



УКРАЇНА

(19) UA (11) 21606 (13) U
(51) МПК (2006)
G01N 33/48МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МЕТИЛМАЛОНОВОЇ КИСЛОТИ В СЕЧІ

1

2

(21) u200611279

(22) 26.10.2006

(24) 15.03.2007

(46) 15.03.2007, Бюл. № 3, 2007 р.

(72) Черноброва Олена Іванівна, Ільченко Олександр Володимирович

(73) ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ.М.І.ПИРОГОВА

(57) Спосіб визначення метилмалонОВОЇ кислоти в сечі, що передбачає пропускання 1мл сечі через

іонообмінну колонку з сильноосновною іонообмінною смолою DOWEX 1×4, елюацію метилмалонОВОЇ кислоти з наступним проведенням кольорової діазореакції, який **відрізняється** тим, що як елюент використовують 2М розчин хлориду натрію, далі очищують елюат активованим вугіллям і здійснюють спектрофотометрію фінального розчину при 620нм відносно контролю на реактиви.

Корисна модель відноситься до медицини, зокрема гематології та лабораторної діагностики, і стосується визначення сечової екскреції метилмалонОВОЇ кислоти (methylmalonic acid - MMA), що є чутливим маркером тканинного дефіциту вітаміну В₁₂.

Відомий колориметричний метод визначення MMA в сечі, вперше запропонований Giorgio A.J. та Plant G.W. [Giorgio A.J., Plant G.W. A method for the colorimetric determination of urinary methylmalonic acid in pernicious anemia //J. Lab. Clin. Med. - 1965. - Vol.66 (4).- P.667-676] і вдосконалений в подальшому Gultepe M. зі співавторами [Urine methylmalonic acid measurements for the assessment of cobalamin deficiency related to neuropsychiatric disorders /M. Gultepe, O. Ozcan, K. Avsar et al. //Clin. Biochem. 2003. -Vol.36. -P.275-282] передбачає пропускання 1мл сечі крізь іонообмінну колонку з сильноосновною іонообмінною смолою DOWEX 1×4, наступне елюювання MMA 0,1 розчином хлориду водню (HCl), проведення кольорової діазореакції та спектрофотометрію оптичної густини фінального розчину відносно дистильованої Н₂О.

Однак відомий метод недостатньо точний, адже разом з MMA на іонообмінній смолі з сечі переносяться органічні речовини (ацетооцтова кислота, сечова кислота, креатинін, аскорбат та ін.), які аналогічно MMA реагують з діазотованим

пара-нітроаніліном, спричинюючи інтенсивно бурю кольорову реакцію, що перешкоджає подальшому визначенню MMA. Залежність оптичної густини розчину продуктів взаємодії цих сполук з діазореагентом від довжини світла наближається до лінійної (але не є лінійною). Вважаючи цю залежність лінійною, Gultepe M. зі співавторами запропонували математичний вираз, за допомогою якого відокремлюється частина оптичної густини, яка відповідає за поглинання світла саме продуктами реакції з MMA. За умов визначення, оптична густина розчину перевищує величини 0,2-0,4; тобто знаходиться в тій ділянці значень шкали спектрофотометра, де зростає відносна похибка визначення. Цю похибку в деякій мірі автори компенсували застосуванням високочутливого цифрового спектрофотометра. Однак існує і складова помилки визначення, яка полягає в певній нелінійності залежності оптичної густини розчину продуктів взаємодії речовин, що перешкоджають визначенню MMA, з діазореактивом на ділянці від 570нм до 670нм. Урахування цієї складової є досить важкою задачею, оскільки будь-який зразок сечі є індивідуальним за своїм складом.

В основу корисної моделі «Спосіб визначення метилмалонОВОЇ кислоти в сечі» поставлене завдання шляхом введення обробки елюату активованим вугіллям усунути заважаючий вплив органічних речовин з сечі (ацетооцтова кислота, сечова

(13) U
(11) 21606
(19) UA

кислота, креатинін, аскорбат тощо), що перешкоджають подальшому визначенню MMA.

Це досягається способом, що передбачає пропускання 1мл сечі через іонообмінну колонку з сильноосновною іонообмінною смолою DOWEX 1×4, елюацію MMA з наступним проведенням кольорової діазореакції, який відрізняється тим, що в якості елюенту використовують 2М розчин хлориду натрію (NaCl), далі очищують елюат активованим вугіллям і здійснюють спектрофотометрію фінального розчину при 620nm відносно контролю на реактиви.

Спосіб здійснюється таким чином: 1мл сечі, з величиною рН попередньо доведеної до 6,5, пропускається крізь іонообмінну колонку (d=6мм), до якої було вміщено 600мг сильноосновної аніонообмінної смоли DOWEX® 1×4, Cl form strongly basic (SIGMA-ALDRICH) з розміром гранул 50-100mesh. Висота шару смоли повинна складати 25-30мм. Після пропускання сечі через колонку смола промивається 30мл дистильованої води. Далі сорбована на смолі MMA елююється 10мл 2М розчину NaCl. До елюату додають 375мг активованого вугілля (подрібнений фармакопейний препарат, розмір частинок менше 1мм), одержану суспензію перемішують протягом 10хв., після чого активоване вугілля відокремлюють центрифугуванням при 1500об/хв впродовж 30 хвилин. Готують діазореагент додаванням 8мл 0,5% розчину нітриту натрію (NaNO₂) до 30мл 5,4мМ розчину пара-нітроаніліну (75мг пара-нітроаніліну на 100мл 0,2М HCl). Після витримування при кімнатній температурі протягом 15хв., суміш охолоджують на льоду до 2-6°C, далі до неї додають 8мл 0,2М розчину ацетату натрію. Стандартні розчини готують розведенням наважки MMA (Methylmalonic acid, 99%, SIGMA) у 2М розчині NaCl до концентрації 0,5мг/мл з подальшим розведенням 2М розчином NaCl до концентрацій 0,002, 0,005, 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2мг/мл. 1мл елюату або стандартного розчину перемішують з 1,5мл 1М ацетатного буфера рН=4,3. Далі до суміші додають 1,5мл холодного діазореагенту, пробірку закорковують для запобігання контакту з вуглекислотою (CO₂) атмосферного повітря, ретельно перемішують і поміщають до водяної бані на 30 хвилин при 37°C. Потім до суміші додають 1мл 3М розчину гідроксиду натрію (NaOH), вільного від карбонатів. Після додаткової інкубації при 37°C протягом 30 хвилин вимірюють оптичну густину розчину (MMA з діазотованим паранітроаніліном в лужному середовищі спричинює ізумрудно-зелений колір) на шкальному спектрофотометрі типу ЛОМО-26 при довжині хвилі світла 620nm в кюветі товщиною 10мм відносно контролю на реактиви (1мл дистильованої води, який обробляють за аналогічною методикою). На основі визначень оптичної густини стандартних розчинів будують калібрувальний графік, за яким визначають концентрації MMA в дослідних розчинах, враховуючи розведення в ході аналізу (з 1мл сечі утворюється 10мл елюату). Слід зауважити, що хімічні реакції, які відбуваються в ході визначення MMA, є чутливими до зовнішніх факторів, зокрема температури в приміщенні. Міжсерійні коливання можуть складати до 20% в обидві боки від певних

середніх значень. Саме тому обов'язково при кожній серії визначень відтворювати градуіровочну шкалу. Залежність оптичної густини (D) фінального розчину від концентрації MMA (C) добре описується рівнянням типу

$$D = \frac{D_{\max} \cdot k \cdot C}{1 + k \cdot C}$$

Вище вказана залежність в обернених координатах $\frac{1}{D} = f\left(\frac{1}{C}\right)$ являє собою пряму лінію, що

значно полегшує математичну обробку експериментальних даних. Метод дозволяє вимірювати концентрацію MMA в сечі від 3мкг/мл та вище. В тих випадках, коли кількість MMA в сечі (uMMA) перевищує 300мг/л, повторно змішують елюат з ацетатним буфером і діазореактивом, проте замість 1мл беруть елюату в 10 разів менше і доводять об'єм до 1мл 2М розчином хлориду натрію (NaCl), а при розрахунку концентрації враховують розведення. Вміст креатиніну в сечі (uCrea) визначають за реакцією з пікриновою кислотою у лужному середовищі. Далі знаходять співвідношення MMA до відповідних концентрацій креатиніну (uMMA/uCrea ratio) в кожному зразку сечі. uMMA/uCrea ratio нижче ніж 20мг/г розглядають як ознаку оптимального забезпечення організму вітаміном В₁₂, в межах 20-25мг/г як ознаку субнормального статусу, а понад 25мг/г - як дефіцит вітаміну В₁₂.

Приклад

Хвора В., 69 років перебувала на стаціонарному лікуванні в гематологічному відділенні Вінницької обласної лікарні ім. М.І. Пирогова з діагнозом: Вітамін В₁₂ дефіцитна анемія, вкрай тяжкого ступеню. Фунікулярний мієлоз по типу сенситивної атаксії. Анемічна кардіоміопатія, НК ІІА.

20.05.2005 до початку застосування цианокобаламіну у хворої здійснено забір зразка ранкової сечі, який було заморожено. Після відтаювання і центрифугування, 1мл сечі пропущено крізь іонообмінну колонку з наступним елююванням 2М розчином HCl, обробкою елюату активованим вугіллям, проведенням кольорової діазореакції в процесі якої отримано ізумрудно-зелений колір фінального розчину, оптична густина якого відносно контролю на реактиви склала 0,288. При відповідних перерахунках встановлено, що uMMA дорівнює 254,82мг/л. В подальшому визначено, що вміст uCrea та uMMA/uCrea ratio склали 0,58г/л та 436,95мг/г. Отже, розвиток клінічних ознак фунікулярного мієлозу у хворої був підтверджений сечовою екскрецією MMA, що значно перевищувала нормальні значення, адже відомо, що саме MMA спричинює демієлінізацію нервових стовбурів з розвитком специфічних неврологічних розладів при Віздефіцитній анемії. Через 8 тижнів застосування цианокобаламіну при повторній перевірці сечової екскреції MMA, виявлено її повну нормалізацію (uMML, uCrea та uMML/uCrea ratio склали 21,09мг/л, 1,12г/л та 18,76мг/г відповідно), а при клінічному обстеженні - поступову регресію неврологічних ознак.

Таким чином, запропонована корисна модель «Спосіб визначення метилмалонової кислоти в

сечі», що завдяки обробці елюату активованим вугіллям призводить до повної адсорбції на вугіллі заважаючи домішок з сечі (причому MMA на вугіллі практично не сорбується), які взаємодіють з діазо-

реагентом в лужному середовищі, підвищує точність дослідження та дає можливість вимірювати оптичну густину фінального розчину на відносно чутливих шкальних спектрофотометрах.