

РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ СЕЧОВИНИ У КРОВІ, М'ЯЗОВІЙ ТКАНИНІ ТА ПЕЧІНЦІ СВИНЕЙ

*М. Ф. Кулик¹, д-р с.-г. наук, професор, член-кореспондент НААН,
В. П. Рауцкіс², студент,
Т. Ю. Ткаченко³, аспірант,
Т. О. Дідоренко¹, мол. наук. співробітник,
О. В. Хімич¹, канд. с.-г. наук*

¹Інститут кормів та сільського господарства Поділля НААН,
проспект Юності, 16, м. Вінниця, 21100, Україна

²Вінницький національний медичний університет імені М. І. Пирогова
вул. Пирогова, 56, м. Вінниця, 21000, Україна

³Вінницький національний аграрний університет
вул. Сонячна, 3, м. Вінниця, 21000, Україна

Розроблено новий метод визначення сечовини в плазмі крові, печінці та м'язовій тканині, як критеріїв обміну речовин в організмі тварин та якості продукції. Метод базується на ферментації сечовини під дією уреазу сої з виділенням аміаку, який змінює буферну ємність, тобто величину рН розчину.

Ключові слова: СЕЧОВИНА, ПЛАЗМА КРОВІ, ПЕЧІНКА, М'ЯЗОВА ТКАНИНА, СВИНІ, УРЕАЗА, БУФЕРНА ЄМНІСТЬ, ВЕЛИЧИНА рН.

Визначення сечовини в клініко-діагностичних лабораторіях проводяться різними методами, однак їх можна розділити на три основні групи: газометричні, прямі фотометричні, ферментативні (уреазні). Кожна із вищеперерахованих груп, в свою чергу, включає в себе різноманітні методи, які об'єднані загальним принципом, але відмінні один від одного реактивами, ходом досліджень тощо. При цьому кожен метод має свої переваги та недоліки і може мати особливі вимоги до біологічного матеріалу для досліджень.

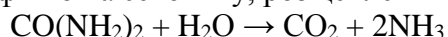
Як правило, тепер більшість лабораторій для визначення сечовини використовують готові набори різних фірм-виробників. В інструкціях до набору зазвичай вказують вимоги до біологічного матеріалу, умови проведення досліджень. При переході з одного методу для визначення сечовини на інший, необхідно ретельно ознайомитися з інструкцією для попередження можливих помилок на всіх етапах лабораторного дослідження.

Підвищення сечовини в крові людей є симптомом серйозних порушень в організмі: захворювання нирок – гломерулонефрит, пієлонефрит, туберкульоз нирок; серцева недостатність; порушення відтоку сечі (пухлина сечового міхура, аденома простати, каміння в сечовому міхурі); лейкоз, злоякісні пухлини, сильні кровотечі; кишкова непрохідність; шок, лихорадка; опіки; непрохідність сечового міхура; гострий інфаркт міокарду.

Підвищення сечовини в крові характеризується рядом симптомів. Однак, вони проявляються лише через деякий час. До найбільш явних відносяться: ламкість волосся і нігтів; сухість шкіри; часті позиви в туалет; підвищення кров'яного тиску; біль в суглобах і загальна слабкість; дефіцит заліза в крові.

Із колориметричних реакцій сечовини найбільш відома реакція Фірона: сечовина утворює з діацетилмонооксидом жовте з'єднання. На цьому засновані методи Нейтельсона, Ормбсі, Форселя і Пальва та ін. [1].

Найбільш надійними, точними і специфічними методами визначення сечовини є ферментні уреазні методи. Уреаза – фермент, який відносно легко отримати із сої. Він діє специфічно на сечовину, розщепленням її на аміак і вуглекислоту:



Аміак, що утворився, можна прямо визначити колориметричним шляхом за допомогою реактива Неслера чи реактива Бертелота після дифузії в чашці Конвея чи в приладі Зелігсона, після дистиляції, електрометрично і ін.

Відомий метод визначення сечовини уреазою по методу Конвея, де аміак, отриманий при розщепленні сечовини під дією уреазу. В чашці Конвея аміак поглинається розчином борної кислоти, а потім титрується 0,004 н. розчином HCl [1].

У ветеринарній медицині визначення сечовини в молоці і в крові використовується як діагностичний тест ниркової недостатності лактуючих корів [2].

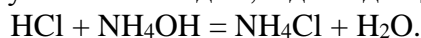
В основу наших досліджень покладено розробку методу визначення сечовини у крові тварин, м'яси і печінці, як критеріїв обміну речовин в організмі та якості продукції.

У наведених вище методиках визначення сечовини в крові базується на уреазному методі, на основі реакції аміаку в лужному середовищі з гіпохлоритом натрію і фенолом. В результаті реакції утворюється індофенол синього кольору (метод Бергло). Запропонований нами метод також базується на ферментації сечовини під дією уреазу сої з виділенням аміаку, який змінює буферну ємність, тобто величину рН розчину.

Методика визначення сечовини у крові. Прилади і реактиви: рН-метр марки рН-150 МИ, водяна баня, бюретки для титрування, набір хімічного посуду, лабораторна піпетка, дистильована вода, 0,1 н та 0,001 н розчин HCl, розчин сої (джерело уреазу).

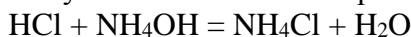
Для приготування розчину сої береться 4 г дрібнопомеленої сої в 100 мл дистильованої води. Розчин настоюється протягом 1 год. для переходу водорозчинних фракцій білків, в тому числі уреазу і проціджується через фільтр-тканину.

Хід визначення. Для визначення сечовини береться проба 2 мл плазми крові і додається 20 мл дистильованої води, заміряється рН і каплями 0,1 н HCl величина рН доводиться до 5,7-5,8 під контролем рН-метра. Уреаза в 10 мл розчину сої змішується з 20 мл дистильованої води, заміряється рівень рН та під контролем рН-метра показник доводиться краплями 0,1 н HCl до рівня 5,7-5,8. Потім змішуємо розчин сої з розчином крові та після змішування визначаємо рН розчину, який в колбочці ставиться на інкубацію у водяну баню при температурі +37 °С на 1 годину при помішуванні через кожні 15 хвилин. Після охолодження заміряється показник рН і титрується 0,001 н. HCl під контролем рН-метра до попередньої величини рН розчину перед інкубацією. Кількість сечовини визначається розрахунковим методом, відповідно до реакції:



Результати й обговорення. Для визначення показників сечовини у плазмі крові на титрування проби пішло в середньому 20 мл 0,001 н HCl (табл. 1). Проби плазми крові знаходилися в холодильнику при температурі +4°C.

Розрахунок визначення вмісту сечовини в плазмі крові, відповідно до реакції:



1000 мл 1 н HCl реагують із 14 г N, тоді 1 мл н HCl відповідає 14 мг N. На титрування витрачено 20 мл 0,001 н HCl. В інкубаційному розчині було 2 мл плазми крові, а потрібно визначити в 100 мл, тобто мг% сечовини, тому 20 мл 0,001 н HCl збільшуємо в 50 разів: 20 мл×50=1000 мл 0,001 н HCl, тоді це буде 1 мл н HCl.

Молекулярна маса сечовини 60 г/моль, а вміст азоту 28 г, звідси 14 мг N буде відповідати $\frac{14 \times 60}{28} = 30$ мг% сечовини в крові свиней.

Вміст сечовини у плазмі крові свиней

№ проби	pH розчину плазми крові з додаванням уреазі (розчину сої) перед інкубацією	pH розчину після 1 год. інкубації	Витрачено 0,001 н НСІ на доведення інкубаційного розчину до попереднього показника pH, мл
1	5,53	5,77	21
2	5,50	5,75	19
3	5,52	5,79	20
4	5,54	5,74	21
5	5,53	5,76	20
6	5,51	5,81	21
7	5,50	5,77	19
8	5,56	5,76	20
9	5,58	5,75	21
10	5,53	5,80	19
X	5,53	5,77	20

Визначення сечовини у м'язовій тканині та печінці. Для визначення сечовини після забою тварин береться гомогенізована наважка 5 г м'язової тканини чи печінки, поміщається в лабораторний стакан і додається 100 мл дистильованої води, суміш розмішуємо і ставимо на електричну лабораторну плитку та кип'ятимо протягом 20 хв. Після чого стакан знімаємо з плитки, охолоджуємо і фіксуємо pH розчину на pH-метрі. До розчину уреазі яку попередньо підготували додається 20 мл дистильованої води, заміряється рівень pH та під контролем pH-метра показник доводиться краплями 0,1 н НСІ до рівня 5,7-5,8. Потім змішуємо розчин сої з розчином м'яса (чи печінки) після кип'ятіння, фіксуємо pH і ставимо на інкубацію при температурі +37 °С на 1 год. при помішуванні через кожні 15 хвилин. Після охолодження заміряється показник pH і титрується 0,001 н НСІ під контролем pH-метра до попередньої величини pH розчину перед інкубацією (табл. 2). Кількість сечовини визначається розрахунковим методом.

Таблиця 2

Вміст сечовини у м'язовій тканині та печінці свиней

№ проби	pH розчину з додаванням уреазі (розчину сої) перед інкубацією	pH розчину після 1 год. інкубації	Витрачено 0,001 н НСІ на доведення інкубаційного розчину до попереднього показника pH, мл
М'язова тканина			
1	5,40	5,70	48
2	5,48	5,73	47
3	5,45	5,71	49
4	5,48	5,72	47
5	5,45	5,70	48
X	5,45	5,71	48
Печінка			
1	5,50	5,71	52
2	5,53	5,76	50
3	5,52	5,75	52
4	5,54	5,77	54
5	5,52	5,75	52
X	5,52	5,75	52

Розраховуємо вміст сечовини в 100 г печінки, тобто мг%. Для нейтралізації аміаку сечовини, що міститься в 5 г печінки витрачено 52 мг 0,001 н НСІ, тоді на 100 г буде $52 \text{ мг} \times 20 = 1040 \text{ мл}$ або 1,040 мл н НСІ. Відповідно реакції $\text{НСІ} + \text{NH}_4\text{OH} = \text{NH}_4\text{Cl} + \text{H}_2\text{O}$ 1 мл 1 н НСІ відповідає 14 мг N, а 1,040 мл н НСІ – $14 \text{ мг} \times 1,040 = 14,560 \text{ мг N}$. Молекулярна маса сечовини – 60 г/моль із вмістом азоту 28 г, тоді 14,560 мг N буде міститися в 30,1 мг сечовини.

Звідси в 100 г печінки буде 30,1 мг% сечовини. Вміст сечовини в м'язовій тканині (м'ясі) розраховується аналогічно та становить 24 мг%.

В И С Н О В К И

Розроблено новий метод визначення сечовини в плазмі крові, печінці та м'язовій тканині, як критерії обміну речовин в організмі тварин та якості продукції. Метод базується на ферментації сечовини під дією уреазы сої з виділенням аміаку, який змінює буферну ємність, тобто величину рН розчину. Встановлено, що у крові свиней вміст сечовини в середньому 30 мг%, у м'язовій тканині (м'ясі) – 24 мг% та печінці –30,1 мг%.

Перспективи досліджень. Результати проведених досліджень визначення сечовини будуть подані для одержання патенту України на винахід та використані для розробки методу визначення сечовини в молоці корів.

DEVELOPMENT OF METHODS OF DETERMINATION UREA IN BLOOD, MUSCULAR FABRICS AND LIVER OF PIGS

M. F. Kulik¹, V. P. Raukskis², T. Yu. Tkachenko³, T. O. Didorenko¹, O. V. Khimich¹

¹Institute of Feed and Agriculture of Podillya of NAAS
16, boulevard Yunosti, Vinnitsa, 21100, Ukraine

²Vinnitsa National Medical University named after M. Pirogov
56, Pirogova str., Vinnitsa, 21000, Ukraine

³Vinnitsa National Agrarian University
3, Sonjachna str., Vinnitsa, 21000, Ukraine

S U M M A R Y

A new method for determining urea in blood (plasma, serum), liver and muscle tissue is developed, as criteria of metabolism in the organism of animals and product quality. The method is based on urea fermentation under the action of urease soybean with the release of ammonia and carbon dioxide, which changes the buffer capacity, that is, the pH of the solution.

Keywords: UREA, BLOOD PLASMA, LIVER, MUSCULAR TISSUE, PIGS, UREASE, BUTTER SOLUTION, pH VALUE.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЧЕВИНЫ В КРОВИ, МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ И ПЕЧЕНИ СВИНЕЙ

М. Ф. Кулик¹, В. П. Рауцкис², Т. Ю. Ткаченко³, Т. О. Дидоренко¹, А. В. Химич¹

¹Институт кормов и сельского хозяйства Подолья НААН,
госп. Юности, 16, г. Винница, 21100, Украина

²Винницкий национальный медицинский университет имени М. И. Пирогова
ул. Пирогова, 56, г. Винница, 21000, Украина

³Винницкий национальный аграрный университет
ул. Солнечная, 3, г. Винница, 21000, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

Разработан новый метод определения мочевины в крови (плазме, сыворотке), печени и мышечной ткани, как критериев обмена веществ в организме животных и качества продукции.

Метод основан на ферментации мочевины под действием уреазы сои с выделением аммиака и углекислого газа, который меняет буферную емкость, то есть величину рН раствора.

Ключевые слова: МОЧЕВИНА, ПЛАЗМА КРОВИ, ПЕЧЕНЬ, МЫШЕЧНАЯ ТКАНЬ, СВИНЬИ, УРЕАЗА, БУФЕРНАЯ ЕМКОСТЬ, ПОКАЗАТЕЛЬ рН

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Тодоров Й.* Клинические лабораторные исследования в педиатрии / Й. Тодоров // София: Медицина и физкультура, 1966. – 1038 с.

2. *Влізла В. В.* Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині / В. В. Влізла, Р. С. Федорук, І. Б. Ратич // Довідник: за ред. В. В. Влізла. Львів: Сполом, 2012. – 764 с.

Рецензент – В. П. Жуков, к. с.-г. н., завідувач лабораторії технології заготівлі та використання кормів Інституту кормів та сільського господарства Поділля НААН.