

ARAŞTIRMALAR :

Eksperimental çalışmalar :

A. Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Kürsüsü

SERUM KALSİYUM KOLORİMETRİK TAYİN METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ

Dr. Cemil Rota *

Dr. Birinci Pınar **

Serum kalsiyumunu ölçmek için çeşitli metodlar (1, 2, 3) kullanılır. Kramer - Tisdall metodundan genellikle diğer kalsiyum metodlarının kontrolünde istifade edilir.

Roe - Kahn'a göre serum proteinleri triklorasetik asitle çökeltilir. Berrak süzüntü kalevilendirildikten sonra trisodyum fosfat ilâve edilir, kalsiyum $\text{Ca}_3 (\text{PO}_4)_2$ halinde çökeltilir. Bu çökelti triklorasetik asitte çözüldükten sonra fosfor tayini yapılır ve neticeler kalsiyum olarak ifade edilir.

METOD VE NETİCELER

Kullandığımız Roe - Kahn metodudur (1). Reaktifleri Seiverd'in (4) tarif ettiği şekilde hazırladık. Bunlardan trisodyum fosfatı % 1 lik yaptık. Aynı serumda Kramer - Tisdall metodunun Clark - Collip tarafından değiştirilmiş şekli ve Roe - Kahn kolorimetrik metodunu kullanarak kalsiyum tayinleri yaptık. Serumda 4,7 mEq/L. olan kalsiyum kolorimetrik metotta 10 mEq/L. den daha fazla çıktı. Deneylerimizi tekrarladık aynı değişik neticeleri aldık. Yaptığımız deneyler neticesinde kolorimetrik metodu daha güvenilir hale getirdik.

Teklif ettiğimiz teknik : Santrifüj tüpüne 0.5 ml. distile su, 0.5 ml. serum ve 0,3 ml. amonyum okzalate (% 4) konur, tüp çalkalanır. Santrifüj tüpü oda ısısında 5 dakika bırakıldıktan sonra 300 r.p.m. de 5 dakika santrifüj edilir. Üstteki berrak sıvı dökülür. Tüp ters çevrili olarak 5 dakika bırakılır. Tüpteki çökelti 1 ml. N sülfürik asitte çözülür, 4 ml. distile su, 0,3 ml. % 25

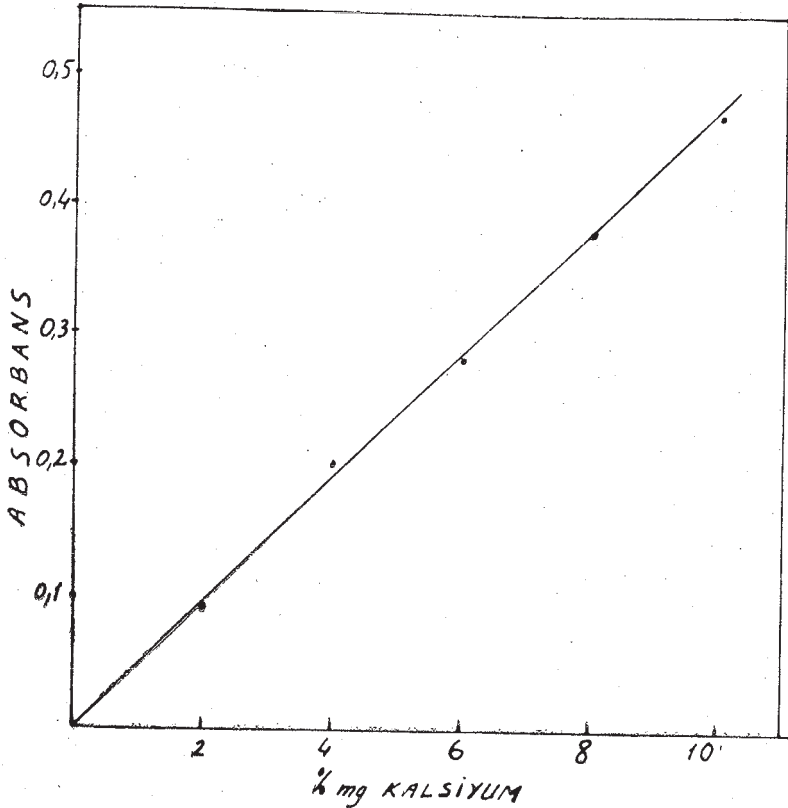
* A. Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Kürsüsü Profesörü

** A. Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Kürsüsü Uzman Asistanı

sodyum hidroksit ve 0,3 ml. % 1 lik Na_3PO_4 konur. Tüp oda ısısında 1 saat bırakılır, kalsiyum trifosfat çökelir. Tüp 5 dakika 300 r.p.m. de santrifüj edilir, üstteki berrak sıvı dökülür. Tüp ters çevrili olarak 5 dakika bırakılır. Çökeltiliye 2 ml. alkol konur. Tüp tekrar santrifüj edilir, üstteki berrak sıvı dökülür. Tüp ters çevrili olarak 5 dakika bırakılır. 3 ml. % 5 triklorasetik asit konur. Asit konması ile trisodyum fosfat çökeltisi çözülür. Berrak sıvıya 0,5 ml. amonyum molibdat 0,5 ml. aminonaftolsulfonik asit ve 4 ml. distile su ilâve edilir. Optik dansite 650 milimikronda kör denemeye karşı okunur.

Kör deney : serum yerine distile su kullanarak hazırlanır.

Standart eğri : Bunun için seyreltik fosfat reaktifi kullanılır. Bu reaktiften sırası ile 0, 2, 4, 6 ve 8 ml. alınır % 5 triklorasetik asitle 10 ml. ye tamamlanır. 5 kolorimetre tüpüne sırası ile 3'er ml. konur. Kolorimetre tüplerine 0,5 ml. amonyum molibdat, 0,5 ml. aminonaftolsulfonik asit ve 4 ml. distile su ilâve edilir. Optik dansiteler birinci tüpe karşı 650 milimikronda okunur.



Reaktifler : 1 — % 2,5 amonyum molibdat : 12,5 g. amonyum molibdat 300 ml. distile suda çözülür, 100 ml. derişik sülfürik asit konur. Hacim distile su ile 500 ml. ye tamamlanır.

2 — Aminonaftolsulfonik asit : 1, 2, 4 aminonaftolsulfonik asitten 0,125 g. ayrıca 7,280 g. anhidr sodyum bistüfit ve 0,250 g. anhidr sodyum sülfite 50 ml. distile suda çözülür. Reaktif süzülür renkli şişede saklanır.

3 — Alkol reaktifi : 58 ml. etil alkole (% 95) 10 ml. amil alkol ilâve edilir, hacim distile su ile 100 ml. ye tamamlanır.

4 — Stok standart fosfat reaktifi : 4,390 g. KH_2PO_4 suda çözülür, hacim distile su ile 1000 ml. ye tamamlanır.

5 — Seyreltik standart fosfat reaktifi : 1 ml. stok standart alınır, 96 ml. % 5 triklorasetik asit ilâve edilir. Bu reaktif standart eğrinin çizilmesinde kullanılacaktır.

MÜNAKAŞA

Roe - Kahn metodunda serum proteinleri çöktürülür, berrak süzüntüde kalsiyum tayini yapılır. Bunun içinde berrak süzüntüdeki kalsiyum, trikalsiyum fosfat halinde çöktürülür. Serum proteinlerini çöktürmede kullanılan reaktiflerin kolorimetrik deneylerde renk şiddetine etkileri vardır (6). Tecrübelerimizde triklorasetik asitin kalsiyum tayini için uygun protein çöktürücü olmadığı görüldü. Bu sebeple tungstik asiti denedik neticelerde önemli fark olmadı.

Teklif ettiğimiz metod değişikliğinde kalsiyumu serum proteinlerine dokunmadan kalsiyum okzalat halinde çöktürmekteyiz. Bundan sonra kalsiyum okzalat N sülfürik asitte çözülmekte, çözelti sodyum hidrosit ile kalevilendirilmektedir. Takribende kalsiyumu trikalsiyum fosfat halinde tekrar çöktürüp renk reaksiyonunu tatbik ediyoruz. Bu geliştirilmiş metodun standart deviasyonu $\pm 1,240$ dır.

ÖZET

Roe - Kahn'ın serumda kolorimetrik kalsiyum tayini metodunda değişiklik yapıldı. Serumdaki kalsiyum önce kalsiyum okzalat halinde çöktürüldü. Bu kalsiyum okzalat çözüldükten sonra tekrar kalsiyum fosfat halinde çöktürüldü, Fiske - Subbaraw'un renk reaksiyonu tatbik edildi. Tarif ettiğimiz kalsiyum metodunda 0,5 ml. serum kullanılır. Bu miktar orijinal metoddaki kullanılabildiği 1/4 dır.

SUMMARY

Improvement of the serum calcium colorimetric estimation method.

We modified colorimetric calcium estimation method of Roe-Kahn. We precipitated calcium from serum as calcium oxalate. The precipitate is dissolved in acid and again precipitated as tricalcium phosphate. The color reaction Fiske-Subbarow is applied. In our improved method 0,5 ml, serum is used. This amount is 1/4 of the original method.

LİTERATÜR

- 1 — ROE, J. H., KAHN, B. S.: The colorimetric determination of blood calcium J. Biol. Chem. 81 : 1, 1929.
- 2 — LYNCH, M. J., RAPHAEL, S., MELLOR, D., SPARE, D., HILLS, P., INWOOD, H.: Medical laboratory technology W.B. Saunders Com. 128 1963.
- 3 — WATSON, D., ROGERS, J. A.: Serum calcium determination with 1,2-diaminocyclohexane - N - tetra - acetate Clin. Chim. Acta 8 : 168, 1963.
- 4 — SEIVERD, C. E.: Chemistry for medical teuhnologists C. V. Mosby Com. 296, 1958.
- 5 — OSER, B. L., editör: Hawk's physiological chemistry Mc Gnaw-Hill 14 tabı 1133, 1965.
- 6 — ROTA, C., GÖKHUN, I.: Copper tungstate as protein precipitant in urea determination by nesslerization method Acta Med. Tur. 6 : 45, 1969.

(Mecmuaya geldiği tarih : 31 Mart 1970)