

'N GASCHROMATOGRAFIESE ANALISE VIR  
ORGANIESESUURURIE

deur

CARL HENRI MARAIS

Verhandeling voorgelê ter gedeeltelike  
nakoming van die vereistes vir die graad  
Magister Scientiae in Biochemie aan die  
Potchefstroomse Universiteit vir  
Christelike Hoër Onderwys

Leier: Prof. Dr. C.J. Reinecke

Potchefstroom  
Mei 1985

## INHOUDSOPGAW

### HOOFSTUK 1

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| INLEIDEND EN DOELSTELLING..... | 2 |
|--------------------------------|---|

### HOOFSTUK 2

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| DIE METABOLIESE BASIS VAN ORGANIESESUURURIE.....                                                                           | 4  |
| 2.1 Inleidend .....                                                                                                        | 4  |
| 2.2 Die terme organiese suur en organiesesuur=urie.....                                                                    | 5  |
| 2.3 n Algemene voorstelling van katabolisme.....                                                                           | 8  |
| 2.4 Abnormaliteite in die katabolisme van die vertakte ketting aminosuur, leusien, wat lei tot egte organiesesuururie..... | 10 |
| 2.5 Aminosuururie geassosieerd met organiesesuur=urie .....                                                                | 11 |
| 2.5.1 Inleidend .....                                                                                                      | 11 |
| 2.5.2 Sub-metaboliese weë betrokke by PKU .....                                                                            | 15 |
| 2.5.3 Ander metaboliese wat aangetref word in die urine van PKU pasiënte .....                                             | 19 |
| 2.6 Literatuurverwysings .....                                                                                             | 22 |

## HOOFSTUK 3

|                                                         |                                                                                                                                                                |
|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DIE EKSTRAKSIE EN GASCHROMATOGRAFIESE FRAKSIONERING VAN |                                                                                                                                                                |
| ORGANIESE SURE UIT URINE ..... 24                       |                                                                                                                                                                |
| 3.1                                                     | Literatuuragtergrond ..... 24                                                                                                                                  |
| 3.1.1                                                   | Ekstraksieprosedures ..... 24                                                                                                                                  |
| 3.1.1.1                                                 | Die vloeistof-vloeistofekstraksieprosedure.. 24                                                                                                                |
| 3.1.1.2                                                 | Ekstraksie met behulp van anioonuitruilings=<br>chromatografie ..... 26                                                                                        |
| 3.1.1.3                                                 | Stoomdistillasie ..... 29                                                                                                                                      |
| 3.1.1.4                                                 | Gevolgtrekkings ..... 30                                                                                                                                       |
| 3.1.2                                                   | Derivaatvorming van die geëkstraheerde ma=<br>teriaal ..... 31                                                                                                 |
| 3.1.2.1                                                 | Trimetielsilanering ..... 31                                                                                                                                   |
| 3.1.2.2                                                 | Derivaatvorming van keto- en aldehydegroepe<br>voor trimetielsilanering ..... 33                                                                               |
| 3.1.2.3                                                 | Metilering ..... 35                                                                                                                                            |
| 3.1.3                                                   | Gas-vloeistofchromatografie ..... 37                                                                                                                           |
| 3.2                                                     | Vergelykende ondersoek van twee ekstraksie=<br>tegnieke en die gepaardgaande fraksionering<br>van die materiaal met behulp van gaschro=<br>matografie ..... 42 |
| 3.2.1                                                   | Inleidend ..... 42                                                                                                                                             |
| 3.2.2                                                   | Anioonuitruilingschromatografie ..... 42                                                                                                                       |
| 3.2.2.1                                                 | Inleidend ..... 42                                                                                                                                             |
| 3.2.2.2                                                 | Chemikalieë ..... 43                                                                                                                                           |
| 3.2.2.3                                                 | Reagense ..... 44                                                                                                                                              |
| 3.2.2.4                                                 | Eksperimentele prosedure ..... 46                                                                                                                              |
| 3.2.2.5                                                 | Resultate ..... 49                                                                                                                                             |
| 3.2.2.6                                                 | Gevolgtrekkings ..... 57                                                                                                                                       |

|         |                                     |    |
|---------|-------------------------------------|----|
| 3.2.3   | Vloeistof-vloeistofekstraksie ..... | 58 |
| 3.2.3.1 | Inleidend .....                     | 58 |
| 3.2.3.2 | Chemikalieë .....                   | 58 |
| 3.2.3.3 | Reagense .....                      | 59 |
| 3.2.3.4 | Eksperimentele prosedure .....      | 60 |
| 3.2.3.5 | Resultate .....                     | 62 |
| 3.2.3.6 | Gevolgtrekking .....                | 68 |
| 3.2.4   | Samevattende gevolgtrekkings .....  | 68 |
| 3.3     | Literatuurverwysings .....          | 71 |

## HOOFSTUK 4

### ORGANIESESUURURIEPATRONE ONDER 'N VERSKEIDENHEID TOESTANDE. 74

|           |                                                                                                                   |    |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1       | Tipiese normale patrone en faktore wat dit<br>beïnvloed .....                                                     | 74 |
| 4.1.1     | Normale patrone .....                                                                                             | 74 |
| 4.1.2     | Geneesmiddels .....                                                                                               | 83 |
| 4.1.2.1   | Aspirien (Asetielsalisilaat) .....                                                                                | 83 |
| 4.1.2.1.1 | Metaboliese afbraak van salisielsuurmetabo=<br>liete .....                                                        | 85 |
| 4.1.2.2   | Die fenotiasienkalmeermiddels .....                                                                               | 88 |
| 4.1.3     | Ouderdom .....                                                                                                    | 91 |
| 4.2       | Organiesesuururie geassosieerd met verstande=<br>like vertraging .....                                            | 94 |
| 4.2.1     | Inleidend .....                                                                                                   | 94 |
| 4.2.2     | Die begrip sifting ("Screening") .....                                                                            | 94 |
| 4.2.3     | Sifting vir nie-amino-organiesesuururië.....                                                                      | 95 |
| 4.2.4     | Selektiewe sifting vir organiesesuururië in<br>n plaaslike opleidingsentrum vir verstandelike<br>gestremdes ..... | 96 |

|           |                                                                                 |     |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.2.4.1   | Inleidend .....                                                                 | 96  |
| 4.2.4.2   | Pasiënte .....                                                                  | 97  |
| 4.2.4.3   | Siftingsprosedure .....                                                         | 97  |
| 4.2.4.4   | Resultate .....                                                                 | 100 |
| 4.2.4.4.1 | Algemene siftingstoetse .....                                                   | 100 |
| 4.2.4.4.2 | Aminosuuranalise .....                                                          | 100 |
| 4.2.4.4.3 | Organiese suuranalise .....                                                     | 103 |
| 4.2.4.5   | Bespreking .....                                                                | 112 |
| 4.3       | Organiesesuururie by pasiënte waar reeds 'n<br>kliniese diagnose gemaak is..... | 113 |
| 4.3.1     | Inleidend .....                                                                 | 113 |
| 4.3.2     | Fenielketonurie (PKU) .....                                                     | 114 |
| 4.3.2.1   | Pasiënt JB .....                                                                | 119 |
| 4.3.2.2   | Pasiënte JK en AK .....                                                         | 121 |
| 4.3.2.3   | Samevattend .....                                                               | 124 |
| 4.3.3     | Metielmaloonsuururie .....                                                      | 125 |
| 4.3.3.1   | Inleidend .....                                                                 | 125 |
| 4.3.3.2   | Die Metaboliese defek .....                                                     | 126 |
| 4.3.3.3   | Samevattend .....                                                               | 132 |
| 4.3.4     | "Maple syrup"-uriensiekte .....                                                 | 133 |
| 4.3.4.1   | Inleidend .....                                                                 | 133 |
| 4.3.4.2   | Die metaboliese defek .....                                                     | 133 |
| 4.3.4.3   | Samevattend .....                                                               | 141 |
| 4.3.5     | Aminosuurwanabsorpsie defek .....                                               | 141 |
| 4.3.5.1   | Inleidend .....                                                                 | 141 |
| 4.3.5.2   | Kliniese beeld.....                                                             | 142 |
| 4.3.5.3   | Biochemiese beeld .....                                                         | 142 |
| 4.4       | Literatuurverwysings .....                                                      | 150 |

## HOOFSTUK 5

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| SAMEVATTENDE AANBEVELINGS ..... | 154 |
|---------------------------------|-----|

|    |                  |     |
|----|------------------|-----|
| 6. | ABSTRACT .....   | 157 |
| 7. | BEDANKINGS ..... | 161 |
| 8. | AFKORTINGS ..... | 162 |

## LYS VAN FIGURE

|            |                                                                                                                                                                 |    |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGUUR 2.1 | Voorstelling van 'n kataboliese weg van ver= binding A .....                                                                                                    | 9  |
| FIGUUR 2.2 | Metaboliese afbraak van Leusien tot Ase= toasynsuur en Asetiel-KoA .....                                                                                        | 11 |
| FIGUUR 2.3 | Voorstelling van die kataboliese verloop van die fenielalanien via die hoofmetabo= liese weg asook sub-metaboliese weë soos in werking by fenielketonurië ..... | 16 |
| FIGUUR 2.4 | Bakteriële en endogene afbraak van feniel= alanien, tirosien en histidien volgens van der Heiden C (1972) .....                                                 | 21 |
| FIGUUR 3.1 | Voorstelling van 'n chromatogram .....                                                                                                                          | 39 |
| FIGUUR 3.2 | Skematiese voorstelling van die bepaling deur middel van anioonuitruilingschromato= grafie .....                                                                | 48 |
| FIGUUR 3.3 | C <sub>10</sub> -C <sub>24</sub> karboksielsuurmengsel, gefraksio= neer met behulp van 10% = OV 101 op Chromo= sorb WHP 80 tot 100 maas .....                   | 50 |
| FIGUUR 3.4 | Fraksionering van organiese suur-TMS-deri= vate geëkstraheer uit die standaard orga=                                                                            |    |

|             |                                                                                                                                                                             |    |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|             | niese suuroplossing met behulp van DEAE-Sephadex<br>anioonuitruilingschromatografie .....                                                                                   | 51 |
| FIGUUR 3.5  | Fraksionering van organiese suur-TMS-derivate<br>soos geëkstraheer uit die standaard organiese<br>suuroplossing wat met p-hidroksibensaldehyd<br>verryk is .....            | 53 |
| FIGUUR 3.6  | Fraksionering van organiese suur-TMS-derivate<br>soos geëkstraheer uit die standaard organiese<br>suuroplossing wat met p-hidroksifeniel-piruvien=<br>suur verryk is .....  | 54 |
| FIGUUR 3.7  | Fraksionering van organiese suur-TMS-derivate<br>geëkstraheer uit urine van normale kontroles<br>met behulp van DEAE-Sephadex-Anioonuitruil=<br>lingschromatografie .....   | 55 |
| FIGUUR 3.8  | Fraksionering van organiese suur-TMS-derivate<br>geëkstraheer uit urine van normale kontroles<br>wat vooraf aan 'n bariumsoutpresipitering by<br>pH 11,5 onderwerp is ..... | 56 |
| FIGUUR 3.9  | Skematiese voorstelling van die bepaling deur<br>middel van vloeistof-vloeistofekstraksie .....                                                                             | 63 |
| FIGUUR 3.10 | Die gaschromatografiese fraksionering van 'n<br>saamgestelde (C <sub>10</sub> -C <sub>24</sub> )-koolwaterstofmengsel...                                                    | 64 |
| FIGUUR 3.11 | Fraksionering van organiese suur-TMS-derivate<br>geëkstraheer uit urine van 'n normale kontrole<br>met behulp van vloeistof-vloeistofekstraksie...                          | 67 |
| FIGUUR 4.1  | 'n Tipiese normale profiel van organiese sure<br>soos verkry vanaf 'n normale kontrolepersoon....                                                                           | 76 |
| FIGUUR 4.2  | Individuele variasie van organiese suuruit=<br>skeiding deur 'n normale persoon oor 'n 24 uur<br>tydperk.....                                                               | 77 |

|             |                                                                                                                                                                    |     |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| FIGUUR 4.3  | A + B Variasie in organiese suuruitskei-<br>ding by normale kontrole persone .....                                                                                 | 79  |
| FIGUUR 4.3  | C + D Variasie in organiese suuruitskeiding<br>by normale persone .....                                                                                            | 80  |
| FIGUUR 4.4  | Profiel van 'n normale persoon na asetielsali-<br>silaat (aspirien) belading .....                                                                                 | 87  |
| FIGUUR 4.5  | Effek van chloropromasien op die gaschroma-<br>tografiese analise van organiesesuururie....                                                                        | 90  |
| FIGUUR 4.6  | Organiese suuruitskeiding deur normale kon-<br>trole persone tussen gestelde ouderdomsgren-<br>se .....                                                            | 93  |
| FIGUUR 4.7  | Die akkumulatiewe persentasie van pasiënte<br>in die opleidingsentrum teenoor ouderdom.....                                                                        | 98  |
| FIGUUR 4.8  | Organiese suurprofiel van pasiënt 22 .....                                                                                                                         | 105 |
| FIGUUR 4.9  | Organiese suurprofiel van pasiënt 76 soos ty-<br>dens die finale analise .....                                                                                     | 106 |
| FIGUUR 4.10 | Organiese suurprofiel van pasiënt 79 soos by<br>die eerste (A) en finale (B) analise .....                                                                         | 107 |
| FIGUUR 4.11 | Organiese suurprofiel van pasiënt 85 (finale<br>analise) .....                                                                                                     | 109 |
| FIGUUR 4.12 | Organiese suurprofiel van pasiënt 86 tydens<br>die finale analise .....                                                                                            | 110 |
| FIGUUR 4.13 | Organiese suurprofiel van pasiënt 97 tydens<br>die finale analise .....                                                                                            | 111 |
| FIGUUR 4.14 | Voorstelling van die kataboliese verloop van<br>fenielalanien en tirosien soos voorgestel<br>deur Mrochek <u>et al.</u> , 1973 en La Du en<br>Gjessing, 1978 ..... | 117 |
| FIGUUR 4.15 | Organiese suurprofiel van pasiënt JB geas-<br>sosieerd met fenielketonurie .....                                                                                   | 120 |

|             |                                                                                                                                                         |     |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| IGUUR 4.16  | Organiese suurprofiel van pasiënt JK<br>geassosieerd met onbehandelde fenielke=<br>tonurie .....                                                        | 122 |
| FIGUUR 4.17 | Organiese suurprofiel van pasiënt AK geas=<br>sosieerd met fenielketonurie op 'n beperkte<br>fenielalanien dieet .....                                  | 123 |
| FIGUUR 4.18 | Vorming van organiese sure in metielma=<br>loonsuuremie .....                                                                                           | 127 |
| FIGUUR 4.19 | Organiese suurprofiel van 'n pasiënt met<br>Metielmaloonsuururie .....                                                                                  | 129 |
| FIGUUR 4.20 | Die metaboliese blok in "Maple syrup"-<br>uriensiekte .....                                                                                             | 135 |
| FIGUUR 4.21 | Urinêre organiese sure van 'n pasiënt met<br>"Maple-syrup"-uriensiekte .....                                                                            | 136 |
| FIGUUR 4.22 | Oksidatiewe dekarboksilasie van keto-sure..                                                                                                             | 137 |
| FIGUUR 4.23 | Totale organiese suuruitskeiding tydens<br>die fenielalanientoleransietoets van 'n<br>pasiënt met 'n moontlike fenielalanien ab=<br>sorpsie defek ..... | 144 |
| FIGUUR 4.24 | Organiese suuruitskeiding van 'n pasiënt<br>met 'n moontlike fenielalanien absorpsie<br>defek voordat en nadat p-kresol eksogeen<br>bygevoeg is .....   | 146 |
| FIGUUR 4.25 | Moontlike bakteriële afbraak van fenielala=<br>nien by 'n pasiënt met 'n fenielalanienwanab=<br>sorpsiesindroom .....                                   | 148 |
| FIGUUR 4.26 | Model-aminosuurwanabsorpsiesindroom .....                                                                                                               | 149 |

|           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |     |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| TABEL 2.1 | Organiesesuururië waarby aminosuururië geassosieerd met organiesesuururië nie ingesluit is nie .....                                                                                                                                                                                                              | 7   |
| TABEL 3.1 | .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 61  |
| TABEL 4.1 | Die urinêre uitskeiding van suurmataboliete deur pasiënt 1 tydens (a) n onbeperkte dieet; (b) n lae koolhidraatdieet; (c) n sintetiese (chemies saamgestelde) dieet en pasiënt 2 tydens diëte (a) en (b). Uitgedruk in mmol RPA per 24 uur. (RPA = Piekarea relatief tot n-tetrakosaan die interne standaard).... | 82  |
| TABEL 4.2 | Die Mataboliete van Salisielsuur .....                                                                                                                                                                                                                                                                            | 84  |
| TABEL 4.3 | Substituent groepe in die mataboliete van Fenothiasien .....                                                                                                                                                                                                                                                      | 89  |
| TABEL 4.4 | Biochemiese siftingsprosedure vir urine van verstandelike vertraagde pasiënte .....                                                                                                                                                                                                                               | 99  |
| TABEL 4.5 | .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 101 |
| TABEL 4.6 | Dunlaaganalise van aminosure tydens n aantal herhalings .....                                                                                                                                                                                                                                                     | 102 |
| TABEL 4.7 | Katabolietuitskeiding in urine deur PKU-pasiënte .....                                                                                                                                                                                                                                                            | 118 |
| TABEL 4.8 | Reeds aangetoonde kataboliete in die urine van M.S.U.S.-pasiënte .....                                                                                                                                                                                                                                            | 139 |

*En die Here God het die mens geformeer  
uit die stof van die aarde en in sy  
neus die asem van die lewe geblaas.  
So het dan die mens 'n lewende siel  
geword.*

*Genesís 2:7*

### INLEIDEND EN DOELSTELLING

Weinig navorsing is tot dusver in die RSA gedoen op die voorkoms van organiese sure in liggaamsvloeistowwe, soos onder andere in bloed en urine, ten spyte van die belangrikheid van hierdie verbindings as indikators van aangebore metaboliese defekte. Veral twee faktore kan genoem word waarom hierdie navorsingsrigting in die RSA agterweë gelaat is.

Die eerste rede is geleë in die eie aard van die organiese= suururië as siekte toestande. Eerstens is die toestande baie seldsaam en tweedens is hulle uiteenlopende ten opsigte van biochemiese versteurings wat die betrokke kliniese beelde onderlê. Om die biochemiese versteuring te identifiseer verg daarom uitgebreide ervaring en gebruikmaking van hoogs gespesialiseerde apparatuur. Die gebrek aan laboratoria met sodanige apparatuur is die tweede faktor.

Die gebruik van gaschromatografie vir die identifikasie van die organiese sure het 'n groot stimulus gegee aan navorsing oor die identifikasie en karakterisering van organiese= suururië. Deurdat daar in liggaamsvloeistowwe 'n komplekse samestelling en 'n groot verskeidenheid kataboliete kan voorkom, is die identifisering van individuele komponente daarin, nog steeds 'n probleem.

Gevorderde tegniese apparatuur soos 'n massaspektrometer, gekoppel aan die gaschromatograaf en aan rekenaar sisteme

is beskikbaar, en word in verskeie buitelandse laboratoriums wel vir identifisering van organiese sure gebruik. Hierdie apparatuur is egter geweldig duur, en gevorderde opgeleide personeel word benodig om hierdie apparate te beman.

Met behulp van 'n minder gesofistikeerde eksperimentele opset, naamlik deur gebruikmaking van gaschromatografiese tegnieke, kan egter al 'n redelik betroubare identifisering en karakterisering van organiesesuururië gedoen word.

Die doelstellings van die resultate wat in hierdie verhandeling aangebied word is dan:

1. om 'n evaluering te maak van bestaande metodes waarmee organiese sure uit urine geëkstraheer word, en hierdie metodes dan onderling eksperimenteel te vergelyk;
2. om 'n mengsel van organiese sure wat tipies met organiesesuururië geassosieer is, met behulp van gaschromatografie te fraksioneer en te identifiseer;
3. om bestaande tegnieke te evalueer deur te gebruik in die sifting vir organiesesuururië in 'n goed gedefinieerde populasie asook in gevalle van geselekteerde pasiënte waarby 'n organiesesuururië of aanverwante defek, met behulp van ander metodes vasgestel is.

### DIE METABOLIESE BASIS VAN ORGANIESESUURURIE

#### 2.1 Inleidend

Biochemiese informasie vorm 'n baie belangrike aanvullende bydrae tot die kliniese beskrywing van pasiënte met aangebore metaboliese defekte.<sup>1</sup> 'n Al groter wordende hoeveelheid sieketetoestande word tans geïdentifiseer as metaboliese defekte weens 'n fout in een of meer biochemiese prosesse.<sup>2</sup> Daar is tans meer as 56 sieketetoestande bekend waar 'n aangebore enkel ensiem defek, die direkte oorsaak is van die voorkoms van hoë konsentrasies van suur metaboliete in die bloed en urine.<sup>20,21</sup>

Die opsporing van kort-ketting, nie-aminosure in urine, het ontwikkel as 'n belangrike laboratorium tegniek vir die diagnose van aangebore metaboliese defekte.<sup>4</sup>

Gedurende die laaste aantal jare het veral die gaschromatografiese profilering van organiese sure in die urine van pasiënte (sowel as vermoedelike pasiënte) 'n aansienlike bydrae gelewer, ten opsigte van die ontdekking en noukeurige definieering van nuwe metaboliese siektes.

Die verskillende tipes sieketetoestande wat met organiese suur uitskeiding in urine gepaard gaan, sal nie in hierdie hoofstuk volledig beskryf word nie. Vanuit 'n teoretiese agtergrond, en aan die hand van voorbeelde, sal die metaboliese

basis van organiesesuururië egter in die algemeen toegelig word.

## 2.2 Die terme organiese suur en organiesesuururie

Alvorens die metaboliese fout(e) by organiesesuururië omskryf word, is dit noodsaaklik om eerstens 'n organiese suur en die gepaardgaande term organiesesuururie te definieer

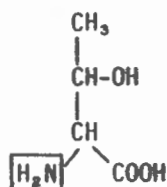
Die *organiesesuururië* is 'n groep ressesiewe aangebore defekte wat gekarakteriseer word deur die verhoogde urinêre uitskeiding van organiese suur metaboliete van aminosure, koolhidrate, lipiede of nukleotiede.

Met betrekking tot bogenoemde kan die term *organiese suur* ge-definieer word as 'n lae-molekulêre-gewig, wateroplosbare karboksielsuur, wat nie 'n primêre aminogroep besit nie, en gevolglik nie deur aminosuur analise, geanaliseer kan word nie.<sup>6</sup>

---

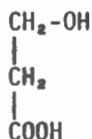
\* Soms word na hierdie siektetoestand in die literatuur ook verwys as organiesesuuremie. Dit beteken in werklikheid die aanwesigheid van 'n verhoogde konsentrasie van 'n organiese suur of sure in die plasma. Gewoonlik is daar tesame met 'n verhoogde konsentrasie van die kataboliet(e) in die plasma, ook 'n verhoogde konsentrasie in die urine aanwesig. Daarom gebruik sekere outeurs Metielmaloonsuuremie terwyl ander Metielmaloonsuururie verkies, as beskrywend vir dieselfde toestand.

## h Aminosuur



Primêre aminogroep van Treonien

## h Organiese suur



3-hidroksipropioonsuur

By verdere omskrywing van die term organiesesuururië moet daar onderskei word tussen egte organiesesuururië en aminosuuremië of aminosuururië geassosieerd met organiesesuururië. By sommige organiesesuururië word aminosure wel sekondêr verhoog. By egte organiesesuururië word daar nie (n verhoogde konsentrasie van) aminosure tesame met (n verhoogde konsentrasie van) organiese sure in die liggaamsvloeistowwe uitgeskei nie. Hierdie groep siektetoestande is dus moeilik met aminosuuranalise aantoonbaar.

In Tabel 2.1 word n aantal van die organiesesuururië aangegee. Hiperaminozuururie is nie daarby ingesluit nie.

Die organiesesuururië resulteer elk in n karakteristieke spektrum van verhoogde organiese sure in die urine van die betrokke pasiënt. Die diagnostiese waarde van hierdie spektra van organiese sure is van groot belang.<sup>7</sup>

TABEL 2.1 Organiesesuururië\* waarby aminosuururië geassosieerd met organiesesuururië nie ingesluit is nie

|     |                                                                              |
|-----|------------------------------------------------------------------------------|
| 1.  | Vertakte-ketting ketosuururie                                                |
| 2.  | Isovaleriensuururie                                                          |
| 3.  | 3-metielkrotoniel-KoA-karboksilase defek en gekombineerde karboksilase defek |
| 4.  | 3-metielglutokoonsuururie                                                    |
| 5.  | Beta-ketothiolase defek                                                      |
| 6.  | Propioonsuururie                                                             |
| 7.  | Metielmaloonsuururie                                                         |
| 8.  | Melksuururie                                                                 |
| 9.  | D-melksuururie                                                               |
| 10. | Defekte geassosieer met ketose                                               |
| 11. | Dikarboksielsuururie                                                         |
| 12. | Etielmaloniel/dikarboksielsuururie                                           |
| 13. | Glutaarsuururie                                                              |
| 14. | 3-hidrokسي-3-metielglutaarsuururie                                           |
| 15. | 2-ketoadiapiensuururie                                                       |
| 16. | 2-hidroksiglutaarsuururie                                                    |
| 17. | Primêre hiperoksaalurie                                                      |
| 18. | D-gliseriensuururie                                                          |
| 19. | Pirolutamiensuururie                                                         |
| 20. | Meervoudige karboksilase defek                                               |
| 21. | Alkaptonurie                                                                 |

\*Hierdie organiesesuururie is nie met behulp van aminosuur analiese oplosbaar nie, en word meestal slegs met behulp van gaschromatografiese tegnieke, tesame met kliniese data, gediagnoseer.

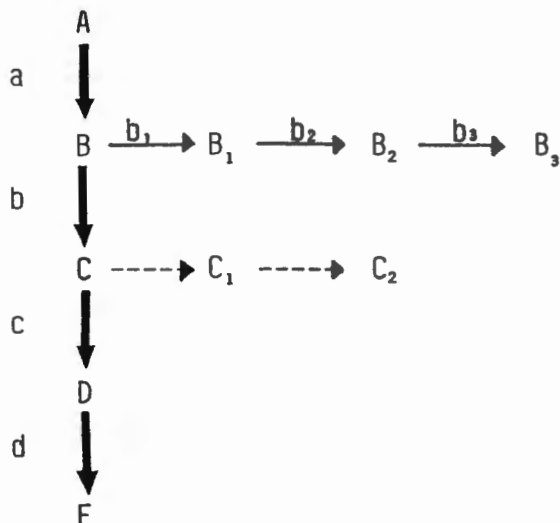
## 2.3 'n Algemene voorstelling van katabolisme

Die ontstaan van die karakteristieke spektra van organiese sure, kan verduidelik word deur van 'n gewysigde voorstelling van die kataboliese pad, soos deur Kretchmer en Etzwiller<sup>8</sup> voorgestel, gebruik te maak. Na aanleiding van die een-geen-ensiem konsep kan die denkebeeldige kataboliese weg aan die hand van figuur 2.1 as volg verduidelik word.

Indien die ensiem a defek is, sal die konsentrasie van verbinding A toeneem en in abnormale konsentrasies in die bloed sowel as die urine teenwoordig wees. Die res van die kataboliete in die kataboliese weg (B tot E) sal nie gevorm kan word nie, en dus in verlaagde konsentrasies in die bloed en urine teenwoordig wees. Indien die ensiem b defek is, sal konsentrasie van verbindings A sowel as B in die bloed en urine toeneem. Verbindings B<sub>1</sub> tot B<sub>3</sub> kan in verhoogde konsentrasies gevorm word, mits daar nie substraat inhibisie plaasvind nie. Indien daar substraat inhibisie plaasvind, sal afhangende van watter ensiem (b<sub>1</sub>, b<sub>2</sub> of b<sub>3</sub>) geïnhibeer word een of meer van verbindings B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> en B<sub>3</sub> verlaag wees. Indien ensiem c defek is, kan al drie voorafgaande verbindings verhoog wees. Die kataboliete van die subkataboliese weg (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> en B<sub>3</sub>) sal ook verhoog wees, weereens mits substraat inhibisie nie plaasvind nie. Die alternatiewe kataboliese weg sal nou in werking tree en verbinding C<sub>1</sub> en C<sub>2</sub> sal in verhoogde konsentrasies gevorm en uitgeskei word. Elke defektiewe ensiem\* veroor=

---

\*Die term "defektiewe ensiem" hier verwys in die algemeen na 'n ensiem wat nie funksioneer soos in die metabolisme van gesonde persone nie, ongeag die rede wat die wanfunksie mag veroorsaak.



FIGUUR 2.1 Voorstelling van 'n kataboliese weg van verbin-  
ding A. Verbinding A word omgesit met behulp  
van 'n hoofkataboliese weg (→), deur ensieme  
a, b, c en d alternatiewelik in verbindings  
B, C, D en E. In 'n subkataboliese weg  
(→) word verbinding B na verbindings B<sub>1</sub>,  
B<sub>2</sub> en B<sub>3</sub> omgesit deur middel van ensieme b<sub>1</sub>,  
b<sub>2</sub> en b<sub>3</sub>. 'n Alternatiewe kataboliese weg  
(--->) bestaan by verbinding C, wat onder  
normale omstandighede onaktief is, maar by 'n  
abnormaal hoë konsentrasie van verbinding  
C, verbinding C<sub>2</sub> via C<sub>1</sub> sal vorm<sup>9</sup>.

saak dus 'n karakteristieke spektrum van verhoogde en verlaagde konsentrasies van verbindings, wat spesifiek vir die besondere ensiem is.<sup>9</sup> Volgens hierdie bepaalde spektrum kan die defektiewe ensiem geïdentifiseer word. Hierdie beginsel word veral gebruik by die beskrywing van nuwe metaboliese defekte.

Uitgaande vanaf hierdie eenvoudige teoretiese voorstelling sal 'n tipiese voorbeeld van

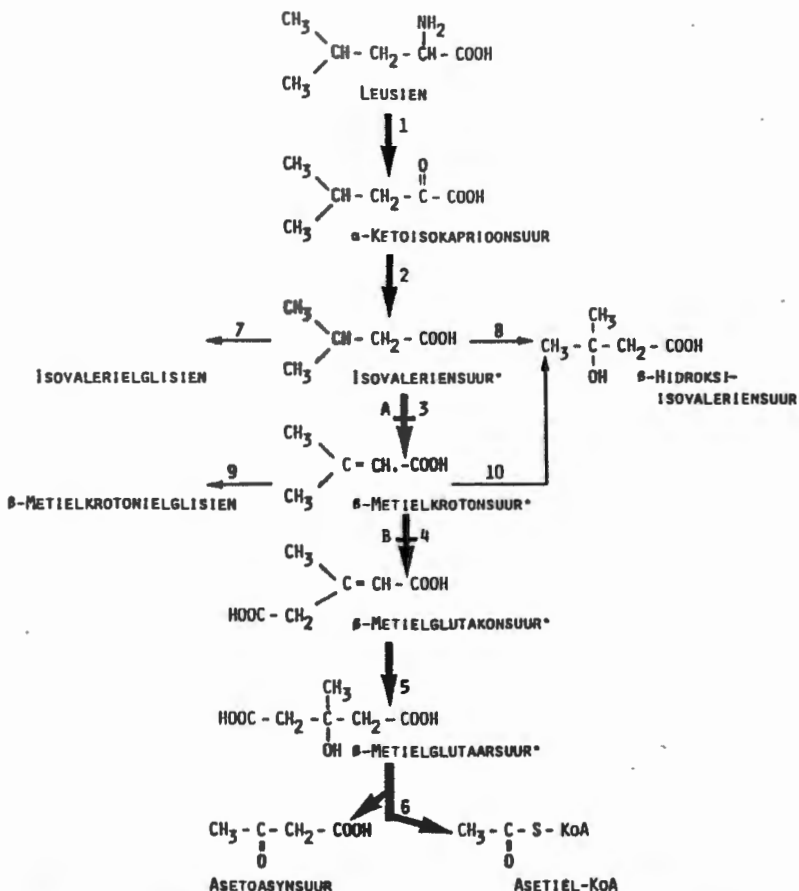
1. egte organiesesuururie en

2. aminosuururie geassosieerd met organiesesuururie

bespreek word, waaruit die verskil tussen die twee tipes defekte asook die metaboliese basis daarvan duidelik behoort te wees.

#### 2.4 Abnormaliteite in die katabolisme van die vertakte ketting aminosuur, leusien, wat lei tot egte organiesesuururie

Die eerste defek ten opsigte van die katabolisme van die vertakte ketting aminosure wat beskryf is, was isovaleriensuururie,<sup>10</sup> wat 'n defek van die katabolisme van leusien is. Die defek sentreer om die ensiem isovaleriel-KoA-dehidrogenase wat normaalweg isovaleriensuur na  $\beta$ -metielkrotonsuur kataboliseer. Die voorgestelde verlaagde aktiwiteit van hierdie ensiem, is in ooreenstemming met kliniese en eksperimentele data ten opsigte van isovaleriensuururie, alhoewel hierdie ensiemdefek tans nog nie spesifiek aangetoon is nie. Die verlaagde ensiem aktiwiteit veroorsaak 'n blokkering van die hoof metaboliese weg (A soos aangetoon in figuur 2.2). Weens hierdie blokkering neem die konsentrasie van isovaleriensuur toe. Die oormaat isovaleriensuur word gekonjugeer met glisien tot isovalerielglisien deur middel van die ensiem gli-



**FIGUUR 2.2: METABOLIESE AFBRAAK VAN LEUSIEN TOT ASEOASYSNUR EN ASETIEL-KOÄ**

- |                                               |                                       |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------|
| 1. LEUSIEN TRANSAMINASE                       | 6. HIDROKSIMETIEL-GLUTARIEL-KOÄ-LIASE |
| 2. $\alpha$ -KETOISOVALERIENSUURDEHYDROGENASE | 7. GLISIEN-N-ASILASE                  |
| 3. ISOVALERIEL-KOÄ-DEHYDROGENASE              | 8. DIREKTE HIDROKSILERING             |
| 4. METIELKROTONIEL-KOÄ-KARBOKSILASE           | 9. GLISIEN-N-ASILASE                  |
| 5. METIELGLUTAKONIEL-KOÄ-HIDRATASE            | 10. HIDRATASE                         |

A = METABOLIESE BLOK IN ISOVALERIENSUURURIE

B = METABOLIESE BLOK IN  $\beta$ -METIELKROTONSUURURIE

• AANGEVEE AS DIE ORGANIESESUUR EN NIE AS DIE KOÄ-DERIVAAT NIE.

sien-N-asilase.<sup>11</sup> Die isovalerieglisien word in die urine uitgeskei in groot hoeveelhede.<sup>6</sup>

Indien die glisien-N-asilase kapasiteit oorskry word, word groot hoeveelhede vrye isovaleriensuur direk in die urine uitgeskei. 'n Ander karakteristieke metaboliet van hierdie siektetoestand is  $\beta$ -hidroksi-isovaleriensuur wat via  $\omega$ -1-oksidasie vanuit isovaleriensuur gevorm word.

Een van die kliniese tekens naamlik die reuk van sweterige voete wat by die pasiënte voorkom, word toegeskryf aan die akkumulasie van vrye isovaleriensuur en  $\beta$ -hidroksi-isovaleriensuur.<sup>6</sup>

Die teoretiese voorstelling (Figuur 2.1) dat indien die hoofmetaboliese weg geblokkeer word, die "opgehoopde" metaboliet deur subkataboliese weë wat normaalweg nie in gebruik is nie, verwyder word, word hierdeur goed geïllustreer.

Leusien se konsentrasie word nie deur die metaboliese defek beïnvloed nie. 'n Verhoogde leusien sirkulering in die bloed en uitskeiding in die urine word nie by hierdie siektetoestand gevind nie.

Die opsporing van isovaleriensuururie berus dus op die teenwoordigheid van 'n aantal organiese sure naamlik isovaleriensuur, isovalerieglisien en  $\beta$ -hidroksi-isovaleriensuur in die urine van 'n vermoedelike pasiënt wat aan hierdie siektetoestand ly.<sup>12</sup> Die teenwoordigheid van bogenoemde sure en andere word meestal met behulp van gaschromatografie aangetoon.<sup>13-15,17-19</sup>

3-Metielkrotoniel-KoA-karboksilase is defektief (hetsy struktureel of met verlaagde aktiwiteit) by  $\beta$ -metielkrotonsuururie. Dit het 'n blokkering en gevolglike opeenhoping van  $\beta$ -metielkrotonsuur tot gevolg (aangedui B in figuur 2.2).  $\beta$ -Metielkrotonsuur word onderskeidelik via subkataboliese weë deur glisien-N-asilase en hidratase na  $\beta$ -metielkrotonielglisien en  $\beta$ -hidroksi-isovaleriensuur gekataboliseer. Hierdie ensiemdefek word gekarakteriseer deur 'n verhoogde urinêre uitskeiding van  $\beta$ -metielkrotonielglisien (tot  $0,5\text{mmol/l}$ ),  $\beta$ -hidroksi-isovaleriensuur (tot  $5,6\text{mmol/l}$ ) en moontlik vrye  $\beta$ -metielkrotonsuur (tot  $2,0\text{mmol/l}$ ).<sup>6,12</sup> Weereens word in hierdie siektetoestand geen verhoogde uitskeiding van aminosure in die urine waargeneem nie.

$\beta$ -Metielkrotonsuururie en isovaleriensuururie vertoon dieselfde patroon van submetaboliese weë na die metaboliese blok. Dit is egter opmerklik dat by eersgenoemde siektetoestand isovalerielglisien in die meeste gevalle in die hoogste konsentrasie in die urine uitgeskei word, terwyl  $\beta$ -hidroksi-isovaleriensuur in die urine voorkom, slegs indien daar so 'n oormaat voorganger is, dat vrye isovaleriensuur direk geoksideer kan word.

By  $\beta$ -metielkrotonsuururie is egter gevind dat  $\beta$ -hidroksi-isovaleriensuur eerder gevorm word, en in aansienlike hoër konsentrasies as die ander kataboliete in urine uitgeskei word.  $\beta$ -Metielkrotonielglisien is by al die bekende pasiënte<sup>6</sup> met hierdie defek, in die laagste konsentrasie van die groepsure in die urine aangetref.

Dit beklemtoon die groot onduidelikheid wat daar tans nog bestaan ten opsigte van hierdie "aan" en "afskakeling" van submetaboliese weë, en die gevolglike vorming van 'n spektrum kataboliete.

## 2.5 Aminosuururie geassosieerd met organiese suururie

### 2.5.1 Inleidend

Seker een van die heel bekendste aangebore metaboliese defekte naamlik fenielketonurie resulteer onder die groep organiese suururië, waar daar benewens organiese sure ook aminosure in die urine uitgeskei word. Uit die klassifikasie van hiperfenielalanienemie (Tabel 2.2) blyk dit duidelik te wees dat daar op grond van die organiese sure wat in verhoogde konsentrasies in die urine uitgeskei word, tussen die verskillende tipes onderskei kan word.

Vir die onderskeid tussen tipes I, II en III hiperfenielalanienemia dien die verhoogde uitskeiding van organiese sure egter nie as 'n goeie indikator vir die klassifikasie daarvan nie. Hier is die kliniese beeld egter meer van belang.

Die doel is hier nie om 'n uitgebreide beskrywing van die hidroksilase ensiem en sy medewerkende ensieme asook eksperimentele modelle en tipes PKU te gee nie, maar om die metaboliese basis van hierdie siektetoestand aan die hand van die teoretiese voorstelling soos in figuur 2.1 weergegee, te verduidelik.

In die normale geval word die meeste fenielalanien omvorm na tirosien deur die ensiem fenielalanienhidroksilase.\*

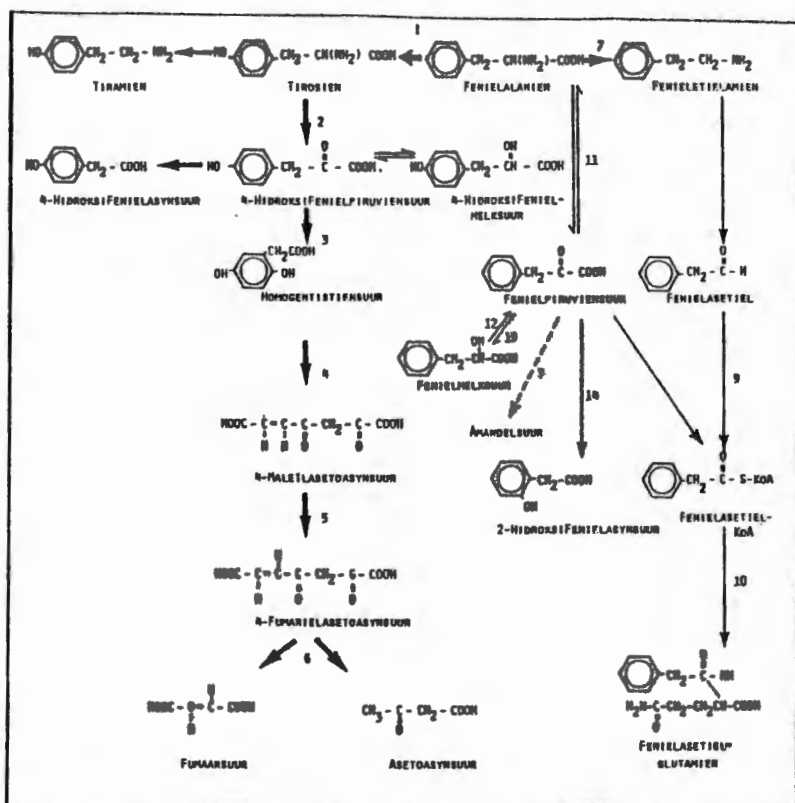
By klassieke fenielketonurie (hiperfenielalanienemie tipe I) is fenielalanienhidroksilase afwesig, terwyl by hiperfenielalanienemie tipe II slegs verlaagde aktiwiteite van die ensiem voorkom. 'n Aantal ander hiperfenielalanienemie tipes kom voor, maar ander ensieme is daarby betrokke, waarvan nie hier melding gemaak gaan word nie. Indien daar 'n metaboliese blok in die omsetting van fenielalanien na tirosien voorkom (soos met fenielalanienhidroksilase afwesigheid), word die toestand verkry dat fenielalanien in die bloed verhoog. Hierdie verhoogde konsentrasie van fenielalanien het tot gevolg dat fenielalanien deur sub-metaboliese weë soos in figuur 2.3 voorgestel gekataboliseer word tot 'n verskeidenheid fenoliese en aanverwante verbindings.

#### 2.5.2 Sub-metaboliese weë betrokke by PKU

Sub-metaboliese weë wat reeds by PKU pasiënte aangetoon is deur 'n aantal outeurs word voorgestel in figuur 2.3. In samewerking met Dr. J.W.T. Seakins<sup>5</sup> is hierdie weë as individuele reaksies voorgestel. Die onsekerheid oor 'n aantal reaksies, kom in die bespreking daarvan duidelik na vore. Hieruit kan afgelei word dat alhoewel die sub-metaboliese weë betrokke by PKU al internasionaal deeglik goed bestudeer is, daar nog steeds 'n aantal knelpunte bestaan. Hierdie sub-metaboliese reaksies soos in figuur 2.3 kan as volg voorgestel word:

---

\*Fenielalanienhidroksilase staan in die literatuur ook bekend as fenielalanien-4-monoöksigenase, en is verteenwoordigend van die monoöksigenases of gemengde funksie oksigenases.



**FIGUR 2.3:** VOORSTELLING VAN DIE KATABOLIESE VERLOOP VAN DIE FENILALANIE VIA DIE HOOPMETABOLIESE WEE  $\longrightarrow$  ADOOK SUB-METABOLIESE WEE  $\longrightarrow$  SOOS IN WERKING BY FENILKETONURIE

- |               |          |                                     |           |                                       |
|---------------|----------|-------------------------------------|-----------|---------------------------------------|
| <b>ENSTE:</b> | <b>1</b> | FENILALANIEHIDROKSILASE             | <b>7</b>  | AROMATIESE DEKARBOKSILASE             |
|               | <b>2</b> | TIROOSIENTRANSAMINASE               | <b>8</b>  | MONAMIE-OKSIDASE                      |
|               | <b>3</b> | 4-HIDROKSIFENILPIRUVIESUUR OKSIDASE | <b>9</b>  | FENILASETIEL-KoA-SINTETASE            |
|               | <b>4</b> | HOMOGENTISIESUUR-1:2-DIKSIDOGEESE   | <b>10</b> | GLUTARIENFENILASETIEL-KoA-TRANSFERASE |
|               | <b>5</b> | MALEILASETOASIESUUR-ISOMERASE       | <b>11</b> | AMINOTRANSFERASE                      |
|               | <b>6</b> | FUMARILASETOASIEASE                 | <b>12</b> | AROMATIESE DEHIDROGENASE              |
|               |          |                                     | <b>13</b> | AROMATIESE REDUKTASE                  |
|               |          |                                     | <b>14</b> | HIDROKSIFENILPIRUVAAAT-DIKSIDOGEESE   |

### Reaksie 7: Feniëlaanien → Feniëletielamien

Hierdie reaksie word gekataliseer deur aromatisiese dekarboksilase. Hierdie ensiem kom algemeen in 'n groot verskeidenheid weefsels in die mens voor. Dit is ook aangetref in *Streptococcus faecalis*.

### Reaksie 8: Feniëletielamien → Feniëlasetiel

Hierdie reaksie word gekataliseer deur monoamien-oksidasie. Monoamien - oksidasas kom algemeen in weefsels van die mens voor.

### Reaksie 9: Feniëlasetiel → Feniëlasetiel-KoA

Feniëlasetiel-KoA-sintetase kataliseer hierdie bekende reaksie.

### Reaksie 10: Feniëlasetiel-KoA → Feniëlasetielglutamien

Feniëlasetiel-KoA word omgesit na feniëlasetielglutamien deur middel van glutamienfeniëlasetiel-KoA-transferase.

### Reaksie 11: Feniëlaanien → Feniëlpiruiensuur

Hierdie reaksie word gekataliseer deur aminotransferase. Dit is moontlik dat feniëlaanien as substraat vir verskeie aminotransferases (transaminases) kan dien.

### Reaksies 12 en 13: Feniëlpiruiensuur → Feniëlmelksuur → Feniëlpiruiensuur

Die omsetting van feniëlpiruiensuur na feniëlmelksuur word

gekataliseer deur aromatiese reduktase, terwyl die terugwaartse omsetting van feniëlmelksuur na feniëlpiruviensuur deur aromatiese dehidrogenase gekataboliseer word. Melksuur dehidrogenase mag ook beide hierdie reaksies kataliseer.

#### Reaksie 14: Feniëlpiruviensuur $\rightarrow$ 2-hidroksifeniëlasynsuur

Hierdie reaksie word gekataliseer deur 4-hidroksifeniëlpiruviensuur-dioksigenase. Vir hierdie reaksie is daar 'n hoër  $K_m$  waarde of 'n laer  $V_{maks}$  waarde as vir die omsettingsreaksie van feniëlpiruviensuur na 4-hidroksifeniëlpiruviensuur.

#### Reaksie 15: Feniëlpiruviensuur $\rightarrow$ Feniëlasetië-KoA

Hierdie omsetting is kompleks, en die katalise daarvan is tans nog nie opgeklaar nie. Indien hierdie reaksie na analogie van die oksidatiewe dekarboksilase van die vertakte ketting ketosure beskou word, mag die reaksie moontlik deur 'n enkele ensiemkompleks gekataliseer word. Indien dit so is, word die ensiemkompleks vinnig versadig by relatief lae konsentrasies van die substraat.

#### Reaksie 16: Feniëlpiruviensuur $\rightarrow$ Amandelsuur?

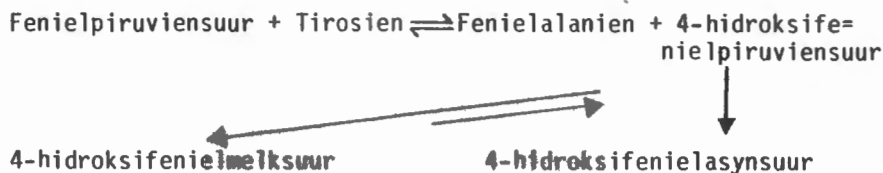
Die vorming van amandelsuur is tans nog nie duidelik nie.

Dr. J.W.T. Seakins<sup>5</sup> stel voor dat amandelsuur vanaf feniëlpiruviensuur afkomstig is, terwyl ander navorsers voorstel dit kom vanaf feniëletielamien en feniëletanolamien, met Seakins se voorstelling die mees waarskynlike.

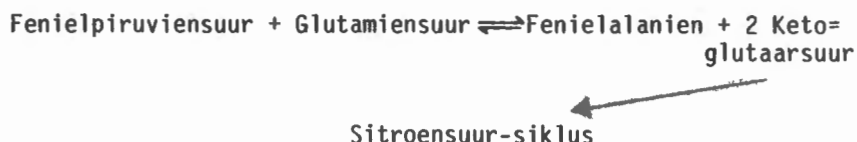
### 2.5.3 Ander metaboliëte wat aangetref word in die urine van PKU pasiënte

Nie alle feniëlanien word via sub-metaboliëse weë gekataboliseer nie, maar word ook as vrye feniëlanien in die urine uitgeskei. Ander fenoliëse verbindings soos feniëlasynsuur, p-hidroksifeniëlasynsuur, en p-hidroksifeniëlmelksuur word ook in die urine aangetref. Die vraag wat ontstaan naamlik: *Waar kom p-hidroksifeniëlmelksuur en p-hidroksifeniëlasynsuur vandaan wat in die urine van PKU-pasiënte aangetref word?* is nog nie met enige mate van sekerheid beantwoordbaar nie. Dit blyk onwaarskynlik te wees dat hierdie sure ontstaan as gevolg van direkte p-hidroksilasie van feniëlmelksuur en feniëlasynsuur. Dit is eerder meer moontlik dat hierdie sure ontstaan as gevolg van 'n sekondêre versteuring in die metabolisme van tirosien. Hierdie sekondêre versteuring is moontlik deurdat feniëlpiruvien-suur as 'n kompeterende inhibeerder van 4-hidroksifeniëlpiruvaatoksidase kan optree, aangesien dit struktureel analoog is aan 4-hidroksifeniëlpiruvaat. Hierdeur kan 'n verhoging in die konsentrasie van 4-hidroksifeniëlpiruvien-suur veroorsaak word.

Die konsentrasie feniëlpiruvien-suur in die plasma is ongeveer een-sesde van die konsentrasie van feniëlanien. Dit is voorgestel<sup>5</sup> dat die volgende reaksies in ander weefsels as die lewer en niere plaasvind, en waar verdere metabolisme van 4-hidroksifeniëlpiruvien-suur kan plaasvind.



Volgens Seakins<sup>5</sup> is daar omstandigheids bewyse dat bogenoemde reaksies kan bestaan. Uit werk wat ongeveer 30 jaar gelede gedoen is, is gevind dat indien onbehandelde PKU-pasiënte groot hoeveelhede glutamiensuur inneem, die uitskeiding van fenielpiruviensuur in die urine drasties afneem. Hierdie waarneming kan met die volgende reaksie weg in verband gebring word.



Indien die bloedfenielalanien vlak baie hoog is, word fenielalanien nie meer geabsorbeer nie, en word dit in die intestinum deur die derm flora tot 'n verskeidenheid van organiese suur metaboliete afgebreek soos in figuur 2.4 voorgestel kan word. Hierdie metaboliete dien as voorgangers vir verdere endogene afbraak.

By PKU ontstaan dus die toestand dat 'n spektrum van fenoliese verbindings in die urine uitgeskei word, wat met behulp van gaschromatografie gefraksioneer en geïdentifiseer kan word, tesame met die verhoogde fenielalanien wat in die bloed en urine voorkom, en met behulp van aminosuur analise tegnieke aantoonbaar is.



## 2.6 Literatuurverwysings

1. FITCH, W.L., ANDERSON, P.J. & SMITH, D.H. (1979). J. of Chromatogr. 162:249.
2. JELLUM, E., STOKKE, O. & ELDJAM, L. (1972). Clin. Chem. 18:800.
3. LAWSON, A.M., CHALMERS, R.A. & WATTS, R.W.E. (1976). Clin. Chem. 22:1283.
4. HAMMOND, K.B. & GOODMAN, S.I. (1970). Clin. Chem. 16:212.
5. SEAKINS, J.W.T. (1982). Persoonlike kommunikasie.
6. DURAN, M. & WADMAN, S.K. In: Recent Advances in Clinical Biochemistry Vol. 2. Chapter 5 p.103.
7. MROCHEK, J.E., DINSMORE, S.R. & OHRT, D.W. (1973). Clin. Chem. 19:927.
8. KRETCHMER, N. & ETZWILLER, D.D. (1958). Pediatrics. 21:445.
9. MIENIE, L.J. (1981). Tirosielurie by geestelik vertraagde pasiënte. Verhandeling vir M.Sc.-graad, PU vir CHO.
10. TANAKA, K., BUDD, M.A., EFRON, M.L. & ISSELBACHER, K.J. (1966). Proc. Nat. Acad. Sci. USA 56:236.
11. ANDO, T., NYHAN, W.L., BACHMANN, C., RASMUSSEN, K. & SCOTT, R. (1973). J. Pediatr. 82:243.
12. DANCIS, J. & LEVITZ, M. (1978). Abnormalities of branched chain amino acid metabolism. Chap. 20. The Metabolic basis of inherit diseases Fourth Edition. McGraw Hill Book Company USA.
13. CHALMERS, R.A., PURKISS, P., WATTS, R.W.E. & LAWSON, A.M. (1980). J. Inher. Metab. Dis. 3:27.
14. TANAKA, K. & HINE, D.G. (1982). J. of Chromatogr. 239:301.

15. KURTZ, D.J., LEVEY, H.L., PLOTKIN, W. & KISHIMATO, Y., (1971). Clin. Chim. Acta. 34:463.
16. VAN DER HEIDEN, C. (1972). Studie over bakteriële metabolieten van tyrosine, phenylalanine en histidine in urines van patienten met gastrointestinale afwijkingen. (Proefskrif vir die graad Doktor in die Wetenskapen, Rijksuniversiteit te Utrecht, Nederland.)
17. KITAGAWA, T. (1974). Clin. Chem. No. 12. 20:1543.
18. KROEPP, P. (1976). Klinische Wochenschrift. 54:1047.
19. WADMAN, S.K., VAN DER HEIDEN, C., KETTING, D. & VAN SPRANG, F.J. (1971). Clin. Chim. Acta. 34:277.
20. MIENIE, L.J. & WADMAN, S.K. (1985). Persoonlike kommunikasie.
21. CHALMERS, R.A. & LAWSON, A.M. (1982). Organic Acids in man. 1<sup>e</sup> Uitgawe. London. Chapman and Hall Ltd.

### DIE EKSTRAKSIE EN GASCHROMATOGRAFIESE FRAKSIONERING VAN ORGANIESE SURE UIT URINE

#### 3.1 Literatuuragtergrond

Alvorens kwantitatiewe sowel as kwalitatiewe studies gedoen kan word oor die verband tussen organiese sure en die metabolisme, moet daar voldoende goed gestandaardiseerde prosedures wees om hierdie sure kwalitatief en kwantitatief te bepaal. Die sure moet eerstens uit die biologiese vloeistowwe, byvoorbeeld bloed of urine, ekstraheerbaar wees, en daarna ook identifiseerbaar wees.

In die literatuur bestaan daar tans drie algemeen gebruikte metodes waarvolgens organiese sure geëkstraheer kan word. Hierdie prosedures het elk bepaalde voor- en nadele. Die toepasbaarheid van elke metode sal dus wissel na gelang van die bepaalde doelstellings wat vir 'n spesifieke ondersoek gestel word. Hierdie prosedures sal nou nader toegelig word.

##### 3.1.1 Ekstraksieprosedures

###### 3.1.1.1 Die vloeistof-vloeistofekstraksieprosedure

Hierdie tipe ekstraksiemethode is gebaseer op die oplosbaarheid van die suurkomponente wat in 'n waterige fase soos urine voorkom in organiese oplosmiddels (byvoorbeeld etielasetaat,

diëtieleter ensovoorts). Hier kan twee tipes ekstraksieprosedures onderskei word naamlik:

- i) 'n Kontinue oplosmiddelekstraksie wat gebruik maak van 'n vloeistof-vloeistofekstraksie-apparaat of 'n Soxhlet-apparaat,<sup>1</sup> en
- ii) 'n nie-kontinue oplosmiddelekstraksie waar die organiese oplosmiddel en die waterige fase met behulp van 'n meganiese menger vermeng word, en die organiese fase telkens na sentrifugering (faseskeiding) verwyder word.<sup>1,2</sup>

In beide tipes vloeistof-vloeistofekstraksies kan 'n beter herwinning van organiese sure verkry word deur die monster voor ekstraksie te versadig met anorganiese soute soos natriumchloried of natriumsulfaat.<sup>2,3,4</sup> Hierdie behandeling van die monster verhoed egter dat sekere ander bepalinge daarop uitgevoer kan word. Die tipe oplosmiddel wat in hierdie ekstrak-siemetode gebruik word is baie belangrik en moet aan 'n aantal kriteria voldoen naamlik:

- i) Die oplosmiddel moet vlugtig wees;
- ii) 'n hoë oplossingsvermoë besit;
- iii) 'n hoë wateroplosbaarheid hê;
- iv) in 'n hoë mate stabiel wees en
- v) moet in 'n hoë (analitiese of chromatografiese) suiwerheidsgraad kommersieël beskikbaar wees.

Diëtieleter en etielasetaat voldoen aan hierdie vereistes en word baie algemeen gebruik. Sekere outeurs beveel isopropielchloried as geskikte oplosmiddel vir die ekstraksie van vlugtige komponente in biologiese vloeistowwe aan.<sup>5</sup> Uitgaande van die volgende fisies-chemiese eienskappe: kookpunt 37,5°C, diëlektriese konstante 9,82 en wateroplosbaarheid, blyk dit

dat isopropielchloried ook geskik sal wees vir die ekstraksie van organiese sure uit urine.<sup>5</sup> Die vloeistof-vloeistofekstrasieprosedure het 'n laer spesifisiteit as ekstraksie met behulp van anioonuitruiling, aangesien neutrale kataboliete soos ureum, in die waterige urinefase sowel as die organiese oplosmiddel oplosbaar is. Die geëkstraheerde materiaal bevat dus ureum wat chromatografies kan inmeng met die kwantifisering van ander sure met lae molêre massa.<sup>1</sup> Baie laboratoria gaan egter voort om hierdie prosedure te gebruik, nieteenstaande die genoemde beperkings. Die hoofrede hiervoor is die kort monstervoorbereidingstyd van hierdie metode. Alhoewel hierdie tegniek voldoende is vir die opsporing van metaboliese defekte, is dit onvoldoende om fyn metaboliese versteurings en veranderinge waar te neem. Die kontinue vloeistof-vloeistofekstrasieprosedure bied nie die kwantitatiewe voordele wat die anioonuitruilingsprosedure besit nie, en bied ook nie die kort ekstraksietyd van die nie-kontinue vloeistof-vloeistofekstrasie nie. Dit word dus selde gebruik, terwyl die nie-kontinue vloeistof-vloeistofekstrasietegniek in verskeie laboratoria die belangrikste tegniek vir die isolering van die organiese sure is.

### 3.1.1.2 Ekstraksie met behulp van anioonuitruilingschromatografie

Hierdie tegniek vir die isolering van organiese sure is op anioonuitruilingschromatografie gebaseer en is in 1970 voorgestel deur Horning en Horning.<sup>6</sup> Met die ionuitruilingstegniek kan 'n kwantitatiewe bepaling van die organiese sure in urine gemaak word. Dit is nie so geredelik met ander isoleringstegnieke uitvoerbaar nie.

Die ionuitruiler wat tans die meeste gebruik word is DEAE-Sephadex. Ander harse byvoorbeeld Dowex 3 is ook geskik.<sup>7</sup> Na binding van die sure aan die ionuitruilingshars word dit meestal met 'n waterige piridiniumasetaatbuffer geëluëer, gevolg deur vriesdroging. Horrocks *et al.*<sup>8</sup> het voorgestel dat die kolom eers met soutsuur geëluëer word en dan met natriumbikarbonaat geneutraliseer word alvorens die eluaat van piridiniumasetaat gevriesdroog word. Hierdeur word die verlies van die meer vlugtige organiese sure tydens vriesdroging beperk. As gevolg van die lang proses van voorbereiding, wat 'n vriesdrogingstap van 24 uur insluit, kan sekere van die minder stabiele sure gedurende hierdie tydverloop ontbind. Chalmers en Watts het in Maart 1972 'n artikel gepubliseer waarin hulle aantoon dat die algemene verlies aan organiese sure die gevolg van 'n vervlugtiging gedurende die vriesdrogingsproses is.<sup>9</sup> Hierdie verliese is verwant aan die variasie wat daar tussen die damp- of sublimasiedrukke van die sure ten opsigte van die temperatuur is. Aangesien betroubare data van die latente verdampingswarmte en sublimasiewarmte van verskeie organiese sure nie altyd gereedlik beskikbaar is nie, het bogenoemde outeurs 'n protokol saamgestel waarmee hierdie fisies-chemiese verwantskappe bepaal kan word. Die probleem ten opsigte van die verlies van die meer-vlugtige sure tydens die anioonuitruilingsekstrasieprosedure kan dus grootliks opgelos word.

'n Verdere nadeel van dié metode is die groot hoeveelhede fosfate en sulfate wat in die ekstrakte voorkom. Aangesien hierdie anorganiese soute in hoër konsentrasies as die organiese sure in urine voorkom, kan dit nie volledig deur die anioonuitruilingschromatografiestap verwyder word nie. Die gevolg is dat groot gebiede in die chromatogramme deur pieke van

hierdie anorganiese verbindings versteur word.

Thompson en Markey<sup>1</sup> stel voor dat die sulfate en fosfate verwyder moet word alvorens die organiese sure met behulp van ionuitruilingschromatografie geëkstraheer word. Hulle metode behels die verwydering van die steurende sulfate en fosfate as onoplosbare bariumsoute, gevolg deur oksiemvorming, ionuitruilingschromatografie, silanering en dan gaschromatografiese fraksionering.

Lawson *et al.*<sup>10</sup> het egter hierdie metode gekritiseer op die volgende gronde:

- i) Die bariumsoute van die organiese sure is onvoldoende oplosbaar en kopresipiteer met die anorganiese soute.
- ii) Baie organiese sure is onstabiel in die alkaliese kondisies wat vir hierdie presipitering gebruik word. Bariumsoutpresipitering kan ook by pH 6,8 of pH 2,0 uitgevoer word.

Die meeste outeurs in hierdie veld voer egter die presipitering by pH > 11,0 uit. Nie een van bogenoemde prosedures is hoogs selektief vir sulfate en fosfate nie. Thompson<sup>11</sup> vind dat 83% sitroensuur kopresipiteer terwyl 68% oksaalsuur ook in die proses verlore gaan.<sup>1</sup> Stokke *et al.*<sup>12</sup> vind ook dat glutakoonsuur 'n verlies van 76% toon indien die bariumsoutpresipitering uitgevoer word. Glutakoonsuur is een van die belangrikste metaboliëte wat waargeneem word in 'n siekte-toestand wat bekend staan as glutaarsuururie. Alhoewel daar genoeg organiese suurmateriaal mag oorbly vir identifisering met behulp van massaspektrometrie, is die presipiteer-

ringsstap nie gewens nie aangesien dit die algemene ekstraksietegniek minder selektief maak. Weens die variërende mate van kopresipitering van organiese sure is die metode as kwantitatiewe metode, onbetroubaar. Met behulp van die anioonuitruilingstegniek sonder die bariumpresipitering kan fyn metaboliese steurnisse opgespoor word, aangesien hierdie metode die beste kwantitatiewe opbrengs van al die organiese sure lewer.

'n Alternatiewe metode<sup>13</sup> is onlangs ontwikkel waarmee die ionoonuitruilingstegniek vervang kan word. Alhoewel hierdie metode primêr vir die ekstraksie van organiese sure uit amniovloeistof ontwikkel is, is dit baie suksesvol toegepas vir die ekstraksie van organiese sure uit urine. Die metode is gebaseer op die adsorpsie van die totale suurfraksie van urine op 'n silikajelkolom, waarna dit met 'n mengsel van amielalkohol, chloroform en diëtieleter geëluëer word.

Met hierdie metode word uitstekende analitiese herwinning van die organiese sure, insluitend sitroensuur, verkry. Hierdie tegniek is egter nog nie algemeen in gebruik in kliniese of aanverwante ondersoeke nie.

### 3.1.1.3 Stoomdistillasie

'n Verdere metode wat beperk is tot die isolering van die meer vlugtige organiese kataboliete maak gebruik van stoomdistillasie<sup>14,15</sup> of vakuumdistillasie.<sup>16</sup> Aangesien hierdie ekstraksietegniek slegs 'n baie beperkte reeks van organiese sure effektief kan ekstraheer, word dit nie algemeen gebruik vir die bestudering van metaboliese defekte wat met organiese sure verband hou nie, maar het 'n meer industriële toepassing.

Die tegniek word nie in hierdie verhandeling verder bespreek nie, maar slegs volledigheidshalwe vermeld sodat 'n beter perspektief verkry kan word ten opsigte van die verskillende moontlike ekstraksieprosedures.

#### 3.1.1.4 Gevolgtrekkings

Die finale keuse vir die ekstraksie van organiese sure lê dus hoofsaaklik tussen die vloeistof-vloeistofekstraksieprosedure en die anioonuitruilingchromatografie. Eersgenoemde tegniek vereis 'n korter voorbereidingstyd van die monster, maar lewer kwantitatief 'n kleiner opbrengs. Die anioonuitruilingschromatografiese prosedure bied 'n goeie kwantitatiewe ekstraksie maar is, as gevolg van die lang monstervoorbereidingstyd, nie geskik vir siftingsdoeleindes nie.

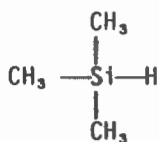
Die volgende aanhaling uit 'n artikel van Jellum<sup>3</sup> in 1977 gee besondere perspektief aan hierdie keuse tussen metodes: *It has been the experience of several groups that if the problem concerns screening for gross metabolic disorders, the detection of which does not require quantitative separation procedures, then solvent extraction is applicable. Even metabolic disorders that result in the excretion of polar compounds such as pyroglutamic acid or glutamic acid are easily detected by solvent extraction methods. For quantitative work and work involving subtle changes in the chromatographic profiles, the use of anion-exchange procedures is not only recommended, but is essential. Some laboratories therefore prefer always to use the quantitative methods, whereas others, particularly those engaged in diagnosis and studies of metabolic disorders, have found it convenient to be able to use both isolation procedures.*

### 3.1.2 Derivaatvorming van die geëkstraheerde materiaal

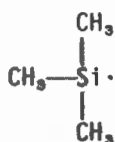
Baie van die organiese sure wat van fisiologiese belang is besit ook ander funksionele groepe soos keto-, aldehyd- en hidroksiegroepe. Derivate van hierdie groepe moet berei word om die polariteit in die molekule te verminder, en die termiese stabiliteit en vlugtigheid wat noodsaaklik is vir skeiding met behulp van gaschromatografie te verhoog.

#### 3.1.2.1 Trimetielsilanering

Die term *siliel* soos wat dit in die literatuur gebruik word, het betrekking op die trimetielsilielgroep. Hierdie radikaal is afkomstig van trimetielsilaan en word algemeen afgekort as TMS



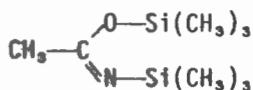
Trimetielsilaan



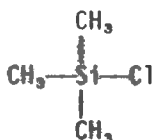
Trimetielsilielradikaal (TMS)

Silanering is die inbring van 'n silielgroep in 'n molekule. Meestal vervang dit 'n aktiewe waterstofatoom.<sup>18</sup> Die silaneringreagense wat die meeste gebruik word vir die silanering van organiese sure is: <sup>3,17,18,19</sup>

- i) BSA(N,O-bis[trimetielsiliel]asetamied)



ii) TMCS (trimetiëlchloorsilaan)



iii) BSTFA (bis[trimetiëlsiliel]trifluorasetamied)

Hierdie reagent is almal derivate van trimetiëlsilaan.<sup>18</sup>

'n Groot aantal reaksiemeganismes waarvolgens trimetiëlsilane-ring kan plaasvind is reeds deur verskeie outeurs voorgestel. Tans is daar nog nie sekerheid oor die presiese meganisme nie. Aangesien die inkomende groep Y meestal 'n sterker basis as die uitgaande groep X is, en aangesien die oplosmiddel 'n gematigde polariteit besit, kan die reaksie voorgestel word as<sup>20</sup>



Sommers<sup>20</sup> stel dit soos volg: *there is evidence for the existence of a wide range of polar mechanisms for organosilicon reactions.* Trimetiëlsiliederivate byvoorbeeld trimetiëlsilielesters en trimetiëlsilieleeters onderskeidelik<sup>17</sup> is die geskikste vorm vir die gaschromatografiese fraksionering van karboksiel- en hidroksielverbindinge. TMS-derivate is eenvoudig om te berei, nie gevaarlik om te hanteer nie en redelik stabiel by 4°C. TMS wat met deuterium gemerk is kan maklik berei word uit kommersieël beskikbare silaneringsreagente. Hierdie radio-aktiewe TMS-derivate word veral gebruik by die opklaring van 'n verbinding se struktuur met behulp van gaschromatografie-massaspektrometrie.

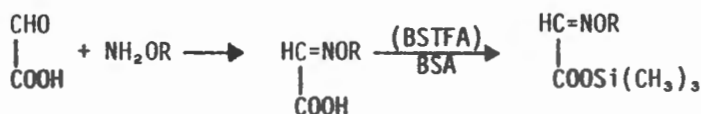
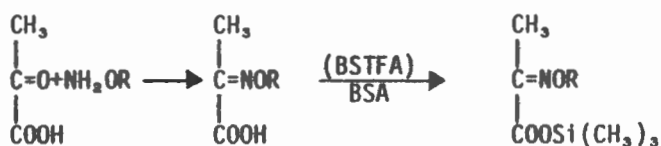
Wanneer verbindings gesilaneer word, word hulle minder polêr. As gevolg van die verlaagde polariteit is die derivate meestal vlugtiger en stabiel en adsorbeer dit minder nie-selektief op die kolom. Verlaagde polariteit in 'n molekule na trimetiel-silanering is die gevolg van die vervanging van aktiewe waterstof met die silielgroep. Dit het 'n verlaging in die hoeveelheid waterstofbindings tot gevolg. Wanneer daar intermolekulêre waterstofbindings in 'n verbinding voorkom, is die gesilaneerde derivaat vlugtiger as gevolg van die vermindering in die aantal reaktiewe punte vir aktiewe waterstof. Silanering het 'n invloed op die algehele profiel deurdat verskille in retensietyd tussen die verbindings groter word. Die gevolg hiervan is dat molekule waarvan die pieke gedeeltelik oorvleuel, 'n beter resolusie vertoon na silanering. Die vorm van 'n piek mag verbeter en minder stertvormig mag voorkom indien die verbinding gesilaneer word.<sup>18</sup>

### 3.1.2.2 Derivaatvorming van keto- en aldehydegroepe voor trimetiel-silanering

Indien sekere van die ketoverbindings direk gesilaneer word, word probleme met hulle skeiding en identifisering ondervind as gevolg van keto-enol-toutomerisêring. Die twee trimetiel-silielderivate van die toutomere reageer meestal verskillend tydens die fraksioneringsproses. Hierdie toutomeriese-effek kan oorbrug word indien 'n derivaat van die ketogroep berei word voordat die ander funksionele groep gesilaneer word.<sup>17</sup>

Karboniel-aktiewe reagentse en aldehydespesifieke reagentse is kommersieel verkrygbaar.<sup>21</sup> 'n Karboniel-aktiewe reagent wat die meeste in die studie van organiese suurmaterie gebruik word is o-etielhidroksielammoniumhidrochloried [ $C_2H_5ONH_2-HCl$ ].

Chalmers en Watts<sup>17</sup> het gevind dat die o-etiëlderivate die geskikste oksiemderivate is om mee te werk aangesien die klein verhoging in die relatiewe molêre massa 'n verskuiwing van die sure met lae molêre massa teweeg bring, terwyl daar nie 'n verskuiwing van die pieke van oksosure met relatiewe hoë molêre massas plaasvind nie. Die gevolg hiervan is dat die profiel oor die algemeen uitgerek word. Die pieke is makliker identifiseerbaar deurdat hulle mekaar minder onderling beïnvloed. Die vorming van o-gesubstitueerde trimetiëlsilielesters kan soos volg voorgestel word:<sup>17</sup>

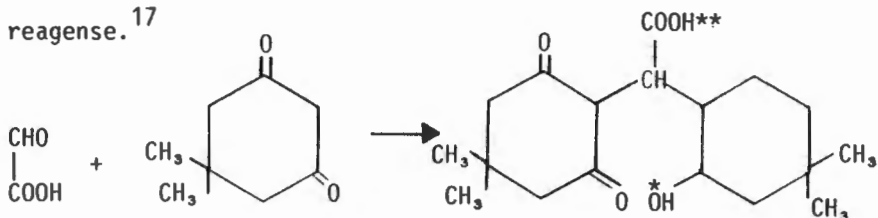


Waar  $\text{R}=\text{H}$ ;  $\text{CH}_3$ ;  $\text{C}_2\text{H}_5$  ...; Wanneer  $\text{R}=\text{H}$  sal verdere silanering plaasvind sodat

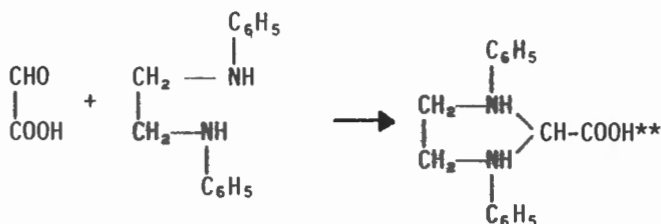


Aldehyd-spesifieke reagense soos dianilinoetaan [N,N-difenieleetileendiamien] en [dimeedoon 5,5'-dimetiëlsikloheksaan-1,3 dioon] word algemeen in metaboliese studies gebruik vir die vorming van dimeedoenderivate en N,N-difenieleetileendiamien-derivate onderskeidelik. Die vorming van glioksaalsuurmeedoon en 1,3 difenielimidiasolidien-2-karboksiesuur onderskeidelik, illustreer die werking van die aldehyd-spesifieke

reagense.<sup>17</sup>



Glioksaalsuur + Dimedoon  $\longrightarrow$  Glioksaalsuurmedoon



Die hidroksiel\*- en karboksielsuurgroepe\*\* kan verder met behulp van BSTFA of BSA gesilaneer word.

### 3.1.2.3 Metilering

Die metielesters van die organiese sure het goeie chromatografiese eienskappe en kan maklik berei word sodat metilering van dié sure in verskeie laboratoria gebruik word.<sup>22,23</sup>

Alhoewel goeie resultate met metilering verkry word, veral by die analise van vetsure, skep hierdie tipe van derivaatvorming van veral organiese sure met diasometaan, 'n aantal probleme tydens die gaschromatografiese skeidingsproses.

Metilering met behulp van diasometaan\* lewer 'n aantal neweprodukte en artefakte wat die interpretasie van die resultate aansienlik bemoeilik. Meer as een metielderivaat word gevorm in die reaksie van diasometaan met ketosure. Pirasoliene word gevorm as neweprodukte gedurende die metilering van fumaarsuur en akonitiensuur. 'n Artefak wat soos 3-hidroksi-propioonsuur optree tydens die fraksioneringsproses word gevorm indien water in die reaksiemengsel teenwoordig is. Diasometaan is nie baie spesifiek vir die karboksielsuurgroepe nie, aangesien dit ook die hidroksielgroep van fenole en die tiolgroepe van tiole, metileer. 'n Aantal klinies belangrike fenoliese sure waarvan p-hidroksifenielaktaat een is, lewer een of meer metielderivate afhangende van die temperatuur en behandelingstyd met diasometaan. As gevolg van bogenoemde inherente nadele van metilering met behulp van diasometaan, is alternatiewe metileringsprosedures ontwikkel, wat 'n verestering met behulp van metanol en soutsuur of metanol en tionielchloried of metanol en boortrifluoried, insluit.

'n Direkte metileringsmetode van die ekstrak op die chromatografiese kolom is deur Gan *et al.*<sup>24</sup> ontwikkel. Hierdie metode is egter nog nie algemeen in gebruik nie.

Die meriete van die verskillende derivaatvormingstegnieke word gedurig teen mekaar opgeweeg. Dit is egter raadsaam dat elke laboratorium die verskillende derivaatvormingstegnieke ondersoek en die metode kies waarmee die beste resultate verkry word onder die heersende kondisies, en wat in ooreen-

---

\* Metileringsreagens wat die meeste in die literatuur gebruik is, en steeds gebruik word.

stemming is met die doel van die ondersoek. Die meeste navorsers stem saam dat dit noodsaaklik is om met een metode goed vertrouwd te raak en die gebreke daarvan te ken.<sup>3</sup> Alternatiewe tegnieke kan dan gebruik word wanneer dit onder die omstandighede vereis word.

### 3.1.3 Gas-vloeistofchromatografie

Gaschromatografie het in die afgelope dekade tot een van die belangrikste tegnieke vir die fraksionering van vlugtige verbindings ontwikkel.<sup>25</sup> Fraksionering van die komponente geskied met behulp van 'n kolom wat 'n nie-vlugtige verbinding, die stasionêre fase wat as 'n selektiewe binder optree, bevat. Die stasionêre fase kan of 'n soliede adsorbeermiddel, of 'n vloeistof wees. 'n Gas bekend as die mobiele fase beweeg dan oor of deur die stasionêre fase. Dienooreenkomstig word dan tussen gas-soliedchromatografie (GSC) en gas-vloeistofchromatografie (GLC) onderskei.

Die tydsduur vanaf die inspuiting van 'n monster in die kolom tot die registrasie van die komponent, bekend as die retensietyd, voorsien 'n manier om die komponent te identifiseer. Die retensietyd of elueringstyd  $t_R$  is onder ideale kondisies onafhanklik van die hoeveelheid monster ingespuut en is slegs afhanklik van die verdelingskoëffisient van die stof tussen die mobiele fase en die stasionêre fase.

Die konstante,  $K_p$ , is die verhouding van die konsentrasie van die betrokke stof in die stasionêre fase tot die ooreenstemmende konsentrasie in die mobiele fase.

Die kapasiteitsverhouding  $k^{26}$  kan dus as volg uitgedruk word.

$$k = K_D \frac{V_L}{V_G} = K_D \left[ \frac{\text{Hoeveelheid van die komponent in die stasionêre fase}}{\text{Hoeveelheid van die komponent in die mobiele fase}} \right]$$

Waar  $V_L$  = Volume van die stasionêre fase in die kolom

$V_G$  = Volume van die mobiele fase in die kolom

Die vorm en posisie (retensietyd) van die pieke in 'n chromatogram is onderhewig aan die volgende faktore:

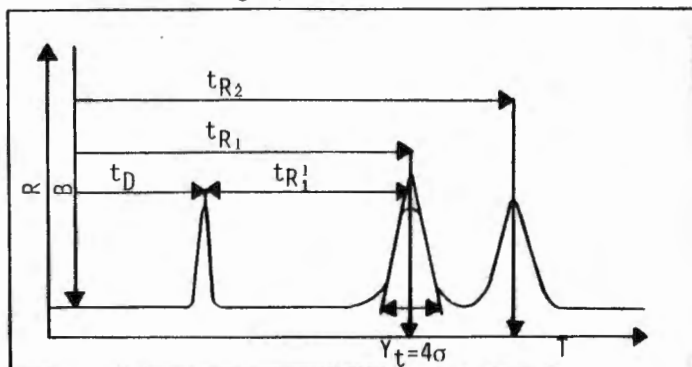
- i) die vloeï van die draergas onder invloed van die drukgradiënt. As gevolg van die druk van die pakstof is die gasvloeï nie aksiaal gerig nie;
- ii) die ewewigsverdeling van die komponente tussen die stasionêre fase en die bewegende draergas;
- iii) die ewewigsverspreiding wat gegee word deur die verdeelingskoëffisient  $K_D$ ;
- iv) die mate van diffusie in die gas- en die vloeïstoffase.

Wanneer die gasvloeï as gevolg van eksterne omstandighede verander, verander die retensietyd dienoreenkomstig. Dit is dus meer korrek om die gasvloeï in plaas van die tyd as maatstaf te neem. Die gereduseerde retensievolumen  $V_R^1$  word gegee deur

$$V_R^1 = V_R - V_m$$

waar  $V_R$  = die retensievolumen. Dit is die volume gas nodig om 'n komponent te elueer.

$V_m$  = die volume gas in die kolom teenwoordig voordat die monster ingespuut is.



FIGUUR 3.1 Voorstelling van 'n chromatogram

B = begin

R = respons

T = tyd

$t_D$  = dooie retensietyd

$t_R$  = retensietyd

$t_R^1$  = gereduseerde retensietyd, indeks 1,2 stem ooreen met die geanaliseerde komponent 1 of 2

$y_t$  = piekbreedte by die basis

$\sigma$  = standaard afwyking

$V_R$  kom ooreen met  $t_R$ , en  $V_m$  kom ooreen met  $t_D$  in die voorstelling.

Die belangrikste beginsel wat die effektiwiteit van die fraksionering bepaal, is kolomdoeltreffendheid. Kolomdoeltreffendheid word deur die aantal teoretiese plate bepaal. In 'n skeidingsproses wat in diskrete stappe uitgevoer word (soos byvoorbeeld distillasie), word met elke stap 'n werklike ewewig van die spesifieke komponent tussen twee fases bewerkstellig. Die aantal sulke stappe gee dan die aantal teoretiese plate. In 'n chromatografiese kolom is die komponent egter in konstante beweging deur die kolom en 'n werklike ewewig kan nie op 'n spesifieke punt ingestel word nie.

In dié geval word die hoogte van die kolom wat 'n skeiding ekwivalent aan een teoretiese plaat sal gee, bereken.

Die hoogte ekwivalent aan 'n teoretiese plaat (HETP) kan geskryf word as

$$\text{HETP} = L/N$$

waar L = die effektiewe lengte van die kolom

N = die aantal teoretiese plate.

N kan vervolgens bereken word uit die vergelyking

$$N = 16 \left( \frac{\text{Retensievolumen}}{\text{Piekwydte}} \right)^2 \quad 27,28$$

Die verskil in retensietyd is dus direk eweredig aan die kolomlengte, terwyl piekverbreding eweredig is aan die vierkantswortel van die kolomlengte.

In die algemeen geld dus dat 'n langer kolom 'n beter fraksionering tot gevolg het.<sup>26</sup> Dit is noodsaaklik om die hele sisteem te optimaliseer sodanig dat die minimum piekverbreding verkry word teenoor die maksimum vergroting in die retensietydverskille van die produkte. Morgan en Deming<sup>29</sup> het optimaliseringstrategieë voorgestel vir gas-vloeistofchromatografiese metodes. Dit word tans in verskeie laboratoria met groot welslae gebruik.

Naas effektiewe fraksionering is die identifisering van die verskillende komponente in 'n gaschromatografiese skeidingsprofiel sekerlik die grootste enkele probleem vir navorsers in die biologiese veld. Retensietye alleen is nie voldoende vir genoegsame identifisering van pieke nie - veral

wanneer met biologiese vloeistowwe gewerk word. Biologiese vloeistowwe, veral urine, is so kompleks dat, selfs al word met kapillêre kolomme gewerk wat 'n groot aantal teoretiese plate het, baie van die pieke nog nie identifiseerbaar is nie, aangesien dit uit 'n mengsel van twee of meer metaboliete kan bestaan. Dit is om hierdie rede dat verskeie outeurs onder andere Kuksis et al.<sup>30</sup> en Healy et al.<sup>31</sup>

voel dat, alhoewel geoutomatiseerde G.C. metodes met 'n hoë resolusie wat gekombineer word met rekenaarevalueringstegnieke, al hoe meer 'n toepassing vind in die biomediese wetenskappe, hierdie metodes alleen nog nie 'n positiewe identifikasie van die verskillende komponente in 'n biologiese profiel kan maak nie.

'n Groot deel van die diagnostiese waarde van chromatografiese *profilerings*\* berus dus op die identifisering van daardie komponente wat spesifiek is vir 'n sekere siektetoestand. Hierdie benaderingswyse kan ook gevolg word in samehang met ander tegnieke vir die identifisering van die verskillende pieke in die profiele. Dit is egter noodsaaklik om steeds addisionele metodes ten opsigte van identifisering te ondersoek. Dit is vandag algemeen bekend dat massaspektrometrie (MS) die geskikste tegniek is om komplekse gefraksioneerde biologiese monsters te identifiseer.<sup>32-37</sup> Dit is egter jammer dat weens die aanvanklik hoë koste daaraan verbonde, min kliniese laboratoria plaaslik, daarvan gebruik kan maak.

---

\* In die vakliteratuur bekend as *biochemical profiling*, *metabolic profiling* en *chromatographic profiling*.

### 3.2 Vergelykende ondersoek van twee ekstraksietegnieke en die gepaardgaande fraksionering van die materiaal met behulp van gaschromatografie

#### 3.2.1 Inleidend

In hierdie ondersoek is twee prosedures wat algemeen in buitelandse kliniese laboratoria gebruik word, met mekaar vergelyk ten opsigte van:

- i) die interpreteerbaarheid van die data sonder dat van 'n gekoppelde massaspektrometer gebruik gemaak word, en die gevolglike geskiktheid van die metode as 'n siftingstoets vir organiese suururie en
- ii) die hoeveelheid tyd en eksperimentele werk wat benodig word.

Die prosedures wat ondersoek is, is onderskeidelik gebaseer op anioonuitruilingschromatografie en vloeistof-vloeistofekstraksie.

#### 3.2.2 Anioonuitruilingschromatografie

##### 3.2.2.1 Inleidend

Verskeie ondersoekers maak gebruik van anioonuitruilingschromatografie vir die isolering van organiese sure uit urine. Hierdie prosedure is veral kwalitatief en kwantitatief gestandaardiseer deur die groep van Watts.<sup>9</sup> Hierdie metode is dan ook geskik vir metaboliese studies.

### 3.2.2.2 Chemikalieë

Dekanoësuur, dodekanoësuur, hendekanoësuur, tetradekanoësuur, heksadekanoësuur, oktadekanoësuur, eikosanoësuur, dokosanoësuur, lignoseriensuur en serotiensuur is verkry vanaf Elmu-Laboratories.

m-hidroksifenielasynsuur, o-hidroksifenielasynsuur, p-hidroksifenielasynsuur, DL-p-hidroksifenielmelksuur, p-hidroksifenielpiruviensuur, p-hidroksibensaldehyd, p-hidroksibensoësuur, DL-B-fenielmelksuur, L-pirolglutamiensuur, chlorosulfoonsuur, p-hidroksibensielalkohol, 3,4 dihidroksifenielpropioonsuur, p-kumaarsuur en triëtielamien is verkry vanaf Merck Chemicals.

Oksaalsuurdihidraat, sitraatmonohidraat, bensoësuur, oksaalsuur, ureum, tartaarsuur, sitroensuur, maloonsuur, fumaarsuur, 2-oksoglutaarsuur, hippuursuur en DL-3-hidroksibuturiensuur is verkry vanaf BHD.

L-Maleïensuur, piruviensuur, suksiensuur en  $\alpha$ -ketobuteriensuur is verkry vanaf Sigma London Chemical Company.

Glikolsuur en metielmaloonsuur is verkry vanaf Fluka A.G. deur Fluorochem. Bogenoemde chemikalieë was van die hoogste suiwerheidsgraad wat beskikbaar was.

Die silaneringsreagens: Bis(trimetielsiliel)trifluorasetamied (BSTFA) is verkry vanaf Phase Separations L.T.D.

A25 DEAE-Sephadex-anioonuitruilingsjel is verkry vanaf Pharmacia L.T.D.

Die kolompakkingsmateriaal vir fraksionering (OV 101 10% op Chromosorb WHP 80-100 maas) is reeds vermeng verkry vanaf Elmu-Laboratories en Supelco INC.

### 3.2.2.3 Reagense

In al die reagense wat berei is, is waar moontlik, van chemikalieë van analitiese graad of van die hoogste beskikbare suiverheidsgraad gebruik gemaak. Gedeïoniseerde en glasgedistilleerde water is gebruik, waar van toepassing.

i) Piridiniumasetaatbuffer ( $0,5\text{mol dm}^{-3}$ )\*

Dit is berei deur  $40,3\text{cm}^3$  piridien en  $28,6\text{cm}^3$  ysasynsuur tot  $1000\text{cm}^3$  met water te verdun. Hierdie buffer moet weekliks vars berei word.

ii) Piridiniumasetaatbuffer ( $1,5\text{mol dm}^{-3}$ )\*

Dit is berei deur  $119\text{cm}^3$  piridien en  $90\text{cm}^3$  ysasynsuur tot  $1000\text{cm}^3$  met water te verdun. Hierdie buffer moet weekliks vars berei word.

iii) Hendekanoësuuroplossing

Hierdie oplossing is berei deur  $100\text{mg}$  hendekanoësuur op te los in 'n baie klein volume  $0,1\text{mol dm}^{-3}$  NaOH waarna die oplossing dan na  $100\text{cm}^3$  met water aangevul is.

iv) Standaardoplossing van organiese sure

Die komponente van die standaardmengsel is gekies op grond van biologiese relevante organiese sure wat met 'n meerdere of mindere reëlmaat in urine aangetref word. Die konsentrasies van hierdie komponente in die mengsel

---

\* Waar metodes bespreek word, word die hoeveelhede in S.I.-eenhede weergegee, maar nie wanneer dit uit die literatuur aangehaal word nie. In daardie gevalle word dit weergegee soos in die spesifieke publikasie genoem.

is nie verteenwoordigend van die konsentrasies wat in die urine aangetref word nie, maar is arbitrêr gekies om die retensietye van die betrokke komponente vas te stel. Hiervoor is dienoooreenkomstig 'n mengsel saamgestel met die volgende komponente: m-hidroksifenielasynsuur, o-hidroksifenielasynsuur, p-hidroksifenielasynsuur, DL-p-hidroksifenielmelksuur, p-hidroksifenielpiruviensuur, p-hidroksibensaldehyd, DL-B-hidroksifenielmelksuur, hidroksibensielalkohol, 3,4-dihidroksifenielpropioonsuur, p-kumaarsuur, p-hidroksibensoësuur, L-pirotglutamiensuur en chlorosulfoonsuur. Dit is alles in water opgelos en tot 10cm<sup>3</sup> verdun.

v) Oplossings van individuele sure

Net soos hierbo beskryf is van elke suur 'n hoeveelheid geneem en afsonderlik in water opgelos en tot 10cm<sup>3</sup> verdun.

vi) (C<sub>10</sub> tot C<sub>26</sub>)-karboksielsure

Hierdie mengsel is saamgestel uit die volgende sure:

|                  |                                                |    |
|------------------|------------------------------------------------|----|
| dekanoësuur      | C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub> |    |
| dodekanoësuur    | C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub> |    |
| tetradekanoësuur | C <sub>14</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> |    |
| heksadekanoësuur | C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub> |    |
| oktadekanoësuur  | C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub> |    |
| eikosanoësuur    | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> |    |
| dokosanoësuur    | C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub> |    |
| tetrakosanoësuur | C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub> | en |
| heksakosanoësuur | C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub> |    |

Die sure is in heptaan opgelos en tot  $5,0\text{cm}^3$  verdun en word as kalibrasiemengsel\* vir die gaschromatograaf gebruik.

#### 3.2.2.4 Eksperimentele prosedure

Die eksperimentele metode word in die vloeidiagram, soos weergegee in Figuur 3.2, saamgevat.

h Kolom van A25 DEAE-Sephadex ( $1 \times 5\text{cm}$ ) is voorberei deur h waterige papoplossing van die jel, wat vooraf vir 24 uur in water uitgeswel is, in die kolom te gooi en vir h tyd te laat om te pak. Na pakking is die kolom met  $3\text{cm}^3$  water en daarna met  $20\text{cm}^3$  van die  $0,5\text{mol dm}^{-3}$  piridiniumasetaatbuffer geëlueer. Vervolgens is  $1,0\text{cm}^3$  geneutraliseerde urine plus  $1,0\text{cm}^3$  van die hendekanoësuuroplossing op die kolom geplaas en gelaat om in te dreineer. Die kolom is weereens twee maal met  $5,0\text{cm}^3$  water geëlueer om die neutrale komponente soos ureum uit die sisteem te verwyder. Die suurkomponente is met  $25,0\text{cm}^3$  van die  $1,5\text{mol dm}^{-3}$  piridiniumasetaatbuffer geëlueer.

Die  $25\text{cm}^3$  eluaat is as h dun film in h rondeboomples gevries deur dit te roteer in vloeibare lug. Na vriesing is die mengsel vir 12 uur gevriesdroog, terwyl die monstertemperatuur by  $-10^\circ\text{C}$  en h druk van  $0,067\text{kPa}$  ( $0,5\text{ torr}$ ) gehou is. Die afkoelingsisteem is by  $-70^\circ\text{C}$  konstant gehou.

---

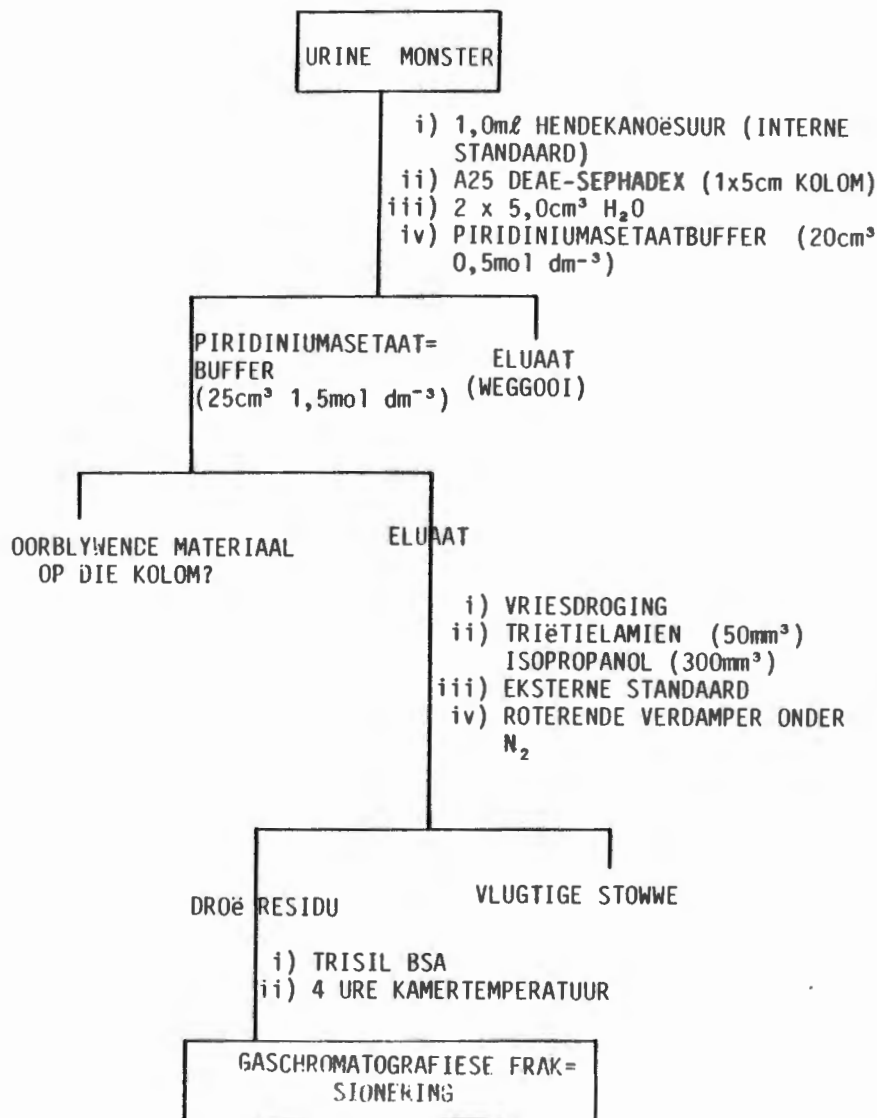
\* Die toepassing van die kalibrasiemengsel word in Hoofstuk 3.2.2.5 toegeelig

Die droë materiaal is in 50mm<sup>3</sup> triëtielamien en 300mm<sup>3</sup> isopropanol gehearsuspendeer. Vervolgens is hierdie gesuspendeerde ekstrak na 'n reaksiefles waarin vooraf 50µg nonadekanoësuur gevoeg is, oorgedra. Die mengsel is onder 'n stroom van stikstof gedroog.

TMS-derivate van die sure is gevorm deur 100ul BSTFA: Piridien (1:1) by die droë materiaal te voeg. Die reaksiemengsel is vir 4 uur by kamertemperatuur gelaat ten einde volledige silanering te verseker.

Die trimetiëlsiliëlderivate is gefraksioneer en geïdentifiseer. Die volgende kondisies is gekies:

|                       |                                                                                                                               |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Chromatograaf:        | Pye Unicam Model 104                                                                                                          |
| Detektor:             | Vlamionisasiedetektor                                                                                                         |
| Registreerder:        | J.J. Lloyd Instrument Model CR650A                                                                                            |
| Verswakking:          | $8 \times 10^2$                                                                                                               |
| Kolomdimensies:       | 1,5m x 4,0mm glas (gespiraliseer)                                                                                             |
| Soliede pakmateriaal: | Chromosorb WHP 80/100 maas                                                                                                    |
| Stationêre fase:      | Silikoon (dimetiel) OV101 10%                                                                                                 |
| Detektortemperatuur:  | 300°C                                                                                                                         |
| Temperatuurprogram:   | 60°C tot 160°C teen 5°C per minuut,<br>160°C tot 280°C teen 2°C per minuut met 'n aanvanklike 5 minute isotermiese vertraging |
| Draergasvloeï:        | 35cm <sup>3</sup> minuut <sup>-1</sup>                                                                                        |
| Monstergrootte:       | 5mm <sup>3</sup>                                                                                                              |



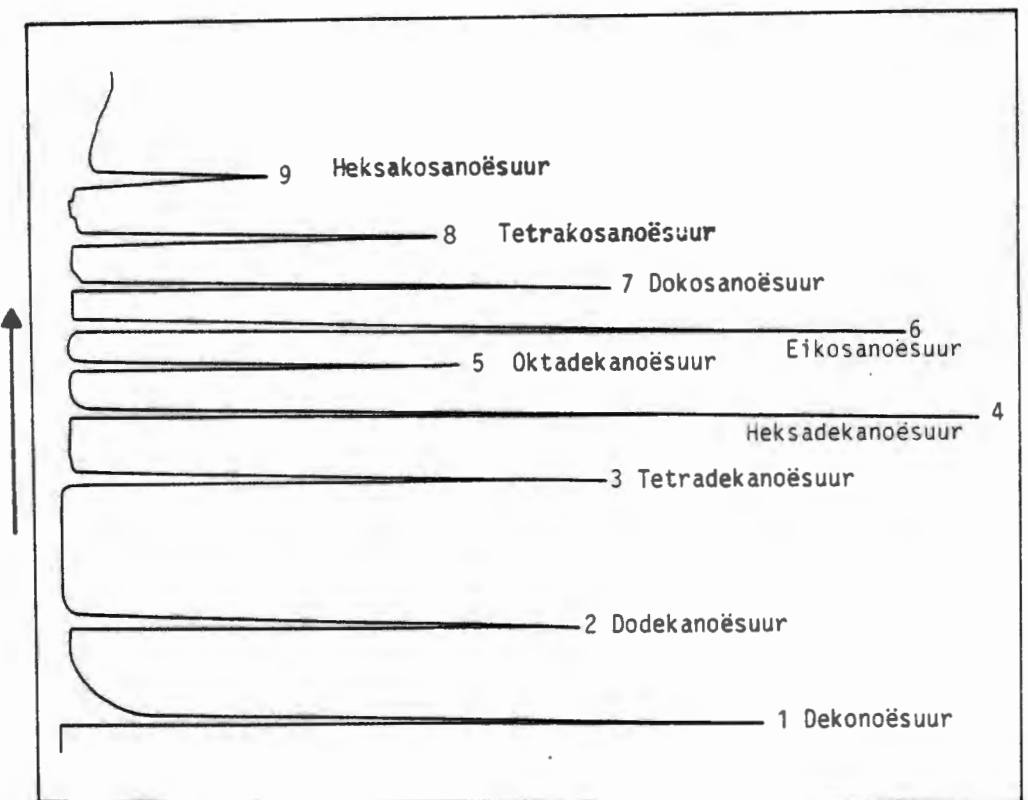
FIGUUR 3.2: Skematiese voorstelling van die bepaling deur middel van anioonuitruilingschromatografie

### 3.2.2.5 Resultate

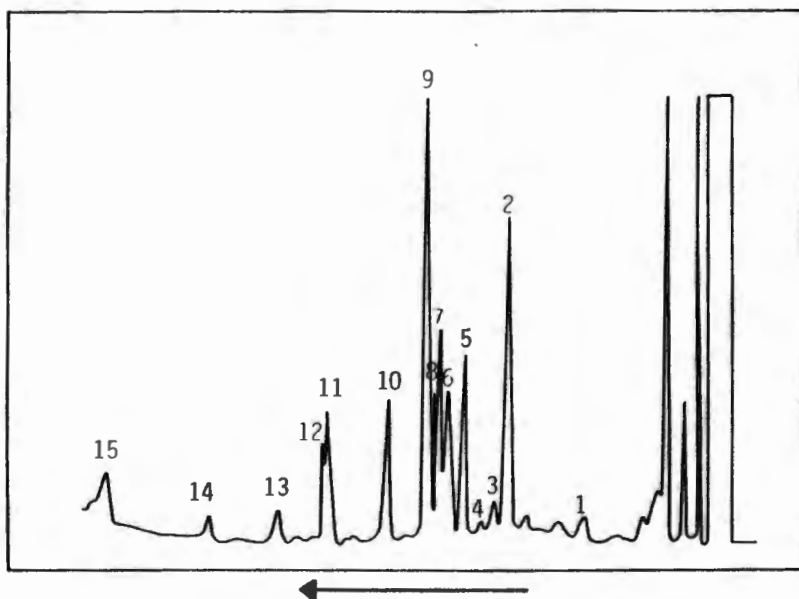
Vir kalibrasie van die kolom is die ( $C_{10}$  tot  $C_{26}$ )-kARBOKSIEL-suurmengsel gebruik wat onder dieselfde kondisies as die ekstrakte gesilaneer en gefraksioneer is.

h Tipiese resultaat van so h kalibrasie-eksperiment word in Figuur 3.3 aangetoon. Hierdie kalibrasiemengsel is deuren=tyd tussen skeidings ingespuut en gefraksioneer om te kontro=leer of daar h verandering in die retensietyd van die onder=skeie kARBOKSIELsure in die mengsel, of h verandering van die algemene profiel plaasgevind het. So h verandering dui op h verandering in die gestelde kondisies vir fraksionering óf h degenerasie van die kolom. Telkens wanneer daar dus h verandering in die skeidingspatroon gevind is, is die frak=sioneringskondisies nagegaan en die kolom gerekondisioneer. Na h lang tydperk van konstante gebruik is gevind dat rekon=disionering van die kolom nie meer h bydrae lewer ten opsigte van die handhawing van h konstante skeidingspatroon nie. Die oënskynlike rede hiervoor is dat die binding tussen die olierige stasionêre fase (OV-101) en die soliede pakmateriaal (chromosorb W.H.P.) verswak met h gepaardgaande verlies van die stasionêre fase by die relatiewe hoë temperatuur waarby die fraksionering uitgevoer word. In so h geval is die kolom=pakkingsmateriaal vervang.

Die fraksionering van die standaardmengsel van organiese sure word in figuur 3.4 aangedui. Dit is nie moontlik om uit figuur 3.4 h direkte verband tussen retensietyd en struk=tuur af te lei nie. Identifisering van die pieke is gedoen deur die mengsel voor fraksionering met h bepaalde suur, wat vooraf gesilaneer is, te verryk. Die piek van die mengsel



FIGUUR 3.3  $C_{10}$ - $C_{24}$  karboksiezuurmengsel, gefractioneerd met behulp van 10% OV101 op Chromosorb WHP 80 tot 100 maas



FIGUUR 3.4 Fraksionering van organiese suur-TMS-derivate geëkstraheer uit die standaard organiese suur-oplossing met behulp van DEAE-Sephadex anioonuitruilingschromatografie

- \*1. p-kumaarsuur
- 2. p-hidroksibensaldehyd
- 3. onbekend
- 4. L-pirolutamiensuur
- 5. 4-hidroksibensielalkohol
- 6. O-hidroksifenielasynsuur
- 7. p-hidroksifenielasynsuur
- 8. m-hidroksifenielasynsuur
- 9. p-hidroksibensoësuur
- 10. 3,4-dihidroksifenielpropioonsuur
- 11. DL-p-hidroksifenielmelksuur
- 12. DL- $\beta$ -hidroksifenielmelksuur
- 13. p-hidroksifenielpiruviensuur
- 14. onbekend
- 15. onbekend

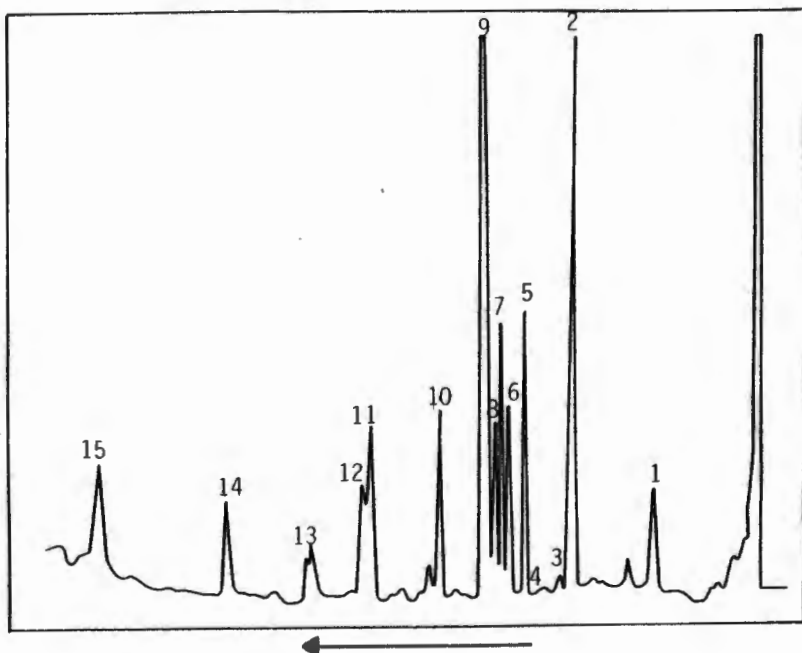
\* Pieke weergegee as die oorspronklike suur en nie as die TMS-derivaat nie.

wat hierdeur hoër word, word dan as die posisie van die betrokke organiese suur geïdentifiseer, soos in figure 3.5 en 3.6 aangetoon word.

Die belangrikste waarnemings wat uit die resultate van figure 3.4 tot 3.7 gemaak kan word, is:

1. Die organiese sure van fisiologiese belang kon met behulp van die gebruikte metode suksesvol geskei word.
2. Isomere, byvoorbeeld para-, meta-, en orto-hidroksifenielasynsuur is onderling individueel identifiseerbaar.
3. 'n Komplekse normale patroon word verkry. Weens hierdie kompleksiteit was identifisering van die verskillende kataboliete nie moontlik nie.
4. Die resultate is reproduceerbaar. Dit is baie belangrik vir die reproduceerbaarheid dat die vriesdroogkondisies konstant gehou word soos dit in paragraaf 3.2.2.4 aangegee word.
5. Die meeste organiese sure word effektief geëkstraheer, behalwe hippuursuur (figuur 6, piek 13).
6. Sulfate en fosfate kom in groot hoeveelhede in die ekstrak voor (figuur 3.7, piek 2).

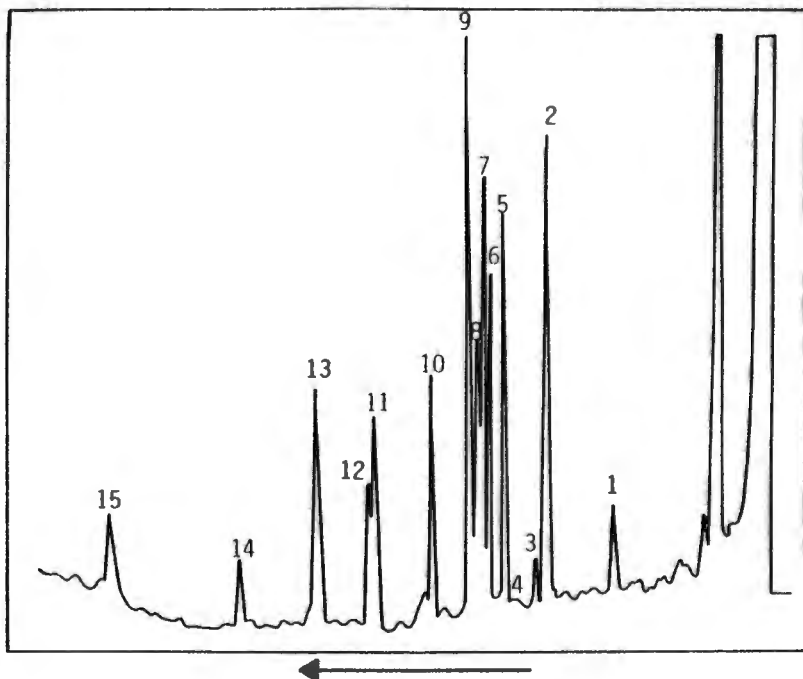
Aangesien sulfaat en fosfaat meestal in baie groter konsentrasies as die organiese sure in urine voorkom, word dit nie effektief met behulp van hierdie metode verwyder nie. Die gevolg is dat die pieke en agtergrond van hierdie verbinding groot dele van die profiel (ongeveer 25%) oorheers.



FIGUUR 3.5 Fraksionering van organiese suur-TMS-derivate soos geëkstraheer uit die standaard organiese suuroplossing wat met p-hidroksibensaldehyd verryk is

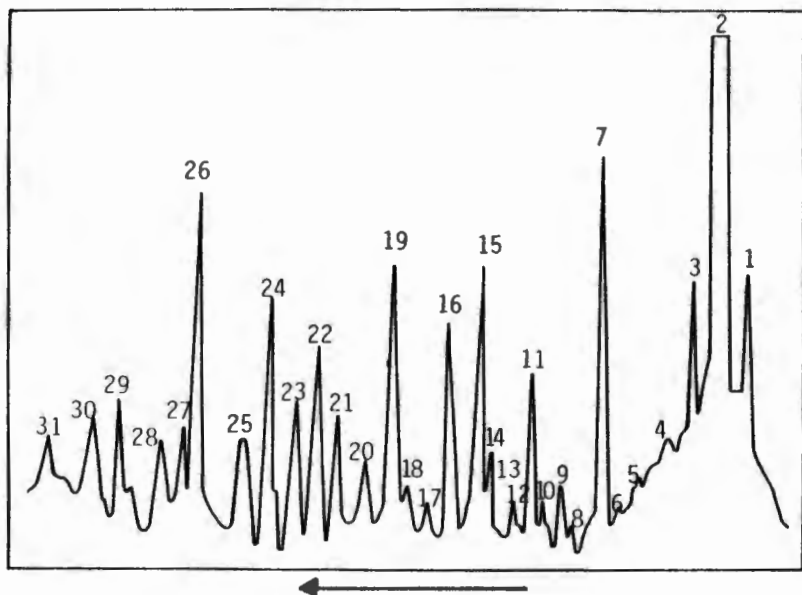
- \*1. p-kumaarsuur
- 2. p-hidroksibensaldehyd
- 3. onbekend
- 4. L-pirotglutamiensuur
- 5. 4-hidroksibensielalkohol
- 6. 0-hidroksifenielasynsuur
- 7. p-hidroksifenielasynsuur
- 8. m-hidroksifenielasynsuur
- 9. p-hidroksibensoësuur
- 10. 3,4-dihidroksifenielpropioonsuur
- 11. DL-p-hidroksifenielmelksuur
- 12. DL-β-hidroksifenielmelksuur
- 13. p-Hidroksifenielpiroviensuur
- 14. onbekend
- 15. onbekend

\*Pieke weergegee as die oorspronklike suur en nie as die TMS-derivaat nie.



FIGUUR 3.6 Fraksionering van organiese suur-TMS-derivate soos geëkstraheer uit die standaard organiese suuroplossing wat met p-hidroksifenielpiruvien= suur verryk is

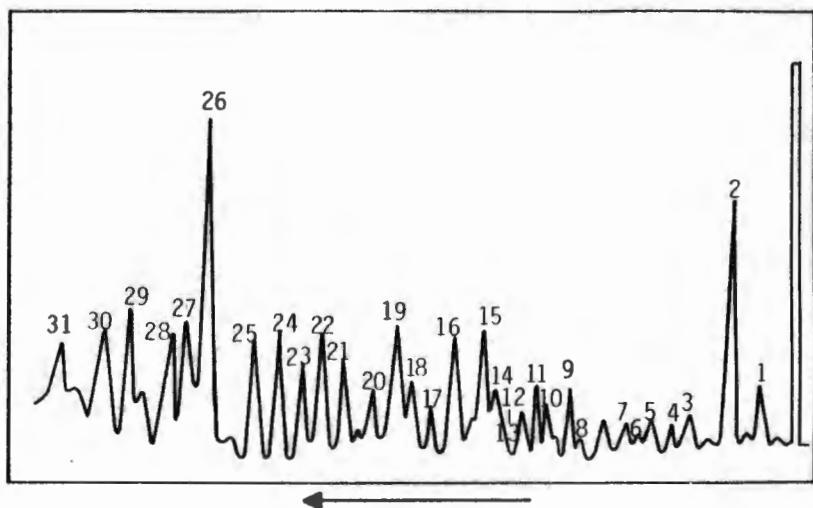
- \*1. p-kumaarsuur
- 2. p-hidroksibensaldehyd
- 3. onbekend
- 4. 4-piroglutamiensuur
- 5. m-hidroksibensielalkohol
- 6. O-hidroksifenielasynsuur
- 7. p-hidroksifenielasynsuur
- 8. m-hidroksifenielasynsuur
- 9. p-hidroksibensoësuur
- 10. 3,4 dihidroksifenielpropioonsuur
- 11. DL-p-Hidroksifenielmelksuur
- 12. DL-β-hidroksifenielmelksuur
- 13. p-hidroksifenielpiruviensuur
- 14. onbekend
- 15. onbekend



FIGUUR 3.7 Fraksionering van organiese suur-TMS-deriate geëkstraheer uit urine van normale kontroles met behulp van DEAE-Sephadex-Anioonuitruilingschromatografie

1. DL-3-hidroksibuturiensuur
2. Sulfaat en fosfaat
3.  $\alpha$ -ketobuturiensuur
4. p-hidroksibensaldehyd
7. Hendekanoësuur (interne Standaard)
8. p-hidroksifenielasetaat
9. p-hidroksibensoësuur
10. 3,4-dihidroksifenielpropioonsuur
13. Hippuursuur
15. Miristiensuur
16. 3-indoolasynsuur
19. p-hidroksifenielpiruviensuur
22. Steariensuur
25. Nonadekanoësuur (eksterne standaard)
- Ander: onbekend

Die pieke is weergegee as die oorspronklike suur, en nie as die TMS-deriaat nie



FIGUUR 3.8 Fraksionering van organiese suur-TMS-derivate geëkstraheer uit urine van normale kontroles wat vooraf aan 'n bariumsoutpresipitering by pH 11,5 onderwerp is

1. DL-3-hidroksibuturiensuur
  2. Sulfaat, fosfaat?
  3.  $\alpha$ -ketobuteriensuur
  4. p-hidroksibensaldehyd
  7. Hendekanoësuur (interne standaard)
  8. p-hidroksifenielasetaat
  9. p-hidroksibensoësuur
  12. 3,4-dihidroksifenielpropioonsuur
  13. Hippiursuur
  15. Miristiensuur
  16. 3-indoolasynsuur
  19. p-hidroksifenielpiruviensuur
  22. Steariensuur
  25. Nonadokanoësuur (eksterne standaard)
- Ander: Onbekend

Figuur 3.8 dui daarop dat presipitering van die verbindingsas bariumsoute, soos voorgestel deur Thompson en Markey,<sup>1</sup> nie suksesvol is nie aangesien dit 'n kopresipitering van die organiese sure meebring. Die algemene verlaging van piekhoogtes, veral in die middelste gebied van die profiel, kan aan hierdie kopresipitering toegeskryf word. Dit blyk uit figuur 3.8 dat sekere sure min of gladnie kopresipiteer nie. 'n Gevolg hiervan is dat die algemene verhouding van die suurkonsentrasies tot mekaar, wat baie belangrik is wanneer die prosedure vir karakteriseringsdoeleindes gebruik word, hierdeur versteur word.

'n Verdere beperking wat hierdie presipiteringsstap op die metode plaas, is dat die verhouding van die interne standaard tot die eksterne standaard nie meer 'n aanduiding van die effektiwiteit van die ekstraksie gee nie. Uit figuur 3.8 kan dus die gevolgtrekking gemaak word dat met bariumpresipitering kwalitatiewe bepalinge bemoeilik word, terwyl die metode kwantitatief uiters onbetroubaar word.

#### 3.2.2.6 Gevolgtrekkings

Piekidentifisering blyk die grootste probleem te wees by hierdie prosedure. Aangesien identifisering van pieke volgens hierdie metode soos reeds vermeld, nie by 'n enkele normale kontrole, selfs na ongeveer 50 verskillende normale urinemonsters, volledig uitgevoer kan word nie, is geen urinemonster van 'n pasiënt met 'n bekende organiese suururie gefraksioneer nie. Die kompleksiteit van die patroon van organiese sure, verkry vanuit normale urine, dui by voorbaat daarop dat anioon-uitruilingschromatografie nie baie geskik vir die opspoor

van organiese suur-defekte sal wees nie. Aanvullend hierby is die metode ook meer arbeidsintensief as wat vir 'n siftingsprosedure vereis word.

### 3.2.3 Vloeistof-vloeistofekstrasie

#### 3.2.3.1 Inleidend

Hierdie metode is in 1970 deur Hammond en Goodman<sup>2</sup> toegepas op die ekstrasie van organiese sure uit urine. Dié metode is aangepas om as 'n siftingstegniek gebruik te kan word vir die identifisering van organiese suururië. Dit word tans onder andere ook by die John. F. Kennedy Institute for Handicapped Children, Baltimore VSA, gebruik.<sup>38</sup>

#### 3.2.3.2 Chemikalieë

Alle chemikalieë wat gebruik is, was van die hoogste beskikbare suiwerheidsgraad. Soutsuur, natriumsulfaat, etielasetaat en diëtleter is verkry vanaf Merck Chemicals.

n-Dekaan, n-dodekaan, n-tetradekaan, n-heksadekaan, n-oktadekaan, n-eikosaan, n-dokosaan, n-tetrakosaan en trimetielchlorosilaan is verkry vanaf Elmu Laboratories.

Bis(trimetielsilil)trifluorasetamied is verkry vanaf Phase Separations.

Pikriensuur, kreatinien en maloonsuur is verkry vanaf BHD.

Die kolompakkingsmateriaal, 5% OV22 op Chromosorb WHP (80/100 maas), is verkry vanaf Elmu Laboratories in 'n vooraf vermengde

toestand.

### 3.2.3.3 Reagense

Gedestilleerde en glasgedistilleerde water is gebruik, waar van toepassing.

- i)  $0,04 \text{ mol dm}^{-3}$  Pikriensuur  
4,58g droë pikriensuur is afgemeten, opgelos en tot  $500 \text{ cm}^3$  met water verdun.
- ii)  $0,75 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH  
15g NaOH is afgemeten in 'n klein volume water opgelos, en tot  $500 \text{ cm}^3$  met water verdun.
- iii) Kreatinienstandaard  
10,0mg kreatinien is in  $10 \text{ cm}^3$  water opgelos.
- iv)  $5 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl  
41,7 $\text{cm}^3$  gekonsentreerde soutsuur is verdun tot  $100 \text{ cm}^3$  met water.
- v) Interne Standaard  
26,25mg maloonsuur is in metanol opgelos en tot  $50 \text{ cm}^3$  met metanol verdun.
- vi) Eksterne Standaard  
9,8mg n-tetrakosaan is in benseen opgelos en tot  $50 \text{ cm}^3$  met benseen verdun.
- vii) Koolwaterstofmengsel  
Ongeveer 2mg van elk van die  $\text{C}_{10}$ - tot  $\text{C}_{24}$ -koolwaterstowwe is afgemeten en alles is in  $1 \text{ cm}^3$  heksaan opgelos.

#### viii) Oplosmiddels

Etielasetaat, diëtieleter, metanol en heksaan is in glas gedistilleer.

#### 3.2.3.4 Eksperimentele prosedure

Die eksperimentele metode word in die vloei-diagram, soos weergegee in Figuur 3.9, saamgevat.

Die ekstraksie van organiese sure berus eerstens op die kreatinienkonsentrasie van die urine. Voordat die ekstraksie uitgevoer word, moet hierdie waarde bepaal word. Die hoeveelheid interne standaard (~~maloonsoor~~), eksterne standaard (~~n-tetrakosaan~~), BSTFA en TMCS wat by die monster gevoeg gaan word, word deur hierdie waarde bepaal.

Presies  $1,0\text{cm}^3$  urine is in 'n  $16 \times 150\text{mm}$  skroefdop-Kimexproefbuis gevoeg. Die toepaslike hoeveelheid interne standaard (~~tabel 3.1~~) is hierby gevoeg. Die pH is op 1,0 met behulp van  $5\text{mol dm}^{-3}$  soutsuur ingestel.

Daar is ~~3,0~~<sup>6ml base</sup> $\text{cm}^3$  etielasetaat by die monster gevoeg en vir ~~1~~<sup>1/2</sup> minute op 'n Vortexmenger gemeng. Daarna is dit vir ~~1~~<sup>3</sup> minute teen ~~1000rpm~~ op 'n tafelsentrifuge gesentrifugeer. Die boonste fase (etielasetaat) is versigtig met behulp van 'n Pasteurpipet na 'n tweede glasproefbuis met 'n skroefdop oorgedra. Die onderste fase (urine) is met ~~3~~<sup>3ml</sup> $\text{cm}^3$  diëtieleter geherekstraheer en vir 10 minute op 'n Vortexmenger gemeng. Daarna is dit weereens vir ~~3~~<sup>3</sup> minute teen ~~1000rpm~~ gesentrifugeer. Die diëtieleter- en etielasetaatekstrakte is bymekaar gevoeg met behulp van 'n Pasteurpipet. Die diëtieleterekstraksie is herhaal en al die ekstrakte is bymekaar gevoeg. Die waterfase is

TABEL 3.1

| Urine<br>Kreatinien*<br>(mgm/100cm <sup>3</sup> ) | Maloonsuur<br>Interne Stan=<br>daard (-mm <sup>3</sup> ) | C-24<br>parafien<br>(-mm <sup>3</sup> ) | BSTFA<br>(-mm <sup>3</sup> ) | TMCS**<br>(-mm <sup>3</sup> ) |
|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 1 - 5                                             | 25                                                       | 25                                      | 10                           | 2                             |
| 6 - 10                                            | 50                                                       | 50                                      | 20                           | 4                             |
| 11 - 20                                           | 100                                                      | 100                                     | 40                           | 8                             |
| 21 - 40                                           | 200                                                      | 200                                     | 80                           | 16                            |
| 41 - 60                                           | 300                                                      | 300                                     | 120                          | 24                            |
| 61 - 80                                           | 400                                                      | 400                                     | 160                          | 32                            |
| 81 -100                                           | 500                                                      | 500                                     | 200                          | 40                            |

\* Wanneer die kreatinienwaarde >100mgm/dl is, moet 0,5cm<sup>3</sup> urine vir die ekstraksie gebruik word. Die volumes interne-, eksterne standaard, BSTFA en TMCS wat dan gebruik word moet ooreenstem met die helfte van die kreatinienwaarde.

\*\* TMCS moet met 'n Hamiltonspuit, wat vry van water of vog gehou word, afgemete word.

nie verder gebruik nie.

Ongeveer <sup>3 spatelplete</sup> 2 gram natriumsulfaat is by die ekstrak gevoeg, gemeng vir 1 minuut en gesentrifugeer soos tevore. Die anhidriese ekstrak is versigtig met behulp van 'n Pasteurpipet in 'n 13x 100mm-glas-Kimexbuis oorgedra.

Die ekstrak is onder 'n stroom stikstof by kamertemperatuur afgedamp. Vervolgens is die korrekte hoeveelheid eksterne standaard (~~Tabel 3.1~~) by die droë ekstrak gevoeg en die ekstrak

weer onder stikstof by kamertemperatuur gedamp.

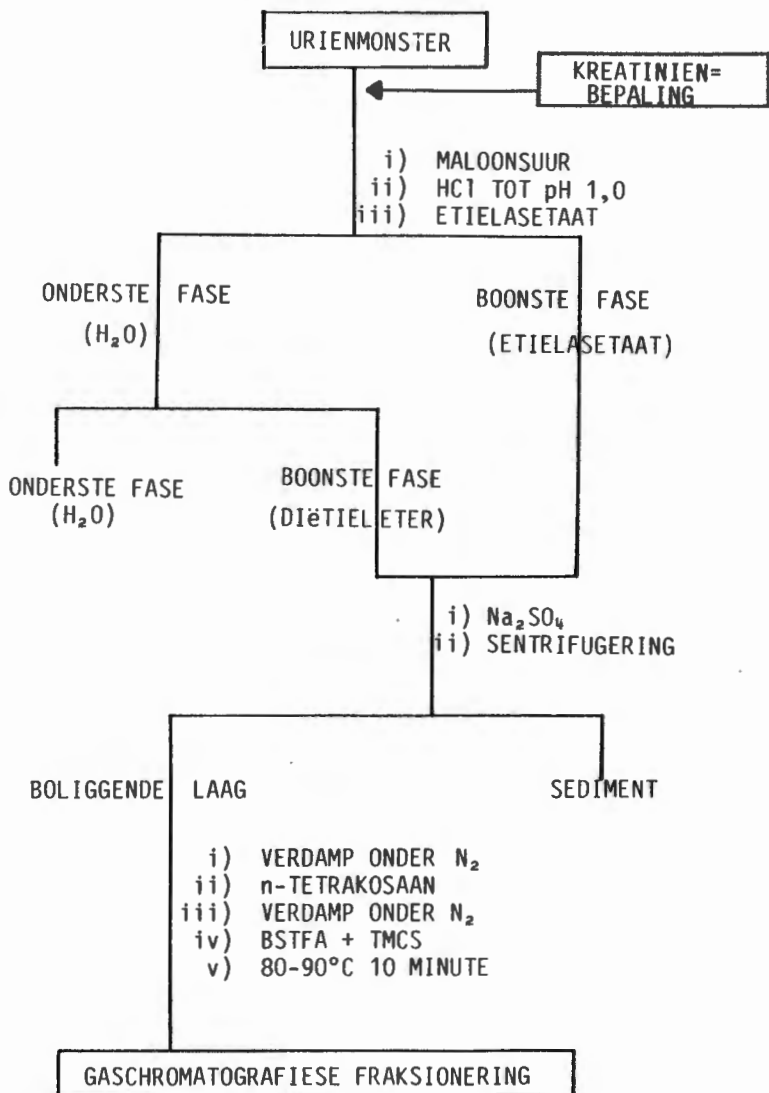
Die silaneringsreagense BSTFA en TMCS is met behulp van 'n Hamiltonspuit ~~volgens tabel 3.1~~ bygevoeg. Die verseëelde buise is vir 10 minute in 'n waterbad by 80-90°C geplaas. Die gesilaneerde ekstrak is gelaat om goed af te koel voor fraksionering.

Van hierdie reaksiemengsel is 3,5 $\mu$ l vir die gaschromatografie= se analise gebruik. Die kondisies hiervoor was die volgende:

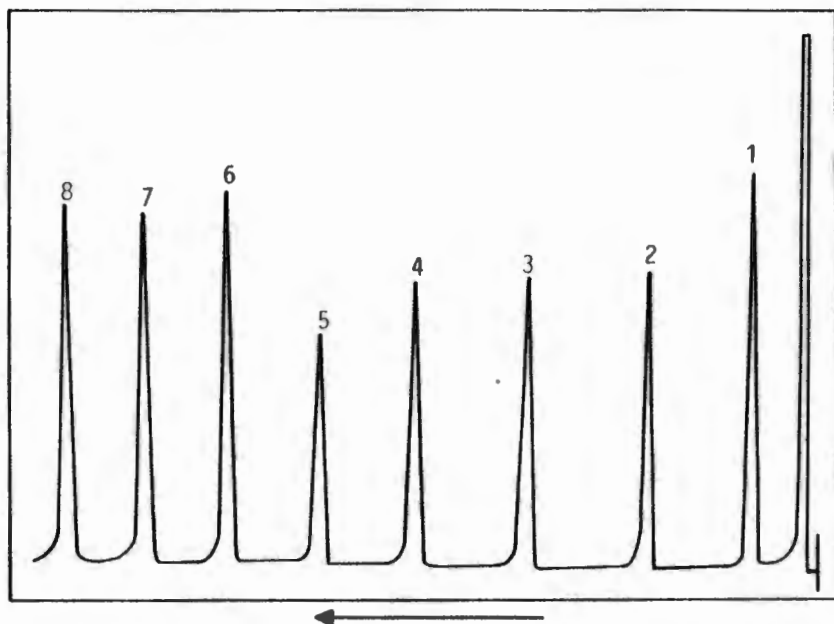
|                       |                                                                                            |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
| Chromatograaf:        | Pye Unicam Model 104                                                                       |
| Detektor:             | Vlamionisasiedetektor                                                                      |
| Registreerder:        | J.J. Lloyd Instrument Model<br>CR650A                                                      |
| Verswakking:          | 8 x 10 <sup>2</sup>                                                                        |
| Kolomdimensies:       | 2,1m x 4,0mm glas (gespirali= seer)                                                        |
| Soliede pakmateriaal: | Chromosorb WHP 80/100 maas                                                                 |
| Stationêre fase:      | Silikoon (feniel, metiel, difeniel)<br>OV22, 5%                                            |
| Detektortemperatuur:  | 300°C                                                                                      |
| Temperatuurprogram:   | 70°C tot 260°C teen 5°C per mi= nuut, met 'n aanvanklike 2 minu= te isotermales vertraging |
| Draergasvloeï:        | 35cm <sup>3</sup> minuut <sup>-1</sup>                                                     |
| Monster grootte:      | 3,5mm <sup>3</sup>                                                                         |

### 3.2.3.5 Resultate

'n C<sub>10</sub> tot C<sub>24</sub>-koolwaterstofmengsel is gebruik as standaard. Die fraksionering van so 'n mengsel word in figuur 3.10 aange= diui. Met hierdie koolwaterstofmengsel word die kolomkondisies



FIGUUR 3.9 Skematiese voorstelling van die bepaling deur middel van vloeistof-vloeistofekstraksie



FIGUUR 3.10 Die gaschromatografiese fraksionering van 'n saamgestelde ( $C_{10}$ - $C_{24}$ )-koolwaterstofmengsel

1. n-Dekaän
2. n-Dodekaän
3. n-Tetradekaän
4. n-Heksadekaän
5. n-Oktadekaän
6. n-Eikosaän
7. n-Dokosaän
8. n-Tetrakosaän

en fraksioneringskondisies gemonitor. Daar is gevind dat in= dien 'n afstand van ongeveer 70mm voorkom tussen n-dodekaan ( $C_{12}$ ) en n-tetradekaan ( $C_{14}$ ) die beste verspreiding van pieke oor die chromatogramme verkry word. Hierdie profiel word ook gebruik vir die identifisering van die komponente aangesien die metileeneenheidwaardes\* (M.E.-waardes) van die meeste organiese sure van kliniese belang tussen die van n-dekaan (M.E.-waarde 10) en n-tetrakosaan (M.E.-waarde 24) geleë is. n-Tetrakosaan ( $C_{24}$ ) is as eksterne standaard gebruik aangesien dit nie in urine voorkom nie. Daar kan ook aangeneem word dat die n-tetrakosaanpiek die einde van die profiel aandui, aangesien volgens Goodman,<sup>38</sup> geen organiese sure van kliniese belang na hierdie piek voorkom nie.

Vir identifisering van die metaboliete in die monster word die metaboliese profiel sodanig op die ( $C_{10}$  tot  $C_{24}$ )-koolwaterstofprofiel geplaas, dat die n-tetrakosaanpiek van die metaboliese profiel en die koolwaterstofprofiel saamval. Indien byvoorbeeld 'n piek wat geïdentifiseer moet word, tussen die pieke van n-dodekaan ( $C_{12}$ ) en n-tetradekaan ( $C_{14}$ ) van die koolwaterstofprofiel voorkom, is die metileeneenheid= waarde uit die volgende vergelyking berekenbaar:

$$\text{ME-waarde} = n + \left( \frac{2y}{x} \right)$$

Waar: x = die afstand tussen die n-dodekaan ( $C_{12}$ ) en n-tetradekaanpieke ( $C_{14}$ ) van die koolwaterstofprofiel.

\*Metieleenheidwaarde (M.E.-waarde) staan in die literatuur bekend as *Methylene Units* (M.U.) of *Methylene Unit values* (M.U.-values).

y = die afstand tussen die n-dodekaan ( $C_{12}$ )-piek van die koolwaterstofprofiel en die middel van die onbekende piek van die metaboliese profiel.

n = 12 in hierdie geval.

Die berekende metileeneenheidwaarde word dan vergelyk met bekende metileeneenheidwaardes, soos reeds deur Thomas en Goodman<sup>38</sup> gepubliseer is.

Hierdeur word 'n groot aantal moontlikhede van organiese sure dus uitgeskakel.

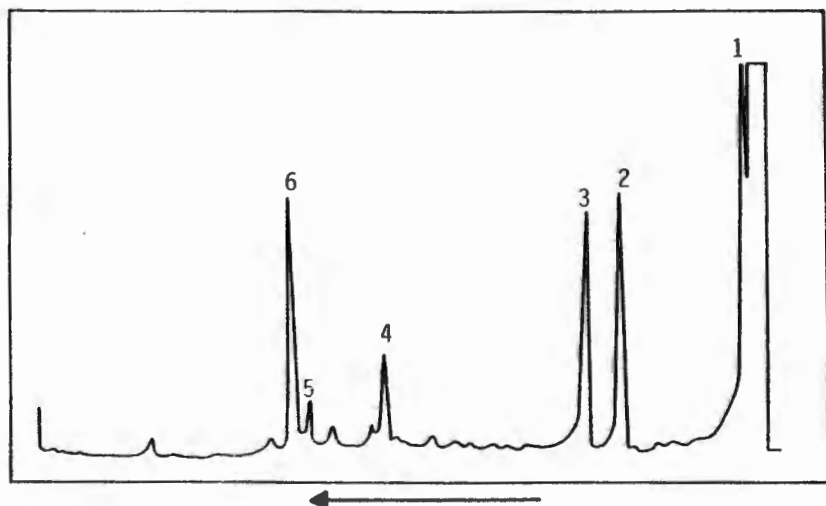
Vir fraksionering van die geëkstraheerde materiaal word die registreerder sodanig gestel dat die piek van die interne standaard (piek 2, figuur 3.11) ongeveer 66% van die totale skaalwydte uitwyk. Die interne standaard se konsentrasie is verder sodanig aangepas dat dit konstant bly onafhanklik van die kreatinienkonsentrasie van die monster. Hierdeur kan die konsentrasies van ander sure vir die monster tot 'n redelike mate bepaal word.

Wanneer die organiese sure wat met vloeistof-vloeistofekstrasie geïsoleer is (Figuur 3.11) vergelyk word met dié geïsoleer met behulp van anioonuitruilingschromatografie (Figuur 3.7), is die volgende duidelik:

1. Kompleksiteit van die patroon

Die patroon soos met hierdie metode verkry is aansienlik eenvoudiger as die patroon in figuur 3.7. Identifisering van kataboliete word hierdeur vergemaklik.

2. Geen sulfate en fosfate kom in die ekstrakte voor nie.



FIGUUR 3.11 Fraksionering van organiese suur-TMS-derivate  
geëkstraheer uit urine van 'n normale kontrole  
met behulp van vloeistof-vloeistofekstraksie

1. BSTFA- en TMCS-produkte
2. Maloon-diTMS (interne standaard)
3. Ureum-diTMS
4. 4-hidroksieamandel-diTMS
5. Hippuur-monoTMS
6. n-Tetrakosaan (eksterne standaard)

3. Ureum word saam met die organiese sure geëkstraheer. Dit is egter uit figuur 3.11 duidelik dat hierdie steurende komponent nie 'n groot gebied van die profiel oorheers nie. Identifisering van die verskillende komponente word dus nie hierdeur benadeel nie.

### 3.2.3.6 Gevolgtrekking

Hierdie metode lewer minder gunstige kwantitatiewe resultate as die anioonuitruilingsisolasietegniek. Indien die gestandaardiseerde fraksioneringskondisies egter gehandhaaf word, is gevind dat met behulp van die vloeistof-vloeistofekstrasieprosedure 'n 92% effektiewe isolering van organiese suur verkry kan word.

### 3.2.4 Samevattende gevolgtrekkings

#### 1. Interpretasie van die data:

Die profiele verkry met die anioonuitruilingsekstrasieprosedure is van so 'n komplekse aard dat interpretasie, sonder om van 'n gekoppelde massaspektrometer gebruik te maak, bykans onmoontlik is. Steurende komponente in die ekstrak soos sulfate en fosfate beïnvloed belangrike dele van die profiel en dra by om die interpreteerbaarheid te bemoeilik. Bariumpresipitering is geskik vir die verwydering van hierdie komponente maar lei dan weer tot ewe ongewenste nuwe-effekte. In teenstelling hiermee word met die vloeistof-vloeistofekstrasie eenvoudige profiele verkry wat interpreteerbaar is sonder om van 'n gekoppelde massaspektrometer gebruik te maak. Ureum wat in die ekstrak teenwoordig is, bemoeilik nie die interpretasie van die data betekenisvol nie.

Daar is gevind dat met die anioonuitruilingsekstraksieprosedure 'n effektiewe ekstraksiemetode vir 'n baie groot hoeveelheid organiese sure (behalwe hippuursuur) is. Hierdie metode het definitiewe kwantitatiewe voordele bo die vloeistof-vloeistofekstraksieprosedure. Dit is bekend dat met laasgenoemde ekstraksieprosedure 'n effektiewer isolering van die aromatiese sure verkry word as van die nie-aromatiese organiese sure. Hierdie diskriminerende effek is egter nie sodanig dat die nie-aromatiese sure onidentifiseerbaar is nie.

Verskille tussen normale kontroles en profiele wat op 'n organiesesuururie dui, is met hierdie metode voor die handliggend, terwyl dit met die anioonuitruilings-ekstraksieprosedure moeilik aantoonbaar is.

2. Hoeveelheid tyd en eksperimentele werk deur die metodes benodig

Bo en behalwe genoemde voor- en nadele is anioonuitruilingsekstraksie 'n komplekse en moeilik uitvoerbare prosedure. Hierdie ekstraksietegniek het 'n lang monstervoorbereidingstyd. Dit is dus moeilik om bepalinge op 'n groot skaal uit te voer. In teenstelling hiermee is die vloeistof-vloeistofekstraksieprosedure tegnies maklik uitvoerbaar en het ook 'n kort monstervoorbereidingstyd.

3. Geskiktheid van die metode as 'n siftingstoets vir organiesesuururie

Uitgaande van die gevolgtrekkings genoem onder (1) en (2) is dit duidelik dat die vloeistof-vloeistofekstrak-

sieprosedure die aangewese metode is vir die sifting van urine met die doel om organiese sure op te spoor. Hierdie prosedure is vervolgens as siftingstoets aangewend. Aanvullend hierby is die metode ook toegepas in gevalle waar metaboliese defekte met behulp van kliniese analises of ander siftingstegnieke geïdentifiseer is.

### 3.3 Literatuurverwysings

1. THOMPSON, J.A. & MARKEY, S.P. (1975). Anal. Chem. No. 8 47:1313.
2. HAMMOND, K.B. & GOODMAN, S.I. (1970). Clin. Chem. No. 3 16:212.
3. JELLUM, E. (1977). J. of Chromatography. 143:427.
4. JAAKONMAKI, P.I., KNOX, K.L., HORNING, E.C. & HORNING, M.G. (1967). Eur. J. of Pharm. 1:63.
5. ZLATKIS, A. & KIM, K. (1976). J. of Chromatogr. 126:475.
6. HORNING, E.C. & HORNING, M.G. (1971). Clin. Chem. No. 8. 17:802.
7. NAKAMURA, E., ROSENBERG, L.E. & TANAKA, K. (1976). Clin. Chim. Acta 68:127.
8. HORROCKS, D.H., HINDLE, E.J., LAWSON, A.P., ORRELL, D.H. & POOLE, A.J. (1976). Clin. Chim. Acta 69:93.
9. CHALMERS, R.A. & WATTS, R.W.E. (1972). Analyst 97:224.
10. LAWSON, A.M., CHALMERS, R.A. & WATTS, R.W.E. (1976). Clin. Chem. 22/8:1283.
11. THOMPSON, J.A. (1977). Clin. Chem. No. 5. 23:901.
12. STOKKE, O., GOODMAN, S.I., THOMPSON, J.A. & MILES, B.S. (1975). Biochem. Med. 12:386.
13. WILLIAMS, V.P., CHING, D.K. & CEDERBAUM, S.D. (1979). Clin. Chem. No. 10 25:1814.
14. TANAKA, K., BUDD, M.A., EFRON, M.L. & ISSELBACHER, K.J. (1966). Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 56:236.
15. GOMPERTZ, D. & DRAFFAN, G.D. (1972). Clin. Chim. Acta 40:5.
16. TYLER, J.E. & DIBDIN, G.H. (1975). J. Chromatogr. 105:71.

17. CHALMERS, R.A. & WATTS, R.W.E. (1972). Analyst 97:951.
18. PIERCE, A.E. (1968). A Technique for gas-phase analysis. Silylation of organic compounds. Pierce Chemical Company Rockford Illinois.
19. CHALMERS, R.A. & WATTS, R.W.E. (1972). Analyst 97:958.
20. SOMMER, L.H. (1965). Stereochemistry. Mechanism and Silicon. McGraw Hill. New York.
21. KODAK LABORATORY CHEMICALS CATALOG 51. Eastman Kodak Company. Rochester New York.
22. JELLUM, E., STOKKE, O. & ELDJAM, L. (1972). Clin. Chem. 18:800.
23. GREGERSON, N., LAUTITZEN, R. & RASMUSSEN, K. (1976). Clin. Chim. Acta 70:417.
24. GAN, I., KATH, J. & HALPEN, B. (1974). J. Chromatogr. 92:435.
25. ETTRÉ, L.S. (1975). J. Chromatogr. 112:1.
26. MIKES, O. (1979). Laboratory handbook of chromatographic and allied methods. Chap. 9. pp.527. John Wiley & Sons.
27. VENTER, E. (1966). M.Sc.-verhandeling. PU vir CHO. Die Gaschromatografiese skeiding van aminosure.
28. HAARHOF, P.C. (1960). M.Sc.-verhandeling. PU vir CHO. Die teorie van gas-vloeistofchromatografie.
29. MORGAN, S.L. & DEMING, S.N. (1975). J. Chromatogr. 112:267.
30. KUKSIS, A. & VISHWAKARMA, P. (1963). Can. J. of Biochem and Phys. 41:2353.
31. HEALY, M.J.R., CHALMERS, R.A. & WATTS, R.W.E. (1973). J. of Chromatogr. 87:365.
32. SMITH, D.H., ACHENBACH, M. Anal. Chem. No. 11. 49:1623.

33. SMITH, D.H., YEAGER, W.J. & RINDFLEISCH, T.C. (1978).  
Anal. Chem. No. 11 50:1585.
34. JELLUM, E., STØRSETH, P. J. Chromatogr. 126:487.
35. SWEeley, C.C., YOUNG, N.D., HOLLAND, J.F. & GATES, S.C.  
(1974). J. Chromatogr. 99:507.
36. JELLUM, E., STOKKE, O. & ELDJAM, L. (1971). Scand. J. of  
Clin. Lab. invest. 27:273.
37. LEWIS, M., KENYON, C.N., MEILI, J. & BURLINGAME, A.L.  
(1979). Anal. Chem. No. 8. 51:1275.
38. THOMAS, G.H. & GOODMAN, S.I. (1981). Handleiding vir  
die opspoor van organiese suur-defekte.

### ORGANIESESUURURIEPATRONE ONDER 'N VERSKEIDENHEID TOESTANDE

#### 4.1 Tipiese normale patrone en faktore wat dit beïnvloed

##### 4.1.1 Normale patrone

Metaboliese siektes waarin organiesesuururie as een van die simptome voorkom, word hedendaags gereeld opgespoor en geïdentifiseer. Die analise van hierdie organiese sure is belangrik vir 'n vroegtydige diagnose, en vir 'n diepgaande studie van die siektetoestand wat hiermee geassosieer is. Vir sodanige studies is betroubare data ten opsigte van die urinêre uitskeiding van organiese suurmetsoliete by normale persone noodsaaklik. Dit kan dan 'n basis vorm waarvolgens abnormale uitskeidingspatrone geïdentifiseer kan word.

Volgens die prosedure van Goodman en Thomas (hoofstuk 3.2.3) word 'n normale patroon gedefinieer as een waarin geen metabolisme in 'n hoër konsentrasie as die interne standaard (maloon=suur) voorkom nie (figuur 4.1). Die interne standaard se konsentrasie word volgens die prosedure van tabel 3.1 (hoofstuk 3.2.3.4) konstant gehou in die finale gesilaneerde ekstrak, onafhanklik van die kreatinienwaarde. By die samestelling van die finale gesilaneerde ekstrak is die kreatinienwaarde reeds in berekening gebring. Vir makliker interpretasie van die data word die registreerder sodanig ingestel dat die piekhoogte van die interne standaard ongeveer 66% van die totale papierwydte beslaan. Enige piek wat dus 'n hoër

uitwyking as die interne standaard vertoon, word as abnormaal geïdentifiseer. Indien daar een of meer abnormale pieke in 'n patroon voorkom, word dit ter vereenvoudiging 'n abnormale profiel genoem.

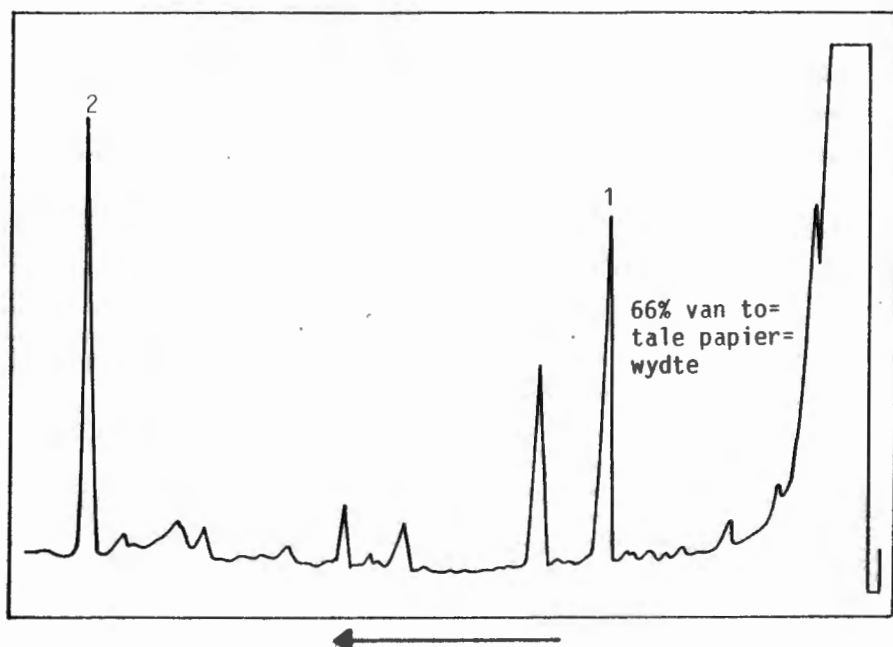
Om 'n gedetailleerde opname van die normale variasie in die uitskeiding van organiese sure in 'n normale heterogene bevolking te bepaal, val buite die doelstelling van hierdie verhandeling. Daar is egter gepoog om te bepaal of daar

- i) 'n individuele variasie in die organiese suurprofiel van 'n bepaalde normale persoon\* is, en
- ii) of daar 'n variasie in organiese suuruitskeiding tussen verskillende normale persone\* is.

Die herhaalbaarheid van 'n resultaat soos in figuur 4.2 (A-F) aangedui, kan benewens die vasstelling van die mate van individuele variasie, ook 'n aanduiding gee van hoedanig die ekstraksieprosedure gestandaardiseer is.

---

\*'n "Normale persoon" word hier gedefinieer as 'n persoon wat sonder enige vooroordele uit 'n heterogene bevolking gekies is, maar waarvan daar beslis geen aanduidings van 'n metabolismiese defek aanwesig was nie, en wat verder op 'n dieet volgens vry lewende kriteria was.

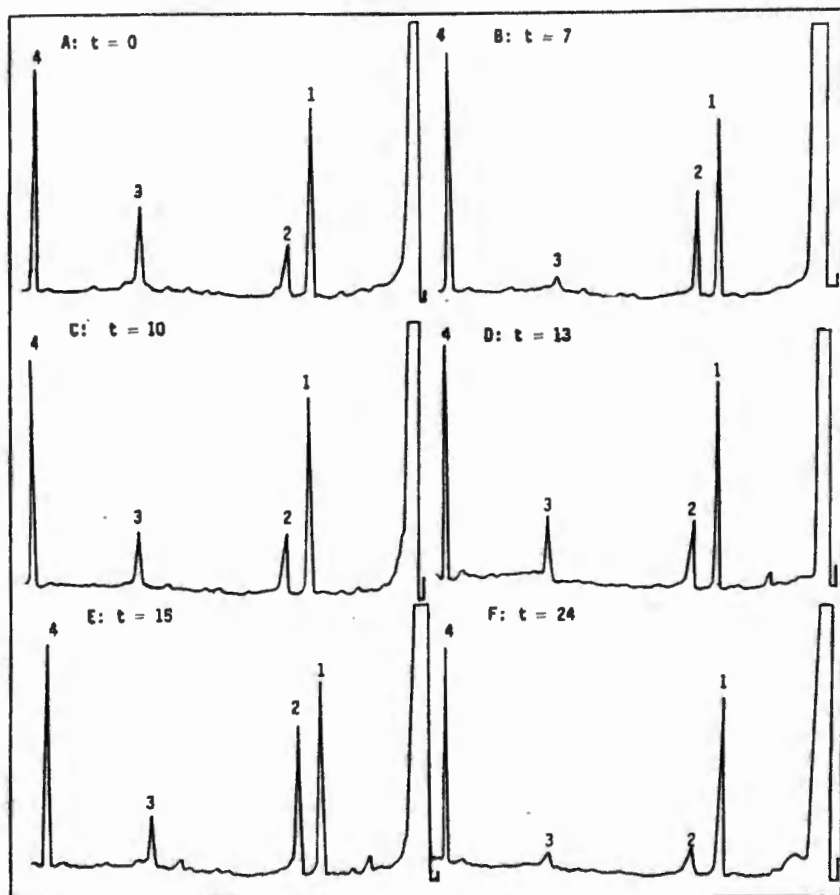


FIGUUR 4.1    'n Tipiese normale profiel van organiese sure  
soos verkry vanaf 'n normale kontrolepersoon

1. Maloonsuur (interne standaard)
2. n-Tetrakosaan (eksterne standaard)

'n Normale persoon se totale urienuitskeiding is oor 'n tydperk van 24 uur geanaliseer (figuur 4.2 A-F). Uit die algemene patroon van die profile kan die herhaalbaarheid daarvan duidelik waargeneem word.

'n Variasie in die mate van sitroensuur- en ureumuitskeiding was die opvallendste waarneming. Hierdie variasie was egter deurgaans binne die gestelde normale grense. Hierdie waarneming is in ooreenstemming met resultate soos verkry deur Chalmers<sup>1</sup> et al. wat 'n uitgebreide studie onderneem het om



FIGUUR 4.2 Individuele variatie van organiese suuruitskeiding deur 'n normale persoon oor 'n 24 uur tydperk

1. Maloonsuur (interne standaard)
2. Ureum
3. Sitroensuur
4. n-Tetrakosaan

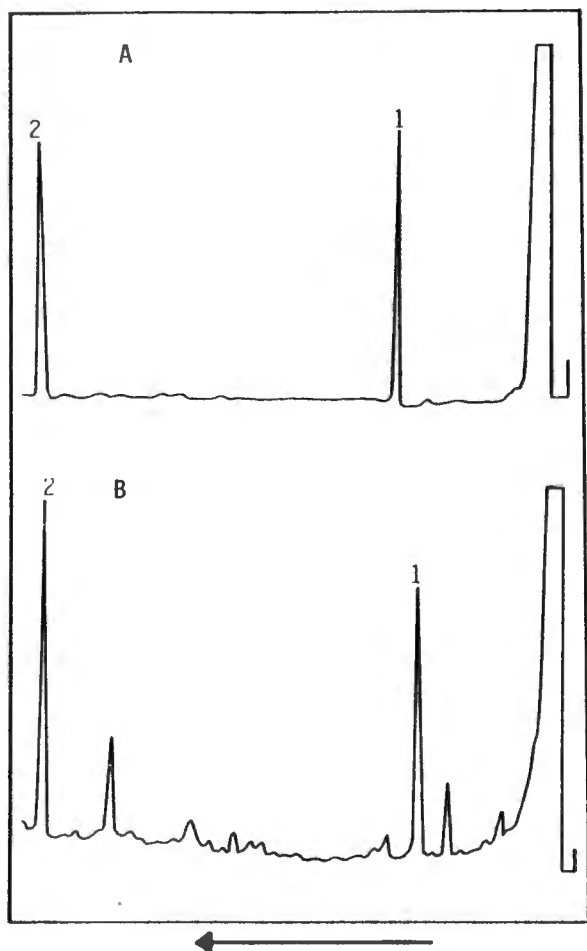
die organiese suuruitskeiding deur normale persone in 'n heterogene samelewing te bepaal.

Vir 'n meer algemene beeld ten opsigte van individuele variasie moet van baie groot kontrolegroepe gebruik gemaak word, wat hier nie die geval was nie. Dit blyk egter uit die literatuur sowel as uit eksperimentele gegewens dat daar 'n goeie individuele herhaalbaarheid van resultate is, en daar nie 'n groot variasie ten opsigte van organiese sure is wat deur 'n bepaalde normale persoon uitgeskei word nie.

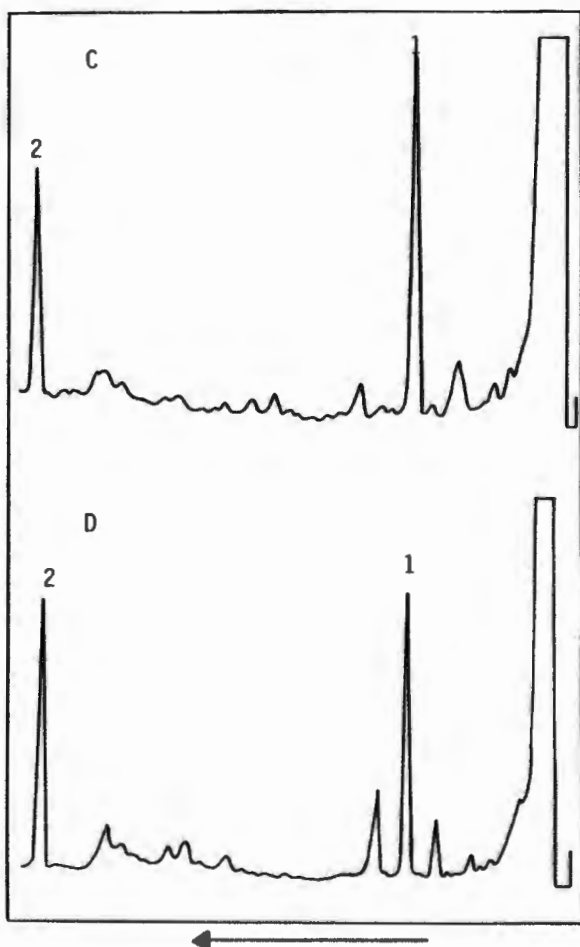
Dit moet egter beklemtoon word dat waar met pasiënte wat vermoedelik aan organiesesuururie ly, gewerk word en 'n abnormale resultaat verkry word, die metings 'n aantal kere herhaal moet word (kyk hoofstuk 4.2).

'n Groot verskeidenheid normale persone se urine is geanaliseer alvorens vermeende gevalle van organiesesuururie (kyk hoofstuk 4.3) nagegaan is. Die normale persone is uit 'n heterogene bevolking gekies. Die keuse is gedoen sonder die inagneming van ras, geslag of spesifieke dieet. 'n Groot variasie ten opsigte van bepaalde sure wat uitgeskei word, is gevind. Slegs 4 patrone van hierdie groep word hierby ingesluit (figuur 4.3 A-D) om as voorbeeld te dien.

Die hoeveelhede van die sure het egter altyd tussen die normale grense gevarieer. By geen normale persoon is enige organiese suur gevind wat 'n hoër respons as die interne standaard (malloonsuur), onder die gestelde kondisies gegee het nie. Hierdie variasie in katabolietuitskeiding kan aan 'n wye aantal faktore toegeskryf word, onder andere<sup>2</sup>



FIGUUR 4.3 A + B Variasie in organiese suur=  
uitskeiding by normale kontrole  
persone  
1. Maloonsuur (interne standaard)  
2. n-Tetrakosaan (eksterne stan=  
daard)



FIGUUR 4.3 C + D Variasie in organiese  
suuruitskeiding by normale  
kontrole persone  
1. Maloonsuur (interne standaard)  
2. n-Tetrakosaan (eksterne stan-  
daard)

- i) dié effek van variasie in die onderskeie dieetsamestellings
- ii) individuele metabolismiese variasies wat die renale effekte en die metabolismiese effek van individuele endogene intestinale bakterieë insluit.

Variasie in dieetsamestelling kan 'n groot bydrae lewer tot variasie in 'n bepaalde normale persoon en die variasie tussen verskillende normale persone se katabolietuitskeiding. Resultate van 'n studie soos onderneem deur Chalmers *et al.*<sup>2</sup> (Tabel 4.1) illustreer hierdie dieetinvloed.

Bogenoemde outeurs<sup>2</sup> se gevolgtrekking na aanleiding van hierdie uitgebreide studie word in die onderstaande aanhaling uit hulle artikel weergegee.

*"The quantitative values and the qualitative patterns of excretion of the urinary acidic metabolites by all subjects studied here while receiving unrestricted diets were within the ranges for and similar to the patterns observed in specimens from a normal population selected without conscious bias. Evidently, the subjects studied may be considered to be representative of the general normal population. The coefficients of variation observed for the excretion of the major and consistently-excreted metabolites were large for all the subjects studied and illustrate the wide range of values that can occur simply as a result of within-subject variation. This supports results of studies on certain urinary acidic metabolites reported by Young and by Witten *et al* and indicates the extent to which the excretion of the metabolites studied here must alter for them to be considered as abnormal or characteristic of an inherited metabolic disease".*

TABEL 4.1: Die urinêre uitskeiding van suurmataboliete deur pasiënt 1 tydens (a) 'n onbepaalde diëet; (b) 'n lae koolhidraatdiëet; (c) 'n sintetiese (chemies saamgestelde) diëet en pasiënt 2 tydens diëte (a) en (b). Uitgedruk in mmol RPA per 24 uur. (RPA = Piekarea relatief tot n-tetrakosaan die interne standaard)

| Suurmataboliete              | Uitskeiding pasiënt 1 |                       |       | Uitskeiding pasiënt 2               |                  |                       |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|-------|-------------------------------------|------------------|-----------------------|
|                              | Onbepaalde diëet      | Lae koolhidraat diëet |       | Sintetiese diëet<br>Hoë koolhidraat | Onbepaalde diëet | Lae koolhidraat diëet |
|                              |                       | Day 4                 | Day 5 |                                     |                  |                       |
| Melksuur                     | 0,20                  | 0,07                  | 0,0   | 0,69                                | 0,0              | 0,0                   |
| Oksaalsuur                   | 0,15                  | 0,27                  | 0,18  | 0,0                                 | 0,04             | 0,32                  |
| Sulfaat                      | 5,32                  | 16,62                 | 15,02 | 10,18                               | 8,55             | 24,01                 |
| 2-hidroksibottersuur         | 0,0                   | 0,0                   | 0,0   | 0,0                                 | 0,0              | 0,11                  |
| 3-hidroksibottersuur         | 0,01                  | 0,15                  | 0,09  | 0,0                                 | 0,01             | 2,97                  |
| Bensoësuur                   | 0,04                  | 0,06                  | 0,09  | 0,01                                | 0,01             | 0,10                  |
| Fosfaat                      | 36,67                 | 28,20                 | 23,55 | 19,04                               | 25,53            | 26,19                 |
| Suksiensuur                  | 0,02                  | 0,0                   | 0,0   | 0,0                                 | 0,05             | 0,0                   |
| 4-deoksitetransuur           | 0,24                  | 1,35                  | 1,36  | 0,72                                | 0,31             | 1,19                  |
| 3-deoksitetransuur           | 0,07                  | 0,04                  | 0,05  | 0,12                                | 0,08             | 0,02                  |
| 2-deoksitetransuur           | 0,11                  | 0,31                  | 0,31  | 2,61                                | 0,14             | 0,20                  |
| Eritransuur en Treonien-suur | 0,56                  | 0,67                  | 0,71  | 1,35                                | 0,41             | 0,50                  |
| 2-okso-glutaarsuur           | 0,01                  | 0,03                  | 0,04  | 0,0                                 | 0,03             | 0,09                  |
| 4-hidroksifenil-asynsuur     | 0,14                  | 0,30                  | 0,16  | 0,28                                | 0,16             | 0,04                  |
| Dynsteensuur                 | 0,50                  | 0,0                   | 0,0   | 0,0                                 | 1,21             | 0,0                   |
| 2-deoksipentonsuur           | 0,39                  | 0,28                  | 0,27  | 0,77                                | 0,12             | 0,16                  |
| Akoniet-suur                 | 0,21                  | 0,38                  | 0,39  | 0,08                                | 0,27             | 0,29                  |
| Hippuursuur                  | 1,66                  | 1,51                  | 1,38  | 0,11                                | 3,30             | 0,95                  |
| Sitroensuur                  | 2,05                  | 0,84                  | 0,70  | 0,97                                | 2,89             | 0,51                  |
| Glukonlaktoon                | 0,26                  | 0,29                  | 0,31  | 0,50                                | 0,37             | 0,30                  |
| Glukuron-suur                | 0,01                  | 0,19                  | 0,20  | 0,05                                | 0,18             | 0,22                  |
| Glutaarsuur                  | 0,11                  | 0,08                  | 0,12  | 0,21                                | 0,08             | 0,06                  |
| Uriensuur                    | 0,51                  | 0,64                  | 0,66  | 0,0                                 | 2,45             | 1,08                  |

#### 4.1.2 Geneesmiddels

Die katabolisme van 'n wye verskeidenheid geneesmiddels dra by tot die aanvanklike abnormaal hoë uitskeiding van sekere organiese suurmetailiete wat, by normale persone, sowel as by pasiënte verkry kan word.

In die literatuur is die invloed van katesjolanienmetaboliete<sup>3</sup>, afbraakprodukte van etanol<sup>4</sup>, en die tekort aan tiramien en oktopamien<sup>5</sup> op organiese suuruitskeiding al bepaal.

Weens die groot verskeidenheid geneesmiddels wat in gebruik is, is daar geselekteer, en is daar slegs na sekere geneesmiddels waarmee daar dikwels deur die loop van hierdie studie te doen gekry is, se invloed op die organiese suuranalise gekyk.

Daar is bepaal wat die invloed is van

- i) Aspirien- 'n algemene, maklik bekombare geneesmiddel.  
Hierdie geneesmiddel se metaboliete is gedurig in die gaschromatografiese profiele gevind (kyk hoofstuk 4.2.4.4.  
In tabel 4.2 word 'n aantal van hierdie metaboliete van salisielsuur voorgestel, en
- ii) Sedeermiddels soos Mellaril en Largactil wat algemeen in sentrums vir geestelik vertraagde pasiënte voorgeskryf word.

##### 4.1.2.1 Aspirien (Asetielsalisilaat)

Aspirien is 'n derivaat van salisielsuur of 2-hidroksibensoësuur. Hierdie geneesmiddel behoort tot die groep van salisilate wat hulle onderskeie effekte uitoefen na aanleiding van hulle

TABEL 4.2 Die Metaboliete van Salisielsuur

BASIESE STRUKTUUT VAN SALISILATEMetaboliet:Plaasvervangende groepe in die Metaboliete van Salisielsuur

|                   | R                   | R <sub>2</sub>      |
|-------------------|---------------------|---------------------|
| Salisielsuur      | -COOH               | -OH                 |
| Natriumsalisilaat | -COONa              | -OH                 |
| Metielsalisilaat  | -COOCH <sub>3</sub> | -OH                 |
| Aspirien          | -COOH               | -OCOCH <sub>3</sub> |
| Salisielamied*    | -CONH <sub>2</sub>  | -OH                 |

\*Hierdie metaboliet is nie streng gesproke 'n salisilaat nie maar word volledigheidshalwe hierby ingesluit

salisielsuurinhoud. Die salisilate word meestal gebruik as pynonderdrukkers weens hulle selektiewe depressiewe effek op die sentrale senuweesisteem.

Hierdie geneesmiddel het egter 'n wye spektrum ander effekte<sup>6</sup> onder andere

- i) antipiretiese werking verlaag die liggaamstemperatuur
- ii) analgesiese werking - pynonderdrukking
- iii) antireumatische werking - inflamatoriese onderdrukking
- iv) effek op die elektrolietbalans
- v) 'n verskeidenheid metaboliese effekte.

Hierdie effekte is egter nie van belang in hierdie studie nie.

#### 4.1.2.1.1 Metaboliese afbraak van salisielsuurmetaboliete

Die metaboliese afbraak van salisilate vind in 'n verskeidenheid weefsels plaas, maar veral in die mikrosomale sisteem<sup>7</sup>.

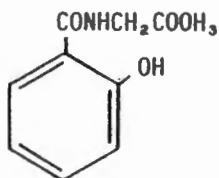
Die drie hoof metaboliese afbraakprodukte van die salisilate is salisieluriensuur (2-hidroksihippuursuur), die eter of fenoliese glukuroniede en die ester of asielglukuroniede.

'n Baie klein hoeveelheid van die salisilate word ook geoksideer tot 2,5 dihidroksibensoësuur, 2,3 dihidroksibensoësuur en 2,3,5-trihidroksibensoësuur.

Volgens Finnie *et al.*<sup>8</sup> is o-hidroksihippuursuur (2-hidroksihippuursuur) die hoofmetaboliet van salisielsuur en aspirien wat in die urine uitgeskei word.

Aspirien is aan 'n normale persoon toegedien in tablette wat elk 300mg aspirien bevat. Drie tablette is 4-uurliks geneem vir 12 uur lank. Die organiese sure is daarna uit die urine geëkstraheer en gaschromatografies gefraksioneer (figuur 4.4).

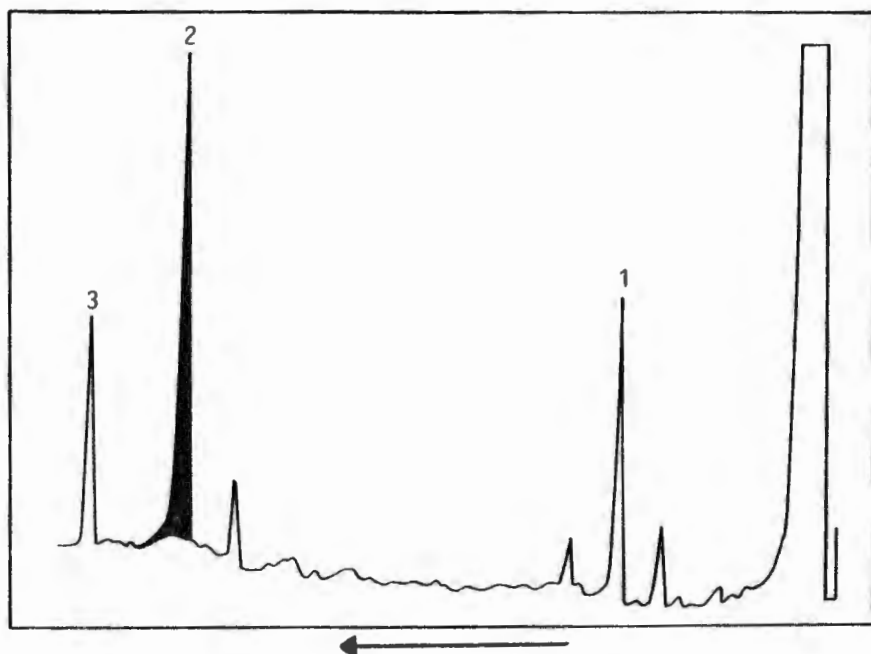
'n Abnormale hoë piek met 'n metileeneenheidwaarde (M.E.) van 21,5 is in die profiel gevind. Hierdie metileeneenheidwaarde word vereenselwig met 2-hidroksihippuursuur.



2-hidroksihippuursuur

Die strukturele verwantskap van hierdie metaboliet met salisieluur is duidelik sigbaar. 'n Aantal ander pieke (metaboliete) is ook in die patroon waargeneem. Hierdie metaboliete is egter in baie lae konsentrasies aanwesig. Hulle teenwoordigheid kan moontlik toegeskryf word aan ander kataboliete van aspirien.

Weens die groot invloed van salisilate op die organiese suurprofiel van normale persone sowel as pasiënte (kyk hoofstuk 4.2.4.4.3), moet die nodige versigtigheid aan die dag gelê word om nie die teenwoordigheid van hierdie kataboliete met werklike abnormale profiele te verwar nie.



FIGUUR 4.4: Profiel van 'n normale persoon na asetielsalisi= laat (aspirien) belading

1. Maloonsuur (interne standaard)
2. 2-hidroksihippuursuur
3. n-Tetrakosaan (eksterne standaard)

#### 4.1.2.2 Die fenotiasienkalmeermiddels

Alhoewel fenotiasien en sommige van sy derivate al vir dekades lank bekend is, is die gebruik daarvan in menslike geneesmiddels beperk tot die afgelope 12 jaar.

Die suksesvolle bekendstelling van prometasiene, 'n gesubstitueerde fenotiasien, as 'n middel met 'n antihistamienwerking, met kalmerende eienskappe en min toksiese effekte, het die ontwikkeling van 'n wye verskeidenheid derivate tot gevolg gehad.

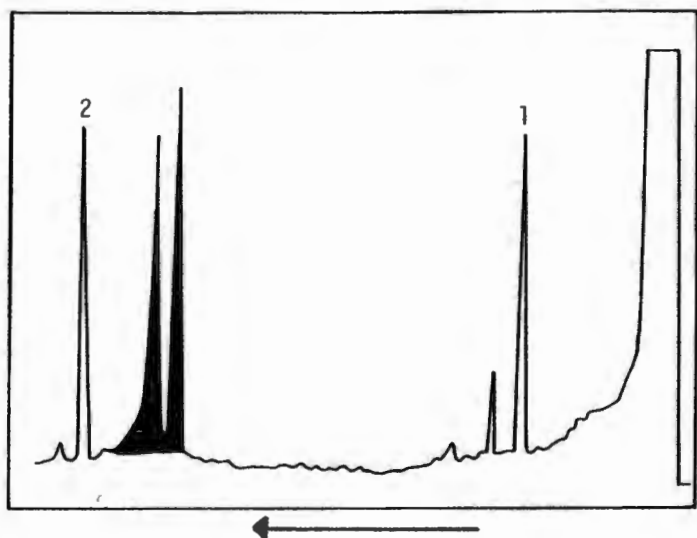
Na die sintese van chloropromasiene in 1950 is 'n wye spektra van gesubstitueerde fenotiasiene in kliniese terapie begin gebruik. Ongeveer 30 van hierdie derivate is tans beskikbaar vir menslike gebruik (Tabel 4.3).

Die gesubstitueerde fenotiasiene word geklassifiseer volgens hulle chemiese struktuur. Dit word gebaseer op substitusie in posisie 10 van die fenotiasienring waarby die tersiêre stikstof betrokke is. Addisionele subklassifikasies sluit die substitusie van verskeie groepe in posisie 2 in.

Die gesubstitueerde fenotiasiene het 'n ingewikkelde farmakologiese werking. Dit affekteer 'n groot verskeidenheid meganismes in die liggaam. In sentra vir verstandelik vertraagde pasiënte word dit meestal gebruik om emosionele kalmte en geestelike verslapping teweeg te bring. Dit word verder ook met groot welslae gebruik in die simptomatiese beheer van akute en kroniese versteurde psigotiese pasiënte.<sup>9</sup>

|  |                         |                                                                                                                                                        |                                |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| Subgroep                                                                          | Handelsnaam             |                                                                                                                                                        |                                |
| <b>A. Propiëldimetiëlamino</b>                                                    |                         |                                                                                                                                                        |                                |
| Promasien                                                                         | Sparine                 | $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3)_2$                                                                                                 | H                              |
| Trimeprasien                                                                      | Temaril                 | $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-N(CH}_3)_2$<br>$\text{CH}_2$                                                                                         | H                              |
| Metotrimprasien                                                                   | Neozine<br>Veractil     | $\text{CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{-N(CH}_3)_2$<br>$\text{CH}_2$                                                                                         | $\text{OCH}_3$                 |
| Asetiëlpromasien                                                                  | Notensil                | $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3)_2$                                                                                                 | $\text{CO-CH}_3$               |
| Metoksipromasien                                                                  | Tentone                 | $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3)_2$                                                                                                 | $\text{OCH}_3$                 |
| Chloorpromasien                                                                   | Thorazine/<br>Largactil | $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3)_2$                                                                                                 | Cl                             |
| Trifluorpromasien                                                                 | Vesprin                 | $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_3)_2$                                                                                                 | $\text{CF}_3$                  |
| <b>B. Propiëlpiperasien</b>                                                       |                         |                                                                                                                                                        |                                |
| Prochloorperasien                                                                 | Compazine               | $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{N-CH}_3$                              | Cl                             |
| Triëtiëlperasien                                                                  | Torecan                 | $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{N-CH}_3$                              | $\text{S-CH}_2\text{-CH}_3$    |
| Trifluorperasien                                                                  | Stelazine               | $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{N-CH}_3$                              | $\text{CF}_3$                  |
| Tioperasien                                                                       | Vontil                  | $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{N-CH}_3$                              | $\text{SO}_2\text{-N(CH}_3)_2$ |
| Asetofenasien                                                                     | Tindal                  | $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$         | $\text{CO-CH}_3$               |
| Karfenasien                                                                       | Proketazine             | $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$         | $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_3$   |
| Perfenasien                                                                       | Trilafon                | $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$         | Cl                             |
| Tiopropasaat                                                                      | Dartal                  | $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CO-CH}_3$ | Cl                             |
| Plufenasien                                                                       | Permitil<br>Prolixin    | $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$         | $\text{CF}_3$                  |
| <b>C. Metiëlpiperidieel</b>                                                       |                         |                                                                                                                                                        |                                |
| Mepasien                                                                          | Pacatal                 | $\text{CH}_2\text{-} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{N} \\   \\ \text{---} \end{array}$                                                     | H                              |
| <b>D. Etiëlpiperidieel</b>                                                        |                         |                                                                                                                                                        |                                |
| Tioridasien                                                                       | Mellaril                | $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-} \begin{array}{c} \text{---} \\   \\ \text{N} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$                                         | $\text{SCH}_3$                 |
| <b>E. Propiëlpiperidieel</b>                                                      |                         |                                                                                                                                                        |                                |
| Pipamasien                                                                        | Mornidine               | $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{CO-NH}_2$                              | Cl                             |
| <b>F. Metiëlpiperidieel</b>                                                       |                         |                                                                                                                                                        |                                |
| Metdilasion                                                                       | Tacaryl                 | $\text{CH}_2\text{-} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{N-CH}_3$                                                       | H                              |
| <b>G. Etiëldimetiëlamino</b>                                                      |                         |                                                                                                                                                        |                                |
| Chloorpromasien                                                                   | Chlorphen-<br>ergan     | $\text{CH}_2\text{-CH-N(CH}_3)_2$<br>$\text{CH}_3$                                                                                                     | Cl                             |
| Propiomasien                                                                      | Largon                  | $\text{CH}_2\text{-CH-N(CH}_3)_2$<br>$\text{CH}_3$                                                                                                     | $\text{CO-CH}_2\text{-CH}_3$   |
| Prometasien                                                                       | Phenergan               | $\text{CH}_2\text{-CH-N(CH}_3)_2$<br>$\text{CH}_3$                                                                                                     | H                              |
| <b>H. Etiëldiëtiëlamino</b>                                                       |                         |                                                                                                                                                        |                                |
| Dietasien                                                                         | Diparcol                | $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N(CH}_2\text{-CH}_3)_2$                                                                                                 | H                              |
| Ethapropasien                                                                     | Parsidol                | $\text{CH}_2\text{-CH-N(CH}_2\text{-CH}_3)_2$                                                                                                          | H                              |
| <b>I. Etiëlpiperidieel</b>                                                        |                         |                                                                                                                                                        |                                |
| Piratasien                                                                        | Pyrrolazote             | $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N} \begin{array}{c} \diagup \diagdown \\ \text{---} \end{array}$                                                        | H                              |

Tabel 4.3: Substituent groepen in die metabolieten van Fenothiazien



FIGUUR: 4.5: Effect van chloropromasien op die gas=chromatografiese analyse van organie=sesuururie

1. Maloonsuur (interne standaard)
2. n-Tetrakosaan (eksterne standaard)

Weens die dramatiese effek en die moontlike nadelige gevolge wat dit vir gesensitiseerde persone kan inhou,<sup>10</sup> kan hierdie groep van geneesmiddels nie aan kontrolepersone toegedien word nie. As 'n alternatief is die urine van 'n pasiënt wat op 'n chroniese behandeling van hierdie medikament is, gebruik gemaak (Figuur 4.5). Twee abnormale pieke het in die patroon voorgekom. Hierdie pieke kan nie volgens die sisteem van metileeneenheidwaardes geïdentifiseer word nie. Dit is egter duidelik dat die inname van bogenoemde medikamente 'n invloed uitoefen op die gaschromatografiese patroon.

Dit beklemtoon die belangrikheid van herhaling van analyses, veral waar met pasiënte gewerk word wat in 'n sentrum vir geestelik vertraagdes opgeneem is. By die herhaling van analyses van abnormales moet daar veral gelet word op die medikamente wat deur die pasiënt ingeneem word. Verkieklik moet die pasiënte vooraf vir 'n tyd, medikasie inname staak alvorens die organiese suuranalise uitgevoer word. Dit is egter nie altyd moontlik nie.

#### 4.1.3 Ouderdom

Alm et al.<sup>11</sup> het die organiese suuruitskeiding by normale babas tussen die ouderdomme van 2 dae tot 5 dae gemonitor.

Hulle vind aansienlike verskille in organiese suurkonsentrasies tussen die ouderdomsgroepe. 'n Groep van 4 sure naamlik fumarisuur, 3-hidroksi-3-metielglutaarsuur, adipiensuur en suberiensuur is in 'n hoër konsentrasie by die 2 dae-oue ouderdomsgroep teenwoordig as by die 5 dae-oue ouderdomsgroep. Hierdie waarneming word deur Alm et al. verklaar as òf 'n verandering in die renale hantering van organiese sure, òf 'n metaboliese

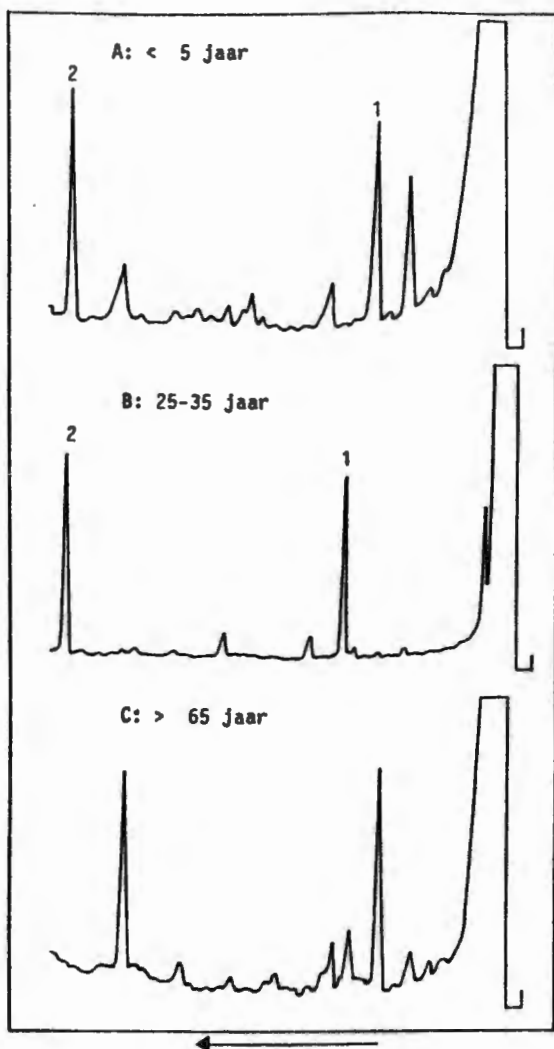
verandering wat met 'n dieetverandering gepaardgaan. Hierdie bevindings word deur verskeie ander outeurs gestaaf.

Die huidige model vir hierdie verandering van organiese suur= uitskeiding in die vroeë prenatale periode word in verband gebring met die vetverbruikende hiperketoniese toestand gedurende die eerste lewensdae.

Aangesien urine van pasgebore babas plaaslik moeilik bekombaar is, is normale persone uit die ouderdomsgroepe jonger as vyf jaar, ouer as sestig jaar en tussen vyf-en-twintig tot vyf-en-dertig jaar geneem om hierdie verandering in die uitskeidingspatroon van organiese sure waar te neem (figuur 4.6 A-C).

Geen konsekwente verskille ten opsigte van die uitskeiding van suurmataboliete kon tussen hierdie normale persone waar= geneem word nie. Daar was egter 'n neiging na 'n hoër konsen= trasie uitskeiding by die jonger (figuur 4.6 A) en ouer ouder= domsgroepe (figuur 4.6 C).

Soortgelyke resultate is deur Lawson *et al.*<sup>12</sup> en Chalmers *et al.*<sup>2</sup> in 'n normale populasie tussen bogenoemde ouderdomsgroepe gevind.



FIGUUR 4.6 Organiese suuruitskeiding deur normale kontrole persone tussen gestelde ouderdomsgrense  
 1. Maloonsuur (interne standaard)  
 2. n-Tetrakosaan (eksterne standaard) 93

## 4.2 Organiesesuururie geassosieerd met verstandelike vertraging

### 4.2.1 Inleidend

Die aangebore metaboliese defekte is 'n groep van individuele, seldsame, biochemiese abnormaliteite waarvan sommige tot ernstige kliniese manifestasies lei. Hierdie defekte is van groot belang vir biochemici, genetici en medici vir wie dit bepaalde diagnostiese en terapeutiese probleme skep.

Die studie van aangebore metaboliese defekte het verder ook groot betekenis en implikasies vir genetiese raadgewing en gepaardgaande voorgeboortelike diagnoses. Al meer metaboliese defekte is in die jongste jare opgespoor, terwyl ander steeds wag om gediagnoseer te word. Slegs 'n klein aantal van hierdie defekte kan tans effektief behandel word, maar die bewustheid dat vroeë diagnose noodsaaklik is om goeie resultate te behaal, het opnuut belangstelling in hierdie tipe siektetoestande gewek.

### 4.2.2 Die begrip sifting ("Screening")

Die begrip sifting in kliniese biochemie impliseer die opspoor van families en/of individue in 'n bepaalde groep, wat volgens vooraf opgestelde kriteria, as abnormaal ten opsigte van sekere biochemiese karakteristieke gediagnoseer word. Die bepaalde groep waarin die siftingsprogram geloods word, kan die totale bevolking of 'n gedeelte van die bevolking wees, byvoorbeeld pasgeborenes, of 'n bepaalde hoë risikogroep, byvoorbeeld geestelik vertraagdes.

Die keuse van 'n bepaalde groep word veral bepaal deur faktore soos die voorkoms en die aard van die siektetoestand. Die siftingstoetse dien as kriteria waarvolgens individue op biochemiese gronde as normaal of abnormaal geklassifiseer word. Die siftingstoetse is diagnostiese prosedures wat aangewend word sonder enige spesifieke kliniese aanduiding van die individue wat getoets word.

As teikengroep vir die siftingsprogram wat vir hierdie studie gebruik is, is leerlinge van spesiale skole sowel as inwoners van sorg- en reabilitasiesentra geneem. Waar die probleem hier gerig is tot verstandelike vertraagdheid, is uit hierdie omvattende groep 'n bepaalde opleidingsentrum vir verstandelik vertraagdes gekies.

Die siftingsprogram is sodanig saamgestel dat dit aan die volgende doelstellinge beantwoord:

1. Identifisering van bekende metaboliese defekte.
2. Opsporing en karakterisering van nuwe metaboliese defekte, en
3. Verskaffing van data vir genetiese raadgewing met betrekking tot die voorkoming van verdere metaboliese defekte in die geaffekteerde families.

#### 4.2.3 Sifting vir nie-amino-organiesesuururie

Lehnert<sup>14</sup> het reeds in 1979 'n pleidooi in sy artikel "Warum screening nach Organoacidurien" gelewer dat 'n sistematiese selektiewe sifting gedoen moet word op pasiënte met aangebore metaboliese defekte, en in die besonder vir organiesesuururie. Volgens bogenoemde outeur is die voorkoms 1:15000 indien

al die persone met organiesesuururië saamgevat word, en is massasifting met behulp van 'n multikomponentsiftingsmetode geregverdig. Hierdie outeur word in sy siening deur Watts et al.<sup>15</sup> ondersteun.

Ongeveer 50 van die bekende enkelgeenafwykings veroorsaak 'n aangebore metaboliese defek wat met 'n abnormale nie-amino-organiese suururie geassosieer word. Die gaschromatografie-se fraksionering van geëkstraheerde mengsels het 'n groot bydrae gelewer as middel waardeur multikomponentanalises gedoen kan word. Hierdie stelling geld veral in die nie-amino-organiese suururië.<sup>2,12,16</sup>

#### 4.2.4 Selektiewe sifting vir organiesesuururië, in 'n plaaslike opleidingsentrum vir verstandelik gestremdes

##### 4.2.4.1 Inleidend

'n Nasionale genetiese program is in 1977 offisieel in die Republiek van Suid-Afrika ingestel. Die doelstelling van hierdie program is om kongenitale en aangebore defekte op te spoor en te probeer voorkom deur genetiese raadgewing. 'n Belangrike deel van hierdie genetiese program is die totstandkoming van 'n gekoördineerde en uitgebreide genetiese dienslewering in die land aan al sy inwoners, ongeag die bevolkingsgroep of die gemeenskapstatus.<sup>17</sup> Teen hierdie agtergrond is die siftingsprogram geloods in 'n plaaslike opleidingsentrum vir verstandelik vertraagde kinders.

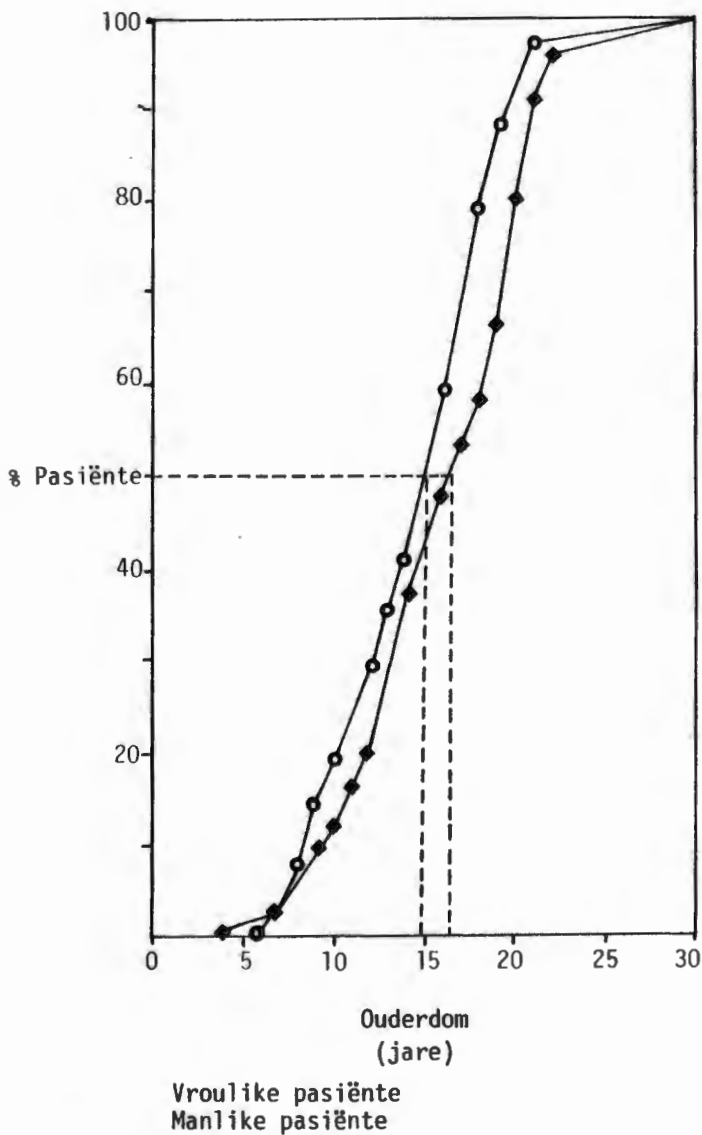
#### 4.2.4.2 Pasiënte

Met die aanvang van die siftingsprogram was baie min aangaande die oorsprong van die verstandelike vertraagdheid by die pasiënte bekend. Gegewens ten opsigte van familiegeskiedenis van die pasiënte was onvolledig of totaal onbekend.

Dié opleidingsentrum bestaan uit 113 pasiënte, met 'n ongeveer gelyke verdeling tussen seuns (50,9%) en dogters (49,1%). Die ouderdomsverspreiding van die pasiënte word in figuur 4.7 aangetoon. Minder as 20% van al die pasiënte is jonger as 10 jaar, en 50% van die pasiënte is ouer as 16½ jaar. Die ouderdom van die pasiënte wissel tussen 4 en 22 jaar, met 'n gemiddelde ouderdom van 14,5 jaar. Die gemiddelde ouderdom van die manlike en vroulike pasiënte is onderskeidelik 14,2 jaar en 15,0 jaar.

#### 4.2.4.3 Siftingsprosedure

Vroeë-oggend-urienmonsters is versamel en onmiddellik na aankoms by die laboratorium geanaliseer. Die urienmonsters is onderwerp aan 'n reeks eenvoudige kwantitatiewe toetse, wat sodanig saamgestel is dat dit 'n genoegsame breë groep van aangebore metaboliese defekte kon identifiseer. Hierdie reeks van eenvoudige kwantitatiewe siftingstoetse, asook die ander prosedures wat in die siftingsprogram gebruik is, word saamgevat in tabel 4.4.



FIGUUR 4.7: Die akkumulatiewe persentasie van pasiënte in die opleidingsentrum teenoor ouderdom

TABEL 4.4: Biochemiese siftingsprosedure vir urine van verstandelike vertraagde pasiënte

| Metaboliet(e)              | Toets                                | Outeurs            | Verwysing        |
|----------------------------|--------------------------------------|--------------------|------------------|
| Fenielpiruviesuur          | Yster(III)chloried                   | Renaurt            | 18               |
| Ketone en ketosure         | 2-4-dinitrofenielhidrosien (DNPH)    | Penrose en Quastel | 19               |
| Reduserende metaboliete    | Benedict                             | Thomas & Havell    | 20               |
| Swawelbevattende aminosure | Natriumsianied-nitroprussied         | Thomas & Havell    | 20               |
| Tirosienmetaboliete        | $\alpha$ -Nitroso- $\beta$ -naftol   | Thomas & Havell    | 20               |
| Mukopolisaggariede         | CTAB                                 | Renaurt            | 18               |
| Histidien                  | Kuprisoon                            | Gerber & Gerber    | 21               |
| Aminosure                  | 1 dimensionele dunlaagchromatografie |                    |                  |
| Organiese sure             | Gaschromatografies                   | Goodman            | Hoofstuk 3.2.3.4 |

#### 4.2.4.4 Resultate

##### 4.2.4.4.1 Algemene siftingstoetse

h Totaal van 113 pasiënte is met die siftingsprosedure ondersoek. Die resultate van hierdie ondersoek word in tabel 4.5 weergegee. Hieruit kan gesien word dat h groot persentasie pasiënte twyfelagtige normale toetsresultate opgelewer het. Een pasiënt het h positiewe reaksie met die CTAB-toets vertoon. Geen verdere ondersoek is op hierdie pasiënt uitgevoer nie. Die abnormale dinitrofeniel-hidrasien- en histidien toetse is in ooreenstemming met data verkry vanaf die dunlaaganalise van aminosure en die gaschromatografiese analise van organiese sure. Hierdie prosedures word vervolgens meer breedvoerig behandel.

##### 4.2.4.4.2 Aminosuuranalise

Benewens bogenoemde algemene siftingstoetse, is die totale aminosuurfraksie in urine geanaliseer met behulp van dunlaagchromatografie. Die resultate hiervan word in tabel 4.6 weergegee. Met die eerste analise het 13% van die pasiënte een of meer aminosure in abnormale konsentrasies in die urine uitgeskei. By 11% van die pasiënte was h enkele aminosuur verhoog, terwyl 2% van die pasiënte algemene aminosuururie vertoon het. By herhaling het 3% van die pasiënte h enkele aminosuur vertoon wat matig verhoog is, terwyl 2% van die pasiënte konstant h toestand van algemene aminosuururie vertoon het. Dieselfde pasiënte wat op die histidientoets positief gereageer het, het ook h toestand van algemene aminosuururie vertoon. Hierdie pasiënte kan dus nie as werklike histidienemië gediagnoseer word nie.

TABEL 4.5

| Algemene Siftingstoetse       | Numeriese Waardes          |     |     |    |   |
|-------------------------------|----------------------------|-----|-----|----|---|
|                               | % van die totale pasiënte* |     |     |    |   |
|                               | N                          | 1+  | 2+  | 3+ | A |
| Benedict se toets             | 93                         | 7   | 0   | 0  | 0 |
| Yster(III)chloriedtoets       | 96                         | 3,5 | 0,5 | 0  | 0 |
| $\alpha$ -Nitroso-naftoltoets | 79                         | 17  | 4   | 0  | 0 |
| Dinitrofenielhidrasientoets   | 91                         | 7   | 0   | 0  | 2 |
| Nitroprussiedtoets            | 100                        | 0   | 0   | 0  | 0 |
| Histidientoets                | 96                         | 2   | 0   | 0  | 2 |
| Mukopolisaggariede            | 69                         | 30  | 0   | 0  | 1 |

n = Normaal

1+ = Twyfelagtig normaal

2+ = Twyfelagtig

3+ = Twyfelagtig abnormaal

A = Abnormaal

\*Benaderd tot die naaste heelgetal

TABEL 4.6: Dunlaaganalise van aminosure tydens 'n aantal herhalings

| Analises | % pasiënte van die totaal |                             |                             |
|----------|---------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
|          | Normaal                   | Enkele Aminosuur<br>verhoog | Algemene Aminosuur=<br>urie |
| 1ste     | 87                        | 11                          | 2                           |
| 2de      | 95                        | 3                           | 2                           |
| finaal   | 95                        | 3                           | 2                           |

#### 4.2.4.4.3 Organiese suuranalise

By die algemene siftingsprotokol wat normaalweg uitgevoer word, is die totale organiese suurinhoud van die urine, as 'n addisionele prosedure, ontleed.

Geen beheer hoegenaamd kon uitgeoefen word op die dieet of inname van geneesmiddels deur die pasiënt gedurende die siftingstydperk nie. Die rede hieroor is dat 'n groot persentasie pasiënte tuis verpleeg word en slegs gedurende die dag by die sentrum onderrig ontvang. 'n Aantal pasiënte is inwonend in 'n ander plaaslike sorg- en rehabilitasiesentrum, waar hulle na-ure onder die sorg van ander verpleegpersoneel is.

By die eerste analise van die sentrum het 85% van die pasiënte 'n normale organiese suurprofiel vertoon, terwyl by 15% van die pasiënte een of meer pieke wat abnormaal verhoog was, in die profiel voorgekom het. Die 15% pasiënte wat aanvanklik 'n abnormale profiele vertoon het, se urine is na 14 dae weer geanaliseer. By slegs drie van die pasiënte (69, 76, 79) is by die eerste herhaling abnormale profiele verkry, terwyl die ander 14 pasiënte normale profiele opgelewer het.

By twee verdere herhalings van die totale aantal aanvanklike abnormales, is daarby die pasiënte wat met die eerste herhaling abnormale profiele vertoon het, weereens verhoogde organiese suurkataboliete in die urine gevind, by drie ander pasiënte, wat aanvanklik normale profiele vertoon het, is toe ook abnormale profiele verkry. Die resultate van hierdie ses pasiënte sal vervolgens individueel bespreek word.

#### Pasiënt 22 (figuur 4.8)

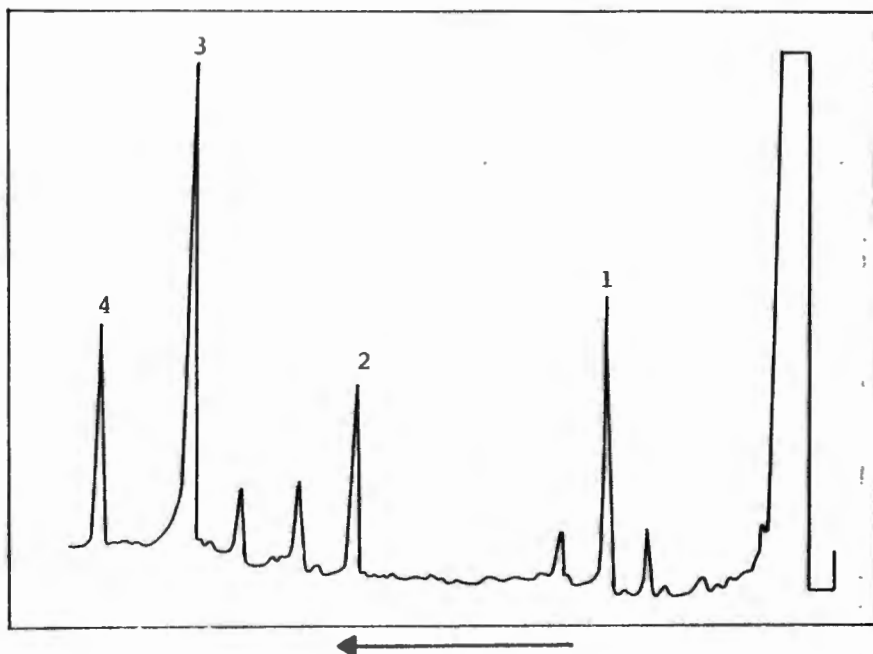
Met die aanvanklike analise was daar drie abnormale hoë pieke in die profiel aanwesig. Hierdie pieke word vereenselwig met p-kresol (M.E. = 12,7), p-hidroksiëtosuksienimied (M.E. = 15,60) en p-hidroksifenielasynsuur (M.E. = 18,0). Met herhaling van die analise, was geen kataboliet in abnormale hoeveelhede teenwoordig nie. By 'n derde en vierde herhaling was slegs een abnormale kataboliet teenwoordig met 'n metileen-eenheidwaarde van 21,5. Hierdie M.E.-waarde word vereenselwig met 2-hidroksihippuursuur, 'n aspirienmetaboliet. Weens die groot individuele variasie van kataboliete, en die feit dat slegs 2-hidroksihippuursuur tydens 'n aantal bepalinge in abnormale hoeveelhede teenwoordig was, is daar tot die gevolgtrekking gekom dat die pasiënt nie 'n organiese suururie het nie, maar dat die abnormale resultaat deur aspirien-inname veroorsaak is.

#### Pasiënt 76 (figuur 4.9)

Met die aanvanklike analise is daar twee abnormale hoë pieke in die profiel gevind. Hierdie pieke is onderskeidelik vereenselwig met p-hidroksiamandelsuur (M.E. = 19,2) en o-hidroksihippuursuur (M.E. = 21,5). By drie verdere herhalings is slegs o-hidroksihippuursuur (M.E. = 21,5) waargeneem. Die voorkoms van hierdie kataboliet word aan die inname van aspiriene toegeskryf, en nie aan 'n organiese suururie nie.

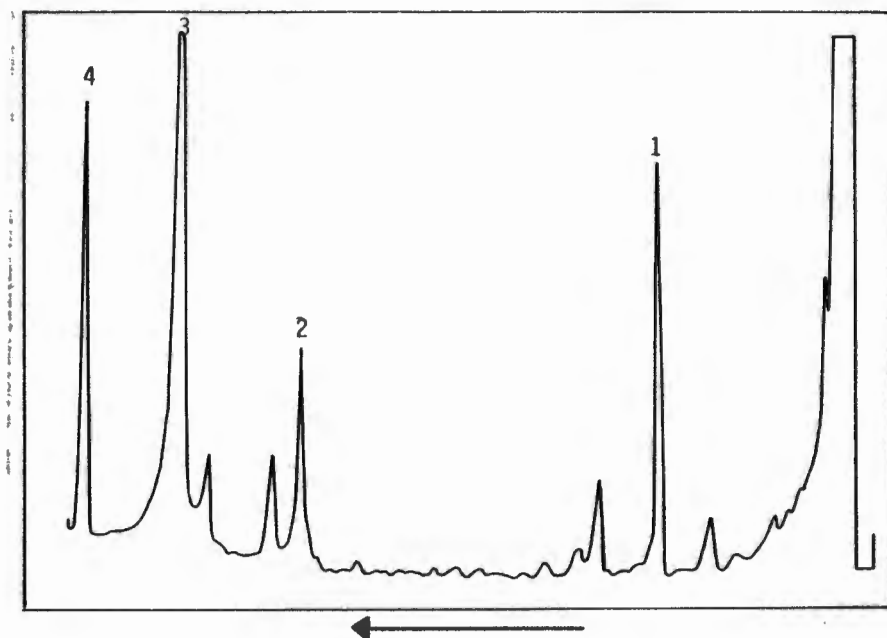
#### Pasiënt 79 (figuur 4.10)

By hierdie pasiënt was daar tydens 'n aantal bepalinge konstant twee pieke wat abnormaal verhoog was. Volgens die berekende



FIGUUR 4.8: Organiese suurprofiel van pasiënt 22

- Pieke: 1. Maloonsuur (interne standaard)  
 2. p-hidroksifenielasynsuur  
 3. o-hidroksihippuursuur  
 4. n-Tetrakosaan (eksterne standaard)



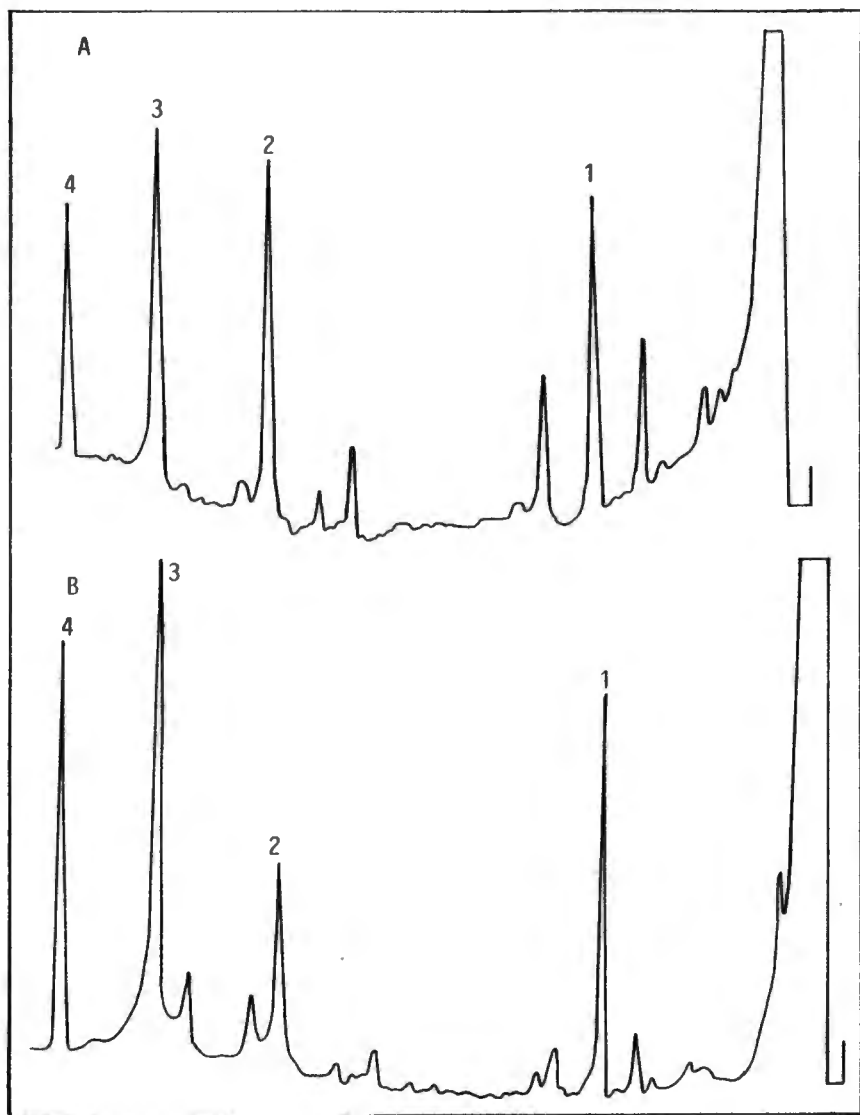
**FIGUUR 4.9: Organiese suurprofiel van pasiënt 76 soos tydens die finale analise**

**Pieke:** 1. Maloonsuur (interne standaard)

2. p-hidroksiamandelsuur

3. o-hidroksihippuursuur

4. n-Tetrakosaan (eksterne standaard)



**FIGUUR 4.10** Organiese suurprofiel van pasiënt 79 soos by die eerste (A) en finale (B) analise  
 Pieke: 1. Maloonsuur (interne standaard)  
 2. Isositroensuur/Meristiensuur  
 3. o-hidroksihippuursuur  
 4. n-Tetrakosaan (eksterne standaard)

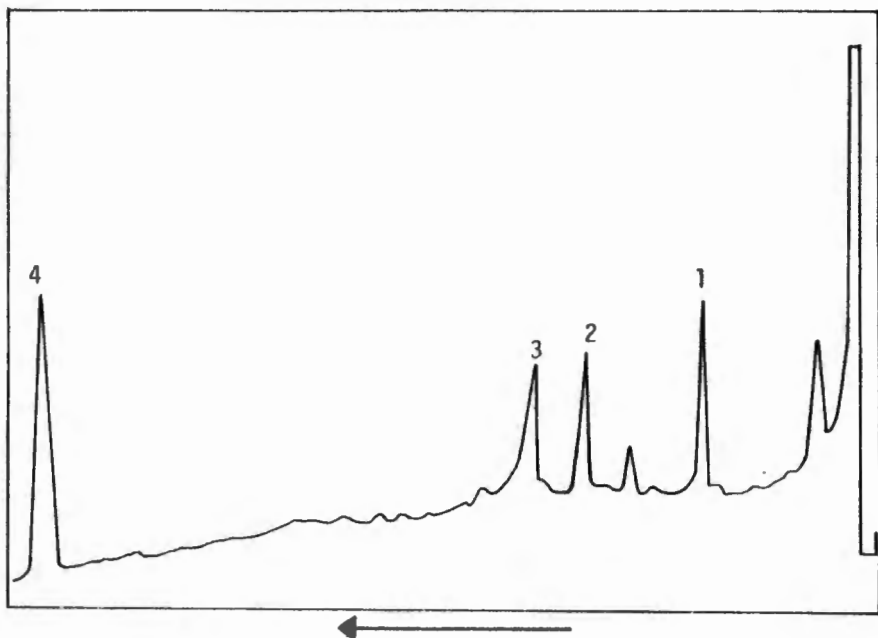
M.E.-waardes, is hierdie pieke verteenwoordigend van isosi-troensuur en/of meristiensuur, (albei hierdie kataboliese M.E.-waarde is 19,1), en o-hidroksihippuursuur (M.E. = 21,5). Geen uitsluitel ten opsigte van hierdie pasiënt kan gegee word nie.

#### Pasiënt 85 (figuur 4.11)

By hierdie pasiënt is met die aanvanklike organiese suuranalise slegs 'n verhoogde ureumpiek (M.E. = 14,0) waargeneem. By verdere herhalings was die profiele normaal. Die metaboliese profiel soos verkry met die finale analise vertoon twee abnormale pieke naamlik ureum (M.E. = 14,0) en askorbiensuur (M.E. = 20,41). Laasgenoemde metaboliet word in groot hoeveelhede in vrugtedranke en ander voedsel aangetref. Die voorkoms van hierdie metaboliet word aan 'n eksogene bron toegeskryf en nie aan 'n biochemiese defek nie.

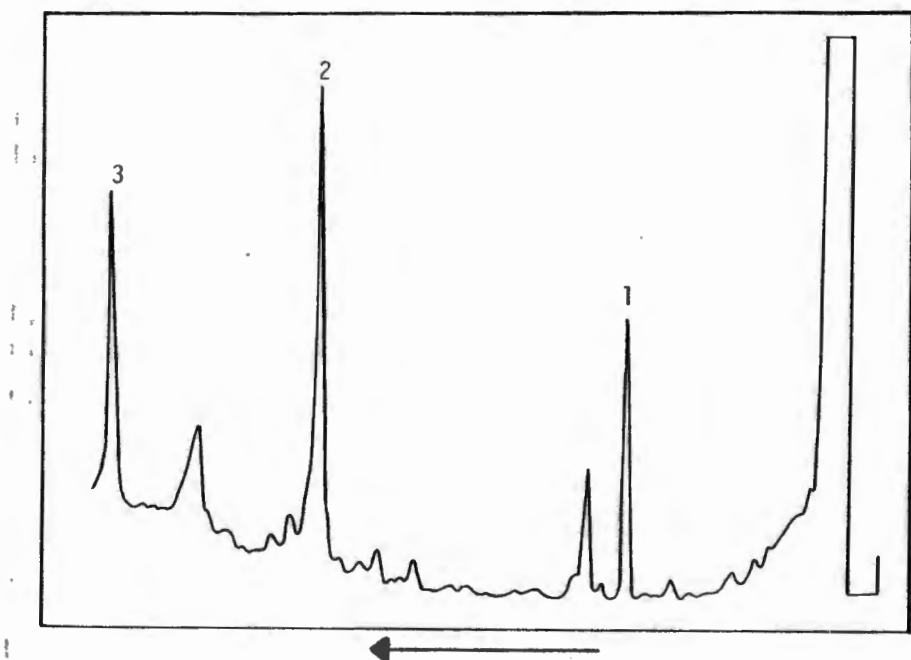
#### Pasiënt 86 (figuur 4.12)

Ureum (M.E. = 14,0), 2-hidroksiheksanoësuur (M.E. = 14,2) en suksiensuur (M.E. = 14,4) was volgens die gestelde kondisies in 'n oormaat in die urine teenwoordig met die aanvanklike analise. By verdere herhaling het p-hidroksiamandelsuur (M.E. = 19,2) een keer in oormaat in die urine voorgekom. Weens die feit dat hierdie kataboliet nie konstant abnormaal verhoog voorgekom het nie, word daar aangeneem dat die sporadiese voorkoms daarvan nie op 'n organiesesuururie dui nie.



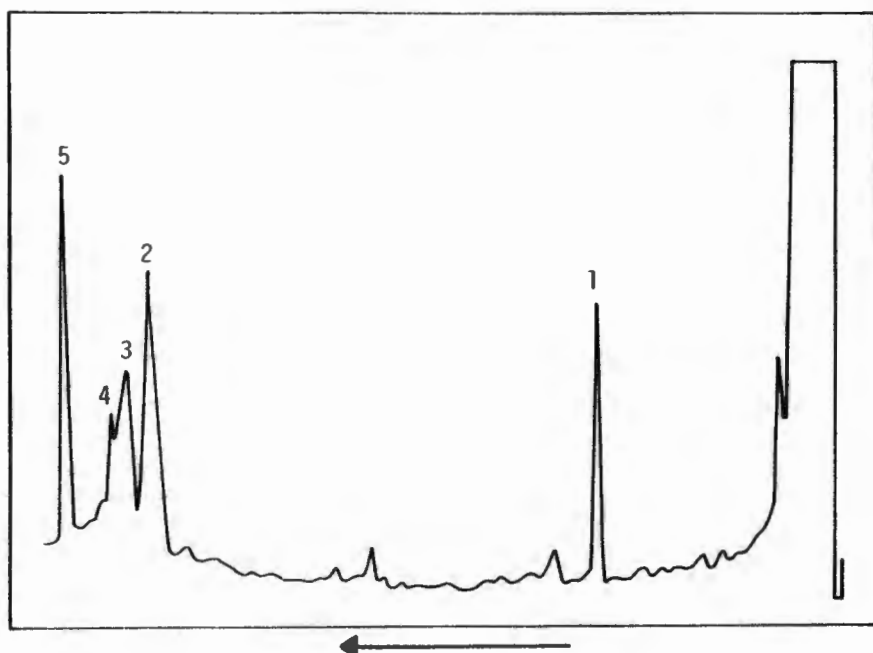
FIGUUR 4.11: Organiese suurprofiel van pasiënt 85 (finale analyse)

- Pieke: 1. Onbekend  
2. Maloonsuur (interne standaard)  
3. n-Tetrakosaan (eksterne standaard)



FIGUUR 4.12: Organiese suurprofiel van pasiënt 86 tydens die finale analise

- Pieke: 1. Maloonsuur (interne standaard)  
 2. p-hidroksiamandelsuur  
 3. n-Tetrakosaan (eksterne standaard)



FIGUUR 4.13: Organiese suurprofiel van pasiënt 97 tydens die finale analise

- Pieke: 1. Maloonsuur (interne standaard)  
 2. 2-hidroksihippuursuur  
 3. Onbekend  
 4. Onbekend  
 5. n-Tetrakosaan (eksterne standaard)

## Pasiënt 97 (figuur 4.13)

Hierdie pasiënt het tydens 'n groot aantal analyses o-hidroksihippuursuur (M.E. = 21,5) in abnormale hoeveelhede uitgeskei. Daar is later bevestiging ontvang dat hierdie pasiënt vir 'n tydperk gedurende die analyses aspiriene ingeneem het. Die voorkoms van hierdie kataboliet dui dus nie op 'n metabolismiese defek nie, maar is toe te skryf aan die inname van medikasie.

### 4.2.4.5 Bespreking

Slegs twee pasiënte met algemene aminosuururie is geïdentifiseer. Geen organiesesuururie pasiënt is in die sentrum geïdentifiseer nie. Uit die organiese suursiftingsresultate het die belangrikheid om te let op die invloed van geneesmiddels duidelik na vore gekom. Aangesien hierdie faktor nie kontroleerbaar was tydens die siftingsprogram nie, kan die groot aantal (+ 15%) aanvanklike abnormale profiele deels daaraan toegeskryf word. Dit is dus van die uiterste belang om aanvanklike analyses wat abnormale resultate lewer eers 'n aantal kere te herhaal, alvorens enige verdere betekenis daaraan geheg kan word.

Alhoewel die prosedure vir organiese suursifting uiters doeltreffend blyk te wees, is dit ten opsigte van koste en tyd nie ekonomies om hierdie prosedure uit te voer op al die pasiënte in sentra waar verstandelike vertraging die enigste indikasie vir 'n aangebore metabolismiese siektetoestand is nie. Daar word voorgestel dat slegs die twyfelagtige en abnormale resultate van die algemene siftingstoetse, met die gaschromatografiese analise opgevolg word. Dit geld ook in gevalle

van pasiënte waar daar 'n duidelike kliniese indikasie van organiesesuururie teenwoordig is.

Watts et al.<sup>15</sup> maak in 1975 die volgende stelling na aanleiding van sifting vir organiesesuururie by kinders en pasgeborenes.

*The preliminary results of screening neonates and infants for organic aciduria's because of non specific illness and failure to thrive suggest that the comprehensive study of non-amino organic acids may be diagnostically more useful than amino acid analysis and that acute non specific illness in infancy, is a better pointer to inherited metabolic disease than longstanding mental handicap.*

Uit die siftingsresultate van die opleidingsentrum, blyk dit asof die stelling van Watts et al.<sup>15</sup> ten opsigte van kinders en pasgeborenes ook van toepassing kan wees op die inwoners van opleidingsentrums en sorg- en rehabilitasie-eenhede.

#### 4.3 Organiesesuururie by pasiënte waar reeds 'n kliniese diagnose gemaak is

##### 4.3.1 Inleidend

Dit is noodsaaklik om in 'n ondersoek, soos wat hier uitgevoer is, die metode toe te pas op pasiënte wat reeds vooraf as organiesesuururie gediagnoseer is. Hierdeur kan die betroubaarheid en toepasbaarheid van die metode geïllustreer word. Drie fenielketonurie-pasiënte (PKU), pasiënte met vertakte langketting suururie ("maple syrup" uriensiekte) en 'n pasiënt met metielmaloonsuur is as verteenwoordigend geneem

van die groep van pasiënte wat vooraf reeds gediagnoseer is. 'n Pasiënt wat vermoedelik aan 'n aminosuurwanabsorpsie-sindroom ly en 'n unieke geval blyk te wees, is ook hierby ingesluit.

#### 4.3.2 Feniëlketonurie (PKU)

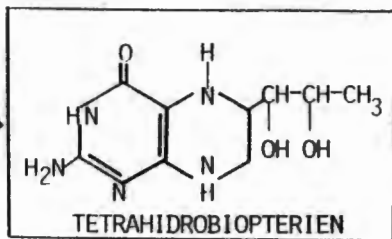
Folling het reeds in 1934 fenielpiruvienzuur in die urine van pasiënte met hierdie metaboliese versteuring geïdentifiseer. Die term feniëlketonurie is deur Penrose en Quastel voorgestel, en is tans steeds in algemene gebruik.

By pasiënte met klassieke PKU\* is die ensiem feniëlaalanienhidroksilase afwesig of totaal onaktief. Hierdie ensiem kataliseer die omsetting van feniëlaalanien na tirosien as deel van die kataboliese van feniëlaalanien (figuur 4.14). Die hidroksileringsstelsel van feniëlaalanienhidroksilase bestaan uit 'n aantal ko-faktore en ko-ensieme wat soos volg voorgestel kan word:

---

\* Klassieke PKU is ook in die literatuur bekend as hiperfeniëlaalanemie tipe I

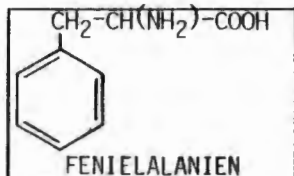
DIHIDROBIOPTERIEN



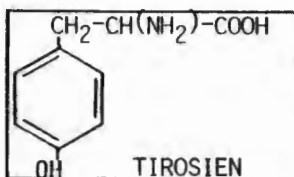
$\text{NADPH} + \text{H}^+$

DIHIDROFOLAATREDUKTASE

$\text{NADP}^+$



FENIELALANIENHIDROKSILASE



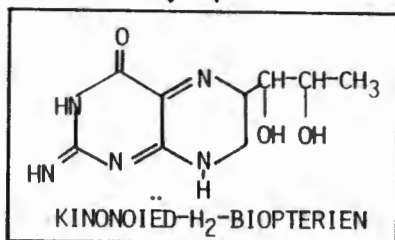
$\text{O}_2$

$\text{H}_2\text{O}$

DIHIDROPTERIDIENREDUKTASI

$\text{NAD}^+$

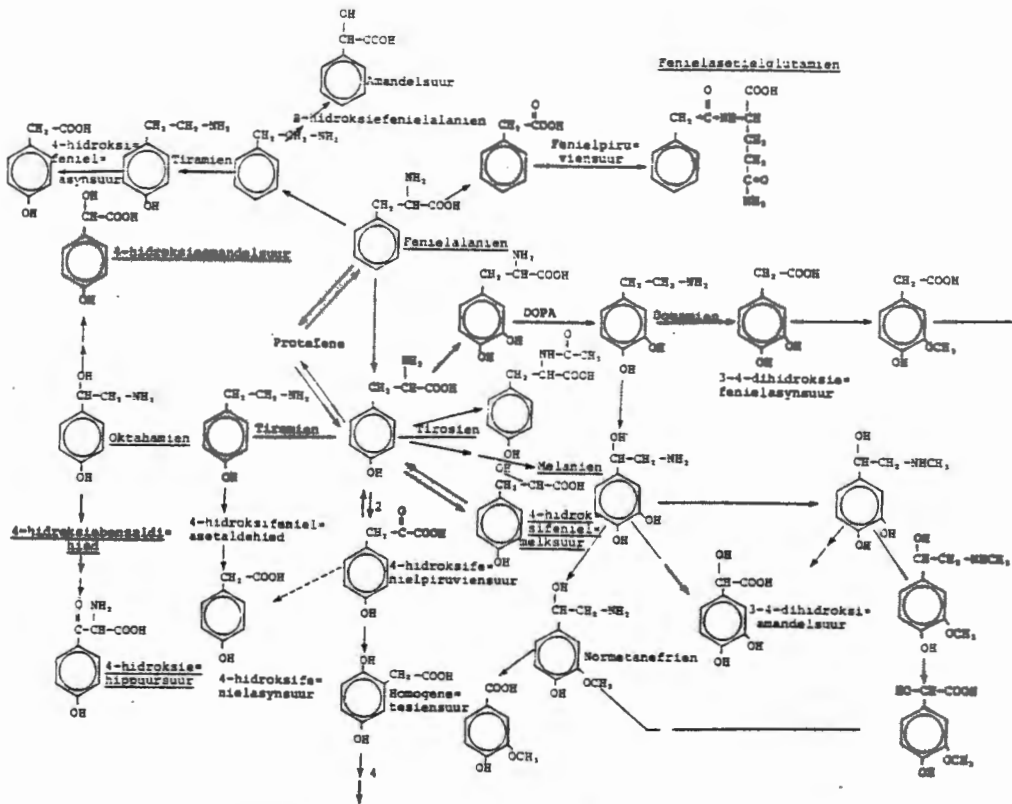
$\text{NADH} + \text{H}^+$



Die ko-ensiem dihidrobiopterien word gereduseer deur 'n NADPH-afhanklike dihidrofolaat reduktase. Die gereduseerde tetra-hidrobiopterien neem saam met suurstof en fenielalanien aan die fenielalanienhidroksilasereaksie deel. Die geoksideerde ko-faktor kinonotied- $H_2$ -blopterien word dan geregenereer deur 'n NADH-afhanklike dihidropteridienreduktase sonder enige verdere afhanklikheid van dihidrofolaatreduktase.

Fenielalanienhidroksilaseaktiwiteit in soogdierlewerekstrakte, die afhanklikheid van atmosferiese suurstof en NADH asook die spesifisiteit van hierdie reaksie, is reeds in 1952 deur Udenfriend en Cooper<sup>24</sup> aangetoon.

Uit figuur 4.14 is dit verder duidelik dat met die blokkering van die omsetting van fenielalanien na tirosien, daar 'n ophoping van fenielalanien en fenielalanienmetaboliëte ontstaan, terwyl daar 'n afname in die konsentrasie van tirosien en sy metaboliëte is. So is 'n tipiese kliniese kenmerk van klassieke PKU-pasiënte byvoorbeeld blonde hare en blou oë met 'n ligte velkleur. Hierdie verlaagde pigmentasie word toegeskryf aan die verlaagde sintese van melanien vanuit tirosien as voorganger. Soos by verskeie ander metaboliese defekte is PKU nie opspoorbaar in 'n siftingsprogram as gevolg van die tekort aan tirosien of andere metaboliëte nie, maar wel as gevolg van die verhoogde voorkoms van fenielalanien en sy metaboliëte in die liggaamsvloeistowwe. Die onderskeie konsentrasies van fenielalanien en sy organiese suurmetsaboliëte vertoon 'n individuele variasie tussen pasiënte, asook 'n daaglikse variasie by 'n bepaalde pasiënt (kyk hoofstuk 2.6). In tabel 4.7 word die kataboliëte wat by PKU-pasiënte in die urine uitgeskei word, asook die onderskeie konsentrasies daarvan, getabuleer volgens data wat verkry is van Dr. J.W.T.



FIGUUR 4.14 Voorstelling van de katabolische verloop van fenilalanien en tirosien zoals voorgesteld deur Wrochek et al., 1973<sup>22</sup> en La Du en Glessing, 1978<sup>23</sup>

TABEL 4.7: Katabolietuitskeiding in urine deur PKU-pasiënte

|                                       | Fenielketonurieë     | Normale Persone      |
|---------------------------------------|----------------------|----------------------|
| Kataboliete in die urine<br>aanwesig: | Uitskeiding / 24 uur | Uitskeiding / 24 uur |
| Fenielalanien                         | ≈ 450mg 10%          | ≈ 15mg               |
| Fenielpiruviensuur                    | ≈ 2,25gram 30%       | ≈ 0                  |
| Fenielmeïksuur                        | ≈ 1,00gram 20%       | ≈ 0                  |
| Fenielasetielglutamien                | 0,3-2,4gram 15%      | ≈ 300mg              |
| Asetielfenielalanien                  | ≈ 75mg               | ≈ 0                  |
| Amandelsuur                           | teenwoordig          | ≈ 0                  |
| 2-hidroksifenielasynsuur              | ≈ 300mg 10%          | ≈ 0                  |

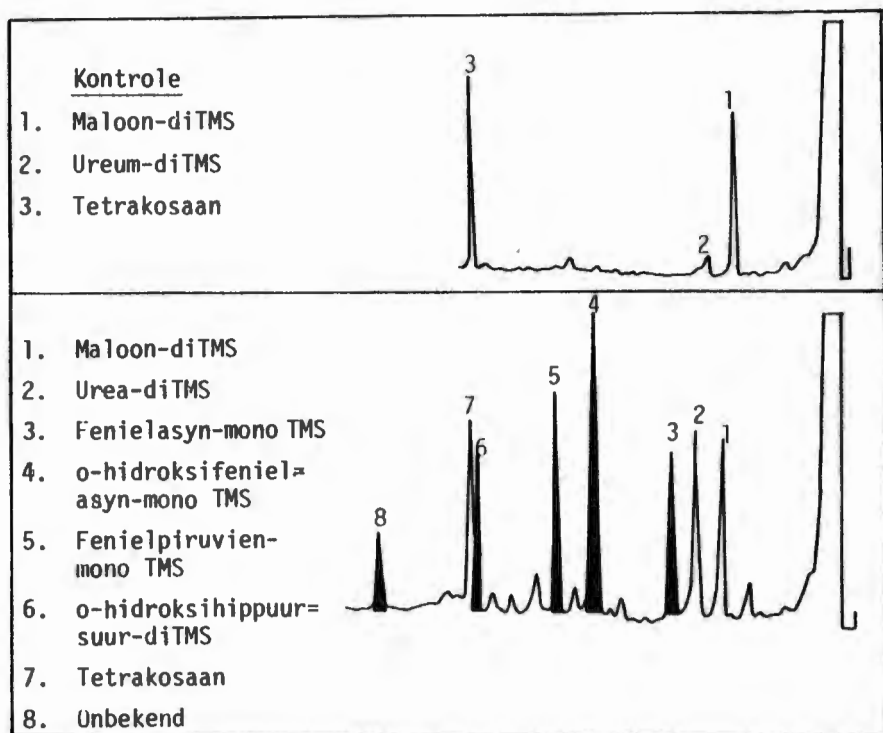
Seakins, The Hospital for Sick Children, Great Osmond Street, London.

Soos reeds genoem is drie reeds gediagnoseerde PKU-pasiënte se urinêre organiese sure ook met behulp van die vloeistof-vloeistofekstrasieprosedure geëkstraheer en gaschromatografies gefraksioneer. Vervolgens sal na die pasiënte as JB, JK en AK verwys word.

#### 4.3.2.1 Pasiënt JB

Hierdie pasiënt is manlik en 28 jaar oud, en is reeds vanaf sy 5de jaar in 'n inrigting vir geestelik vertraagde pasiënte. Hy besit growwe gelaatstrekke, het 'n liggepigmenteerde vel met blonde hare en blou oë. Hierdie pasiënt kan nie praat, loop of opdragte verstaan nie, en sy verstandelike ontwikkeling word gestel as 'n voorbeeld van IK 20. Die pasiënt vertoon naas vertraagde psigomotoriese ontwikkeling ook hiperaktiwiteit, aggressie, hipertonsiteit en prominente maksilla met verwyde interdendale spasies.

Die organiese suurprofiel van pasiënt JB word in figuur 4.15 aangetoon. Hierdie profiel is verkry deur van 'n vroeë-oggend urienmonster gebruik te maak. Uit figuur 4.15 kan gesien word dat in teenstelling met 'n normale kontroleprofiel 'n aantal kataboliete in abnormale hoeveelhede voorkom. Die kataboliete naamlik fenielasynsuur, fenilpiruviensuur en o-hidroksifenielasynsuur is voortdurend by 'n aantal ekstraksies waargeneem. Soos uit figuur 4.15 gesien kan word is die hoeveelheid o-hidroksifenielasynsuur aansienlik meer as enige ander kataboliet. 2-hidroksihippuursuur (piek 6) was tydens hierdie ekstraksie ook in die urine aanwesig. Aangesien



FIGUUR 4.15: Organiese suurprofiel van pasiënt JB geassosieerd met fenielketonurie

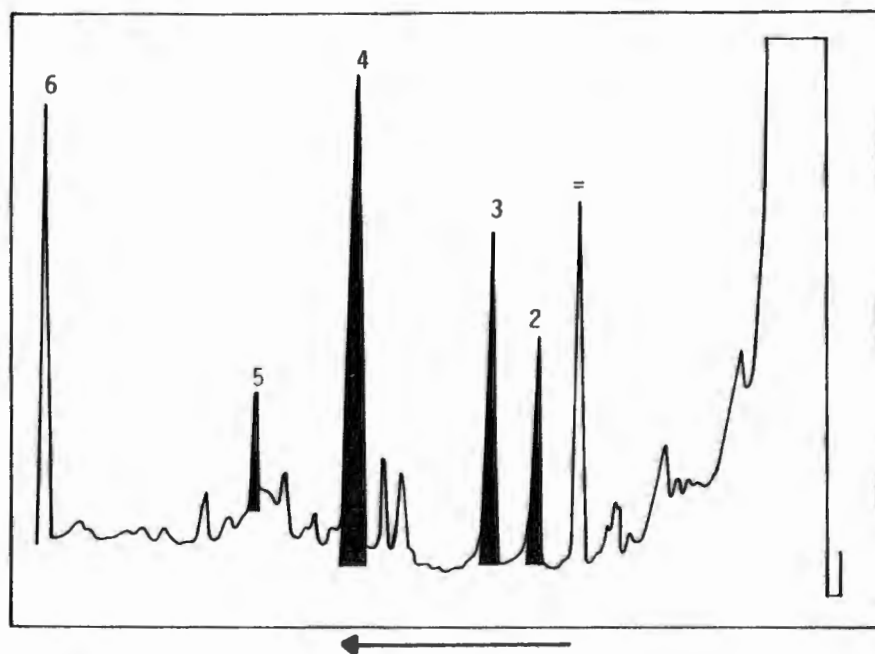
dit 'n aspirienmetabool is, word geen verdere betekenis daaraan geheg nie. Piek 8 kon nie geïdentifiseer word nie. Op grond van die Metileeneenheidwaarde ( $C_{24}$ ) kan met sekerheid aanvaar word dat dit nie 'n klinies belangrike organiese suur is nie. 'n Verskeidenheid ander metaboliëte is ook in die ekstrak aangetref - dit was egter in sulke klein hoeveelhede teenwoordig dat dit hier van geen belang geag is nie.

Op grond van die kataboliëte in die urine, die plasmafenielalanienkonsentrasie ( $>1\text{mMol/l}$ ) asook die kenmerkende kliniese gelaatstrekke kan met sekerheid aanvaar word dat pasiënt JB 'n PKU tipe is.

#### 4.3.2.2 Pasiënte JK en AK

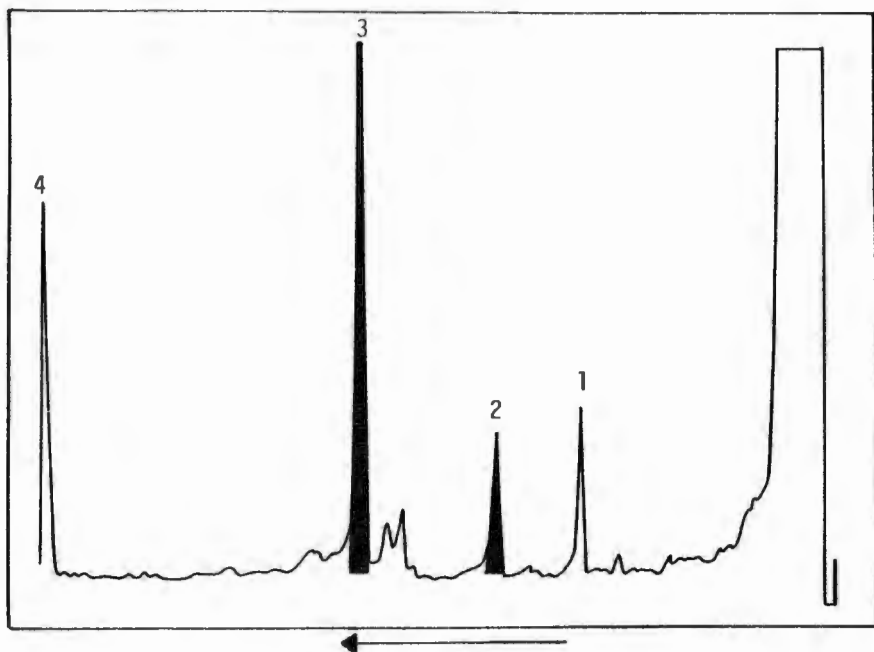
Hierdie pasiënte is broers en is onderskeidelik 16 jaar en 14 jaar oud. Beide het ligte gelaatstrekke met blonde hare en blou oë. Baie min kliniese data kon deur die ouers verskaf word. Hierdie twee pasiënte word spesifiek hier vermeld aangesien hulle toestand die noodsaaklikheid van vroeë diagnose en 'n dieetbehandeling onderskryf.

Uit die organiese suurprofiel van pasiënt JK (figuur 4.16) kan duidelik die analogie wat bestaan met figuur 4.15, waargeneem word. Die drie primêre kataboliëte wat waargeneem is, is weereens fenilpiruviensuur, fenielasynsuur, en o-hidroksifenielasynsuur. Alhoewel figuur 4.9 ooreenkomste met figuur 4.17 toon, is die verskille meer uitstaande. In figuur 4.17 is ureum sowel as fenilpiruviensuur bykans totaal afwesig, terwyl fenielasynsuur ook in 'n aansienlik laer hoeveelheid voorkom. Hierdie waarnemings kry meer betekenis indien dit gesien word teen die kliniese agtergrond van hierdie pasiënte.



FIGUUR 4.16: Organiese suurprofiel van pasiënt JK geassosieerd met onbehandelde fenielketonurie

1. Maloon-diTMS
2. Ureum-diTMS
3. Fenielasyn-mono TMS
4. o-hidroksifenielasyn-mono TMS
5. Fenielpiruvien-mono TMS
6. Tetrakosaan



FIGUUR 4.17: Organiese suurprofiel van pasiënt AK geassosieerd met fenielketonurie op 'n beperkte fenielalanien dieet

1. Maloon-diTMS
2. Fenielasyn-mono TMS
3. o-hidroksifenielasyn-mono TMS
4. Tetrakosaan

Pasiënt JK is eers op 'n laat ouderdom as PKU gediagnoseer, en is op 'n onbeperkte dieet, terwyl sy jonger broer pasiënt AK by geboorte as PKU gediagnoseer is en onmiddellik op 'n beperkte feniëlanien-dieet geplaas is. Pasiënt AK se algemene intelligensievlak is ook aansienlik hoër as die van sy ouer broer. Dit wil dus voorkom asof behandeling met 'n lae feniëlanien-dieet nie net 'n verlaging in feniëlpiruviesuur teweegbring nie, maar ook 'n verlaging van feniëlasynsuur tot gevolg het. Daar sou egter verwag word dat die o-hidroksifeniëlasynsuurvlak ook sou daal. Dit is egter nie uit figure 4.16 en 4.17 duidelik nie. Hoedanig die behandeling 'n verhoging in intelligensievlak tot gevolg het is nog nie bekend nie, hoewel daar 'n groot aantal teorieë hieroor bestaan.

#### 4.3.2.3 Samevattend

1. By genoemde pasiënte is organiese suurprofiële verkry waarin feniëlasynsuur, feniëlpiruviesuur en o-hidroksifeniëlasynsuur prominent vertoon. Hierdie kataboliete pas in by die voorstelling van die kataboliese verloop van feniëlanien en tirosien soos voorgestel deur Mrochek *et al.*<sup>22</sup> en La Du en Gjessing.<sup>23</sup>
2. Dit wil voorkom asof 'n dieetbehandeling 'n invloed op die algemene profiel het. Die invloed hiervan is met behulp van organiese suurekstraksie en fraksionering opvolgbaar.
3. Die urinêre uitskeiding van die feniëlanienmetaboliete naamlik o-hidroksifeniëlasynsuur, feniëlmelksuur en feniëlpiruviesuur, oorheers die tirosienmetaboliete p-hidroksifeniëlmelksuur en p-hidroksifeniëlpiruviesuur by die feniëlketonurie pasiënte wat ondersoek is. Dit is in

ooreenstemming met data soos verkry deur Chalmers en Watts.<sup>25</sup> Op grond van die organiese suurprofiële kan tussens tirosienemie- en fenielketonurie pasiënte onderskei word.

4. 'n Baie duidelike onderskeid tussen die profiële van normale kontrolepersone en PKU-pasiënte is waarneembaar. Dit, tesame met 'n effektiewe manier van identifisering, herbeklemtoon die toepasbaarheid van hierdie tegniek as 'n diagnostiese hulpmiddel.

#### 4.3.3 Metielmaloonsuururie

##### 4.3.3.1 Inleidend

Hierdie defek is veronderstel om die hoogste voorkoms van al die organisesesuururië te vertoon. Die simptome in die meeste pasiënte neem 'n aanvang met voedingsprobleme, lusteloosheid en hipotonie. Ernstige metaboliese asidose kom byna altyd voor by hierdie siektetoestand. Hiperglisienemie is byna altyd teenwoordig terwyl hiperammoniaemie ook somtyds by hierdie pasiënte waargeneem word. Dehidrasie en neurologiese abnormaliteite kom voor namate die siektetoestand verloop.

Trombositopenia en/of leukopenie is ook by pasiënte met hierdie defek aangetoon. Sommige pasiënte sterf as gevolg van nierversaking wat moontlik toegeskryf kan word aan die opeenhoping van uriensuur. Die nierversaking bring ook 'n versteuring in die serumelektrolietbalans mee. Die meeste pasiënte wat aan hierdie metaboliese defek ly is ook verstandelik vertraag.<sup>26</sup>

#### 4.3.3.2 Die Metaboliese defek

Die metaboliese weg wat in hierdie siektetoestand van belang is, is die tweestapomsetting van D-metielmaloniel-KoA tot suksiniel-KoA. Laasgenoemde is op sigself deel van die tri-karboksielsuursiklus (figuur 4.18).

Die sintese van D-metielmaloniel-KoA geskied vanaf propioniel-KoA deur middel van die ensiem propioniel-KoA-karboksilase. Hierdie stap is afhanklik van  $Mg^{++}$ , biotien en ATP.

Katabolisering van D-metielmaloniel-KoA geskied, soos reeds vermeld, in 'n tweestapomsetting van eerstens D-metielmaloniel-KoA na L-metielmaloniel-KoA deur middel van metielmaloniel-KoA-rasemase en tweedens deur die omsetting van L-metielmaloniel-KoA na suksiniel-KoA deur middel van metielmaloniel-KoA-mutase.

5'DeoksiadenosielKobalamien (Ado-Cbl), 'n vitamien- $B_{12}$ -derivaat, dien as 'n essensiële ko-faktor vir metielmaloniel-KoA-mutase,<sup>27</sup> gevolglik sal verskeie defekte van vitamien- $B_{12}$ -metabolisme ook aanleiding tot metielmaloonsuururie gee.

Hierdie siektetoestand word biochemies gekenmerk deur die groot hoeveelhede metielmaloonsuur wat in die urine uitgeskei word.<sup>28</sup>

Verskeie eenvoudige kolorimetriese toetse wat gebruikmaak van die reaksie tussen die kataboliet en p-nitroanilien<sup>29</sup> is vir die opspoor van metielmaloonsuur ontwikkel.

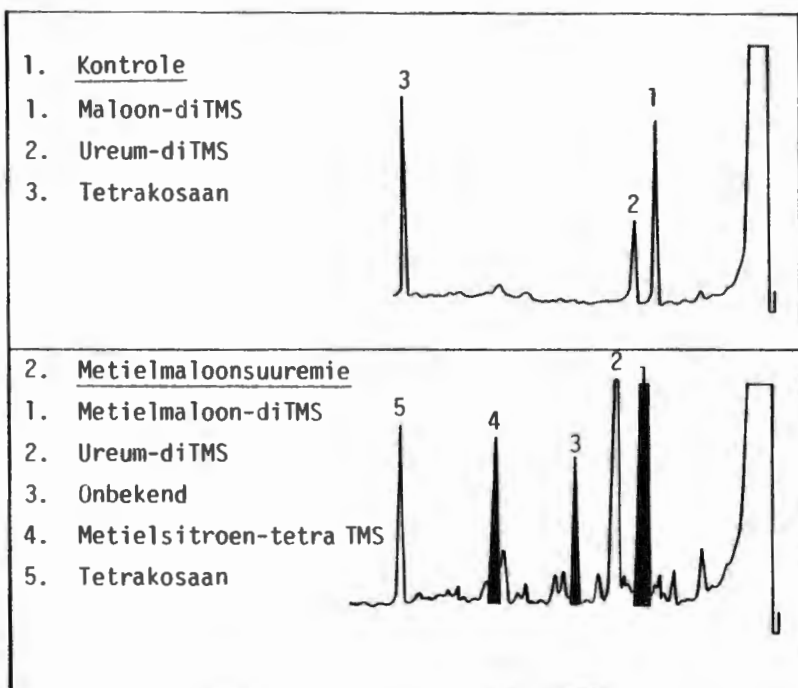


**FIGUUR 4.18** Vorming van organiese sure in metielmaloonsuuremie

h Aantal outeurs het metielmaloonsuur kwalitatief bestudeer by pasiënte met metielmaloonsuuremie, deur gebruik te maak van diëtieleterekstrasieprosedures en fraksionering met behulp van dunlaagchromatografie<sup>30</sup> asook papierchromatografie in h butanol-asynsuur-waterloopmiddel (12:3:5).<sup>31</sup> Die beste metode vir die diagnose van metielmaloonsuuremie en andere organiesesuururië, is by uitstek egter gaschromatografiese fraksionering van die geëkstraheerde organiese sure.

Die gefraksioneerde organiese suurmengsel soos verkry uit die urine van h pasiënt met metielmaloonsuuremie kan in figuur 4.19 gesien word. Volgens Duran et al.<sup>32</sup> word geen ander metaboliete behalwe metielmaloonsuur waargeneem tydens periodes van metaboliese regulering nie, terwyl tydens aanvalle van metaboliese versteurings, aansienlike hoeveelhede van die propioniel-KoA-metaboliete soos 3-hidroksipropioonsuur, metielsitroensuur, 3-hidroksi-n-valeriaansuur, 2-metiel-3-keto-n-valeriaansuur, 2-metiel-3-hidroksibottersuur en 2-metiel-3-ketobottersuur ook in variërende hoeveelhede in die urine mag voorkom.

Bogenoemde is in ooreenstemming met die toestand by die metielmaloonsuuremie pasiënt verkry en waarvan die metaboliese profiel in figuur 4.19 weergegee word. Uit figuur 4.19 is dit duidelik waarneembaar dat metielmaloonsuur in h baie groot konsentrasie in die urine van die pasiënt voorkom. Tanaka et al. het in h onlangse oorsigsartikel opgemerk dat tot 20mg metielmaloonsuur per mg kreatinien deur metielmaloonsuuremie pasiënte in hulle urine uitgeskei word. Piek 1 se hoogte (konsentrasie) in figuur 4.19 is egter te wyte aan die kumulatiewe molekulêre reaksie van beide maloonsuur en metielmaloonsuur. Die verskil



FIGUUR 4.19: Organiese suurprofiel van 'n pasiënt met Metielmaloonsuururie

tussen die metileeneenheidwaardes van maloonsuur (M.E.= 13,28) wat as interne standaard gebruik word, en metielmaloonsuur (M.E. = 13,30), is so gering dat, onder die gestelde kondisies, hierdie sure nie van mekaar skei nie. In die ondersoekte monster kom naas metielmaloonsuur, ook 'n baie groot hoeveelheid ureum voor.

Oberholzer *et al.*<sup>33</sup> het 'n pasiënt beskryf met metielmaloonsuur=urie waarvan die ureum inhoud in die urine 610mg% of 25,6mg per mg kreatinien was. Die outeur skryf hierdie verhoging toe aan die nierversaking wat begin intree het, 6 maande na geboorte.

Of die hoë ureuminhoud in figuur 4.19 aan dieselfde oorsaak toegeskryf kan word, is nie verantwoordbaar nie, aangesien geen kliniese data van die pasiënt ten opsigte van renale funksie tans bekend is nie.

Twee ander prominente pieke is in die metielmaloonsuururie profiel gevind.

Piek 3 kan nie bo alle twyfel geïdentifiseer word nie. Dit wil egter voorkom asof dit adipiensuur mag wees. Tanaka (1982) het ook 'n klein hoeveelheid adipiensuur in 'n metielma=loonsuururie pasiënt se urine gevind.

Die ander uitstaande suur (Piek 4) wat in die urienmonster gevind is, is geïdentifiseer as metielsitroensuur. Propioniel-KoA akkumuleer in die lewermitochondria as gevolg van 'n defek in een of meer van die ensieme wat betrokke is by die omsetting daarvan tot suksiniel-KoA. Metielsitroensuur word volgens Cheema-DHaldi *et al.*<sup>34</sup> in die mitochondria gevorm

deur kondensasie van propioniel-KoA met oksaloasetaat ten spyte daarvan dat propioniel-KoA 'n swak substraat vir die ensiem is.

Opmerking:

Metielsitroensuur is *in vitro* getoets op ensieme wat in wisselwerking is met sitroensuur en isositroensuur. Daar is gevind dat hierdie metaboliet sitraatsintetase, akonitase en die NAD- en NADP-gekoppelde isositraatdehidrogenase inhibeer. Hierdie inhibisie was kompetender van aard in die geval van akonitase, en die  $K_I$  in die laasgenoemde ensieme was tussen die grense 1,5-7,6mmol.

Fosfofruktokinase word ook deur metielsitroensuur geïnhibeer. 'n Inhibisie van 50% word by 'n metielsitroensuurkonsentrasie van 1mmol verkry. Asetiel-KoA-karboksilase word deur metielsitroensuur geaktiveer met 'n  $K_A$  van 2,8mmol.

Die  $K_m$  (3,3mmol) van metielsitroensuur vir die mitochondriale sitraatdraer is ongeveer tien keer hoër as die  $K_m$  (0,26mmol) vir sitroensuur. Die trikarboksilaatdraer kan ook geïnhibeer word deur lae konsentrasies (0,2mmol) metielsitroensuur, veral wanneer die konsentrasie sitroensuur naby die veronderstelde  $K_m$ -waarde is.

Dus akkumulاسie van metielsitroensuur binne die mitochondrion, mag lei tot inhibisie van ensieme in die sitroensuursiklus, en daardeur 'n bydrae lewer tot die ketogenese en hipoglisemie wat by metielmaloonsuururie pasiënte waarneembaar is.

Metiëlmaloonsuururie mag ook die gevolg wees van 'n vitamien-B<sub>12</sub>-tekort. Hierdie tekort kan voorkom as gevolg van 'n gastro-intestinale defek of 'n tekort aan dieet inname van hierdie essensiële vitamien. Laasgenoemde kom veral voor by borsgevoede babas van moeders wat op 'n streng vegetariese dieet is.

Weens die belang van korrekte vroegtydige diagnose het Nakamura *et al.*<sup>35</sup> 'n prenatale diagnostiese metode ontwikkel waardeur met behulp van gaschromatografie die inhoud van metiëlmaloonsuur in amnionvloeistof en urine van swanger heterosigotiese vroue met 'n hoë risikofaktor bepaal kan word. Prenatale diagnose in amnioselkulture is ook al suksesvol uitgevoer. Willard & Rosenberg<sup>36</sup> gee 'n uitstekende oorsig van die huidige kennis op hierdie terrein.

Op die sellulêre vlak kan prenatale diagnose en bestudering van die siektetoestand gedoen word deur ook van leukosiet- en fibroblastselkulture<sup>37,38</sup> gebruik te maak.

#### 4.3.3.3 Samevattend

1. By metiëlmaloonsuuremie is die metaboliese fout geleë in die tweestapomsetting van D-metiëlmaloniel-KoA na suksiniel-KoA. Vitamien B<sub>12</sub> speel ook hierin 'n rol.
  2. Weens die hoë uitskeiding van metiëlmaloonsuur in die urine, is die siektetoestand maklik opspoorbaar met behulp van gaschromatografiese prosedures.
  3. In die urine van 'n pasiënt wat ly aan hierdie siektetoestand is groot hoeveelhede metiëlmaloonsuur, ureum, metië-
- 132

sitroensuur asook moontlik adipiensuur, gevind. Dit is in ooreenstemming met gevalle wat in die literatuur beskryf is.

4. Prenatale diagnose van hierdie siektetoestand is met behulp van verskillende tegnieke moontlik. Die siektetoestand kan behandel word.<sup>39,40</sup>

#### 4.3.4 "Maple syrup"-uriensiekte\*

##### 4.3.4.1 Inleidend

Babas wat aan hierdie aangebore siektetoestand ly, lyk op die oog af normaal direk na geboorte. Na die 1ste week begin voedingsprobleme en oormatige vomering. Spierhipertonisiteit en konvulsies mag ook voorkom. Hierdie pasiënt se urine het 'n baie tipiese reuk. Pasiënte wat aan hierdie siektetoestand ly, sterf gewoonlik binne die 1ste week na geboorte, en meestal binne die eerste lewensjaar. Geen pasiënte is al beskryf waarvan die lewens tydperk langer as 2 jaar was nie. Indien 'n onbehandelde pasiënt vir 'n tydperk wel lewe, is ernstige breinbeskadiging altyd teenwoordig.

##### 4.3.4.2 Die metaboliese defek

Die biochemiese oorsaak van hierdie toestand word gedefinieer as 'n aangebore defek van die vertakte-ketting-ketosuurdehidrogenase-ensiem wat lei tot die akkumulasie van 2-ketoïso-

---

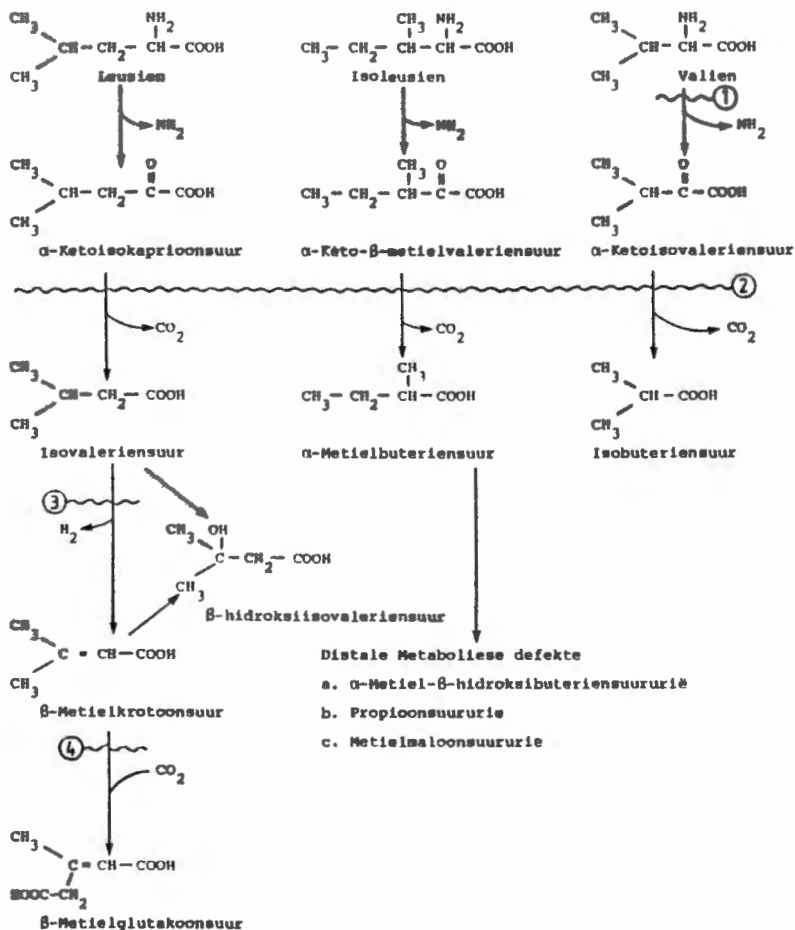
\* Staan ook in die literatuur bekend as "Branched chain ketonuria", "Branched chain ketoaciduria" (B.C.K.A.) of "Maple Syrup Urine Disease" (M.S.U.D.)

kaprioonsuur, 2-keto-3-metielvaleriensuur en 2-ketoisovaleriensuur asook hulle onderskeie amino- en hidroksisure (figuur 4.20).

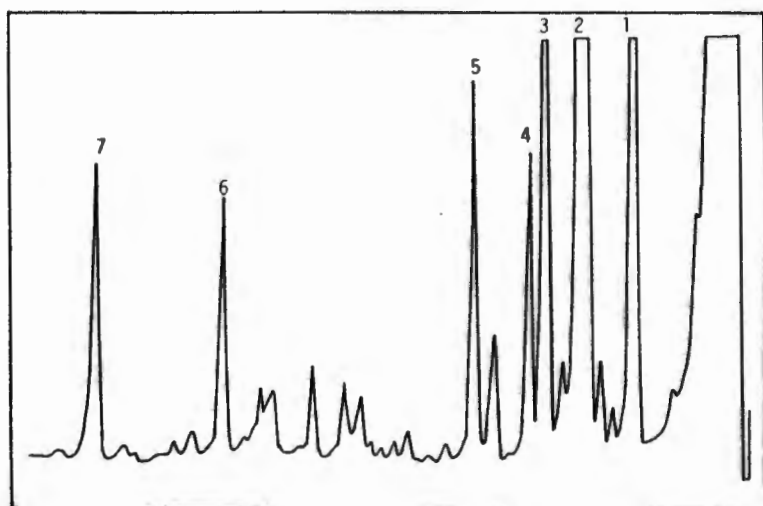
Na aanleiding van die oormaat ketosure wat ook in die urine van hierdie pasiënte teenwoordig is, soos uit figuur 4.21 waarneembaar is, moet die gevolgtrekking gemaak word dat die primêre defek vir "maple syrup"-uriensiekte, en in al sy variante tipes wat al bestudeer is, 'n verlaagde kapasiteit in oksidatiewe dekarboksilasie van die drie ketosure met vertakte kettings, is. Die reeks reaksies wat by oksidatiewe dekarboksilasie betrokke is (figuur 4.22) laat onwillekeurig die vraag na vore kom watter reaksie spesifiek betrokke is. Dit is moontlik dat verskillende pasiënte mutasies van verskeie stappe mag voorstel. Alhoewel die spekulasie voor die handliggend en interessant is, is geen eksakte gegewens tot op die huidige tydstip hieroor beskikbaar nie. Die probleem is om 'n oplosbare aktiewe preparaat te verkry waarin elke stap afsonderlik bestudeer kan word.

Rudiger *et al.*<sup>41</sup> het so 'n benadering beskryf waarin hy weefsel van 'n pasiënt met "maple syrup"-uriensiekte gebruik het. Hy maak die gevolgtrekking dat die dekarboksilasie-ensiem mutant is. Elsas *et al.*<sup>42</sup> ondersteun hierdie waarneming na aanleiding van sy studie wat op fibroblaste van 'n ander pasiënt met "maple syrup"-uriensiekte uitgevoer is.

In die urienmonster van 'n pasiënt met "maple syrup"-uriensiekte wat geanaliseer is, is die drie vertakte 2-ketosure die mees uitstaande waarnemings in die metaboliese profiel (figuur 4.21). Daar is gevind dat die 2-keto-isokaprioonsuurkonsentrasie baie hoër is as die konsentrasies van 2-keto-isovalerien=

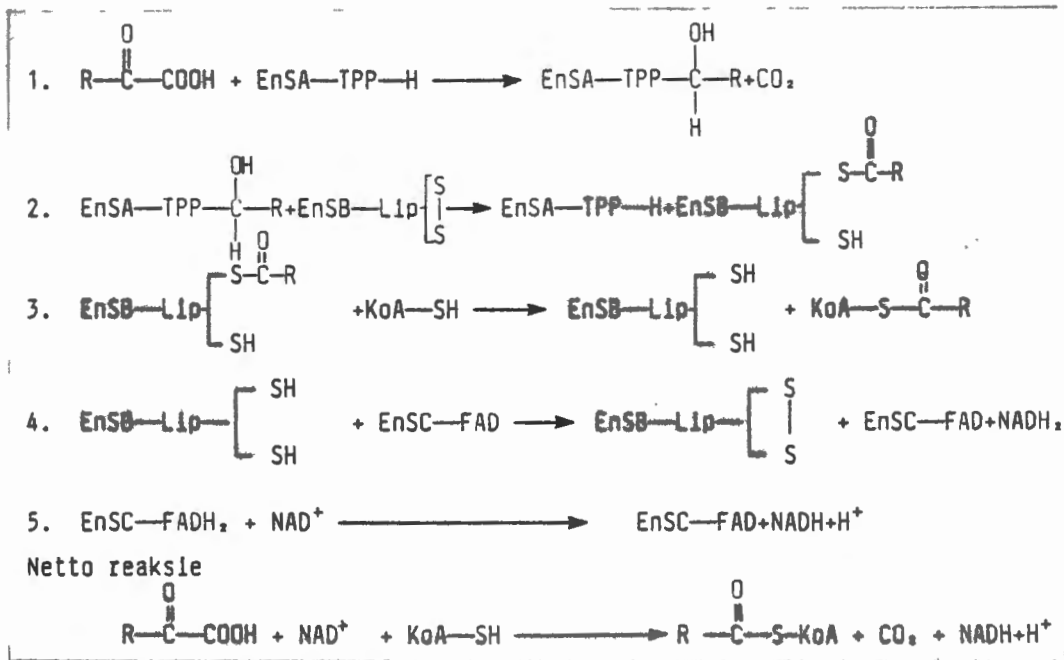


FIGUUR 4.20: Die metaboliese blok in "maple syrup"-uriënsiekte



FIGUUR 4.21 Urinêre organiese sure van 'n pasiënt met "Maple-syrup"-uriensiekte

- 1 = 2-ketiosivaleriaan-diTMS;
- 2 = 2-ketoisokaproë-diTMS;
- 3 = 2-keto-3-metielvalerien-diTMS;
- 4 = Maloon-diTMS (interne standaard);
- 5 = N-asetielvalien-monoTMS;:
- 6 = Hippuur-diTMS;
- 7 = n-Tetrakosaan (eksterne standaard)



FIGUUR 4.22 Oksidatieve decarboxylatie van keto-zuren

suur en 2-keto-3-metielvaleriensuur onderskeidelik.

Uit hierdie spesifieke gegewens kan daar volgens Lancaster *et al.*<sup>43</sup> afgelei word dat die pasiënt aan die klassieke vorm van "maple syrup"-uriensiekte gely het.

Duran *et al.* (1978)<sup>44</sup> het 'n pasiënt met 'n variante vorm van hierdie siektetoestand beskryf, waarin 2-keto-3-metielvaleriensuur in die hoogste konsentrasie in die urine aanwesig was.

Die voorkoms van die bepaalde kombinasie van ketosure naamlik 2-keto-isovaleriensuur, 2-keto-isokaproësuur, en 2-keto-3-metielvaleriensuur, is baie spesifiek vir "maple syrup"-uriensiekte. Die onderskeie konsentrasies van bogenoemde kan 'n aanduiding gee van die tipe "maple syrup"-uriensiekte waaraan die pasiënt ly. Verskeie ander sure wat nie spesifiek aan hierdie siektetoestand gekoppel is nie, word ook in die urine aangetref. In 'n publikasie van Jellum *et al.*<sup>45</sup> word 'n aantal van hierdie sure vermeld.

Tanaka *et al.* (1982)<sup>46</sup> het in 'n onlangse artikel ook na 'n aantal van hierdie sure wat nie konsekwent voorkom nie, verwys. Die gegewens van bogenoemde outeurs word in tabel 4.8 saamgevat.

Die welslae wat behaal word met 'n dieet wat lae konsentrasies aminosure met vertakte kettings bevat, dui daarop dat die skadelike effekte van hierdie siektetoestand die gevolg van die abnormale akkumulasie van metaboliëte proksimaal tot die metaboliese weg is, en nie die gevolg van 'n tekort aan metaboliëte distaal tot die metaboliese blok is nie.

TABEL 4.8: Reeds aangetoonde kataboliete in die urine van M.S.U.S.-pasiente

| Kataboliet                        | Stationere fase | Verwysing                                                             |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------|
| i)                                |                 |                                                                       |
| Konsekvente voorkoms in urine     |                 |                                                                       |
| 2-ketoisovaleriaansuur*           | OV-1; OV-17;    | Lancaster <i>et al.</i> <sup>43</sup>                                 |
| 2-ketoisokaproësuur*              | OV-22*; SE-30   | Duvan <i>et al.</i> <sup>44</sup> Jellum <i>et al.</i> <sup>45</sup>  |
| 2-keto-3-metielvaleriensuur*      |                 | Tanaka <i>et al.</i> <sup>46</sup>                                    |
| ii)                               |                 |                                                                       |
| Nie-konsekvente voorkoms in urine |                 |                                                                       |
| Melksuur                          | OV-1; SE-30     | Tanaka <i>et al.</i> <sup>46</sup> Jellum <i>et al.</i> <sup>45</sup> |
| 2-hidroksi-isovaleriensuur        | OV-1; SE-30     | Tanaka <i>et al.</i> <sup>46</sup> Jellum <i>et al.</i> <sup>45</sup> |
| 2-ketoglutaarsuur                 | OV-1            | Tanaka <i>et al.</i> <sup>46</sup>                                    |
| Piruviesuur                       | OV-1            | Tanaka <i>et al.</i> <sup>46</sup>                                    |
| Hippuersuur*                      | OV-1; OV-22*    | Tanaka <i>et al.</i> <sup>46</sup>                                    |
| 2-hidroksi-isobottersuur          | SE-30           | Jellum <i>et al.</i> <sup>45</sup>                                    |
| 2-ketobottersuur                  | SE-30           | Jellum <i>et al.</i> <sup>45</sup>                                    |
| 2-metiel-8-hidroksibottersuur     | SE-30           | Jellum <i>et al.</i> <sup>45</sup>                                    |
| 3-hidroksi-isovaleriensuur        | SE-30           | Jellum <i>et al.</i> <sup>45</sup>                                    |
| Asetoasynsuur                     | SE-30           | Jellum <i>et al.</i> <sup>45</sup>                                    |
| 2-hidroksi-3-metielvaleriensuur   | SE-30           | Jellum <i>et al.</i> <sup>45</sup>                                    |
| N-Asetielvalien*                  | OV-22           |                                                                       |

\* Soos self gevind is by 'n pasiënt met "maple syrup"-uriensiekte met behulp van 'n OV-22 gepakte glaskolom

Hoe dra hierdie opgehoopte metaboliëte by tot die manifestasie van "maple syrup"-uriensiekte?

Kliniese waarnemings dui daarop dat die akute simptome van hierdie siektetoestand, in 'n groter mate toegeskryf kan word aan die abnormaal hoë konsentrasies van leusien as aan die oormaat van die ander twee vertakte aminosure isoleusien en valien.<sup>47</sup>

Dit is tans nog nie duidelik of dit die oormaat aminosure, hulle onderskeie ketosure of 'n ander metaboliëte is wat die betekenisvolste is nie. Dit is wel bekend dat verhoogde konsentrasies van die vertakte-kettingaminosure:

- i) aminosuurtransport beïnvloed en 'n ingreep maak op die beskikbaarheid van vrye aminosure;
- ii) proteïenbiosintese inhibeer, en
- iii) vertraagde proteolipied en miëliënsintese tot gevolg het.

Die vertakte-kettingketosure oefen kompeterende inhibisie op glutamiënsuurdekarboksilasie uit - 'n reaksie wat van groot belang geag word in breinfunksie.

Suurstofopname deur breinweefsel word aansienlik verlaag in die teenwoordigheid van 2-ketoiësokaproësuur. Hierdie is die enigste ketosuur wat miëlinering in kulture van serebellumweefsel, asook piruvaatdekarboksilasie, inhibeer.<sup>48</sup>

Hierdie uiteenlopende waarnemings dui daarop dat 'n wye reeks faktore bydra tot die tekens en simptome van hierdie siektetoestand.

#### 4.3.4.3 Samevattend

1. "Maple syrup"-uriensiekte is 'n siektetoestand wat 'n kort lewensverwagting tot gevolg het. Die aangebore biochemiese defek is geleë in die verlaagde oksidatiewe dekarboksilasie van vertakte-kettingketosure. Hierdie verlaagde aktiwiteit manifesteer in die ophoping van vertakte-kettingamino- en ketosure (figuur 4.21).
2. Die primêre diagnose van hierdie siektetoestand berus by die voorkoms van die 3 ketosure, 2-ketoisovaleriensuur; 2-ketoisokaproësuur en 2-keto-3-metielvaleriensuur, soos in die metaboliese profiel (figuur 4.21) waargeneem kan word. Diagnose geskied meestal met behulp van gaschromatografiese prosedures.<sup>49,50,51,52,53</sup>
3. Meestal kom daar ook ander sure in minder beduidende konsentrasies in die urine van pasiënte wat aan hierdie siektetoestand ly, voor. In die bepaalde monster wat geanaliseer is, is die voorkoms van hippuursuur (soos ook deur Tanaka *et al.*, 1983<sup>46</sup> gevind) en N-asetielvalien die verdere mees uitstaande kenmerk.
4. Die opgehoopte metaboliete, veral 2-ketoisokaproësuur, dra by tot die verdere kliniese beeld van die pasiënte.

#### 4.3.5 Aminosuurwanabsorpsie defek

##### 4.3.5.1 Inleidend

Hierdie moontlike defek is 'n unieke geval wat met behulp van 'n siftingsprogram vir tirosielurie in 'n plaaslike sorg- en rehabilitasiesentrum opgespoor is.

Met  $\alpha$ -nitroso-naftol kleur die urine van hierdie pasiënt oranje-rooi. Hierdie abnormale resultaat het gedui op 'n hoë uitskeiding van tirosien-metaboliete. Die pasiënt is 33 jaar oud, met 'n intellektuele ontwikkeling van 2-3 jaar. Chromosomale ondersoek toon 46xy, wat vereenselwig word met 'n normale manlike kariotipe.

#### 4.3.5.2 Kliniese beeld

Hierdie pasiënt se kliniese beeld was soos volg: klein hande en voete; kort postuur; normale kopomtrek; growwe gesig met makro glossuur; verhoogde refleksie; fleksiegebreke van elm-boog, polsgewrig en knie; normale sekondêre geslagskenmerke; normale haargroei-patroon en stotterende spraak.

#### 4.3.5.3 Biochemiese beeld

'n Aantal aminosure word deur die pasiënt in verhoogde konsentrasies uitgeskei. Volgens Mienie<sup>54</sup> is hierdie aminosure tirosien (65mg/gm kreatinien), fenielalanien (25mg/gm kreatinien), triptofaan, 3-metiel-histidien en alanien. Hierdie aminosure word in relatief hoë konsentrasies uitgeskei. Hy vind verder ook dat 1-metielhistidien en histidien in hoë konsentrasies uitgeskei word. Mienie het 'n fenielalanien-toleransietoets op die pasiënt uitgevoer en vind dat byna geen fenielalanien deur die pasiënt geabsorbeer word nie. Dit het die gedagte laat ontstaan dat alle aromatiese aminosure moontlik gewanabsorbeer word deur die pasiënt.

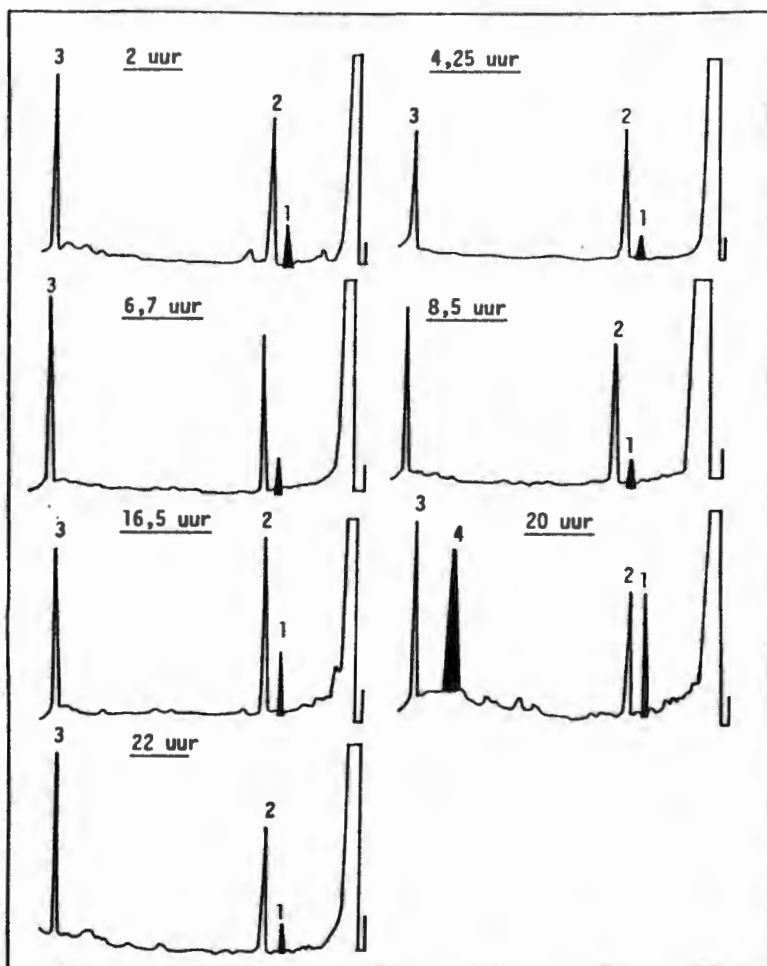
'n Tirosien- sowel as 'n triptofaan-toleransietoets is vervolgens deur Mienie op die pasiënt uitgevoer. Hieruit vind hy dat tirosien byna gladnie en triptofaan in 'n mindere mate geabsor-

beer word. Die pasiënt absorbeer xylose normaal en dus is die moontlikheid van algemene wanabsorpsie (as gevolg van verminderde absorptiewe oppervlakte), uitgeskakel. Mienie neem ook waar dat 4-hidroksiefenole in die urine van die pasiënt teenwoordig is. Hy kan hierdie fenoliese verbindings egter nie identifiseer nie. Weens die feit dat hierdie p-hidroksi-fenolverbindings ekstraheerbaar, fraksioneerbaar en gedeeltelik identifiseerbaar is volgens die prosedure soos in Hoofstuk 3 beskryf, is daar besluit om die fenielalanientoleransietoets te herhaal en spesifiek te kyk na watter p-hidroksi-fenolverbindings in die urine van hierdie pasiënt uitgeskei word. Fenielalanien is mondelings toegedien teen 'n konsentrasie van 100mg fenielalanien per kilogram liggaams= massa.

Urienmonsters is oor 'n tydperk van 24 uur versamel. Die tyds= interval tussen elke urienmonster is nie kontroleerbaar soos wanneer met serum gewerk word nie. Uit die resultate soos in figuur 4.23 aangetoon, kan gesien word dat daar nie 'n onmiddellike verhoging in die uitskeiding van organiese sure in die urine van die pasiënt is nie.

Na 8,5 uur verhoog die uitskeiding van 'n onbekende kataboliet tot 'n konsentrasie ongeveer gelyk aan 'n derde van die interne standaard (maloonsuur). Ongeveer 20 uur na inname van fenielalanien word 'n maksimum uitskeiding van hierdie metaboliet verkry, waarvan die konsentrasie ongeveer gelyk is aan die konsentrasie van die interne standaard.

Na ongeveer 22 uur lyk dit asof die konsentrasie van die onbekende metaboliet teruggekeer het na 'n vlak soos voor die fenielalanientoediening.



FIGUUR 4.23 : Totale organiese suuruitskeiding tydens die fenielalanientoleransietoets van 'n pasiënt met 'n moontlike fenielalanien absorpsie defek  
1 = Onbekend; 2 = Maloonsuur (Interné standaard);  
3 = n-Tetrakosaan (Eksterne standaard); 4 = Onbekend.

Bogenoemde waarneming is in ooreenstemming met die bevindinge van Mienie<sup>54</sup> soos gebaseer op die  $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naftol toets. Daar is gepoog om hierdie onbekende kataboliet te identifiseer.

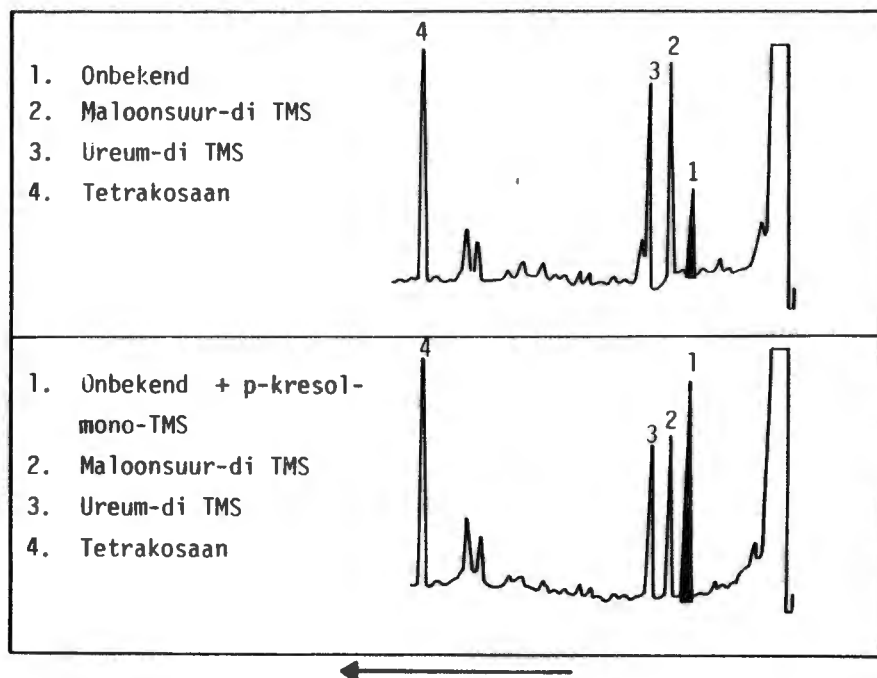
Onder die gestelde fraksioneringskondisies (Hoofstuk 3.2.3.4) is die metileeneenheidwaarde van hierdie verbinding 12,7. Hierdie waarde word vereenselwig met 4-hidroksitolueen of p-kresol.

'n Urienmonster van die pasiënt is geneem en verdeel, waarna by een deel p-kresol eksogeen bygevoeg is. Die organiese suurmetaboliete is uit hierdie monsters geëkstraheer en gefraksioneer soos in figuur 4.24 aangedui word. Uit figuur 4.24 asook uit die metileeneenheidwaarde blyk dit dat die onbekende metaboliet p-kresol is.

Dit is bekend dat bakteriële feniellalanienafbraakprodukte oorsprong kan gee tot die uitskeiding van 'n groot verskeidenheid 4-hidroksifenolverbindinge.<sup>55</sup>

Ongeabsorbeerde feniellalanien kan deur die dermflora afgebreek word na verskeie produkte soos feniellasyneur, feniellamien, feniellpropioonsuur, bensoësuur en tirosien. Tiro-sien kan verder tot 4-hidroksifeniellasyneur, 4-hidroksiben-soësuur, 4-hidroksifeniellpropioonsuur, fenol en p-kresol afgebreek word.

Hierdie bakteriële afbraakprodukte kan deur die pasiënt geabsorbeer word waarna dit verdere endogene afbraak kan ondergaan om ten slotte in die urine uitgeskei te word. Die meeste van die bakteriële afbraakprodukte van feniellalanien sowel



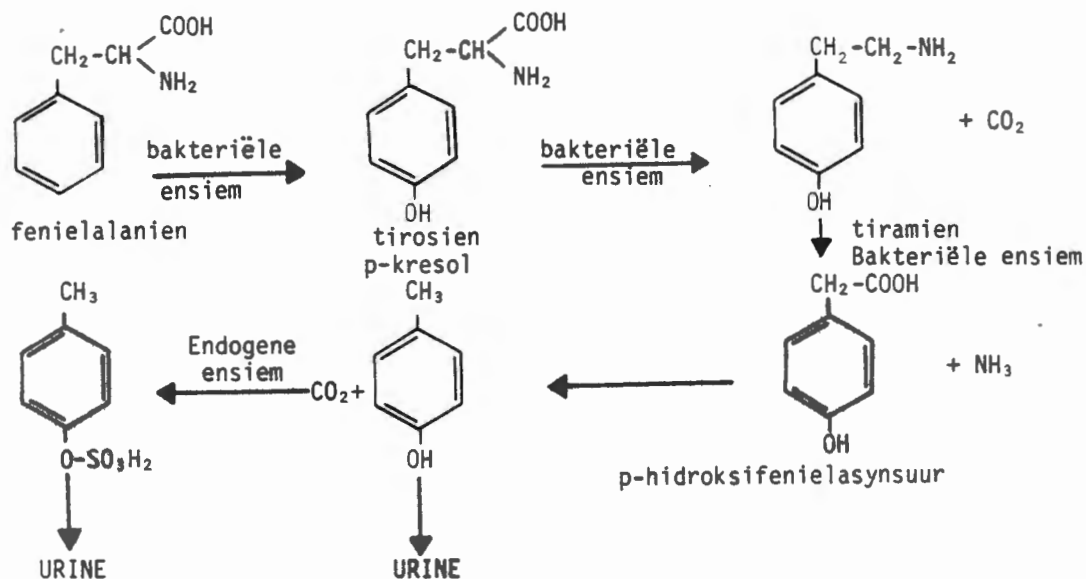
FIGUUR 4.24 Organiese suuruitskeiding van 'n pasiënt met 'n  
moontlike fenielalanien absorpsie defek voordat  
en nadat p-kresol eksogeen bygevoeg is

as tirosien, is struktureel verwant aan tirosien en kan dus in voldoende konsentrasies as kompeterende inhibeerders vir die ensieme van die kataboliese weg optree.<sup>56,57</sup>

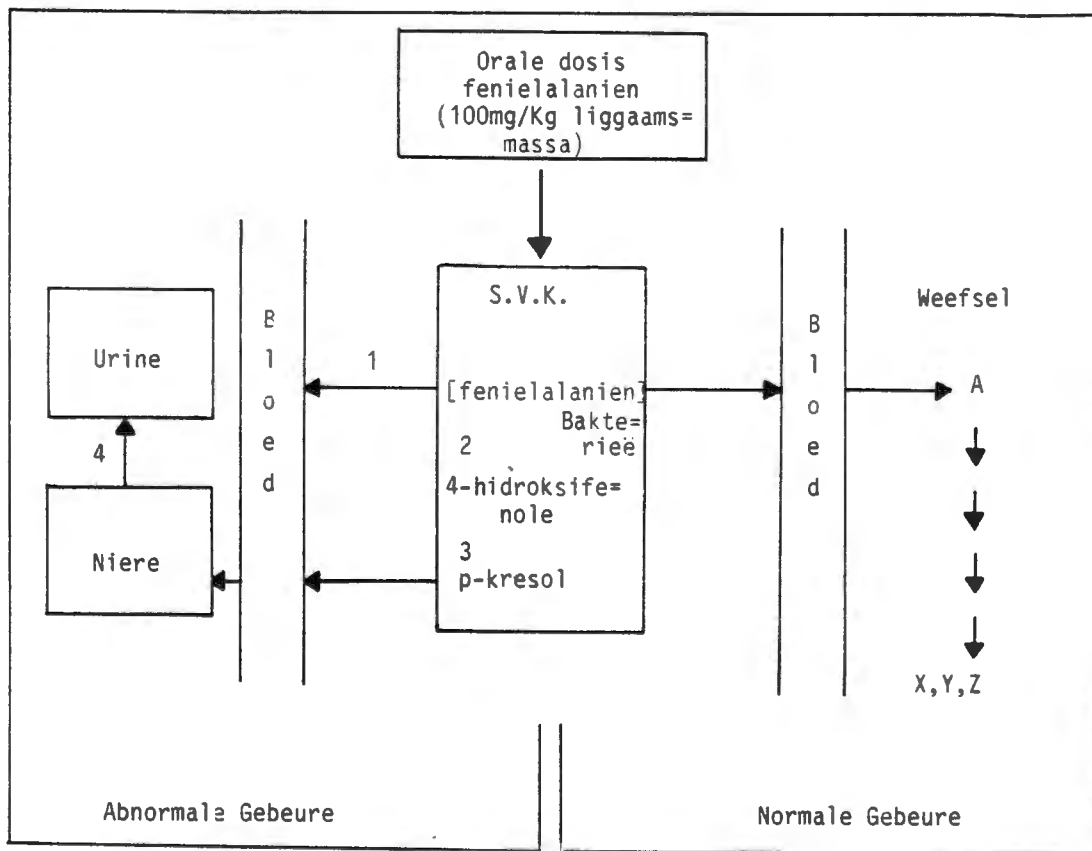
Teen voldoende konsentrasies sal die kataboliese weg van tirosien in so 'n mate vertraag kan word dat die vorming van 4-hidroksifenole uit tirosien kan plaasvind. So 'n moontlike bakteriële afbraakweg van die ongeabsorbeerde fenielalanien by hierdie pasiënt is in figuur 4.25 uiteengesit.

'n Model is saamgestel wat die moontlike probleem in perspektief kan stel (figuur 4.26). Hierin word gestel dat

1. die bepaalde pasiënt nie fenielalanien kan opneem nie;
2. die opgehoopte aminosuur deur dermflora afgebreek word tot 'n aantal 4-hidroksifenolverbindings;
3. van hierdie verbindings mag baie moontlik p-kresol wees, en
4. die abnormale kataboliet deur die niere in die urine van die pasiënt uitgeskei word.



FIGUUR 4.25: Moontlike bakteriële afbraak van feniëalanien by 'n pasiënt met 'n feniëalanienwanabsorpsiesindroom



FIGUUR 4.26 Model-aminosuurwanabsorptiesindroom

#### 4.4 Literatuurverwysings

1. CHALMERS, R.A., HEALY, M.J.R., LAWSON, A.M., HART, J.T. & WATTS, R.W.E. (1976). Clin. Chem. No. 8. 22: 1292.
2. CHALMERS, R.A., HEALY, M.J.R., LAWSON, A.M. & WATTS, R.W.E. (1976). Clin. Chem. No. 8. 22:1288.
3. MUSKIET, F.J.A., FREMOUW-OTTEVANGERS, D.C., WOLTERS, B.G. & DE VRIES, J.A. (1977). Clin. Chem. No. 5. 23:863.
4. JAAKONMAKI, P.I., KNOX, K.L., HORNING, E.C. & HORNING, M.G. (1967). Eur. J. of Pharmacology 1:63.
5. SANDLER, M., RUTHVEN, C.R.J., GOODWIN, B.L., REYNOLDS, G.P., RAO, V.A.R. & COPPEN, A. (1979). Nature 278:357.
6. GROLLMAN, A. & GROLLMAN, E.F. (1970). Pharmacology and Therapeutics. Seventh Edition. Lea & Febiger.
7. GOODMAN, L.S. & GILMAN, A. (1967). The Pharmacological Basis of Therapeutics. Third Edition. The Mac= Millan Company, New York.
8. FINNIE, M.P.A., ERSSER, R.S., SEAKINS, J.W.T. & SNEDDEN, W. (1970). Clin. Chim. Acta. 70:171.
9. DOMINO, EDWARD, F. (1965). Drill's Pharmacology in Me= dicine. Third Edition. Chap. 23: Psychosedative Drugs I: Substituted Phenothiazines Reserpine and Derivatives. McGraw-Hill Book Company New York.
10. EXTRA PHARMACOPOCIA MARTINDALE TWENTY-EIGHT EDITION. (1982). Edited by E.F. Reynolds. The pharmaceu= tical press London.
11. ALM, J., HAGENFELDT, L. & LARSON, A. (1978). Ann. of Clin. Biochem. 15:245.
12. LAWSON, A.M., CHALMERS, R.A. & WATTS, R.W.E. (1976). Clin. Chem. No. 8. 22:1283.
13. WATTS, R.W.E. (1978). Experientia 34:143.

14. LEHNERT, W. (1979). Monatsschr. Kinderheilkd. 127: 665.
15. WATTS, R.W.E., CHALMERS, R.A. & LAWSON, A.M. (1975). Lancet I:368.
16. CHALMERS, R.A., WATTS, R.W.E. & LAWSON, A.M. (1977). Ann. of Clin. Biochem. 14:149.
17. REINECKE, C.J., MIENIE, L.J., HITZEROTH, H.W. & OP'T HOF, J. Screening for inborn errors of metabolism among mentally retarded patients: outcome of a survey undertaken at the Witrand Care and Rehabilitation Centre.
18. RENAURT, N.W. (1966). New England Journal of Med. 274:384.
19. PENROSE, L. & QUASTEL, J.H. (1937). Biochem. J. 31:266.
20. THOMAS, G.H. & HAVELL, R.R. (1973). Selected Screening Tests for Genetic Metabolic Diseases. Chicago: Year Book Medical Publishers Inc.
21. GERBER, M.J. & GERBER, D.A. (1969). Pediatrics 43:40.
22. MROCHEK, J.E., DINSMORE, S.R. & OHRT, D.W. (1973). Clin. Chem. 19:927.
23. LA DU, B.N. & GJESSING, L.R. (1978). (In J.B. Stanluny J.B. Wyngaarden en D.S. Fredrickson Red. The metabolic basis of inherited disease. McGraw-Hill Book Company).
24. UDENFRIEND, S. & COOPER, J.R. (1952). J. Biol. Chem. 194:503.
25. CHALMERS, R.A. & WATTS, R.W.E. (1974). Clin. Chem. Acta. 55:281.
26. RECENT ADVANCES IN CLINICAL BIOCHEMISTRY. Vol. 2. Chap. 5. p.110.
27. FENTON, W.A. & ROSENBERG, L.E. (1978). Ann. Rev. Genet. 12:223.

28. GOODMAN, S.I., MOE, P.G., HAMMOND, K.B., MUDD, S.H. & UHLENDORP, B.W., (1970). *Biochem. Med.* 4:500.
29. ROSENBERG, L.E., LILLJEQVIST, A. & HSIA, Y.E. (1968). *New England J. of Med.* 24:1319.
30. DREYFUS, P.M. & DUBE, V.E. (1967). *Clin. Chem. Acta.* 15:525.
31. LEVY, H.L., MUDD, S.H., SCHULMAN, J.D., DREYFUS, P.M. & ABELES, R.H. (1970). *The American J. of Med.* 48:390.
32. DURAN, M., BRUINVIS, L., KETTING, D. & WADMAN, S.K., (1978). *J. of Inherited Metabolic Diseases.* 1:105.
33. OBERHOLZER, V.G., LEIEN, B., ANNBURGESS, R. & YOUNG, W.F. (1967). *Arch. Dis. Childh.* 42:492.
34. CHEEMA DHALDI, S., LEZNOFF, C.C. & HALPERIN, M.L. (1975). *Pediatric Research.* 9:905.
35. NAKUMURA, E., ROSENBERG, L.E. & TANAKA, K. (1976). *Clin. Chem. Acta.* 68:127.
36. WILLARD, H.F. & ROSENBERG, L.E. (1979). *Biochem. Genetics.* 17:57.
37. ROSENBERG, L.E., LILLJEQVIST, A. & HSIA, Y.E. (1968). *Science.* 162:805.
38. JELLUM, E. (1977). *J. of Chromatogr.* 143:427.
39. STOKKE, O., ELDJAM, L. (1967). *Scandinavian J. of Clin. Lab. Investigation.* 20:313.
40. NYHAN, W.L., FAWCETT, N., TOSHIYUKI, A., RENNERT, O.M. & JULIUS, R.L. (1973). *Pediatrics* No. 3. 51:539.
41. RUDIGER, H.W., LANGENBECK, U., SCHULZE-SCHENEKING, M. & GOEDDE, H.W. (1972). *Human Genetics* 14:257.
42. ELSAS, L.J., PRIEST, J.H., WHEELER, F.B., DANNER, D.J. & PASK, B.A. (1974). *Metabolism* 23:569.

43. LANCASTER, G., MAMER, O.A. & SCRIVER, C.R. (1974).  
Metabolism 23:257.
44. DURAN, M., TIELENS, A.G.M., WADMAN, S.K., STIGTER, J.C.M.  
& KLEIJER, W.J. (1978). Acta Paediatrica Scandi-  
navica 67:367.
45. JELLUM, E., STØRSETH, P., ALEXANDER, J., HELLAND, P.,  
STOKKE, O. & TEIG, E. (1976). J. of Chromatogr.  
126:487.
46. TANAKA, K. & HINE, D.G. (1982). J. of Chromatogr.  
239:312.
47. SNYDERMAN, S.E., NORTON, P.M., ROITMAN, E. & HOLT, L.E.  
Pediatrics 34:454.
48. DREYFUS, P.M. & PRENSKY, A.L. (1967). Nature. 214:276.
49. GEHRKE, C.W. & TAKEDA, J. (1973). J. of Chromatogr.  
76:63.
50. ZANETTA, J.P. & VINCEDON, G. (1973). J. of Chromatogr.  
76:91.
51. STAFFORD, M., HORNING, M.G. & ZLATKIS, A. (1976). J.  
of Chromatogr. 126:495.
52. SMITH, D.H., ACHENBACH, M., YEAGER, W.J., ANDERSON, P.J.,  
FITCH, W.L. & RINDFLEISCH, T.C. (1977). Anal.  
Chem. No. 11. 49:1623.
53. SMITH, D.J., YEAGER, W.J. & RINDFLEISCH, T.C. (1978).  
Anal. Chem. No. 11 50:1585.
54. MIENIE, L.J. (1981). Tirosielurië by geestelik ver-  
traagde pasiënte. Verhandeling vir M.Sc.-graad,  
PU vir CHO.
55. HANSEN, S., PERRY, T.L. & LESK, D. (1972). Clin. Chim.  
Acta. 39:71.
56. FELLMAN, J.H., VAN BELLINGHAM, P.J., JONES, R.T., &  
KOLER, R.D. (1969). Biochemistry No. 2 8:615.
57. JACOBY, A. & LA DU, B. (1964). J. Biol. Chem. 239:419.

SAMEVATTENDE AANBEVELINGS

Uit die resultate van hierdie verhandeling kan ten slotte die volgende samevattende aanbevelings gemaak word naamlik:

1. Die keuse van die korrekte ekstraksie prosedure vir die bepaalde doel is belangrik.

Die organiesesuururie is 'n groep van komplekse metabooliese siektetoestande, wat nie altyd met eenvoudige siftingstoetse aantoonbaar is nie. Gevorderde metodes word gebruik vir die identifisering en karakterisering van hierdie siektetoestande. Dit is van groot belang dat die analis van die onderskeie voor- en nadele van elke ekstraksie prosedure bewus is, en 'n sodanige metode kies wat by die omstandighede van die laboratorium en die doel van die projek aanpas. Met hierdie ekstraksie prosedure moet hy goed vertrouud raak.

2. Die gaschromatografiese fraksioneringsproses moet goed gestandardiseer wees

Daar moet gepoog word om die fraksionerings kondisies sodanig te standardiseer dat alle pieke individueel waarneembaar is tussen werkbare temperatuurgrense.

3. Die totale prosedure moet sodanig saamgestel wees dat die verskil tussen kontrole en organiesesuururie monsters duidelik aantoonbaar is

Die interpretasie van data word aansienlik vergemaklik indien daar op 'n eenvoudige manier onderskei kan word watter monsters normaal of abnormaal is. By samestelling van die prosedure moet die mate van data-interpretasie reeds in aanmerking geneem word.

4. Data van die pasiënt moet so volledig as moontlik beskikbaar wees, veral ten opsigte van faktore wat tot 'n vals positiewe beeld kan lei

'n Groot aantal eksterne faktore beïnvloed die metaboliese profiel. Indien hierdie faktore vooraf bekend is, word die onderskeid tussen die profile van pasiënte met nie-organiesesuururië en organiesesuururië vergemaklik. Veral geneesmiddels dra by tot vals positiewe resultate. Soos uit die siftingsresultate van die organiesesure in hoofstuk 4.2.4.4.2 gesien kan word, moet abnormale resultate 'n aantal kere herhaal word, sodat waninterpretasie van data as gevolg van eksterne faktore grootliks uitgeskakel kan word.

5. Die prosedure\* is geskik as 'n siftingstoets

Die prosedure waarvolgens organiese sure in urine analiseerbaar is, besit meer as die minimum vereistes wat aan 'n siftingstoets gestel word.

---

\*Met prosedure word bedoel die hele metode van agtereenvolgens, vloeistof-vloeistofekstrasie, gaschromatografiese fraksionering en identifisering volgens M.E.-waardes.

6. Bevestiging van piek identifikasie met behulp van massa= spektrometrie is noodsaaklik

Dit moet steeds in ag geneem word dat die identifikasie van organiese sure met behulp van gaschromatografie slegs voorlopig is. Die finale bevestiging is afhanklik van 'n absolute identifikasie van die verbindings met behulp van massaspektrometrie, aangevul deur 'n ensimologiese studie van die ensiem wat as defektief gepostuleer is.

## 6. ABSTRACT

### A GASCHROMATOGRAPHIC ANALYSIS OF ORGANIC ACIDURIA'S

Original Title: 'N GASCHROMATOGRAFIESE ANALISE VIR ORGANIESE=SUURURIE

MARAIS, CARL, HENRI. M.Sc.: 1985

One of the trends in modern biomedicine is the increasing understanding that many diseases may be linked in some way with deviations from, or alterations in, one or more of the several thousand biochemical reactions normally occurring in the human body. Among others, these deviations are reflected in the relative concentrations of metabolites or catabolites in the cells or the body fluids. This observation led to the development of the procedure of "metabolic profiling" which is a "multicomponent gaschromatographic analyses" that define metabolic patterns for a group of metabolically or analytically related metabolites.

The aim of this investigation was

1. to compare different methods which are currently used for the detection of urinary organic acids as a method for the detection of inborn errors of metabolism and
2. to use the method of choice to identify organic aciduria's associated with
  - a) mentally retarded patients and
  - b) a selected number of patients diagnosed for organic aciduria's by alternative methods.

Firstly, the principle methods for the isolation of acidic constituents from urine were compared, the first method is based on anion exchange which is still used in many laboratories. The second method is based on solvent extraction, usually with diethyl ether and/or ethyl acetate or pooled extracts of both. The major analytical problems with the ion exchange extraction of the organic acids were

1. the extensive amount of small quantities of unknown organic acids extracted, which greatly complicated the interpretation of the gaschromatographic profile and
2. the sulphates and phosphates which co-extracted with the organic acids and consequently obscure some of the organic acids.

Methods used to eliminate these interfering substances were

1. removal of sulphate and phosphate from the urine by column chromatography while maintaining the intrinsic organic acid content and
2. selective precipitation of the inorganic acids as bariumsalts prior to anion exchange chromatography. None of these methods were totally succesful.

The method of choice for the screening of inborn errors of metabolism was therefore the solvent extraction of organic acids.

The advantages of this method is

1. a relatively simple gaschromatographic profile is obtained, which is easily interpreted,
2. no interfering substances are co-extracted and
3. it's a rapid extraction procedure.

The organic acids extracted from urine were subsequently silylated with BSTFA and TMCS to TMS-derivatives. The amounts of internal standard (malonic acid), external standard (tetraacosane), BSTFA and TMCS (as silylating agents) to be added to the sample are determined by the creatinine value.

With temperature programming, the organic acids as TMS-derivatives were separated on a 2,1m x 4,0mm packed glass column of OV-22 (5% on 80 to 100 mesh Chromosorb WHP).

The sensitivity was adjusted to the extent that the internal standard gives a peak which is about  $\frac{2}{3}$  of full scale deflection. At the above setting any peak of a compound present in urine which exceeds this limit should be investigated.

The column was tested with a C<sub>10</sub> to C<sub>24</sub> paraffin standard, with which the individual peaks of the organic acid profiles were identified by their M.U. values.

Normal urine profiles and factors that influence this was defined. This method was further used as

1. a screening procedure for organic aciduria's on the patients with mental retardation of the E.S. le Grange

School, and

2. tested on patients previously diagnosed as Phenylketonuria and Maple Syrup Urine Disease.

Part of these results were presented at the following national meetings:

1. MARAIS, C.H., PRETORIUS, P.J. & REINECKE, C.J. (1981).  
A Comparative investigation on the Urinary excretion of organic acids: Sixth Congress South African Biochemical Society held at Rustenburg, Nov. 1981.
2. MARAIS, C.H., PRETORIUS, P.J. & REINECKE, C.J. (1982).  
A Comparative investigation on the urinary excretion of organic acids: Eight Congress South African Genetic Society held at University of the Witwatersrand, Johannesburg, April 1982.

The results on organic aciduria's associated with the group of mentally handicapped children were included in a publication on a genetic/diagnostic study undertaken at the institution for these children:

Op't Hof, J., Venter, P.A., Du Toit, Joan L., Gericke, G.S., Dawson, Bronwen; Coetzee, D.J., Mienie, L.J., Marais, C.H. and Reinecke, C.J.:

*A multidisciplinary diagnostic/genetic study on the 103 patients with mental retardation of the E.S. le Grange School.*

Journal of Mental Deficiency Research (1985). Vol. 29 (in press).

## 7. BEDANKINGS

- \* Prof. C.J. Reinecke vir sy leiding, raad en hulp.
- \* Prof. N.T. Malan vir die taalkundige versorging.
- \* Mev. E. Schutte vir die netjiese tikwerk.
- \* Mev. I. de Beer vir die natrek van die figure.
- \* Personeel en pasiënte van die E.S. le Grange Sentrum te Potchefstroom vir die geduldige versameling en verskaffing van monsters.
- \* My kollegas en vriende in besonder Dr. P.J. Pretorius van die Departement Biochemie, PU vir CHO vir hulle aanmoediging en belangstelling.
- \* My vrou Annelise vir haar opoffering en geduld.

## 8. AFKORTINGS

|                     |                                                              |
|---------------------|--------------------------------------------------------------|
| BSA;                | N,O-bis[trimetielsiliel]asetamied.                           |
| BSTFA;              | bis[trimetielsiliel]trifloorasetamied.                       |
| GLC;                | Gas-vloeistofchromatografie.                                 |
| GSC;                | Gas-soliedchromatografie.                                    |
| M.E-waarde;         | Melileeneenheidwaarde.                                       |
| M.S.U.S.;           | Maple syrup-uriensiekte.                                     |
| NAD <sup>+</sup> ;  | Nikotienamiedadeniendinukleotied (geoksi=deerde vorm).       |
| NADH;               | Nikotienamiedadeniendinukleotied (gere=duzeerde vorm).       |
| NADP <sup>+</sup> ; | Nikotienamiedadeniendinukleotiedfosfaat (geoksideerde vorm). |
| NADPH;              | Nikotienamiedadeniendinukleotiedfosfaat (gereduseerde vorm). |
| PKU;                | Fenielketonurie.                                             |
| TMS;                | Trimetielsilielradikaal.                                     |
| TMCS;               | Trimetielchloorsilaan.                                       |