

jména:	
obor:	datum provedení:
neznámý vzorek močoviny pro kvantitativní analýzu a b c d e f g h (zakroužkujte)	

přílohy protokolu:

graf (kalibrační přímka pro stanovení koncentrace amonných iontů Nesslerovým činidlem)
graf (závislost % konverze močoviny na době enzymové reakce)

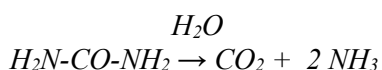
OKRUHY K PŘÍPRAVĚ

Ureasová reakce, princip stanovení koncentrace močoviny. Lambertův-Beerův zákon. Chemické výpočty.

PRINCIP ÚLOHY

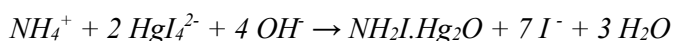
A. Stanovení koncentrace močoviny pomocí ureasy.

Ureasa (karbamid-amido-hydrolasa) je substrátově vysoce specifický enzym katalyzující hydrolytický rozklad močoviny za vzniku oxidu uhličitého a amoniaku:



Ureasa se vyskytuje v rostlinách a mikroorganismech, u vyšších živočichů nebyla nalezena. Pomocí ureasou katalyzované reakce lze stanovit množství **močoviny** ve vzorku jako množství vznikajícího **amoniaku**. Podmínkou je, aby reakce probíhala dostatečně dlouhou dobu tak, aby došlo k ustanovení rovnováhy mezi močovinou a produktem. Pro stanovení koncentrace močoviny v neznámém vzorku je ovšem nejprve nutné zjistit, jaký je stupeň konverze močoviny v reakci.

Amoniak uvolněný ureasovou reakcí lze stanovit buďto titračně, anebo fotometricky po jeho reakci s Nesslerovým činidlem (tetrajodortuťnatanem):



Vzniklý reakční produkt má absorpční maximum při vlnové délce **436 nm**. Jako standard pro stanovení koncentrace amonných iontů lze použít síran amonný, který poskytuje dva amonné ionty stejně jako rozklad močoviny, stechiometrie je tedy 1:1.

Stanovení koncentrace močoviny v tělních tekutinách má význam pro posouzení funkce ledvin (denní produkce močoviny u člověka je 20 - 25 g). U zdravého jedince je koncentrace močoviny v krevním séru v rozmezí 2,5 - 8,3 mmol/l.

Stanovujeme-li aktivitu enzymu, je potřeba pracovat za podmínek nasycení enzymu substrátem – v reakční směsi musí být nadbytek substrátu. V opačném případě, kdy stanovujeme množství substrátu, je naopak vhodnější pracovat za podmínek nadbytku enzymu v reakční směsi – urychlí se tak průběh konverze stanovovaného substrátu na produkt.

PRAKTICKÁ ČÁST A. Stanovení koncentrace močoviny pomocí ureasy.

Materiál a vybavení:

standardní roztok síranu amonného (0,1 mmol.l⁻¹)

standardní roztok močoviny (20 mmol.l⁻¹)

roztok močoviny o neznámé koncentraci

0,1 mol.l⁻¹ fosfátový pufr pH 7,0

ureasa - 1 % roztok v 30 % ethanolu

Nesslerovo činidlo (roztok tetrajodortuřnatanu draselného v hydroxidu sodném)

zkumavky, pipety, dávkovače, stopky, temperovaná vodní lázeň, fotometr

Nesslerovo činidlo je toxické - pracujte se zvýšenou opatrností!

Postup:

Sestrojení kalibrační závislosti pro stanovení koncentrace amoniaku:

Nachystejte si sadu 6 zkumavek, které důkladně vypláchnete destilovanou vodou. Podle tabulky připravte sadu šesti roztoků o celkovém objemu 5 ml a známé koncentraci síranu amonného k sestrojení kalibrační přímky (zkumavky 1-6). Zkumavka č. 1 síran amonný neobsahuje, proto se použije jako slepý vzorek.

zkumavka č.	pipetovaný objem		vypočtená c (NH ₄) ₂ SO ₄ [mmol.l ⁻¹]	vypočtená c NH ₄ ⁺ [mmol.l ⁻¹]	A ₄₃₆
	0,1 mmol.l ⁻¹ roztok (NH ₄) ₂ SO ₄ [ml]	destilovaná voda [ml]			
1	0,0	5,0	0,00	0,00	0,000
2	1,0	4,0			
3	2,0	3,0			
4	3,0	2,0			
5	4,0	1,0			
6	5,0	0,0			

Do všech zkumavek pipetujte 0,2 ml Nesslerova činidla. Obsah zkumavek promíchejte na vortexu a po 10 minutách stání při laboratorní teplotě změřte absorbanci vzorků při vlnové délce 436 nm proti slepému vzorku č. 1 (roztoky po měření vracejte do zkumavek) a výsledky zapište do tabulky. Přesáhne-li absorbance některého z roztoků hodnotu 0,8 (nad touto hodnotou již není závislost absorbance na koncentraci lineární a neplatí Lambert-Beerův zákon) připravte příslušný roztok znovu, případně bod z kalibrace vynechte.

Stanovení koncentrace močoviny ureasovou reakcí:

Připravte si sadu 14 označených zkumavek – pipetujte do každé 0,2 ml Nesslerova činidla.

Připravte si další dvě čisté zkumavky: do první z nich pipetujte 2 ml **standardního** roztoku močoviny a 1 ml fosfátového pufru, do druhé 2 ml **neznámého** roztoku močoviny a 1 ml fosfátového pufru. Zkumavky označte a nechejte vytemperovat v termostatu na teplotu 30 °C. Poté v nich startujte enzymovou reakci přidávkem 1 ml roztoku ureasy: směs důkladně promíchejte na vortexu, zkumavky vraťte do termostatu a zapněte si stopky.

V časových intervalech 5, 10, 15, 20 a 25 minut proveďte vždy **dva paralelní** odběry **pouze** ze vzorku se **standardním roztokem** močoviny a v čase 30 minut proveďte **dva paralelní** odběry ze vzorku se **standardním i neznámým roztokem** močoviny: reakční směs vždy promíchejte a odpipetujte 50 µl směsi do zkumavky s Nesslerovým činidlem (ukončí enzymovou reakci). Vzorky promíchejte, po 10 minutách stání při laboratorní teplotě k nim přidejte 4,95 ml vody (co nejpřesněji – zdroj chyb), opět promíchejte a změřte absorbanci vzorků při vlnové délce 436 nm proti slepému vzorku (slepý vzorek připravte smícháním 5 ml vody a 0,2 ml Nesslerova činidla).

zkumavka č.	50 µl reakční směsi (se standardním vzorkem močoviny) odebrané v čase: [min]	A_{436}	$\emptyset A_{436}$
1, 2	5		
3, 4	10		
5, 6	15		
7, 8	20		
9, 10	25		
11, 12	30		
zkumavka č.	50 µl reakční směsi (s neznámým vzorkem močoviny) odebrané v čase: [min]	A_{436}	$\emptyset A_{436}$
13, 14	30		

Vyhodnocení:

Srovnáním absorbance standardního a neznámého vzorku po uplynutí 30 minut (s oběma vzorky se pracovalo stejným postupem) vypočítejte koncentraci močoviny v neznámém vzorku (v obou případech předpokládejte stejné % konverze močoviny – tedy ho při výpočtu neberte v úvahu):

$$c = \quad \text{mmol.l}^{-1}$$

Vypočítejte koncentrace síranu amonného a amonných iontů ve zkumavkách č. 2-6, výsledky doplňte do tabulky v části Postup. Sestrojte **kalibrační graf** (závislost A_{436} na koncentraci amonných iontů ve zkumavce).

Vypočítejte teoretickou koncentraci **amonných iontů v reakční směsi** obsahující standardní vzorek močoviny na konci reakce v případě 100 % konverze močoviny na amoniak (vezměte v úvahu stechiometrii ureasové reakce):

$$c = \quad \text{mmol.l}^{-1}$$

Dále vypočítejte teoretickou koncentraci amonných iontů ve vzorku, který vznikl zředěním reakční směsi obsahující standardní vzorek močoviny vodou (ředění Nesslerovým činidlem neberte v úvahu):

$$c = \quad \text{mmol.l}^{-1}$$

Z kalibrační závislosti pro stanovení koncentrace amonných iontů zjistěte absorbanci (A_{436}) odpovídající této koncentraci amonných iontů, čímž získáte absorbanci odpovídající 100% konverzi močoviny:

$$A_{436} = \quad .$$

Srovnáním absorbancí standardního vzorku močoviny stanovených v různých časových intervalech s hodnotou absorbance odpovídající 100% konverzi močoviny vypočítejte skutečné % konverze močoviny v průběhu enzymové reakce.

Dále **sestrojte graf** závislosti % konverze močoviny na době enzymové reakce.

Doba ureasové reakce: [min]	konverze močoviny [%]
0	0
5	
10	
15	
20	
25	
30	

KONTROLNÍ LIST

jména:	
obor:	datum provedení:
neznámý vzorek močoviny pro kvantitativní analýzu a b c d e f g h (zakroužkujte)	

ÚLOHA 10A

zkumavka č.	1	2	3	4	5	6
A ₄₃₆	0,000					

podpis vedoucího cvičení:

zkumavka č.	50 µl reakční směsi (se standardním vzorkem močoviny) odebrané v čase: [min]	A ₄₃₆	
1, 2	5		
3, 4	10		
5, 6	15		
7, 8	20		
9, 10	25		
11, 12	30		
zkumavka č.	50 µl reakční směsi (s neznámým vzorkem močoviny) odebrané v čase: [min]	A ₄₃₆	
13, 14	30		

podpis vedoucího cvičení: