

A KLINIKAI KÉMIA SPECIÁLIS ANALITIKAI FELADATAI

EGYETEMI DOKTORI ÉRTEKEZÉS

A JÓZSEF ATTILA TUDOMÁNYEGYETEM SZERVETLEN ÉS
ANALITIKAI KÉMIAI TANSZÉKÉHEZ BENYUJTJA:

Szabó Antal okl.vegyész,
okl. műszeres analitikai
szakmérnök.

SZEGED

- 1974 -

TARTALOMJEGYZÉK

Bevezetés	2.o.
1. A klinikai kémia időszerű kérdései	4.o.
1.1. Mennyiségi növekedés	5.o.
1.2. Minőségi követelmény	13.o.
1.3. Analízis idő rövidítése	22.o.
1.4. Korszerű analitikai módszerek	24.o.
2. Fotometriás mikro analitikai eljárások	29.o.
2.1. Szérum karbamid meghatározás mikro eljárással	29.o.
2.2. Szérum összfehérje meghatározás mikro eljárással	42.o.
2.3. Szérum glükóz meghatározás mikro eljárással	60.o.
2.4. Szérum anorganikus foszfor megha- tározás mikro eljárással	79.o.
2.5. Szérum vas meghatározás mikro eljá- rással	91.o.
Összefoglalás	100.o.
Irodalomjegyzék	103.o.

BEVEZETÉS

A kémia, fizika, elektronika, biológia, biokémia, fiziológia és egyéb tudományágak területén tapasztalható nagyarányú fejlődés éreztette hatását az orvostan területén is. Az orvostudomány fejlődésén belül az utóbbi évtizedekben az alaptudományokban való előrelépés a legjellemzőbb.

A feladatok megoldására irányuló törekvések kapcsán specializálódás, differenciálódás figyelhető meg.

Igy a kémia és az orvostudomány közötti hid kiépítéséhez, szélesítéséhez, mind intenzivebb együttműködésre, a határterületekre megfelelő szakemberekre van igény. E munkakör jellegzetessége abból adódik, hogy a biokémiai történések felfedésének és megismerésének módja elsősorban kémiai, felhasználásuk viszont orvosi feladat.

Az analizélandó minták speciális jellegéből és az eredmények speciális felhasználási területéből tevődnek össze azok a feladatok, amelyeknek megoldására a klinikai kémia kérdéseit ismerő, elsősorban az analitika területén járatos vegyészekre van szükség.

Ennek a specializálódásnak - miután a jelenben zajlik - koránt sincsenek kialakult, vagy éppen rögzült formái.

Hiszen az, hogy mi a "klinikai kémia" még ma sincs véglegesen és egyértelműen definiálva /1/.

A meghatározásra való törekvés nélkül úgy vélem, hogy a klinikai kémia része az emberi élet kémiai nézőpontból való tanulmányozásának a diagnózis, a gyógykezelés ellenőrzése és a betegség megelőzése céljából.

A klinikai kémia felhasználja a biokémia eredményeit és laboratóriumi vizsgálatait, fejleszti és hasznosítja a kémiai analízist, valamint egyéb - a kutatások alapján célravezetőnek bizonyult - tudományos módszerek alkalmazásával mind alaposabban feltárja a beteg szervezetben végbemenő kóros elváltozások lényegét és mértékét.

Feladata, hogy - elsősorban az analitika eszközeivel - minél több és hasznos információval segítse a gyógyító és az elméleti orvostudományt.

1. A KLINIKAI KÉMIA IDŐSZERŰ KÉRDÉSEI

Miután a biokémiai kutatás fényt derített a szervezetben végbemenő legtöbb normális és kóros folyamatra, számos eddig nem ismert kórkép és kórfolyamat megismerése vált lehetővé, sok vonatkozásban pedig megváltoztak a régebben is ismert betegségek okára, lefolyására és ezen keresztül a kezelésükre vonatkozó ismeretek. A puszta empiria helyébe, majdnem minden esetben az exakt biokémiai /illetve kóros állapotban "pat-hokémiai"/ adatok léptek.

A diagnosztikai és a kutató munkához nyújtott segítségével a klinikai kémia, az utóbbi két-három évtizedben, egyre inkább központi helyet foglal el. E folyamat jelentős változásokat hozott magával a laboratóriumok tevékenységében. E változások a laboratórium fogalmának minden területén észlelhetők, a szakemberigénytől a műszerezettségen át a mélyreható szervezeti és szervezési feladatokig.

A vizsgálatok jellege is fokozatos változást mutat. A klasszikus anyagcseretermékek, vagy egyes vegyületek analízise mellett, az anyagcsere folyamatoknak a dinamikus mérése, vagy az azokat szabályozó tényezők vizsgálata került előtérbe. E sok esetben bonyolult analízisek elvégzése szükségképpen a laboratóriumok feladata.

Ezek teljesítése érdekében még számos részlet vár megoldásra:

- a mennyiségi növekedés,
- a minőségi követelmény,
- az analízis idő rövidítése és
- a korszerű analitikai módszerek alkalmazása.

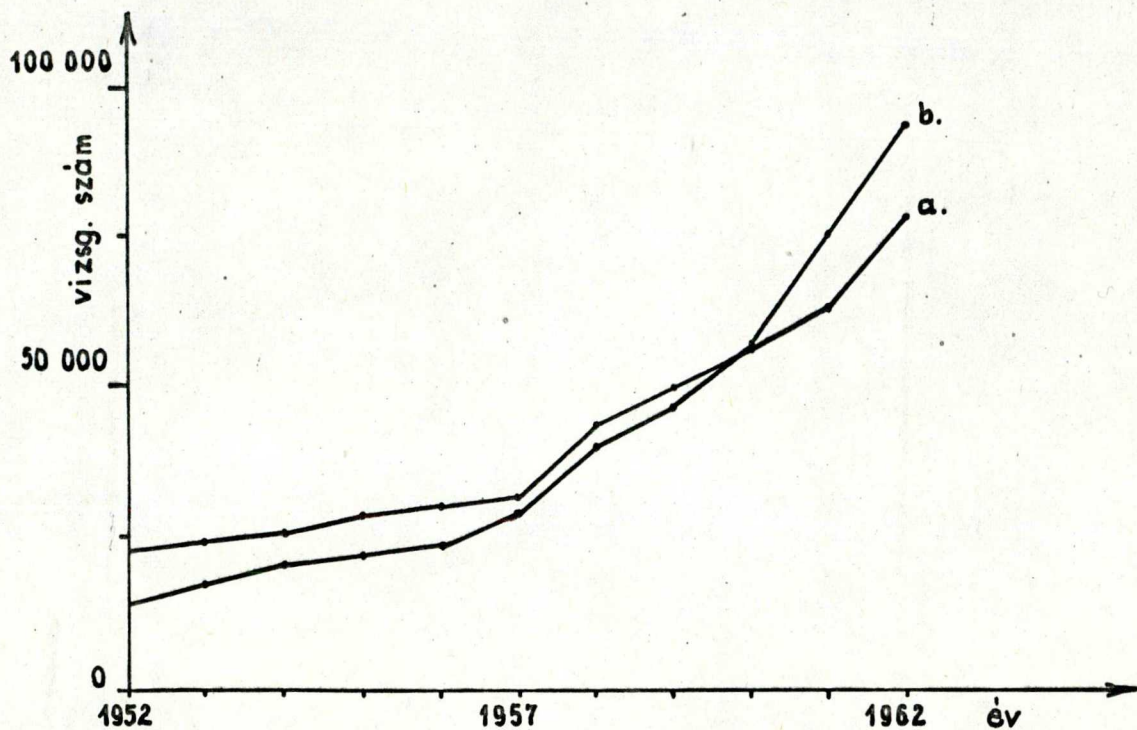
1.1. MENNYISÉGI NÖVEKEDÉS

A jövőbeni feladatok tervszerű szervezése érdekében feltétlenül szükséges a vizsgálati szám várható növekedési ütemének ismerete. Ezért célszerűnek tartom, több azonos jellegű, 800-1.200 ágyas, vegyes osztályokból álló intézet laboratóriumi vizsgálatszámának több éves alakulását bemutatni az 1. és 2. ábrákon.

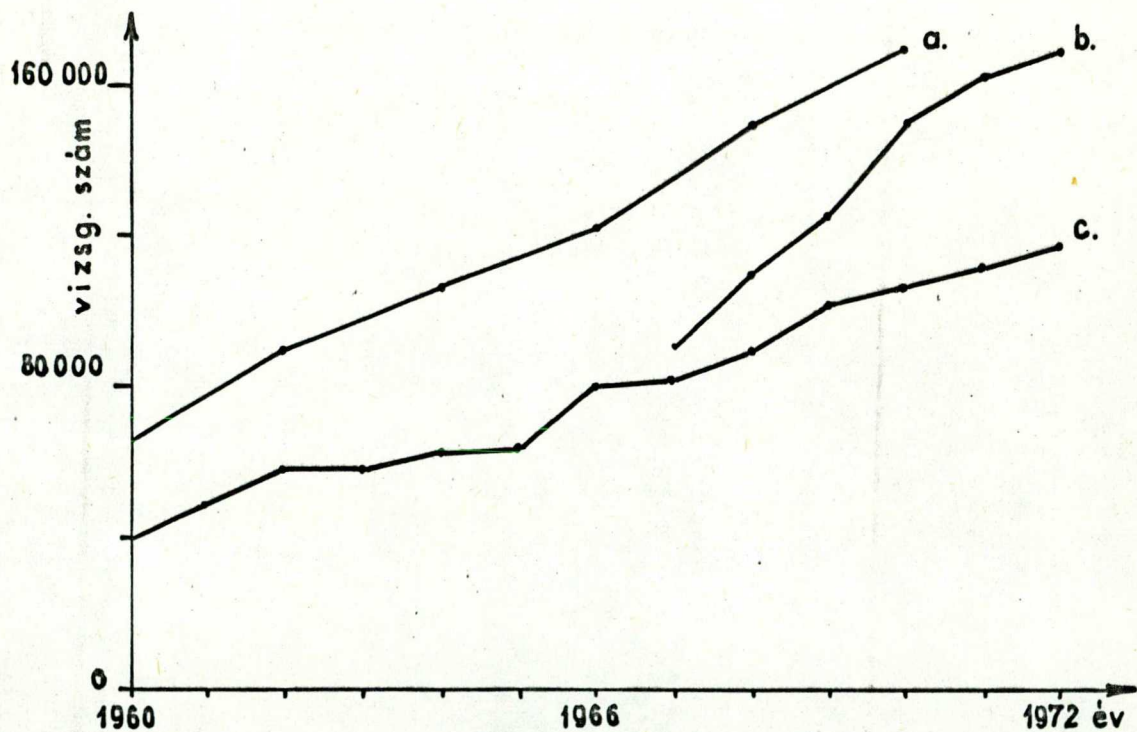
A bemutatott öt intézet adatai /2,3,4,5/ valamint az irodalmi összehasonlítás alapján /6,7/ megállapítható, hogy a kémiai analizisek száma a laboratóriumokban rohamosan emelkedik. Ezek szerint az elvégzett elemzések száma általában öt évenként megduplázódik. Minden okunk meg van annak feltételezésére, hogy ezzel az emelkedéssel a jövőben is számolnunk kell.

A Szolnok Megyei Kórház Központi Laboratóriuma 1973. évben 129.000 db. analizist végzett. Ez havi átlagban 10.750 db. naponta pedig átlag 450 db. elemzést jelent. Az analizisek számának kritikai elemzéséből közelítő adatokat kaphatunk a fejlődés ütemére és a várható igények jövőbeli alakulására. A statisztikai adatok puszta közzlése azonban még nem fejezi ki a laboratóriumok valódi munkáját. Az analizisekhez kapcsolódik a minta vételének és előkészítésének művelete, a reagensek készítése, az adminisztráció, az edényzet tisztítása, stb.amelyek ugyancsak hatványozottan emelkednek.

További tényezőként kell figyelembe venni, hogy évről-évre nő az új analitikai eljárások száma. A klinikai kémiai laboratórium vizsgálatai 30-40 évvel ezelőtt szűkebb körre szorítottak, korlátozott számú, maximumán 10-20 különböző kémiai elemzéssel.



1. ábra A Leeds /a./ és Glasgow /b./ klinika laboratóriumainak biokémiai vizsgálatszámja 1952-62 között.



2. ábra A Bp.-i MÁV Kórház /a./, a Bp.-i Bajcsy Zs. Kórház /b./ és a Szolnok Megyei Kórház /c./ laboratóriumainak analitikai vizsgálatszámja 1960-72 között.

Ma ugyanez a szám laboratóriumonként 60-80 is lehet. Az igények további emelkedése várható, mert a diagnosztika és a terápiás ellenőrzés súlypontjában a biokémiai alapok felé tolódott el. Ennek megfelelően a laboratórium egyre bonyolultabb és nagyobb számú analitikai eljárásokat végez /szteroidok, izoenzimek, vitaminok, stb. elemzése/.

A rohamosan szaporodó vizsgálatok elvégzése nem kívánatos feszültséget teremthet a laboratóriumokban. Az említett nagyságrendű intézetek laboratóriumainak jelenlegi teljesítőképessége - az általános személyi és műszer ellátottság mellett, hagyományos vizsgálati módszerek figyelembevételével /8/ - megfelelő pontossággal, naponta, és tipusonként mintegy 10-15 analízis. 20 elemzésen túl már egyes eredmények bizonytalanná válhatnak, ennek tudatában már nem volna szabad nagyobb széria analízisét engedélyezni. A laboratórium megfelelő minőséggel kb. 20-30 féle eljárást képes átfogni. Az előbbiekből következik, hogy a mai átlagos adottságok esetén a klinikai kémiai laboratóriumnak mintegy 200-300 analitikai vizsgálatot volna szabad végeznie naponta. A tényleges igénybevétel azonban jelentősen nagyobb és a jövőben tovább fog növekedni.

E fokozott követelmények a laboratóriumokra számos olyan feladatot rónak, amelyek mind a felépítés, mind a munkamenet tekintetében lényeges változtatásokat tesznek szükségessé.

Először azokkal a feladatokkal kívánok foglalkozni, amelyek a mennyiségi növekedéssel vannak kapcsolatban.

A laboratóriumok teljesítőképességének továbbfejlesztése elvileg több módon lehetséges, ugymint a létszámemelés, területbővítés, korszerű analízisek alkalmazása, mechanizáció, félautomatizáció, és az automatizáció.

1.1.1. Létszámemelés, területbővítés

Bár a laboratóriumok területi és személyi igénye fokozódik, a helyiségek hiánya azonban legtöbb intézetben korlátot szab a bővítésnek és a megfelelően képzett szakszemélyzet utánpótlása is nehézségbe ütközik. A munkaerő létszám bővítése természetesen csak egy bizonyos határig lehetséges. A két műszak bevezetése /létszámemelés azonos terület jobb kihasználásával/ pedig hátrányosan befolyásolná - az egyébként sem megoldott - szakképzett munkaerő ellátást.

A kapacitás lényeges növelése ezen a módon, gazdasági tényezők miatt nem valósítható meg.

1.1.2. Korszerű analitikai eljárások alkalmazása

A jelenlegi mennyiségi igénybevétel esetén, korszerű analitikai módszerek alkalmazásával elérhető, hogy az elemzésekre fordított munka és idő jelentősen csökkenjen. Ma modern eljárásnak csak azt a klinikai kémiai elemzést tekintjük, amelyik két, vagy három térfogat mérésből áll. Elfogadható a módszer még, ha négy bemérést igényel. Ennél több lépés esetén az eljárás nem alkalmas sorozat vizsgálatra. Mindezekhez tartozik még, hogy az analízis minta igénye 20-100 µl térfogati határok közé essen, valamint a műszeres, különösen a fotometriás kiértékelés.

Nyilvánvaló, hogy a korszerű analitikai eljárások alkalmazása egymagában nem oldhatja meg a túlterheltségből származó összes nehézségeket. E módszerek legnagyobb előnye az, hogy könnyen mechanizálhatók, automatizálhatók, ezáltal nagyobb vizsgálati szériák analízisét teszik lehetővé, ugyanakkor bevezetésük nem jár lényeges anyagi kihatásokkal, általánosan alkalmazhatók.

1.1.3. Mechanizáció, félautomatizáció

Amennyiben egy laboratórium kapacitását növelni akarjuk és ehhez különböző készülékeket, vagy manuális eszközöket alkalmazunk /mintavevők, adagolók, átfolyós küvetták, stb./ ezt a részét a fejlesztésnek "mechanizálásnak" nevezzük.

Számos, a hazai laboratóriumaink számára sem elérhetetlen ún. félautomata berendezés van forgalomban. 800-1.200 ágyas intézeteinkben a laboratóriumi munka mechanizáltságának mértéke jelenleg még 20-30 %-ra becsülhető /9/. Segítségükkel egy-egy meghatározás munkaidejét 40-50 %-kal meg lehet rövidíteni, ill. a laboratóriumi személyzet munkateljesítményét ennyivel lehet fokozni.

A mechanizálásnak, félautomatizálásnak jelenleg három fő iránya alakult ki:

Az ún. Suchet-rendszer, amely zárt egységet képez a minta centrifugálásától az analízisek fotometriás leolvásásáig. A készülékhez csak a gyártó által előírt analitikai eljárások használhatók. Hátránya, hogy egyszerre nagyobb összegű beruházást igényel és zárt egység lévén csak a speciális tartozékokkal üzemeltethető. Bármely rész meghibásodása, vagy tartozékhiány esetén az egész rendszer működésképtelenné válik.

A svéd LKB-Ultralab szisztéma, amelynél a reakcióelegyek bemérése manuális, vagy mechanizált, a reakcióedény szerepét a küvetták töltik be, és a kiértékelés automatikus. A kiértékelő rész egy fotométer, amelynél a nullázás, standard mintára történő kalibrálás /faktorozás/ automatikusan programozható a műszer memória egységébe.

Az eredményszolgáltatás - megfelelő koncentráció egységben - digitális kijelzővel és sorkiíróval történik. A készülékkel csak bizonyos vizsgálatok elvégzése lehetséges, maximálisan csak 10 csatornára programozhatók. Előnye a kiértékelés nagyfokú gyorsasága és pontossága.

Az un. stuttgarti-rendszer - Braun-Systematic - amely a beméréseket építőköcka elv alapján automatizálja, míg a kiértékelések bármely fotométeren elvégezhetőek. Hazánkban a kialakult szokások, szervezeti formák, gazdasági és személyi lehetőségek figyelembevételével ez utóbbi rendszer bevezetése látszik legcélszerűbbnek. Az építőköcka elv következtében minden egyes egyedileg beszerzett darab /pl. automata mintavevő, reagens és minta adagoló, termosztát, dializátor, átfolyós küvetta típusu fotométer, fényelnyelés \longleftrightarrow koncentráció átszámoló, kiíró, stb./ zökkenésmentesen és azonnal beállítható a munkafolyamatba. Ugyanakkor egyes részek bármikor kiemelhetők és manuális munkával pótolhatók. Egy-egy darab ára 30.000-200.000.-Ft. tartományba esik. Több építőköcka alkalmazásával gyorsan és egyszerűen kialakítható egy félautomata lánc, amely a teljes automatizáláshoz való átmenetet jelenti.

A mechanizáció, félautomatizáció bevezetése természetesen nem csak abból áll, hogy az addig hagyományos beméréseket /pipettázások, titrálások, stb./ mechanikus elven működő készülékek segítségével vitelezzük ki. A teljesítmény növelő programnak tartalmaznia kell minden fázist, a mintaátvételtől, a szállításon, az elosztáson, az analíziseken keresztül az eredmények visszajuttatásáig, sőt felhasználásáig.

1.1.4. Automatizálás

A jövő távlatait is figyelembe véve, a kapacitás lényeges és hatékony növelésére a teljes automatizálás és az elektronikus adatfeldolgozás kínál lehetőséget. A teljes automatizálás a különféle /Technicon, Eppendorf, Mecolab, Perkin-Elmer C4, Beckman-DSA 560, stb./ autoanalyzerek bevezetését jelenti.

Az automatizálás előnyös és hátrányos kihatásával számos kutató és intézet foglalkozott /10,11,12/. Előnye a nagy teljesítmény, a minimális reagens felhasználás, a gyors eredmény szolgáltatás és a kis számú kezelő személyzet. Ennek illusztrálására a sok lehetőség közül Rappoport adatait idézem /13/, amelyek szerint az általa vezetett laboratóriumban egy asszisztens hagyományos eljárásokkal egy év alatt kb. 5.000 analízist tudott megfelelő minőségben elvégezni /ez jól egyezik a hazai mutatókkal /5/, míg automatizálás-elektronikus adatfeldolgozás rendszerében ez a szám 40.000-re emelkedett. Nem ilyen egyértelmű az állásfoglalás abban az esetben, ha arra kell választ adni, hogy egy konkrét esetben, egy meghatározott laboratóriumban, a teljesen hagyományos - teljesen automatizált határok között mi a szükséges, megfelelő és optimális út. Az alkalmazni kívánt rendszer kiválasztásakor természetesen számos helyi tényezőt is figyelembe kell venni /műszerek, szokások, személyzet, stb./. A válasznak ezenkívül tartalmaznia kellene nem csak az elérhető eredményeket, hanem azok gazdasági kihatásait is.

A teljes automatizálás legfőbb hátránya hazai vonatkozásban a készülékek beszerzésének magas költsége és az állandó szerviz kérdése.

Mindeme nehézségek ellenére, az automatizálás megoldása égető probléma, mert megoldása nélkül a laboratóriumok képtelenek lesznek az igényeket kielégíteni és ez egy bizonyos idő után a klinikai kémia fejlődését hátrányosan fogja befolyásolni.

1.2. MINŐSÉGI KÖVETELMÉNY

A mennyiségi növekedéssel párhuzamosan egyre nagyobb jelentőségű az a követelmény, amely az elemzések minőségével szemben jogosan megnyilvánul.

A klinikai kémia műszerezési technikájában elért fejlődés nem járt együtt az eredmények megbízhatóságának oly mérvű fokozódásával, mint ahogyan az várható lett volna.

A klinikai kémia területén már ma is követelmény, hogy minden laboratóriumnak garantálnia kell az általa végzett analízisek kémiai hitelességét. E feladatok közül először azokkal a módszerekkel kívánok foglalkozni, amelyek az eredmények megbízhatóságát hivatottak biztosítani. Előfeltételként szükséges bizonyos fokú szemléletbeli változás, hogy az analitikai információkat felhasználók a vizsgálatokat az analitika szigorú szabályai - ne pedig a kapott eredmények biológiai, ill. fiziológiai elfogadhatósága - szerint értékeljék.

Amikor egy új eljárási rendszert alkalmazunk, új fogalmakkal is meg kell ismerkednünk, ezek jelölésére új terminus technicusok szükségesek. Az egyértelműség érdekében célszerűnek tartom az idetartozó fogalmak magyar elnevezését és rövid tartalmi ismertetését rögzíteni. A könnyebb tájékozódás céljából az angol és a német szakirodalmakban általánosan használt kifejezéseket is feltüntettem. A továbbiakban a MOTESZ Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság 1972. április 20-án tartott ankétján megvitatott és további használatra elfogadott terminus technicusait vettem alapul.

A gyűjtő fogalom a "Minőségi ellenőrzés" /Quality control - Qualitätskontrolle/. Ebbe tartoznak:

"Pontosság" /Precision - Präzision/: azt jelenti, hogy a valódi értéktől az egyes analízis eredmények mennyire térnek el. Megfelelő az a módszer, ha szórása a megengedett határokon belül van. Kifejezésére a párhuzamos mérések standard deviációját és a variációs koefficiensét használjuk:

$$s = \sqrt{\frac{\sum/x - \bar{x}^2}{n - 1}} \quad VK = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$$

Pontosnak nevezünk egy módszert, ha a variációs koefficiense standard oldatban 2-3 %, biológiai mintában végzett mérés esetén 5 % alatt van.

"Valódiság" /Accuracy - Richtigkeit/ jelenti, hogy az alkalmazott módszer a vizsgált minta komponensének valódi koncentrációját állapítja meg.

"Elfogadhatóság" /Plausibility - Plausibilität/: a vizsgálat eredménye megfelel a várt értéknek, figyelembe véve a beteg egyéb tüneteit.

"Kifejezőképesség" /Capability - Aussagefähigkeit/: a használt módszer alkalmas a felvetett kérdés megválaszolására, ill. a vizsgált komponens változását számadatszerűen ki tudja fejezni.

"Belső ellenőrzés" /Inner control - Interne Kontrolle/: azoknak az eljárásoknak összessége, amelyeket a laboratórium saját maga végez.

"Külső ellenőrzés" /External control - Aussere Kontrolle/: külső szervek /felettes hatóságok, társaságok, stb./ által végzett ellenőrzések összessége.

"Mintacsere" /Specime exchange - Probentausch/: kettő, vagy néhány laboratórium l-l vizsgálati anyagból rendszeresen, párhuzamosan elvégzi ugyanazt az

elemzést, összehasonlítás céljából.

"Csoportos vizsgálat" /Survey control - Ringversuch/: nagyobb számú laboratórium ugyanabból a vizsgálati anyagból egyidejűleg elvégzi ugyanazokat a meghatározásokat.

"Ellenőrző módszer" /Reference method - Referenz Methode/: olyan analitikai eljárás, ami 1-1 komponens meghatározására a mi ismereteink szerint, a legpontosabb eredményt adja.

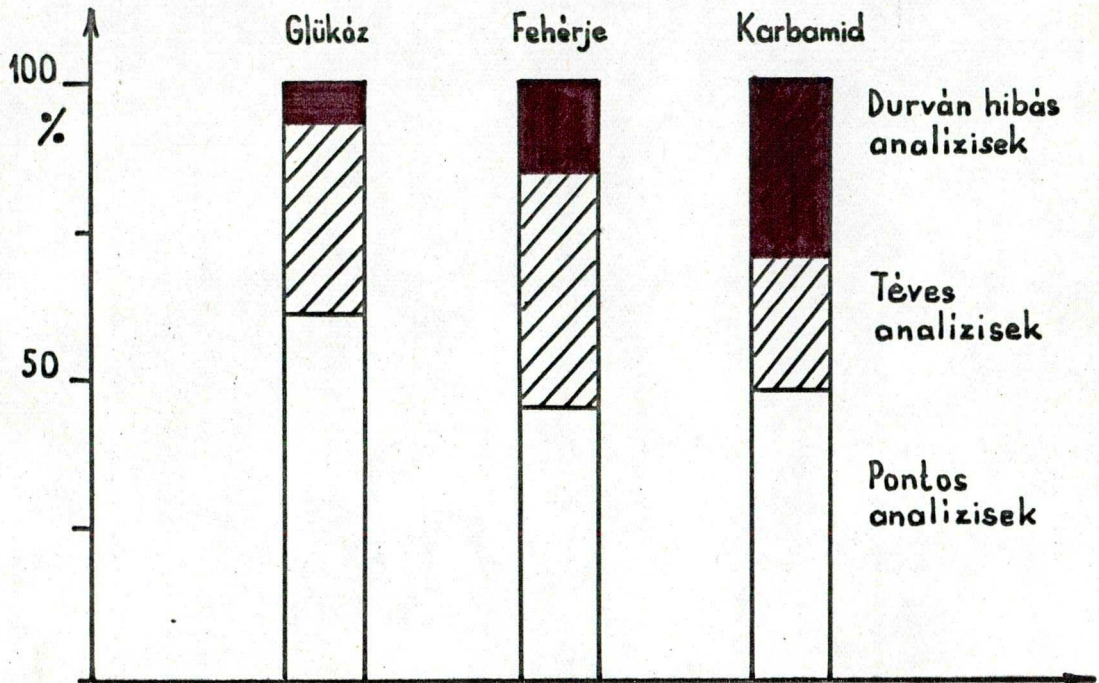
"Ellenőrző laboratórium" /Reference laboratory - Referenz Laboratorium/: modern műszerekkel felszerelt, referens módszerekkel dolgozó, ellenőrző feladatokat ellátó központi laboratórium.

A minőségi ellenőrzés bevezetése az amerikai orvosi laboratórium vegyészeitől indult el. Belk és Sunderman ugyanazt a szérumot 53 pennsylvániai kórház laboratóriumába küldte szét és a mintákból több analízis elvégzését kérte /14/. Három önkényesen kiemelt elemzés általuk összesített eredményét a 3. ábra tartalmazza.

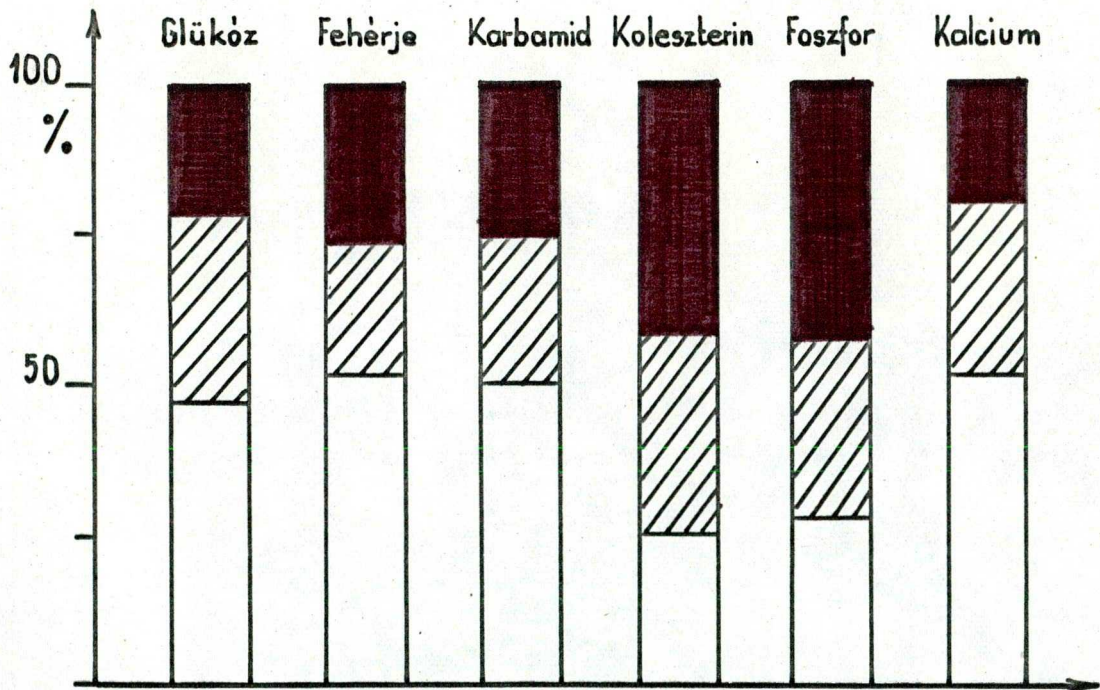
Megdöböntő volt, hogy az elemzéseket elvégzőknek mintegy fele elfogadhatatlan eredményt adott, vagy olyat, ami a felhasználót teljesen tévútra vezethette volna.

Európában is végeztek hasonló vizsgálatokat, amelyeknek eredménye ugyanolyan rossz volt /15,16,17/. A felmérések tanulságaként, ma már számos európai országban központi ellenőrző laboratóriumot létesítettek, rendszeres csoportos vizsgálatokat végeznek és a részvétel a legtöbb országban kötelező.

Ennek bevezetése az analitikai információk megbízhatóságát, ill. az eredmények valódiságát nagymértékben javította.



3. ábra Belk és Sunderman csoportos analitikai vizsgálatának hiba megoszlása /14/.



4. ábra Magyarországi csoportos analitikai felmérés hiba megoszlása /18/.

Hazánkban központi ellenőrző laboratórium nincs, így a Klinikai Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság szervezte meg a csoportos vizsgálatokat. Eddig négy ilyen vizsgálat történt, mintegy 123 laboratórium részvételével, önkéntes alapon /18/.

A laboratóriumaink több mint 50 %-a adott pontatlan eredményeket, ami rosszabb, mint amit más országok hasonló felmérései jelenleg mutatnak. Az eredményeket a 4. ábrán tartalmazza.

Az analitikai eredmények pontatlanságának, illetve nem kielégítő megbízhatóságának legfőbb oka abban rejlik, hogy ma még a legtöbb hazai klinikai kémiai laboratóriumban kevés, vagy pedig nem elég hatékony minőségi ellenőrzést hajtanak végre.

Az analitikai eredmények megbízhatóságát lényegében három tényező határozza meg: a személyzet, a készülék és a módszer. Ez a három faktor elegendő hibaforrást rejt magában ahhoz, hogy az elemzések eredményei pontatlanok legyenek. A hibák milyenségének és nagyságrendjének felismerése és kiküszöbölése a minőségi ellenőrzés módszereinek a segítségével történhet. A minőségi ellenőrzést úgy kell megszervezni, hogy a hibákat a laboratóriumban időben észlelni lehessen, lehetőleg még a sorozat elemzések elvégzése előtt. A hibák felismerése nem elegendő. A hibák okának és fajtájának kiderítése a hatásos minőségi ellenőrzés fő követelménye. A foganatosítandó intézkedések megkövetelik a megkülönböztetést a véletlen, a rendszeres és a durva hibák között.

Youden-től származik egy meglepően egyszerű és gyors módszer a véletlen és a rendszeres hibák felismerésére /19/.

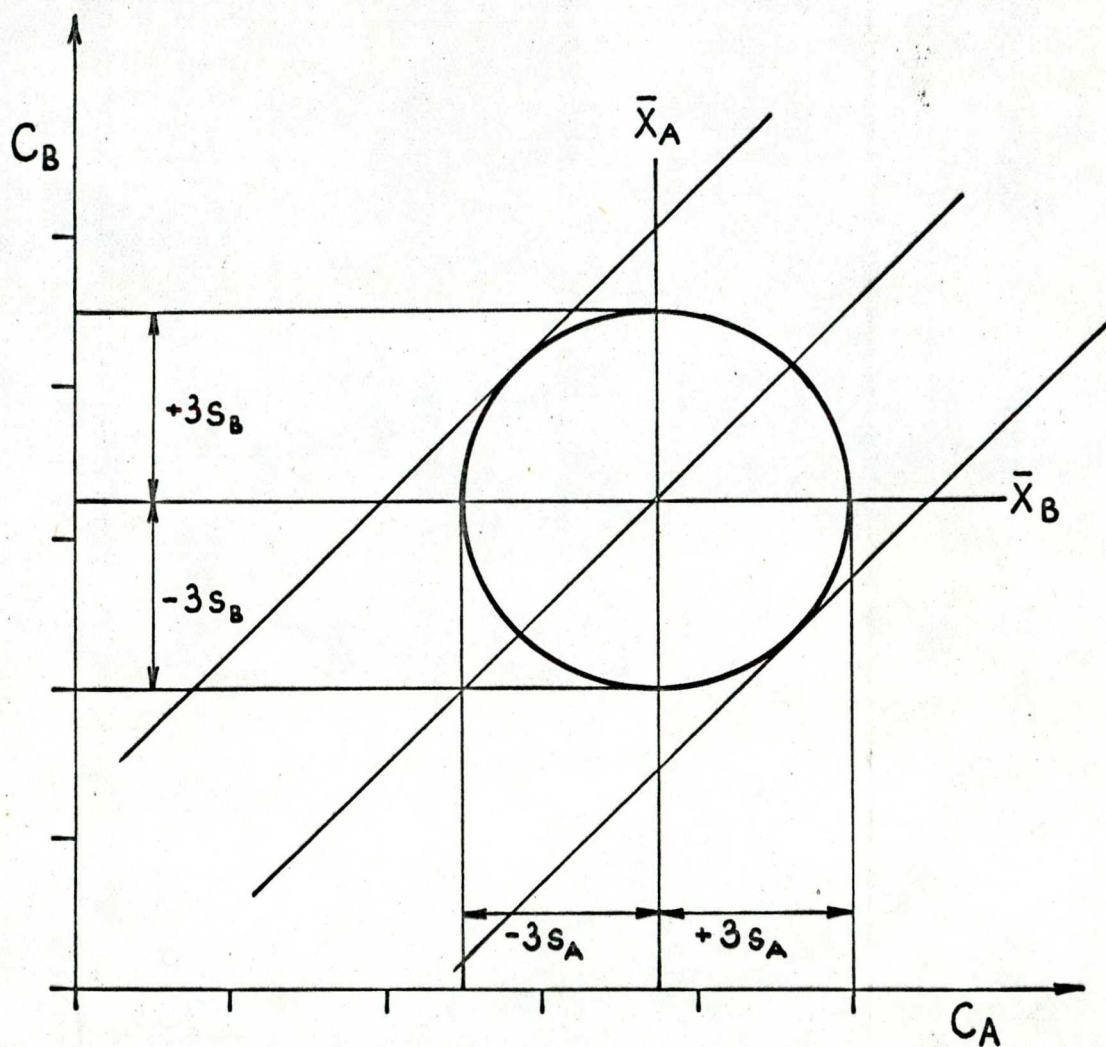
Alkalmazásakor két különböző koncentrációjú standarddal, vagy szérummal kell dolgoznunk.

A mérési sorozatból kiszámítjuk a középértéket \bar{x} / és a standard deviációt s /. A két \bar{x} érték egy pontként lesz egy koordináta rendszerben ábrázolva /a két koordináta tengely a két minta koncentrációjának felel meg/ és szerkeszthető egy kör, amelynek középpontja \bar{x} és sugara $3s$ /5.ábra/.

Minden érték, ami a körbe esik elfogadható, pontossága jó. A rendszeres hibák arról ismerhetők fel, hogy a mérési pontok a körön kívül a két párhuzamos átló közt fekszenek. A fennmaradó területen oszlanak el a véletlen hibák.

A "belső ellenőrzést" a laboratóriumok saját belátásuk és lehetőségeik szerint végezhetik. Az egyik legelterjedtebb és legrégebbi eljárás a standard oldatok alkalmazása. Ezek többnyire desztillált vízben, néha más oldószerben általunk bemért, egy-egy anyagot ismert töménységben tartalmazó oldatok. A módszer pontosságának ellenőrzésére célszerű két olyan koncentrációt választanunk, amelyek a napi elemzési sorozatban általában előforduló vizsgálati anyagok alsó és felső határán lévő értékeinek felelnek meg. Alkalmazhatók a párhuzamos meghatározások, amikor minden vizsgálati anyagból két, vagy több meghatározást végzünk. Statisztikai számítások szerint a véletlen hiba lehetőségét így a párhuzamos vizsgálatok négyzetgyökével csökkenthetjük. A módszer hátránya, hogy a rendszeres hibák nem észlelhetők, és a párhuzamos elemzések körülbelül 60 %-os munkatöbbletet jelentenek. Ilyen plusz terhelésre a legtöbb laboratóriumban nincs meg a lehetőség.

A "valódiság" ellenőrzését standard szérumok rendszeres vizsgálatával végezhetjük, amelyeket a napi rutin elemzési minták közé kell beiktatnunk.



5.ábra Mérési eredmények grafikus ábrázolása
Youden szerint /19/.

Standard szérumnak olyan mintákat nevezünk, amelyek pontos összetételét központi ellenőrző laboratórium alapos vizsgálat sorozatok alapján "ellenőrző módszernek" elismert metodikával határozta meg. Ma már több gyár forgalmaz ismert összetételű, liofilizált standard szérumokat /Versatol, Seronorm, Precinorm, stb./

A "belső és külső ellenőrzés" között átmenet az ún. "mintaváltás". Két, vagy néhány egymáshoz közel fekvő laboratórium napi analizálandó mintáiból néhányat rendszeresen szétoszt és ugyanazt az analizist egyidejűleg mindkét helyen elvégzik. A rendszeres összehasonlítás alkalmas arra, hogy az eredmények egyezése a laboratóriumok biztonság érzetét növelje, a sorozatos, főleg egyirányú eltérés pedig a munkamódszer rendszeres hibájára hívja fel a figyelmet.

A "külső ellenőrzés" leghatékonyabb módszere a "csoportos vizsgálat". E feladattal megbízott központi laboratórium gondosan ellenőrzött szérumokat szétküld és az elemzéseket valamennyi laboratórium azonos napon elvégzi. Statisztikai módszerekkel értékelve megállapítható, hogy melyik laboratórium eredményei haladták meg a megengedett maximális eltérést, ill. hogy melyiknek a munkamódszere szorul korrekcióra. A következő kísérlet sorozatok már felvilágosítást adnak az eredményekben elért javulásról.

Hazánkban egy központi ellenőrző laboratórium felállítása és a rendszeres, kötelező csoportos vizsgálatok szervezése az eredmények megbízhatósága szempontjából sürgős és elengedhetetlen követelmény.

A minőségi követelmény más téren is jelentkezik. A modern laboratóriumi és klinikai diagnosztika megköveteli, hogy a vizsgált biológiai mintából olyan analízis eredményt adjunk meg, mely leginkább megközelíti az in vivo állapotnak megfelelő értéket.

Mivel a laboratóriumokba a vizsgálandó minta /vér, vizelet, liquor, stb./ már in vitro kerül analízisre, ezért olyan módszerek és eljárások kidolgozása vált szükségessé, melyek megőrzik a szervezeten belüli összetételt.

A legtöbb biológiai folyadékban - különösen a vérben - az alkotók jelentős része fehérjéhez kötött állapotban található. A kötés lehet igen stabilis, pl. vas és rézionn.../ferritin, transzferrin, ceruloplazmin/, lehet gyengébb kötés pl. a kalciumionnál, vagy a bilirubin kötése az albuminhoz. A fehérje szerepe gyakran bizonyos vízben oldhatatlan, vagy kevésbé oldódó anyagok kolloid oldatban való tartása, pl. lipoidok, koleszterin, stb. esetében.

A fehérjék az analízis folyamán különböző zavaró hatást fejtenek ki. Különösen fotometriás kiértékelésnél a fehérjék koagulációjából származó zavarosság jelent a legfőbb gondot. Ezért a klinikai kémiában, az általánosan alkalmazott analitikai eljárások jelentős részét a vizsgálati anyag fehérjementesítése előzi meg. /Karbamid, kreatinin, cukor, vas, réz, foszfátion, stb. meghatározásoknál./

A fehérjementesítés azonban nem csak adszorpciós és térfogat kontrakciós problémákat okoz, hanem ismeretlen és nem következő kémiai torzulásokat is.

Ahhoz, hogy a minta az analízis folyamán a tényleges biológiai összetételt tükrözze, nativ vizsgálati anyag szükséges. Ezért kézenfekvő az a törekvés, hogy az analizálandó anyagot ill. komponenst az élet-tani fehérjének jelenlétében elemezzük.

A kémiai és biológiai hitelesség egyidejű biztosításának kell meghatározni analitikai módszertani munkánkat.

1.3. AZ ANALIZIS IDŐ RÖVIDÍTÉSE

Már korábban utaltam arra, hogy a klinikai kémia egyre inkább kulcshelyzetet foglal el, mind a diagnosztika, mind a gyógykezelés hatásosságának ellenőrzése terén. Nem lehet kétséges, hogy eredményes terápia, csak helyesen megállapított diagnózis alapján vezethető be. Mindebből következik, hogy az analitikai információ szolgáltatás gyorsasága, vagy lassúsága - gazdasági tényezőként tulmenően - közvetlenül is befolyást gyakorol a betegellátásra.

Fokozott mértékben érvényes ez a megállapítás az életveszélyes állapotban lévő betegekre. Klinikákon és kórházakban ujabban az ún. intenzív terápiás osztályok /őrző-, akut-szobák/ beállítása megköveteli a laboratóriumoktól, hogy egy-egy fontos kórjelző paramétert a legrövidebb időn belül és igen pontosan határozzon meg. Alkalmassint az elemzés eredménye adja meg az alapot a gyors, intenzív és célirányos gyógykezeléshez.

A modern technika nyújtotta lehetőségeket /művese kezelés, újraélesztés, stb./ súlyos betegek megmentésére csak akkor lehet igénybe venni, ha a befolyásolt paraméterek változásait, gyors laboratóriumi ellenőrzéssel, szinte azonnal nyomon lehet követni.

A szervezet víz-háztartásának, sav-bázis egyensúlyának, vagy éppen elektrolit változásának gyors regisztrálása, ma a klinikai laboratóriumok alapvető feladatai közé tartozik.

Az időfaktor befolyása azonban más vonatkozásban is érvényesül.

Ismeretes, hogy a vér sejtés elemeinek és a szérumnak összetétele és koncentrációja között lényegbevágó különbségek vannak. Ezek a különbségek egyes komponensek, mint pl. tejsavdehidrogenáz, tranzamináz, stb. enzimek, vagy káliumion esetében akár több nagyságrendet is elérhetnek. Ezért a sejtés elemek és a plazma elválasztását, majd az analízist a vérvétel után a lehető leggyorsabban el kell végezni, hiszen az *in vitro* bekövetkező diffúzió és a spontán lezajló enzimatis reakciók a biológiai arányokat lényegesen megváltoztathatják. Ilyen torzulás következik be a legkisebb hemolízis esetében is. Azt sem szabad figyelmen kívül hagynunk, hogy a vizsgálati anyagaink már szobahőmérsékleten is könnyen bomlanak. Ezért a hosszabb ideig tárolt mintákban a valóságostól eltérő eredményre juthatunk. Hiszen pl. az acidfoszfataz enzim aktivitása szobahőmérsékleten 5 óra alatt 50 %-kal, a triglicerid koncentrációja 20 %-kal csökken. Glükóz, karbamid, kreatinfoszfokináz meghatározását 24 órán belül, zsírsavak, lipoproteid, szorbindehidrogenáz analízisét pedig a mintavétel után azonnal el kell kezdeni.

Az említett tényezők - a teljességre való törekvés nélkül is - egyértelműen magyarázzák azokat a helyes törekvéseket, amelyek a vizsgálati anyagok előkészítési és analízis idejének csökkentésére irányulnak.

1.4. KORSZERŰ ANALITIKAI MÓDSZEREK

A vázolt követelmények teljesítéséhez /mennyiségi növekedés, minőségi igény, analízis idő rövidítése/ alapvető feladat elsődlegesen olyan eljárások bevezetése, ill. kidolgozása, amelyek kémiaiilag alkalmasak a kívánt feltételek megoldására. Természetesen azok között a tárgyi lehetőségek között, amelyek a gyakorlatban célszerűek és teljesíthetők is.

A megfelelő analitikai módszer kiválasztásánál alapvetőek a következők.

1.4.1. Megfelelő pontosság, szelektivitás, érzékenység

Az analitikai eljárások pontosságának a megítélésénél azt tételezzük fel, hogy az az eredmény helyes, amelyik a tényleges, valódi értéknek felel meg. Ez az elméleti követelmény a gyakorlatban csak kivételes esetekben valósítható meg. El kell ismernünk ugyanis, hogy a leggyakrabban analizálandó biológiai folyadékban - a szérumban - sem egyetlen komponensnek a pontos koncentrációját nem ismerjük, sem pedig az illető komponenst abszolút pontosan meghatározni nem tudjuk. A gyakorlatban ezért a relatív pontosságot használjuk, megfelelő standard törzsoldatok és minták összehasonlítása alapján. A standard törzsoldatok használatánál azonban felléphetnek bizonyos nehézségek. Vizes törzsoldatok használhatók ugyan, de nem korlátlanul, mivel a szérumban lévő nagyszámu vegyület gyakorlatilag minden elemzési módszert zavarhat.

Ezen túlmenően a kémiai és enzimatis reakcióknak más lefolyásuk van az általunk készített vizes oldatban, mint biológiai anyagokban. Ezért a törzsoldatoknak mind kvalitatíve, mind kvantitatíve lehetőleg azonos összetételűnek kell lennie a vizsgálandó mintával. Ilyen standard oldatok készíthetők ugyan, de ezek tartósítása nem megoldott, általában csak 2-3 napig használhatók.

Amennyiben a módszerünk pontos, ebből még nem okvetlenül következik, hogy azzal a valós értéket határoztuk meg. Ha például a standard oldatunk összetétele, ami alapján számolunk hibás, vagy ha a fotométerünk monokromátora nem az előírt hullámhosszat biztosítja, pontos módszerrel is hibás eredményt kaphatunk. Ezek a tényezők teszik érthetővé, hogy az abszolút koncentráció meghatározása miért ütközik gyakran elháríthatatlan nehézségbe.

Mivel a vérben 40-50 komponens jelenlétével kell számolnunk, ezért az analitikai módszerek fejlesztése során olyan szelektív kémiai eljárások és reagensek kidolgozása a cél, hogy egyes komponensek meghatározása, más alkotók jelenlétében is biztonságosan megvalósítható legyen.

Egyre nagyobb az igény az elemzések érzékenységeinek fokozására is. Az érzékenység definíciója tulajdonképpen azt fejezi ki, hogy a vizsgált koncentráció intervallumban, mennyi az a legkisebb koncentráció különbség, amelyet a használt módszer még egyértelműen meg tud különböztetni. Ennek számszerű mértékéül a kétszeres szórást használjuk.

A szükséges érzékenységi fok teszi lehetővé a már fiziológiailag értékelhető változások megbízható analitikai észlelését.

1.4.2. Fehérjementesítés nélküli elemzés

Az utóbbi évek során kidolgozott néhány fehérjementesítés nélküli analitikai eljárás, a már említett biológiai szempontok mellett, további előnyökre hívta fel a figyelmet. Lényegesen kevesebb egy-egy analízis munkafázisa, nincs időigényes centrifugálás, a kevesebb bemérés következtében a pontosság és a reprodukálhatóság várakozáson felül javult. Ezek a módszerek igen kis anyag, ill. minta mennyiséget igényelnek. Könnyen automatizálhatók, elmarad a komplikált dialízis, így különféle automata műszertípusra alkalmazhatók.

1.4.3. Az elemzések fotometriás, vagy egyéb műszeres kiértékelhetősége

A klinikai kémiai analízisekben nagy szerepük van a fotometriás eljárásoknak, a következő okok miatt:

A színreakciók nagy érzékenysége és ennek folytán a meghatározásokat kis minta mennyiségekkel is el lehet végezni.

Az eljárások aránylag egyszerűek, gyorsak, legtöbb esetben nem szükséges a meghatározandó komponens teljes izolálása.

A színreakciók nagy száma olyan anyagok meghatározását is lehetővé teszi, amelyek az analitika számára egyébként nehezen hozzáférhetők. /Enzimek, lipoidok, vitaminok, stb./

Nem igényelnek költséges műszerezettséget, így általánosan alkalmazhatók. A mérések átfolyós követéssel könnyen félautomatizálhatók.

A korszerű klinikai kémiai elemzések tekintélyes része a fotometriához kapcsolódik.

Ezenkívül ismertek a pH mérésre visszavezetett vér-gáz analízis ill. sav-bázis egyensúly vizsgálat, a kis számú ionszelektív membrán elektród alkalmazása és a gázkromatográfiás elemzések.

Mind nagyobb szerepet játszik azoknak a rendkívül alacsony koncentrációban található anyagoknak a mérése, amelyek kulcsfontosságúak az anyagcsere folyamatok szabályozásában /steroid hormonok, fehérjék, nukleinsavak, stb./. A mérések ultramikro módszerekkel történnek, amelyek izotóppal jelzett vegyületet igényelnek / ^3H , ^{14}C , ^{125}I , stb./. Ennek hatásaként a nukleáris műszerparkra épülő laboratóriumi vizsgálatok alkalmazása is megfigyelhető napjainkban.

1.4.4. Mikro módszerek használata

A mikro eljárások bevezetésének legfőbb indoka, hogy bizonyos esetekben /csecsemőknél, eszméletlen állapotban, stb./ nehézségbe ütközik a vizsgálathoz szükséges vénás vérvétel. Előnyt jelent, ha az elemzést a bőr megszurása által nyert kevés vérből is el lehet végezni. Ezenkívül az analízisek állandó szaporodó száma miatt, egyre gyakrabban merül fel szüksége annak, hogy minél kevesebb anyag felhasználásával tegyük lehetővé több összetevő elemzését ugyanabból a vérmintából. Nem lebecsülendő előny a mikro eljárások révén elérhető költség és anyagmegtakarítás jelentősége sem.

1.4.5. Az analitikai eljárások automatizálhatósága

Miután a jövő utja kétségtelenül az automatizálás,

ezért már most olyan módszerek alkalmazása, ill. kidolgozása szükséges, amelyek a későbbiek folyamán - a gazdasági és a technikai lehetőségek megvalósítása esetén - minden változtatás nélkül mechanizálhatók legyenek, azaz módszertani nehézségek a program kivitelét ne akadályozzák.

A kívánatos eljárások alapvető feltétele, hogy kevés mérési fázisból álljon és ne tartalmazzon olyan lépést, amely nem, vagy csak körülményesen mechanizálható. Megfelelő metodikák kidolgozásával kell biztosítani a már meglévő műszerek analízis programjainak kiszélesítését is.

Az analitikai eljárásokkal szemben támasztott követelmények összehangolásával biztosítható a kívánt vizsgálati mennyiség elvégzése megfelelő minőségben és idő intervallumban.

A fenti kívánalmaknak megfelelően kidolgozott elemzési eljárással érhető el továbbá a laboratóriumi személyzet munkaidejének célszerű felhasználása és a műszerezettség leggazdaságosabb kihasználtsága.

A felvázolt feladatok határozzák meg a klinikai kémiai laboratóriumok vegyészének tevékenységét és felelősségét. Nem kétséges ugyanis, hogy a megfelelő analitikai módszerek kiválasztása, ellenőrzése, vagy esetleg éppen kidolgozása többnyire egyedül az ő feladatát képezi.

2. FOTOMETRIÁS MIKRO ANALITIKAI ELJÁRÁSOK

2.1. SZÉRUM KARBAMID MEGHATÁROZÁS MIKRO ELJÁRÁSSAL

A fehérjeanyagcsere laboratóriumi vizsgálatához tartozik a vérben, a szérumban és a vizeletben a különböző nitrogén tartalmu anyagcsere termékek meghatározása. A szérum nitrogén tartalma elsősorban a nagy mennyiségű fehérjében található. A szérumnak nem fehérjében foglalt nitrogén tartalmát "maradék-nitrogén", vagy "rest-nitrogén" névvel jelölik. A maradék-nitrogén fogalmán egy sor nem fehérje természetű nitrogéntartalmu vegyület értendő, mint a karbamid, kreatin, kreatinin, húgysav, aminosavak, nukleotidok, glutathion, és számos más anyag, amelyek kémiai természete csak kevésbé tisztázott. Az 1. táblázat mutatja a szérum és a vér maradék-nitrogén, valamint frakcióinak átlagos normálértékét /20/.

A maradék-nitrogén természetesen csak nitrogén mg %-ban adható meg, ugyanez vonatkozik az aminosavnitrogén mg %-ra is. A karbamid koncentrációját mind nitrogén mg %-ban, mind karbamid mg %-ban kifejezhetjük. Hazánkban általában szokásosabb a karbamid-N-ben való koncentráció megadása, míg a külföldi irodalomban a karbamid mg % érték.

Az 1. táblázat adatai szérum és vér fehérjementesített szűrletére vonatkoznak. A fehérjék nitrogén tartalma miatt a fehérjementesítés szükséges. A táblázatból látható, hogy teljes vérben a maradék-nitrogén /a karbamid azonban nem/ valamivel nagyobb koncent-

rációju, minthogy a glutathion, a nukleotidok, stb. a vérsejtekben nagyobb mennyiségben vannak, mint a szérumban.

1. táblázat

Szérum és vér maradéknitrogén, valamint összetevőinek átlagos, normáltartománya.

Komponens	Szérum mg %	Vér mg %
Maradék-N	25 - 43	28 - 45
Karbamid-N	10 - 18	10 - 15
Karbamid	20 - 38	20 - 33
Aminosav-N	3 - 5	4,5 - 7
Hugysav-N	0,7 - 1,6	0,4 - 1,3
Hugysav	2 - 4	1 - 3
Kreatinin-N	0,4 - 0,6	0,4 - 0,6
Kreatinin	1 - 1,3	1,2 - 1,5
Glutathion-N	-	4,4 - 4,8
Glutathion	-	24 - 40
Nukleotid-N	-	4 - 7
Ergothionin-N	-	2,9 - 3,7
Ergothionin	-	16 - 20

Normál körülmények között a maradéknitrogén közel fele karbamidnitrogénnek, mintegy negyede aminosavnitrogénnek felel meg. Az egyéb összetevők a maradék negyedét képezik. Kóros körülmények között /pl. elégtelen veseműködésnél/ a teljes maradéknitrogén 80 %-át jelentheti a karbamidnitrogén koncentrációja.

2.1.1. Klinikai karbamid meghatározások értékelése

Tartalmában nem egészen pontosan definiált maradéknitrogén helyett az utóbbi időben a négy főkomponens /karbamid, szabad aminosav, kreatinin és húgysav/ külön-külön történő meghatározása terjedt el. Hazánkban a klinikai kémiai laboratóriumok mintegy 50%-ában a maradéknitrogén meghatározás még ma is használatos /18/.

Az elemzéseket Rappaport-Eichhorn szerint /21/, vagy módosításai alapján végzik. A meghatározás a következő elven alapul: A fehérjementesített vérhez, vagy szérumhoz mért alkalikus hipobromit oldat a fehérjementes szűrletben lévő aminocsoportú vegyületeket oxidálja. Az oxidáció befejeztével a hipobromit feleslege jodometriás titrálással meghatározható. A titrálásra fogyott nátriumtioszulfát mennyiségéből számolható a maradéknitrogén koncentrációja. Miután e módszer több lépésből áll /fehérjementesítés, centrifugálás, a szűrlethez lugos hipobromit, az oxidáció után sav, káliumjodid, keményítő bemérés, titrálás/ munka és időigényes, ezért ma már sorozat vizsgálatra nem megfelelő, valamint reprodukálhatósága az 5-6 térfogat mérés halmozódó hibája miatt nem kielégítő. A hipobromit oxidáló ereje időben csökken, ezért a titrálásra használt tioszulfáttal együtt naponta frissen készítendő, ill. higitandó tömény törzsoldatból, melyek hatóértéke, ill. faktora naponta ellenőrizendő. A meghatározás nem specifikus, hiszen több aminocsoporttal rendelkező vegyület koncentrációjának összegeként adódik a maradéknitrogén mennyisége, holott az összehasonlítás ill. a számolás karbamid standard segítségével történik.

A karbamid kórtani jelentősége miatt célszerű és

ajánlott, hogy minden hazai klinikai kémiai laboratórium, a karbamid meghatározására térjen át.

A karbamid analízise a klinikai laboratóriumi gyakorlatban a következő ismert elveken alapszik.

A fehérjementesített szűrletből a karbamid xant-hidrollal kicsapható és a vízben alig oldódó dixanthil-karbamid csapadék gravimetriásan, vagy nefelometriásan meghatározható /22,23/. Sorozatvizsgálatra időigényessége és a nagy szórummennyiség miatt nem megfelelő.

A karbamid bizonyos organikus vegyületekkel színes reakció terméket képez, amely fotometriás elemzésre alkalmas. Általában a diacetilmonoximmal képzett színreakciót részesítik előnyben és alkalmazzák /24, 25,26/. A reakció alapja a karbamidnak Fearon kondenzációja diacetilmonoximmal, savas közegben, melegítés hatására /27/.

A módszer utánvizsgálata alapján megállapítást nyert, hogy nem specifikus /citrullinnal, triptofánnal és alantoinnal is reagál/ ezenkívül a Beer-Lambert törvényt sem követi a klinikai laboratóriumban megkívánt koncentráció tartományban /28/.

Az ureáz enzim a karbamidot ammóniára és széndioxidra bontja és a keletkező ammónia mennyisége meghatározható. Erre a célra általában a Berthelot reakció használatos, a keletkező indolfenolkék nagy moláris extinkciós koefficiense miatt $\epsilon = 20.300$ - /28/. A gyakorlatban pufferolt ureáz szuszpenzióhoz mérendő szérum, majd 30 perc várakozás szükséges /37 C°-os termosztátban/ a karbamid bontás befejeztéig. Az ammónia meghatározásra használatos fenol és lugos hipoklorit reagens hozzáadása után kb. 1/2-1 óra múlva alakul ki az indolfenolkék színe, amely végül fotometriás kiértékelésre alkalmas. A szín instabil, fényre érzékeny.

A meghatározásnál mérjük a szérum eredeti ammónia tartalmát is, ez azonban a karbamid bontásából származó ammónia mellett elhanyagolhatóan csekély: /0,05 - 0,2 mg %/. Nem kétséges, hogy specifitás tekintetében az ureáz módszer a legmegfelelőbb karbamid meghatározás. Nem ismerünk ugyanis a karbamidon kívül más, a szervezetben előforduló vegyületet, amelyet az ureáz bontana. Az eljárás további előnye, hogy minta igénye: 20-100 μ l. A meghatározásnak van azonban néhány gyakorlati hátránya - enzim tisztaság, az enzim költsége, ammónia mentes reakció körülmények, 4-5 reagens használata, amely reagensek nem tárolhatók tartósan, idő igényessége és főként az időben elhuzódó színváltozás - amelyek nagyobb számu minták analizise esetén szinte át sem halhatók.

2.1.2. KARBAMID MEGHATÁROZÁS DIMETILGLIOXIMMAL

Abból a tényből kiindulva, hogy az oximok a karbamiddal reagálnak /29/ célszerűnek látszott, egy egyszerű, minimális és stabil reagenst igénylő, lehetőleg gyors karbamid meghatározást ezen elv alapján kidolgozni.

Kísérleti rész

A karbamid és a dimetilglioxim reakció optimális körülményeinek tisztázása céljából az alábbi kísérleteket végeztem. A reakció a karbamid és a dimetilglioxim között savas közegben és melegítés hatására játszódik le. Az aciditás biztosítására kénsavat alkalmaztam, a reakcióhőt forrásban lévő vízfürdő használatával biztosítottam. Mivel a dimetilglioxim vízben kis mértékben, alkoholokban azonban jól oldódik, ezért és a magasabb reakcióhőt is figyelembe véve, oldószernek glicerint alkalmaztam.

A kénsav célszerű koncentrációjának megállapítását a következő mérések alapján végeztem.

Alkalmazott kísérleti koncentráció:

Dimetilglioxim	3×10^{-2}	mól/l
Glicerin	4,0	mól/l
Kénsav	0 - 1,5	mól/l

A kísérletek alkalmával 2,0 ml, a leirt összetételű reagensbe mértem 20 μ l 50 mg % koncentrációju karbamid standardot. /A standard oldatot 0,1 % benzoésavval tartósítottam./ Az egyes reakcióelegyeket forrásban lévő vízfürdőbe helyeztem.

A szükséges reakcióidőt 100 C° hőmérsékleten a maximális fényelnyelés időbeli kialakulása alapján figyelem meg. A reakcióelegyek fényelnyelését, a kialakuló termék fényelnyelési maximumán, 480 nm hullámhossznál mértem. A mérésekhez "Spektromom 360" spektrofotométert és 1 cm-es küvettát alkalmaztam.

A fényelnyelés értékeit a kénsav koncentrációjának függvényében a 6. ábrán ábrázoltam.

Standard oldat helyett szérum alkalmazása esetén, az erősen savas közeg és a melegítés hatására a szérum fehérjék denaturálódtak. A heterogén oldat fotometriás kiértékelésre alkalmatlannak bizonyult. Ezért a fehérjék eltávolítására a következő fehérjementesítési eljárások közül igyekeztem kiválasztani a legcélszerűbbet. Savas szűrlethez 6×10^{-1} mól/l triklórecetsavat, ill. 6×10^{-1} mól/l perklórsavat alkalmaztam. Semleges szűrlethez 3×10^{-1} mól/l nátriumwolframát és $6,3 \times 10^{-1}$ mól/l kénsav 1 : 1 arányu elegyét használtam. Lugos szűrlethez $3,5 \times 10^{-1}$ mól/l cinkszulfát és 5×10^{-1} nátriumhidroxid 1 : 1 arányu elegyét alkalmaztam.

Minden esetben 1,0 ml fehérjementesítőhöz 100 µl szérumot, ill. karbamid standardot mértem és 10 perc várakozás után centrifugáltam le a denaturálódott fehérjét. Ezt követően 0,5 ml fehérjementesített homogén oldatot mértem 2,0 ml következő koncentrációju reagenshez:

Dimetilglioxim	3×10^{-2}	mól/l
Glicerin	4,0	mól/l
Kénsav	1,0	mól/l

20 perc 100 C°-on történő melegítés után mértem az egyes reakcióelegyek fényelnyelését, a fehérjementesítők összehasonlítása céljából.

A meghatározási eljárás egyszerűsítése érdekében szükségesnek látszott a bemérési lépések csökkentése. Megfigyeléseink szerint /30/ a szükséges reagensek /fehérjementesítő, színreagens/ egyetlen oldatban összehozhatók.

A megfelelő reagens összetétele:

Dimetilglioxim	3×10^{-2}	mól/l
Glicerin	4,0	mól/l
Kénsav	1,0	mól/l
Perklórsav	6×10^{-1}	mól/l

A meghatározásoknál 2,0 ml reagensbe mértem 20 μ l karbamid standardot, ill. szérumot, centrifugálás után a felüluszó homogén oldatot kémcsövekbe öntöttem át. 20 perc 100 C°-on történő melegítés után mértem a reakcióelegyek fényelnyelését és ebből számoltam a minta karbamid koncentrációját.

A leirt reagens és munkamenet alkalmazásával a meghatározás megbízhatósága és a reprodukálhatóság vizsgálata céljából a következő kísérlet sorozatot végeztem.

A Beer-Lambert törvény érvényességét vizsgáltam 0 - 200 mg % karbamid koncentráció tartományban, standard oldatok felhasználásával.

Ismert karbamid koncentrációju liofilizált kontrol szérummal /Versatol-General Diagnosztics gyártmány/ összehasonlító vizsgálatokat végeztem 10-10 párhuzamos mérés alapján. Az elemzések átlagértékeit és a százalékos eltérést a 2. táblázat tartalmazza.

Önkényesen kiválasztott szérumból 20 meghatározást végeztem a standard deviáció és a variációs koeficiens meghatározása céljából. Az eredményeket a 3. táblázat tartalmazza.

2. táblázat

Versatol N ^o 2709109	Saját mérés	Eltérés
26,0 mg %	27,5 mg %	+ 5,8 %
Versatol N ^o 2448079	Saját mérés	Eltérés
65,0 mg %	64,0 mg %	- 1,5 %

3. táblázat

Karbamid meghatározás hibaszámítása.

n	x	$ x-\bar{x} $	$ x-\bar{x} ^2$
1	57,2	2,0	4,00
2	58,5	0,7	0,49
3	63,0	0,8	0,64
4	59,0	0,2	0,04
5	58,5	0,7	0,49
6	62,0	1,8	3,24
7	60,8	1,6	2,56
8	57,1	2,1	4,41
9	57,5	1,7	2,89
10	58,9	0,3	0,09
11	61,2	2,0	4,00
12	58,3	0,9	0,81
13	59,6	0,4	0,16
14	56,9	2,3	5,29
15	58,1	1,1	1,21
16	58,9	0,3	0,09
17	62,4	3,2	10,24
18	58,9	0,3	0,09
19	57,4	1,8	3,24
20	60,2	0,4	0,16

$$\bar{x} = 59,2 \text{ mg \%}$$

$$s = \pm 1,52 \text{ mg\%}$$

$$VK = 2,6 \%$$

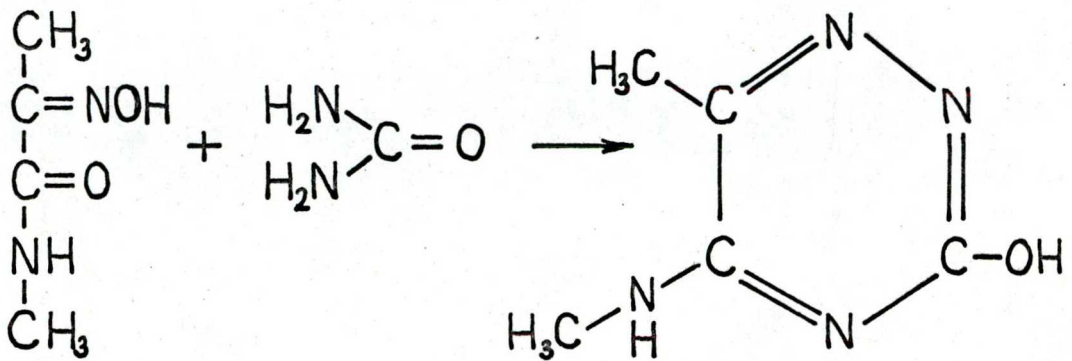
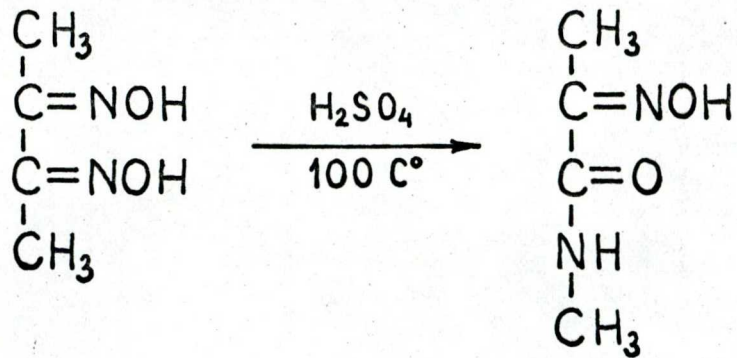
A kísérleti eredmények és értékelésük

A reakció a karbamid és a dimetilglioxim között valószínűleg a Beckman-féle oxim átrendeződéssel indul, kénsav hatására, magasabb hőmérsékleten /100 C°-on/. A további lépés azonos a diacetylmonoxim - karbamid reakcióval /27,31/. Ennek eredményeként 3-hidroxi-5-aminometil-6-metil-1.2.4.-triazin keletkezik, amely a konjugált kötések miatt színes, fényelnyelési maximuma a kísérleti körülmények között 480 nm-nél található.

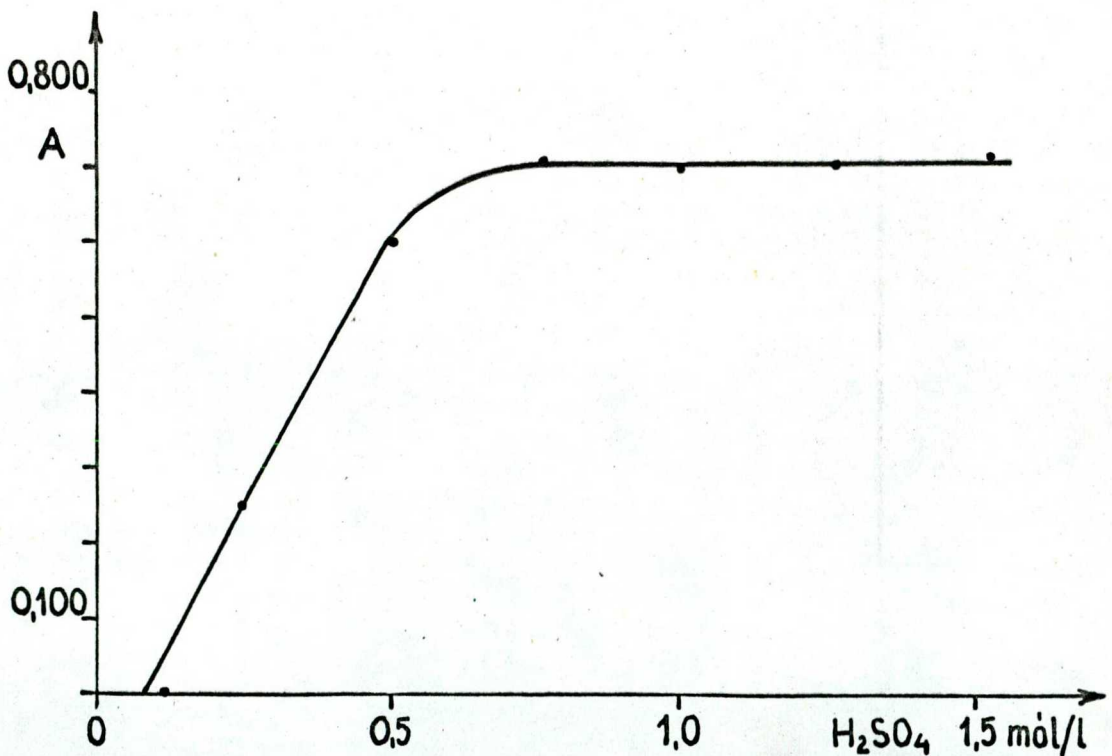
A reakcióhoz szükséges kénsav optimális koncentrációját - az adott kísérleti feltételek mellett - 1,0 mól/l-nek találtam. /6.ábra/ Perklórsav még 2,0 mól/l töménységben sem elégséges a reakció teljes lejátszódásához, tehát a hidrogénion koncentráció biztosításán túl kénsav jelenléte is szükséges.

Fehérjementesítésre legcélszerűbbnek a perklórsavat találtam. Így megoldható volt, hogy a kénsavas, dimetilglioximos reagens egyben a fehérjementesítőt is tartalmazza. A wolfrámsavas és a cinkhidroxidos fehérjementesítés is alkalmasnak bizonyult, a fényelnyelés értékében eltérést nem tapasztaltam.

Ezen fehérjementesítők használatakor azonban a fehérjementesített szűrlet további bemérése szükséges a savas dimetilglioximos reagensbe. A gyakorlatban legelterjedtebb fehérjementesítő a triklórecetsav nem alkalmazható, mert a reagens elkészítése után 2 - 3 napon belül reagál a dimetilglioximmal. Perklórsav használatakor hónapok alatt sem történik olyan változás, amely a reakcióképes dimetilglioxim teljes átalakulásához vezetne. Így a reagens szobahőmérsékleten is hosszabb ideig stabilis.



3-hidroxi-5-aminometil-6-metil-1.2.4-triazin



6. ábra Kénsav hatása a karbamid-dimetilglioxim reakció termékének fényelnyelésére.

Az eljárás 0 - 200 mg % karbamid koncentráció tartományban /a klinikai gyakorlatban előforduló határok/ követi a Beer-Lambert törvényt.

A kísérletek alapján a megfelelő reagens készítése, az analízis kivitele, az eredmény számolása, ill. értékelése a következő:

Karbamid reagens: Desztillált víz 400 ml
Glicerín 300 ml
Dimetilglioxim 3,5 g
Kénsav konc. 100 ml
Perklórsav 60 %-os 100 ml
oldódás után ad 1000 ml desztillált
vizzel.

Analízis kivitele:

Oldatok	Reag.vak	Standard	Minta
Karbamid reag.	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml
Standard	-	20 µl	-
Szérum	-	-	20 µl

Az oldatok mérése műanyag vagy üveg centrifuga csőbe célszerű. A szérum bemérése után a fehérje a perklórsav hatására kiválik. Centrifugálás után a felüluszó homogén reakcióelegyet kémcsövekbe öntjük át, majd pontosan 20 percre állandó forrásban lévő vízfürdőbe tesszük. Ezt követően csapviz alatt lehütjük és 480 nm-nél reagens vakra nullázott fotométeren mérjük a standard és a minta fényelnyelését. A reakció termék szinstabilitása szobahőmérsékleten 24 óra.

Az eredmény számolása:

$$\frac{\text{Minta extinciója}}{\text{Standard extikciója}} \times \text{standard mg \% koncentrációja} =$$

= minta mg karbamid tartalma / 100 ml szérum.

Normál érték: 20 - 50 mg karbamid / 100 ml szérum, ill.
10 - 24 mg karbamid-N / 100 ml szérum.

Meghatározási idő: 1 minta + standard ~ 30 perc
50 minta + standard ~ 60 perc

A megbízhatósági és reprodukálhatósági vizsgálatok alapján /2.- 3. táblázat, standard deviáció: $\pm 1,52$ mg %, variációs koefficiens: 2,6 %/ a módszer a klinikai laboratóriumi igényeket messzemenően kielégíti. Mivel az analízishez egyetlen reagens szükséges a módszer az automatizálás céljára kedvező.

Vér, liquor, vagy megfelelően higitott vizeletminta esetén a meghatározás a szérum karbamiddal analóg módon végezhető.

2.2. SZÉRUM ÖSSZFEHÉRJE MEGHATÁROZÁS MIKRO ELJÁRÁSSAL

Az emberi vér-plazma egészséges körülmények között 6,5 - 8,0 g % fehérjét tartalmaz, ami azt jelenti, hogy átlagos plazma térfogattal számolva a keringő plazmafehérje mennyisége felnőtt emberben kb. 200 gramm. A plazmafehérje voltaképpen különböző fehérje komponensekből áll, amely frakcionálási eljárásokkal összetevőire bontható.

A szervezetben egyetlen egységes fehérjeanyagcsere van, amelynek a plazmafehérjék is részei. A plazmafehérje kép tisztázásának első lépcsője az összfehérje mennyiségi meghatározása.

2.2.1. Klinikai összfehérje meghatározások értékelése

A klinikai laboratóriumi gyakorlatban alkalmazott plazma, ill. szérum összfehérje meghatározások a következők:

Kjeldahlometriás meghatározás /32/. A plazmát tömény kénsavval hevítve elroncsoljuk, mire a plazmában lévő fehérje nitrogénje ammóniává, ill. ammóniumszulfáttá alakul át. A roncsolás befejezése után a kénsav által megkötött ammónia meghatározható. Általánosan szokás a plazmafehérje nitrogén tartalmát 16 %-nak venni és ennek alapján a meghatározott nitrogén koncentráció 6,25-tel szorozva számítható a fehérje koncentrációja. Utánvizsgálatok szerint humán plazmafehérje meghatározásánál alkalmasabb a 6,54 szorzószám használata, amelyre többek nyomán Chariaviglio utal /33/.

Az elemzés igen pontos eredményt ad, különösen abban az

esetben ha desztillációval dolgozunk. Kielégítő pontosságú a Kjeldahlozás fotometriás befejezése is, a kén-savas oldat ammónia tartalma Nessler reagenssel, vagy Berthelot reakcióval fotometrálható.

A Kjeldahlometriás összfehérje meghatározás sorozat elemzésre a komplikált technikai kivitele miatt nem megfelelő, egy-egy meghatározás sok időt igényel. Egyéb fehérje meghatározási módszer kalibrálására, kontrol szérumok standardizálására használatos.

Gravimetriás meghatározás /34/. A plazmafehérje tetített ammóniumsulfáttal acetát pufferben, 100 C^o-on koagulál. A fehérje csapadék analitikai szűrőpapíron összegyűjthető, mosás és szárítás után gravimetriásan mérhető. Időigénye miatt sorozat vizsgálatra alkalmatlan.

Meghatározás fajsúly alapján. A plazma fehérjetartalma és fajsúlya közötti összefüggést a következő egyenlet adja meg:

$$\text{fehérje g \%} = \text{/fajsúly} - 1,007/ \cdot k$$

A k faktor értéke Phillips és mts.-i szerint 377 /35/.

Az eljárás sorozat vizsgálatra alkalmasnak látszik.

Előnye, hogy gyorsan kivitelezhető. Alkalmazásának akadálya, hogy különböző anorganikus és organikus plazma alkotórészek kóros szaporulata emeli a fajsúlyt és a hiba egyes esetekben + 10 % is lehet, a fajsúly alapján számított és a tényleges plazmafehérje érték között.

Meghatározás spektrofotometriásan /36/. A fehérjék ultraibolya fényben abszorbeálnak a vegyületben található peptidkötés, valamint az aromás aminosavak /tirozin, triptofán, fenilalanin/ jelenléte miatt. A fényelnyelés pH függő, pH 7,5-nél az abszorpció maximum 210 - 220 és 280 nm-nél található. Empirikus extinkciós koeficiens alapján számolható az összfehérje mennyisége.

A módszer nem specifikus a fehérjére, a szabad aromás aminosavak, a húgysav valamint a xanthin ultraibolya elnyelési zavarása miatt. A meghatározáshoz precíz és drága UV spektrofotométer szükséges.

Meghatározás biuret reakcióval.

A klinikai kémiai gyakorlatban a legelterjedtebb eljárás. Hazánkban a laboratóriumok háromnegyed részében használatos /18/, egyes országokban standard módszerként lett bevezetve /37/.

A mérésre az ad módot, hogy a fehérjék réz/II/ionokkal lugos közegben lila színű komplexet képeznek, amely fotometriás analízisre alkalmas. A fehérjékhez hasonlóan reagálnak a peptonok is, számos polipeptid, a biuret és általánosságban az összes olyan vegyület, amely legkevesebb két $-\text{CONH}_2$, $-\text{CONH}-$, $-\text{CSNH}_2$, $-\text{C}=\text{NH}/\text{NH}_2$ csoportot, ill. kötést tartalmaz.

A biuret módszert első ízben Riegler alkalmazta vizeletfehérjék meghatározására /38/. Azóta több módosítással használják plazma, ill. szérum összfehérje elemzésre. A biuret reakció lejátszódása és az előálló színezék a használt reagens összetételétől és koncentrációjától messzemenően függ. Eredetileg a CuSO_4 oldatot és a lugot külön-külön adták a mintához és a kivált réz-hidroxid csapadékot a reakció keverékéből el kellett távolítani. Kingsley állapította meg, hogy a réz-hidroxid csapadék kiválását a lugtartalom emelésével el lehet kerülni /39/. Hasonló hatást kívántak elérni a különböző komplexképzők hozzáadásával, amelyek a réz-iont alkalikus közegben komplex formában stabilizálják, azonban a réz-fehérje komplex kialakulását nem akadályozzák meg. Erre a célra a következőket ajánlották: etilén-glikol /40/, glicerin /41/, K-Na-tartarát /42/, karbamid /43/ és EDTE /44/.

A gyakorlatban általánosan elterjedt, hogy a réz/II/-ionokat tartarát komplex formájában tartják lugos oldatban. A reakció során a rézhez koordinálódott tartarát ligandum egy része peptidkötést tartalmazó fehérje ligandumra cserélődik ki.

A kicserélődési reakció időben elhúzódó, a réz-fehérje komplex lila színénc kialakulása a reakció indítása után több óra elteltével sem teljes, folyamatos fényelnyelés növekedés figyelhető meg. Ez által a meghatározás pontatlansága jelentős, mintegy + 5 % relatív hiba / óra.

Ezenkívül a reagens egy törzsoldat / CuSO_4 + KNa-tartarát/ és egy hígító oldat /NaOH/ keveréke, amely csak pár napig stabilis.

A meghatározás általában több lépésben történik, munkaigényes.

2.2.2. ÖSSZFEHÉRJE MEGHATÁROZÁS MÓDOSÍTOTT BIURET REAGENSSEL

A kicserélődési reakció időben elhúzódik, tehát az elemzés pontatlan, a reagens instabilis, a kivitel több lépéses, ezért indokoltnak látszott a biuret reakcióval történő összfehérje meghatározás felülvizsgálata és egy olyan reagens kidolgozása, amely a fent említett hátrányokkal nem rendelkezik /45/.

Kísérleti rész

A réz/II/ion lúgos közegű oldatban tartásához a következő ligandumokkal végeztem kísérleteket: citromsav, almasav, alanin, borkősav és EDTE. Az egyes ligandumok kiválasztásánál igyekeztem a klasszikusan használt tartaráthoz hasonló funkciós csoportú /- OH, -COOH/ vegyületeket alkalmazni. Több amin csoportot tartalmazó komplexképzők használata nem célszerű /di- etilén-triamin, trietanolamin, TRIS, stb./ hiszen ezek rézkomplexeinek saját fényelnyelése a réz-fehérje komplex elnyelési sávjában jelentős.

A kicserélődési reakció időbeni alakulását spektrofotometriásan követtem, a végtermék fényelnyelési maximumához tartozó hullámhossz /545 nm/ mellett.

Az oldatösszetétel minden kísérletnél a következő volt:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	8×10^{-3} mól/l
Ligandum	1×10^{-1} mól/l
NaOH	5×10^{-1} mól/l

A kivitel során 5,0 ml reagensbe 100 μ l standard szérumot mértem, amely összfehérje koncentrációja a gyári

adat szerint /Versatol/ 7,1 g % volt. A beméréssel egyidőben indítottam a stopperórát és figyeltem a fényelnyelés időbeli változását /7.ábra/.

A reakciósebesség megállapítása céljából a fényelnyelés kezdeti változását milliméter papíron nagyobb lépték mellett ábrázoltam /8.ábra/. Kezdeti reakciósebességnek az egyenesek, ill. a görbékhez húzott érintők iránytangensét tekintettem.

Kísérleteket végeztem a reakcióhoz szükséges lugkoncentráció megállapítására.

A következő oldat összetételt használtam:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	8×10^{-3}	mól/l
Ligandum	1×10^{-1}	mól/l
NaOH	$1 - 6 \times 10^{-1}$	mól/l

5,0 ml reagensbe mértem 100 μl , 7,1 g % fehérje koncentrációjú szérumot és 60 perc várakozás után regisztráltam az egyes minták fényelnyelését. Az 545 nm-en mért fényabszorpciót az alkalmazott lugkoncentráció függvényében ábrázoltam /9.ábra/.

A kísérletekhez használt ligandumok közül a citrát koncentrációjának hatását vizsgáltam a reakcióra.

A következő összetételű oldatot készítettem:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	8×10^{-3}	mól/l
Na_3 -citrát	$2 - 25 \times 10^{-2}$	mól/l
NaOH	5×10^{-1}	mól/l

5,0 ml reagensbe 100 μl szérumot adtam és 60 perc várakozás után mértem a fényelnyelést, amelyet a citrát koncentrációjának függvényében ábrázoltam /10.ábra/.

A kísérletek során keletkező termék spektrumát a következő oldat összetétel mellett vizsgáltam:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	8×10^{-3}	mól/l
Ligandum	1×10^{-1}	mól/l
NaOH	5×10^{-1}	mól/l

5,0 ml reagensbe mértem 100 μ l 7,1 g % fehérje tartalmu szérumot, majd 10 óra elteltével vettem fel a spektrumot, mikor a fényelnyelés értékében már változás nem történt /11.ábra/. A méréseket "Spektromom 360" spektrofotométerrel végeztem, 1 cm rétegvastagságu küvettát alkalmazva. A készüléket a mindenkori reagens vakra nulláztam.

A Beer-Lambert törvény érvényességét vizsgáltam 0-14 g % összfehérje koncentráció tartományban. A 7,1 g % fehérje koncentrációju standard szérumból 50, 100, 150 és 200 μ l-t mértem be 5,0 ml citrát ligan-dumot tartalmazó biuret reagensbe, majd mértem a fényelnyelési értékeket.

Ismert összfehérje koncentrációju, liofilizált kontrol szérum /Versatol-General Diagnostics/ felhasználásával ellenőrző méréseket végeztem 10-10 elemzés alapján. Az analizisek átlagértékeit a 4. táblázat mutatja.

A módszer pontosságának és reprodukálhatóságának megállapítása céljából 20 párhuzamos meghatározást végeztem önkényesen kiválasztott szérumból. A méréseket a 5. táblázat tartalmazza.

4. táblázat

Versatol N ^o 0186022	Saját mérés	Eltérés
7,30 g %	7,40 g %	+ 1,3 %
Versatol N ^o 2456121	Saját mérés	Eltérés
4,50 g %	4,58 g %	+ 1,7 %

5. táblázat

Összfehérje meghatározás hibaszámítása

n	x	$ x-\bar{x} $	$ x-\bar{x} ^2$
1	6,25	0,05	0,0025
2	6,33	0,03	0,0009
3	6,21	0,09	0,0081
4	6,45	0,15	0,0225
5	6,26	0,04	0,0016
6	6,19	0,11	0,0121
7	6,29	0,01	0,0001
8	6,40	0,10	0,0100
9	6,42	0,12	0,0144
10	6,22	0,08	0,0064
11	6,36	0,06	0,0036
12	6,20	0,10	0,0100
13	6,19	0,11	0,0121
14	6,49	0,19	0,0361
15	6,30	0,00	0,0000
16	6,19	0,11	0,0121
17	6,36	0,06	0,0036
18	6,38	0,08	0,0064
19	6,26	0,04	0,0016
20	6,20	0,10	0,0100

$\bar{x} = 6,30 \text{ g \%}$

$s = \pm 0,095 \text{ g\%}$

VK = 1,5 %



A kísérleti eredmények és értékelésük

A réz-fehérje komplex kialakulását a fényelnyelés időbeni alakulásával követtem, különböző kiindulási réz komplexek alkalmazása esetén. A mérési eredményeket a 7. ábra mutatja. A 8. ábrán a 30 percig történő fényelnyelés változást ábrázoltam.

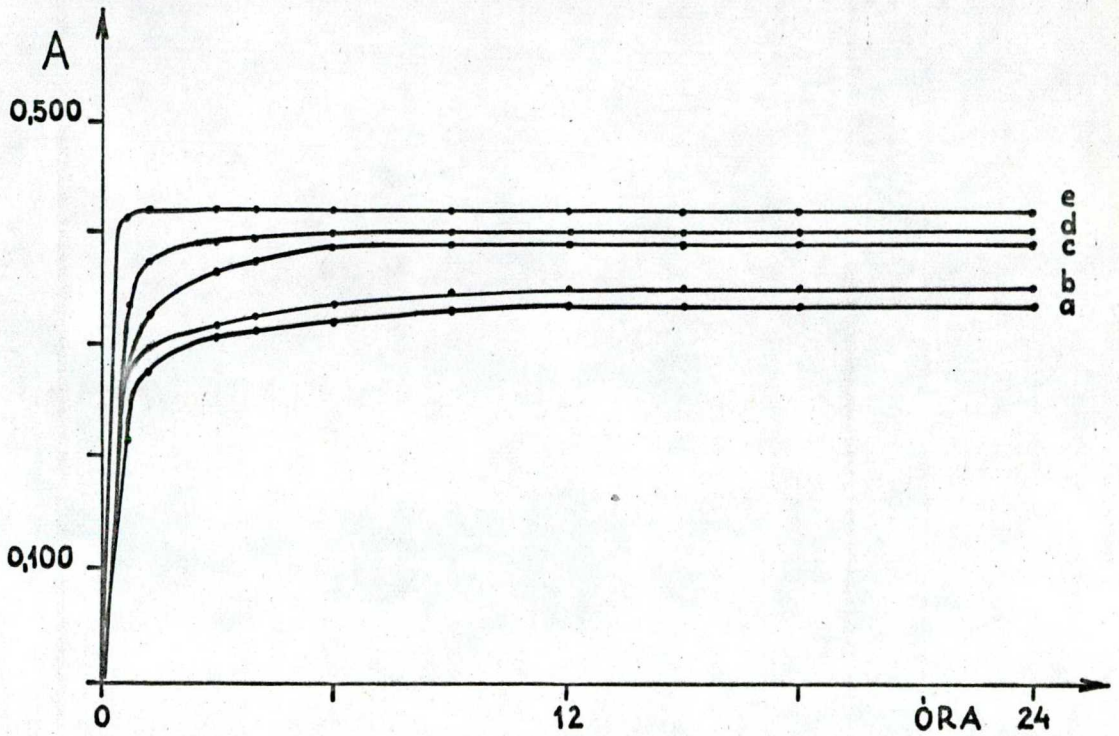
Az előzőekben már leírtak szerint az alkalmazott ligandumok feladata a rézhidroxid keletkezésének megakadályozása lúgos körülmények között. A 7. és 8. ábrán látható, hogy leggyorsabb a reakció citrát ligandum alkalmazása esetén, leglassabb pedig az eddigi gyakorlatban általánosan használt tartarát és EDTE ligandum jelenlétében.

Az iránytangensből számolt relatív kezdeti reakciósebesség az alkalmazott ligandumoknál a következő:

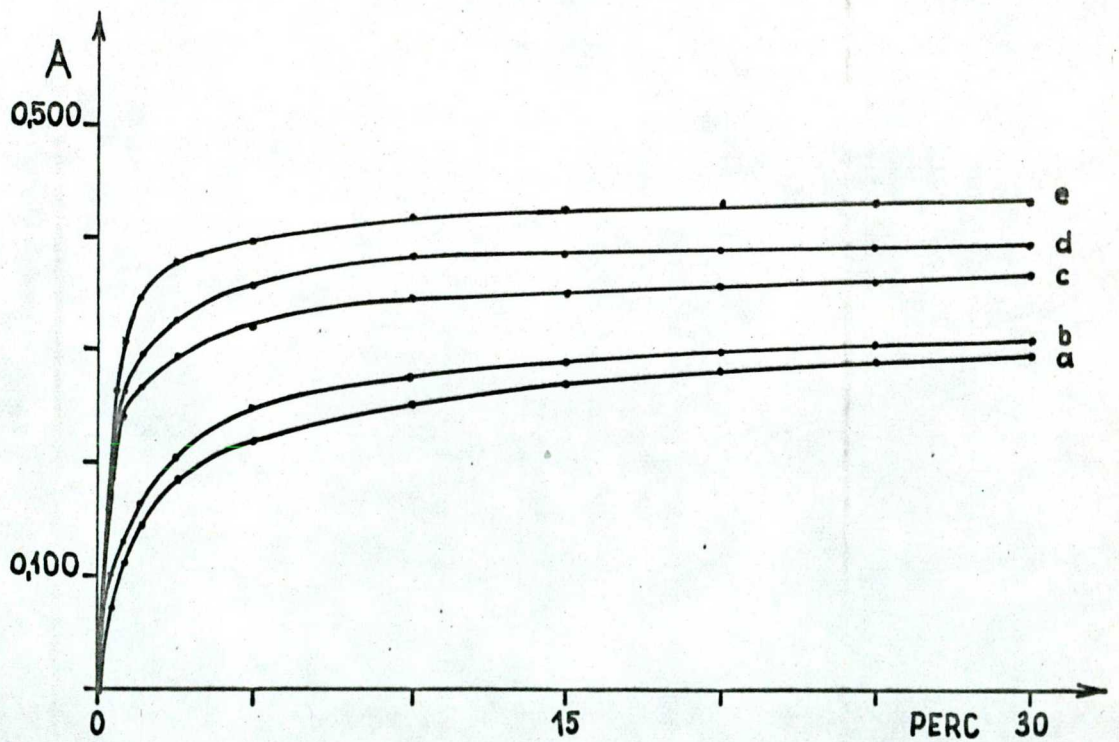
Ligandum	V_0
Citrát	0,340
Almasav	0,308
Alanin	0,305
Tartarát	0,195
EDTE	0,157

A fotometriás analízisre alkalmas termék fényelnyelése citrát ligandum alkalmazásakor a reakció indítása után 20 perccel határértéket ér el, míg tartarát és EDTE ligandumnál ez mintegy 10 óra után következik be. A 7. és 8. ábrán megfigyelhető továbbá, hogy a végtermék fényelnyelése citrát ligandum használatakor jelentősen nagyobb, mint tartarát, ill. EDTE ligandum esetében. /Minden kísérlet azonos reagens koncentráció és szérum fehérje tartalom mellett történt./

Az egyes ligandumok alkalmazásakor tapasztalható reakciósebességi és fényelnyelésbeli különbségek a



7.ábra A biuret reakció termékének fényelnyelés változása 0 - 24 óra között. Alkalmazott ligandumok: a./EDTE, b./tartarát, c./alanin, d./almasav, e./citrát.



8.ábra A biuret reakció termékének fényelnyelés változása 0 - 30 perc között. Alkalmazott ligandumok: a./EDTE, b./tartarát, c./alanin, d./almasav, e./citrát.

keletkező termékek stabilitásaival és szerkezeteivel hozhatók összefüggésbe.

Első közelítésben a reakció során a réz/II/iont lugos oldatban tartó komplexképző ligandum /L/ peptidkötést tartalmazó ligandumra /P/ cserélődik ki:



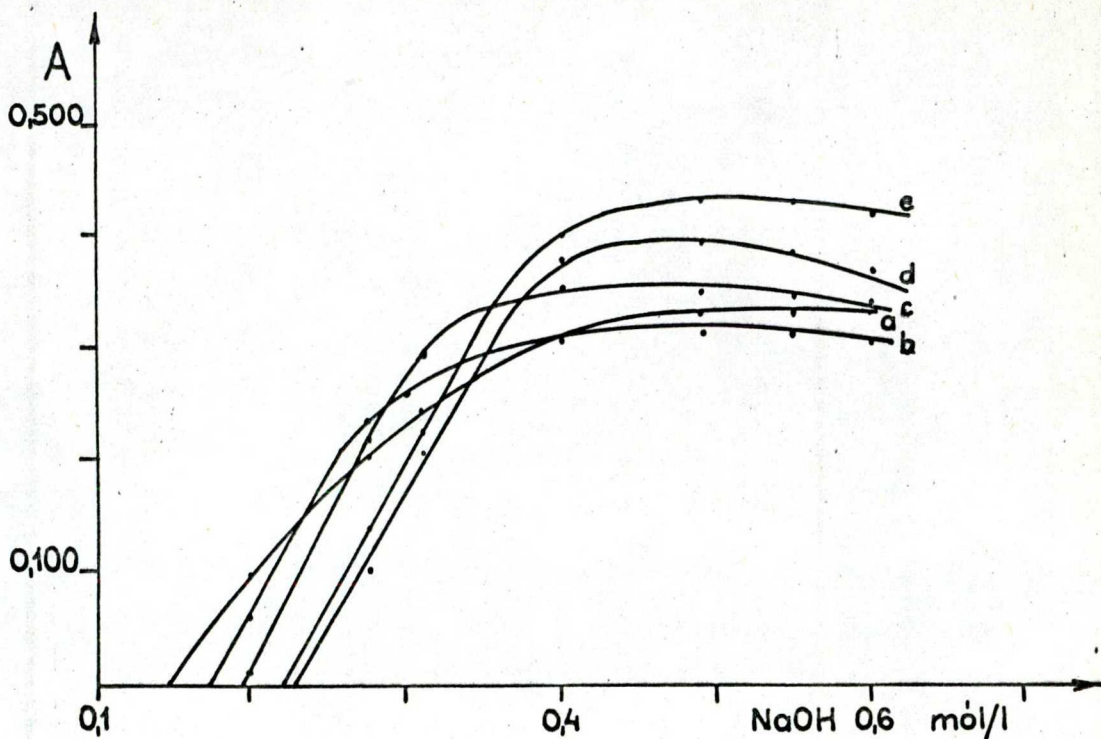
Ezen egyszerű kicserélődési reakció és ugyanazon CuP komplex keletkezése esetén azonos értékű fényelnyelés lenne várható különböző L ligandumok alkalmazása esetén. A kísérletek alapján talált fényelnyelésbeli különbség egyes komplexek képződésének lehetőségére hívja fel a figyelmet.

Vizsgálataim szerint a különböző komplexképző ligandumok alkalmazásakor közel azonos lugkoncentráció szükséges a maximális fényelnyelés kialakulásához. Ez a 9. ábrán látható.

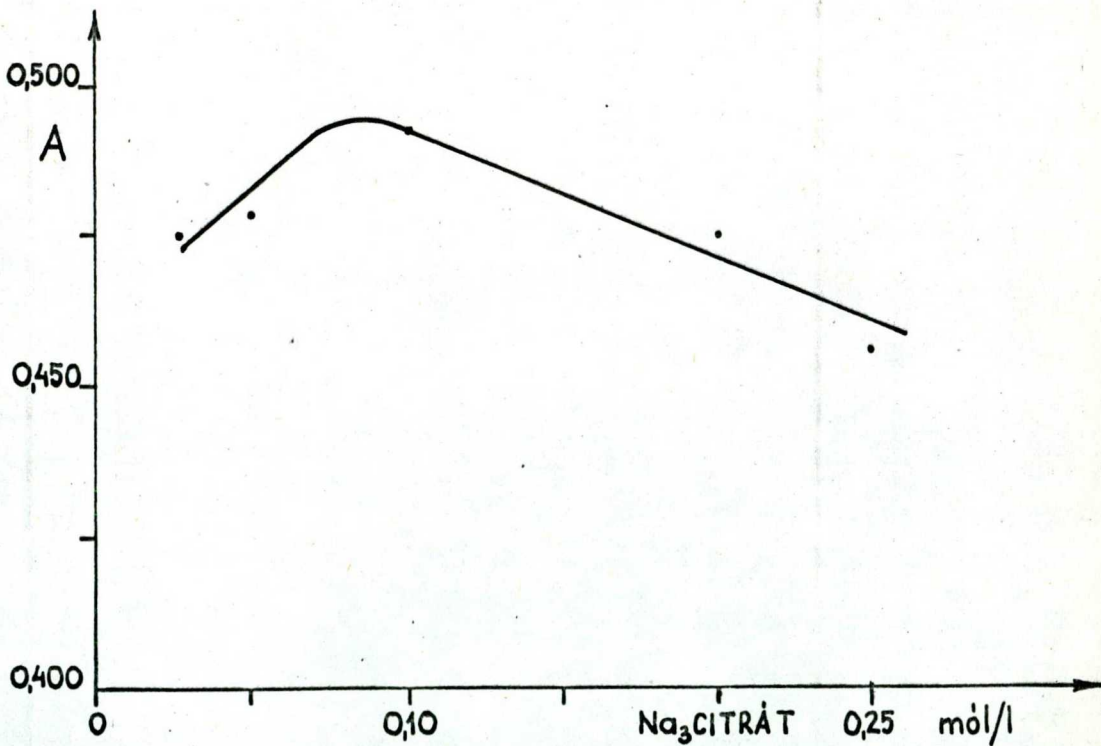
Az optimális lugkoncentráció 0,5 mól/l-nek adódott. Tehát a végtermék kialakulása függetlenül az alkalmazott ligandumtól azonos pH-nál következik be. Az egyes görbék lefutásában látható különbségek szintén a keletkező rézkomplexek szerkezeti és stabilitási különbségeivel magyarázhatók. A 0,6 mól/l lugkoncentráció feletti kismértékű fényelnyelés csökkenés a réz-fehérje \rightarrow réz-hidroxo komplex átalakulás kezdetére utal.

A kinetikai mérések alapján legcélszerűbbnek talált citrát ligandum koncentrációjának függvényében a fotometriás elemzésre alkalmas termék fényelnyelése maximum görbe szerint változik. 10. ábra.

$/2 \times 10^{-2}$ mól/l citrát koncentráció alatt a rézhidroxid kiválás, $2,5 \times 10^{-1}$ mól/l tartalom felett pedig a használt trinátrium-citrát oldékonysága szabott határt a vizsgált koncentráció tartománynak/.



9.ábra Lugkoncentráció hatása a biuret reakció termékének fényelnyelésére. Alkalmazott ligandumok: a./EDTE, b./tartarát, c./alanin, d./almasav, e./citrát.



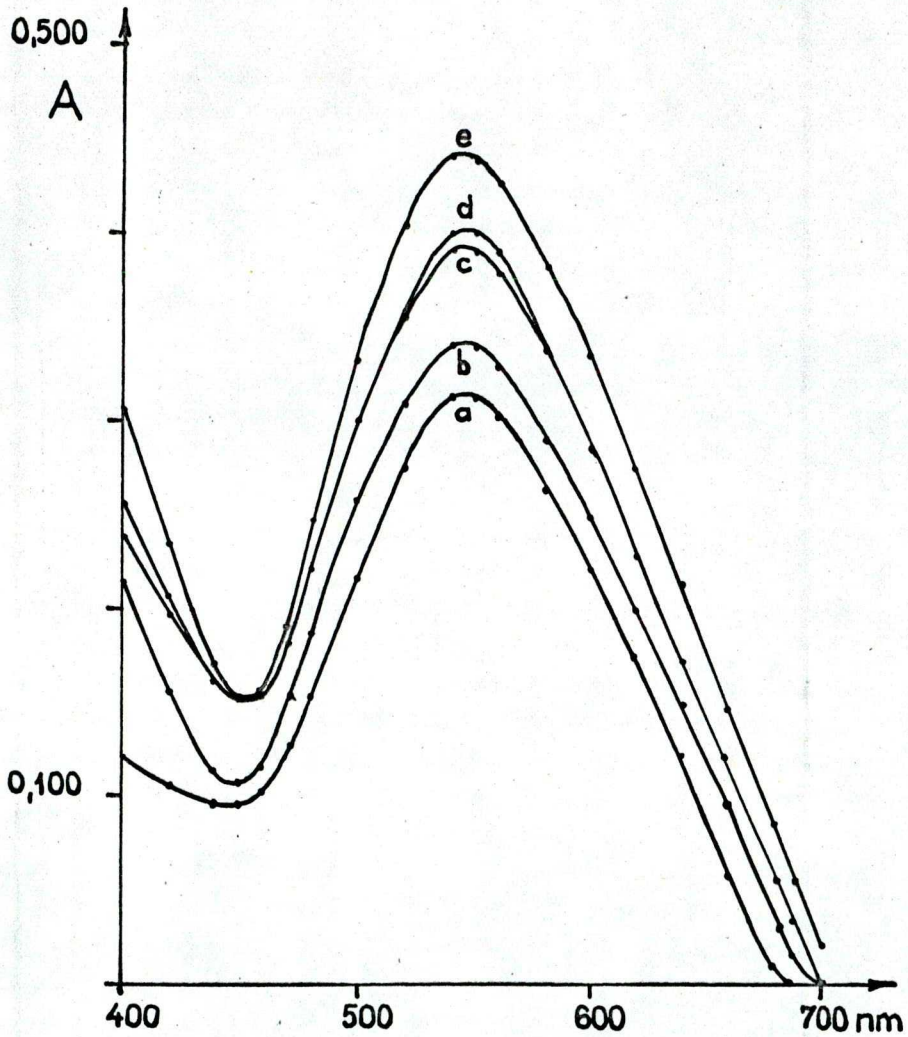
10.ábra Citrát ligandum koncentrációjának hatása a biuret reakció termékének fényelnyelésére.

A mérések alapján az látszik valószínűnek, hogy a reakció alkalmával a réz-fehérje komplex citrát ligandumot is tartalmaz, tehát vegyes komplex keletkezik. E vegyes komplex képződési sebessége és fényelnyelése nagyobb, mint az általam vizsgált többi ligandum kicserélődése folytán keletkező komplexé.

A vizsgált rézkomplexek kicserélődése esetén a keletkező végtermékek spektrumai a 11. ábrán láthatók. A fényelnyelési maximumok 540 - 550 nm-nél találhatóak. A spektrumok közel azonos lefutásából arra lehet következtetni, hogy egy hasonló szerkezetű réz-fehérje, ill. réz-fehérje vegyes ligandumu komplexek képződnek, amelyek pontos összetételét még nem ismerjük eléggé. Annyi bizonyos, hogy kelát típusu, polinukleáris, színes rézkomplexek képződésével kell számolni, amely szerkezetének jelölésére még nincs egységes álláspont.

A Nielsen által javasolt strukturát ábrázolja szematikusan az 57. oldalon látható I. képlet, oly módon, ahogy a peptidláncban a rézionok elhelyezkedhetnek /46/. Egy rézion a -CONH- csoportok négy nitrogén atomjához koordinatíven kötődik. Ez a négy nitrogén atom a rézionokkal planáris helyzetű. Sztöchiometrikusan az következik ebből, hogy egy réz/II/ion négy nitrogén atomot, ill. négy peptid kötést köt le. Erősen alkalikus oldatban ehhez még hozzájárul a peptidlánc felcsavarodása úgy, hogy egyidejűleg két peptidláncot a négy nitrogén atommal koplánáris állásba lehet találni /47/.

Ray és Sen a reakciót közelebbről is felderítették /48/. Szerintük összefüggés áll fenn a szintónus és a rézionoknak a fehérjékhez való kötődési módja között. Közelebbi vizsgálataikból kiderült, hogy a színezék legkevesebb két komponensből tevődik össze. Az egyik /vöröses-lilás komponens/ 540 - 560 nm-nél



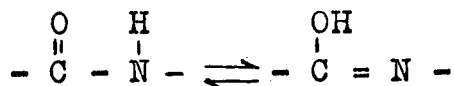
11.ábra A biuret reakcióban keletkező
komplexek spektrumai.
Alkalmazott ligandumok:
a./EDTE, b./tartarát, c./ala-
nin, d./almasav, e./citrát.

mutat abszorpciós maximumot és mintegy 48 óráig a fényelnyelés állandó. Ez egy réz-fehérje komplexre vezethető vissza, amely igen stabilis. A második /kék komponens/, amely 700 - 750 nm tartományban mutat fényelnyelési maximumot, egy labilisan kötött rezet tartalmaz és ezért a fényelnyelés ennél a hullámhossznál igen gyorsan csökken. Ez arra látszik utalni, hogy a rendszerben a rézhidroxid, ill. réz-hidroxo komplexek is átalakulnak réz-fehérje komplexé.

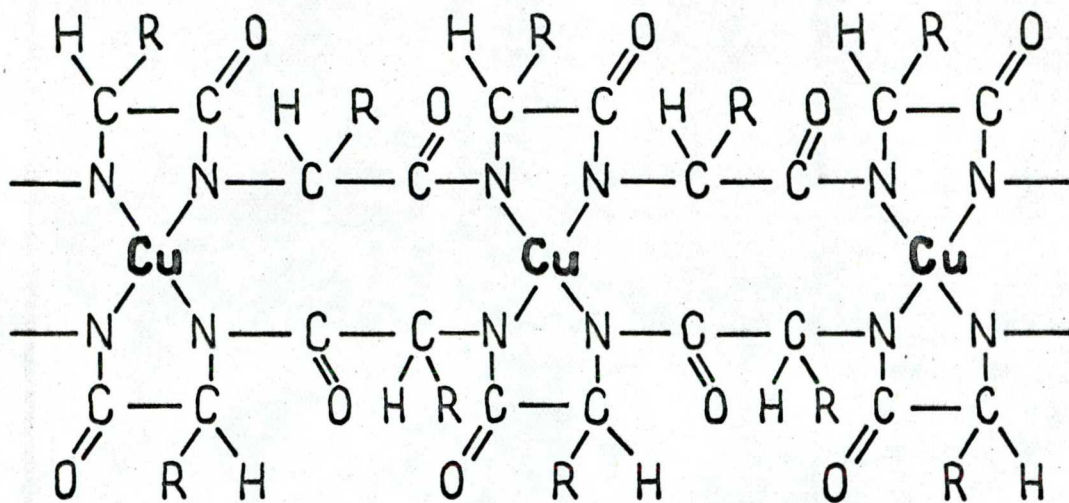
Aida és mts.-i szerint a biuret a rézionnal alkalikus közegben két kelátot képez, egy vörös színűt, amelynek összetétele: $\text{Na}_2 [\text{Cu}/\text{C}_2\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_2/2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ és egy ibolya színűt, amely $\text{Na} [\text{Cu}/\text{C}_2\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_2//\text{OH}//\text{OH}_2/] \cdot \text{H}_2\text{O}$ képlettel írható le /49/.

Az első esetben a biuret molekula nitrogénje és a rézion koordinatíven kötődik a komplexben, míg a másik kelátban egy nitrogén - fém koordináció, továbbá egy oxigén-fém koordináció - az -OH és OH_2 csoportokon keresztül - is szerepel.

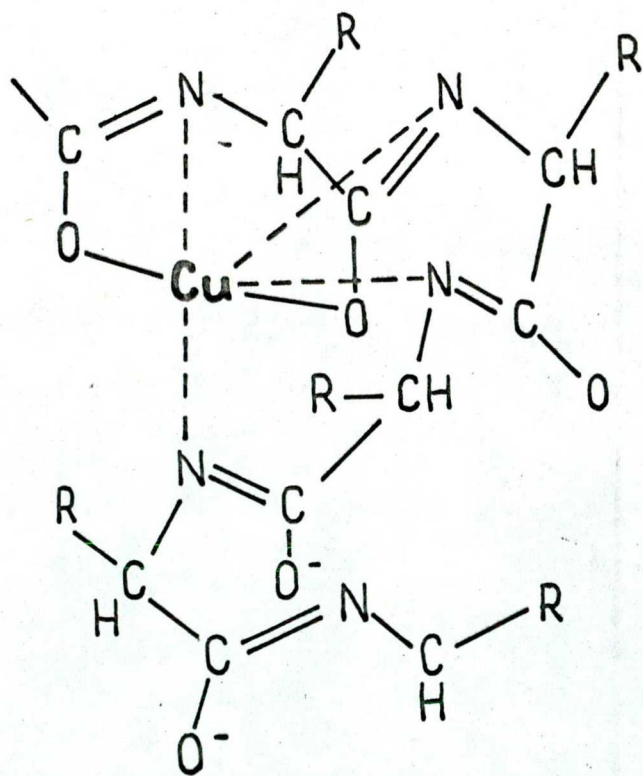
További kutatások alapján a biuret reakcióhoz lúgos közegben két OH csoport és több nitrogén atom szükséges, ami lehet két szomszédos polipeptidláncon, vagy ugyanazon peptidláncon belül /50/. Lúgos közegben a -CONH- peptid csoport tautomér alakja van jelen:



Erősen lúgos oldatban az enolos OH csoport nitrogénje disszociál, az így keletkező negatív töltés segítségével az oxigén a rézzel kötődik, a nitrogének pedig szabad elektronpárjaikkal datív kötést hoznak létre a rézzel. Az így keletkező komplex rendkívül stabilis. Egy peptidlánc esetén a komplex szerkezete / α -helix struktúra alapján/ a II. képlettel jelölhető.



I.



II.

A kísérleti eredmények arra utaltak, hogy a kitűzött cél - érzékenység fokozás, pontosság és reagens stabilitás - elérésére a citrát ligandum használata látszott a legalkalmasabbnak.

A vizsgálatok szerint az elemzéshez szükséges reagens összetétele, az analízis kivitele, az eredmény számolása és értékelése a következő:

Biuret reagens: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2,0 g
Citromsav 21,0 g
200 - 300 ml vízben való oldás után
NaOH 1 mól/l 500,0 ml, ezt követően
vizzel 1000 ml-re egészítjük ki.

Analízis kivitele:

Oldatok	Reag.vak	Standard	Minta
Biuret reagens	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml
Standard szérum	-	20 μl	-
Minta szérum	-	-	20 μl

20 perc várakozás után reagens vakra nullázott műszeren mérjük 545 nm-nél a standard és a minta fényelnyelését.

Az eredmény számolása:

$$\frac{\text{Minta extinciója}}{\text{Standard extinciója}} \times \text{standard g \% koncentrációja} =$$

= minta g összfehérje tartalma / 100 ml szérum.

Normál érték: 6,5 - 8,0 g összfehérje / 100 ml szérum.

Meghatározási idő: 1 minta + standard \sim 25 perc
50 minta + standard \sim 40 perc

A meghatározott standard deviáció: $\pm 0,095$ g %
és a variációs koefficiens: 1,5 % alapján /5. táblázat/ a módszer a klinikai laboratóriumi gyakorlatban megfelelő és a tudományos igényeket is kielégíti.
0 - 14 g % összfehérje koncentráció tartományban a Beer-Lambert törvény érvényes. Az analízis egyetlen reagenst igényel, amely szobahőmérsékleten hónapokon át tárolható. Az eljárás automatizálása megfelelő, 500 μ l liquor, vagy vizeletminta használatakor az elemzés hasonlóan végezhető el.

2.3. SZÉRUM GLÜKÓZ MEGHATÁROZÁS MIKRO ELJÁRÁSSAL

A táplálékkal a szervezetbe jutó poliszaharid vegyületek lebontásra kerülnek és mint monoszaharidák szívódnak fel. Ezek leglényegesebb képviselője a szénhidrátanyagcsere központi anyaga a glükóz /dextróz, szőlőcukor/. A "vércukor szint" általános megjelölés, a vérben lévő glükóz koncentrációját jelenti. Egészséges körülmények között koncentrációja a vérben, a több oldalú hormonális szabályozás következtében eléggé állandó, míg a szénhidrátanyagcsere zavaraiiban széles határok között változhat.

A szénhidrátanyagcsere vizsgálata közül a glükóz meghatározása a leggyakoribb.

Igy nem meglepő, hogy egyike a leggyakrabban és a legnagyobb mennyiségben végzett elemzéseknek. Ma már számos módszer ismeretes, amelyek végeredményben mind alkalmasak a vércukor mennyiségi meghatározására. Az egyes módszerek előnyeiről és hátrányairól azonban ma is élénk vita folyik.

2.3.1. Klinikai vércukor meghatározások értékelése

Redukción alapuló vércukor meghatározások.

Hagedorn és Jensen szerint /51/ a vér fehérjét cinkhidroxiddal kicsapjuk, majd a cukortartalmu szűrlet lugos közegben forralva kálium-[hexacianoferrát/III/]-ot redukál. A feleslegben maradt kálium-[hexacianoferrát/III/]-ot káliumjodid és sav hozzáadása után jodometriásan határozzuk meg.

A tioszulfát fogyásból számolható a glükóz koncentrációja.

Shaffer és Hartmann szerinti eljárás fehérjementesítés után, a Fehling oldat cukor által történő redukcióján alapszik /52/. Az így keletkező Cu_2O -t káliumjodát CuO -dá oxidálja, a feles jodát tioszulfáttal visszaitrálható.

A redukción alapuló vércukor meghatározásokat még a hazai klinikai laboratóriumok közel 20 %-a használja /18/. A mai minőségi igényeket már nem elégíti ki, közismert hátrányai miatt. Ezek a következők: a glutathion, glükoronsav, hugysav, kreatinin, aszkorbinsav, galaktóz, és a mannóz, a glükóz mellett további redukciót okoz. Az ebből származó hiba pl. cukorbetegségben a + 20 - 30 %-ot is elérheti. Rendkívül munka-és időigényes eljárások, hiszen pl. a Hagedorn-Jensen módszerhez kilenc reagens szükséges.

Fotometriás vércukor meghatározások.

Az utóbbi évek folyamán több specifikus színreakción alapuló vércukor meghatározást irtak le. Ezek közös alapját az képezi, hogy a cukrok alifás és aromás primer aminokkal kondenzációs reakcióba lépnek. A keletkező reakciótermékek /Schiff bázis alapu N-szubsztituált glikozilaminok/ színesek, fotometrálnak. Az említett reakciók erősen savas közegben játszódnak le, melegítés hatására.

Először a p-aminoszalicilsav színreakciója alapján dolgoztak ki vércukor meghatározást /53/. A színreakciót csak az aldoszaharidák adják, a ketocukrok nem. A difenilamin szintén használható glükóz reagensként /54/. Hasonló eljárást közölt Lorenz /55/, aki színreagensnek anilint használt. Glükózra nem specifikus a ketocukrok pozitív reakciója miatt.

A primer aromás aminokkal történő glükóz meghatározások közül az o-toluidines módszer terjedt el leginkább a gyakorlatban. A hazai klinikai laboratóriumok 72 %-ban használatos /18/. A reagenst vércukor meghatározásra Hultman írta le először /56/. Koncentrált ecetsavban oldott o-toluidint alkalmazott, ehhez mérte a vér fehérjementesített szűrlését, vagy szérumot. A reakcióhoz szükséges melegítési idő $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 7 - 10 perc. Specifitását tekintve a glükózon kívül, galaktózzal, manózzal és laktózzal ad az o-toluidin színes reakcióterméket /57/. Ezek zavaró hatásával a vérben lévő alacsony koncentrációjuk miatt csak kivételes esetekben kell számolnunk. Az eredeti közlemény óta számos módosítás jelent meg az irodalomban. Egyes kutatások a tömény ecetsavas közeg kiküszöbölésének irányába haladtak. Problémát jelent ugyanis a tömény ecetsavas reagens maró hatása, mind a személyzet, mind a készülékek számára. Velösy és Mészáros szerint 50 %-os ecetsavas közegben is elvégezhető a meghatározás, némileg hosszabb reakcióidő alkalmazásával /58/. Ismeretesek ecetsavmentes o-toluidin reagensek is. Ezekben az esetekben a reakcióhoz szükséges proton katalizist más szerves savval, ill. savakkal /glikolsav, almasav, citromsav, bórsav/ biztosítják /59,60/. A módosított eljárások általános jellemzője az, hogy a reakció előtt a vizsgálati anyagot fehérjementesíteni szükséges, hiszen a savas közeg hatására a fehérjék denaturálódnak, kicsapódnak, az így keletkező heterogén oldat közvetlen fotometriás mérésre alkalmatlan. Fehérjementesítés nélküli o-toluidines szérum glükóz meghatározást írt le Hann és Roth /61/. A módszer egyike a legjobb o-toluidines eljárásnak, azonban az általuk alkalmazott glikolsav /aciditás

biztosítására/ és hexametilfoszfortriamid /reagens stabilizáló/ magas ára miatt a gyakorlati alkalmazásban - különösen sorozat vizsgálatra - nem terjedt el.

Enzimatiszus glükóz meghatározások.

Egyike a glükózoxidáz / peroxidáz módszer, miszerint a glükózoxidáz enzim a glükózt glükonsavvá oxidálja, miközben hidrogénperoxid keletkezik. Ez utóbbi, peroxidáz enzim jelenlétében, megfelelő kromogén tulajdonságu vegyületet oxidálni képes. A színintenzitás mértéke arányos az eredeti glükóz tartalommal. Kromogénként o-dianisidin, o-tolidin, kromotrópsav használatos /62,63/.

Az eljárás abszolút glükóz meghatározási módszerként jelentkezett az irodalomban, de az évek során kiderült, hogy a gyakorlatban nem teljesíti maradéktalanul ezt a feltételt /64/. Az első lépés specifikus, míg a második teljesen aspecifikus reakció. Ugyanis a legtöbb peroxidáz preparátum katalázal szennyezett, ezért a keletkező hidrogénperoxid egy része már eleve elbomlik, a kromogént nem oxidálja. Ehhez járulnak mindazok a redukáló tulajdonságu anyagok /hugysav, glutathion, aszkorbinsav/ amelyek a reakciót zavarják. Ezért a valódi glükóz értéknél alacsonyabbat mérünk, amely extrém alacsony vércukor szint esetén akár nulla glükóz eredményre is vezethet. Mindezekhez járul még a különböző kromogénekből adódó probléma /szinállandóság, autooxidáció, fotokémiai hatás, stb./.

A másik enzimatiszus eljárás a hexokináz / glükóz-6-foszfátdehidrogenáz módszer. Alapja az a megfigyelés, hogy a glükóz adenozintrifoszfáttal hexokináz jelenlétében glükóz-6-foszfáttá alakul.

Ez utóbbi nikotinsavamid-adenindinukleotid /NAD/ koenzim és glükóz-6-foszfát-dehidrogenáz enzim segítségével glükonát-6-foszfáttá alakul, miközben a NAD koenzim redukálódik. A keletkező redukált nikotinsavamid-adenindinukleotid /NADH₂/ koenzim fényelnyelése 340 nm-nél mérhető. Abszorpciója a reakció alapján arányos az eredeti glükóz tartalommal /65/. E reakció alapján kétségtelenül a legspecifikusabb glükóz elemzés. A gyakorlatban azonban a glükóz-6-foszfátdehidrogenáz majdnem minden esetben szennyezett glükonsav-6-foszfátdehidrogenázzal. Ezáltal a tényleges glükóz tartalomnál magasabb értékeket kapunk. Előfordul, hogy a hexokináz tartalmaz hexozefoszfát-izomerázt és ez esetben a fruktóz értékek is hozzáadódnak a valódi glükóz értékéhez /64/. A klinikai laboratóriumi gyakorlat számára, nem csak az enzimpreparátumok drágasága miatt nem terjedt el, de a NADH₂ koenzim mérése az UV tartományban széria vizsgálatokra nem a legcélszerűbb, mert minden minta esetén az enzimreakció előtti és utáni fényelnyelés értékeket mérni kell, mert abból számolható a glükóz koncentrációja.

2.3.2. FEHÉRJEMENTESÍTÉS NÉLKÜLI GLÜKÓZ MEGHATÁROZÁS o-TOLUIDINNEL

Az o-toluidines módszerről - széles körű elterjedtsége ellenére - sem egységes a vélemény. Az ellenvetések főként a tömény savas közeg maró hatása, a fehérjementesítés és a reprodukálhatóság bizonytalansága köré csoportosulnak.

Egyes szerzők nagy számú és precíz vizsgálatokkal azonos eredményre jutottak az enzimátikus glükóz elemzéssel nyert értékekkel /64,65/. Az átlagos eltérés \pm 1-2 % volt. E biztató eredmények alapján olyan eljárást igyekeztem keresni, ahol az o-toluidines módszer gyakorlati hibái minimálisra csökkenthetőek. Tisztázni kívántam, hogy lehetséges-e az o-toluidines glükóz meghatározást olyan módosítással használni, hogy a reagens ne tartalmazzon tömény savat, kevésbé költséges vegyszereket igényeljen, valamint az elemzés ne kívánjon előzetes fehérjementesítést, minél kevesebb mérésből álljon az automatizálás alkalmazhatósága céljából.

Kísérleti rész

A reagens megfelelő összetételének meghatározására a következő kísérleteket végeztem.

Mivel az o-toluidin / glükóz reakció sav jelenlétében melegítés hatására játszódik le, a szérumfehérjék ilyen közegben denaturálódnak, az oldatból kiválnak. A fehérjék oldott állapotban való tartását több alkohol kipróbálása után /szerkezet, forráspont, oldhatóság és ár figyelembevételével/, a megfelelő védőkolloid hatású benzilalkohollal kívántam biztosítani.

A benzilalkoholnak a fehérje stabilizáló és a reakcióra történő hatását a következő oldat összetétel mellett vizsgáltam:

Tiokarbamid	$6,6 \times 10^{-2}$	mól/l
Ecetsav	5,0	mól/l
Benzilalkohol	2,0 - 4,0	mól/l
o-Toluidin	$9,4 \times 10^{-1}$	mól/l

A reagensben alkalmazott tiokarbamid szerepe az o-toluidin oxidációjának megakadályozása /57/. Oldószernek minden kísérlet alkalmával desztillált vizet alkalmaztam. Felhasználás előtt az o-toluidint cinkporról desztilláltam le, így közel szintelen reagenst tudtam készíteni. Minden kísérletnél 3,0 ml reagensbe mértem 50 μ l, 120 mg % glükózt és 7,5 g % összfehérjét tartalmazó standard szérumot. Összekeverés után, a reakció elegyeket 15 percre forrásban lévő vízfürdőbe helyeztem. Lehűtés után, a keletkezett zöld színű termék fényelnyelését 645 nm-nél mértem, a műszert reagens vakra nullázva. A méréseket "Spektromom 360" spektrofotométerrel végeztem, 1 cm-es kivetítát alkalmazva. A mérési eredményeket a 12. ábrán ábrázoltam.

A fehérjék oldatban tartásának megfigyelését 0-15 g % közötti összfehérje tartalmú mintákkal vizsgáltam. Az oldat összetétele és az analízis kivitele az előbb leírtakkal azonos. Az esetleges fehérje koagulálódást a reakcióelegyek opálosságának vizsgálatából állapítottam meg a Tyndall jelenség vizuális megfigyelése alapján.

A célszerű ecetsav koncentráció meghatározására a következő összetételű reagensekkel végeztem méréseket:

Tiokarbamid	$6,6 \times 10^{-2}$	mól/l
-------------	----------------------	-------

Ecetsav	3,3 - 10,0	mól/l
Benzilalkohol	2,9	mól/l
o-Toluidin	$9,4 \times 10^{-1}$	mól/l

3,0 - 3,0 ml reagensbe 50 μ l, 120 mg % glükóz koncentrációju standard szérumot mértem, majd 100 C^o-os vízfürdőbe helyeztem a reakcióelegyeket. A melegítési időtartamoknál az optimális reakcióidő meghatározás eredményeit vettem figyelembe. A reakciótermék fényelnyelését az ecetsav koncentráció függvényében a 13. ábrán ábrázoltam.

Az optimális reakcióidő meghatározását a következők alapján végeztem. A 10,0 - 8,35 - 5,0 mól/l ecetsavat és standardszérumot tartalmazó reakcióelegyeket pontosan 5 - 10 - 15 - 20 percig melegítettem forrásban lévő vízfürdőn. A reakcióelegyek fényelnyelési értékeit a reakcióidő függvényében a 14. ábra tartalmazza.

Különböző koncentrációju ecetsavat tartalmazó reagensek használatakor a keletkező színes reakcióterméknek a spektrumát vettem fel a látható tartományban /15. ábra/.

A gyakorlat számára célszerűnek talált reagens alkalmazásával a megbízhatóság és a reprodukálhatóság meghatározására kísérlet sorozatot végeztem.

A méréseknél használt reagens összetétele:

Tiokarbamid	$6,6 \times 10^{-2}$	mól/l
Ecetsav	5,0	mól/l
Benzilalkohol	2,9	mól/l
o-Toluidin	$9,4 \times 10^{-1}$	mól/l

Az analízisek kivitelénél 2,0 ml reagensbe mértem 20 μ l glükóz standard oldatot, ill. szérumot.

15 perc 100 C^o-on történő melegítés után mértem a fényelnyeléseket és ebből számoltam a minták glükóz koncentrációját.

A Beer-Lambert törvény érvényességét vizsgáltam 0 - 1000 mg % glükóz koncentráció tartományban, vizes standard oldatok felhasználásával.

Ismert glükóz koncentrációju liofilizált kontrol szérumokkal /Versatol-General Diagnostics/ összehasonlító vizsgálatokat végeztem 10 - 10 mérés alapján. A mérési eredményeket a 6. táblázat mutatja.

A standard deviáció és a variációs koefficiens meghatározása céljából önkényesen kiválasztott szérumból 20 párhuzamos elemzést végeztem. A mérési adatokat a 7. táblázat tartalmazza.

6. táblázat

Versatol N ^o 2455121	Saját mérés	Eltérés
83,0 mg %	80,9 mg %	- 2,6 %
Versatol N ^o 2456121	Saját mérés	Eltérés
203,0 mg %	204,2 mg %	+ 0,6 %

7. táblázat

Glükóz meghatározás hibaszámítása

n	x	$ x-\bar{x} $	$ x-\bar{x} ^2$
1	83,5	0,6	0,36
2	80,8	2,1	4,41
3	84,6	1,7	2,89
4	81,1	1,8	3,24
5	80,9	2,0	4,00
6	82,0	0,9	0,81
7	83,1	0,2	0,04
8	83,8	0,9	0,81
9	81,6	1,3	1,69
10	84,9	2,0	4,00
11	86,0	3,1	9,61
12	80,6	2,3	6,29
13	84,2	1,3	1,69
14	83,1	0,2	0,04
15	80,9	2,0	4,00
16	83,8	0,9	0,81
17	84,6	1,7	2,89
18	85,1	2,2	4,84
19	82,0	0,9	0,81
20	80,6	2,3	5,29

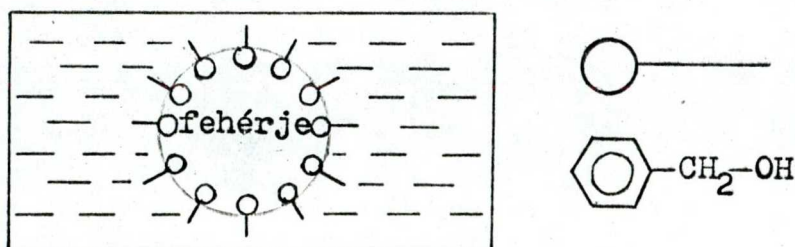
$$\bar{x} = 82,9 \text{ mg \%}$$

$$s = \pm 1,74 \text{ mg \%}$$

$$VK = 2,1 \%$$

A kísérleti eredmények és értékelésük

A fehérje oldott állapotban való stabilizálását savas közegben benzilalkohollal értem el. A mechanizmus kolloid védő hatáson alapszik. A benzilalkohol poláris és apoláris részének megfelelő térállása biztosítja a fehérje makromolekulás kolloid oldatban való tartását.

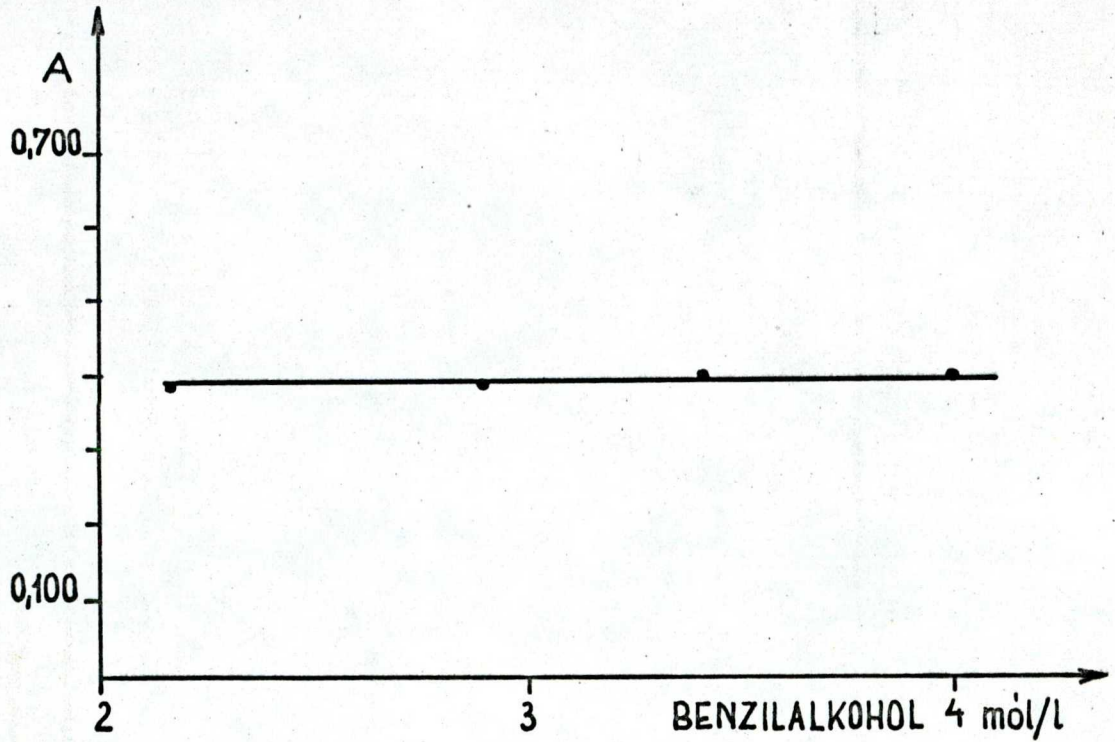


Hasonló hatást mutat más, hosszabb szénláncu alifás alkohol is. Megfigyelésem szerint pl. az oktilalkohol szintén használható. A reakció során a fényelnyelés értékében jelentős különbség nincs, viszont a reagens az oktilalkohol tartalom miatt erősen szagos, kellemetlen és a használt üvegeszközök vízzel nehezen tisztíthatók.

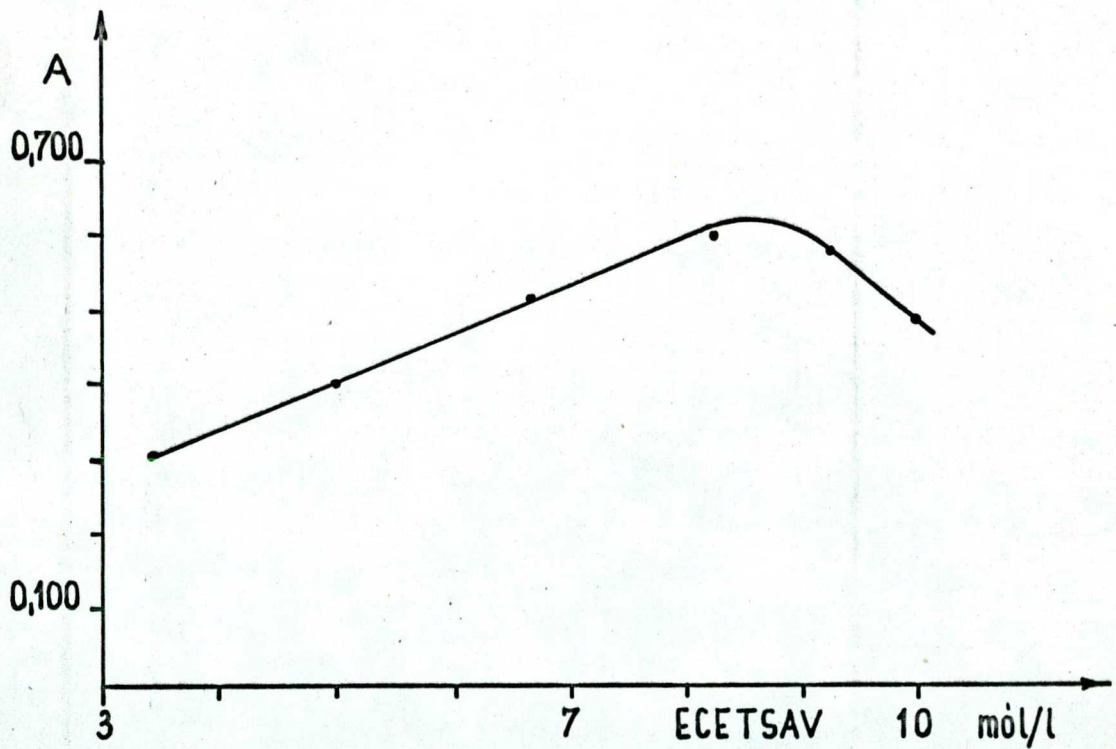
A 12. ábrán látható, hogy a benzilalkohol koncentrációjának változása nincs hatással a képződő termék fényelnyelésére. A kísérletek szerint a benzilalkohol szerepe a fehérje kolloid oldatban való stabilizálása. A 2,0 mól/l benzilalkohol koncentráció alatt a fehérje kiválik, 4,0 mól/l tartalom felett pedig a benzilalkohol oldódása szab határt az alkalmazható koncentrációnak.

A kísérletek szerint csak 14 - 15 g % összfehérje tartalom mellett figyelhető meg a reakcióelegyek kis mértékű opaleszcenciája, ami a fehérje kiválására utal.

Az alkalmazott reagensekkel tehát 0 - 12 g % szérum összfehérje koncentráció tartományban az analizálandó oldat homogén, fotometrálnak.



12. ábra Benzilalkohol hatása az o-toluidin-glükóz reakció termékének fényelnyelésére.



13. ábra Ecetsav hatása az o-toluidin-glükóz reakció termékének fényelnyelésére.

Megállapítható, hogy ezen a koncentráción belül a leirt reagens alkalmazása esetén a benzilalkohol megakadályozza a fehérje kiválását. Így az analízishez nem szükséges előzetes fehérjementesítés. A 12 g %-nál nagyobb szérum összfehérje tartalom kóros körülmények között is csak ritkán fordul elő.

A már leirtak szerint, az o-toluidin és a glükóz közötti reakció savas közegben melegítés hatására játszódik le. A reakció eredményeként fotometriás analízisre alkalmas zöld színű termék keletkezik.

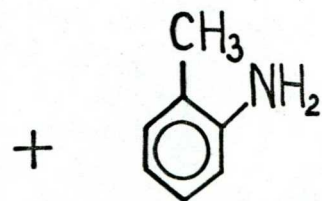
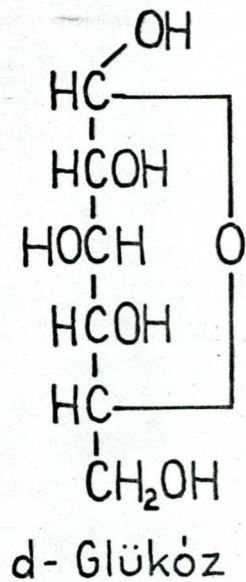
Ez Yee és Godwin vizsgálatai szerint /67/ a glikozilamin és az ennek megfelelő Schiff bázis egyensúlyi termékének tekinthető. A spektrofotometriás és vékonyréteg kromatográfiás vizsgálataik a zöld reakcióterméknek négy abszorpciós kromogén komponensét fedték fel.

A reakció menete a következő oldalon látható /68/.

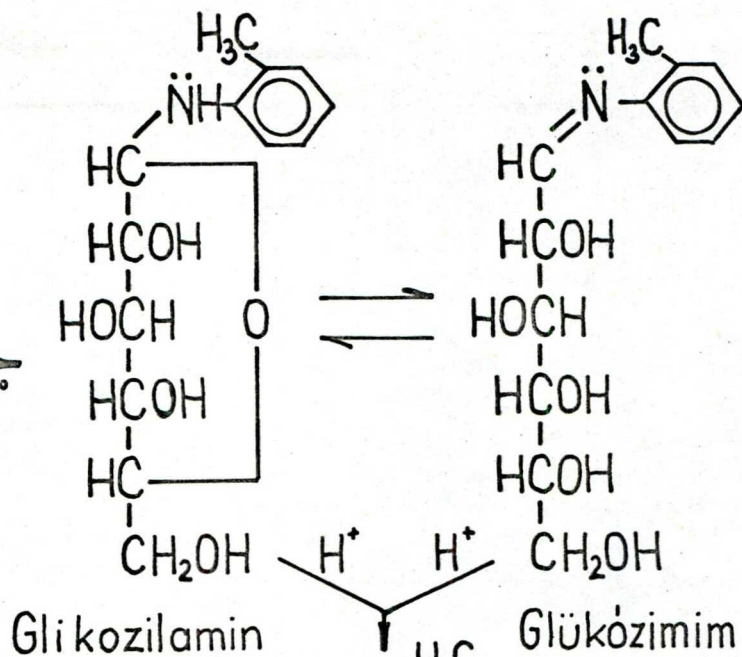
Az elterjedten használt tömény ecetsavas közeg ki-küszöbölésére vizsgáltam az ecetsav mennyiségének hatását a reakcióra. Benzilalkohol alkalmazása esetén a zöld reakciótermék színintenzitása maximum görbe szerint változik a reagensben lévő ecetsav függvényében. Ez a 13. ábrán látható.

A mérési eredmény azzal értelmezhető, hogy vízmentes közegben /jelen esetben 10 mól/l ecetsav és 2,9 mól/l benzilalkohol alkalmazásakor/ a protonálódási viszonyok nem legkedvezőbbek a reakció lejátszódásához. Hígított ecetsav jelenlétében pedig a keletkező termékek víz hatására komponenseikre hidrolizálnak /68/. Emiatt az optimális savkoncentráció után szintén csökken a fényelnyelés értéke.

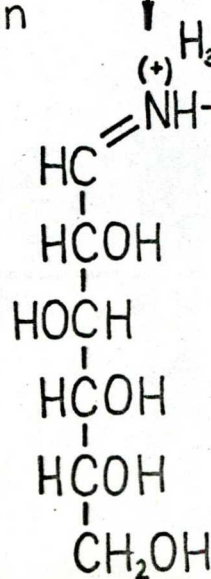
A reakcióhoz a legalkalmasabb ecetsav koncentrációt - az alkalmazott kísérleti feltételek mellett - 8,5 mól/l-nek találtam.



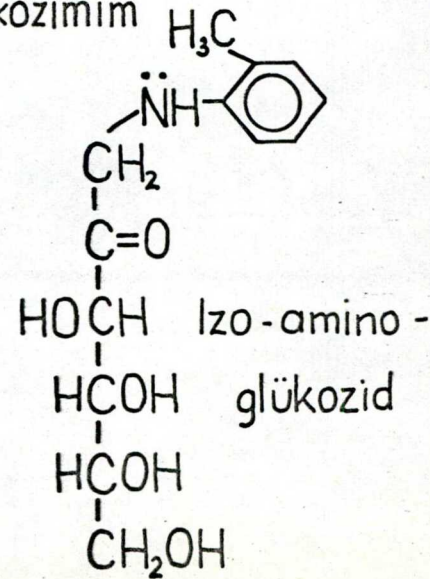
$\xrightarrow[100\text{C}^\circ]{\text{SAV}}$



Protonált Schiff bázis



\longrightarrow

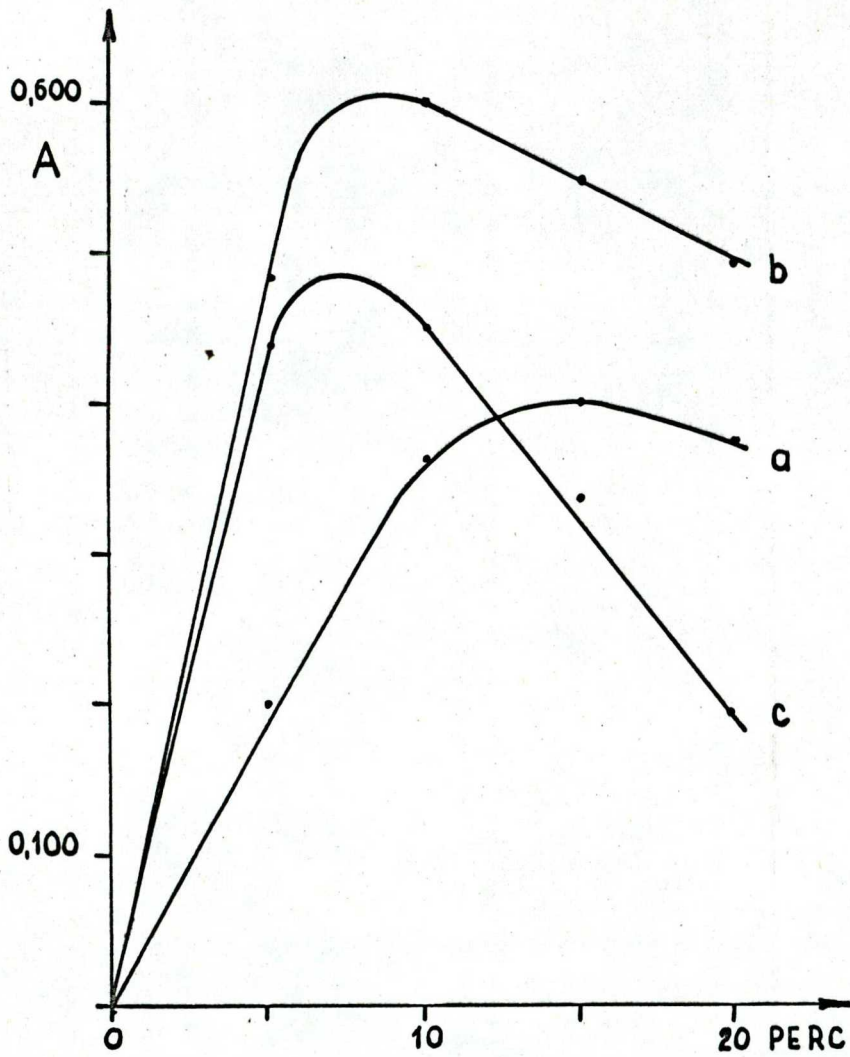


3,3 mól/l ecetsav jelenlétében a fehérje hődenaturálódása is megfigyelhető 100 C° hőmérséklet alkalmazásakor. A használt 2,9 mól/l koncentrációju benzilalkohol már nem fejti ki kolloid védő hatását, nagyobb alkohol mennyiség pedig az oldódási határ miatt nem alkalmazható.

A kísérletek alapján megállapítható, hogy az analízishez nem szükséges tömény ecetsavas o-toluidin reagens, még 3 - 5 mól/l /~30 - 40 tf%/ ecetsav jelenlétében is lejátszódik a reakció.

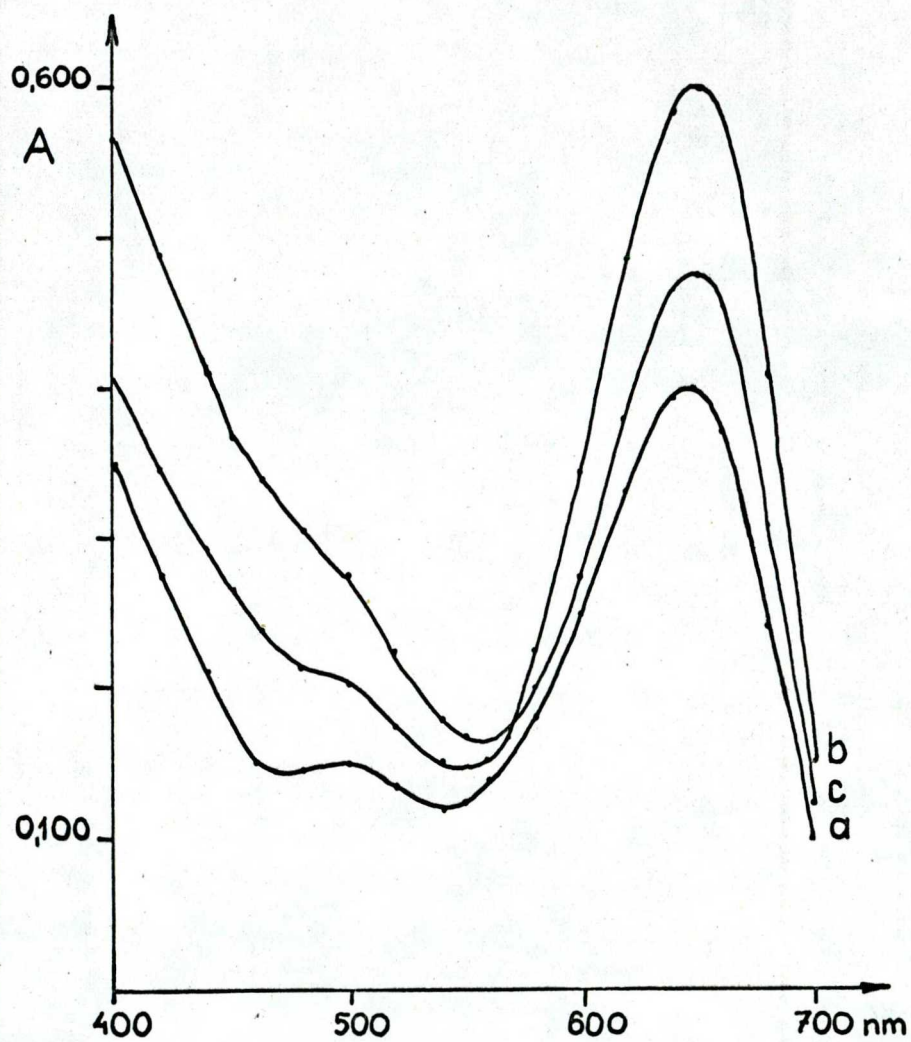
A reagens ecetsav tartalmának függvényében változik az optimális reakcióidő is, 100 C° hőmérsékleten. Ennek alakulását a 14. ábra mutatja. Vizmentes közegben /c.görbe/ a maximális fényelnyelés 6 perces melegítés hatására alakul ki, majd jelentősen csökken az extinkció. Hasonló függvény figyelhető meg a 8,35 mól/l ecetsavat tartalmazó reagens használatakor is. A reakcióidő ez esetben 8 perc. Mintegy 5,0 mól/l ecetsavat tartalmazó oldatban a maximális fényelnyelés némileg hosszabb, 15 perces melegítés hatására alakul ki /a.görbe/, azonban kis mértékű fényelnyelés különbség van a 10 és 20 perces melegítési intervallum között. Így az optimális reakcióidőnek pontos be nem tartásából származó hiba gyakorlatilag kiesik. Ez a technikai hátrány a klasszikus tömény ecetsavat tartalmazó reagens használatakor jelentős hibaforrásként szerepelt, $\pm 1 - 2$ perc eltérés $\pm 3 - 5$ % hibát jelenthetett. A szükséges reakcióidő szélesebb intervallumával elérhető az egyes mérési szériák jobb reprodukálhatósága.

A reakció során képződő egyensúlyi elegynek a fényelnyelési maximuma 645 nm-nél található. A spektrumokat a 15. ábra mutatja. A fényelnyelési maximum független a reagens ecetsav tartalmától.



14.ábra Melegítési idő hatása az o-toluidin-glükóz reakció termékének fényelnyelésére.

Ecetsav tartalom: a./ 5,0 mól/l
b./ 8,35 mól/l
c./ 10,0 mól/l



15.ábra Az o-toluidin-glükóz reakcióban
keletkező termékek spektrumai.
Ecetsav tartalom: a./ 5,0 mól/l
b./ 8,35 mól/l
c./ 10,0 mól/l

A fényelnyelés abszolút értékeinek változása a leírtak értelmében a reagens ecetsav koncentrációjától függ /13.ábra/.

Vizsgálataim szerint a keletkező egyensúlyi elegy fényelnyelése 0 - 1000 mg % glükóz koncentráció tartományban lineáris.

A reakció menetének és a komponensek koncentrációinak vizsgálata alapján a következő eljárás használható a szérum glükóz tartalmának meghatározására/69/.

Glükóz reagens:	Tiokarbamid	5,0 g
	Deszt.viz	300 ml
	Ecetsav /konc./	300 ml
	Benzilalkohol	300 ml
	o-Toluidin /deszt./	100 ml

Analízis kivitele:

Oldatok	Reag.vak	Standard	Minta
Glükóz reagens	2,0 ml	2,0 ml	2,0 ml
Standard	-	20 μ l	-
Szérum	-	-	20 μ l

A bemérések után a reakcióelegyeket 15 percre forrásban lévő vízfürdőbe helyezük. Ezt követően csapvíz alatt lehütjük és 645 nm-nél reagens vakra nullázott műszeren mérjük a standard és a minta fényelnyelését.

Az eredmény számolása:

$$\frac{\text{Minta extinkciója}}{\text{Standard extinkciója}} \times \text{standard mg\% koncentrációja} =$$

= minta mg glükóz tartalma / 100 ml szérum.

Normál érték: 60 - 100 mg glükóz / 100 ml szérum

Meghatározási idő: 1 minta + standard ~ 20 perc
50 minta + standard ~ 50 perc

A megbízhatósági és a reprodukálhatósági vizsgálatok alapján /7. táblázat/ standard deviáció: $\pm 1,74$ mg %, variációs koefficiens: 2,1 %, az eljárás a klinikai laboratóriumi igényeket messzemenően kielégíti. Liquor glükóz tartalmának elemzésénél az eljárás teljesen azonos, vizeletcukor vizsgálatánál - a koncentráció viszonyok miatt - a minta megfelelő /általában 1 : 10/ higitása célszerű.

2.4. SZÉRUM ANORGANIKUS FOSZFOR MEGHATÁROZÁS MIKRO ELJÁRÁSSAL

A táplálékkal bevitt organikus foszfát vegyületek a szervezetben anorganikus foszfáttá bomlanak le és mint ilyenek szivódnak fel. A plazma, ill. szérumban anorganikus foszfát tartalma teljes mértékben ultrafiltrálható, azaz az elsődleges vizeletszűrletben az anorganikus foszfát koncentrációja a plazmáéval azonos. A foszfor a plazmában, ill. a szérumban különböző vegyületek formájában fordul elő. Az egyes frakciók koncentrációját foszfor mg %-ban szokásos megadni. A szérumban egészséges körülmények között általában 10 mg % összes foszfort tartalmaz. Ebből 3 - 4,5 mg % anorganikus foszfor. A plazma pH értéke mellett a teljes mennyiség 4/5 része szekunder, 1/5 része primer foszfát formában van jelen. A maradék komponens organikus foszforészter és foszforlipoid alakban található. A klinikai gyakorlatban legnagyobb jelentősége az anorganikus foszfáttartalom meghatározásnak van. Koncentrációjából ugyanis a csontelváltozásokra, a testnedvek sav-bázis egyensúlyára, az intermedier szénhidrát anyagcserére, veseelégtelenségre, stb. kaphatunk értékes felvilágosítást.

2.4.1. Klinikai anorganikus foszfor meghatározások értékelése

Az anorganikus foszfor meghatározására számos eljárás ismeretes. A molibdátok foszfátokkal /arzenátokkal, szilikátokkal/ alkalmas körülmények között hetero-

polisav típusu vegyületet alkotnak. Ilyen pl. a foszformolibdénsav, vagy az ammóniummolibdófoszfát.

Ezek a komplexek megfelelő feltételek mellett molibdénkékké redukálhatók és ez olyan vegyületek fotometriás meghatározására használható, amelyek molekulájukban foszfort tartalmaznak, ill. foszfátokká alakíthatók. Ezen az elven nyugszik a legtöbb foszfor elemzés a klinikai kémiai gyakorlatban is.

A foszformolibdénsav redukcióján alapuló módszereknek - elterjedtségük ellenére - néhány közismert hibája van. A kvantitatív analízisekben a legtöbb problémát a foszformolibdénsav képződés, ill. a fotometriás analízisre alkalmas molibdénkékké való redukálás jelenti. Nem könnyű ugyanis biztosítani, hogy a foszformolibdénsavból kvantitatíven molibdénkékké legyen, egyéb nem specifikus mellékreakció ne történjék, tehát a fényelnyelés a foszfor koncentrációval lineáris legyen. A kialakuló szín legtöbbször labilis, a fényelnyelés időben gyorsan változik. Ezért csak meghatározott idő utáni leolvasások hasonlíthatók össze. Nagyobb vizsgálati szériák esetén ez jelentős nehézséget okozhat.

A jelzett hibák kiküszöbölésére több módosítás született. A meghatározási módszerek főleg a redukáló anyagok használatában térnek el egymástól. Elterjedten használják a Fiske és Subbarov leírását /70/.

Az eljárás szerint 1,0 ml szérumot triklórecetsavval fehérjementesítünk, majd a szürlethez 5 mól/l kénsavas közegben ammóniummolibdenátot adunk. A keletkező foszformolibdénsavat frissen készített 1.2.4.-amino-naftolszulfonsav /Eikonogén/ - nátriumsulfid eleggyel molibdénkékké redukáljuk. A termék fényelnyelését 5 - 10 percen belül fotometrálunk kell, ez idő után az extinkció gyorsan csökken és a meghatározás pontatlan.

A redukálási folyamat bizonytalanságát jól tükrözi az a tény, hogy milyen sokféle redukálószer van ma is használatban. Eikonogén /70/, hidrokinon /71/, aszkorbinsav /72/, ónklorid /73/, metol /74/ és ezek legkülönbözőbb kombinációi. Mindegyik közös hátránya, hogy csak egészen frissen és pontosan készítve adnak reprodukálható eredményt.

Ezekben az eljárásokban mindezekhez járul még a viszonylag nagy szérum igény /0,5 - 1,0 ml/. Így koraszülötteknél, csecsemőknél a vizsgálathoz szükséges 2 - 3 ml vér vétele komoly nehézségbe ütközik.

A meghatározásokhoz jelentős többlet munkát igénylő fehérjementesítés szükséges. A nolibdénkék színe időben változik és csak szűk tartományban követi a Beer-Lambert törvényt. A hátrányok kiküszöbölésére történtek már különböző lépések. Így többek nyomán Richterich irt le egy mikro módszert /75/. A szín stabilizálására nátriumtetraborátot, a nonspecifikus reakció megakadályozására nátriumpiroszulfidot és a kicsapódott fehérje oldatba vitelére nátriumkarbonát-nátriumszulfid elegyet ajánl. A meghatározás vizsgálataim szerint is pontos, legfőbb előnye, hogy mikro módszer és a szín 5-30 perc között stabilis. Az analízis azonban négy reagenst igényel, melyek átlag csak egy hónapig eltarthatók és a kivétel öt térfogat mérésből áll, ezért körülményesen automatizálható.

2.4.2. FEHÉRJELENTESÍTÉS NÉLKÜLI ANORGANIKUS FOSZFOR MEGHATÁROZÁS

A laboratóriumi gyakorlat számára egy olyan eljárás kidolgozása vált szükségessé, amely az eddig elért előnyök megtartása mellett, kiküszöböli a redukálószer hátrányait. Ugyanakkor mind a reagensek, mind a kivitel szempontjából maximális egyszerűséget biztosít az automatizált munkamenet, ill. elemzés lehetőségének beállításához.

Kísérleti rész

Az elemzés kidolgozásához első lépésként a foszformolibdénsav kialakulásához szükséges sav koncentrációt vizsgáltam. A méréseknél a következő oldat összetételt alkalmaztam:

Nátriummolibdenát	$4,1 \times 10^{-2}$ mól/l
Vas/II/ammóniumsulfát	$2,5 \times 10^{-2}$ mól/l
Kénsav	$1-20 \times 10^{-1}$ mól/l

4,0 ml reagensbe mértem 100 μ l, 5,0 mg % koncentrációju foszfor standardot /0,2200 g szárított KH_2PO_4 - 1000 ml H_2O /. A kialakuló kék szín fényelnyelését, a keletkező termék fényelnyelési maximumán, 660 nm-nél mértem/16.ábra/. A méréseket "Spekol ZV" spektrofotométerrel végeztem, 1 cm rétegvastagságu átfolyós küvettát alkalmazva.

A foszformolibdénsav redukciójához szükséges vas/II/ ion célszerű koncentrációját a következő reagens összetétel mellett vizsgáltam:

Nátriummolibdenát	$4,1 \times 10^{-2}$ mól/l
-------------------	----------------------------

Vas/II/ammóniumsulfát $1-10 \times 10^{-2}$ mól/l
Kénsav $5,0 \times 10^{-1}$ mól/l

4,0 ml reagensbe 100 µl, 5,0 mg % foszfor tartalmu standardot mértem, majd időben vizsgáltam a fényelnyelés alakulását és értékét, a vas/II/ion koncentrációjának függvényében. /17. ábra/ Foszfor standard helyett szérumot használva a kísérletekhez, a savas közeg és a molibdenát hatására a fehérje denaturálódott. A fehérje csapadék feloldására trietanolamint használtam.

A reagensek összetétele:

I. Nátriummolibdenát $4,1 \times 10^{-2}$ mól/l
Vas/II/ammóniumsulfát $2,5 \times 10^{-2}$ mól/l
Kénsav $5,0 \times 10^{-1}$ mól/l
II. Trietanolamin $1,0 - 4,0$ mól/l

A kísérletek alkalmával 2,0 ml I. reagensbe mértem 100 µl szérumot /anorganikus foszfor koncentráció: 4,6 mg %/, 10 perc várakozás után pedig 2,0 ml trietanolamint adagoltam a reakció elegyekhez. A fehérje csapadék feloldását vizuálisan figyeltem, valamint ellenőriztem a kialakult kék szín időbeli stabilitását, a fényelnyelés mérésének alapján.

A bilirubin fényelnyelés esetleges zavarásának meghatározása céljából, 0 - 10 mg % bilirubint is tartalmazó foszfor standard oldatokkal végeztem a meghatározást, az előbb leírtak szerint.

A módszer megbízhatóságának és reprodukálhatóságának meghatározása céljából a következő méréseket végeztem.

A reagensek összetétele:

I. Nátriummolibdenát $4,1 \times 10^{-2}$ mól/l
Vas/II/ammóniumsulfát $2,5 \times 10^{-2}$ mól/l
Kénsav $5,0 \times 10^{-1}$ mól/l
II. Trietanolamin $2,0$ mól/l

A kísérleteknél 2,0 ml I.reagensbe mértem 100 μ l foszfor standardot, ill. szérumot. 10 perc várakozás után, 2,0 ml trietanolamint adagoltam az analizálandó elemekhez. A fényelnyeléseket 660 nm-nél mértem és ebből számoltam a minták anorganikus foszfor tartalmát. A Beer-Lambert törvény érvényességét vizsgáltam 0 - 20 mg % foszfor koncentráció tartományban, standard oldatok felhasználásával.

Az összehasonlítás céljából megvizsgáltam ismert anorganikus foszfor tartalmu liofilizált kontrol szérumokat is /Versatol-General Diagnostics/. A 10 - 10 párhuzamos minta mérési átlagértékét a 8. táblázat mutatja.

A standard deviáció és a variációs koefficiens meghatározása céljából 20 párhuzamos elemzést végeztem önkényesen kiválasztott szérumból. A mérési adatokat a 9. táblázat tartalmazza.

8. táblázat

Versatol N ^o 0186022	Saját mérés	Eltérés
4,1 mg %	4,0 mg %	- 2,5 %
Versatol N ^o 0186122	Saját mérés	Eltérés
6,4 mg %	6,2 mg %	- 3,2 %

9. táblázat

Anorganikus foszfor meghatározás hibaszámítása

n	x	$ x-\bar{x} $	$ x-\bar{x} ^2$
1	4,40	0,04	0,0016
2	4,37	0,01	0,0001
3	4,38	0,02	0,0004
4	4,43	0,07	0,0049
5	4,42	0,06	0,0036
6	4,36	0,00	0,0000
7	4,21	0,15	0,0225
8	4,28	0,08	0,0064
9	4,43	0,07	0,0049
10	4,39	0,03	0,0009
11	4,43	0,07	0,0049
12	4,28	0,08	0,0064
13	4,30	0,06	0,0036
14	4,41	0,05	0,0025
15	4,35	0,01	0,0001
16	4,43	0,07	0,0049
17	4,26	0,10	0,0100
18	4,30	0,06	0,0036
19	4,34	0,02	0,0004
20	4,32	0,04	0,0016

$\bar{x} = 4,36 \text{ mg \%}$

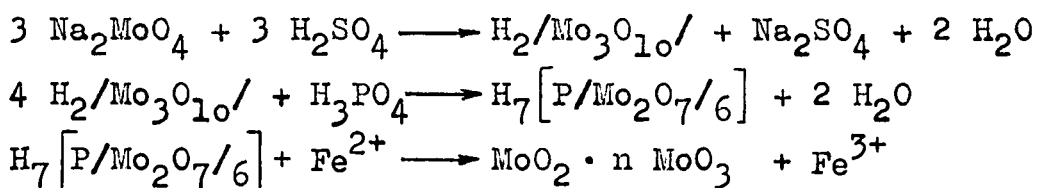
$s = \pm 0,06 \text{ mg\%}$

$VK = 1,7 \%$

A kísérleti eredmények és értékelésük

Közismert, hogy a savas molibdenát oldatok redukciója következtében kék színű molibdénoxidok képződnek, amelyeket molibdénkék néven ismerünk. Amint az számos közleményből kiderül /pl.76/, több féle molibdénkék kötés létezik, amelyek MoO_2 -ből és különböző mennyiségű MoO_3 -ből tevődnek össze. A MoO_2 és a MoO_3 ugyanis szintelen a kettő komplexe viszont kék. Sematikusan tehát a molibdénkéket a következőképpen jelölhetjük: $\text{MoO}_2 \cdot n \text{MoO}_3$. Még a molibdenátoknál is könnyebben lehet a foszformolibdénsav komplexet molibdénkékké redukálni, amely jelenség több kutató szerint az ebben a komplexben lévő MoO_3 gyök fokozott labilitására vezethető vissza /77,78/.

A foszfor elemzésnél savas közegben a következő lépésekkel számolhatunk:



Az anorganikus foszfor meghatározásnál keletkező molibdénkék fényelnyelése telítési görbe szerint változik a kénsav koncentrációjának függvényében. Ez a 16. ábrán látható. A kísérletek alapján megállapítható, hogy a foszformolibdénsav, ill. a molibdénkék kialakulásához - az alkalmazott koncentráció tartományban - 0,5 mól/l kénsav is elégséges. Így nem szükséges az 5 mól/l töménységű kénsav használata, mint ami az előírásokban általában szerepel. Ilyen savkoncentráció használatakor szobahőmérsékleten is megtörténhet a foszforészterek és foszforlipoidok kismértékű hidrolízise.

Ez egyes esetekben látszólagosan nagyobb anorganikus foszfor tartalmat eredményezhet.

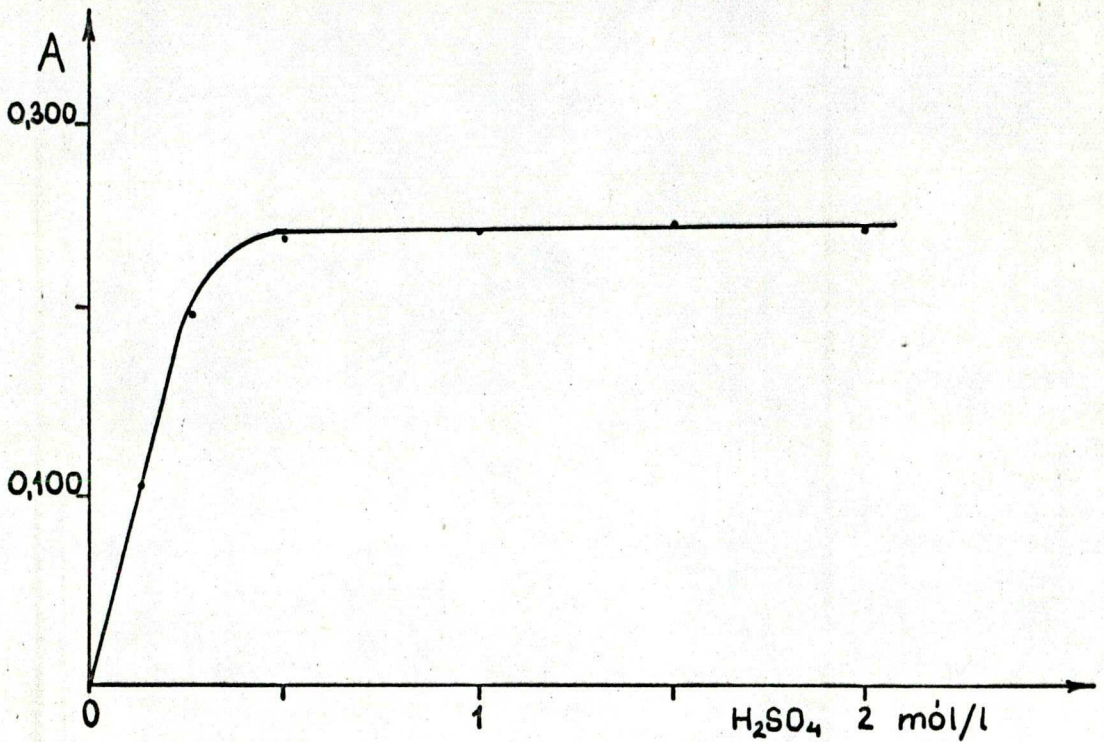
Megfigyeléseink szerint a vas/II/ion aránylag kis koncentrációban és 0,5 mól/l kénsavas közegben tökéletesen redukálja a foszformolibdénsavat molibdénkékké/79/. A 17. ábrán látható, hogy $1,0 \times 10^{-2}$ mól/l vas/II/ammóniumsulfát jelenlétében mintegy 15 perc, $5,0 \times 10^{-2}$ mól/l koncentráció alkalmazásakor 10 perc szükséges a maximális fényelnyelés kialakulásához. $1,0 \times 10^{-1}$ mól/l vas/II/ töménység használatakor a reakcióidő 5 percre csökken.

A nátriummolibdenát a kénsav és a redukáló vas/II/-ammóniumsulfát egy oldatban hónapokon át eltartható. Ezzel elérhető volt, hogy a foszfor elemzésnél nem szükséges naponta frissen készült redukáló szert használni.

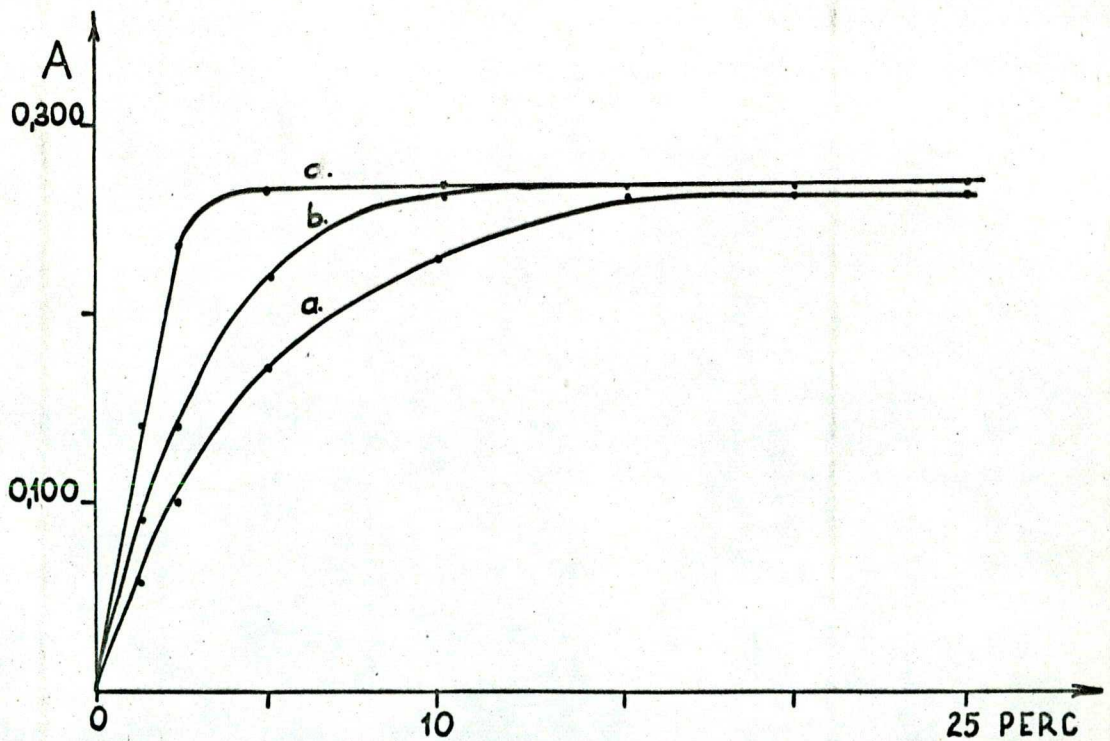
Az alkalmazott vas/II/ion redukáló képessége az alkalmazott kísérleti feltételek között biztosítja a foszformolibdénsav redukcióját moliddénkékké, de nem elégséges a molibdénsav redukációjához. Ez által a fényelnyelés a foszformolibdénsav koncentrációjával, ezen keresztül a foszfor tartalommal lineáris.

A kidolgozott reagens használatakor nem specifikus reakció előfordulásával nem kell számolnunk.

A meghatározáshoz használt trietanolamin egyik szerepe a szín stabilizálása és a savas közeg, valamint a molibdenát hatására denaturálódott fehérje feloldása. A trietanolamin másik feladata a reagensben jelenlévő vasionok komplex formában való kötése. Így a trietanolamin megakadályozza a vashidroxidoknak a fehérje csapadék feloldásához szükséges lúgos közeg hatására történő kiválását.



16.ábra Kénsav hatása a foszformolibdénsav-molibdénkék reakció termékének fényelnyelésére.



17.ábra A molibdénkék fényelnyelésének időbeli kialakulása. Vas/II/ammóniumsulfát tartalom: a./ 1×10^{-2} mól/l, b./ 5×10^{-2} mól/l, c./ 1×10^{-1} mól/l.

A kísérletek alapján az optimális trietanolamin koncentrációt 2 mól/l-nek találtam.

A fotometriás analízisre alkalmas reakciótermék szin-
stabilitása 1,5 óra. Ezt követően 0,020 extinció csök-
kenés / óra figyelhető meg.

A fényelnyelés 0 - 20 mg % anorganikus foszfor inter-
vallumban lineáris.

A vizsgálatok alapján a következő eljárás használ-
ható a szérum anorganikus foszfor tartalmának meghatá-
rozására.

Foszfor reagens: Nátriummolibdenát 10,0 g oldva 500 ml
1,0 mól/l kénsavban. Teljes oldódás
után vas/II/ammóniumsulfát 10,0 g old-
va, majd desztillált vízzel 1000 ml-re
egészítjük ki az oldatot.

Trietanolamin: Trietanolamin /1,126 - 1,128 fajsúlyu/
298 gramm 1000 ml vizes oldatban.

Analízis kivitele:

Oldatok	Reag.vak	Standard	Minta
Foszfor reagens	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml
Standard	-	50 μ l	-
Szérum	-	-	50 μ l
Tíz perc várakozás			
Trietanolamin	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml

Másfél órán belül 660 nm-nél reagens vakra nullázott
műszeren mérjük a standard és a minta fényelnyelését.
Vizsgálataink szerint 3,0 mg %-nál magasabb bilirubin
tartalmu szérum minták esetében szérum vakot is kell
beállítani, oly módon, hogy a foszfor reagens helyett
1,0 ml 0,5 mól/l kénsavat mérünk be.

Ez esetben a standard fényelnyelését a reagens vakra nullázva, az analizálandó mintáét a szérum vakra nullázva olvassuk le.

Az eredmény számolása:

$$\frac{\text{Minta extinkciója}}{\text{Standard extinkciója}} \times \text{standard mg \% koncentrációja} =$$

= minta mg anorganikus foszfor tartalma/100 ml szérum.

Normál érték: 2,0 - 5,0 mg anorganikus foszfor/100 ml szérum.

Meghatározási idő: 1 minta + standard \sim 15 perc
50 minta + standard \sim 50 perc

Az eljárás standard deviációja: \pm 0,06 mg %, variációs koefficiense: 1,7 % /9.táblázat/.

A közölt eljárással sikerült megszüntetni a redukáló anyagok labilitásából eredő hátrányokat. Az analízis nem kíván előzetes fehérjementesítést, minta igénye ezáltal 50 μ l. Az elemzéshez két reagens és három mérés szükséges. A fotometriás mérésre alkalmas szín stabilitása sorozat vizsgálatra és az automatizálásra is lehetőséget ad.

2.5. SZÉRUM VAS MEGHATÁROZÁS MIKRO ELJÁRÁSSAL

A vas a szérumban csaknem teljes mennyiségében a transferrinnek nevezett plazmafehérjéhez kötött állapotban fordul elő. A transferrin mintegy 0,1 % vasat tartalmazó metalloproteid. A vérben a transferrin komplex minimális mértékben vasionra és fehérjére diszociál.

A vasforgalom megítélése céljából fontos feladat a szérum vas értékének meghatározása.

2.5.1. Klinikai vas meghatározások értékelése

A klinikai kémiában a következő vas meghatározási módszerek terjedtek el.

Fehérjementesítéses eljárások.

A transferrin metalloproteidből savas hidrolízis útján felszabadítható a vas/III/ion. Erre a célra általánosan sósavat alkalmaznak. Triklórecetsavas fehérjementesítés után a vasion a szűrletben meghatározható.

Az analízisek azon az elven alapulnak, hogy redukció után /aszkorbinsav, nátriumpiroszulfid, hidroxilamin, stb./ a vas/II/ion, különböző vas reagensekkel /dipiridil és ezek származékai/ színes komplexet képez.

A keletkező komplexek színintenzitása arányos a szérum vas tartalmával. Színreagensként a klinikai laboratóriumokban általában a következő vegyületek használatosak: 2.2'-dipiridil /80,81/, 1.10-fenantrolin /82/, batofenantrolin /4.7-difenil-1.10-fenantrolin/ /83,84/, tripiridil-triazin -TPTZ- /2.4.6.-tri-2-piridil-1.3.5.-triazin/ /85,86/.

Ezen színreagensok vas komplexeinek jellemzőit a 10. táblázatban foglaltam össze /87/.

10. táblázat

Komplex	λ_{\max}	Mol.ext.koeff.
Fe-/2.2'-dipiridil/ ₃	522 nm	8.650
Fe-/1.10-Fenantrolin/ ₃	510 nm	11.100
Fe-/batofenantrolin/ ₃	543 nm	22.100
Fe-/tripiridil-triazin/ ₂	593 nm	24.100

A fehérjementesítési eljárások közös hibája, hogy a szükséges szérum igény 1-2 ml, esetenként több is. Csecsemőknél a korai vashiányos vérszegénység és a vasforgalom vizsgálatához ez esetben 3 - 4 ml vér lenne szükséges és ilyen térfogatú vérvétel már jelentős problémát okozhat. Ezenkívül a fehérjementesítéssel vasvesztés állhat elő. A meghatározások kivitele 4- 5 lépésű, időigényes centrifugálás szükséges.

Az említett tényezők miatt a fehérjementesítési vas meghatározások pontatlansága figyelemre méltó, 10 - 15 % is lehet.

Fehérjementesítés nélküli vas meghatározások.

Az említett hibák kiküszöbölésére több szerző írt le fehérjementesítés nélküli vas meghatározást. Az eljárások azon az elven alapulnak, hogy alkalmas detergensok leválasztják a vasat a fehérjéről, majd megfelelő színreagenssel fotometriás mérésre alkalmas komplexbe vihetők /88/. Ilyen detergensként Tween 20-at /89,90/ és Teepol 710-et javasolnak. Színreagensként batofenantrolin, vagy tripiridil-triazin használatos.

Az eljárások aránylag egyszerűek, azonban az elemzéshez szükséges szérum igény még jelentős, általában 0,5 ml.

2.5.2. FEHÉRJEMENTESÍTÉS NÉLKÜLI SZÉRUM VAS MEGHATÁROZÁS FERROZINNAL

A csecsemő-és a gyermekgyógyászati igények kielégítésére szükségessé vált a vas meghatározásokhoz általában szükséges nagyobb szérum mennyiségek csökkentése.

Az automatizálhatóság és a megfelelő reprodukálhatóság elérésére fehérjementesítés nélküli eljárás kidolgozása volt a cél.

A /3-/2-piridil/-5.6-bis/-4-fenil-szulfosav-1.2.4.-triazin/ vasreagens /ferrozin/ használatával, lehetőség nyílt egy mikro vas elemzés kidolgozására /91/.

Kísérleti rész

A vas-ferrozin komplex fényelnyelésének pH intervallumát a következő kísérlettel határoztam meg: 10,0 ml 2×10^{-3} mól/l ferrozint /Serva készítmény/ tartalmazó oldatba 10,0 ml 2×10^{-5} mól/l vas/II/ammónium-szulfátot mértem, amely $5,0 \times 10^{-2}$ mól/l kénsavban volt oldva. A pH-t 2,0 mól/l NaOH adagolásával változtattam. Az 50 - 500 μ l lug bemérése miatti térfogat változás elhanyagolhatónak tekinthető. Ugyanazon oldatnak mértem a pH értékét és a fényelnyelését a NaOH adagolása közben /18.ábra/. A pH mérést "Radelkisz OP-203" típusu pH mérővel végeztem, kombinált üvegelektrod felhasználásával. A komplex oldat fényelnyelésének mérését "LKB Calculating Absorptiometer" automatikus fotométerrel mértem 572 nm-nél. A vas-ion leválasztását a transzferrin komplexből savas

kémhatásu hidroxilamin-hidrokloriddal biztosítottam. A hidroxilamin egyben redukálja is a vas/III/iont a vas/II/-ferrozin komplex képződéséhez. A kísérletek alkalmával 0,5 - 1,0 - 2,0 mól/l hidroxilamin-hidrokloridot tartalmazó reagens 0,4 ml térfogatába mérttem 100 µl, 118 µg % vasat tartalmazó standard szérumot. Ezt követően 0,3 ml 1,5 mól/l nátriumacetátban oldott 2×10^{-3} mól/l ferrozin színreagenst mérttem a vas tartalmu analizálandó oldathoz. A fényelnyelés mértékét időben vizsgáltam /19.ábra/.

A leírt kísérleti viszonyok mellett, 1,0 mól/l hidroxilamin-hidroklorid reagens alkalmazásával, vizes vas tartalmu standard felhasználásával, a Beer-Lambert törvény érvényességét vizsgáltam 0 - 500 µg % vas koncentráció tartományban.

Ismert vas koncentrációju, liofilizált kontrol szérum /Versatol-General Diagnostics/ felhasználásával összehasonlító méréseket végeztem 10 - 10 mérés alapján. Az analizisek átlag értékeit a 11. táblázat mutatja.

A módszer pontosságának és reprodukálhatóságának megállapítása céljából 20 párhuzamos meghatározást végeztem önkényesen kiválasztott szérumból. A méréseket a 12. táblázat tartalmazza.

11. táblázat

Versatol N ^o 2455121	Saját mérés	Eltérés
118 µg %	123 µg %	+ 4,1 %
Versatol N ^o 2456121	Saját mérés	Eltérés
77 µg %	80 µg %	+ 4,0 %

12. táblázat

Szérum vas meghatározás hibaszámítása

n	x	$ x-\bar{x} $	$ x-\bar{x} ^2$
1	109	1	1
2	108	0	0
3	109	1	1
4	107	1	1
5	106	2	4
6	106	2	4
7	109	3	9
8	105	3	9
9	108	0	0
10	115	7	49
11	113	5	25
12	108	0	0
13	109	1	1
14	110	2	4
15	106	2	4
16	107	1	1
17	109	1	1
18	114	6	36
19	106	2	4
20	103	5	25

$\bar{x} = 108 \mu\text{g} \%$

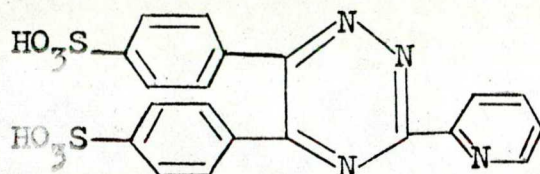
$s = \pm 3,1 \mu\text{g} \%$

VK = 2,9 %

A kísérleti eredmények és értékelésük

A ferrozin színreagenst vaskötőkapacitás meghatározására Persijn és mts.-i alkalmazták /92/.

A vas/II/ionnal 2:1 mólarányu komplexet képez, moláris extinkciós koefficiense: 31.200.



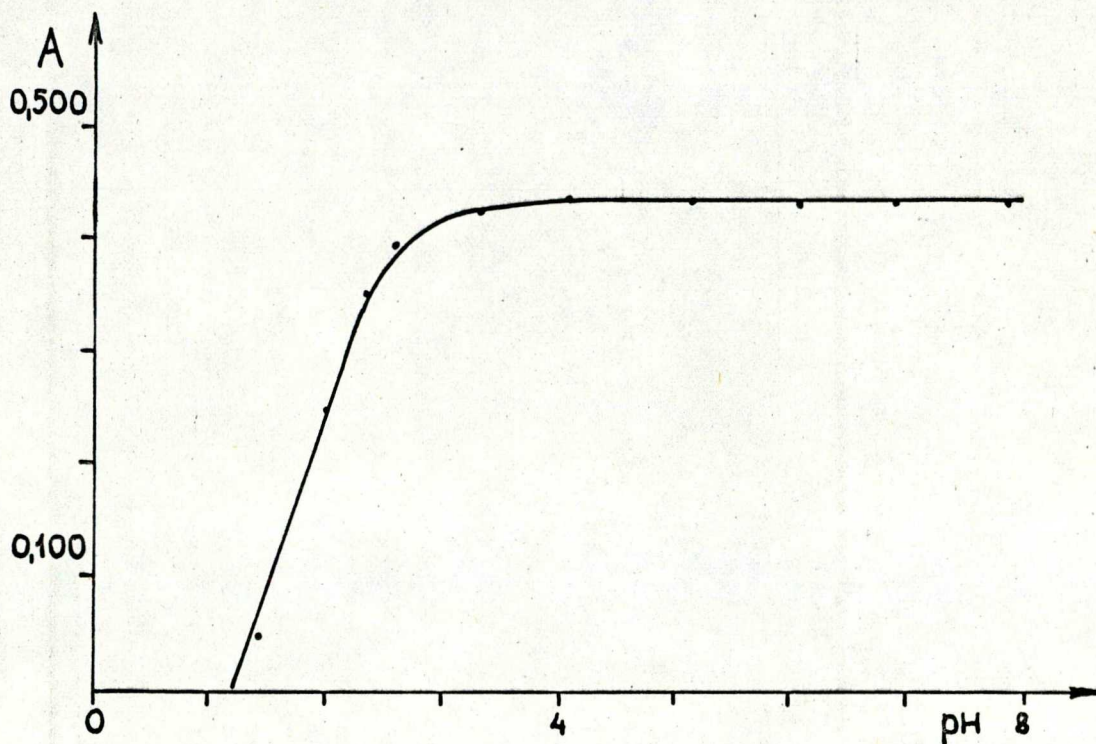
Ferrozin: /3-/2-piridil/-5.6-bis/-4-fenil-szulfonsav-1.2.4.-triazin/ $C_{20}H_{14}N_4O_6S_2$ Ms: 470,49

A moláris extinkciós koefficiens értéke nagyobb, mint a klinikai kémiában alkalmazott vas/II/-tripiridil-triazin, ill. a vas/II/-batofenantrolin komplexé /10.táblázat/. Ez adott lehetőséget arra, hogy a még pontosan mérhető fényelnyelések elérése mellett, az analizisek szérum igényét csökkenteni lehessen.

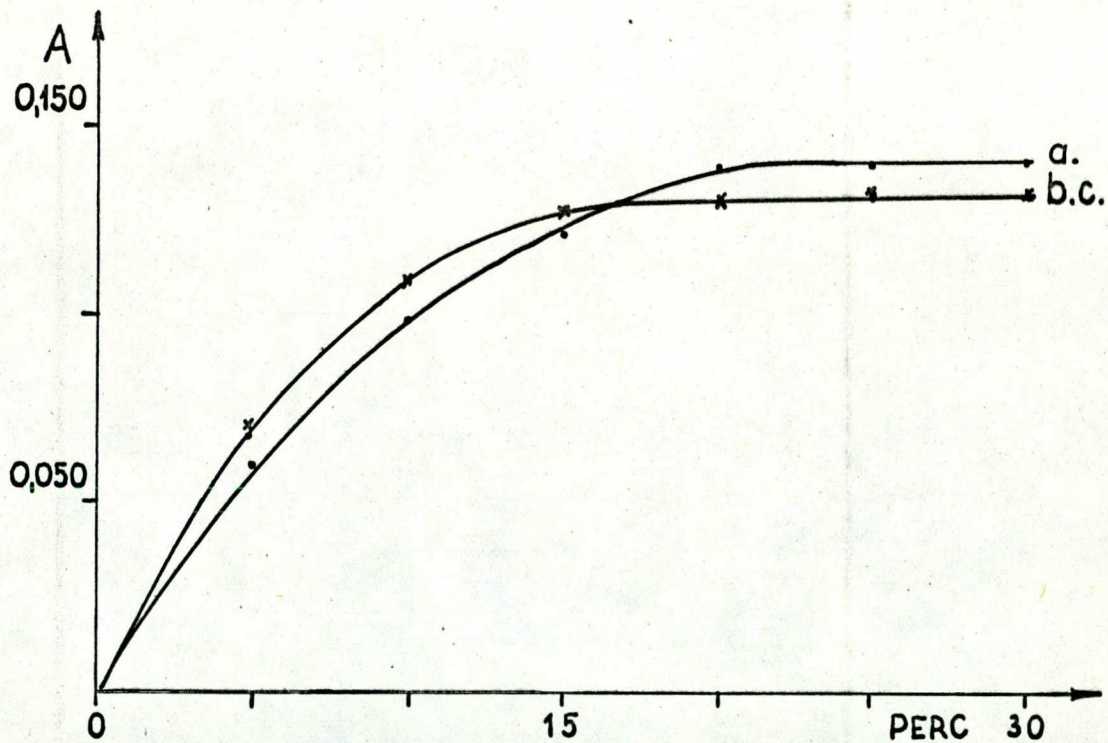
A 18.ábrán látható a [vas/II/-ferrozin/2] komplex fényelnyelésének változása a pH függvényében.

A pH 3 alatti fényelnyelés csökkenés, a komplex sav hatására történő bomlásával magyarázható. A pH 4 - 8 intervallumban a fényelnyelés értéke állandó.

Megfigyelésem szerint, önmagában a hidroxilamin-hidroklorid megfelelő koncentrációban elégséges aciditást biztosít arra, hogy a traszferrin komplexből a vas ionos formában felszabaduljon, de a fehérje még ne denaturálódjon. A traszferrin metalloproteid hidrolizálásához mintegy 20 perc szükséges. A fehérje / ferrozin ligandum cseréje, tehát fokozatosan megy végbe. Ezt a 19.ábra mutatja.



18. ábra A vas/II/-/ferrozín/2 komplex fényelnyelésének változása a pH függvényében.



19. ábra A vas/II/-/ferrozín/2 komplex időbeli kialakulása. Hidroxifamin • HCl tartalom: a./0,5 mól/l, b./1,0 mól/l, c./2,0 mól/l.

Az analízishez a hidroxilamin-hidroklorid célszerű koncentrációját 1,0 mól/l-nek találtam. A pH: 2,6 értékű reagens esetén a vasion leválása a fehérjéről 20 - 30 perc elteltével kvantitatív. Az alkalmazott reagenssel sikerült elérni, hogy a meghatározás ne igényeljen előzetes fehérjementesítést.

A fotometriás analízisre alkalmas vas/II/-ferrozín komplex fényelnyelése 24 órás megfigyelés alatt nem változott. A fényelnyelés 0 - 500 µg % vas tartalom mellett lineáris.

A kísérletek alapján a következő eljárás használható a szérum vas tartalmának meghatározására.

Hidrolizáló reagens: Hidroxilamin-hidroklorid 69,5 g
1000 ml vizes oldatban.

Szinreagens: Ferrozín 1,0 g 1000 ml 20 %-os
nátriumacetát oldatban.

Az analízis kivitele:

Oldatok	Reag.vak	Standard	Minta vak	Minta
Hidr.reag.	0,7 ml	0,4 ml	0,7 ml	0,4 ml
Standard	100 µl	100 µl	-	-
Szérum	-	-	100 µl	100 µl
Szin reag.	-	0,3 ml	-	0,3 ml

20 - 30 perc várakozás után mérjük a reagens vakkal szemben a standard extinkcióját, a minta vakkal szemben pedig a minta fényelnyelését 570 nm-nél.

Az eredmény számolása:

$$\frac{\text{Minta extinkciója}}{\text{Standard extinkciója}} \times \text{standard } \mu\text{g } \% \text{ koncentrációja} =$$

= minta μg vas tartalma / 100 ml szérum.

Normál érték: Nő 70-140 μg / 100 ml szérum
 Férfi 80-150 μg / 100 ml szérum

Meghatározási idő: 1 minta analízisének \sim 30 perc
 50 minta analízisének \sim 60 perc

Az eljárás standard deviációja: \pm 3,1 $\mu\text{g } \%$, variációs
koefficiense: 2,9 % /12.táblázat/.

A közölt meghatározási módszerrel sikerült a cse-
csemők szérum vas vizsgálatát is megoldani. Az eljárás
alkalmas az automatizálásra is, az elemzéshez két
reagens és három bemérés szükséges. Magas bilirubin
tartalmu szérumok nem zavarják a meghatározást a min-
ta vak használata következtében.

ÖSSZEFOGLALÁS

A biokémiai ismeretek jelentős kiszélesedése mélyreható változást hozott a klinikai kémiai laboratóriumok tevékenységében is.

Az egyre fokozódó analitikai feladatok olyan igényeket támasztottak a klinikai laboratóriumokkal szemben, amelyeket azok kialakult hagyományos szervezeti formájukkal, használt módszereikkel, eljárásaikkal nem oldhattak meg.

Vázoltam azokat a kérdéseket, amelyekkel a megoldandó feladatok keretében számolni kell:

- a mennyiségi növekedéssel,
 - a minőségi követelményekkel,
- és ezek megoldása érdekében foglalkoztam:
- az analízis idő rövidíthetőségével, illetve
 - a korszerű analitikai eljárások feltételeivel.

A modern elemzésekkel szemben támasztott követelmények figyelembevételével célul tűztem ki néhány - különösen a hazai klinikai kémiai laboratóriumokban általánosan használt - analitikai módszer rövid kritikai értékelését és ezek eredményeként lehetőséget kerestem egyes eljárások célszerű módosítására.

Mind a mennyiségi, mind a minőségi nehézségek a nagy szériájú vizsgálatok terén jelentkeznek elsősorban, ezért az ilyen jellegű vizsgálatok megoldását kíséreltem meg. A célszerű módosítás egyrészt arra irányult, hogy a sok hiba lehetőséget magában rejtő több lépéses elemzéseket egyszerűsítsem, érzékenységüket fokozzam, más részt arra, hogy néhány titrimetriás eljárás fotometriás változatát alakítsam ki.

A dimetilglioxim - karbamid Fearon kondenzációja alapján szérumban karbamid meghatározást dolgoztam ki. Az elemzéshez szükséges reagensek egyetlen oldatban stabilisak, az analízis két térfogat mérést igényel, az eljárás mintaigénye 20 µl.

A szérumban összfehérje meghatározására elterjedten használt biuret reakció vizsgálata alapján módosított szérumban összfehérje meghatározást írtam le citrát ligandum alkalmazása útján. Az eljárás a klasszikus biuret reakció pontatlanságát és a reagensek instabilitását kiküszöböli, a vizsgálat érzékenysége pedig fokozódott. A módszer egy reagenst és 20 µl mintát igényel.

Az o-toluidin - glükóz reakció alapján fehérjementesítés nélküli vércukor meghatározást igyekeztem kidolgozni. A reakció optimális körülményeinek tisztázása után sikerült e módszer közismert hátrányait /tömény ecetsavas közeg, esetenként fehérjementesítés, kifogásolható reprodukálhatóság/ kiküszöbölni. Az analízishez szintén egy reagens és 20 µl minta szükséges.

A foszformolibdénsav - molibdénkék reakció alapján megkíséréltem egy fehérjementesítés nélküli szérumban anorganikus foszfor meghatározást kidolgozni, amely két reagenst igényel, minta szükséglete 50 µl. A foszformolibdénsav redukciójából származó bizonytalanságokat vas/II/ redukálószer alkalmazásával sikerült kiküszöbölni, valamint az alkalmazott trietanolamin reagens stabilizálja a fehérjét és a fotometriás analízisre alkalmas molibdénkék színét.

Olyan vas meghatározást igyekeztem kidolgozni, amely lehetővé teszi csecsemők, vagy akár koraszülöttek vasanyagcseréjének vizsgálatát 100 µl szérumból is. A célt az által értem el, hogy előzetes fehérjementesítés nem szükséges, színreagensnek pedig ferrozint alkalmaztam, amely vas komplexének moláris extinkciós koefficiense jelenlegi ismereteink szerint a legnagyobb.

Az analitikai eljárások alkalmazhatóságát kontrol szérumok felhasználásával vizsgáltam. Az egyes módszereknél az alapvető hibaszámításokat ezek segítségével végeztem el.

A kidolgozott eljárások a gyakorlatban alkalmasnak bizonyultak az előzetesen támasztott követelmények teljesítésére.

- Az eljárások minőségi paraméterei az érvényben lévő követelményeknek megfelelnek.
- Az elemzések - a karbamid kivételével - nem igényelnek előzetes fehérjementesítést, ez egyik biztosítéka a biológiai arányok közelítő megőrzésének.
- A fotometriás analizisek a kívánt koncentráció tartományban követik a Beer-Lambert törvényt, ezért egyszerűen kiértékelhetők.
- A mikro eljárások minta igénye nem haladja meg a 100 µl térfogatot.
- Az elemzések különböző biológiai mintákból /szérum, plazma, liquor, vizelet/ is elvégezhetők.
- A mindössze két, maximum három bemérést igénylő analizisek a nagy volumenű sorozatok manuális teljesítésére is alkalmasak, továbbá könnyedén alkalmazhatónak látszanak különböző típusú klinikai laboratóriumi automatákra is.

IRODALOM JEGYZÉK

- 1./ Dybkaer, R.: Newsletter No.7, May 1972. IFCC kiadvány.
- 2./ Eaton, J.C.-Lathe, G.H.: Lancet II. 959 /1963/
- 3./ Goreczky, L.: Orvosi Hetilap 114. 1354 /1973/
- 4./ Horvátth, I.: Bajcsy Zs.Kórház Jubileumi Tudományos Évkönyve. Budapest 1972. 233.old.
- 5./ Velősy, Gy.: Éü.Gazd.Szemle 9. 299 /1971/
- 6./ Whitby, L.G.: Lancet II. 1239 /1963/
- 7./ Brehant, J.: La Nouvelle Presse Medicale 2. 144 /1973/
- 8./ Bálint, P.: Klinikai Laboratóriumi Diagnosztika. Medicina. Budapest. 1962.
- 9./ Horvátth, I.: Orvosi Hetilap 115. 1203 /1974/
- 10./ Kaschel, E.: Labortechnik 1. 7 /1969/
- 11./ Müller, S.: Labortechnik 5. 2 /1972/
- 12./ Eggstein, H.-Kenzelmann, E.-Knodel, W.-Allner, R.: Das ärztl. Lab. 13. 64 /1967/
- 13./ Rappoport, A.E.-Gennaro, W.D.-Constandse, W.J.: The Modern Hospital 4. /1967/
- 14./ Belk, W.P.-Sundermann, F.W.: Amer.J.Clin.Path. 17. 853 /1947/
- 15./ Wootton, I.D.P.: Clin.Chem. 2. 296 /1956/
- 16./ Eldjarn, L.-Stomme, J.H.: Scand.J.Clin.Lab.Invest. 21. 110 /1969/
- 17./ Bürgi, W.: Das Medizinische Laboratorium 27. 105 /1974/
- 18./ Horvátth, I.: Beszámoló a Magyar Laboratóriumi Diagnosztikai Társaság csoportos vizsgálatáról. Budapest. 1973.

- 19./ Youden, W.J.: Statistical techniques for collaborative tests. The Association of Official Analytical Chemist Inc. Washington 1967.
- 20./ Plenert, W.-Heine, W.: Normalwerte 3. Auf. Veb Verlag Volk und Gesundheit-Berlin 1969.
- 21./ Rappaport, F.-Eichhorn, F.: Lancet II. 171 /1947/
- 22./ Lee, M.H.-Widdowson, E.M.: Biochem.J. 31. 1035 /1937/
- 23./ Kachani, Z.: Das ärztl. Lab. 9. 81 /1963/
- 24./ Natelson, S.-Scott, M.L.-Beffa, C.: Amer.J. Clin. Path. 21. 275 /1951/
- 25./ Cerriotti, G.-Spandrio, L.: Clin.Chim.Acta 11. 519 /1965/
- 26./ Bohoun, C.-Delarue, J.C.-Comoy, E.: Clin.Chim. Acta 18. 417 /1968/
- 27./ Fearon, W.R.: Biochem. J. 33. 902 /1939/
- 28./ Richterich, R.: Klinische Chemie. 2. Auf. S.Karger-Basel 1968. p. 254.
- 29./ Dudek, H.: Clin.Chem.Acta 14. 108 /1966/
- 30./ Velósy, Gy.-Szabó, A.: Orvosi Hetilap 113. 1120 /1972/
- 31./ Biltz, H.: Berichte 41. 1882 /1908/
- 32./ Hiller, A.-Plazin, J.-Van Slyke, D.D.: J.Biol. Chem. 176. 1401 /1948/
- 33./ Chariaviglio, E.D.C.-Wolf, A.V.-Prentin, P.G.: Amer.J.Clin. Path. 39. 42 /1963/
- 34./ Lang, K.-Hinsberg, K.: Medizinische Chemie. 3 Auf. Urban-Schwarzenberg 1957. p. 982.
- 35./ Phillips, R.A.: J.Biol.Chem. 183. 305 /1950/
- 36./ Warburg, O.-Christian, W.: Biochem.Z. 310. 384 /1941/
- 37./ Reinhold, J.G.: Standard Methods of Clinical Chemistry 1. 88 /1953/

- 38./ Riegler, E.: Z. Analyt. Chem. 53. 242 /1914/
- 39./ Kingsley, G.R.: J. Lab. Clin. Med. 27. 840 /1942/
- 40./ Mehl, J.W.: J. Biol. Chem. 157. 173 /1945/
- 41./ Sols, H.: Nature 160. 89 /1947/
- 42./ Weichselbaum, T.E.: Amer. J. Clin. Path. 10.
40 /1946/
- 43./ Keyser, J.W.: Biochem. J. 44. 23 /1949/
- 44./ Rosenthal, H.L.-Cundiff, H.I.: Clin. Chem 2.
394 /1956/
- 45./ Velősy, Gy.-Szabó, A.: Kisé. tes Orv. Tud.
Megjelenés alatt.
- 46./ Nielsen, H.: Acta Chem. Scand. 12. 38 /1958/
- 47./ Cox, E.G.-Wardlaw, W.-Webster, K.C.: J. Chem. Soc.
1475 /1935/
- 48./ Ray, P.-Sen, D.N.: J. Indian Chem. Soc. 25.
473 /1948/
- 49./ Aida, K.-Musya, J.-Kimumaki, S.: Inorg. Chem.
2. 1268 /1963/
- 50./ Straub, F.B.: Biokémia. Medicina. - Budapest
1965. 48. old.
- 51./ Hagedorn, H.C.-Jensen, W.N.: Biochem. Z. 135.
46 /1923/
- 52./ Shaffer, P.A.-Hartmann, A.E.: J. Biol. Chem. 45.
365 /1920-21/
- 53./ Ek, J.-Hultman, E.: Scand. J. Clin. Lab. Inv. 9.
215 /1957/
- 54./ Athanail, G.-Gabaud, P.G.: J. Lab. Clin. Med. 51.
321. /1958/
- 55./ Lorentz, K.: Z. Klin. Chem. 1. 127 /1963/
- 56./ Hultman, E.: Nature 183. 108 /1959/
- 57./ Dubowski, K.M.: Clin. Chem. 8. 215 /1962/
- 58./ Velősy, Gy.-Mészáros, S.: Orvosi Hetilap 109.
1273 /1968/

- 59./ Härtel, A.-Helger, R.-Lang, H.: Z.Klin.Chem.u.
Klin.Biochem. 7. 14 /1969/
- 60./ Yee, H.Y.-Jenest, E.S.: Clin.Chem. 17. 103 /1971/
- 61./ Hann, J.B.-Roth, M.: Z.Klin.Chem.u.Klin.Biochem.
7. 624 /1969/
- 62./ Marks, V.: Clin.Chim.Acta 4. 395 /1959/
- 63./ Sunderman, F.W.: Amer.J.Clin.Path. 36. 75 /1961/
- 64./ Förster, H.-Halsbeck, M.: Diagnostik 5. 311 /1972/
- 65./ Bartholomai, W.-Czok, R.: Klin.Wschr. 40. 585 /1962/
- 66./ Debreczeni, M.-Ujvárosi, I.: Kisérletes Orv.Tud.
22. 93 /1970/
- 67./ Yee, H. -Godwin, J.F.: 8th.International Congress
of Clinical Chemistry-Copenhaga 1972.27.7.
- 68./ Bruckner, Gy.: Szerves Kémia I/2. Tankönyvkiadó
Budapest, 1961. 963. old.
- 69./ Velősy, Gy.-Szabó, A.: Orvosi Hetilap 114.
3088 /1973/
- 70./ Fiske, C.R.-Subbarow, Y.: J.Biol.Chem. 66.
375 /1925/
- 71./ Bell, R.D.-Doisy, E.A.: J.Biol.Chem. 44. 55 /1920/
- 72./ Raaber, S.: Rec.Trav.Chim. 74. 652 /1955/
- 73./ Kuttner, T.-Lichtenstein, L.: J.Biol.Chem. 86.
671 /1930/
- 74./ Gömöri, G.: J.Lab.Clin.Med. 27. 955 /1942/
- 75./ Richterich, R.: Klinische Chemie. 2. Auf. S.Karger-
-Basel 1968. p. 307.
- 76./ Malowan, S.L.: Z.Analyt.Chem. 84. 209 /1931/
- 77./ Woods, J.T.-Mellon, M.G.: Ind.Engng.Chem.Anal.
Edit. 13. 760 /1941/
- 78./ Kitson, R.E.-Mellon, M.G.: Ind.Engng.Chem.Anal.
Edit. 16. 466 /1944/
- 79./ Velősy, Gy.-Szabó, A.: Orvosi Hetilap 112.
153 /1971/

- 80./ Ramsay, W.N.M.: Biochem.J. 53. 227 /1953/
81./ Bothwell, T.H.-Mallatt, B.: Biochem.J. 59.
599 /1955/
82./ Laurell, C.B.: Acta Physiol.Scand. 14. 46 /1947/
83./ Landers, J.W.-Zak, B.: Amer.J.Clin.Path. 29.
590 /1958/
84./ Szilágyi, L.-Páhoki, I.: Orvosi Hetilap 109.
2837 /1968/
85./ Caraway, W.T.: Clin.Chem. 7. 572 /1961/
86./ Benedek, E.-Soós, G.: Orvosi Hetilap 108.
2137 /1967/
87./ Diehl, H.: J.Chron.Dis. 16. 305 /1963/
88./ Richterich, R.: Klinische Chemie. 2. Auf. S.Karger-
-Basel 1968. p. 209.
89./ Ishida, T.-Osaka, T.-Kojima, K.: Clin.Chim.Acta 22.
271 /1968/
90./ Rosner, E.-Molnár, A.: Kisérletes Orv.Tud. 23.
220 /1971/
91./ Stookex, L.L.: Anal.Chem. 42. 779 /1970/
92./ Persijn, J.P.-Slik, W.-Riethorst, A.: Clin.Chim.
Acta 35. 91 /1971/

Ezuton is hálás köszönetem fejezem ki munkahelyi vezetőmnek, Dr. Velősy György laboratóriumi és megyei vezető szakfőorvosnak, aki lehetőséget nyújtott és éveken át minden segítséget megadott a munkámhoz.

Köszönettel tartozom Dr. Csányi László egyetemi tanárnak, a kémiai tudományok doktorának, a téma iránt tanúsított érdeklődéséért, értékes megjegyzéseiért, hasznos észrevételeiért.