

## MICROMETODĂ PENTRU DETERMINAREA LIPIDELOR TOTALE DIN SER

dr. M. Kerekes, Maria Ardeleanu

Pînă nu de mult, determinarea lipidelor serice a întîmpinat dificultăţi considerabile. Metodele exacte, ca de ex. cea gravimetrică, sînt foarte laborioase, necesită cantităţi însemnate de ser şi solvenţi organici, nu pot fi executate în serii mari. Tehnicile mai simple (turbidimetria, metoda Swahn) s-au dovedit a fi puţin reproductibile şi nu permit deci decît o orientare sumară.

În ultima vreme, determinarea constituenţilor lipidici din serul sanguin a dobîndit o importanţă deosebită, datorită perturbării metabolismului lipidic, intervenită în cursul cardiopatiei ischemice. Una din metodele de screening în această afecţiune o constituie tocmai determinarea lipidelor totale din ser. Tehnicile folosite azi aproape exclusiv pentru acest scop sînt cele care au la bază reacţia sulfofosvanilinică (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Reacţia este foarte sensibilă, simplă şi suficient de precisă. Totuşi, variantele uzuale prezintă unele inconveniente. Astfel, se impune pipetarea repetată a unor lichide vîscoase (acid sulfuric şi fosforic), iar durata de dezvoltare a culorii este relativ lungă (30—40 min). Deseori culoarea formată nu este suficient de stabilă.

Ne-am propus să eliminăm aceste neajunsuri şi, în acelaşi timp, să înlocuim acidul fosforic cu un reactiv mai uşor accesibil.

### *Descrierea metodei*

Metoda elaborată de noi are la bază tot reacţia sulfofosvanilinică, acidul fosforic însă este înlocuit cu o soluţie de fosfat monopotasic în acid sulfuric. Acest reactiv formează o culoare roz-violetă cu substanţele lipidice din serul încălzit în prealabil cu acid sulfuric.

### *Reactivi*

1. Acid sulfuric concentrat ch.p. ( $d = 1,83-1,84$ ).
2. Reactiv de culoare: 5 g fosfat monopotasic ( $KH_2PO_4$ ) se dizolvă în 90 ml acid sulfuric concentrat. După dizolvarea completă, acidul se toarnă cu grijă în 70 ml apă distilată, agitînd vasul şi răcindu-l cu apă. După răcire, în soluţie se dizolvă 240 mg vanilină. Reactivul, de culoare galbenă, se păstrează în sticlă perfect curată, bine închisă, la frigider. Se conservă timp de o lună. În caz că reactivul are o nuanţă roz, nu se va mai folosi.

Se recomandă scoaterea cantităţii necesare pentru determinări într-un cilindru gradat sau eprubetă, evitînd astfel introducerea cu pipeta în reactiv a unor eventuale impurităţi lipidice.

3. Standard: 75 mg colesterol se dizolvă prin încălzire uşoară în aprox. 70 ml acid acetic glacial, iar după răcire la temperatura camerei, se completează la 100 ml cu acid acetic glacial. Această cantitate de colesterol, produce o culoare identică cu cea produsă de lipidele serice în concentraţia de 1000 mg‰.

## Tehnica

Înainte de determinare, serul se diluează: la 0,9 ml ser fiziologic se adaugă cu o micropipetă 0,1 ml ser. Se lucrează cu trei eprubete, proba, standardul și proba în alb, după schema:

	Proba	Standardul	Proba în alb
Ser diluat (1:10) ml	0,1	—	—
Standard ml	—	0,1	—
Apă distilată ml	—	—	0,1
Acid sulfuric conc. ml	1,0	1,0	1,0
Se agită și se ține 10 min. la 100° (apă în fierbere)			
Reactiv de culoare ml	4,0	4,0	4,0
Se agită puternic și se ține 5 min. la 100°			

Eprubetele se introduc în apă de robinet (într-un pahar sau alt vas) și, după răcire, se fotometrează în cuvă de 1 cm la 525 nm, față de proba în alb. Dacă se folosesc alte fotometre (IOR, Pulfrich, fotocolorimetre electrice), se întrebuițează filtrul corespunzător (S 53 etc.).

## Calcul

$$\text{Lipide totale mg}\% = \frac{\text{extincția probei}}{\text{extincția standardului}} \times 1000.$$

Întrebuițind un spectrofotometru, se poate renunța la executarea standardului, calculînd rezultatul prin înmulțirea extincției cu un factor:

$$\text{Lipide totale mg}\% = \text{extincția probei} \times 1400.$$

## Observații

Se va avea grijă ca în timpul încălzirii să nu cadă stropi de apă în eprubetă (se va aplica eventual un dop de vată).

În cazul unor concentrații care depășesc 1500 mg%, determinarea se repetă cu 0,05 ml ser diluat, iar rezultatul obținut se înmulțește cu 2.

Valori normale: 550—750 mg%.

## Rezultate și discuții

Cu metoda descrisă, am efectuat peste o mie de determinări. Valorile normale au fost stabilite la 206 donatori de sînge, practic sănătoși, obținînd o medie de  $626 \pm 21,3$  mg%, 90 % a valorilor au fost cuprinse între 550—750 mg%. Ele coincid de altfel cu limitele acceptate în general ca normale (8). Reproducibilitatea metodei este foarte bună: executînd 10 probe paralele cu același ser, am obținut rezultate practic identice ( $683 \pm 4,1$ ).

Precizia metodei a fost controlată, comparînd-o cu metoda Fast-abend-Handloser (3) și o metodă gravimetrică (9), găsindu-se o bună concordanță cu ambele. Efectuînd determinarea lipidelor totale din seruri standardizate (Precilip-Boehringer), am obținut valorile indicate cu o diferență de sub 1%!

Trebuie evidențiată stabilitatea deosebită a culorii. Ea atinge intensitatea maximă după cele 5 min. încălzire la 100° și rămîne practic con-

stantă timp de mai multe ore, ceea ce asigură executarea comodă și precisă a determinărilor în serie.

Reacția se desfășoară într-o singură eprubetă, transferul lichidelor viscoase fiind eliminat. Un alt avantaj îl constituie folosirea pentru etalonare a colesterolului, ușor accesibil. Prin dezvoltarea culorii la cald, durata determinării se scurtează în mod considerabil față de tehnicile uzuale (20 min. față de 45 min.), realizându-se astfel o economie importantă de timp. În sfârșit, nu este lipsit de importanță nici faptul că, prin folosirea fosfatului monopotasice se elimină acidul fosforic mai costisitor.

### Concluzii

1. Metoda propusă, în comparație cu cele folosite în mod curent, se distinge prin simplitatea și rapiditatea execuției, precum și prin folosirea unor reactivi ușor accesibili.

2. Metoda poate fi executată în serii și se pretează în mod deosebit pentru efectuarea de screening, în vederea determinării hiperlipemiilor.\*

Sosit la redacție: 1 noiembrie 1976.

### Bibliografie

1. Chabrol E., Charonnat R.: Presse médicale (1937), 45, 1713; 2. Zöllner N., Kirsch K.: Zschr. Ges. Exp. Med. (1962), 135, 545; 3. Fastabend W., Handloser M.: Aerzt. Lab. (1967), 13, 428; 4. Zöllner W., Handloser M.: Aerzt. Lab. (1967), 13, 431; 5. Postma T., Stores J.A.P.: Clin. Chim. Acta (1968), 22, 596; 6. Frings C., Dunn R. T. Clin. Chem. (1969), 15, 769; 7. Woodman D. D., Price C. P.: Clin. Chim. Acta (1972), 38, 39; 8. Manta I., Cucuianu M., Bengă G., Hodărnău A.: Metode biochimice în laboratorul clinic. Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 1976, p. 199; 9. Jacobs S. L., Henry R. J.: Clin. Chim. Acta (1962), 7, 270.

Clinica de ftiziologie (cond.: prof. dr. Z. Barbu doctor-docent) din Tîrgu-Mureș

## CERCETĂRI PRIVIND FLORA SECREȚIEI BRONȘICE LA MUNCITORII SĂNĂTOȘI ȘI BOLNAVI DIN MEDIU BISINOGEN

dr. Eugenia Barbu, dr. A. Szöllösi, V. Lakatos

Cunoscînd faptul că pulberea de carde rezultată de pe urma tehnologiei fibrelor de in conține numeroși germeni, proveniți în parte încă din lichidul de topitorie, precum și faptul că unii autori consideră aceste microorganisme ca agenți cauzali ai bisinozei, am supus unei investigații, sub aspectul prezenței de germeni, aspiratul bronșic recoltat de la muncitorii sănătoși și bolnavi expuși prafului bisinogen.

\* Țin să mulțumesc tovarășilor dr. doc. S. M. Idu și biolog principal Nicoleta Mihai de la Spitalul Colțea din București, care au avut amabilitatea să verifice metoda, precum și asistentelor Barbara Csiky și Elza Tatár, pentru contribuția lor prețioasă la elaborarea metodei.