

PRAKTYKA LABORATORYJNA

JANUSZ WIERCIŃSKI

Modyfikacja i przystosowanie metody Stojanovića*) do oznaczania miedzi w małych ilościach surowicy

Katedra Chemii Fizjologicznej Wydz. Wet. WSR w Lublinie
Kierownik: prof. dr J. SKULMOWSKI

Powszechnie stosowane metody, służące do oznaczania miedzi w surowicy krwi, opierają się na spektrofotometrycznym pomiarze kompleksu miedziowego wytworzonego z dwuetylo - dwutio - karbaminianem sodu (2, 4, 5, 13, 14). Intensywność zabarwienia powstałego związku jest stosunkowo nieduża (molowy współczynnik absorpcji w roztworach wodnych wynosi 8 000), stąd pomiar wymaga czułych spektrofotometrów i pobierania do oznaczeń większych ilości surowic, zwykle 2–4 ml. W wielu przypadkach warunki te ograniczają stosowanie tych metod. Poza tym dokładność oznaczeń zależy od ścisłego przestrzegania wartości pH, jak również niejednokrotnie, od zawartości żelaza w surowicy. Z tych względów coraz częściej poszukuje się bardziej czułych i bardziej specyficznych reakcji barwnych na miedź lub reakcji mniej zależnych od warunków oznaczania (1, 6, 9, 10, 11, 12, 15). Stosowane do metod tych odczynniki nie zawsze są w Polsce dostępne.

Opisana modyfikacja metody opiera się na czułej i specyficznej reakcji miedzi z oksalilo-dwuhydrazdem w nadmiarze aldehydu octowego (molowy współczynnik absorpcji wytworzonego związku barwowego = 29 000 i jest najwyższy z dotychczas badanych w roztworach wodnych kompleksów miedzi, w szerokim zakresie pH 5–10).

Wprawdzie związek ten nie jest jeszcze produkowany przez krajowe wytwórnie chemiczne, ale synteza jego (z etanolu, kw. szczawiowego i wodzianu hydrazyn) jest prosta i możliwa do przeprowadzenia w każdym laboratorium (3, 7).

Część doświadczalna

Metode Stojanovića stosowano już w naszej pracowni do oznaczania miedzi w paszach pochodzenia roślinnego. Jej wyniki porównywano z rezultatami

innych metod w ramach prac związanych z ujednoliceniem analiz pasz. Zwrócono wówczas uwagę na dużą czułość pomiarów i powtarzalność wyników.

Przystosowanie metody do oznaczania miedzi w surowicy wymagało przeprowadzenia szeregu prób, aby upewnić się czy niektóre składniki surowicy a przede wszystkim żelazo nie będą wpływać ujemnie na dokładność oznaczania. Okazało się, że inne mikroelementy — Co, Ni, Zn i Mn, w ilościach znajdujących się w surowicy nie wywierają żadnego wpływu na przebieg oznaczania. Podobnie żelazo surowicy w większości przypadków nie wpływa ujemnie na rezultaty oznaczeń. W próbkach, w których zawartość Fe przekraczała 4 γ /ml (np. w surowicach częściowo zhemolizowanych), znajdowano jednak miedzi mniej, aniżeli była jej rzeczywista wartość. W celu usunięcia wpływu większej ilości Fe dodawano pirofosforan sodu, w obecności którego uzyskiwano prawidłowe rezultaty nawet przy 20-krotnej przewadze ilościowej Fe w stos. do Cu.

Wpływ zawartości Fe surowicy oraz dodawanego pirofosforanu sodu na wyniki oznaczeń Cu (ekstynkcje), ilustruje tab. 1.

Wyniki uzyskane tą metodą porównano z rezultatami innych najczęściej stosowanych metod — met. Hütterera, met. Gublera oraz met. polarograficznej (tab. 2). Zestawienie to wskazuje, że różnice między wynikami wymienionych metod są niewielkie i mieszczą się w granicach błędów każdej z tych metod.

Wartości ekstynkcji kompleksów barwnych uzyskane tymi metodami, w przeliczeniu na 1 ml surowicy pobranej do oznaczania zestawiono w tab. 3. Wskazują one, że opisana metoda przewyższa czułością powszechnie używane metody Hütterera i Gublera. Stosowanie tej metody umożliwia obniżenie do 1 mln ilości surowicy pobieranej do analizy.

Tabela 1

	Surowica z zawartością Fe/ml w ilościach:										Surowica + 20% Fe + pirofosforan	
	1 %	2 %	3 %	4 %	5 %	6 %	7 %	8 %	10 %	15 %		20 %
Ekstynkcja	0,130	0,132	0,130	0,131	0,128	0,124	0,120	0,115	0,108	0,100	0,086	0,130

Tab. 2. Wyniki oznaczeń Cu w γ /ml surowicy (średnie wyniki z 6 oznaczeń)

Nr próby	Metoda Hütterera	Metoda Gublera	Metoda polarograficzna	Metoda proponowana		
				spalanie próby na sucho	mineralizacja kwasami	oddzielenie Cu z HCl
1	1,24	1,20	1,30	1,25	1,22	1,20
2	2,50	2,48	2,56	2,52	2,49	2,50
3	0,86	0,85	0,82	0,88	0,85	0,84
4	1,40	1,36	1,30	1,40	1,38	1,38
5	1,32	1,32	1,40	1,34	1,33	1,30

Tabela 3

Ekstynkcja w przeliczeniu na 1 ml analizowanej surowicy

Nr próby	Metoda Hütterera E_{440}	Metoda Gublera E_{440}	Metoda proponowana E_{542}		
			z suchym spalaniem	z mokrym spalaniem	oddzielenie Cu z HCl
1	0,019	0,019	0,091	0,088	0,067
2	0,040	0,039	0,185	0,181	0,138
3	0,014	0,015	0,064	0,062	0,046

*) Stojanović N. M., Stevančević D. B.: Direktno spektrofotometričko određivanje bakra u biološkom materijalu oksalidihidrazidom. Acta Vet. Beograd, 11 (1961) 55.

Proponuje się niżej opisane postępowanie analityczne.

Przygotowanie prób surowicy do

oznaczania miedzi można przeprowadzać przez:

1. spalanie surowicy na sucho
2. mineralizację składników surowicy za pomocą stężonych kwasów utleniających
3. przeprowadzenie miedzi do roztworu z jednocześnie odbiałieniem surowicy za pomocą HCl i CCl_3COOH .

Ad 1. W celu spalania próbki na sucho pobiera się do tygielka 0,5 ml surowicy, odparowuje się nad grzejnikiem elektr. do momentu rozpoczęcia zwęglania i praży w piecu w temp. nie wyższej niż 55°. W trakcie spalania zwilża się (po ostudzeniu) zawartość tygla kilkoma kroplami stęż. HNO_3 i odparowuje do sucha. Składniki popiołu przeprowadza się w chlorku przez potraktowanie pozostałości w tygliku kilkoma kroplami HCl (1:1) i odparowanie. Zawartość tygla rozpuszcza się w 3 ml 2 m HCl i zachowuje do dalszego toku analizy.

Ad. 2. Mineralizację na mokro przeprowadza się przez ogrzewanie 0,5 ml surowicy z 2 ml stęż. HNO_3 i 2 ml 60% HClO_4 w 50 ml kolbkach Kjeldahla. Aby zapobiec przegrzewaniu się roztworu do kolbki wrzuca się 2—3 szklane kulki. Zawartość w kolbkach ogrzewa się na młym ogniu do momentu odbarwienia, potem silniej przez ok. 15 min. Po ostudzeniu roztwór przenosi się ilościowo do tygla o poj. 20—25 ml i odparowuje do sucha nad grzejnikiem elektr. Pozostałość zwilża się kilkoma kroplami HCl (1:1), ponownie odparowuje i rozpuszcza w ml 2m HCl.

Ad. 3. Uwolnienie miedzi z kompleksów białkowych przeprowadzić można przez potraktowanie surowicy HCl i CCl_3COOH . W tym celu do 1,0 ml surowicy, umieszczonej w probówce wirówkowej, dodaje się 1,5 ml 2m HCl i po wymieszaniu pozostawia na 10 min. Po upływie tego czasu dodaje się w trakcie dokładnego mieszania roztworu 1,5 ml 20% kw. trójklorooctowego i pozostawia na dalsze 10 min. Wytrąceny osad odwirowuje się przy 3000 obr./min. Do dalszego znaczenia pobiera się 3 ml roztworu z nad osadu.

Przebieg analizy. Do probówki wirówkowej pobiera się 3 ml przygotowanego jak wyżej roztworu, dodaje 0,3 ml nasyconego wodnego roztworu oksalilo-dwuhydrazdu (ok. 0,2%), 2 ml cytrynianu amonu (o pH=9, doprowadzone za pomocą stęż. NH_3 wobec uniwersalnego papierka wskaźnikowego), a po wymieszaniu kolejno: 0,3 ml nasyconego wodnego roztworu pirofosforanu sodu, 2 ml 8% roztworu NH_3 i 1 ml 40% wodnego roztworu aldehydu octowego (aldehyd należy dodawać zawsze w ostatniej kolej-

ności). Zawartość probówki miesza się i jeśli próbkę surowicy przygotowywano wg pkt. 3, po upływie 30 min. dokonuje się pomiaru spektrofotometrycznego. Jeżeli próbka surowicy była mineralizowana, po 30 min dodaje się jedną kroplę roztworu szkła wodnego (1:5), a po wymieszaniu i 10 min. wirowaniu przy 3 tys. obr./min., dokonuje się pomiaru ekstynkcji. Wytworzone czerwono-fioletowe zabarwienie próbki nie zmienia swojej intensywności w temp. pokojowej co najmniej przez 24 godz.

Jednocześnie z próbami badanymi przeprowadza się oznaczenie w próbie kontrolnej, przygotowanej wg tego samego sposobu i z dokładnie takimi samymi ilościami odczynników, jak przy próbie właściwej. Wyniki odczytuje się z krzywej standardów sporządzonej uprzednio w zakresie 0—5 γ Cu. Parametry pomiaru: $\lambda = 542$ nm (na fotometrze Pulfricha S-53), $d = 20$ mm.

Wnioski

1. Opracowana metoda przewyższa czułością i specyficznością spektrofotometryczne metody oznaczania miedzi oparte na pomiarze kompleksu z dwutylo-dwutio-karbaminianem sodu.

2. Zmniejszenie objętości próby do 0,5—1 ml, czyni metodę przydatną w badaniach miedzi w surowicy u ludzi i małych zwierząt.

3. Dodatek pirofosforanu sodu umożliwia dokładne oznaczenie Cu w stężeniach około 4 γ ml (surowice częściowo zhemolizowane)

4. Ze względu na dużą trwałość wytworzonego kompleksu barwnego metoda nadaje się dobrze do oznaczeń seryjnych.

Piśmiennictwo

1. Brown N. A.: Research of Vet. Sci., 3 (1962) 345.
2. Mc Farlen W. D.: Biochem. J., 26 (1932) 1022.
3. Gran G.: Anal. Chim. Acta, 14 (1956) 150.
4. Gubler C. J. i wsp.: J. Biol. Chem., 196 (1962) 209.
5. Hütterer F., Hunya T.: Schweiz. Med. Wschr., 87 (1957) 190.
6. Jacobsen E. i wsp.: Anal. Chim. Acta, 24 (1961) 579.
7. Middleton K. R.: Analyst, 90 (1965) 234.
8. Nilsson G.: Acta Chem. Scand., 4 (1950) 205.
9. Peterson R. E., Bollier M. E.: Anal. Chem., 27 (1955) 1195.
10. Smith G. F., Mc Curdy W. H.: Anal. Chem., 24 (1952) 371.
11. Smith G. F., Wilkins D. H.: Anal. Chem., 25 (1953) 510.
12. Stevančević D. B.: Zeitschrift Anal. Chemie, 165 (1959) 343.
13. Taucin E. Ja.: Opredelenje mikroelementov w organizmie životnyh. Riga 1962.
14. Ventura S., White J. C.: Analyst., 79 (1954) 39.
15. Zak B.: Clinica Chim. Acta, 3 (1958) 328.

H. ZAIDLER, W. HEESCHEN

Leukometr, prosty przyrząd, służący do pośredniego oznaczania ilości leukocytów w krwi bydlęcej

Instytut Higieny Mleka Państwowego Ośrodka Badawczego i Zakładu Badawczego Gospodarki Mlekiem w NRF
Kierownik: prof. dr A. TOLLE

W akcji zwalczania białaczki bydlęcej, której diagnoza opiera się na badaniu krwi, coraz większego znaczenia nabiera kwestia ustalenia liczby leukocytów.

Obliczenia ilości białych ciałek krwi można dokonać w powszechnie stosowanych komorach do liczenia składników krwi (Türka, Neubauera, Bürkera i inn.). Jednakże do badań masowych metoda ta jest nieprzydatna z uwagi na znaczną pracochłonność. W praktyce weterynaryjnej liczenie przy pomocy wyżej wspomnianych komór jest często niewykonalne ze względu na trudności techniczne.

Dokładne i szybkie ustalenie ilości leukocytów we krwi możliwe jest przy zastosowaniu tzw. elektronicznych celoskopów, opartych na zasadzie Coultera. W NRF prowadzi się od 1965 r. akcję zwalczania białaczki. W tym celu zaopatrzoneo weterynaryjne pla-

cówki badawcze w w/w celoskopy elektroniczne. Heesch i Krüger (1963) oraz Rojahn i Tolle (1963) opisali działanie tych przyrządów, ich dokładność i efektywność.

Uzupełnieniem wspomnianej metody może być pośrednie oznaczanie liczby leukocytów we krwi (przeprowadzone po raz pierwszy przez Schalma w 1963 r.) przy pomocy udoskonalonej i zmodyfikowanej przez niego metody kalifornijskiego testu stosowanego przy zapaleniu wymion (CMT). Metoda ta, zwana także testem Schalma, polega na reakcji określonych komórek jądrazstych z pewnymi powierzchniowo-aktywnymi substancjami z grupy alkailo-arylo sulfonianów. Powstawanie żelu przy tej reakcji spowodowane jest obecnością kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNS) w jądrach komórek. Jaartsveld (1961) zmodyfikował