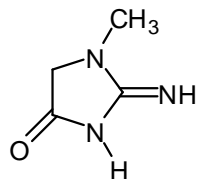


# Oznaczanie kreatyniny w płynach ustrojowych metodą z udziałem pikrynianu

## Wprowadzenie

Kreatynina jest pochodną kreatyny, bezwartościowym produktem metabolizmu białek w mięśniach.



Występuje w krwi oraz moczu, jest obok mocznika jednym z gł. związków azotowych wydalanych z organizmu, a stopień wydalania wiąże się z wielkością masy mięśniowej organizmu i zazwyczaj jest wyższy u mężczyzn niż u kobiet. Zbyt duże stężenie kreatyniny we krwi może doprowadzić do nieodwracalnego uszkodzenia nerek.

Poziom kreatyniny w surowicy lub moczu oznacza się podczas rutynowych badań okresowych i jest on wypadkową produkcji i wydalania tego związku, zależną od filtracji kłębuszkowej, wobec czego klirens kreatyniny jest bardzo dobrym wskaźnikiem funkcji nerek.

## Cel ćwiczenia:

*Celem ćwiczenia jest oznaczenie zawartości kreatyniny w płynach ustrojowych zmodyfikowaną metodą Jaffe'go, bez odbiałczania. W metodzie tej wykorzystuje się zdolność kreatyniny do wiązania z pikrynianami w środowisku zasadowym, w wyniku czego powstaje kompleks o żółto-czerwonym zabarwieniu. Ilość utworzonego kompleksu jest proporcjonalna do zawartości kreatyniny w badanej próbce. Oznaczenia absorbancji wykonuje się wobec próby kontrolnej przy 500nm.*

## Sprzęt i materiały:

- Wzorcowy roztwór kreatyniny o stężeniu 2 mg/dl (177 μmol/l)  
3-STANDARD,
- Surowica krwi ludzkiej,

- Zestaw diagnostyczny do oznaczania stężenia kreatyniny *Lquick Cor-CREATININE* składa się z dwóch oddzielnych odczynników *1-CREATININE* i *2-CREATININE*. Skład i stężenie składników w odczynniku roboczym :
  - Wodorotlenek sodu 300 mmol/l
  - Bufor węglanowy 100 mmol/l
  - Kwas pikrynowy 6,5 mmol/l
- 6 Probówek typu eppendorf,
- Pipety automatyczne, końcówki do pipet,
- 1 Kuweta polistyrenowa (poj. 800  $\mu$ l) do pomiarów spektrofotometrycznych (d = 10 mm),
- Wytrząsarka typu Vortex,
- Spektrofotometr UV-Vis SP-830 *PLUS*.

### **Wykonanie ćwiczenia:**

1. Próba wzorcowa: do probówki typu eppendorf dodać 1 ml odczynnika 1-CREATININE. Pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej. Następnie dodać 100 $\mu$ l roztworu wzorcowego. Dokładnie wymieszać i dodać 250 $\mu$ l odczynnika 2-CREATININE. Wymieszać i przenieść 800  $\mu$ l roztworu do kuwetki. Dokładnie po upływie 30 sek. od dodania odczynnika 2-CREATININE odczytać absorbancję A1 próby wzorcowej wobec powietrza przy długości fali 500 nm. Następnie, nie wyjmując kuwetki, dokładnie po 1 min. powtórzyć odczyt A2 próby wzorcowej. Pomiar wykonać trzykrotnie.
2. Próbka badana: do probówki typu eppendorf dodać 1 ml odczynnika 1-CREATININE. Pozostawić do osiągnięcia temperatury pokojowej. Następnie dodać 100 $\mu$ l roztworu wzorcowego. Dokładnie wymieszać i dodać 250 $\mu$ l odczynnika 2-CREATININE. Wymieszać i przenieść 800  $\mu$ l roztworu do kuwetki. Dokładnie po upływie 30 sek. od dodania odczynnika 2-CREATININE odczytać absorbancję A1 próby badanej wobec powietrza przy długości fali 500 nm. Następnie, nie wyjmując kuwetki, dokładnie po 1 min. powtórzyć odczyt A2 próby wzorcowej. Pomiar wykonać trzykrotnie.

Składnik próbki \ Próba	Wzorcowa (PW)	Badana (PB)
1-CREATININE	1000µl	1000µl
Ogrzać do temperatury 25°C. Następnie dodać:		
Roztwór wzorcowy	100µl	---
Roztwór badany	---	100µl
Dokładnie wymieszać i dodać:		
2-CREATININE	250µl	250µl
Dokładnie wymieszać i przenieść 800 µl roztworu do kuwetki. Dokładnie po upływie 30 sek. od dodania odczynnika 2-CREATININE odczytać absorbancję A1 próby wzorcowej i badanej wobec powietrza przy długości fali 500 nm. Następnie, nie wyjmując kuwetki, dokładnie po 1 min. zmierzyć absorbancję A2 próby wzorcowej i badanej.		

### **Opracowanie wyników:**

- Obliczyć  $\Delta A = A2 - A1$  dla obydwu prób;
- Obliczyć stężenie kreatyniny w badanej próbce korzystając ze wzoru:

$$\text{Stężenie kreatyniny} = \Delta A(\text{PB}) / \Delta A(\text{PW}) \times \text{stężenie wzorca}$$

### **WARTOŚCI PRAWDŁOWE**

Surowica, osocze	kobiety	0,6-1,1 mg/dl (53-97 µmol/l)
	mężczyźni	0,7-1,3 mg/dl (62-115 µmol/l)
Mocz: zbiórka dobową	kobiety	11-20 mg/kg/24h (97-177 µmol/kg/24h)
	mężczyźni	14-26 mg/kg/24h (124-230 µmol/kg/24h)

Zalecane jest opracowanie przez każde laboratorium własnych zakresów wartości prawidłowych charakterystycznych dla lokalnej populacji.

- Przeprowadzić analizę statystyczną wyników, obliczając średnią zawartość kreatyniny w próbce, odchylenie standardowe oraz procentowy błąd oznaczenia.

### **Literatura uzupełniająca:**

1. W. Szczepaniak, *Metody instrumentalne w analizie chemicznej*, PWN Warszawa 1996.
2. L. Klyszejko-Stefanowicz, *Ćwiczenia z biochemii*, PWN Warszawa 1999.
3. L. Stryer, *Biochemia*, PWN Warszawa 1999.

### **Zagadnienia:**

1. kreatynina (budowa, poznanie zagrożeń wynikających z zachwiania równowagi kreatyniny w organizmie, kolorymetryczna metoda Jaffe'go).
2. Spektrofotometria UV-Vis (prawa absorpcji i odchylenia od tych praw, aparatura).
3. Opracowanie wyników i ich ocena statystyczna.