

PRAKTYKA LABORATORYJNA

JANUSZ WIERCIŃSKI, ANDRZEJ SZEWCZUK

Przygotowywanie prób a precyzja i dokładność w płomieniowej metodzie ASA. III. Oznaczanie sodu i potasu w surowicy krwi

Z Centralnego Laboratorium Aparaturowego AR w Lublinie

Atomowa spektrofotometria absorpcyjna jest czułą i specyficzną metodą oznaczania sodu i potasu w surowicy krwi. W laboratorium klinicznym oba składniki analizuje się zazwyczaj razem w celu określenia równowagi elektrolitowej. Jednakże przy oznaczaniu tych pierwiastków — uważniej niż w przypadku analizy innych — powinno się zwracać uwagę na fakt, iż łatwo ulegają one jonizacji w płomieniu palnika. Zjawisko to jest powodem obniżania sygnału absorpcyjnego, gdyż atomy pierwiastka w stanie zjonizowanym nie absorbują promieniowania o tej samej długości fali co atomy w stanie podstawowym. W przypadku sodu i potasu jonizacja osiąga stosunkowo wysokie wartości i — w płomieniu palnika acetylen-powietrze — wynosi odpowiednio 26,4 i 82,1% (5). Stopień jonizacji dla metali alkalicznych wzrasta w kierunku: $Li < Na < K < Rb < Cs$ i jest zależny od stosunków ilościowych oznaczanego składnika do pozostałych w tym szeregu. Ponieważ wielkość jonizacji zależy od temperatury płomienia palnika zaleca się niekiedy stosowanie niższej energetycznych gazów, np. propanu, butanu lub gazu węglowego (1, 9, 14). Jednakże w temperaturach niższych wzrasta wpływ czynników natury chemicznej — szczególnie anionów. Dlatego dla wyeliminowania lub osłabienia zjawiska jonizacji częściej stosuje się dodawanie do roztworów oznaczanego składnika supresorów, którymi są sole pierwiastków łatwiej jonizujących — zwykle związki Rb lub Cs (14, 15, 16). W innych metodach — nie ograniczając jonizacji — dąży się do zachowania identycznego stosunku stężeń standardów Na : K, jak to ma miejsce w badanym materiale (2, 4, 10, 11, 17).

Przy analizie sodu i potasu zwraca się coraz częściej uwagę na fakt przechodzenia tych pierwiastków do badanych roztworów ze ścianek stosowanych strzykawk i naczyń szklanych. Dlatego zaleca się przeprowadzanie całości operacji przygotowawczych i analitycznych w naczyniach krytych silikonem lub wykonanych z polimerów (7, 8, 12, 13, 16, 17).

Oprócz omawianych warunków pomiaru aparaturowego, wpływ na dokładność analiz mają

podobne czynniki, jakie spotyka się w innych metodach analitycznych. Są to:

- sposób pobierania próby,
- sposób przechowywania próby,
- czystość stosowanej wody i odczynników,
- sposób przygotowania prób do oznaczeń.

O ile wpływ pierwszych 3 czynników na dokładność wyników jest na ogół znany, a poprawność tych ostatnich osiągana przez eliminację zanieczyszczeń oraz zapobieganie hemolizy, o tyle w doborze sposobów przygotowawczych prób do oznaczeń panuje duża dowolność. Prowadzi to do uzyskiwania mniej lub bardziej dokładnych rezultatów (7). Opracowanie lub wybór właściwego sposobu przygotowawczego prób ma na celu zapewnienie rzetelnych wyników zawartości sodu i potasu w analizie materiału biologicznego w obliczu zachodzącej jonizacji i w obecności potencjalnie interferujących anionów i kationów. Natomiast precyzja — obok sposobu przygotowania prób — jest określona czynnikami operacji aparaturowej — włączając warunki płomienia, palnik, lampę, rozpylacz, szybkość zasysania i wielkość uzyskanej absorbancji.

Materiał i metody

Do badań wzięto 210 ml mieszanej surowicy krwi bydlęcej. Objętość tę podzielono na 7 jednakowych części (grup) po 10 prób każda.

Stężenie Na i K oznaczano płomieniową metodą atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej po przygotowaniu surowicy wg niżej wymienionych sposobów:

- I. grupa prób — surowica rozcieńczana wodą w stos. 1:500 (Na) i 1:50 (K), wg postępowania Przesmyckiego i in. (2, 10, 11);
- II. grupa prób — surowica rozcieńczana wodą w stos. 1:5000 (Na) i 1:100 (K), wg postępowania Fernanda (4);
- III. grupa prób — surowica rozcieńczana w stos. 1:50 wodą (Na) i 1% EDTA-Na (K), wg postępowania Willisa (17);
- IV. grupa prób — surowica rozcieńczana 4 mM CsCl w stos. 1:500 (Na) i 1:50 (K), wg postępowania Sanui i Pace (14, 15);
- V. grupa prób — surowica rozcieńczana 0,1 N HCl w stos. 1:2000 (Na) i 1:40 (K), wg postępowania Enigka i in. (3);
- VI. grupa prób — surowica rozcieńczana wodą w stos. 1:3 (K), wg postępowania własnego *);

*) w mniej czułym zakresie pomiaru (404,4 nm), nie wymagającym zmiany fotopowielacza z zakresem 766,5 nm.

W VII. grupie prób dokonano oznaczeń sodu i potasu standardową metodą fotometrii płomieniowej wg postępowania Halda (6, 7) i wykorzystano ją jako metodę porównawczą.

Standardy przygotowywano:

dla I. grupy prób: w wodzie (Na) i 3 mM roztw. NaCl (K),

dla II. grupy prób: w wodzie (Na) i 1,5 mM roztw. NaCl (K),

dla III. grupy prób: w wodzie (Na) i 1% EDTA—Na (K),

dla IV. grupy prób: w 4 mM CsCl (Na i K),

dla V. grupy prób: w 0,1 M HCl,

dla VI. grupy prób: w roztworze o składzie: 50 mM NaCl i 3,5% dekstran (M. cz. 110 000).

Wszystkie próby, odczynniki i standardy przechowywano w naczyniach polietylenowych.

Oznaczenia prowadzono na spektrofotometrze absorpcji atomowej EEL 240/2 prod. Evans Electroselection Ltd (Anglia), metodą krzywej wzorcowej.

W metodzie IV. stosowano płomień propan—butan-powietrze, dla pozostałych metod — płomień acetylen-powietrze. Zakresy stosowanych długości fal i natężenia prądu lamp:

Na: 589,0 nm, 5A;

K: 766,5 nm, 5A, (w VI. grupie prób: 404,4 nm).

Pozostałe warunki pomiarowe:

— średnica kapilary: 0,5 mm,

— szybkość zasysania roztworu: 4 ml/min.,

— inne szczegółowe warunki wg cytowanych opracowań.

Wyniki i omówienie

Rezultaty oznaczeń zawartości Na i K, określanych w surowicy przy pomocy płomieniowej metody ASA i przygotowaniu prób różnymi sposobami, zestawiono w tab. 1. Tam też — dla każdej grupy prób (sposobu przygotowawczego) — zamieszczono względne wartości odchylenia standardowego, obliczonego z serii 100 oznaczeń. Dla oceny metody zestawiono wyniki analiz pierwiastków tych samych prób surowicy, uzyskane przy pomocy standardowej metody fotometrii płomieniowej (6, 7).

Wyniki oznaczeń Na

Porównanie wyników oznaczeń Na po podaniu surowicy różnym czynnościom przygotowania

wawczym z rezultatami analiz metody porównawczej pozwala na stwierdzenie, że metoda ASA prowadzi — z wyjątkiem II i V grupy prób — do uzyskania wyższych wartości stężeń tego pierwiastka — przeciętnie od 2,5 do 5,0%. Wartość i kierunek odchylenia tych wyników dla obu omawianych metod jest zgodny z danymi innych autorów (10, 11).

Kierując się pomiarami własnymi oraz wnioskami obcych prac należałoby przyjąć, że wszystkie sposoby przygotowawcze — dające rezultaty równe lub niższe od wartości stężeń uzyskanych metodą fotometrii płomieniowej — prowadzą do wyników mniej charakterystycznych metodzie ASA. Z tych też względów należałoby krytycznie ocenić postępowania przygotowawcze właściwe grupom prób II i V. Wydaje się, iż jedną z przyczyn wpływających na zaniżanie wyników jest stosunkowo wysokie rozcieńczenie prób wodą lub roztworami nie wpływającymi na ograniczenie rozmiarów jonizacji.

Pozostałe sposoby przygotowawcze stosowane dla prób w grupach I, III i IV, dają zbliżone wyniki stężeń Na w surowicy, przy czym niższe wartości uzyskuje się tam, gdzie czynnik rozcieńczający nie zawiera dodatku supresora.

We wszystkich grupach prób uzyskano wartości precyzji — wyrażone względnym odchyleniem standardowym — poniżej $\pm 1\%$.

Wyniki analiz K

Podobnie jak w przypadku sodu, wyniki oznaczeń potasu w surowicy metodą ASA są z reguły wyższe w poszczególnych grupach prób od rezultatów metody fotometrii płomieniowej — przeciętnie od 2,8 do 9,3%. Rezultaty takie są także zgodne z danymi piśmiennictwa (11, 19). Wyjątek stanowi V. grupa prób, w której uzyskano wartości niższe o ok. 8,0%. Nie doszukując się przyczyn tego stanu rzeczy, postępowanie

Tab. 1. Zawartość Na i K w próbach surowicy krwi przygotowywanych różnymi sposobami

Grupa prób	Sposób przygotowania prób surowicy	Na		K	
		$\bar{x}$	$\pm S$	$\bar{x}$	$\pm S$
I	rozcieńczanie wodą w stos. 1:500 (Na) i 1:50 (K)	2,88	0,67	0,146	0,62
II	rozcieńczanie wodą w stos. 1:5000 (Na) i 1:1000 (K)	2,78	0,88	0,145	0,73
III	rozcieńczanie w stos. 1:50 wodą (Na) i 1% EDTA—Na (K)	2,90	0,70	0,151	0,96
IV	rozcieńczanie 4 mM CsCl w stos. 1:50 (Na) i 1:500 (K)	2,95	0,76	0,149	0,78
V	rozcieńczanie 0,1 N HCl w stos. 1:2000 (Na) i 1:500 (K)	2,75	0,82	0,128	0,82
VI	rozcieńczanie wodą w stos. 1:3 (K)	—	—	0,144	1,40
VII	standardowa metoda fotometrii płomieniowej (metoda porównawcza)	2,81		0,140	

Objaśnienia: $\bar{x}$ — wartości średnie w mg/ml surowicy, $\pm S$ — odchylenie standardowe w %, $n=100$.

przygotowawcze właściwe tej grupie prób (rozcieńczenie surowicy 40 x przy pomocy 0,1 N HCl) należałoby uznać za niewłaściwe.

Wyniki oznaczeń K w pozostałych grupach prób są sobie stosunkowo bliskie — różnica między najniższym i najwyższym leży w granicach 6% — przy czym nieco wyższe wartości stężeń uzyskuje się w tych grupach, gdzie do rozcieńczeń prób używano wodnych roztworów soli EDTA i Cs (III. i IV. grupa).

Stosowane w naszym Laboratorium postępowanie przygotowawcze, omijające konieczność wymiany fotopowielacza na inny z zakresem 766,5 nm, a polegające na 4-krotnym rozcieńczeniu surowicy wodą i oznaczaniu K w mniej czułym zakresie 404,4 nm (VI. grupa prób), daje wyniki w przybliżeniu równe rezultatom omawianych ostatnio grup. Prowadzenie oznaczeń w tym mało czułym dla potasu przedziale jest jednak powodem uzyskiwania stosunkowo niskich wartości absorpcji, co z kolei odbija się niekorzystnie na precyzji oznaczeń K w próbach surowicy po tym sposobie przygotowawczym ($\pm S=1,40\%$). Wartości precyzji uzyskane dla innych grup nie przekraczają 1%, co warunkuje przydatność ich wyników do oceny klinicznej.

Wnioski

1. Płomieniowa metoda ASA daje wyniki oznaczeń Na i K w surowicy krwi wyższe o 1,8—9,3% od rezultatów metody fotometrii płomieniowej.

2. Postępowania przygotowawcze — polegające na rozcieńczeniu prób surowicy jedynie wo-

dą — prowadzą do wyników niższych o 1,0—2,3% (Na) i o 2,6—4,9% (K).

3. W następstwie rozcieńczenia prób surowicy przy pomocy 0,1 N HCl uzyskuje się stężenia zarówno Na jak i K poniżej wartości uznanych za dokładne (odległe od wartości rzeczywistych).

4. Przygotowanie prób przez 4-krotne rozcieńczenie surowicy wodą i oznaczanie K w przedziale 404,4 nm nosi ryzyko otrzymywania mało precyzyjnych wyników.

5. Z uwagi na możliwość jednoczesnego oznaczania Na i K w próbce surowicy rozcieńczanej tym samym czynnikiem oraz zapewnienie warunków ograniczających jonizację atomów obu oznaczanych pierwiastków, należałoby preferować postępowanie przygotowawcze właściwe IV grupie prób.

Piśmiennictwo

1. Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry. The Perkin-Elmer Corp., Norwalk 1964.
2. Dyla Z., Przesmycki J.: *Diagn. Lab.* 6, 147, 1970.
3. Enigk K., Feder H., Dey-Hazra A., Weingartner E.: *Zbl. vet. Med.* 19, 238, 1972.
4. Fernandez F. J., Kahn H. L.: *Clin. Chem. Newsl.* 3, 24, 1971.
5. Foster W. H., Hume D. N.: *Anal. Chem.* 31, 2033, 1959.
6. Hald P. M.: *Stand. Meth. Clin. Chem.* 2, 165, 1958.
7. Helbock H. J., Brown D. M.: *Clin. Chem.* 17, 108, 1971.
8. Hughes R. O., Wease D. F., Troxler R. G.: *Clin. Chem.* 22, 691, 1976.
9. Pinta M.: *Absorpcyjna spektrometria atomowa*. PWN, Warszawa 1977.
10. Przesmycki J., Choraży W.: *Diagn. Lab.* 6, 61, 1970.
11. Przesmycki J., Choraży W., Dyla Z.: *Diagn. Lab.* 7, 105, 1971.
12. Reinhold J. G., Pascoe E., Kfoury G. A.: *Anal. Biochem.* 25, 557, 1968.
13. Richterich R.: *Chemia kliniczna*. PZWL, Warszawa 1971.
14. Sanui H., Pace N.: *Anal. Biochem.* 25, 330, 1968.
15. Sanui H., Pace N.: *Appl. Spectr.* 20, 135, 1966.
16. Whiteside P. J.: *Pye Unicam Atomic Absorption Data Book*. Pye Unicam Ltd, Cambridge 1976.
17. Willis J. B.: *Spectrochim. Acta* 16, 551, 1960.

Adres autora: doc. dr habil. Janusz Wierciński, ul. Sowińskiego 3/31, 20-040 Lublin.

WILSON J. W., STEVENS J. B.: Badanie ciężaru płynu mózgowo-rdzeniowego. (Analysis of cerebro-spinal fluid specific gravity). *J. Amer. vet. med. Ass.* 172, 911—913, 1978 (8).

W próbkach płynu mózgowo-rdzeniowego pochodzącego od 71 psów określono ciężar właściwy, białko całkowite, aktywność fosfokinazy kreatyny, reakcję Pandy, ilość i rodzaj krwinek białych. Średni ciężar właściwy płynu mózgowo-rdzeniowego wynosił 1,005 (1,004—1,006). Zawartość białka, aktywność fosfatazy kreatyny, reakcja Pandy, liczba i rodzaj krwinek białych nie odbiegały od normy. Trzyletnie retrospektywne badania płynu mózgowo-rdzeniowego pochodzącego od 124 psów z zaburzeniami neurologicznymi wykazały, że u 24,22% psów ciężar właściwy płynu wynosił 1,006. Z tych względów zarówno diagnostyczna jak i prognostyczna wartość określania ciężaru właściwego płynu mózgowo-rdzeniowego jest niewielka.

G.

LING G. V., RUBY A. L.: Chloramfenikol stosowany doustnie w leczeniu zakażeń układu moczowego u psów. (Chloramphenicol for oral treatment of canine urinary tract infections). *J. Amer. vet. med. Ass.* 172, 914—916, 1978 (8).

Chloramfenikol stosowano doustnie przez okres 7—14 dni u 83 psów u których zdiagnozowano bakteryjne zapalenia układu moczowego. Dawkę dzienną wynoszącą 99 mg/kg wagi ciała stosowano w trzech podzie-

lonych dawkach w odstępach 8 godzinnych. Pozytywne wyniki (ujemny wynik badania bakteriologicznego moczu) uzyskano w 84% przypadków zakażeń wywołanych przez *Staphylococcus aureus*, w 51% zakażeń wywołanych przez *Escherichia coli*, 82% zakażeń paciorkowcowych i 63% zakażeń wywołanych przez *Proteus mirabilis*. Te cztery rodzaje drobnoustrojów wywoływały 88% zakażeń układu moczowego u psów.

G.

WEBBON P. M., PENNY R. H. C., GRAY J.: Zakaźne zanikowe zapalenie nosa: przydatność badań radiologicznych w rozpoznawaniu choroby u prosiąt. (Atrophic rhinitis: the value of radiography for diagnosis in piglets). *Br. vet. J.* 134, 193—197, 1978 (3).

Badaniom radiologicznym poddano kości części trzewnej głowy 160 prosiąt w wieku 8 tygodni pochodzących ze stad w których występuje zakaźne zanikowe zapalenie nosa. Wyniki badań radiologicznych porównano z wynikami badań sekcyjnych kości trzewiowczaszki. Rozpoznanie radiologiczne zakaźnego zanikowego zapalenia nosa oparto o powiększenie przestrzeni między małżowinami i brzegami przegrod oraz o brak cienia małżowin. Nie zaobserwowano istnienia korelacji między wynikami badań radiologicznych i badań sekcyjnych. W dużym odsetku przypadków uzyskiwano przy tym zarówno w badaniach radiologicznych jak i badaniach pośmiertnych wyniki fałszywie dodatnie.

G.