednje vrednosti, saj je znano, da se zanemarljivo spreminja.

5. ZAKLJUČEK

Raziskovalno delo je zajelo raziskave glede sestave urina in določanja nekaterih funkcionalnih skupin v modelnih in realnih vzorcih. Za osnovo so nam služile raztopine uree. Pripravljene raztopine so bile 10%, in sicer z etanolom in destilirano vodo. Poleg raztopin smo opravljali poskuse tudi z vzorci trdne uree in jo kombinirali z različnimi reagenti z namenom, da bi zagotovili večje potrditve.

Pokazali smo, da so le nekatere dokazne reakcije primerne za kvalitativno indentifikacijo funkcionalnih skupin.

Za zdravstveno samonadzor na domu so primerni tudi testni lističi za analizo urina. Domnevali smo, da bomo morda v urinu 17-letnega dijaka zasledili tudi znake glukoze, saj je na odvajanje urina odhajal zelo pogosto. Glukozno stanje se je po testu izkazalo za popolnoma normalno. Test je pokazal le sledi. Pri identifikaciji kreatinina v vzorcu 38-letne ženske smo opazili normalno raven kreatina za njej primeren status. Znano je, da se kreatinin v telesu skladišči v obliki kreatinin-fosfata, slednji se v času intenzivne fizične vadbe porablja, odstranijo se fosfatne skupine, kreatin pa se sprosti. Sproščen kreatinin hitro zaznamo z občutljivimi metodami oz. testi (v našem primeru alkalni pikrinat).

Že zamisel o tako preprosti samokontroli zdravja bi morala mnogim dajati spodbudo, saj je urin pomemben pokazatelj prvih bolezenskih težav v organizmu, zato moramo svoje izločanje budno spremljati vse življenje.

Glavno hipotezo o raziskavah na področju analize urina lahko v celoti potrdimo. Pokazali smo, da je možno s pomočjo dokaznih reakcij in testov analizirati določne tipe urinskih vzorcev oz. predstavnikov snovi, ki jih vsebujejo. V nadaljevanju, ko bomo imeli zadostna znanja na tem področju, bomo skušali razviti spektrometrični pristop, ki bo za potrebe hitrih analiz komercialno dostopen in enostaven za razumevanje in izvedbo.

Delo na tem čudovitem in življenjsko pomembnem področju obeta lepe rezultate predvsem za splošno občinstvo. Veseli smo, da smo bili del tega projekta.

6. LITERATURA

[1] Darja Mahnič, Validacija analiznih metod za določanje neproteinskih metod dušikovih spojin v krvnem serumu, *Diplomsko delo*, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor, 2011.

[2] Nina Miklič, Določanje antioksidativne aktivnosti urina z metodo ABTS, *Diplomsko delo*, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Ljubljana, 2012.

[3] Nika Zakrajšek in Patricija Jereb, Vsebnost antioksidantov in polifenolov v naravnih ekstratih, *Projektno delo*, Biotehniški izobraževalni center Ljubljana, Gimnazija in veterinarska šola, Ljubljana, 2015.

[4] Matjaž Pavlič, Borut Kričej in Marko Petrič, Spektrofotometer, *Leswood*, 60, 2008.

[5] Dostopno na: http://studentski.net/gradivo/ulj_ntf_nt1_bmt_kol_vprasanja_in_odgovori_01?r=1
[10. 2. 2016 ob 14.15 uri].

[6] Dostopno na: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Spektrofotometrija> [10. 2. 2016 ob 18.00 uri].

[7] Dostopno na: https://sl.wikipedia.org/wiki/Amin#Splo.C5.A1ne_lastnosti
[10. 2. 2016 ob 18.20 uri].

[8] Dostopno na: <https://sl.wikipedia.org/wiki/Amid> [10.02. 2016 ob 18.40 uri].

[9] Dokazne reakcije, Dostopno na: <http://keminfo.pef.uni-lj.si/ro03m/dokreakcijespl.htm> [10. 2. 2016 ob 18.50 uri].

[10] Andrej Smrdu, Od molekule do makromolekule, Učbenik za kemijo v 9. razredu osnovne šole, Jutro, 2011.

[11] Dostopno na: <http://www.kii3.ntf.uni-lj.si/analchemvoc2/file.php/1/HTML/slo/spektra/measuringprocedure.htm> [10. 2. 2016 ob 19.02 uri].

[12] Dostopno na: <http://www.sanotest.com/nakup/urin/> [10. 2. 2016 ob 19.10 uri].

[13] Dostopno na: <http://www.orgsyn.org/demo.aspx?prep=CV2P0228> [10. 2. 2016 ob 20.00 uri].

[14] Dostopno na: http://delloyd.50megs.com/organic_reagents.html [10. 2. 2016 ob 17.15 uri].

VIRI SLIK:

Slika 1

Dostopno na: <https://s3.amazonaws.com/ww-article-cache-1/sl/Protin> [4. 1. 2016 ob 18.33 uri].

Slika 2

Dostopno na: <http://www.mpbio.com/product.php?pid=02101423&country=190> [1. 1. 2016 ob 18.14 uri].

Slika 3





Dostopno na: http://www.zeiss.com/spectroscopy/en_de/solutions-applications/Color-measurement.html#color-space [10. 1. 2016 ob 19.00 uri].













Slika 4

Dostopno na: <http://igbiologyy.blogspot.si/2012/12/33-biuret-test-for-proteins.html> [10. 2. 2016 ob 15.55 uri].

7. DODATEK

7.1 OZNAKE ZA NEVARNE SNOVI

Ime kemikalije	Formula	M(g/mol)	Piktogram	H-stavki	P-stavki	CAS
Bakrov(II) sulfat(VI) pentahidrat	$\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	249,68		H315- H302- H319- H410	P302-P352- P273- P305+P351+ P338	7758-99-8
Kalij-natrijev tartarat	$\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \times 4\text{H}_2\text{O}$	282,23	/	/	/	6381-59-5
Natrijev hidroksid	NaOH	40,00		H290- H314	P301+P330+ P331+P280- P305+P351+ P338	1310-73-2
Urea	$\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$	60,06	/	/	/	57-13-6
Etanol	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	46,07		H225	P210	64-17-5
Amonijak	NH_3	17,03		H314- H400- H335	P309+P311- P273- P305+P351+ P338-P280- P301+P330+ P331	1336-21-6

Pikrinska kislina ali 2,4,6- trinitrofenol	$C_6H_3N_3O_7$	229,1	 	H228- H302 + H332- H311	<u>P210-P280-</u> <u>P312</u>	88-89-1
Srebrov nitrat	$AgNO_3$	169,87	  	H410- H272- H314	P273- P301+P330+ P331- P305+P351+ P338-P280	7761-88-8
Metanol	CH_4O	32,04	 	H225- H301- H331- H370- H311	P280-P233- P310-P309- P302+P352- P210	67-56-1
2,4- dinitrofenil- hidrazin	$C_6H_6N_4O_4$	198,14	 	H228- H302	P210- P301+P312+ P330	119-26-6
Žveplova (VI) kislina	H_2SO_4	98,08		H314- H290	P310- P305+P351+ P338-P280- P309- P301+P330+ P331	7664-93-9
Klorovodiko- va kislina	HCl	36,46	 	H315 H319	P264 P280 P305+P351+ P338 P302+P352	7647-01-0

Natrijev bisulfat ali natrijev hidrogensulfat(IV)	NaHSO_4	120,06	/	/	/	7681-38-1
Kreatinin	$\text{C}_4\text{H}_7\text{N}_3\text{O}$	113.11	/	/	/	82016-55-5