임상 화학(Clinical Chemistry)

Lecture 2. Non Protein Nitrogen, NPN

Prof. Choi Jeong Su
E-mail : guesschjs@korea.ac.kr
H.P : 010-6314-3910

Lecture 2. Non Protein Nitrogen, NPN

■ 비단백질소(Non Protein Nitrogen, NPN)

- 잔여질소(Rest Nitrogen)라고도 하며, 단백질 이외의 질소성분인 요소, 요산, 크레아티닌, 크레아틴, 아미노산, 암모니아 등의 질소화합물 총칭
- 단백질 대사, 핵산 대사의 종말산물 및 중간산물들이 포함된다.
- 대부분 체내에 필요없는 물질로서 신장을 통해서 배설되어 일정한 혈중 농도 유지
- 단백질 대사의 이상은 대사산물의 변량을 초래
- 신장기능장애는 배설능 저하로 비단백질소의 혈중농도 증가
- NPN의 약 50%는 요소가 차지하며, 예전에는 NPN 각 성분을 측정할 수 없었기 때문에 kjeldahl법 등으로 총 질소량을 구했지만, 현재는 NPN 각 성분을 쉽게 측정할 수 있기 때문에 총 NPN량은 측정하지 않는다.

Lecture 2. Non Protein Nitrogen, NPN

■ 비단백질소(Non Protein Nitrogen, NPN)

종 류		함량 (%)
Non Protein Nitrogen (NPN : 비단백질소)	Blood Urea Nitrogen (BUN : 요소질소)	50%
	Amino acid Nitrogen (아미노산 질소)	20%
	Uric acid Nitrogen (요산 질소)	20%
	Creatinine Nitrogen (크레아티닌 질소)	5%
	Creatine Nitrogen (크레아틴 질소)	1 ~ 2%
	Ammonia Nitrogen (암모니아 질소)	0.2%
	Indican Nitrogen (인디칸 질소)	
	Bilirubin	
	Glutathione	
	Vitamine	
	Purine Body	
	Pyrimidine Body	

Lecture 2. Non Protein Nitrogen, NPN

■ 비단백질소(Non Protein Nitrogen, NPN)

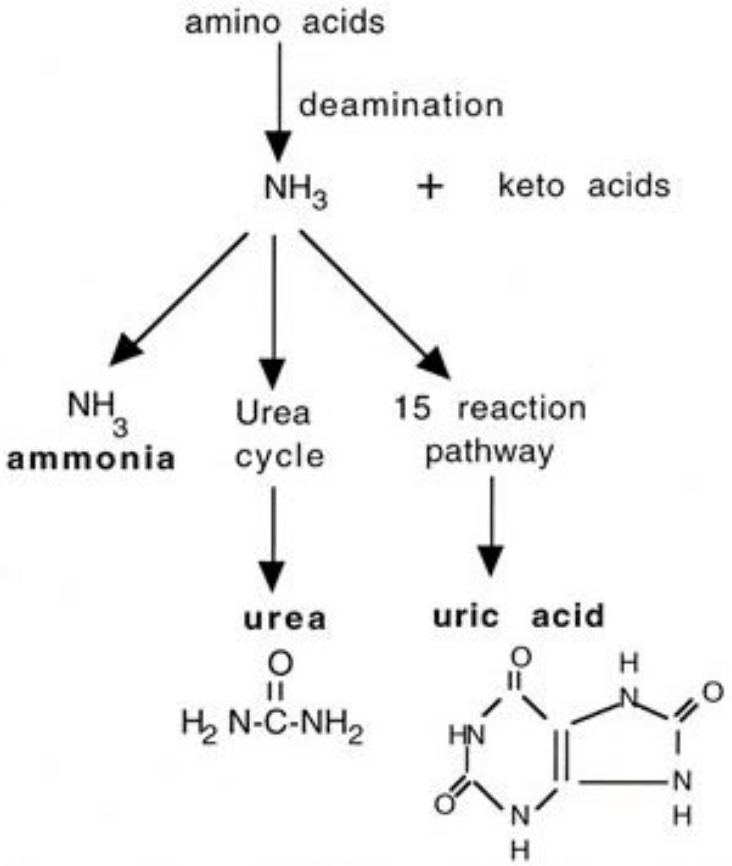
- 임상적 의의
  ① 비단백질소 (NPN)의 증가 원인
  -> 혈중 비단백질소가 증대된 상태를 질소혈증 (Azotemia)이라 한다
  -> 전신성
  1) 단백질 섭취량이 증가할 때
  2) 조직단백의 붕괴가 있을 때 (화상 , 쇼크 , 기아 , 감염 등)
  -> 신성 : 신장기능부전에 의한 비단백질소의 배설이 저하
  1) 급성 및 만성 신염, 신장자체의 질환
  -> 신후성 : 신장 이하의 요로 (방광 , 요도 등)의 폐색에 의한 NPN 배설 저하
  1) 요관결석 , 방광종양 등
  -> 요독증 (Uremia) , 자간증 (Eclampsia)

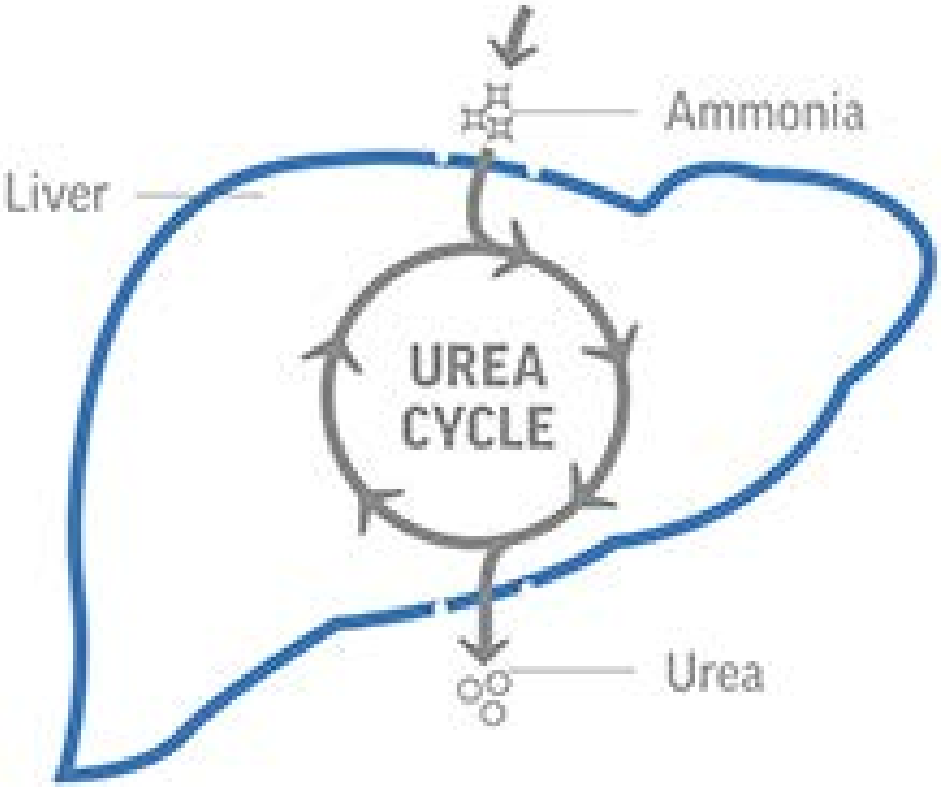
  ② 비단백질소 (NPN)의 감소 원인
  -> 간기능이 현저하게 저하 하는 경우
  -> 수혈증 , 기아, 임신말기

- 측정시 주의사항
  ① 용혈검체 사용 불가
  ② Ammonium Oxalate 검체 사용 불가

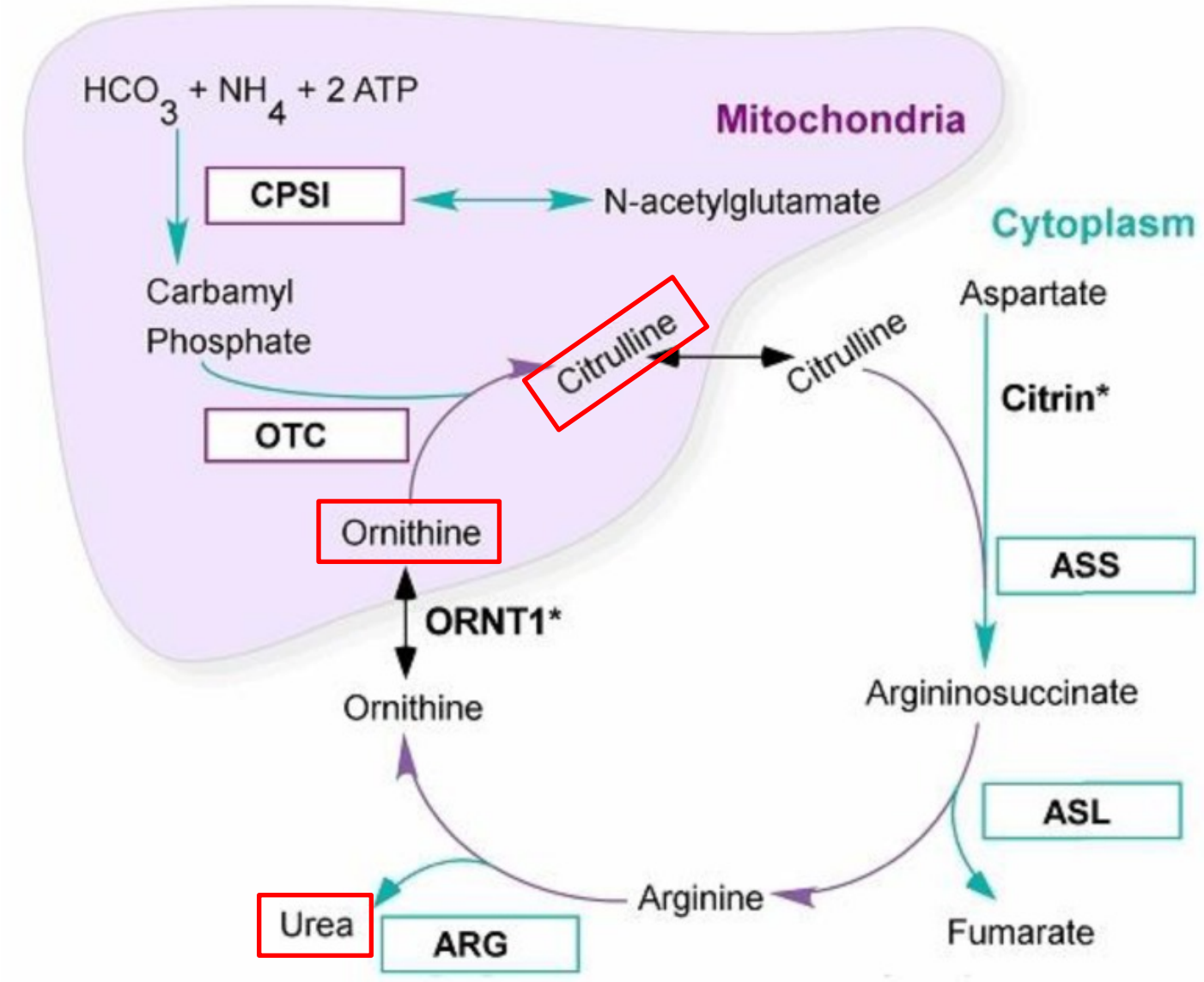
■ 질소화합물 대사과정 (Urea Cycle)

- 질소화합물은 대사과정에서 암모니아(NH_3)를 생성한다.
- 암모니아는 독성이 높아 배설을 위해 간에서 형태 전환 ---> 요소(Urea)





■ 질소화합물 대사과정 (Urea Cycle)



■ Total Protein - Micro Kjeldahl 법 (질소 정량법, 적정법)

- 단백질의 질소 함유율(16%)이 거의 일정한 것을 이용해서 질소를 측정한 후 계수 6.25를 곱해서 단백질의 양을 구한다 n:X = 16:100 X = 100/16 * n = 6.25 * n

① 1단계 : 산화

$$\text{Protein} + H_2SO_4 \xrightarrow{\text{Boiling, 산화}} (NH_4)HSO_4$$

② 2단계 : 증류

$$(NH_4)HSO_4 + 2NaOH \xrightarrow{\text{Alkali, 증류}} Na_2SO_4 + 2H_2O + 2NH_3$$

③ 3단계 : 포집

$$NH_3 + H_3BO_3(\text{포집}) \dashrightarrow NH_4H_2BO_3 \dashrightarrow NH_4^+ + H_2BO_3^-$$

④ 4단계 : 적정

NH_4^+에 Methyl red (지시약) 를 가하면 Yellow

여기에 HCl을 가하여 Red Color가 보일때 까지 적정한다 (적정량을 측정한다)

Lecture 2. Non Protein Nitrogen, NPN

■ 비단백질소(Non Protein Nitrogen, NPN) 측정법

- Kjeldahl-Nessler법

① 1단계 : 제단백 (Folin-Wu)

$Na_2WO_4 + H_2SO_4 \dashrightarrow Na_2SO_4 + H_2WO_4$

H_2WO_4 + Serum → Protein 침전 ⇢ PFF 여액

② 2단계 : 산화

PFF 여액 (NPN) + H_2SO_4 $\xrightarrow{\text{Boiling}}$ $(NH_4)_2SO_4$ (Ammonium sulfate)

③ 3단계 : 증류

$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \rightarrow 2NH_3$ (Ammonia)

④ 4단계 : 비색 (Nessler 반응)

$2NH_3 + 2HgI_2{*}2KI \rightarrow NH_2Hg_2I_3$ (Ammonia dimercuric iodide) + 4KI + NH_4I

↑

Orange-Brown, 470nm

Nessler 반응 시약

* 10% NaOH (KOH) : 암모니아 생성
* HgI_2 (Mercuric iodide) : 발색시약 = 정색시약
* KI (Potassium iodide) : 산화제

Lecture 2. Non Protein Nitrogen, NPN

■ 비단백질소(Non Protein Nitrogen, NPN) 측정법

- Kjeldahl-Indophenol법

① 1단계 : 제단백 (Folin-Wu)

$Na_2WO_4 + H_2SO_4 \dashrightarrow Na_2SO_4 + H_2WO_4$

H_2WO_4 + Serum → Protein 침전 ⇢ PFF 여액

② 2단계 : 산화

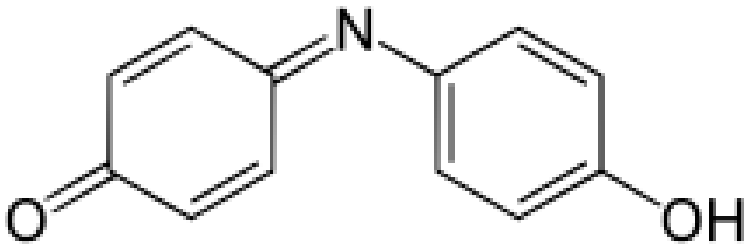
PFF 여액 (NPN) + H_2SO_4 $\xrightarrow{\text{Boiling}}$ $(NH_4)_2SO_4$ (Ammonium sulfate)

③ 3단계 : 증류

$(NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \rightarrow 2NH_3$ (Ammonia)

④ 4단계 : 비색 (Berthelot 반응)

$2NH_3$ + Phenol + NaOCl + $Na_2Fe(CN)_5NO$ → Indophenol



↑

Blue, 630nm



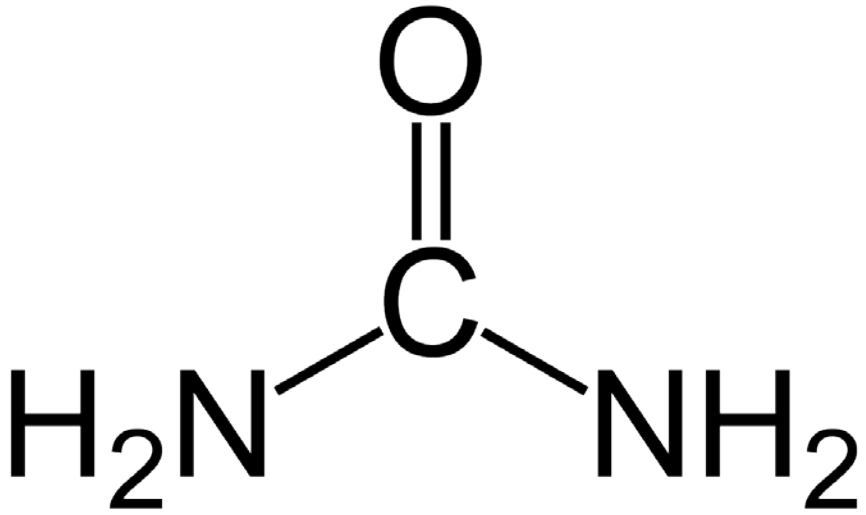
Berthelot 반응 시약

* Phenol
* NaOCl (Sodium hypochlorite)
* $Na_2Fe(CN)_5NO$ (Sodium nitroprusside)

Lecture 2. Non Protein Nitrogen, NPN

■ 요소질소(Blood Urea Nitrogen, BUN)

- 체내 단백질 대사의 최종 대사산물, 혈청 중 BUN은 NPN의 약 50%
- 단백질 분해에 의해 생긴 Amino acid는 여러가지 효소에 의해 Ammonia 발생
- 간에서 Urea cycle을 거쳐 요소(Urea)로 합성
- Urea = Urea Nitrogen x 2.14
- 임상적 의의 : 요독증(Uremia) 시 NPN 중 BUN의 비율이 80~90%까지 증가



■ 요소질소(Blood Urea Nitrogen, BUN) 측정법 : 축합법

- Oxime 법(Diacetylmonoxime, DAM 법), 자동분석기에서 활용하는 방법

-> 축합반응으로 Urea만 특이적으로 반응, NH3 제거가 필요없다

① 1단계 : 제단백 (Folin-Wu)

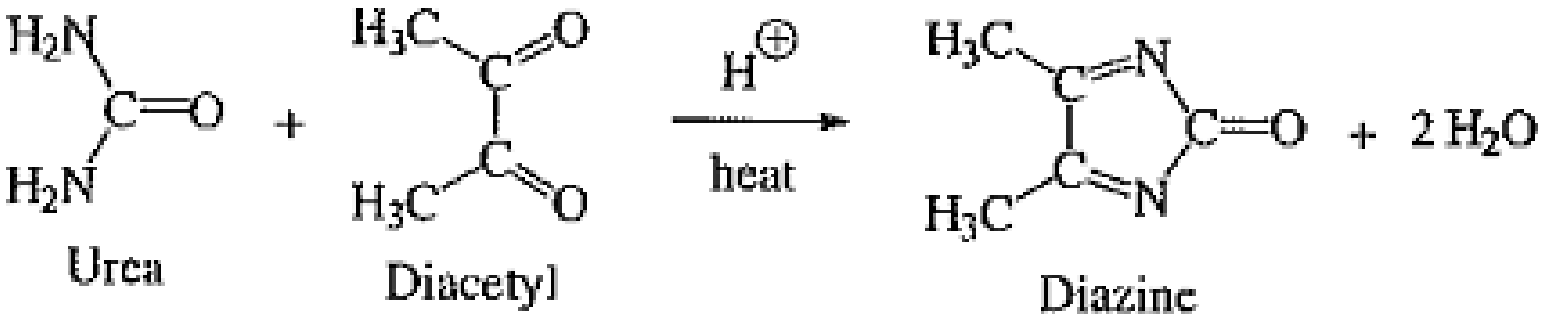
$Na_2WO_4 + H_2SO_4 \text{ --------} \rightarrow Na_2SO_4 + H_2WO_4$

H_2WO_4 + Serum → Protein 침전 -------→ PFF 여액

② 2단계 : 비색 (Fearon 반응)

Urea + DAM(발색) + $FeCl_3$(Ferric chloride) + TSC(Thiosemicarbazide) → Diazine

↑ 발색증진 ↑ 발색안정 ↑ Red, 520nm



Lecture 2. Non Protein Nitrogen, NPN

■ 요소질소(Blood Urea Nitrogen, BUN) 측정법 : 효소법

- 비색법 : Urease-Nesslerization법

-> 효소로 요소를 분해하여 발생한 암모니아(NH_3)를 정량

① 1단계 : 제단백 (Folin-Wu)

$Na_2WO_4 + H_2SO_4 \text{ --------} \rightarrow Na_2SO_4 + H_2WO_4$

H_2WO_4 + Serum → Protein 침전 ------→ PFF 여액

② 2단계 : 가수분해

$Urea + H_2O \text{ ----------} \rightarrow NH_3 + CO_2 + H_2O$

↑

Urease (가수분해효소)

③ 3단계 : 비색 (Nessler 반응)

$2NH_3 + 2HgI_2*2KI \rightarrow NH_2Hg_2I_3$ (Ammonia dimercuric iodide) + 4KI + NH_4I

↑

Orange-Brown, 470nm

Lecture 2. Non Protein Nitrogen, NPN

■ 요소질소(Blood Urea Nitrogen, BUN) 측정법 : 효소법

- 비색법 : Urease-Indophenol법

-> 효소로 요소를 분해하여 발생한 암모니아(NH_3)를 정량

① 1단계 : 제단백 (Folin-Wu)

$Na_2WO_4 + H_2SO_4 \dashrightarrow Na_2SO_4 + H_2WO_4$

H_2WO_4 + Serum → Protein 침전 ⇢ PFF 여액

② 2단계 : 가수분해

$Urea + H_2O \dashrightarrow NH_3 + CO_2 + H_2O$

↑

Urease

③ 3단계 : 비색 (Berthelot 반응)

$2NH_3$ + Phenol + NaOCl + $Na_2Fe(CN)_5NO$ → Indophenol

↑

Blue, 630nm

Lecture 2. Non Protein Nitrogen, NPN

■ 요소질소(Blood Urea Nitrogen, BUN) 측정법 : 효소법

- UV법 : Urea-GLDH법

-> 효소로 요소를 분해하여 발생한 암모니아(NH_3)를 NADH 감소량으로 UV 정량

① 1단계 : 제단백 (Folin-Wu)

$Na_2WO_4 + H_2SO_4 \dashrightarrow Na_2SO_4 + H_2WO_4$

H_2WO_4 + Serum → Protein 침전 ⇢ PFF 여액

② 2단계 : 가수분해

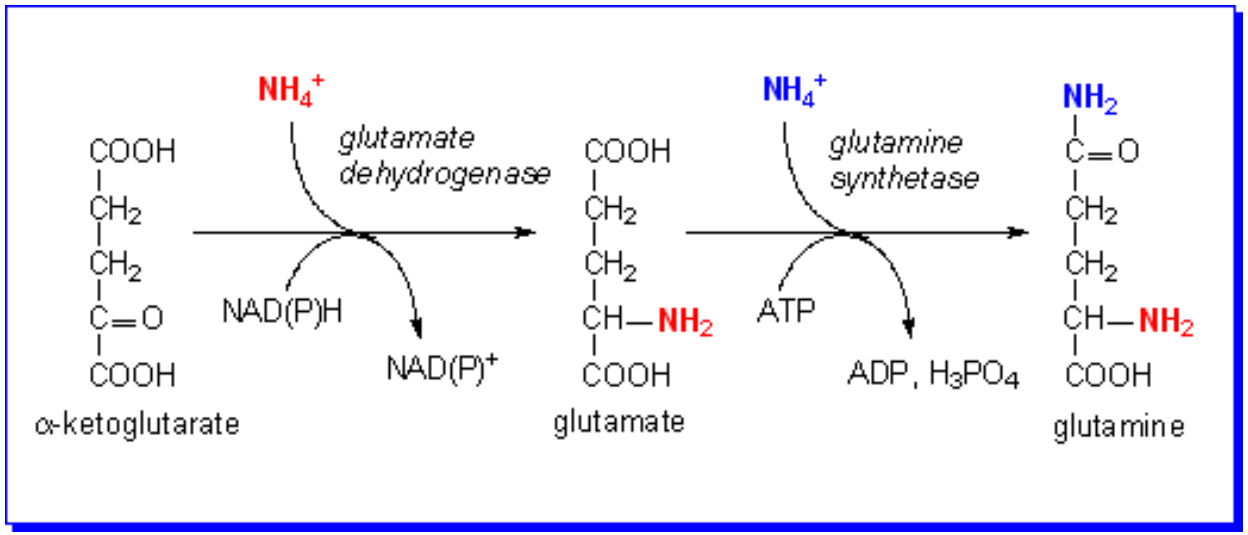
$Urea + H_2O \xrightarrow{Urease} NH_3 + CO_2 + H_2O$

③ 3단계 : UV 정량

NH_3 + NADH + α-Ketoglutaric acid ⇢ NAD + Glutamic acid

↑ Colorless, 340nm

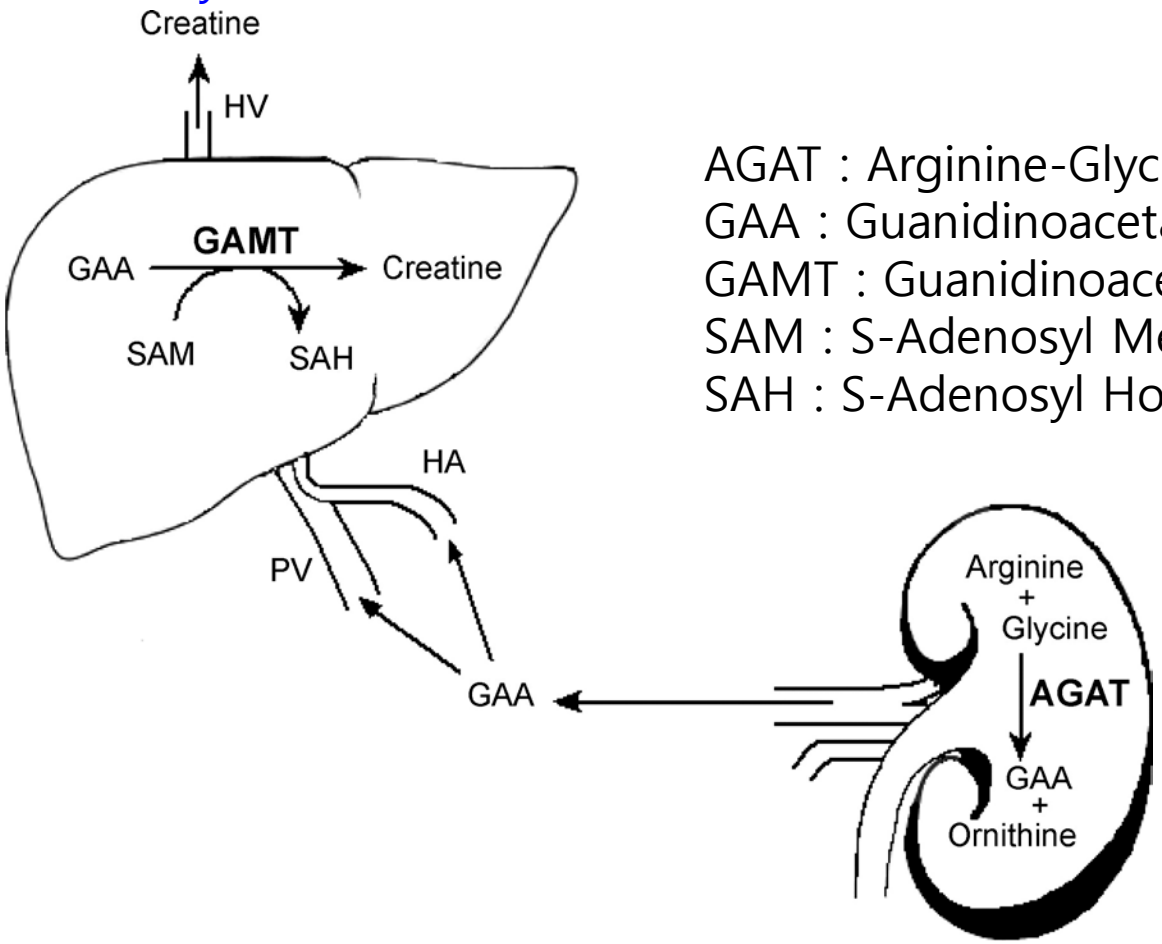
↑ GlutamateDehydrogenase(GLDH)



■ 크레아틴 & 크레아티닌 (Creatine & Creatinine)

- 크레아틴 (Creatine)

  -> Arginine , Glycine , Methionine 3종류의 Amino acid에 의해 간, 신장에서 합성



AGAT : Arginine-GlycineAmidinotransferase
GAA : Guanidinoacetate
GAMT : GuanidinoacetateMethyltransferase
SAM : S-Adenosyl Methionine
SAH : S-Adenosyl Homocysteine

■ 크레아틴 & 크레아티닌 (Creatine & Creatinine)

- 크레아틴 (Creatine)

  -> Creatine이

  CPK(Creatine PhosphoKinase)

  의 작용으로 Creatine phosphate

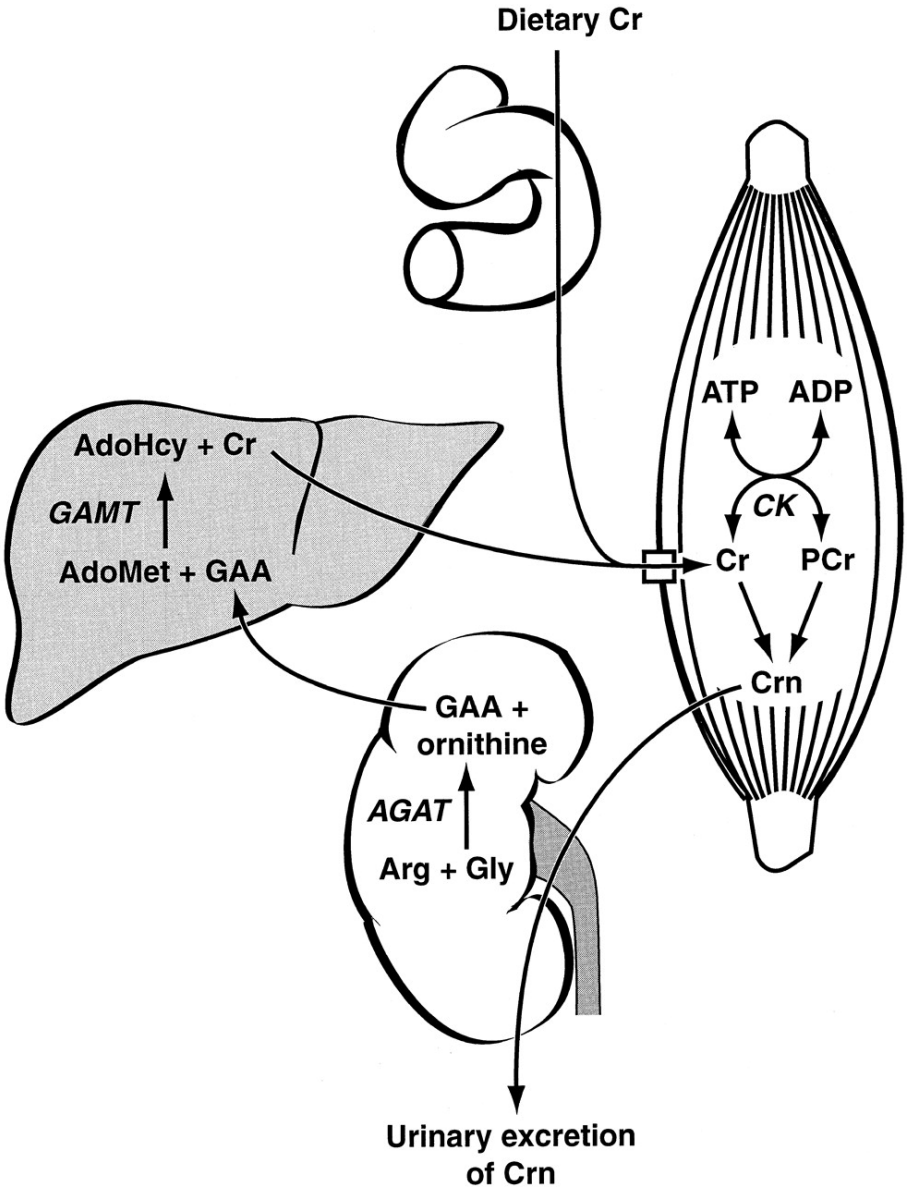
  형태로 근육에 저장

  -> Creatine phosphate는 근육에서

  에너지원으로 활용

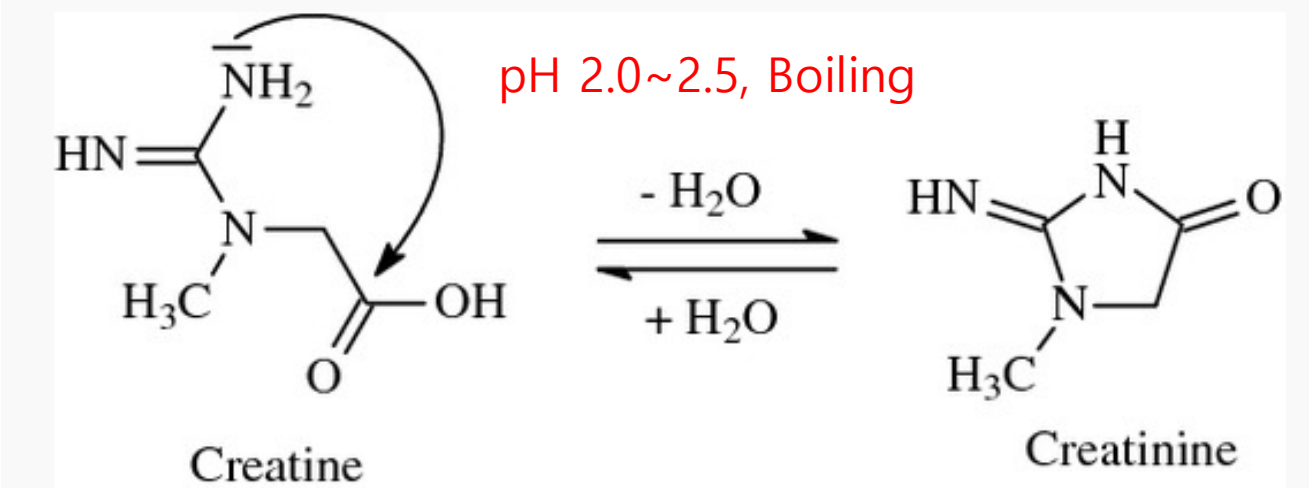
  -> Creatine은 신장에서 재흡수되므로

  정상인의 요중에는 검출되지 않음



■ 크레아틴 & 크레아티닌 (Creatine & Creatinine)

- 크레아티닌 (Creatinine)
  -> 크레아틴의 탈수반응 산물
  -> Creatine의 직접적인 측정이 불가능하므로 탈수하여 Creatinine으로 전환 후 측정한다
  -> 크레아티닌은 요 중으로 배설 : 신장기능검사 종목으로 가능
  -> Creatine = Creatinine x 1.16



Lecture 2. Non Protein Nitrogen, NPN

■ 크레아틴 & 크레아티닌 (Creatine & Creatinine)

- 정상치

검체	성별	Creatinine	Creatine
Serum	♂	0.6 ~ 1.2㎎/㎗	0.17 ~ 1.50㎎/㎗
	♀	0.5 ~ 1.0㎎/㎗	0.35 ~ 0.93㎎/㎗
Urine	♂	1.0 ~ 2.0g/day	0 ~ 40㎎/day
	♀	0.8 ~ 1.8g/day	0 ~ 80㎎/day
비고	(1) 성인의 혈청 Creatine은 ♂ > ♀ , 일차 및 계절변동 없다 (2) Creatine은 어린이 , 임산부에게서 높다		

- 임상적의의

Creatinine 증가질환	Creatine 증가질환
사구체신염	근육질환 , 다발성근염
신부전	갑상선기능항진증
근위축	신장장애
요독증 (Uremia)	영양실조

■ 크레아틴 & 크레아티닌 (Creatine & Creatinine) 측정법 : 비색법

- Creatinine 측정법 : Jaffe 반응

① 1단계 : 제단백 (Folin-Wu)

$Na_2WO_4 + H_2SO_4 \text{ --------} \rightarrow Na_2SO_4 + H_2WO_4$

H_2WO_4 + Serum → Protein 침전 -------→ PFF 여액

② 2단계 : 탈수

Creatine ----------→ Creatinine + H_2O

↑

HCl(pH 2.0~2.5), Boiling

③ 3단계 : 비색 (Jaffe 반응)

Creatinine + Alkaline picrate (Picric acid + NaOH) ------→ Creatinine picrate

↑

Orange red, 515nm

Lecture 2. Non Protein Nitrogen, NPN

■ 크레아틴 & 크레아티닌 (Creatine & Creatinine) 측정법

- Creatine 측정법 : (Total Creatinine - Free Creatinine) × 1.16 = Creatine

① Free Creatinine 측정

-> 제단백 여액의 Creatine을 탈수하지 않고 Jaffe 반응으로 Creatinine 정량

② Total Creatinine 측정

-> 제단백 여액의 Creatine을 탈수하여 Creatinine으로 만든 후 Jaffe 반응

③ (Total Creatinine - Free Creatinine) × 1.16 = Creatine

■ Creatinine Clearance rate (CCr : 크레아티닌 청소율)

- 1분 동안 혈액 중의 노폐물인 Creatinine 배설을 위한 신장을 통과하는 혈액의 양
- 정상치 : 70~120mL/min

$$C_{Cr} = \frac{U_{Cr}\ (mg/dL) \times V_{Ur}\ (mL/24h)}{P_{Cr}\ (mg/dL) \times 1440\ min/24h} \times \frac{1.73\ (m^2)}{BSA\ (m^2)}$$

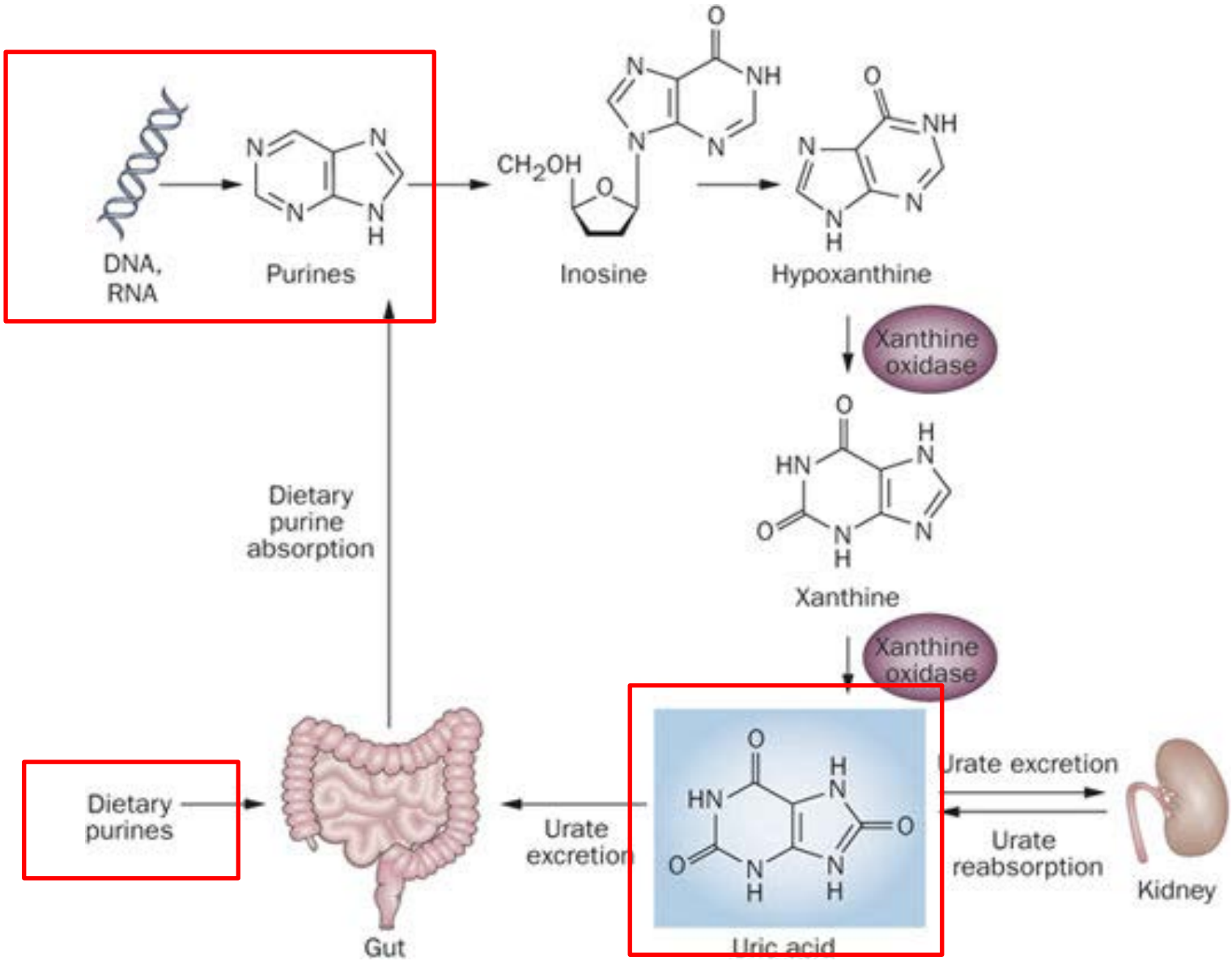
Lecture 2. Non Protein Nitrogen, NPN

■ 요산 (Uric acid)

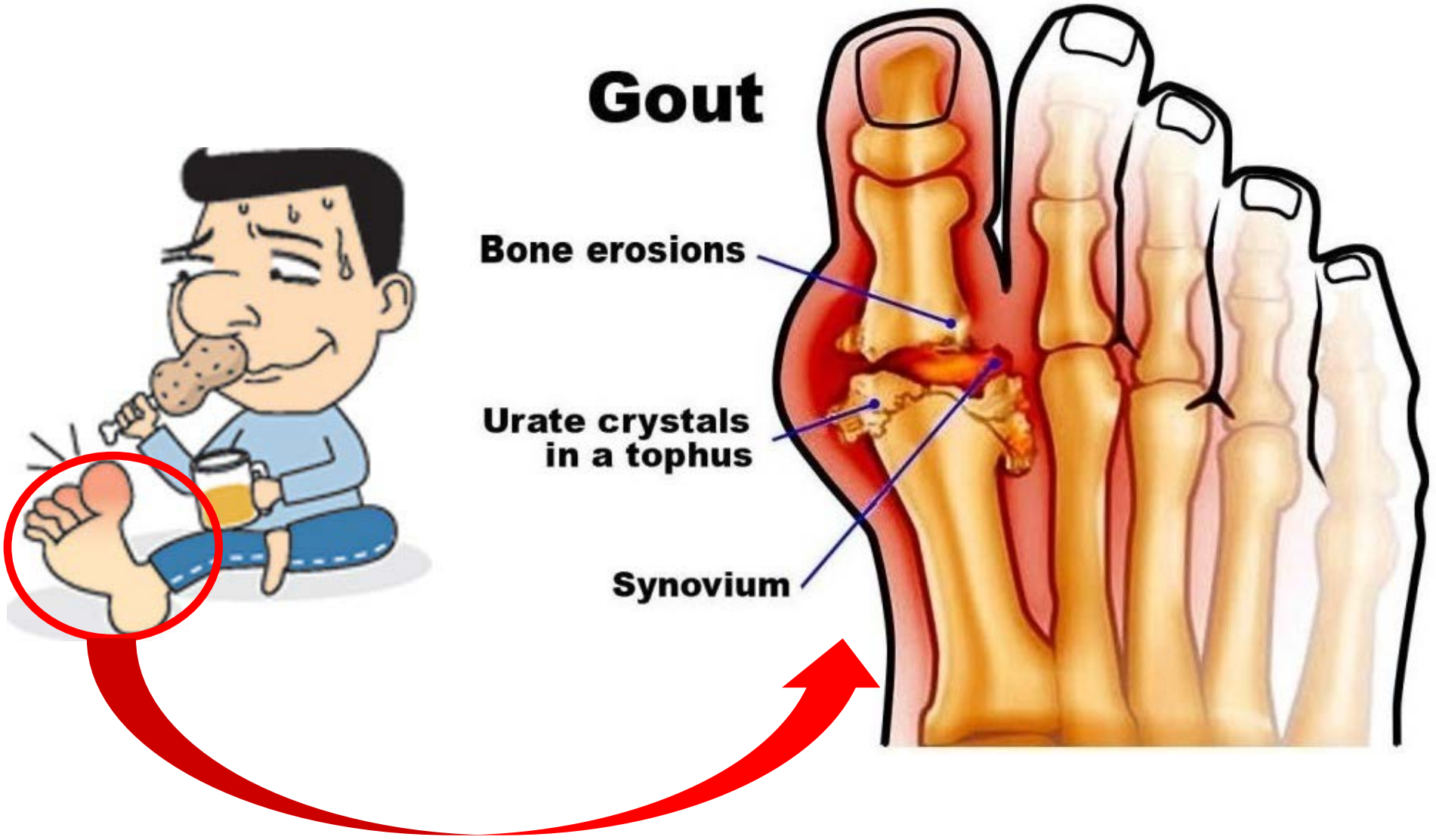
- 요산은 생체 내에서 핵산의 구성성분인 Purine body의 최종 대사산물이다
- Purine body는 음식물의 섭취나 핵단백질 붕괴에 의해 얻어진다
- 간 , 근육 , 골수에서 요산이 생성된다
- 혈청 중에는 일부 Albumin과 결합하고 나머지는 유리형으로 존재
- 정상치
  -> Serum : ♂ 3 ~ 6㎎/㎗ , ♀ 2 ~ 5㎎/㎗
  -> Urine : 250 ~ 750㎎/day
- 임상적의의

고 요산혈증	저 요산혈증
- 통풍 (Gout) - Lesch-Nyhan 증후군 - 핵단백붕괴 항진 (백혈병 , 악성빈혈 , 골수종) - 만성신부전증 - 신기능 장해로 배설 감소 (급성 만성 사구체 신염 , 요로 폐쇄)	- 뇨세관 재흡수 장해 * Fanconi 증후군 * 카드뮴 , 납 등의 중금속 중독증

■ 요산 (Uric acid)

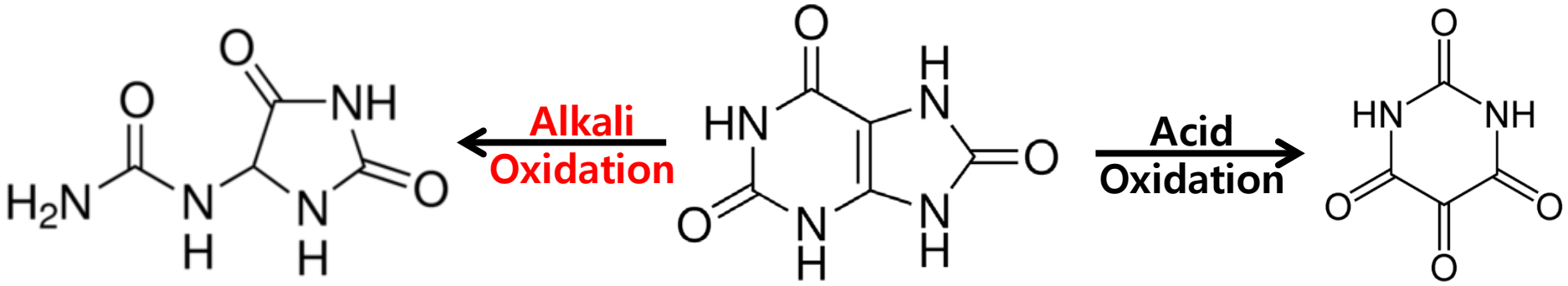

DNA, RNA
Purines
Inosine
Hypoxanthine
Xanthine oxidase
Xanthine
Xanthine oxidase
Dietary purine absorption
Dietary purines
Gut
Urate excretion
Uric acid
Urate excretion
Urate reabsorption
Kidney

■ 요산 (Uric acid)



■ 요산 (Uric acid) 측정법 : 환원법

- 요산은 산성용액이나 알카리용액에서 쉽게 산화하는 성질이 있다.
  ① 산성용액 : Alloxan, Urea
  ② 알카리용액 : Allantoin, CO_2
- 혈청에 존재하는 요산 이외의 환원성 물질로 인한 오차가 발생할 수 있다
  -> Glutathione, Ascorbic acid, Glucose, Tyrosine, Tryptophan.....
- Sodium oxalate, Potassium oxalate는 Phosphotungstate와 혼탁을 일으킴



Allantoin **Uric acid** **Alloxan**

■ 요산 (Uric acid) 측정법 : 환원법

* Phosphotungstic acid : 정색시약
* Urea : 정색안정제
* Na_2CO_3 (Sodium carbonate) : Alkali, 정색증진제

- Phosphotungstate 법 : Henry법

① 1단계 : 제단백 (Folin-Wu)

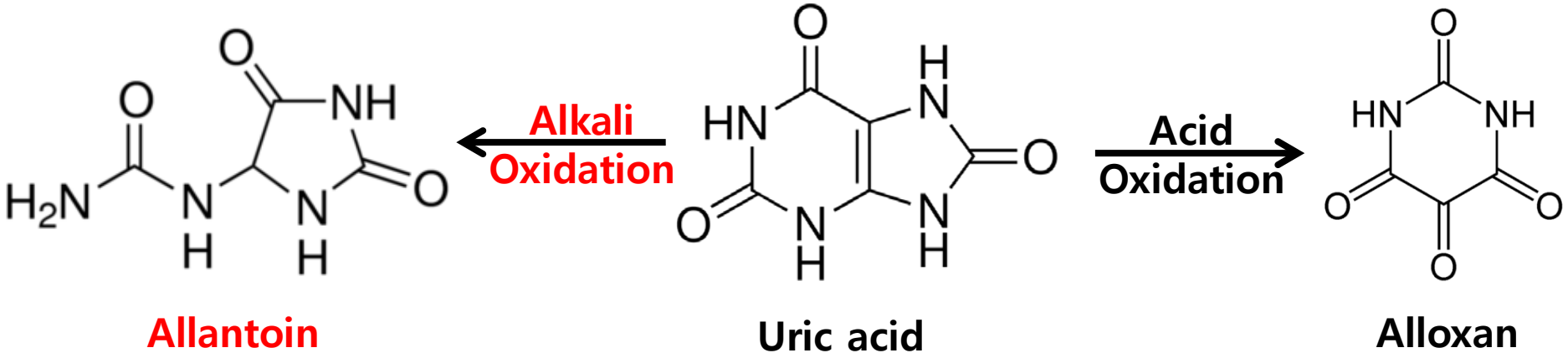
$Na_2WO_4 + H_2SO_4 \dashrightarrow Na_2SO_4 + H_2WO_4$

H_2WO_4 + Serum → Protein 침전 ⇢ PFF 여액

② 2단계 : 산화환원반응

Uric acid + Phosphotungstic acid ⇢ Allantoin + CO2 + Tungsten blue

↑ Urea, 10% Na_2CO_3 ↑ Blue, 750nm



Allantoin Uric acid Alloxan

■ 요산 (Uric acid) 측정법 : 환원법

* Phosphotungstic acid : 정색시약
* Urea : 정색안정제
* NaCN (Sodium cyanide) : Alkali, 정색증진제

- Phosphotungstate 법 : Brown법

① 1단계 : 제단백 (Folin-Wu)

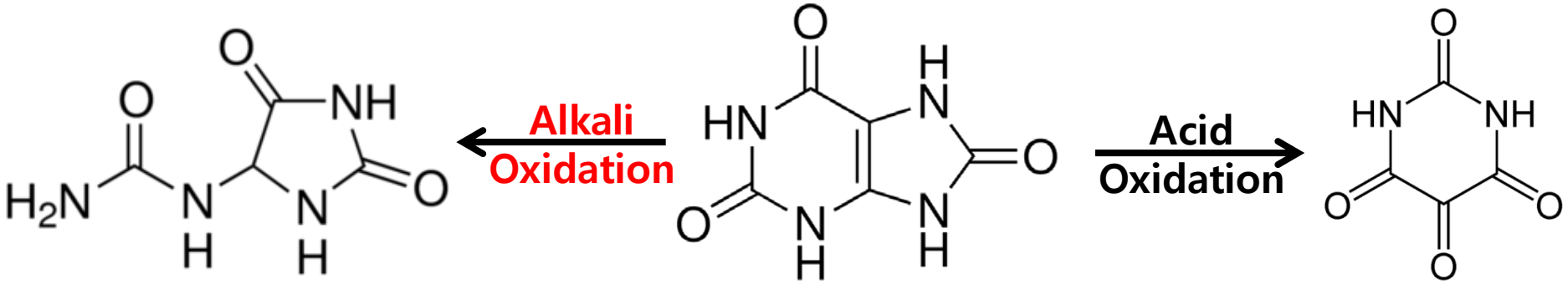
$Na_2WO_4 + H_2SO_4 \dashrightarrow Na_2SO_4 + H_2WO_4$

H_2WO_4 + Serum → Protein 침전 ⟶ PFF 여액

② 2단계 : 산화환원반응

Uric acid + Phosphotungstic acid ⟶ Allantoin + CO2 + Tungsten blue

↑ Urea, NaCN ↑ Blue, 750nm



Allantoin　　Uric acid　　Alloxan

■ 요산 (Uric acid) 측정법 : 효소법

- 비색법 : Uricase-Peroxidase 법, 요산 측정의 표준방법

① 1단계 : 제단백 (Folin-Wu)

$Na_2WO_4 + H_2SO_4 \dashrightarrow Na_2SO_4 + H_2WO_4$

H_2WO_4 + Serum → Protein 침전 ⇢ PFF 여액

② 2단계 : 산화환원반응

$$\text{Uric acid} + O_2 + H_2O \xrightarrow[\text{Uricase (Urate Oxidase)}]{} \text{Allantoin} + H_2O_2 + CO_2$$

③ 3단계 : 비색

$$H_2O_2 + \underset{\text{정색시약}}{\text{Phenol + 4-AAP}} \xrightarrow[\text{POD}]{} \underset{\text{Red, 550nm}}{\text{Quinone}}$$

Lecture 2. Non Protein Nitrogen, NPN

■ 요산 (Uric acid) 측정법 : 효소법

- UV법 : Uricase 법

-> 293nm에서 Uric acid의 흡광도 측정 (Allantoin은 293nm에서 흡광도 X)

① 1단계 : 제단백 (Folin-Wu)

$Na_2WO_4 + H_2SO_4 \text{ --------} \rightarrow Na_2SO_4 + H_2WO_4$

H_2WO_4 + Serum → Protein 침전 -------→ PFF 여액

② 2단계 : 산화환원반응

$$\text{Uric acid} + O_2 + H_2O \text{ ----------} \rightarrow \text{Allantoin} + H_2O_2 + CO_2$$

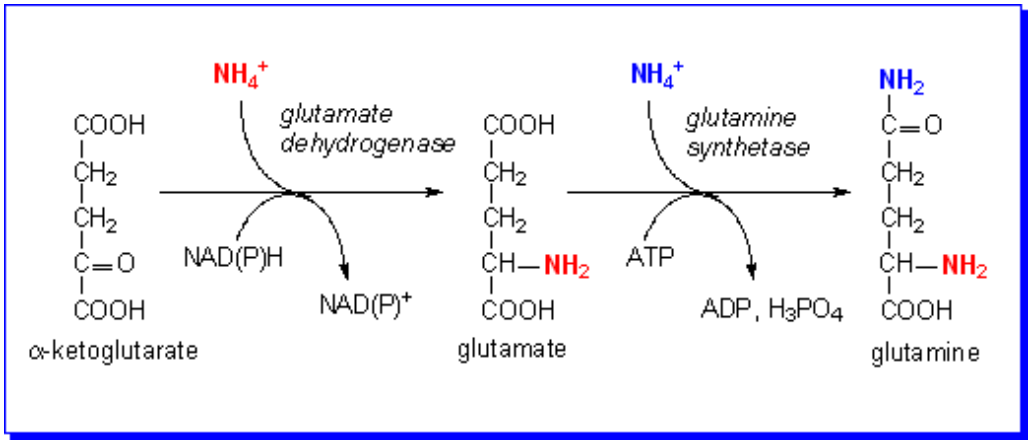
↑

Uricase (Urate Oxidase)

Lecture 2. Non Protein Nitrogen, NPN

■ 암모니아 (Ammonia)

- 생체 내 단백질의 분해 또는 Amino acid의 탈 amino화 등에 의해 생성
- 생체 내에서 NH^{4+} <----> $NH_3 + H^+$ 형태로 존재
- 대부분의 암모니아는 간에서 독성이 적은 요소로 합성되어 요 중으로 배설
- 일부 암모니아는 α-Ketoglutarate와 반응하여 Glutamate, Glutamine 합성

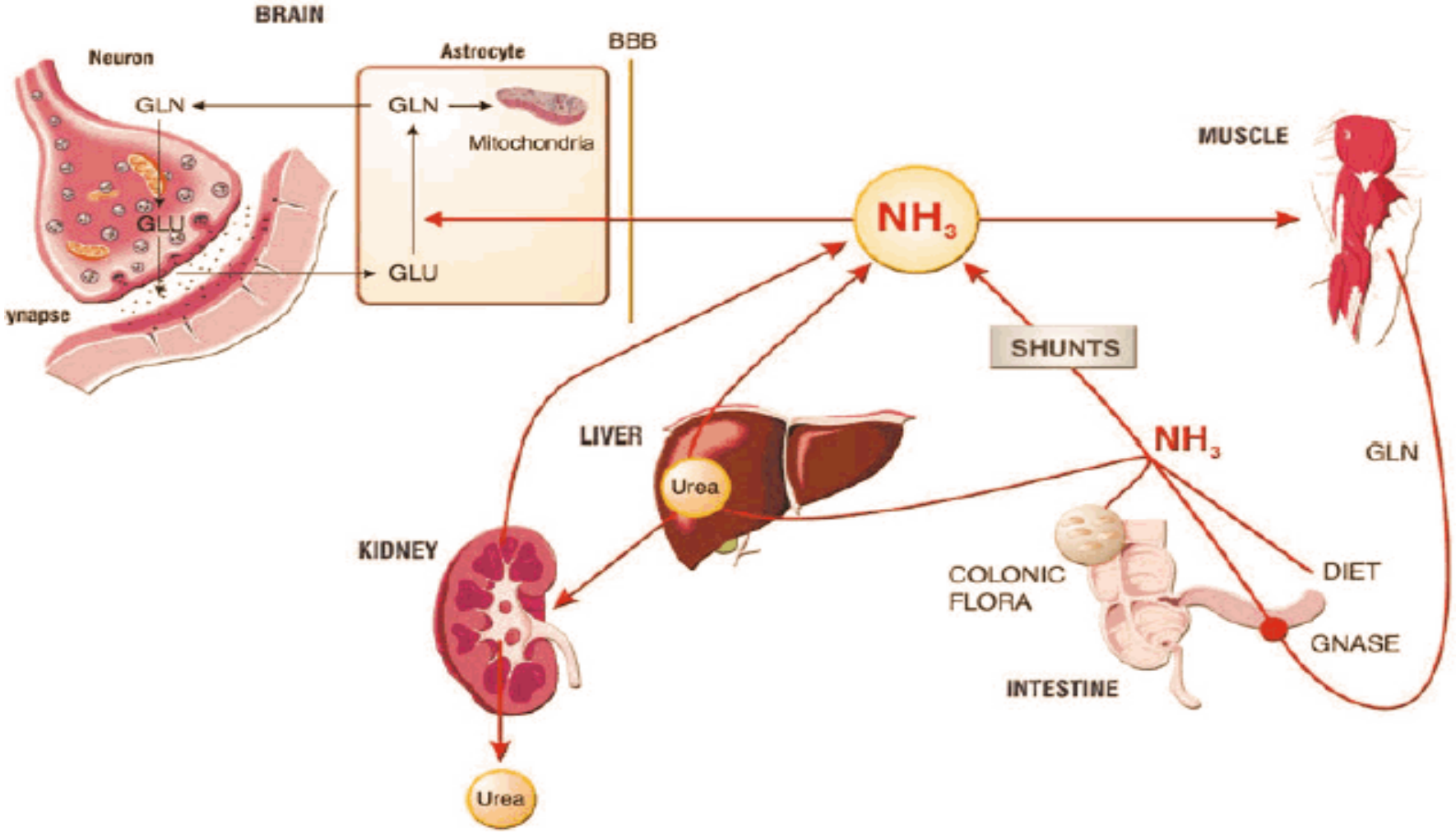


- 정상치 : 150μg/dℓ 이하
- 임상적 의의

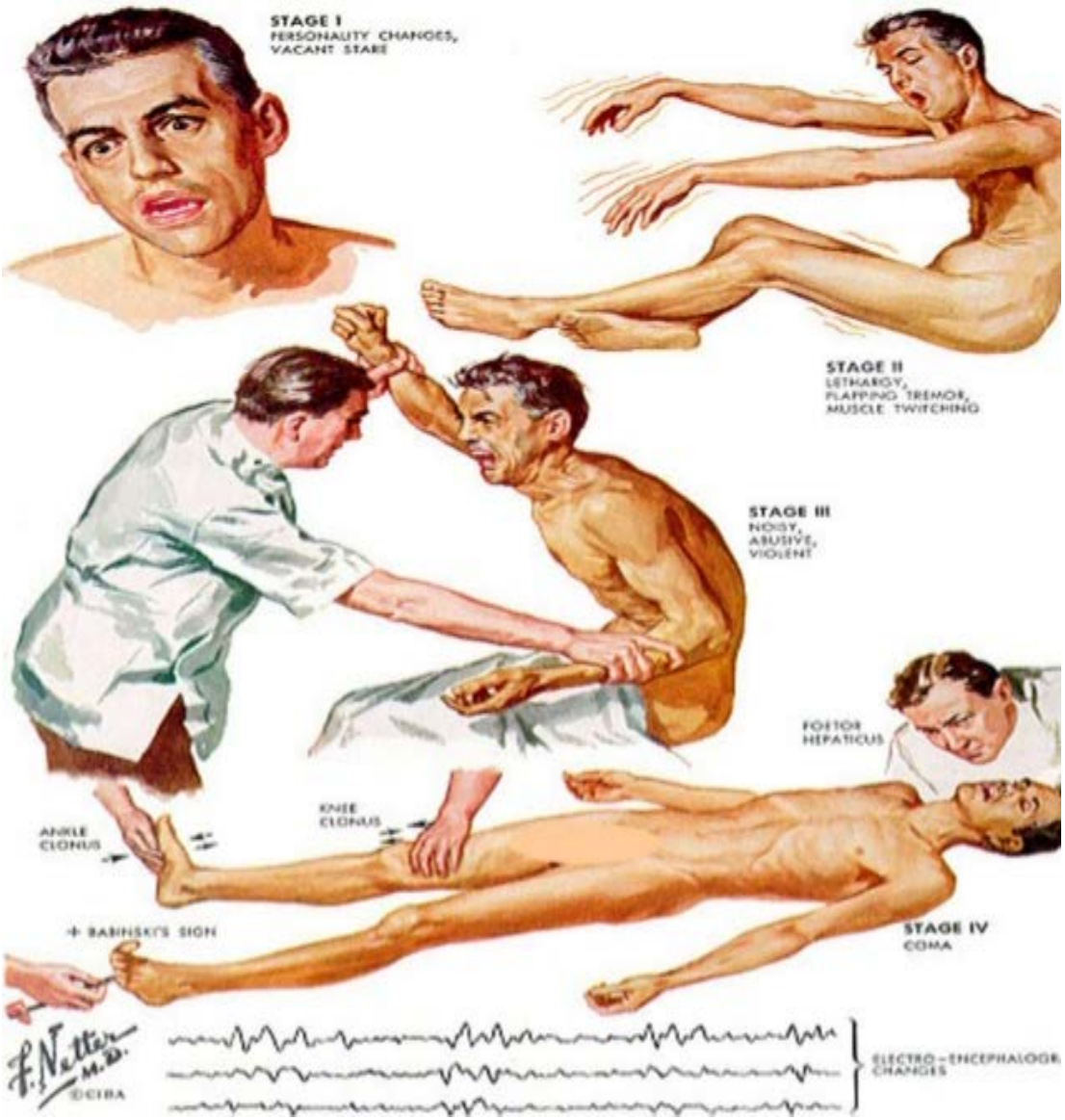
증가	감소
간성혼수 (Hepatic Coma) : Ammonia가 2000 μg/dℓ 이상 간뇌증후군, 중증 간장애 신부전, 요독증 선천성 Urea Cycle의 효소 결핍증	저단백 식사 빈혈

■ **암모니아 (Ammonia) : 간성혼수 (Hepatic Coma)**

-> 간경변과 같은 중증 간장애로 인한 간의 해독작용 부전이나, 신부전으로 인한 암모니아 배설부전의 결과 체내에 축적된 암모니아에 의한 중추신경계 손상

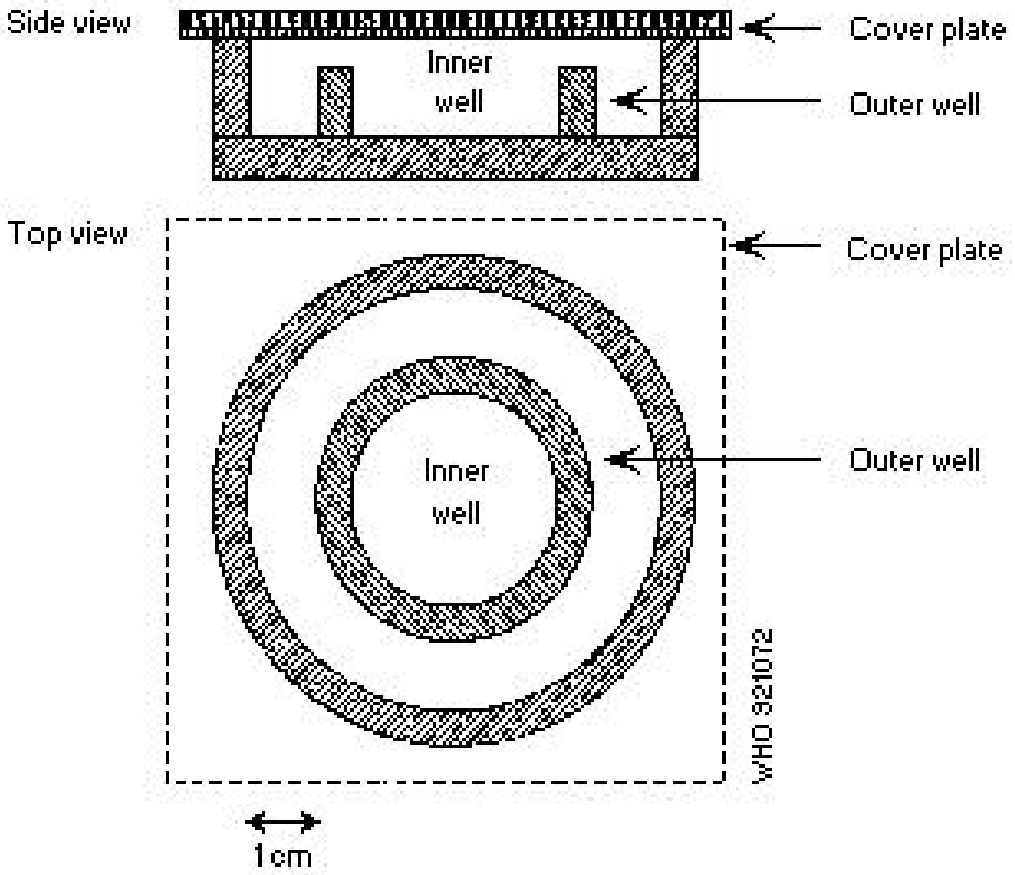


■ **암모니아 (Ammonia) : 간성혼수 (Hepatic Coma)**



■ 암모니아 (Ammonia) 측정법 : 확산법

- Conway 법 : 외실에서 혈장의 암모니아를 유리시킨 후, 내실에서 암모니아를 흡수하여 HCl로 적정하여 흡수된 암모니아 측정



*외실 : 암모니아(NH_3) 유리
-> K_2CO_3, Borate-Ethanol

*내실 : 암모니아(NH_3) 흡수
-> H_3BO_3 , H_2SO_4

*지시약
-> Methyl red + Methylene blue
-> Blue ----> Pink

*적정시약
-> 0.03N HCl

■ 암모니아 (Ammonia) 측정법 : 이온교환수지법

- Hyland 법 : 양이온교환수지로 암모늄이온을 흡착시킨 후 Alkali 로 Elution하여 Berthelot 반응으로 암모니아 정량

① 흡착 : Resin에 혈장 중의 암모늄이온을 흡착시킨다

-> $R\text{-}SO_3^-Na^+ + NH_4^+ \text{-----}\rightarrow R\text{-}SO_3^-NH_4^+ + Na^+$

② 탈착 : 희석 Alkali로 Ammonia를 용출시킨다

-> $R\text{-}SO_3^-NH_4^+ + Na^+ + NaOH \text{------}\rightarrow R\text{-}SO_3^-Na^+ + NH_3 + H_2O$

③ 발색 : 용출액 중의 Ammonia와 Berthelot 반응을 시킨다

-> $NH_3 + NaOCl + Phenol + Na_2Fe(CN)_5NO \text{--------}\rightarrow$ Indophenol blue

↑

Blue, 630nm