

**Cadre de predare:** Anghel Andrei: [biochim@umft.ro](mailto:biochim@umft.ro) Grecu Daniela: [grecu.daniela@umft.ro](mailto:grecu.daniela@umft.ro)  
Sfrijan Felicia: [sfrijan.felicia@umft.ro](mailto:sfrijan.felicia@umft.ro) Samoila Corina: [corisamoila@umft.ro](mailto:corisamoila@umft.ro)  
Gurban Camelia: [gurban.camelia@umft.ro](mailto:gurban.camelia@umft.ro) Buzatu Ramona: [buzatu.ramona@umft.ro](mailto:buzatu.ramona@umft.ro)  
Bonte Diana: [bonte.diana@umft.ro](mailto:bonte.diana@umft.ro) Tamas Liviu: [tamas.liviu@umft.ro](mailto:tamas.liviu@umft.ro)  
Mihala Adrian: [mihala.adrian@umft.ro](mailto:mihala.adrian@umft.ro) Bujor Geta: [bujor.cristiana@umft.ro](mailto:bujor.cristiana@umft.ro)  
Alexa Anda: [alexa.anda@umft.ro](mailto:alexa.anda@umft.ro) Marcu Anca: [marcu.anca@umft.ro](mailto:marcu.anca@umft.ro)  
Moatar Alexandra: [moatar.alexandra@umft.ro](mailto:moatar.alexandra@umft.ro) Chis Aimee: [chis.aimee@umft.ro](mailto:chis.aimee@umft.ro)  
Toate întrebările vor fi adresate cadrului de predare corespunzător fiecărei grupe la adresa de email furnizată.

## DETERMINAREA ACIDULUI URIC ÎN SER

### Introducere

Diagnosticul hiperuricemiilor se bazează pe determinarea concentrației serice a acidului uric.

Catabolismul acizilor nucleici constă în degradarea enzimatică a acestora până la elementele lor constitutive: baze azotate, pentoze și acid fosforic. La rândul lor sunt degradate și bazele azotate, dar într-un mod diferențiat: cele pirimidinice la  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  și  $\text{NH}_3$  iar cele **purinice la acid uric (2,6,8-trihidroxipurină)** (inițial se dezaminează heterociclul purinic, iar în continuare acesta este oxidat progresiv la hipoxantină, xantină și în final la acid uric).

Acidul uric produs predominant în ficat din purinele endogene și exogene este eliminat renal prin secreție tubulară. Concentrația normală de acid uric în ser este de 1-7 mg/100 ml, ceea ce corespunde unei rezerve de urat (cantitatea totală de urat din organism) de un gram. În mod patologic, rezerva de urat poate crește (la 25-30 g) pe baza unui defect de eliminare renală (70-80%) respectiv datorită unei producții crescute (20%), ceea ce se traduce și printr-o creștere a concentrației serice a acidului uric în ser, care, fiind puțin solubil, se poate depune în țesuturile moi, producând boala numită gută.

Determinarea concentrației acidului uric se poate face prin metode chimice și enzimatic.

### Principiul metodelor

Cea mai veche metodă de determinare a acidului uric are la bază abilitatea acestuia de a reduce soluția alcalină de fosfowolframă la albastru de wolfram. Metoda originală realizează îndepărtarea proteinelor prin precipitare și izolarea acidului uric din filtrat înainte de reacția cu fosfowolframatul. Puține laboratoare mai folosesc această metodă datorită lipsei de specificitate prin interferența altor compuși reducători (acidul ascorbic, purinele metilate, glucoză în concentrații mari, tirozină, triptofan, acidul homogentizic și salicilații).

Utilizarea uricazei a permis dezvoltarea unor metode mai specifice de determinare. Oxidarea acidului uric la alantoină și apă oxigenată a condus la o varietate de tehnici. Una din metode are la bază absorbția diferențiată a alantoinei și a acidului uric în ultraviolet. În timp ce acidul uric are un maxim de absorbție între 290-293 nm, alantoina nu absoarbe. Această proprietate de a urmări absorbția de radiație la această lungime de undă înainte și după incubarea probelor cu uricază este folosită la determinarea acidului uric în ser, plasmă și urină.

Variantele alternative folosesc reacția de oxidare a diverșilor cromogeni cu apa oxigenată. Compușii folosiți sunt: o-dianisidină, 3-metil-2-benzotiazolinonă, N, N-dimetilanilină, acidul 3,5-diclor-2-hidroxibenzoic și aminofenazona când rezultă compuși colorați cu maximum de absorbție în vizibil.

Apa oxigenată poate fi determinată și prin posibilitatea oxidării etanolului la acetaldehidă în prezență de catalază, reacția fiind cuplată cu oxidarea acetaldehidei

la acetat sub acțiunea aldehiddehidrogenazei și a  $\text{NAD}^+$ . Măsurătorile spectrometrice se efectuează în acest caz la 340 nm.

Oxidarea acidului uric cu uricază poate fi măsurată și prin viteza de consum a oxigenului în reacție, aceasta fiind proporțională cu concentrația în acid uric.

Cromatografia de lichid de înaltă performanță (HPLC) permite determinarea acidului uric în ser și urină. Deși tehnica HPLC nu este una de rutină, această metodă a fost propusă ca procedeu de elecție în determinare.

## **Partea experimentală**

### **A. Metodele chimice**

Sunt metode care se bazează pe caracterul reducător al acidului uric .

#### **Principiu**

Acidul uric reduce acidul fosfowolframic, în mediu alcalin, formând un compus colorat în albastru, intensitatea culorii fiind proporțională cu concentrația acidului uric din proba de analizat. Deoarece acidul ascorbic interferează reacția, el este eliminat de pH-ul alcalin (10 -11) asigurat de soluția tampon.

#### **Reactivi**

##### **1. Soluția deproteinizantă :**

Sulfat de sodiu anhidru .....150 g

Acid sulfuric 0,1N.....1000 ml

se încălzește amestecul pe o baie de apă până la dizolvare completă.

##### **2. Reactiv fosfowolframic :**

Wolframat de sodiu.....50 g

Acid fosforic 85 % .....40 ml

Apă distilată .....400 ml

se introduc într-un balon de 1litru, cu șlif, la care se atașează un refrigerent și se fierb la reflux timp de patru ore. Dacă soluția obținută este verde, se adaugă 1-2 picături de brom și se mai fierbe câteva minute, fără refrigerent, până se îndepărtează tot bromul. După răcire, soluția se trece într-un balon cotat de 500 ml și se aduce la semn cu apă distilată.

##### **3. Soluția tampon glicină (pH~12,5) :**

Glicină .....3 g

Hidroxid de sodiu 1N.....100 ml

##### **4. Soluție standard stoc de acid uric (100 mg %) :**

Se dizolvă 100 mg acid uric și 50 mg carbonat de litiu în 60 ml apă bidistilată la 60°C, se răcește și se adaugă 2,5 ml formol 40 % și 0,3 ml acid acetic glacial, după care se aduce la 100 ml în balon cotat.

##### **5. Soluție standard de lucru de acid uric (5 mg %) :**

Într-un balon cotat de 100 ml se introduc 5 ml soluție standard stoc de acid uric și se aduce la semn cu apă distilată.

### **Mod de lucru**

#### **1. Deproteinizarea serului:**

Într-o eprubetă 160 / 16 se introduc 0,50 ml ser și 4,50 ml soluție deproteinizantă, se menține, agitând din când în când, în baia de apă la fierbere timp de 15 minute. Se filtrează la cald, **pe filtru uscat**, într-o altă eprubetă.

## 2. Reacția de culoare:

În trei eprubete de dimensiuni 160/16 notate: P (probă), S (standard) și M (martor) se introduc :

Reactivi	P (ml)	S (ml)	M (ml)
Filtrat (la temperatura camerei)	2,00	-	-
Soluție deproteinizantă	-	1,80	1,80
Soluție standard acid uric (5 mg %)	-	0,20	-
Apă distilată	-	-	0,20
Soluție tampon glicină	0,50	0,50	0,50

Se agită probele și se lasă în repaus 5 minute, apoi se adaugă:

Reactiv fosfowolframic	0,10	0,10	0,10
------------------------	------	------	------

Se lasă în repaus 15 minute, după care se măsoară absorbția probei și a standardului față de martor la 710 nm, în cuve cu grosimea de strat de un centimetru.

### Calcul

$$\text{mg acid uric} / 100 \text{ ml ser} = E_P/E_S \times 5$$

### Valori normale :

1-7 mg / 100 ml ser

### Valori patologice :

**Hiperuricemii:** insuficiență renală acută și cronică, gută, leucemii, mielom multiplu, limfom Hodgkin, mononucleoză infecțioasă, psoriazis, cură de slăbire, intoxicații cu plumb și mercur, boli febrile, arsuri întinse etc. Se pot produce și hiperuricemii prin defect de eliminare a acidului uric, insuficiență cardiacă.

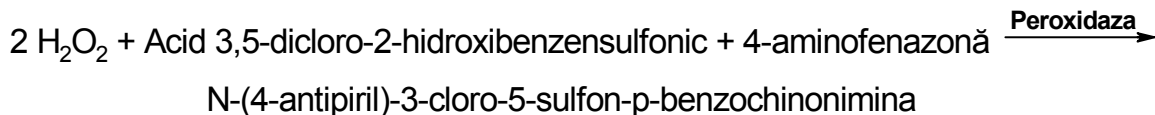
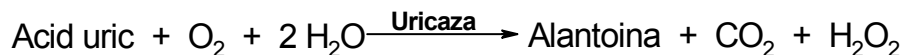
**Hipouricemii:** se întâlnesc mai rar, în urma administrării unor medicamente, prezența unor defecte enzimatic (xantinurie ereditară), afecțiuni parenchimatose hepatice grave, etc.

### B. Metode enzimatic

Sunt metode caracterizate prin sensibilitate și specificitate, ceea ce face să fie mult utilizate în prezent.

### Principiu

Acidul uric se transformă sub acțiunea uricazei în alantoină, cu producerea de apă oxigenată. Apa oxigenată oxidează, în prezența peroxidazei, acidul 3,5-dicloro-2-hidroxibenzensulfonic și 4-aminofenazona cu formarea unui compus chinoniminic colorat în roșu-violet.



### Reactivi

1. Soluție tampon:  
Tampon fosfat , pH 7 .....50 mM  
Acid 3,5-dicloro-2-hidroxibenzensulfonic ...4 mM
2. Reactiv enzimatic :  
4-aminofenazonă .....0,3mM  
Peroxidază .....1000 U/l  
Uricază .....200 U/l
3. Soluție standard acid uric: 10 mg/100 ml (595 mM)
4. Reactivul de lucru enzimatic se prepară amestecând în raport volumetric de 1:1 reactivul 1 cu reactivul 2. Stabilitatea soluției obținute este de 21 zile la 2 - 8°C și de 5 zile la 15 - 25°C (se păstrează la întuneric).

### Mod de lucru

În eprubete de format 120/12 se măsoară:

Reactivi	Probă (μl)	Standard (μl)	Martor (μl)
Ser	20	-	-
Standard acid uric	-	20	-
Reactiv de lucru	1000	1000	1000

Se amestecă, se incubează 15 minute la 20-25°C .

Se măsoară absorbția probei și a standardului față de martor, într-un interval de 30 minute de la adăugarea ultimului reactiv, la  $\lambda = 520$  nm, în cuve de 1 cm.

### Calcul

$$\begin{aligned}\text{mg acid uric / 100 ml ser} &= (E_P/E_S) \times 10 \\ \text{mmol acid uric / l} &= (E_P/E_S) \times 595\end{aligned}$$

### Valori normale

Bărbați : 3 - 9 mg / 100 ml (0,18 – 0,54 mmol / l )

Femei : 2,5 - 7 mg / 100 ml (0,15 – 0,45 mmol / l)

Metoda poate servi și la determinarea acidului uric din urina de 24 de ore, utilizând un standard de 110 mg / 100 ml (6545 mmol/l), în care caz valorile normale sunt :

250 - 750 mg / 24 ore (1,5 - 4,5 mmol /24 ore)

### Observații

Hemoglobina până la 100 mg/dl și bilirubina până la 20 mg/dl nu deranjează determinarea.