

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ МЕТИЛМАЛОНОВОЇ КИСЛОТИ В СЕЧІ

О.І. Чернوبرова, О.О. Пентюк, О.С. Азаров, О.В. Ільченко, В.П. Маленький
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА

Пропонується модифікований метод визначення метилмалонової кислоти (ММК) у сечі, який полягає в пропусканні 1 мл сечі крізь іонообмінну колонку із сильноосновною іонообмінною смолою DOWEX 1X4 з подальшим елююванням ММК 2 М розчином NaCl, очищенням елюату активованим вугіллям та проведенням кольорової діазореакції. Оптичну густину розчину визначали при 620 нм. Графік залежності оптичної густини від концентрації є лінійним у зворотних координатах ($1/D - 1/C$). Метод дозволяє визначити ММК у сечі в концентрації від 3 мкг/мл та вище.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: метилмалонова кислота, сеча, спектрофотометрія.

ВСТУП. Метилмалонова кислота (ММК) є нормальним продуктом гідролізу метилмалоніл-СоА, який, у свою чергу, утворюється при катаболізмі пропіонової або ізобутанової кислоти. Оскільки вітамін В₁₂ є ко-фактором для реакції перетворення метилмалоніл-СоА до сукциніл-СоА, то при дефіциті цього вітаміну спостерігається накопичення в сироватці проміжного продукту – ММК, 30 % якої екскретується із сечею [4].

З іншого боку, ниркова недостатність або зниження об'єму циркулюючої крові можуть призводити до збільшення вмісту сироваткової ММК, що не спричинено недостатністю кобаламіну [7]. Тому, на думку багатьох авторів [5, 6], при дослідженні недостатності вітаміну В₁₂ необхідно визначати вміст ММК саме в сечі, а не в сироватці крові (тим більше, що концентрація ММК у сечі в 40 разів вища за концентрацію в сироватці). До того ж, визначати її в добовій сечі або зіставляти з вмістом креатиніну [6, 8].

Основних принципів, за якими проводять визначення ММК, є порівняно небагато. Найсучасніші методи, що базуються на газовій хроматографії з мас-спектрометричним детектуванням, потребують дорогого обладнання, а традиційні методи тонкошарової хроматографії [3] є занадто трудомісткими і повільними. Спектрофотометрія ж займає проміжну позицію, дозволяючи проводити відповідні вимірювання досить швидко і дешево [2, 6].

© О.І. Чернوبرова, О.О. Пентюк, О.С. Азаров, О.В. Ільченко, В.П. Маленький, 2007.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. 1 мл сечі з величиною рН, попередньо доведеною до 6,5, пропускали крізь іонообмінну колонку (d=6 мм), в яку було вміщено 600 мг сильноосновної іонообмінної смоли DOWEX® 1x4, Cl⁻ form (SIGMA-ALDRICH) з розміром гранул 50-100 меш. Висота шару смоли складала 25-30 мм. Після витікання сечі смолу промивали 30 мл дистильованої води, після цього сорбовану ММК елюювали 10 мл 2 М розчину хлориду натрію. До елюату додавали 375 мг активованого вугілля (подрібнений фармакопейний препарат, розмір частинок – менше 1 мм), одержану суспензію перемішували протягом 10 хв, після чого вугілля відокремлювали шляхом центрифугування при 1500 об./хв упродовж 30 хв.

Готували діазореагент, додаючи 8 мл 0,5 % розчину нітриту натрію до 30 мл 5,4 мМ розчину пара-нітроаніліну (75 мг пара-нітроаніліну на 100 мл 0,2 М соляної кислоти). Після витримання при кімнатній температурі протягом 15 хв суміш охолоджували на льоду до 2-6 °С, після чого до неї додавали 8 мл 0,2 М розчину ацетату натрію.

Стандартні розчини готували шляхом розведення наважки ММК (Methylmalonic acid, 99 %, SIGMA) у 2 М розчині хлориду натрію до концентрації 0,5 мг/мл з подальшим розведенням 2 М розчином хлориду натрію до концентрацій 0,002, 0,005, 0,01, 0,02, 0,05, 0,1, 0,2 мг/мл.

1 мл елюату або стандартного розчину змішували з 1,5 мл 1 М ацетатного буфера

(рН=4,3). Після цього до суміші додавали 1,5 мл холодного діазореагенту, пробірку закорковували для запобігання контакту з вуглекислотою повітря, ретельно перемішували та поміщали у водяну баню на 30 хв при 37 °С, після чого до суміші додавали 1 мл 3 М розчину гідроксиду натрію, вільного від карбонатів. Після додаткової інкубації при 37 °С протягом 30 хв вимірювали оптичну густину розчину на спектрофотометрі ЛОМО-26 при довжині хвилі світла 620 нм у кюветі товщиною 10 мм відносно контролю на реактиви (1 мл дистильованої води, який було оброблено за аналогічною методою).

На основі визначень оптичної густини стандартних розчинів будували калібрувальний графік, за яким визначали концентрації ММК у дослідних розчинах, враховуючи розведення в ході аналізу (з 1 мл сечі утворюється 10 мл елюату).

Концентрацію креатиніну в сечі визначали стандартним набором (НВП "Філісіт-Діагностика", Україна) за реакцією з пікриною кислотою у лужному середовищі.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. За основу було взято метод визначення метилмалонової кислоти, вперше запропонований [5] і модифікований у подальшому [6]. Різниця полягає у різних підходах до усунення впливу деяких органічних речовин (ацетооцтова і сечова кислоти, креатинін та ін.), які містяться у сечі. Ці речовини переносяться із сечі на іонообмінній смолі разом з ММК і дають кольорову реакцію з діазореагентом, забарвлюючи розчин у бурий колір, що перешкоджає подальшому визначенню. Залежність оптичної густини розчину продуктів взаємодії цих сполук з діазореагентом від довжини світла наближається до лінійної (але не є лінійною). Вважаючи цю залежність лінійною, автори роботи [6] запропонували математичний вираз, за допомогою якого відокремлюється частина оптичної густини, яка відповідає за поглинання світла саме продуктами реакції з ММК. За умов визначення оптична густина розчину перевищує величини 0,2-0,4, тобто перебуває в межах тих значень, де зростає відносна похибка визначення. Цю похибку деякою мірою компенсують шляхом застосування високочутливого цифрового спектрофотометра.

Однак існує й інша складова помилки визначення, яка полягає в певній нелінійності залежності оптичної густини розчину продуктів взаємодії речовин, що перешкоджають визначенню, з діазореактивом на ділянці від 570 до 670 нм. Урахування цієї складової є

досить важким завданням, оскільки будь-який зразок сечі є індивідуальним за своїм складом. Тому ми дещо змінили саму методику аналізу, видаляючи ті компоненти сечі, які заважають визначенню.

При модифікуванні методу було замінено елюат з 0,1 М хлориду водню (як це запропоновано [6]) на 2 М хлорид натрію. Виявилось, що при цьому кількість ММК, яка визначається, не зменшується і складає 97-99 % від доданої. Крім того, було введено обробку елюату активованим вугіллям. Це призвело до повної адсорбції на вугіллі заважаючих домішок, причому, як з'ясувалося, за умов визначення метилмалонової кислоти на вугіллі практично не сорбується.

Залежність оптичної густини D фінального розчину від концентрації ММК C дуже добре описується рівнянням типу:

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

Ця залежність в обернених координатах

$\frac{1}{D} = f\left(\frac{1}{C}\right)$ являє собою пряму лінію, що значно полегшує математичну обробку експериментальних даних.

Слід мати на увазі, що хімічні реакції, які відбуваються в ході визначення ММК, є дуже чутливими до зовнішніх факторів, зокрема до температури в приміщенні. Міжсерійні коливання можуть складати до 20 % в кожен сторону від певних середніх значень. Тому важливим і обов'язковим є відтворення градуированої шкали при кожній серії визначень.

Запропонованим методом визначили кількість ММК у сечі 34 здорових людей. Після визначення вмісту креатиніну було встановлено відношення концентрацій ММК до відповідних концентрацій креатиніну в кожному зразку сечі. За величинами ексцесу та асиметрії доведено, що розподіл одержаних величин задовільно відповідає нормальному закону. Середня величина та стандартне відхилення склали $(10,55 \pm 4,55)$ мг/г креатиніну, що відповідає літературним даним щодо цієї величини для здорових людей – менше 20 мг ММК на 1 г креатиніну [1].

ВИСНОВКИ. 1. Запропоновано модифікований метод визначення метилмалонової кислоти у сечі, придатний для виконання на відносно малочутливих спектрофотометрах.

2. Визначення вмісту ММК у сечі здорових людей дало результати, які відповідають літературним даним.

ЛІТЕРАТУРА

1. Дуднік В., Омельченко Л., Пентюк О. Патогенетична роль недостатності вітамінів B₆, B₉ і B₁₂ у формуванні анемічного синдрому у ювенільному ревматоїдному артриті // Ліки України. – 2005. – № 2 (91). – С. 119-123.
2. Снегирева Л.В., Арешкина Л.Я. Метод определения метилмалоновой кислоты // Прикл. биохим. и микробиол. – 1972. – 8, вып. 3. – С. 363-366.
3. Barness L.A., Young D., Mellman W.J. et al. Methylmalonate excretion in a patient with pernicious anemia // N. Engl. J. Med. – 1963. – № 268. – P. 144-146.
4. Elin R.J., Winter W.E. Methylmalonic acid. A test whose time has come? // Arch. Pathol. Lab. Med. – 2001. – 125. – P. 824-827.
5. Giorgio A.J., Plaut G.W.E. A method for the colorimetric determination of urinary methylmalonic acid in pernicious anemia // J. Lab. Clin. Med. – 1965. – 66, № 4. – P. 667-676.
6. Gultepea M., Ozcana O., Avsara K. et al. Urine methylmalonic acid measurements for the assessment of cobalamin deficiency related to neuropsychiatric disorders // Clinical Biochemistry. – 2003. – 36. – P. 275-282.
7. Hvas A.M., Ellegaard J., Nexø E. Increased plasma methylmalonic acid level does not predict clinical manifestations of vitamin B₁₂ deficiency // Arch. Intern. Med. – 2001. – 161, № 2. – P. 1534-1541.
8. Norman E.J. Urinary methylmalonic acid/creatinine ratio defines true tissue cobalamin deficiency // Br. J. Hematol. – 1998. – 100. – P. 614-615.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТИЛМАЛОНОВОЙ КИСЛОТЫ В МОЧЕ

Е.И. Черноброва, А.А. Пентюк, А.С. Азаров, А.В. Ильченко, В.П. Маленький
ВИННИЦКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н.И. ПИРОГОВА

Резюме

Предложен модифицированный метод определения метилмалоновой кислоты (ММК) в моче, суть которого состоит в пропускании 1 мл мочи через ионообменную колонку с сильноосновной ионообменной смолой DOWEX 1X4 с последующим элюированием ММК 2 М раствором NaCl, очисткой элюата активированным углем и проведением цветной диазореакции. Оптическую плотность раствора определяли при 620 нм. График зависимости оптической плотности от концентрации линеен в обратных координатах ($1/D - 1/C$). Метод позволяет определять ММК в концентрации от 3 мкг/мл и выше.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: метилмалоновая кислота, моча, спектрофотометрия.

SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF METHYLMALONIC ACID IN URINE

O.I. Chernobrova, O.O. Pentiuk, O.S. Azarov, O.V. Ilchenko, V.P. Malenky
VINNYTSIA NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY BY M.I. PYROHOV

Summary

Spectrophotometric method for measuring methylmalonic acid (MMA) in urine has been developed. 1 ml of urine was mixed with a column containing a strongly basic anion exchanger resin DOWEX 1X4. After the resin was washed with distilled water, the methylmalonic acid was eluted from the resin with 2 M solution of NaCl. The eluate was cleared by activated charcoal. Following this, aliquot portion was treated with diazoreagent. Then, the absorbance at 620 nm was measured. It was founded, that the dependence of absorbance on MMA concentration is linear in coordinates $1/D - 1/C$. The sensitivity of the method is 3 mkg MMA per 1 ml of urine.

KEY WORDS: methylmalonic acid, urine, spectrophotometric method.

Адреса для листування: О.В. Ильченко, а/с 3032, Вінниця, 21027, Україна.