

356.33:616—008.9[547.565.2]—034:616.63—07

METODA PŘÍPRAVY VZORKŮ MOČE PRO STANOVENÍ METABOLITŮ KATECHOLAMINŮ V POLNÍCH PODMÍNKÁCH

Pplk. ing. Josef LUXA, MUDr. Vladimír DOLEŽAL, CSc.,
Ústav leteckého zdravotnictví, Praha (náčelník plk. MUDr. M. Haňka)

Studium výkonnosti člověka v terénních podmínkách, např. při horských expedicích, v polních podmínkách na letištích apod., je nemyslitelné bez moderních biochemických testů. Při vysokohorských i jiných expedicích jsou však těžko realizovatelná složitá biochemická vyšetření a i v komfortně vybavených expedicích nelze na místě zpracovat odebraný materiál tak jako v laboratoři.

Jednou z biochemických metod, používaných v našich laboratořích při studiu humorálních reakcí organismu ve stresu, je stanovení metabolitů katecholaminů, kyseliny vanilmandlové a homovanilové v moči podle Armstronga a spol. (1956).

Aby bylo možné sledovat vylučování těchto látek močí při studiích ve složitých terénních podmínkách, zvláště tedy tam, kde nelze uchovávat po delší dobu moč v konstantních parametrech pro další zpracování nebo ji transportovat (omezenost zavazadlového prostoru při expedicích, práce na vzdálených letištích ap.), zavedli jsme jednoduchou metodu pro odběr vzorků moče a jejich přechovávání v suchém stavu s možností pozdějšího zpracování v laboratoři. Při zavádění metody se přihlíželo k maximální jednoduchosti, snadné použitelnosti a k materiálové a prostorové nenáročnosti.

Metodika

Pro odběr a prvotní zpracování moče v terénních podmínkách jsou podle našich zkušeností nejvhodnější a také nejnútější tyto pomůcky: PE láhve na 1000 ml, polyetylenová odměrka na 250 ml a několik pipet (protinárazově uložených).

Moč se sbírá v určitém časovém úseku (nejlépe noční) do polyetylenových lahví. Po změření a zapsání objemu se odpipetují 2 ml a nanesou se na impregnovaný chromatografický papír Watman 3 o rozměrech 8×8 cm. Impregnaci papírků provádíme před expedicí roztokem o složení 10 ml HCl, 25 g NaCl a 100 ml H₂O. Papírek s naneseným vzorkem moče se usuší, řádně označen se vloží zpět do transportních polyetylenových obálek a může být v chladu a temnotě skladován 3 měsíce i déle. Podle našich zkušeností se vlastnosti takto zpracovaného vzorku významně nemění po 3 měsících uložení ve tmě při laboratorní teplotě (asi 25 °C). Je nutno upozornit, že papírek je po impregnaci kruchý a je proto zapotřebí při nanášení moče jisté opatrnosti.

Laboratorní zpracování těchto vzorků se liší od běžných postupů především v eluci. Papírek se rozstříhá na malé kousky. Ty se vloží do odstředivkové zkumavky a zalijí se 4 ml destilované vody. Kousky papírků se tyčinkou nebo jiným vhodným předmětem rozmělní a obsah zkumavky se převrství 4 ml etylacetátu. Vzorek se nechá potom 24 hodin stát v chladu. Dále se zpracovává po třepání, odstředění a odpaření vrstvy etylacetátu stejným způsobem (extrakce etylacetátem) jako při zpracovávání normální moče pro papírovou nebo tenkovrstvou chromatografii, tzn. další extrakce 3 a 2 ml etylacetátu.

Výsledky

Zpracovali jsme současně vzorky moče a vzorky z papírků následující den po usušení, pak vzorky moče z papírků za 3 měsíce. Vzorky byly chromatografovány dvourozměrně na papíře podle Armstronga (1956).

v mikrog/hod VMK	SE	Korekční faktor	HVK mikrog/hod	SE	Korekční faktor
normální moč					
225,0	± 7,7	1	401,1	±10,3	1
vzorky moče z papírků ihned					
111,0	±17,4	2,02	363,1	±16,6	1,10
vzorky moče z papírků za 3 měs.					
108,8	±12,9	2,08	362,6	±26,0	1,11
n = 15					

Diskuse

Jak je patrné z výsledků, výtěžek jak HVK, tak zvláště VMK je nižší než při stanovení přímo z moče a výsledky je nutné podle kontrolních stanovení upravit korekčními faktory. Ke snížení výtěžku stanovovaných kyselin dochází ve fázi převedení suchého vzorku do vody a je pravděpodobně způsobeno vazebnými silami fyzikálně-chemické povahy, vážícími molekuly fe-

nolkarbonových kyselin i balastních látek na celulóзовá vlákna. Velikost této vazby je pak rozdílná podle stavby molekul jednotlivých látek a způsobuje snížení výtěžku různou měrou. Tento výklad podporuje i skutečnost, že chromatogramy jsou velice čisté a čitelnější než při běžném zpracování moče. Právě zachycení balastu a části některých fenolkarbonových kyselin, vyskytujících se ve velkých kvantech zvyšuje přehlednost a čitelnost chromatogramů. Při porovnání obou chromatogramů je vidět, že většina fenolkarbonových kyselin se vyskytuje v menším množství, skvrny jsou menší, čistě probarvené. Některé skvrny málo zřetelné, s těžko definovaným barevným odstínem, viditelné na chromatogramech z normální moče, úplně chybí. Tyto látky nebyly námi identifikovány a nejsou ani uvedeny na mapách v citované Armstrongově práci. Chromatogramů by bylo výhodné využít podle zájmu pracovišť a podle možností (dostatek standardních látek) i pro stanovení ostatních fenolkarbonových kyselin. Zdá se, že tohoto způsobu konzervace moče by bylo možno použít

i pro stanovení jiných metabolitů nadledvinkové kůry.

Metoda odběru moče s následným zpracováním vzorků v laboratoři byla prakticky ověřena při účasti čs. horolezců v sovětské expedici na Pamír v r. 1967 [Wolf a spol. 1970]. Pro tento účel byla připravena, byla však již s úspěchem použita i při některých studijních výzkumech v terénu.

Souhrn

Byla vypracována metodika odběru a konzervace vzorků moče pro stanovení metabolitů katecholaminů při práci v obtížných terénních podmínkách. Podle metody je možné skladovat močové vzorky při labor. teplotě i několik měsíců, aniž byla ovlivněna kvalita stanovení.

Literatura

1. Armstrong, M. D., Shaw, K. F., Wall, P. E.: The phenolic acid of human urine. *J. Biol. Chem.*, 218, 1956, 293—303.
2. Wolf, J., Doležal, V., Luxa, J.: Urinary excretion of vanillylmandelic and homovanilic acids in mountain climbing. *J. Appl. Physiol.*, 29, 1970, 1:51—53