

ALLANTOIINISISALDUSE MÄÄRAMINE MÄLETSEJALISTE URIINIS JA SEDA MÕJUTAVAD TEGURID

M. Ots, A. Pärn

Vatsas sünteesitava mikroobse proteiiniga katavad mäletsejalised suurema osa oma proteiinitarbest. Mikroobse proteiini sünteesi ulatust on võimalik hinnata puriinderivaatide kaudu, määrates nende sisaldust kas piimas või uriinis. Puriinaluste katabolismi lõpp-produktiks mäletsejaliste organismis on allantoiin, mis väljutatakse organismist uriiniga.

Antud töö eesmärgiks on välja selgitada tegureid, mis mõjutavad mäletsejaliste uriini allantoiinisalduse määramise täpsust. Et alati ei ole võimalik kohealt uriiniproovidest allantoiinisaldust määrata, siis proove säilitatakse külmkapis.

Uriisime, missugust mõju avaldavad proovide säilitamine ja säilitamistingimused allantoiinisalduse näitajatele.

Kirjanduse andmetel kogutakse uuritav uriin 5...7 päeva jooksul. Puhtasse kogumisnõusse pannakse eelnevalt 100 ml 10%-list H_2SO_4 (Chen, Gomes, 1992) või 10%-list HCl (Johnson *et al.*, 1998). Kogumisel tuleb jälgida, et uriini pH oleks alla kolme, vältimaks valgu mikrobioloogilist lagunemist. Puriinderivaatide kontsentratsioon uriinis on kõrge ja seepärast lahjendatakse uriini 3...4 korda. Uriini ühepäevane kogus kaalutakse ja lahjendatakse 4 kg-ni lammaste ja 50 kg-ni veiste korral. Võetakse analüüsideks vajalik kogus uriini, mis säilitatakse nõutud tingimustes.

Puriinderivaadid määratakse keemiliselt (Chen, Gomes, 1992) või vedelik-kromatograafiliselt (Martin-Orse *et al.*, 1996).

Materjal ja meetodika

Käesolevas töös uuriti allantoiinisaldust lammaste ja veiste uriinis keemilisel meetodil. Ühe ml uuritava komponendi sobiva kontsentratsiooniga (10...50 ml/l) lahusele katseklaasis lisati 5 ml destilleeritud vett, 1 ml 0,5 n NaOH lahust, segati ja kuumutati 7 minutit keevas vesivannis. Katseklaasi segu jahutati seejärel külma veega, lisati 1...1,2 ml 0,5 n HCl lahust ning 1 ml fenüülhüdriasiini ($0,1663 \text{ g } C_6H_5-NH-NH_2 \times HCl$ 50 ml destilleeritud vees). Segati ja kuumutati täpselt 7 minutit keevas vesivannis.

Pärast kuumutamist asetati katseklaasid jäävanni (40% C_2H_5-OH $-20^\circ C$) mõneks minutiks. Seejärel lisati katseklaasidesse 3 ml kontsentreeritud HCl (20 min. $-20^\circ C$ juures hoitud) ja 1 ml kaaliumferritsüaniidi ($0,835 \text{ g } K_3Fe(CN)_6$ 50 ml destilleeritud vees) lahust. Segati hoolikalt. Lahuste optiline neelduvus mõõdeti 522 nm pimelahuse suhtes. Mõõtmist alustati 20 minutit pärast esimesele lahusele $K_3Fe(CN)_6$ lahuse lisamist. Tekkinud värviline kompleks on ebapüsiv. Seetõttu tuleb mõõta kiiresti ja pole võimalik määrata korraga liialt suurt proovide arvu. Optimaalne on analüüside 10×2 proovi korraga. Igaks mõõtmiskorraks koostatakse uus kalibreerimisgraafik.

Uriin koguti kolmelt lambalt ja neljalt lüpsilehmalt nelja päeva jooksul. Proovid lahjendati ja säilitati nii külmkapis $+6^\circ C$ juures kui ka sügavkülmas $-20^\circ C$ juures.

Tulemused

Allantoiinisaldus määrati lammaste uriinist samal päeval pärast kogumist (tabel 1). Analüüsitulemused on ligilähedased.

Tabel 1. Lammaste uriini allantoiinisaldus, määratud igal kogumispäeval

Table 1. Urine allantoin content of the sheep (measured in each day of sampling)

Proovi nr. <i>Sample</i>	Allantoiinisaldus mg/l / <i>Allantoin content mg/l</i>			
	1. päev / <i>1st day</i>	2. päev / <i>2nd day</i>	3. päev / <i>3rd day</i>	4. päev / <i>4th day</i>
1	280	305	320	322
2	350	495	500	495
3	280	327	265	283

Uriiniproovide säilitamisel külmkapis $+6^\circ C$ juures nende allantoiinisaldus ei muutunud kuni neli päeva. Suured muutused toimusid alates viiendast päevast (tabel 2). Seitsmendaks päevaks vähenes allantoiinisaldus 2,5 korda, samal ajal muutus konserveeritud happeline proovilahus leeliseliseks. Samal ajal aga 10 päeva sügavkülmitus $-20^\circ C$ juures säilitatud proovides ei olnud allantoiinisaldus kohe määratud prooviga võrreldes muutunud.

Tabel 2. Proovide säilitamisest tingitud uriini allantoiinisalduse muutused**Table 2.** Changes in urine allantoin content resulted from sample storage

Proovi nr. Sample	Allantoiinisaldus mg/l / Allantoin content mg/l				
	Säilitamine +6 °C juures Storage at +6 °C				Säilitamine –20 °C juures Storage at –20 °C
	1. päev 1 st day	4. päev 4 th day	5. päev 5 th day	7. päev 7 th day	10. päev 10 th day
1	305	340	430	120	310
2	495	495	636	195	495

Veiste uriini allantoiinisaldust kontrolliti neli päeva +6 °C juures ja –20 °C juures säilitatud proovides. Allantoiinisaldus ei muutunud võrreldes esimesel päeval pärast kogumist määratud proovidega (tabel 3).

Tabel 3. Veiste uriini allantoiinisaldus erinevail säilitustingimustel**Table 3.** Urine allantoin content of the cattle in different storage conditions

Proovi nr. Sample	Allantoiinisaldus mg/l / Allantoin content mg/l		
	1. päeval +6 °C juures 1 st day, stored at +6 °C	4. päeval +6 °C juures 4 th day, stored at +6 °C	10. päeval –20 °C juures 10 th day, stored at –20 °C
	1	430	440
2	405	410	410
3	200	200	200
4	300	295	290

Uriini allantoiinisalduse määramiseks proovi kogumisel on eriti tähtis kogumisinõude puhtus, õige pH säilitamine ja proovide täpne lahjendamine.

Lahjendatud proove võib säilitada külmkapis +6 °C juures kuni neli päeva. Kõige sobivam on mäletsejaliste uriiniproove allantoiinisalduse määramiseks säilitada sügavkülmkapis –20 °C juures.

Kirjandus

- Chen, X. B., Gomes, M. J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives – an overview of the technical details. – Occasional Publication, p. 2...24, 1992.
- Johnson, L. M., Harrison, J. H., Riley, R. E. Estimation of the flow of microbial nitrogen to the duodenum using urinary uric acid or allantoin. – J. Dairy Sci., vol. 81, p. 2408...2420, 1998.
- Martin-Orse, S. M., Dapoza, C., Balcells, J., Castrillo, C. Purine derivatives excretion in lactating ewes fed straw diets with different levels of fish meal. – Animal Feed Science Technology, vol. 63, p. 341...346, 1996.

Determination of Allantoin Content in the Urine of the Ruminants and its Affecting Factors

M. Ots, A. Pärn

Summary

For urine allantoin content determination the cleanness of collection vessels, maintenance of proper pH and precise dilution of the samples are essential.

Diluted samples may be stored in a refrigerator for up to 4 days at +6 °C. For determination the allantoin content of urine samples of the ruminants it is proper to store the samples in a freezer at –20 °C.