

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ОСНОВНИХ ОРГАНІЧНИХ СКЛАДОВИХ СЕЧІ ЛЮДИНИ

Отримані спектральні залежності показника поглинання (екстинкції) для основних органічних складових сечі у спектральному інтервалі $\lambda=190\text{--}320$ нм. Використовуючи літературні дані їх концентрації в сечі здорової людини, розраховано спектральну залежність оптичної густини для "середньої" сечі, яка порівнюється з експериментально виміряними спектрами поглинання добових проб сечі здорових і хворих легеневою формою туберкульозу пацієнтів.

Got spectral dependences of index of absorption for the basic organic constituents of urine in the spectral interval of $\lambda=190\text{--}320$ nm. Using literary information on their concentration in urine of healthy man, spectral dependence of optical density is expected for "middle" urine which is compared to the experimentally measured spectrums of absorption of day's tests of urine of healthy and sick by the pulmonary form of tuberculosis of patients.

Вступ

Відомо [1,2], що сеча здорової людини у нормі містить біля п'ятнадцяти вільних α -амінокислот L -ряду в невеликих кількостях (їх загальна концентрація C у середньому порядку $(60\text{--}80)\cdot 10^{-3}\%$), сечову кислоту ($C\approx(60\text{--}100)\cdot 10^{-3}\%$), креатинин ($C\approx(70\text{--}150)\cdot 10^{-3}\%$) і сечовину ($C\approx(1500\text{--}2000)\times 10^{-3}\%$), що складає $\approx 2\text{--}2,5\%$ від її маси. Крім того, 96% сечі – це вода і 1,5–2,0%, розчинені в ній неорганічні солі.

Оскільки сеча – це продукт обміну речовин в організмі людини, то при багатьох захворюваннях (наприклад, цукровому діабеті, нефриті, гепатиті та ін.) в ній можуть з'являтися інші органічні складові: білки, білірубін та ін. Позаяк оптичні методи абсорбційного спектрального аналізу малоєфективні через багатоконпонентність досліджуваного біологічного середовища, в медичній практиці розроблені та широко використовуються типові біохімічні методи аналізу сечі (наприклад, форма №210/у). Однак багато захворювань людини не приводять до виділення з сечею вказаних вище компонентів і, відповідно, не можуть бути діагностувані типовими методами аналізу. В цих випадках сеча за складом органічних речовин подібна до сечі здорової людини, але при цьому можливі зміни кількісних співвідношень між її основними органічними складовими, що є додатковим тестом при діагнос-

тиці захворювань. Щоб визначити такі кількісні зміни, необхідно здійснити кількісний аналіз сечі на її органічні складові. Оскільки органічних складових сечі небагато, то виникає цілком реальна можливість розробки оптичного методу абсорбційного спектрального аналізу, що й є метою даної роботи.

Об'єкти експериментальних досліджень

Об'єкти експериментальних досліджень – розчини в дистильованій воді всіх органічних складових сечі здорової людини: α -амінокислоти, сечовина, сечова кислота та креатинин. Відомо [3], що їх поглинання знаходиться в ультрафіолетовій області спектра ($\lambda < 350$ нм), тоді як дистильована вода й розчинені в ній неорганічні солі практично не поглинають і не впливають на характер спектра поглинання у цій області спектра.

Виміри проводились на спектрофотометрі СФ-46, в якого замість фотометричної голівки із сурьмяно-цезієвим фотоелементом використовується ФЭУ-39 з електронно-реєструючим блоком. Це істотно підвищує чутливість установки в області спектра $\lambda=190\text{--}250$ нм, що дає можливість проводити вимірювання через кожні 5 нм при спектральній ширині вихідної щілини 1,5–2,0 нм. Досліджувані розчини містилися у кварцовій кюветі товщиною $d=1$ см, а виміри проводилися відносно еталонного "нульового" середовища, в якості яким була дистильована

вода в кюветі. Коефіцієнт пропускання τ вимірювався, а оптична густина розраховувалася за співвідношенням:

$$D = -\lg \tau.$$

Вимірювання залежності $D=f(\lambda)$ у спектральному діапазоні $\lambda=190-350$ нм проводилися для 5-7 різних концентрацій кожної з органічних складових сечі. Як приклад, наведені залежності $D=f(\lambda)$ для сечовини (крива 2 на рис.1) і для сечової кислоти (крива 3 на рис.1). В їх спектрах поглинання спостерігаються три максимуми: короткохвильовий при $\lambda=195-200$ нм, середньохвильовий при $\lambda=227-235$ нм і довгохвильовий при $\lambda=270$ нм (для сечовини), $\lambda=290$ нм (для сечової кислоти). Останні відрізняються не тільки місцем розташування у спектрі поглинання, але й інтенсивністю поглинання: для сечової кислоти оптична густина тут істотно більш, ніж у середньохвильовому максимумі.

В аналогічних дослідженнях для інших органічних складових сечі виявили таке:

➤ в спектрі поглинання тирозину теж спостерігається три максимуми, інтенсивність яких зменшується зі збільшенням довжини хвилі. Середньохвильовий максимум, на відміну від двох попередніх складових, знаходиться при $\lambda=220$ нм, а довгохвильовий, як і для сечовини – при $\lambda=275$ нм, що цілком відповідає літературним даним [4,5];

➤ для спектрів поглинання всіх інших присутніх у сечі амінокислот і креатинина характерна наявність одного максимуму при $\lambda=195-200$ нм. З ростом довжини хвилі їх поглинання швидко спадає і при $\lambda>240$ нм воно практично дорівнює нулеві.

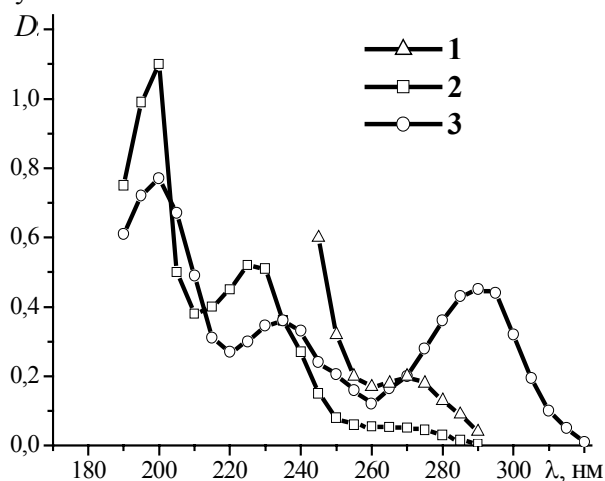


Рис. 1. Залежність оптичної густини D від довжини хвилі λ для сечовини $C=1,6$ мг% (1), $0,4$ мг% (2) і для сечової кислоти $C=0,84$ мг% (3)

Обговорення результатів

Для знаходження спектральної залежності показника поглинання (екстинкції) ϵ від довжини хвилі будувалися функції $D=f(\lambda)$ через кожні 5 нм у спектральному інтервалі $\lambda=190-320$ нм для всіх органічних складових сечі. За формулою $D=\epsilon \cdot c \cdot d$ величина ϵ для фіксованої λ знаходиться як тангенс кута нахилу α до осі абсцис відповідної прямої. Оскільки перепад оптичних густин у спектрі достатньо великий, то в області максимумів поглинання для виконання закону Бугера-Бера і побудови залежностей $D=f(\lambda)$ необхідно використовувати невеликі концентрації $C<1$ мг%, тоді як в області незначного поглинання для деяких органічних складових сечі необхідно використовувати концентрації до 50 мг%. Результати досліджень і проведені розрахунки ϵ подані у таблиці 1 лише для шести основних органічних складових сечі. Для інших амінокислот величини ϵ на порядок менше, ніж у гліцину, тому (з огляду на їх незначну концентрацію у сечі [1,2]) значення для них у таблиці 1 не наведені, оскільки ці складові не можуть реально впливати на загальну оптичну густина сечі і на характер її спектра поглинання. Виходячи з таблиці 1, найвищі значення ϵ на короткохвильовій ділянці ультрафіолетового спектра спостерігаються в сечовині, тоді як у на довгохвильовій ділянці помітними стають значення екстинкції також для сечової кислоти і тирозину, а при $\lambda>290$ нм спектр поглинання сечі визначається тільки наявністю в ній сечової кислоти.

Визначивши значення ϵ для основних органічних складових сечі і знаючи їх середні концентрації в ній [1,2], можна розрахувати оптичну густина "середньої" сечі для кожної із зазначених у таблиці 2 довжин хвиль, використовуючи співвідношення:

$$D_{\lambda} = \epsilon_{\lambda_c} c_c d + \epsilon_{\lambda_{CK}} c_{CK} d + \epsilon_{\lambda_K} c_K d + \epsilon_{\lambda_T} c_T d + \epsilon_{\lambda_{ГЛ}} c_{ГЛ} d + \epsilon_{\lambda_{ГТ}} c_{ГТ} d, \quad (1)$$

де ϵ_{λ_c} , $\epsilon_{\lambda_{CK}}$, ϵ_{λ_K} , ϵ_{λ_T} , $\epsilon_{\lambda_{ГЛ}}$, $\epsilon_{\lambda_{ГТ}}$ – екстинкції для фіксованих λ , відповідно, для сечовини, сечової кислоти, креатинина, тирозину, гліцину і гістизину, c_c , c_{CK} , c_K , $c_{ГЛ}$ і $c_{ГТ}$ – середні концентрації в сечі, відповідно, для сечовини, сечової кислоти, креатинина, тирозину, гліцину і гістизину, які згідно [1,2] дорівнюють: $c_c=1700$, $c_{CK}=75$, $c_K=100$, $c_T=4$, $c_{ГЛ}=13$ і $c_{ГТ}=22$ мг%.

Результати розрахунків зведені в таблицю 2, з якої випливає:

Таблиця 1. Значення ϵ [см·мг%]⁻¹ для основних органічних складників сечі

λ , нм	Сечовина	Сечова кислота	Креатинин	Тирозин	Гліцерин	Гистидин
190	2,0	0,71	0,31	0,64	0,018	0,16
195	2,75	0,83	0,36	1,12	0,015	0,162
200	2,0	0,83	0,29	0,86	0,0098	0,163
205	1,38	0,75	0,22	0,38	0,0068	0,200
210	0,81	0,60	0,15	0,304	0,0044	0,24
215	1,05	0,40	0,11	0,33	0,0030	0,23
220	1,15	0,35	0,083	0,38	0,0022	0,16
225	1,25	0,33	0,062	0,38	0,0019	0,088
230	1,0	0,40	0,039	0,38	0,0015	0,032
235	0,75	0,44	0,022	0,28	0,0010	0,0090
240	0,38	0,42	0,011	0,021	0,0008	0,0040
245	0,19	0,36	0,004	0,011	0,0007	0,002
250	0,125	0,28	–	0,012	0,0005	0,001
255	0,09	0,20	–	0,021	–	–
260	0,108	0,15	–	0,03	–	–
265	0,125	0,14	–	0,045	–	–
270	0,12	0,2	–	0,060	–	–
275	0,12	0,26	–	0,074	–	–
280	0,064	0,34	–	0,064	–	–
285	0,016	0,47	–	0,044	–	–
290	0,0034	0,51	–	0,010	–	–
295	–	0,49	–	0,004	–	–
300	–	0,39	–	0,0015	–	–
310	–	0,083	–	–	–	–
320	–	0,01	–	–	–	–

Таблиця 2. Значення оптичної густини сечі, розраховані відповідно до (1), для середніх концентрацій її органічних складників

λ , нм	190	195	200	205	210	215	220	225
Всіх складників	3490	4781	3498	2430	1443	1424	1825	1990
Без сечовини	90,5	106,4	98,4	848,2	66,5	47,4	39,6	34,5
λ , нм	230	235	240	245	250	255	260	265
Всіх складників	2161	1736	1308	674	344	227	164,3	194,7
Без сечовини	35,8	35,9	32,8	27,5	21,1	15,1	11,32	10,68
λ , нм	270	275	280	285	290	295	300	310
Всіх складників	227,2	223,8	229,8	144,4	65,4	42,6	29,2	6,3
Без сечовини	15,2	19,8	25,8	35,4	38,2	36,8	29,2	6,3

➤ як основна складова сечі сечовина здійснює визначальний вплив на величину оптичної густини сечі в ультрафіолетовій області спектра та на характер її спектра поглинання, особливо в областях короткохвильового і середньохвильового максимумів, для яких внесок усіх інших п'яти складових у загальну оптичну густину не перевищує 2% (для довгохвильового максимуму відповідно близько 10%);

➤ в області спектра $\lambda > 250$ нм реальна оптична густина сечі визначається лише трьома складовими: сечовиною, сечовою кислотою і тирозином.

➤ експериментальні вимірювання оптичної густини сечі як біологічного середовища в спектральному інтервалі $\lambda = 190\text{--}240$ нм можна здій-

снювати лише, розвівши її дистильованою водою в 1000–4000 разів, а для $\lambda > 250$ нм – не менше ніж у 100–200 разів.

Все це говорить про те, що виявити, а тим більше якісно оцінити більшість органічних складових сечі за її ультрафіолетовими спектрами поглинання при наявності сечовини неможливо. Однак це можна здійснити для сечової кислоти і тирозину, використовуючи для аналізу спектр поглинання сечі в області $\lambda > 250$ нм. Щоб зменшити при цьому вплив сечовини на результати такого аналізу (показано, що її концентрація в сечі для різних пацієнтів різна), проведемо нормування розрахованих значень оптичної густини сечі на величину D при $\lambda = 230$ нм, на яку при-

падає середньохвильовий ультрафіолетовий максимум у спектрі поглинання. Вибір для нормування цього значення D сечі зумовлений тим, що тут внесок у сумарну оптичну густину всіх інших п'яти органічних складових не перевищує 1,7%, як це показано в таблиці 2, а також тим, що виміри відносної оптичної густини в області $\lambda > 250$ нм із технічних причин здійснити значно важче, ніж для $\lambda = 230$ нм.

Проведені за (1) розрахунки загальної оптичної густини сечі при мінімальній і максимальній концентраціях сечовини, що відповідають нормі ($C_{\min} = 1500$ мг% і $C_{\max} = 2000$ мг%), і при середніх концентраціях інших п'яти органічних складових, з наступним нормуванням на величину D при $\lambda = 230$ нм, показали, що максимальне відхилення відносних значень D від середнього в області $\lambda > 250$ нм припадає на $\lambda = 295$ нм і не перевищує $\pm 0,002$. Це підтверджує правомірність використання для аналізу сечі відносних значень її оптичної густини. На рис.2 наведені розраховані за формулою (1) спектри поглинання сечі для середньої концентрації сечовини при максимальних (крива 1) і мінімальних (крива 2) значеннях концентрацій інших п'яти органічних складових.

Тут же на рис.2. зображений типовий спектр поглинання добових проб сечі, виміряних за описаною в роботі [6] методикою, для десяти здорових пацієнтів (діти 10-14-річного віку (крива 3)), з використанням нормування на значення D для середньохвильового максимуму. Перед вимірюваннями сеча розбавляється у 100–150 разів. Видно, що спектр виміряного поглинання досить добре відтворює розраховані криві. Проте є дві особливості: по-перше, спостерігається зміщення максимуму поглинання у довгохвильову область

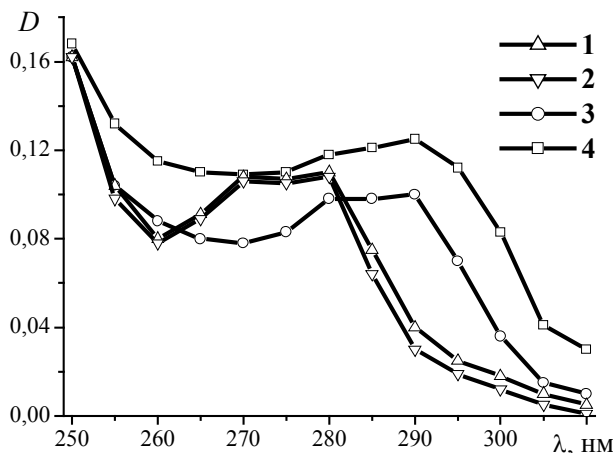


Рис. 2. Залежність відносного значення D від довжини хвилі λ для сечі: розраховані (1, 2), виміряні (3,4)

на 5–10 нм, по-друге, дещо менші значення виміряних D у порівнянні з розрахованими у цьому довгохвильовому максимумі. Перше пояснюється тим, що в реальному біологічному середовищі сечі органічні складові зв'язуються в комплекси, чого не враховує формула (1). Друге можна пояснити тим, що у здорових дітей концентрація сечової кислоти в сечі менше від тієї, яка бралася при розрахунку кривої 2 ($C < 60$ мг%).

Кривою 4 на рис.2 зображений вимірний спектр поглинання, характерний для добових проб сечі більшості пацієнтів (діти 10–14-річного віку), хворих на різні форми туберкульозу. Основна його особливість: істотне підвищення оптичної густини в усьому аналізованому спектральному діапазоні, що може бути викликано тільки значним підвищенням у сечі концентрації сечової кислоти або тирозину (таблиця 2), оскільки біохімічними методами аналізу наявність білків у сечі зазначених пацієнтів не виявлено.

Висновок

Отже, проведені дослідження надають можливість використання спектрів поглинання сечі в області $\lambda > 250$ нм для визначення фактів відхилення від норми концентрації в ній сечової кислоти і тирозину. Оцінка з використанням формули (1) показує, що кривій 3 на рис.2 відповідає концентрація сечової кислоти $C_{\text{СК}} \approx 20$ мг%, а кривій 4, рис.2 – $C_{\text{СК}} \approx 225$ мг%.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Рубин А.Б. Биофизика. – М.: Высшая школа, 1988.
2. Лопаткина Н.А. Урология и неврология. – М.: Медицина, 1990.
3. Демченко А.П. Ультрафіолетова спектрометрія і структура білків. – Київ, 1981.
4. Guminietsky S.G., Pishak O.V., Pishak V.P., Grigori-shin P.M. Absorbting and diffusive properties of blood plasma and urine proteins // SPIE. - 1997. -3317. - P. 390-398.
5. Kostishin S.S., Gorshynska L.J., Guminietsky S.G. Absorbting spectral analysis of proteins and free amino acids in pleurotus fruiting body extracts // SPIE. – 2001. - 4607. - P. 475-484.
6. Рвачев В.П., Гумінецький С.Г., Сахновський М.Ю., Смо Е.С., Тихоненко Т.И., Добров Е.Н. Дослідження поглинання вірусних суспензій на інтегральному фотометрі // Журнал прикладної спектроскопії. – 8, №5. – С. 844-850.