

## ОПИТИ ЗА КОЛИЧЕСТВЕНО ОПРЕДЕЛЯНЕ НА ЦИСТИН В КОНКРЕМЕНТИ

В. Лесичков, Д. Бакалов, М. Щерева, Л. Халачева

Клиниката проявява по-голям интерес към минералния състав на конкрементите, а от органичните съставки предимно към пикочната киселина — уратите. От свободните аминокиселини интерес представлява главно цистинът поради случаите на типично генетично заболяване — цистинурия и цистиноза.

Сравнително малък е броят на работите, посветени на аминокиселинния състав на конкрементите от различен произход. Принос в това отношение представляват работите на G. Gasser и сътр. (9, 10), които с помощта на хроматографския анализ са установили наличието на цистин, цистеин, аспарагин, лизин, глицин, тирозин и други свободни аминокиселини в бъбречни конкременти и конкременти от пикочен мехур.

Хроматографският анализ е свързан с трудности поради значителното наличие на соли, получавани при първичната солнокиселинна обработка на конкрементите и твърде малкото съдържание на аминокиселините. Налага се предварително отделяне на солите и аминокиселините чрез диализа или посредством йонообмен.

За количествено определяне на аминокиселините се прилага методът на Ф. Крамер (2), използващ като проявител нинхидрин със станохлорид в смес с метилцелозолв (гликолмонометилестер), натриева основа и оцетна киселина. Най-често обаче за тази цел се използва методът, даден от Т. С. Пасхина (3), който се основава на образуването на медни комплекси на аминокиселините с нинхидрина. По подобен начин са работили и А. Н. Пономарева и сътр. (4), В. П. Волков (1), Д. Т. Цонев (6) и др. За определяне на цистина се оказва подходящ методът на А. Д. Семенов и сътр. (5), при който като проявител на аминокиселините се използва нинхидрин с кадмиев хлорид в разтвор на нормален бутанол. Развива се червена оцветка, която се измерва фотометрично. Горните автори са разработили метода при отлъчване на аминокиселини от природни води посредством йонообменна смола НУ-1.

Във връзка с наши аналитични проучвания върху конкременти (7, 8) ние си поставихме за задача намирането на подходящ способ за количествено определяне на цистин в конкременти. За целта, използвайки реактива на Семенов, бе разработена калибрационна крива за проверка на закона на Буге — Бер. Същевременно бе приготвен моделен разтвор с обичайните за конкрементите соли и цистин. Разделянето бе извършено върху йонообменна смола Dowex 50 в Н-форма. Сравнителното проучване на взетото количество спрямо намереното количество цистин бе проведено фотометрично.

### Материали

Моделен разтвор, съдържащ цистин — 0,1 мг/мл;  $\text{Ca}^{2+}$  — 0,4 мг/мл,  $\text{Mg}^{2+}$  — 0,08 мг/мл,  $\text{Na}^{+}$  — 0,02 мг/мл,  $\text{K}^{+}$  — 0,02 мг/мл,  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$  — 0,44 мг/мл, и  $\text{PO}_4^{3-}$  — 0,995 мг/мл; цистин — 100  $\gamma$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  — 400 $\gamma$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  — 80 $\gamma$ ,  $\text{Na}^{+}$  — 20 $\gamma$ ,  $\text{K}^{+}$  — 20 $\gamma$ ,  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$  — 440 $\gamma$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  — 995 $\gamma$ , йонообменна смола Dowex 50, 10% натриева основа,  $2\text{NNH}_3$ , солна киселина — 5,10 и 15%, нинхидрин, ацетон, нормален бутанол, кадмиев двухлорид, ледена оцетна киселина. Нинхидриновият реактив съдържа 0,075 г кадмиев двухлорид, 3 мл вода, 0,6 мл ледена оцетна киселина, 2 г нинхидрин в 100 мл ацетон.

*Начин на работа.* Смолата се накисва за 24 часа в наситен разтвор на натриев хлорид, за да може да набъбне. След това се приготвя колонката в бюрета от 25 мл с диаметър 10 мм с височина около 200 мм. Смолата леко се набива със стъклена пръчка. За превръщането ѝ в Н-форма колонката се промива последователно с по 100 мл 5,10 и 15% солна киселина. След това колонката се промива с дестилирана вода до отрицателна реакция за хлорни йони.

От моделния разтвор се отмерват 15 мл, разреждат се до около 50 мл с дестилирана вода, алкализират се с 10% натриева основа в границите на рН от 5 до 9 и се пропускат през колонката. В тези граници на стойностите на рН става най-добро задържане на аминокиселините, както са установили Семенов и сътрудници при работа със смолата КУ-1 (5).

Елуирането на цистина се постига със 150 мл  $2\text{nNH}_3$ . Елуатът се изпарва на водна баня до сухо. Към сухия остатък се прибавят 2 мл дестилирана вода, 1 мл нинхидринов реактив и 5 мл нормален бутанол. Сместа се разбърква добре, прехвърля се количествено в колбичка от 25 до 50 мл и се нагрява на кипяща водна баня около 15 минути. След охлаждане до обикновена температура оцветеният разтвор се прехвърля в градуирана епруветка и се долива до 10 мл с нормален бутанол. Фотометрира се веднага на Пулфрих фотометър при филтър  $S_{53}$  и компенсационна течност нормален бутанол при дебелина на слоя 2 см.

Съдържанието на цистина се определя по калибровъчна крива, построена по стандартен разтвор на цистин, съдържащ 0,1 мг/мл цистин, и обработена по същия начин.

Направени бяха и определения на цистин в течността на моделния разтвор след изтичането ѝ от колонката, както и на повторно промитата колонка след елуирането, които не показаха съдържание на цистин. Това говори за пълно задържане и пълно елуиране на цистина при посочените условия.

### Резултати

Резултатите от извършените изследвания показват, че определеното следва закона на Буге — Бер. Средноквадратното отклонение между взетото и намереното количество цистин е  $\pm 0,002$  и е показано на таблица 1 и 2.

Таблица 1

Съдържание на цистин в мг	0,50	1,00	1,50	2,00	2,50
Екстинкция	0,23	0,42	0,52	0,72	0,76

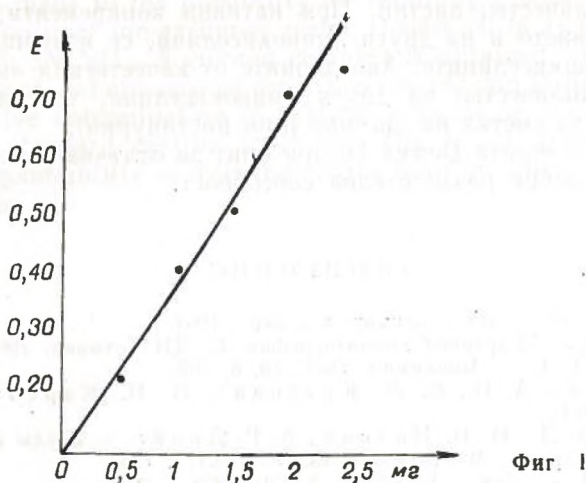


Таблица 2

За количеството на взетия и намерения цистин

Взето количество цистин в мг/мл		Намерено		
		екстинкция	цистин в мг	разлика
1	1,50	0,54	1,50	0,00
2	1,50	0,57	1,70	0,15
3	1,50	0,56	1,60	0,10
4	1,50	0,54	1,50	0,05
5	1,50	0,54	1,50	0,00
6	1,50	0,52	1,40	0,10
7	1,50	0,57	1,70	0,20
8	1,50	0,55	1,55	0,05
9	1,50	0,54	1,50	0,00
10	1,50	0,52	1,40	0,10
11	1,50	0,54	1,50	0,00
12	1,50	0,54	1,50	0,00
13	1,50	0,57	1,70	0,20
14	1,50	0,56	1,60	0,10
15	1,50	0,54	1,50	0,00
16	1,50	0,55	1,55	0,05
17	1,50	0,57	1,70	0,20
18	1,50	0,56	1,60	0,10
19	1,50	0,54	1,50	0,00
20	1,50	0,54	1,50	0,00
	1,50	средно $\bar{X}=1,55$	I 0,002 t=0,52	

### Обсъждане

От приведените данни се вижда, че при наличност на цистин в моделен разтвор на конкремент са възможни изолирането и количественото му определяне. Статистическата обработка по метода на Студент Фишер показва, че не съществува съществено различие между стойностите на взетото и намереното количество цистин. При нативни конкременти, където е възможно присъствието и на други аминокиселини, се извършва общо определяне на аминокиселините. Ако данните от качествения анализ покажат незначително количество на други аминокиселини, то оптичната плътност се отнася за сметка на цистина (при цистинурия).

Работата със смолата Dowex 50 при опит за отлъчване на солите на цистина показва добра разделителна способност.

### КНИГОПИС

1. Волков, В. П. — Вест. дермат. и венер., 1964, 1.
2. Крамер, Ф. — Хартиена хроматография, С. ДИ Техника, 1961.
3. Пасхина, Т. С. — Биохимия, 1954, 19, 6, 702.
4. Пономарева, А. Н., В. Л. Кретович, П. И. Карева. — *Биохимия*, т. 29, 2, 1964.
5. Семенов, О. Д., И. Н. Ивлева, В. Г. Дацко. — Труды комиссии по аналитической химии, М., Изд. АН СССР т. XIII, 1963.
6. Цонев, Д. Т. — Докл. АН СССР, 2, 120, 1958.
7. Bakalov, D., M. Shtereva, L. Halatcheva, V. Lesitchkov. — Annual sc. pap. of the higher med. inst. Varna, V III, F I.
8. Gasser, G. and al. — *Z. Urol*, 49, 1956.
9. Gasser, G. and al. — *Z. Urol*, 50, 8—9, 1957.

### ОПЫТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦИСТИНА В КОНКРЕМЕНТАХ

В. Лисичков, Д. Бакалов, М. Щерева, Л. Халачева

### РЕЗЮМЕ

Приводится возможность задержки цистина модельным раствором конкремента на ионообменной смоле Dowex 50 в виде H-формы. Элюация проводят при помощи  $2\text{N.NH}_3$ . Под воздействием нингидринового реактива получают цветной комплекс, оптическую плотность которого отсчитывают на фотометре Пульфриха. Количественное определение цистина проводят по калибровочной кривой, построенной из стандартных растворов цистина. Ионообменная смола Dowex 50 обладает хорошей разделительной способностью в отношении цистина из солей модельного раствора конкремента.

**ATTEMPTS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION  
OF CYSTINE, OCCURRING IN CONCREMENTS**

*VI, Lesichkov, D. Bakalov, M. Shtereva, L. Halacheva*

SUMMARY

Reference is made to the possibility for retaining cystine by sample concret solution over ion-exchange resin Dowex 50 in H-form. Elution is performed with 2N  $\text{NH}_3$ . A colored complex is obtained with the aid of a ninhydrin reagent, whose optical density is recorded on Pulfrich photometer. The quantitative determination of cystine is based on a calibrated curve, produced by standard cystine solutions. The ion-exchange resin Dowex 50 displays a good ability of splitting cystine from the salts of sample concret solutions.