

PATOLOGIA I TERAPIA

JERZY MAZURCZAK

Oznaczanie aminokwasów w moczu koni

Z Kliniki Chorób Wewnętrznych SGGW Warszawa
Kierownik Kliniki: doc. dr F. NAGÓRSKI

Mocz w warunkach fizjologicznych zawiera pewną ilość aminokwasów niezwiązanych (aminokwasy wolne) oraz pewną ilość aminokwasów występujących w połączeniach peptydowych. Stosując metody chromatografii bibułowej istnieją możliwości oznaczania jakościowego i ilościowego aminokwasów w moczu.

Pierwsze prace z tego zakresu ogłosił Dent (1947), który badał występowanie aminokwasów w moczu ludzi zdrowych w przypadku cystynurii, i zwrócił uwagę na wyraźne różnice w składzie aminokwasów wydalanych z moczem w obu przypadkach. Doniesienia te spowodowały dalsze badania, które wykazały, że skład aminokwasów w moczu ulega zmianom w całym szeregu schorzeń (prace Dent'a, Boulanger'a, Kirby-Berry, Reed'a, oraz opracowania monograficzne Bergera, Schönerberga, Pépin'a). Wymienieni autorzy badali również występowanie aminokwasów w moczu ludzi zdrowych. Mimo stosowania przez nich metody chromatografii bibułowej, otrzymywali różne wyniki.

Jedni autorzy używają mocz do badania, poddając go bezpośrednio analizie chromatograficznej (Berger, Largot, Bickel, Wewalka), drudzy stosują odpowiednie przygotowanie moczu do analizy chromatograficznej (Dent, Müting, Schönerberg i inni). Większość jednakże autorów zwraca uwagę, że oznaczanie aminokwasów w moczu napotyka na trudności ze strony metodycznej, z uwagi na specyficzny skład moczu, różniący się swym charakterem (surowica krwi, płyn mózgowo-rdzeniowy itp.). Głównie w grę wchodzi tu związki nieorganiczne, mocznik, kwas moczowy, które należy usuwać z próbki badanej przed rozdzieleniem chromatograficznym, w przeciwnym wypadku utrudniają otrzymanie czytelnych chromatogramów. W oparciu o metody podane przez autorów, którzy oznaczali aminokwasy w moczu ludzkim, podjęto próby oznaczania aminokwasów w moczu u koni. W tym celu poddawano mocz koni bezpośrednio analizie chromatograficznej, następnie wypróbowano metodę podaną przez Bisserté (ekstrakcja alkoholem i zakwaszonym acetonem). Otrzymane wyniki nie były zadowalające. Po wypróbowaniu tych metod przyjęto następujący tryb postępowania.

Metodyka

5 ml moczu odbiałczano 10-krotną objętością alkoholu etylowego, odtłuszczanie przeprowadzono chloroformem wg Hermana. Następnie mocz poddawano elektrodializie wg Condensena. Po zakończeniu elektrodializy próbkę moczu odparowano do sucha (55°) i rozpuszczano w 0,5 ml alkoholu izopropylowego. Rozdział aminokwasów przeprowadzano przy pomocy jonoforezy*). Mocznik usuwano przez ponowne podanie rozdziałowi przy pomocy jonoforezy grupy aminokwasów obojętnych. Jako buforu użyto

*) jonoforezę przeprowadzano wg opisu podanego w pracy „Oznaczanie wolnych aminokwasów w płynie mózgowo-rdzeniowym u psów metodą jonoforezy i chromatografii”. Med. Wet. Nr 6, 1957 r.

0,5 N kwasu octowego, zastosowane napięcie 50 V/cm, czas rozdziału 20 min.

Poszczególne grupy aminokwasów poddawano dalszemu rozdziałowi przy pomocy chromatografii krążkowej i paskowej. Jako rozpuszczalnika użyto alkoholu n-butyłowego z kwasem octowym i wodą w stos. 4:1:5. Chromatogramy barwiono 0,2% ninhydryną. Identyfikację przeprowadzano przy pomocy reakcji barwnych specyficznych oraz standartów aminokwasów.

W celu oznaczenia wszystkich aminokwasów, próbkę moczu po elektrodializie poddawano hydrolizie kwaśnej z 6 N kwasem solnym w temp. 110—115° w ciągu 10 godz.

Omówienie wyników i dyskusja

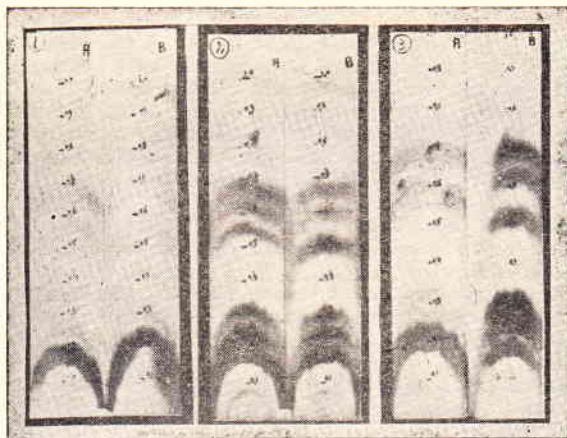
Stosując wyżej opisaną metodę stwierdzono w moczu konia hydrolizowanym występowanie nast. aminokwasów: kwas asparaginowy, kwas glutaminowy, cystyna, seryna, glicyna, treonina, alanina, lizyna, leucyna. Z uwagi na brak standartów nie stwierdzono dokładnie obecności tauryny. Występująca plama barwna odkładająca się na wysokości standartów waliny i metioniny, z uwagi na jej b. słabe stężenie nie pozwoliła na dokładne stwierdzenie jej podwójnego charakteru. Prawdopodobnie występowała tu w małych ilościach zarówno walina jak i metionina. W niektórych próbkach stwierdzono ponadto obecność proliny. W badanych próbkach, które pochodziły od 10 różnych koni, będących w różnym wieku i w różnych warunkach, stwierdzano z reguły obecność kwasu glutaminowego, kwasu asparaginowego, seryny, glicyny i alaniny. Pozostałe aminokwasy występowały w wielu przypadkach w śladowych ilościach na chromatogramach. (Fot. 1).

Przeprowadzone doświadczenia zarówno z moczem koni, jak i ludzkim potwierdzają spostrzeżenia Dolglicsh'a, Ryzla i innych, że obecność mocznika na chromatogramach powoduje przesunięcie wartości Rf poszczególnych aminokwasów, co z kolei utrudnia identyfikację poszczególnych aminokwasów (Fot. 2.) Z tych względów wskazanym jest eliminowanie mocznika z próbek moczu. Niektórzy autorzy zalecają stosowanie ureazy, przy pomocy której mocznik jest rozkładany przed doświadczeniem (Boissomasa). W doświadczeniach własnych uzyskano stosunkowo w łatwy sposób wydzielenie mocznika z badanego materiału przy pomocy jonoforezy. Stosując bufor Michel'a mocznik odkłada się razem z grupą aminokwasów obojętnych. Poddanie tej grupy aminokwasów ponownemu rozdziałowi jono-



Fot. 1. Chromatogram porównawczy

- A) grupy obojętnej aminokwasów po jonoforetycznym rozdziale próbek moczu konia
B) wybranych standartów aminokwasów

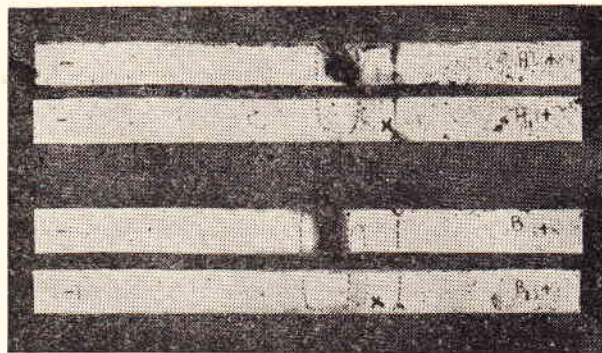


- Fot. 2. Wpływ mocznika na wartości „R_f” aminokwasów Chromatogram 1. A) aminokwasy grupy obojętnej poddane rozdzielaniu przed usunięciem mocznika
B) j. w. po oddzieleniu mocznika
„ 2. A) standarty aminokwasów naniesione łącznie z mocznikiem
B) j. w. bez mocznika
„ 3. A) aminokwasy grupy obojętnej poddane rozdzielaniu przed oddzieleniem mocznika
B) standarty aminokwasów

Poszczególne pary chromatogramów wykonane zostały w takich samych warunkach. Aminokwasy poddane rozdzielaniu łącznie z mocznikiem wykazują przesunięcie wartości R_f w porównaniu z tymi samymi aminokwasami rozdzielanymi w kwasie octowym.

foretycznemu w kwasie octowym pozwoliło na wydzielenie mocznika z grupy aminokwasów (Fot. 3). Przy przenoszeniu grupy aminokwasów obojętnej do wtórnej jonoforezy zastosowano

sposób Schlögl'a i Siegela, stosowany przez tych autorów w rechromatografii.

Fot. 3. Oddzielanie mocznika przy pomocy jonoforezy A, A₁ mieszanina standartów aminokwasów łącznie z mocznikiem

- A — połowa paska barwiona ninhydriną wykazuje miejsce odkładania się aminokwasów
A₁ — druga połowa paska barwiona aldehydem p-aminobenzoowym wykazuje miejsce odkładania się mocznika (x)
B, B₁ — j. w. wykonane z grupą aminokwasów obojętnych po jonoforetycznym rozdziale próbki moczu konia.

Z punktu widzenia klinicznego, zasadnicze znaczenie mają aminokwasy wolne występujące bądź w moczu fizjologicznym, bądź w stanach chorobowych (Berger). Jednakże znana jest rzeczą, że w moczu występuje dość pokaźna grupa peptydów, które na chromatogramie dają reakcje barwne z ninhydriną. Stwierdzenie ich obecności przeprowadzane jest po przez porównywanie chromatogramów wykonanych z próbek badanego moczu przed i po hydrolizie (Mütting). Tego rodzaju postępowanie, jakkolwiek dokładne, jest jednak uciążliwe. Przy zastosowaniu jonoforezy, jako wstępnego rozdzielenia aminokwasów na poszczególne grupy, uzyskano możliwość eliminowania peptydów przy chromatograficznej analizie aminokwasów w moczu. Stosując bufor pirydynowo-octanowy, oraz zachowując stale te same zawsze warunki rozdzielania jonoforetycznego, otrzymujemy rozmieszczenie grup aminokwasów zawsze w tych samych miejscach na pasku bibuły (Grassmann, Haning). Występowanie na pasku dodatkowych plam barwnych wskazuje na obecność innych związków reagujących z ninhydriną (głównie peptydów).

Jonofogramy z próbek moczu wykonane przed hydrolizą wykazują obecność grup barwiących się ninhydriną, umiejscowienie ich jest nietypowe w porównaniu z jonofogramem wykonanym ze standartami, i takie rozmieszczenie plam barwnych pozwala brać do dalszych oznaczeń tylko te ugrupowania, które odpowiadają lokalizacji poszczególnych grup aminokwasów.

Jonofogramy wykonane z próbek moczu przed hydrolizą poza peptydami, które odkładają się bardziej w kierunku katodowym wykazywały brak grupy aminokwasów kwaśnych, w niektórych przypadkach występowały tylko ślady

kwasu asparaginowego. Porównując następnie chromatogramy wykonane z moczu przed i po hydrolizie (po uprzedniej jonoforezie) grupy aminokwasów obojętnych i zasadowych nie spotkano różnic jakościowych. Spostrzeżenia te są częściowo analogiczne do wyników doświadczeń Mütinga, który przebadał w moczu ludzkim skład wolnych aminokwasów i wchodzących w połączenia peptydowe. Nie stwierdził on wyraźnych różnic. W przebadanych 40 przypadkach (mocz osobników zdrowych) na ogólną ilość 20 wykrytych aminokwasów tylko 4 aminokwasy nie występowały w moczu przed hydrolizą (kwas asparaginowy, prolina, oksyprolina i izoleucyna). Charakterystycznym jest natomiast fakt, że w dobowej ilości moczu, przed hydrolizą znajdowało się 809—815 mg a po hydrolizie 2221—2228 mg wszystkich aminokwasów.

Wnioski

W oparciu o przeprowadzone doświadczenia należy sądzić, że bezpośrednio poddawanie moczu analizie chromatograficznej nie daje zadowalających wyników. Wydaje się również celowym odpowiednie przygotowanie próbki moczu co w wyniku daje w miarę czytelne chromatogramy.

W świetle przytoczonych wyżej uwag otrzymane wyniki własne mogą posłużyć jako materiał wstępny do dalszego oznaczania aminokwasów w moczu u koni wykonywanego na większym, jednolitym materiale doświadczalnym.

Piśmiennictwo

- 1) Berger V. H.: Schweiz. Med. Wschr. 86, 24, 1956.
- 2) Braun P., Kisfaludy S., Budsky M.: Acta Medica Acad. Scienc. Hung. 7, 1—2, 1955.
- 3) Boissonas R., Lo Bianco S.: Experientia 8, 25, 1952.
- 4) Block R. J.: A manual of paper chrom. and paper electroph. N. Y. 1955.
- 5) Boulanger P., Biserte G.: Bull. Soc. Chim. Biol. 31, 696, 1949.
- 6) Boulanger P., Biserte G., Gourtan F.: j. w. 34, 366, 1952.
- 7) Consden R., Gordon A. H., Martin S. P.: Biochem. J. 41, 590, 1947.
- 8) Datta S., Harris H.: J. of Physiology 114, 4, 1951.
- 9) Decker P., Roffort W., Wagner H.: Klinische Wschr. 29, 23/24, 1954.
- 10) Dent E. E.: Biochem. J. 41, 240, 1947.
- 11) Decker R., Riffort W.: Chemischer Ztg. 74, 261, 1950.
- 12) Dalgliesh C. E.: Nature 166, 1076, 1951.
- 13) Grassmann W., Hannig K., Plöckl M.: Hoppe-Seilers Zschr. 299, 5/6, 1955.
- 14) Giddey C.: Schweiz. Med. Wschr. 83, 14, 1953.
- 15) Herman F., Bickel H., Fanconi G.: Helv. Pediatr. Acta 4, 1949.
- 16) Largot F.: Algerie Medicale 60, 8, 1956.
- 17) Müting D.: Hoppe-Seilers Zschr. 297, 2, 1954.
- 18) Mazurczak J.: Med. Wet. 6, 1957.
- 19) Noworytko, Sarnecka: Acta Biochem. Pol. 3, 1956.
- 20) Stanley M.: Am. J. of Physical Anthropology 14, 1, 1956.
- 21) Pèpin B.: Presse Medicale 91, 64, 1956.
- 22) Schönerberg H.: Klinische Wschr. 34, 6/10, 1956.
- 23) Schöneberg H. j. w. 34, 15/16, 1956.
- 24) Souchon F., Grunau J.: Zschr. für die gesamte exper. Medizin. 119, 6, 52.
- 25) Schlögl K., Siegel A.: Zschr. Physiolog. Chem. 292, 263, 1953.
- 26) Tuszkiewicz A. R., Opińska-Blauth J., Zajączkowska H.: Pol. Arch. Med. Wew. 25, 3a, 55.
- 27) Wewalka F., Wiener: Zschr. Inn. Med. 33, 12, 52.

E. MAZURČAK

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ В МОЧЕ ЛОШАДЕЙ

Для определения свободных аминокислот и аминокислот выступающих в пептидных соединениях в моче здоровых лошадей применено метод ионофореза и хроматографии.

Белок удаляли из мочи метиловым спиртом, неорганические вещества — путём электродиализа по Кондену а мочевину — ионофорезом с применением в качестве буферного раствора 0,5 N уксусной кислоты.

При ионофоретическом разделе получено группы кислых, средних и щелочных аминокислот. Группы полученных аминокислот подвергали разделу путём плоской или дисковой хроматографии и обозначали отдельные аминокислоты. Из опыта следует, что для хроматографического определения аминокислот является необходимым удаление из мочи лошади неорганических веществ и мочевины (это излишние при исследовании мочи человека), Начальный раздел при помощи ионофореза дает возможность элиминировать для дальнейших обозначений выступающие в моче пептиды.

JERZY MAZURCZAK

DETERMINATION OF AMINOACIDS IN THE URINE OF THE HORSE

Summary

It is the purpose of this work to determine free aminoacids and aminoacids combined as peptide linkages in the urine of normal horses by the use of ionophoresis and paper chromatography. Methods used for the determination of aminoacids in human urine were tested as to their applicability for the analysis of the aminoacid content of equine urine. Convenient appeared to be the method of combined ionophoresis with chromatography.

To remove proteins the urine to be analysed was treated with ethyl alcohol, inorganic compounds were removed by the use of electrodiagnosis according to Consden, urea was removed by the use of ionophoresis employing as the buffer solution 0,5 N acetic acid.

Ionophoretic separation produced groups of acid, neutral and basic aminoacids. These groups were separated by the use of strip paper and disc paper chromatography and the separate aminoacids were identified. Results of these examinations indicate that inorganic compounds and urea should be removed from the urine before using the paper chromatography method for the determination of aminoacids in equine urine (such a necessity is not observed with human urine).

A preliminary separation by the use of ionophoresis performed before the determination of free aminoacids enables to eliminate in further determinations the peptides present in the sample of urine.