

3. ANALIZA JAKOŚCIOWA ELEKTROLITÓW PŁYNÓW USTROJOWYCH

1. Wykrywanie nieorganicznych anionów w moczu

1.1. Wykrywanie anionów chlorkowych

Zasada:

Aniony chlorkowe są podstawowymi elektrolitami w płynach ustrojowych. Wraz z jonami sodowymi odgrywają główną rolę w utrzymaniu ciśnienia osmotycznego i utrzymaniu wody w organizmie. Szczególnie wysokie stężenie chlorków (oraz jonów wodorowych) występuje w soku żołądkowym. Zawartość jonów chlorkowych w moczu w dużym stopniu zależy od ilości przyjmowanego chlorku sodu z pokarmem. W zaburzeniach równowagi kwasowo-zasadowej organizmu jony chlorkowe równoważą przesunięcia stężeń jonów wodorowęglanowych. Aniony chlorkowe są aktywatorami amylazy, pod tym względem są wyjątkowe, ponieważ aniony mają raczej mały wpływ na aktywność enzymów. W żołądku produkowany jest HCl w stałym stężeniu około 0,5%, który stwarza optymalne środowisko kwaśne dla aktywacji pepsynogenu do pepsyny i utrzymania aktywności tego enzymu (pH 1,5–2). Stężenie chlorków w organizmie zmienia się zazwyczaj równocześnie ze stężeniem jonu sodowego. Do zmniejszenia stężenia anionów chlorkowych w organizmie dochodzi w uporczywych wymiotach i biegunkach, a do wzrostu stężenia w niektórych zasadowicach. Aniony chlorkowe w środowisku kwaśnym są strącane jonami srebra w postaci chlorku srebra, który jest trudno rozpuszczalny w wodzie oraz rozcieńczonym HNO_3 , dlatego wypada z roztworu w postaci białego, serowatego osadu. Biały osad chlorku srebra czernieje pod wpływem światła, na skutek wytrącenia metalicznego srebra. Chlorek srebra rozpuszczalny jest natomiast w amoniaku, z którym tworzy związek kompleksowy, chlorek diammonosrebrowy $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]\text{Cl}$.

Wykonanie:

- Do 1 ml moczu dodać 2 krople stężonego HNO_3 , a następnie dodawać kroplami 0,1 M roztwór AgNO_3 , aż do wytrącenia się charakterystycznego białego osadu AgCl . Zapisać równanie reakcji.

1.2. Wykrywanie anionów siarczanowych

Zasada:

Aniony siarczanowe obecne w moczu występują głównie jako wolne jony (ok. 90%), nieznaczna część (ok. 10%) jest połączona estrowo z różnymi związkami organicznymi, np. cukrami, steroidami, fenolami. Jony siarczanowe nadają polianionowy charakter specyficznym heteroglikanom, tzw. glikoaminoglikanom, których powszechnym przedstawicielem jest heparyna. Siarczany uczestniczą też w procesach detoksykacji. Znaczna część jonów siarczanowych obecnych w moczu pochodzi z przemian aminokwasów siarkowych. Wolne aniony siarczanowe w środowisku kwaśnym są strącane jonami baru w postaci siarczanu baru, który jest trudno rozpuszczalny w wodzie, rozcieńczonym HNO_3 lub HCl , nawet na gorąco, dlatego wypada z roztworu w postaci białego osadu. Siarczan baru jest rozpuszczalny w stężonym kwasie siarkowym. Aniony siarczanowe obecne w połączeniach organicznych, dopiero po hydrolizie mogą uczestniczyć w tej reakcji.

Wykonanie:

- Do 5 ml moczu dodać 3 krople 2 M roztworu HCl , a następnie 1 ml 5% roztworu BaCl_2 . Zaobserwować powstawanie osadu.
- Wytrącony osad BaSO_4 odsączyć przez sączonej karbowany umieszczony na lejku lub odwirować w wirówce laboratoryjnej przy 2000 obr./min przez 5 minut.
- Do przesączu (supernatantu) dodać 1 ml stężonego HCl , po czym ogrzewać 10 minut we wrzącej łaźni wodnej.
- Próbę schłodzić pod bieżącą wodą i dodać 1 ml 5% roztworu BaCl_2 . Zaobserwować powstawanie osadu. Zinterpretować uzyskane wyniki. Zapisać równania reakcji.

1.3. Wykrywanie anionów fosforanowych

Zasada:

Fosforany I- i II-rzędowe tworzą się podczas hydrolizy estrów fosforanowych. Są składnikami buforu fosforanowego przestrzeni wewnątrzkomórkowej, który stanowi 6% pojemności buforowej krwi. W krwi przeważa czterokrotnie fosforan II-rzędowy HPO_4^{2-} nad fosforanem I-rzędowym H_2PO_4^- . W moczu ostatecznym stosunek ten jest odwrócony, dlatego tworzą bufor o pH przesuniętym w kierunku kwaśnym. Zmiana tego stosunku następuje w przesączu pierwot-

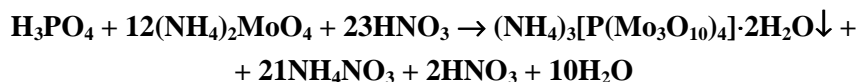
nym w wyniku zamiany fosforanu II-rzędowego w I-rzędowy podczas zaoszczędzania zasad w nerkach:



Fosforany w moczu alkalicznym łatwo reagują z obecnymi w moczu jonami wapniowymi i magnezowymi, tworząc nierozpuszczalne sole, będące częstą przyczyną powstawania kamieni moczowych. Wykrywanie jonów fosforanowych opiera się na ich wytrącaniu w obecności amoniaku i jonów magnezowych w postaci kryształów fosforanu amonowo-magnezowego:



Kwas ortofosforowy reaguje z molibdenianem amonowym w środowisku stężonego kwasu azotowego (V), tworząc żółty, krystaliczny osad soli amonowej kwasu molibdenofosforowego, czyli fosfomolibdenian amonowy, który jest rozpuszczalny w wodorotlenkach i amoniaku.



Produkt podstawienia atomów tlenu w H_3PO_4 resztami trimolibdenianowymi ($\text{Mo}_3\text{O}_{10}^{2-}$) traktuje się jako kwas molibdenofosforanowy. Zasada tej metody jest również podstawą ilościowego oznaczania fosforanów analizą wagową. Oznaczania fosforanów za pomocą molibdenianu amonowego nie można stosować w obecności arsenianów, ponieważ dają podobny osad.

Wykonanie:

- 2 ml moczu zakwasić 5 kroplami stężonego HNO_3 , następnie dodawać kroplami 10% roztwór molibdenianu amonowego do wytrącenia się jasnożółtego osadu fosfomolibdenianu amonowego.
- Sprawdzić, czy osad ten rozpuszcza się w wodorotlenkach.

1.4. Wykrywanie jonów wodorowęglanowych

Zasada:

Jon wodorowęglanowy jest składnikiem buforu wodorowęglanowego przestrzeni zewnątrzkomórkowej, który stanowi 70% pojemności buforowej krwi. Choć jon wodorowęglanowy przesącza się z krwi do moczu pierwotnego, to w warunkach fizjologicznych prawie całkowicie resorbowany jest zwrotnie do krwi, dlatego w moczu ostatecznym nie stwierdza się jego obecności. Wyjątek stanowi zasadowica metaboliczna, w której znacznie wzrasta zawartość wodorowęglanów w krwi, skutkiem czego jest wzrost ich poziomu w moczu osta-

tecznym. Obecność jonów wodorowęglanowych można stwierdzić na podstawie wydzielania się banieczek gazu po zakwaszeniu moczu.

Wykonanie:

Do 2 ml moczu dodać 5 kropli stężonego HNO_3 , po czym dodawać kroplami 0,25 M roztwór H_2SO_4 , aż do pojawienia się pęcherzyków gazu. Zapisać równanie reakcji.

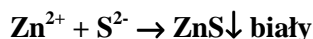
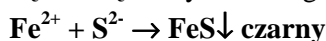
2. Wykrywanie nieorganicznych kationów w surowicy

2.1. Wykrywanie jonów żelazawych Fe^{2+}

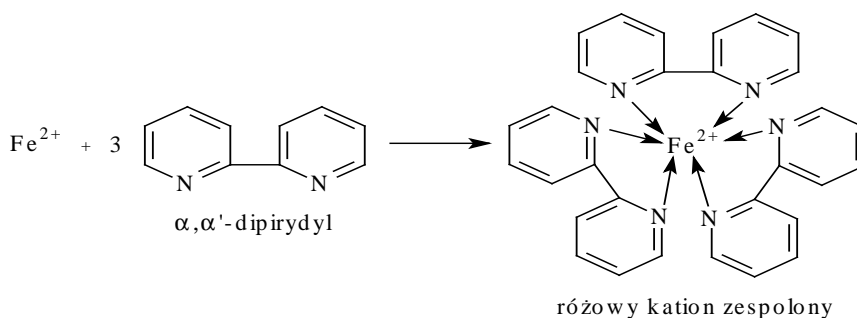
Zasada:

Roztwory wodne soli Fe^{+2} są zielono zabarwione. Wszystkie związki zawierające Fe^{+2} są mobilne, lecz mało stabilne. Praktycznie tylko kationy Fe^{+2} mogą ulegać wchłanianiu w przewodzie pokarmowym. Kationy żelazawe są składnikami hemu niektórych hemoprotein, mianowicie hemoglobiny, oksyhemoglobiny, mioglobiny i oksymoglobiny.

Jony Fe^{2+} i Fe^{3+} , obok Zn^{2+} i innych, należą do kationów III grupy analitycznej, dla której odczynnikiem grupowym jest zasadowy roztwór siarczku amonowego $(\text{NH}_4)_2\text{S}$. Kationy te strącają się odczynnikiem grupowym jako siarczki:



Reakcja charakterystyczna dla jonów Fe^{2+} z α, α' -dipirydylem w środowisku kwaśnym dostarcza różowego kationu zespolonego:



Powstawanie tego barwnego jonu może być nie tylko podstawą wykrywania jonów Fe^{2+} , lecz jest także podstawą metody kolorymetrycznej ilościowego oznaczenia Fe^{2+} w surowicy. Utrzymywanie żelaza w postaci jonu dwuwartościowego zapewnia obecność siarczynu sodowego.

Wykonanie:

- Do 0,5 ml surowicy dodać:
 - 0,5 ml 2,5% roztworu Na₂SO₃,
 - 0,5 ml 0,1% roztworu α,α'-dipirydylu w 3% kwasie octowym. Wymieszać i wstawić do wrzącej łaźni wodnej na 5 minut.
- O obecności jonów Fe²⁺ świadczy pojawienie się różowego zabarwienia w próbce.

2.2. Wykrywanie jonów żelazowych Fe³⁺

Zasada:

Roztwory wodne soli Fe³⁺ mają zabarwienie żółte w przeciwieństwie do zielono zabarwionych roztworów soli Fe²⁺. Kationy żelazowe występują w hemie met-hemoglobiny, w peroksydazie i katalazie. Funkcjonalna zmiana stopnia utlenienia z Fe³⁺ na Fe²⁺ ma miejsce w hemie cytochromów. Żelazo transportowane jest przez białko transferynę, a magazynowane w ferrytynie i w postaci hemosyderyny (fosforanu żelazowego). W obojętnym pH sole Fe³⁺ są trudno rozpuszczalne, mała ich ilość występuje w formie uwodnionych jonów, dlatego niska ilość Fe³⁺ może zostać wchłonięta do organizmu. Z odczynnikami grupowym kationy Fe³⁺ tworzą czarny osad Fe₂S₃:



Reakcja charakterystyczna dla jonów Fe³⁺ z tiocyjanianem (rodankiem) amonowym lub potasowym dostarcza krwistoczerwonego rodanku żelazowego:



Reakcja ta jest bardzo czuła i pozwala odróżnić jony Fe³⁺ od jonów Fe²⁺, które nie dają tej reakcji. Wykorzystywana jest do wykrywania i miareczkowego lub kolorymetrycznego oznaczania żelaza. W środowisku zasadowym jony Fe³⁺ tworzą z kwasem sulfosalicylowym związek kompleksowy o barwie żółtej.

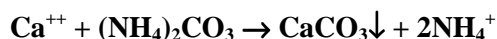
Wykonanie:

Do 0,1 ml surowicy dodać 2 krople 20% roztworu kwasu sulfosalicylowego, a następnie zalkalizować stężonym amoniakiem (4 krople). Powstaje kompleks o żółtym zabarwieniu.

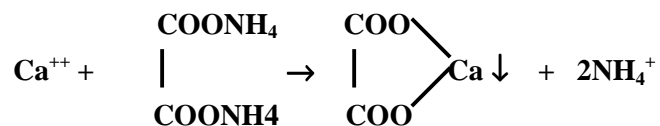
2.3. Wykrywanie kationów wapnia

Zasada:

Wolne jony wapnia są fizjologicznie aktywne, w tej formie występuje około 50% wapnia w surowicy krwi. Jony wapnia mogą być również związane z białkami, tę formę ma około 40% wapnia w surowicy. Poza tym wspomniany pierwiastek może mieć postać rozpuszczalnych fosforanów i cytrynianów. Jony wapnia należą do IV grupy analitycznej kationów, dla której odczynnikiem grupowym jest węglan amonowy. Wszystkie kationy grupy IV (Ca^{++} , Ba^{++} , Sr^{++}) wytrącają się pod wpływem odczynnika grupowego w postaci białych osadów węglanów.



Reakcja charakterystyczna dla jonów Ca^{++} polega na ich wytrącaniu w postaci szczawianu wapnia, białego osadu krystalicznego. Osad szczawianu wapnia jest rozpuszczalny w kwasie siarkowym i innych kwasach mineralnych, natomiast nierozpuszczalny w kwasie octowym, czym różni się od osadu np. szczawianu baru.



Wiele metod hamowania krzepnięcia krwi opiera się na wytrącaniu jonów wapnia w postaci szczawianów, bądź na usuwaniu jonów wapnia w postaci kompleksów z cytrynianem albo wersenianem (EDTA).

Wykonanie:

- Do dwóch probówek wprowadzić po 0,5 ml surowicy, dodać kroplami nasyconego roztworu szczawianu amonu, aż do wytrącenia się białego osadu szczawianu wapnia w obu probówkach.
- Osady odwirować w wirówce laboratoryjnej przy 3000 obr./min przez 5 min. Supernatanty odlać do zlewu.
- Do jednej probówki wprowadzić 1 ml 1 M kwasu octowego, do drugiej 1 ml 1 M kwasu siarkowego, w celu sprawdzenia rozpuszczalności osadu szczawianu wapnia. Zapisać równania reakcji.

ODCZYNNIKI

HNO₃ stężony, HCl stężony, 2 M HCl, 1 M H₂SO₄, 0,2 M H₂SO₄, 1 M CH₃COOH, 20% kwas sulfosalicylowy, amoniak stężony, nasycony roztwór (COONH₄)₂, 1 M AgNO₃, 5% BaCl₂, 10% (NH₄)MoO₄ (rozpuścić 10 g molibdenianu amonu w 50 ml H₂O, do zawiesiny dodać niewielką ilość amoniaku do wyklarowania się roztworu, po czym roztwór wlać powoli, mieszając, do 50 ml kwasu azotowego; po upływie tygodnia odsączyć wydzielony osad), 2 M NaOH, 2,5% Na₂SO₃, 0,1% α,α'-dipirydył w 3% CH₃COOH. Materiał biologiczny: surowica wołowa, mocz.

NOTATKI