

## BİLİRÜBİN MİKTAR TAYİNİNDE STANDART PROBLEMİ

Dr. Kemal Özkan<sup>(x)</sup>

### ÖZET

*Bilirubin miktar tayininde standart madde olarak saf bilirubin elde edilmesinin güçlüğü gözönüne alınarak, onun yerine geçmek üzere ileri sürülen kimyasal maddelerden birisi olan kobalt sülfat incelendi. Belirli bilirubin konsantrasyonuna karşılık olabilen kobalt sülfat konsantrasyonu spektrofotometrik metotla hesaplandı. Elde edilen renk şiddeti (optik dansite) eşdeğerliği sonucuna göre standart eğri grafiği hazırlanması amacıyla bir çalışma şeması düzenlendi.*

### SUMMARY

*Standard problem in the bilirubin estimation.*

*Since the preparation of the bilirubin standard presents a number of problems, we used a solution of cobaltous sulphate solution according Van den Bergh for the bilirubin estimation in serum. We calculated the optical density equivalence of known bilirubin and cobaltous sulphate concentrations. From this equivalence value we carried out a working scheme to prepare standard curve.*

· Bilindiği üzere eritrositlerin retikülo endotelial sistemde parçalanmasıyla açığa çıkan hemoglobin, hücre içinde koleglobin ve verdohemoglobin gibi ara maddelerinden sonra bilirübine kadar değişim sürecine uğrar. Bilirubin, serbest durumda iken suda çözülmeyen toksik bir maddedir. Safra ve böbrek yoluyla atılamaz. Üstelik serum albüminiyle birleşir.

---

(x) Bursa Tıp Fakültesi Biyokimya Kürsü Başkanı

Karaciğer parenkim hücresi içinde glükuronik asitle birleştirilerek bilirübin glükuronat (bağlı bilirübin = direkt bilirübin) şeklinde suda çözünebilir ve dolayısıyla safra, ya da böbrek yoluyla dışarı atılabilir duruma getirilir. Bilirübin, glükuronatlaşmakla toksik özelliğini de kaybeder. O halde karaciğerin bu glükuronatlaştırma fonksiyonunu aşan miktarlarda vücutta serbest bilirübin (= indirekt bilirübin) meydana getiren bir mekanizma (örneğin hemolitik hastalıklar) varsa, kanda serbest bilirübin miktarı artacak ve lipitlerin bol olduğu dokularda (örneğin merkez sinir sisteminde, deri altı dokusunda) suda değil, yağlı ortamda eriyebilen ve sarı renkli bir madde olan bilirübin birikmesi olayı (sarılık) görülecektir. Karaciğer ve safra yollarındaki patolojik durumlarda ise vücutta bilirübin oluşumu normal miktarlarda olsa bile, onun doğal atılım yolunun arızası nedeniyle, gene kanda bilirübin birikimi görülecektir. Ancak bu durumda, parenkima hücre bozukluğunda daha hafif, tıkanmalarda daha belirgin olmak üzere bağlı (direkt) bilirübin şeklinde artma olacaktır.

Uygulama alanında (sarılıklarda ameliyat endikasyonu, neonatal sarılıklarda kan değişimi endikasyonu koymada) kan serumu bilirübin seviyesi, çok faydalı ve ölçülmesi gerekli bir parametre olarak karşımıza çıkmaktadır.

Bilirübin miktar tayin metotları, ya serumdaki bilirübinin sarı renk şiddetinin doğrudan doğruya spektrofotometrik ölçülmesine, ya da önce özel kimyasal reaksiyonla bilirübinin pembe renkli azobilirübüne çevrilmesine ve ondan sonra renk şiddetinin ölçülmesine dayanmaktadır.

Bağlı bilirubin sulu ortamda çözündüğünden, kolayca diazolandırılarak azobilirubine çevrilir. Halbuki serbest bilirubin bu reaksiyonu verebilmesi için ya alkol (etil veya metil alkol) gibi çözücüye ya da kafein gibi reaksiyon hızlandırıcısına gereksinme vardır. Bu nedenle serbest bilirubine eski bir deyişle indirekt bilirubin adı verilegelmiştir.

Öteki miktar tayinlerinde olduğu gibi bilirubin miktar tayininde de önce saf maddeden yapılmış standart çözeltiliye gereksinme vardır. İşte bu noktada laboratuarda çalışanlar için güç problemler ortaya çıkmaktadır. Çünkü, saf bilirubin elde etme zordur. Piyasadaki bilirubin preparatlarında saflık derecesi (purity) % 70 e kadar düşmektedir<sup>(1)</sup> Ne kadar hassas tartılırsa tartılsın saf olmıyan bir standartla çalışmak yanlış sonuçlara götürür. Saf ve sabit bir standartla çalışmak gereği vardır.

Bu çalışmamızda başka yazarlar<sup>(2,3,4)</sup> tarafından da öğütlenen kobalt sülfat çözeltisinin bilirubin standardı yerine kullanılması ve bundan standart eğri grafiği (kalibrasyon) çizme olanakları araştırılacaktır.

#### MATERYEL VE METOD

Saf bilirubin (bilirubin, for biochemistry, Merck, Art 1840 Lab.) kloroformda (Chloroform proanalysis, Merck) ve kobalt sülfat ( $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .Merck) ise sulu çözelti halinde kullanıldı. Ölçmeler Beckman DU-2 spektrofotometresiy-le yapıldı. Kullanılan çözeltiler aşağıda gösterilmiştir.

a) 0.007 mM. bilirubin çözeltisi hazırlanması: Işıktan korunarak yapılan tartıyla alınan 40.88 mg. bilirubinle 100 ml. lik kloroformda ana çözelti hazırlandı. Bundan 1 ml.

alınarak kloroformla 100 ml. ye tamamlandı ve böylece çalışma çözeltisi % 0.4088 mg. (0.007 mM veya  $7 \times 10^{-6}$  M) elde edildi. Zaman geçirmeden ve yine direkt güneş ışığından sakınılarak spektrofotometrik ölçüm yapıldı (Ölçüm değerleri Tablo: 1 de gösterilmiştir).

Tablo: 1

	Dalga Boyları (nm)		
	453	450	436
Optik dansite	0.414	0.412	0.375
Molar absorpsiyon	59,143	58,286	53,571

(Not: Değerler ikiye ölçümün ortalamasıdır.)

b) % 2.75 mg. bilirubin çözeltisi: Kloroformda %27.5 mg. olarak hazırlanan ana çözeltiden 10 kere kloroformla seyreltilerek hazırlandı.

c) Kobalt sülfat çözeltisi: % 1 gr. sulu çözelti.

Elimizdeki bilirubin preparatının saflık derecesi (purity) molekül ağırlığı (Ma) = 584, konsantrasyon (c)=%0.4088 mg. ve molar absorpsiyon (E) = 60.700 alınarak hesaplandı. yüzde yüz saflık derecesindeki bilirubin kloroform çözeltisinin 453 nm. de molar absorpsiyon (molar optik dansitesi) 60 700 olduğuna göre bizim hazırladığımız  $7 \times 10^{-6}$  M çözeltisinin olması gereken optik dansitesi ( $A_g$ ),

$$A_g = 60\,700 \times 7 \times 10^{-6} = 0.4249 \text{ dur.}$$

Halbuki Tablo: 1 de görüldüğü üzere bulduğumuz değer ( $A_b$ ) 0.4140 dır. O halde,

$$\text{Saflık yüzdesi} = \frac{0,4140}{0,4249} \times 100 = 97 \text{ dir.}$$

Başka deyişle elimizdeki bilirübin preparatının saflık derecesi % 97 bulunmuştur.

Bilirübin (daha doğrusu azobilirübin haline çevrilmiş bilirübin) ile kobalt sülfatın renk şiddeti (optik dansite) eşdeğerliğinin araştırılması aşağıda anlatılan yöntemle yapıldı:

Laboratuarlarımızda uygulamakta olduğumuz bilirübin miktar belirtimi Malloy ve Evelyn<sup>(3,5)</sup> metotlarının modifiye şekliyle yapılmaktadır. Orijinal metotta nihai serum seyreltmesi 1/25 olduğu halde bizim kullandığımız modifiye şekil 1/27.5 tur.

(0,2 ml. serum + 1, 8 ml. su + 3 ml. metanol + 0.5 ml. diazo ayırıcı = toplam hacim = 5.5 ml.)

Bundan anlaşılacağı üzere metodumuza göre 27.5 keke seyreltilen % 2.75 mg. lık bilirübin çözeltisi nihai konsantrasyon olarak (spektrofotometre kuveti içinde) % 100 µg. lık konsantrasyona düşmektedir.

% 1 gr. kobalt sülfat çözeltisi ve serum gibi işlem gören (azobilirübine çevrilen) % 2.75 mg. bilirübin çözeltisi için bulunan değerler ikişer ölçümün ortalaması olarak aşağıda gösterilmişlerdir.

% 1000 mg. Kobalt Sülfat: % 100 µg. Bilirübin:

Optik dansite  
(540 nm de)

0,137

0,131

Bu değerlere göre, önce % 100 µg. bilirübine optik dansite bakımından eşdeğer kobalt konsantrasyonu bulundu:

$$\frac{1000}{0,137} \times 0,131 = 956 \text{ mg.}$$

Bundan sonra, serumda % 1000 µg. ve nihai konsantrasyonda ise yüzde,  $\frac{1000}{27,5} = 36,4 \text{ µg.}$  olan bilirübünün verdiği renge eşdeğer optik dansite veren kobalt konsantrasyonu hesaplandı:

$$\frac{956}{100} \times 36,4 = 348 \text{ mg.}$$

0 halde % 348 mg. konsantrasyonunda hazırlanacak olan bir kobalt sülfat çözeltisinin vereceği absorpsiyon metodumuzla hazırlanan bir serumda % 1000 µg. (% 1 mg.) bilirübine eşit olacaktır.

Bu temel veriden hareket edilerek standart eğri grafiği, Tablo: 2 deki çalışma şemasına göre çizilmiştir.

Tablo: 2

	Kör	1	2	3	4	5	6
CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O % 3,48 gr.	0	0,5	1	1,5	2	4	8 ml.
Distile su	10	9,5	9	8,5	8	6	2 ml.
Tüplerde kobalt sülfat karışımı (% mg)	0	174	348	522	696	1392	2784 mg.
Serumda bilirübin olarak eşdeğeri (% mg.)	0	0,5	1	1,5	2	4	8 mg.

## TARTIŞMA VE SONUÇ

Bilirubin preparatında saflık derecesinin kontrolü için kesin kriterler yoktur. Kloroform içinde saf bilirubin çözeltisi için molar absorpsiyon (molar absorptivity = molar extinction = litrede bir molekül gram bilirubin ihtiva eden çözeltinin 10 mm tabaka kalınlığında optik dansitesi) değerleri 53000 - 63000 arasında gösterilmektedir. 60700 ortalama bir değer olarak kabul edilmektedir<sup>(6)</sup>. Bilirubin molekül ağırlığı 584 e göre bu değeri 60100 olarak bildirenlere rastlanmaktadır<sup>(7)</sup>. Farklı değerler farklı preparatların kloroformda çözünme derecelerinin farklı oluşuyla ve bu çözeltilerin son derece dayanıksız (labile) oluşuyla açıklanabilir<sup>(8)</sup>

Ayrıca bilirubinün 4° C de desikatör içinde ve güneş ışınlarından iyice korunarak saklanması gerekir. Aksi halde kolayca parçalandığı gibi desikatörde (kurutucuda) tutulmazsa % 3 kadar nem alabilir. Tartı ve çözelti işlemlerinin kısa sürede yapılması ve ölçümde zaman geçirmeden hemen kullanılması gerekir<sup>(9)</sup>.

Bütün bu zorluklar yenilse bile bilirubinün verdiği renk reaksiyonu (veya kendisinin sarı rengi) ortamdaki protein konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterir. Ayrıca protein cinsi de önemlidir. At serum proteini diazo reaksiyonunu inhibe eder. İnsan ya da sığır serumu ise taze olmak şartıyla kullanılır<sup>(10)</sup>.

Anlaşılacağı üzere bilirubin standartlarından yararlanarak pratik olarak laboratuvarında bilirubin tayini yapmak son derece güç ve sonuçları şüphe götürür bir metottur.

İşte bu sakıncalar gözönüne alınarak, bilirubin yerine standart olarak onun azobilirubin bileşiğinin pembe rengine eşdeğer başka maddeler üzerinde durulmuştur. Bu amaçla en çok kullanılan kobalt sülfat sulu çözeltisidir. Kobalt sülfat çözeltisinin renk özelliği diazolanmış bilirubinün pembe rengine çok yakındır.

Kobalt sülfattan başka ferritiosiyanatın eter çözeltisi ya da metil kırmızısının pH 4,6 - 4,7 arasındaki rengi de standart olarak kullanılmışlardır<sup>(3)</sup>.

Birçok araştırmacının çeşitli ticari kaynaklardan elde edilen bilirubin preparatlarının saflık derecelerinin çok farklı oluşu konusundaki genel kanısı<sup>(1,3,9)</sup> bizim bulgularımızı da kapsayan Tablo: 3 te teyit edilmektedir.

Tablo: 3

	453 nm de (% 0.4088 mg.)			Saflık Yüzdesi	Literatür
	A <sub>b</sub>	A <sub>g</sub>	Molar absorpsiyon		
Fluka	0.572	0.515	60,800	101	(9) <sup>x</sup>
Eastman Kodak	0.379	0.515	54,300	91	(9) <sup>x</sup>
Merck	0.425	0.414	59,143	97	(bizimki)

(A<sub>b</sub> = bulunan optik dansite, A<sub>g</sub> = olması gereken optik dansite, (x) = % 1 mg. konsantrasyon % 0,4088 mg. a çevrilerek yazılmıştır.)

Bu koşullara göre başka bir standart kullanmak, başka bir standardizasyona gitmek zorunludur.

Yukarıda materyal ve metot bölümünde gösterilen yol izlenerek % 348 mg. lık kobalt sülfat çözeltisinin renk şiddetinin, başka deyişle optik dansitesinin % 1 mg. lık bilirübine, daha doğrusu onun azolaşmış renk şiddetine eşdeğer olduğu bulunmuştur. Bu değerlerimizi Hijmans Vanden

Berg'e atfedilen iki literatür kaynağından<sup>(2,4)</sup> aldığımız aşağıdaki değerlerle karşılaştırdığımız birincisine çok yakın, ikincisinden çok farklı olduğunu görmekteyiz ;

Bu kaynaklardan birincisinde<sup>(2)</sup> on kere sulandırılmış % 2,16 gr. anhidr kobalt sülfat çözeltisi renk şiddetinin % 0,4 mg. lık bilirubin çözeltisinin diazolandıktan sonra nihai olarak on kere seyreltilmesi halinde verdiği renk şiddetine eşdeğer olduğu kaydedilmiştir. Biz buna dayanarak 10 yerine 27,5 kere seyreltmenin 0,4 yerine 1,1 mg. bilirubin olacağı sonucuna varırız. (% 2,16 gr. anhidr kobalt sülfat = % 3,92 gr.  $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) Bizim bulgumuza göre % 3,48 gr. lık kobalt sülfat 10 kere sulandığında (Tablo: 2 de 2 nolu tüp) serum 27,5 kere sulanmak şartıyla % 1 mg. bilirubine eşdeğerdir.

İkinci kaynaktan ise<sup>(4)</sup> anhidr kobalt sülfatın % 2,161 gr. lık standart çözeltisinin % 0,5 mg. bilirubine eşdeğer olduğu ileri sürülmüştür. Ancak bunda, bilirubin nihai konsantrasyonu, kendi deney şartlarına göre incelendiğinde (1 ml. serum + 0,5 ml. diazo ayırıcı + 2,5 ml. etilalkol + 1 ml. doymuş amonyum sülfat) alkol tabakasında yaklaşık olarak 3,5 kere seyreltilmiş olduğu görülmektedir. Buna dayanarak 27,5 kere sulanma (bizim deney şartlarımız) halinde bahis konusu kobalt çözeltisinin  $0,5 \times \frac{27,5}{3,5} = 3,93$  mg. gibi çok farklı bir bilirubin konsantrasyonuna eşdeğer olduğu sonucunu çıkarmaktayız.

Standart eğri grafiğimizi elde etmek için gösterilen çalışma şeması (Tablo: 2) de görüldüğü üzere deneysel veriden hareket edilerek hazırlanmıştır. 1 ml. % 3,48 gr. lık kobalt çözeltisine 9 ml. su katılarak (on kere seyrelti-

lerek) % 348 mg. lık çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltinin renk şiddeti % 1 mg. lık bilirubinün deney şartlarımıza göre diazolanmış şekline eşdeğerdir (Tablo: 2, 2 nolu tüp). Bunun katları (0,5; 1,5 ; 2 ; 4 ve 8 katları) alınarak çalışma şeması düzenlenmiştir.

#### KAYNAKLAR

1. Schellong,G.: *A technic for standardisation of methods in serum bilirubin determination*, *Klin.Wschr.* 38: 703, 1960
2. Fleury,P.: *Fiches technique de Chimie Biologique (Sang 9 ter)*. Les Editions Vega, Paris, 1955
3. Varley,H.: *Practical Clinical Biochemistry ed. 3 p: 282* William Heinemann Ltd. London 1964
4. Frankel,S., Reitman,S.: *Gradwohl's Clinical Laboratory methods and diagnosis seventh ed. p: 95* The Mosby C.V. Company, St. Louis, 1970
5. Malloy,H.T., Evelyn,K.A.: *The determination of bilirubin with the photoelectric colorimeter J. Biol. Chem.* 119,481, 1937
6. Billing,B.: *Ann. Clin. Biochem.* 8: 21, 1971
7. Henry,R.J.: *Studies on the determination of bile pigment Clin. Chem,* 6: 529; 1960
8. Michaelson,M.: *Bilirubin determination in serum and urine Scad.J.Clin.Lab.Invest.Suppl.* 56, 1961
9. Richterich,R.: *Clinical Chemistry Theory and Practice,* p: 412 S. Karger, Basel, New-York, 1969
10. Wootton,İ.D.P.: *Microanalysis in medical Biochemistry ed.* 5,p: 92 Churchill Livingstone, London, 1974