

## BROM CRESOL GREEN VE BİÜRET İLE ALBÜMİN TAYİN METOTLARININ MUKAYESESİ

Doç. Dr. İsmail Hakkı GÖKHUN\*  
Yrd. Doç. Dr. Gülbet ŞİRZAI\*\*

### Ö Z E T :

Bu çalışmada sağlıklı kişilerden alınan toplam 70 serum numunesinde Brom Gresol Green ve Biüret metotları ile yapılan albümin tayinlerinden elde edilen sonuçlar mukayese edilmiştir. Neticede her iki metotla bulunan değerlerin birbirine çok yakın ve ortalamalar arasındaki farkın önemsiz olduğu tesbit edilmiştir. Brom Cresol Green metodunun çeşitli üstünlüklerinden dolayı diğer metotlara tercih edilebileceği kanaatine varılmıştır.

### S U M M A R Y :

In this study albumin was detected in serum samples from 70 healthy persons, by Brom Cresol Green and Biuret methods and the results compared. It is revealed that the results obtained by each methods are quite similar and the difference between them is istatistically insignificant. It is concluted that Brom Cresol Green method could be prefered because of various advantağes.

### G İ R İ Ő

Bilindiđi gibi proteinler hayat ve sağlığın devamı için gerekli olan organik maddelerdir. Son derece gerekli olan bu maddelerin bazı hastalıklarda kandaki miktarları azalıp çoğaldığını da bilinmektedir. Proteinlerin önemli fraksiyonlarından biri albumindir.

İnsan albümini molekül ağırlığı 64694, yapısı tamamen aydınlatılmıő, nadir raslanan birkaç tipin dıőında, bütün türlerde homogen ve sabit bir bileőim gösterir.

( \*) A. Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Bilim Dalı Öğretim Üyesi.

(\*\*) Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Bilim Dalı Öğretim Üyesi.

Klinik kimyada kullanılan albümin tayin metotları albümin molekülünün çeşitli özelliklerine dayanmaktadır.

Albümin tayininde, Tuzlarla çöktürme, organik çözücülerle çöktürme, elektroforetik ayırma, immunolojik metotlar, fotometrik indikatör hata metotları, metil orang, 2 — (4'—Hydroxyphenylazo) — Benzoik asit ve Brom Cresol Green boyar metotları gibi değişik metotlar uygulamıştır. Bu metotların herbirinin iyi ve eksik yönlerinin mevcut olduğu muhakkaktır.

Yukardaki metotlar arasında indikatör hata metodunun kısa sürede yapılması, besit ve nisbeten spesifik oluşu gibi üstünlükleri vardır. Bu metotlar ile elde edilen değerler arasında oldukça önemli farklar bulunmaktadır. Aşağıdaki tabloda dört ayrı metotla elde edilen albümin değerlerinin ortalamaları ile standart sapmaları verilmiştir.

TABLO: I

| Metotlar       | X   | Sd.  |
|----------------|-----|------|
| Büret          | 5,2 | 0,44 |
| Elektroforez   | 4,1 | 0,47 |
| Ultrasantrifüj | 6,3 | 0,49 |
| HABA           | 5,1 | 0,65 |

HABA = 2 — (4' — Hydroxyphenylazo) — Benzoik asit.

Biz kendi imkânlarımız çerçevesinde halen en çok uygulanan Büret metod uile Brom Cresol Green metodu mukayese ederek üstün olanı tesbite çalıştık.

## MATERYAL VE METOTLAR

Çalışmamızda sağlıklı şahıslardan alınan serumları kullandık. Toplam 70 serumda büret metodu ile total protein ve albümin, gene aynı serumlarda Brom Cresol Green (BCG) ile albümin tayini yaptık.

Brom Cresol Green metodu ile albümin tayini :

Metodun Prensibi : Brom Cresol Green boyası selektif olarak yalnız albümine bağlıdır. Bu bağlanma neticesinde 628 nm de bir absorpsiyon yükselmesi olur. Ortama 4 Ml % 30 luk Brij —35 ila-

ve edilerek düşük kör seviyesi temini ile bulanıklık önlenir ve hassasiyet artırılır. Brij —35'in konsantrasyonunun % 30 dan az veya çok olması hassasiyeti azaltır ve lineerliğin bozulmasına yol açar. (3, 9, 11)

### Reaktiler :

1 — Süksinat tamponu (0,1 M, PH = 4.0) : 11.9 gr. süksinik asit 800 ml. distile suda çözülür, 2.5 N NaOH ile PH = 4.0'e ayarlanır ve distile su ile litreye tamamlanır. 4°C de saklanır.

2 — Brom Cresol Green stok çözeltisi (0,6 mM) : 419 mgr. BCG 10 ml. 0,1 N NaOH ile çözülür ve distile su ile litreye tamamlanır. 4°C de saklanır.

3 — Brom Cresol Green çalışma çözeltisi : 125 ml. stok BCG, 500 ml. 0,1 M süksinat tamponu, 4 ml. % 30 luk Brij —35 çözeltisi karıştırılır. PH = 4,  $2 \pm 0,05$  ayarlanır ve 4°C de saklanır.

4 — Standart albümin çözeltisi : Monitrol.

5 — % 30 luk Brij —35.

### Kalibrasyon Eğrisinin Çizimi :

| Tüp No.    | 1      | 2      | 3      | 4                     |
|------------|--------|--------|--------|-----------------------|
| Monitrol   | 0,1 ml | 0,2 ml | 0,3 ml | Seyreltilmiş Monitrol |
| Distile su | 0,3 ml | 0,2 ml | 0,1 ml |                       |

Yukardaki karışımlardan alınan 0,025 ml standartlar sıra ile 1, 2, 3 numaralı tüplere ve seyreltilmemiş monitrolden alınan 0,025 ml. ise 4 numaralı tüpe konur.

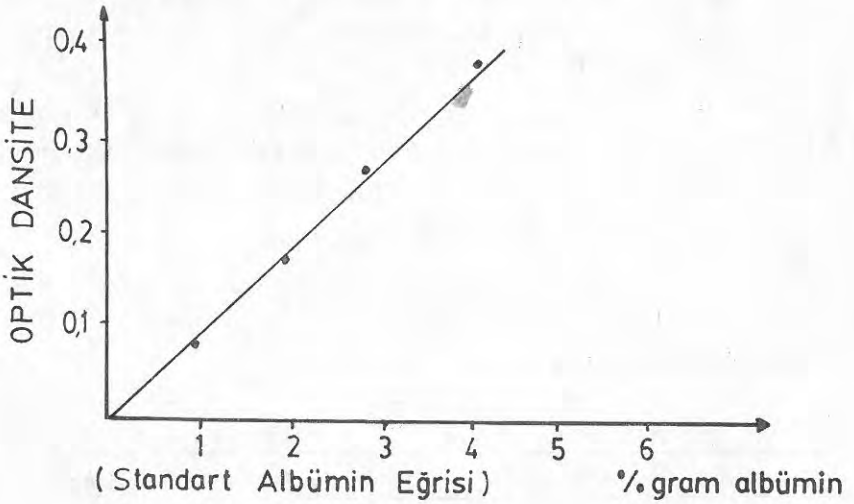
|                         |       |       |       |           |
|-------------------------|-------|-------|-------|-----------|
| Monitrol (Seyreltilmiş) | 0,025 | 0,025 | 0,025 | 0,025 ml. |
| Çalışma ECG çözeltisi   | 5,000 | 5,000 | 5,000 | 5,000 ml. |
| Alb. gr % 100 ml.       | 1,075 | 2,150 | 3,225 | 4,300     |

Deney körü : 0,025 ml. distile su + 5 ml. çalışma BCG çözeltisi. Tüpler karıştırılır. Oda sıcaklığında 10 dakika bekletilir ve 628 nm de köre karşı ölçülür.

**Albümin standartları için bulunan optik dansite değerleri :**

|                       |       |       |       |       |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|
| Tüp No :              | 1     | 2     | 3     | 4     |
| Albümin<br>gr/100 ml. | 1,075 | 2,150 | 3,225 | 4,300 |
| Optik dansite         | 0,085 | 0,180 | 0,299 | 0,392 |

Albümin konsantrasyonları X ekseninde ve optik dansiteleri Y ekseninde işaretlenerek aşağıdaki eğri çizilmiştir.



**DENEYİN YAPILIŞI :**

| Tüpler        | Kör   | Standart | Nümune    |
|---------------|-------|----------|-----------|
| Serum         | —     | —        | 0,025 ml. |
| Standart      | —     | 0,025    | —         |
| Distile su    | 0,025 | —        | —         |
| Çal. BCG Çöz. | 5,000 | 5,000    | 5,000 ml. |

Tüpler iyice karıştırılır, oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra 628 nm de köre karşı ölçülür.

Lipemik serumlarla yapılan deneylerde kör tüpüne 0,025 ml. serum ve 5 ml. süksinat tamponu konur. Kör, standart ve nümune distile suya karşı ölçülür. Standart ve nümunenin optik dansite-lerinden körün optik dansitesi çıkarılır.

Albüminin 4,3 gr/100 ml. lik standardı kullanılarak neticeler aşağıdaki formülden de hesaplanabilir.

$$\frac{\text{Nümunenin optik dansitesi}}{\text{Standartın optik dansitesi}} \times 4,3 = \text{gr/100 ml. albümin}$$

## B U L G U L A R

Biüret metodu ile yapılan tayinlerden albümin için bulunduğumuz değerler 4.090 - 4.750 gr/100 ml. arasında değişmekte olup, bunların ortalaması 4.318 dir. Aynı nümunelerden, Brom Cresol Green metodu ile elde edilen sonuçlar 4.010 - 4.775 gr/100 ml. sınırları içerisinde değiştirmektedir. Ve ortalama değer 4.411 dir. Bulgular tablo II de özetlenmiştir.

Burada her iki metotla bulunan albümin değerlerinin birbirine çok yakın olduğu görülmektedir. Sonuçların istatistik incelenmesinden elde edilen  $P < 0.01$  değerine göre ortalamalar arasındaki fark önemsizdir.

TABLO: II  
BİÜRET VE BCG METOTLARITLA TESBİT EDİLEN DEĞERLER

| Biüret           |            |                | BCG              |            |                | T - değeri | Serbest Derecesi |
|------------------|------------|----------------|------------------|------------|----------------|------------|------------------|
| Standart Sapma X | Ortalama X | Deney adedi NX | Standart Sapma Y | Ortalama Y | Deney adedi NY |            |                  |
| 0.375            | 4.695      | 10.000         | 0.162            | 4.775      | 10.000         | 0.618      | 18.000           |
| 0.212            | 4.650      | 10.000         | 0.416            | 4.640      | 10.000         | 0.048      | 18.000           |
| 0.365            | 4.090      | 10.000         | 0.187            | 4.230      | 10.000         | 0.079      | 18.000           |
| 0.636            | 4.260      | 10.000         | 0.500            | 4.319      | 10.000         | 0.216      | 18.000           |
| 0.415            | 4.095      | 10.000         | 0.358            | 4.445      | 10.000         | 0.021      | 18.000           |
| 0.440            | 4.240      | 10.000         | 0.649            | 4.070      | 10.000         | 0.423      | 18.000           |
| 0.045            | 4.530      | 10.000         | 0.071            | 4.900      | 10.000         | 0.510      | 18.000           |

## T A R T I Ő M A

Albümin tayininde ilk defa tuzlarla çökme özelliğinden yararlanmıştır. 2.05 ve 2.45 nihai molar konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Bu konsantrasyonlarda albümin çözmüş olarak çözeltide kalmakta, globulinler ise çökmektedir. Daha sonra Hovve, amonyum sülfat yerine sodyum sülfat kullanmıştır. Sodyum sülfatla çöktürmenin fraksiyonlarındaki azot miktarının tayinine' imkân sağlamak gibi bir üstünlüğü vardır. Burada kullanılan sodyum sülfatın nihai konsantrasyonları 1.5 ve 1.8 molardır.

Compbell ve Hanna'nın sodyum sülfatla yaptıkları ayırma işlemini Gingsley eter ilave etmek suretiyle değiştirmiştir. (9)

Ancak bu metot preparatif işlemler için uygun olup analitik çalışmalarda hassas neticeler vermez.

Organik çözücülerle çöktürme metodu soğukta hassas olmadığından kantitatif tayinler için uygun değildir.

Elektroforetik ayırma metotların mahzurlu tarafı ise çeşitli proteinlerin farklı boyamalarından ileri gelen hatalardır.

İmmunolijik metotlarla güvenilir neticeler elde etmek için tekniğin ve reaktiflerin hassas bir şekilde standardizasyonu gerekir. (1, 2, 4, 5, 7)

Sörensen 1909 da renk indikatörleri kullanarak kolorimetrik metotla PH ölçümünün yapılabileceğini göstermiştir. Ancak ortamda proteinlerin bulunmasının büyük hatalara yol açtığı tesbit edilmiştir.

Marshall ve Vichers 1923 te böbrek fizyolojisi ile ilgili çalışmalarında proteinlerin fenol kırmızısı ile bağlanmasını araştırmışlardır. (5, 8, 10, 12)

Klotz da araştırmalarında albüminin diğer kan proteinlerinden farklı özelliğini tesbit etmiştir. Albümin bazı boyar maddeleri bağlamak suretiyle onların spektral özelliklerini değiştirmektedir. Bu boya maddelerden şimdiye kadar en çok kullanılanlar metil orang, HABA ve Brom Cresol Green'dir. Bunlardan ilk kullanılan metil orang 550 nm de bir maksimum absorpsiyon vermektedir.

Metil orang albümine spesifik olmayıp, beta —lipoproteinlerle de reaksiyon verdiğiinden bu metodun kullanılması tavsiye edilmemektedir. (13)

HABA, albümin mevcudiyetinde 520 nm de bir maksimum absorpsiyon gösterir. Fakat bu metot da hassas değildir.

Bu durumda albümin tayini için en uygun ve elverişli metot sulfoftalein boyar maddeler grubundan Brom Cresol Green'in kullanıldığı metotdur.

Biüret metodu hassa bir metot olmakla beraber BCG metodu ile karşılaştırdığımızda aşağıdaki sonuçlara vardık.

1 — Biüret metodunda deneyin yapılışı sırasında kullanılan doymuş sodyum sülfat 25°C'lik bir sıcaklıkta olmalıdır. Bu derecenin altında bir ısıda tüp içinde bazan kristallanma olur.

2 — 2,3 ml. eter koyduktan sonra çalkalama işlemi önemlidir. Kuvvetli çalkalanmadığı takdirde globulin tabakası istenildiği gibi teşekkül etmez ve dolayısıyla bulanıklık meydana gelir.

3 — Çalkalanma sırasında gazla beraber bir miktar materyelin de kaybına sebep olur.

4 — Santrifüj edildikten sonra sallanıp veya fazla bekletilirse tekrar bulanıklık meydana gelir.

5 — Globulin tabakası trompla almak veya pipetle geçmek (yarmak) sırasında çok dikkat etmek lazımdır, aksi halde globulin tabakası parçalanır ve bulanıklık meydana gelir.

6 — Biüret metodu BCG metoduna nazaran daha çok zaman alır, BCG metodu ise kısadır.

Çalışmamızdan elde edilen neticelere dayanarak ufak tefek farklar vardır. Bu farklar kullandığımız tekniğin değişik olmasından ileri gelmektedir.

Sonuç olarak giriş kısmında da belirttiğimiz gibi albümin tayininde kullanılan biüret ve diğer metotlardan çeşitli üstünlükleri sebebiyle, Brom Cresol Green metodunun rutin analizlerde tercih edilebileceği kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

1. ATASAĞUNGİL, M. : Klinik laboratuvar ve araştırma metotları, 1962.
2. BENG, C. G., RASANAYAĞAM, L. J. : Solubility and absorption spectro of complexes resulting from interaction amon human albumin BCG and detergents. Clin. Chim. Acta, 52 (3), 257, 1974.
3. DOUMAS, B., etal : Albumin standard and the measurment of serum albumin with Brom Cresol Green. Clin. Chim. Acta, 31, 87, 1971.
4. EUGENE, W.R. : Improved Biuret procedure for routine determination of urinary total proteins in clinical proteinuria. Clin. chem., 21 (3), 398, 1975.
5. FERRERIA, P., PRICE, P.C. : A comparison of BCG and Immunoprecipitation method for the determination of serum albumin. Clin. Chim. Acta, 55 (2), 295, 1974.
6. HANS, B.M.D. : Diagnostic tests in infants and children, 1962.
7. İMREN, H. : Klinik tanıda laboratuvar, 1975.
8. PRONTİP, H.L., et al : Improved automated metohd for determination serum albumin With BCG. Clin. Chim. Acta, 20 (5), 617, 1974.
9. RODKEY, F.L. : Direct spectrofotometric determination of albumin in Human serum. Clin. Chem. 11, 478, 1965.
10. RICHTERİCH, R. : Klinische Chemine, S. Karger Verlag, Basel - 1971. serum globulin fraction. Clin. Chim. Acta, 53 (1), 109, 1974.
11. WEBSTER, D. et al : A study of the interaction of BCG with isolated serum globulin fraction. Clin. Chim. Acta, 53 (1), 109, 1974.
12. WEBSTER, D., ALTWOOD, E.L. : An assesment of the suitability of BCG for the determiration of serum albumin. Clin. Chim. Acta, 53 (1), 101, 1974.
13. WHITE, W.L. et al : Chemistry for the clinical laboratory, 1976.

## LABOR İLDAM

LABORATUAR MALZEMELERİ TİCARET LİMİTED ŞİRKETİ

KİMYEVİ MADDELER — KLİNİK TEŞHİS REAKTİFLERİ  
TIBBİ ve LABORATUAR CİHAZLARI SATIŞLARI ve  
GIDA ANALİZ AYGITLARI İMALATI

İMALÂTLARIMIZ : \* AR \* RENKLİ AR  
\* NB \* DUROBAX \* PYREX, CAMLARDANDIR.

Adres : Modern Çarşı No. 205 Tel : 12 60 40 Ulus - ANKARA  
Süngübayırı Sok. No. 10/D Tel : 19 39 63 Cebeci - ANKARA