



BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM

Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék

2002.

PhD ÉRTEKEZÉS

A tehéntej ketonanyag- és citromsav-tartalmának diagnosztikai célú vizsgálata

Készítette: **Baticz Orsolya**
okleveles biomérnök

Témavezető: **Dr. Tömösközi Sándor**
egyetemi docens

TARTALOM

1. BEVEZETÉS, A VIZSGÁLATOK CÉLJA.....	6
<i>A dolgozatban szereplő fontosabb fogalmak, rövidítések értelmezése.....</i>	<i>8</i>
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	9
2.1. A KETONANYAGOK ÉS A CITROMSAV SZEREPE AZ ANYAGCSERE-FOLYAMATOKBAN	9
2.1.1. <i>A ketonanyagok anyagcseréjének alapfolyamatai.....</i>	<i>9</i>
2.1.1.1. A ketonanyagok szintézisének és felhasználásának biokémiai alapfolyamatai	9
2.1.1.2. A ketogenezis	12
2.1.1.2.1. A ketogenezis kialakulásának feltételei.....	12
2.1.1.2.2. A ketonanyagok szerepe.....	15
2.1.1.3. A ketózis	16
2.1.1.3.1. Az I. típusú ketózis	17
2.1.1.3.2. A II. típusú ketózis.....	18
2.1.1.4. Éhezéses hyperketonaemia	21
2.1.1.5. A ketózis klinikai jelei, tünetei	21
2.1.2. <i>A citromsav anyagcseréjének alapfolyamatai</i>	<i>25</i>
2.2. A KETONANYAGOK ÉS A CITROMSAV VIZSGÁLATÁRA ALKALMAS ANALITIKAI MÓDSZEREK ÁTTEKINTÉSE.....	28
2.2.1. <i>A ketonanyagok analitikai vizsgálata</i>	<i>28</i>
2.2.1.1. A vizsgálati módszerek csoportosítása	28
2.2.1.2. Félkvantitatív eljárások (gyorsteszték).....	29
2.2.1.3. Kvantitatív eljárások.....	32
2.2.1.3.1. Spektrofotometriás eljárások	32
2.2.1.3.2. Kromatográfiás módszerek.....	35
2.2.1.3.2.1. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia	36
2.2.1.3.2.2. Gázkromatográfia	37
2.2.1.4. Automatizált analitikai rendszerek	41
2.2.1.4.1. A FIA analitika elve	43
2.2.1.4.2. A FIA-rendszerek felépítése.....	45
2.2.1.4.3. Ketonanyag-tartalom meghatározása FIA-módszerrel.....	46
2.2.2. <i>A citromsav analitikai vizsgálata</i>	<i>48</i>
2.2.2.1. Spektrofotometriás eljárások	48

2.2.2.2. Kromatográfiás módszerek.....	49
2.3. A KÍSÉRLETTERVEZÉS ALKALMAZÁSA ANALITIKAI MÉRŐRENDSZER OPTIMÁLÁSÁRA	51
2.4. AZ ANALITIKAI MÓDSZEREK ÉRVÉNYESÍTÉSE.....	53
3. KÍSÉRLETI RÉSZ.....	55
3.1. VIZSGÁLATI MINTÁK	55
3.2. ALKALMAZOTT ANYAGOK, MÓDSZEREK ÉS MÓDSZERFEJLESZTÉSEK.....	56
3.2.1. <i>Acetontartalom meghatározása</i>	56
3.2.1.1. Az acetontartalom gázkromatográfiás meghatározása	56
3.2.1.1.1. Anyagok, eszközök.....	57
3.2.1.1.2. A minták folyadékfázisából történő mintavételt alkalmazó gázkromatográfiás analitikai eljárás (GC-eljárás) fejlesztése	57
3.2.1.1.2.1. Mintaelőkészítés fejlesztése a GC-eljáráshoz.....	58
3.2.1.1.2.2. Az analitikai meghatározás fejlesztése a GC-eljáráshoz	59
3.2.1.1.2.3. Az új GC-eljárás leírása.....	61
3.2.1.1.2.4. Az új GC-eljárás teljesítményjellemzőinek meghatározása	62
3.2.1.1.3. A minták gőzteréből történő mintavételt alkalmazó gázkromatográfiás analitikai eljárás (HS-GC-eljárás) fejlesztése.....	63
3.2.1.1.3.1. Mintaelőkészítés fejlesztése a HS-GC-eljáráshoz	63
3.2.1.1.3.2. Az analitikai meghatározás fejlesztése a HS-GC eljáráshoz.....	63
3.2.1.1.3.3. Az új HS-GC-módszer leírása	65
3.2.1.1.3.4. Az új HS-GC-eljárás teljesítményjellemzőinek meghatározása.....	65
3.2.1.1.4. A GC- és a HS-GC-eljárás összehasonlítása	67
3.2.1.2. Acetontartalom meghatározása áramló injektálásos (FIA) analitikai eljárással	68
3.2.1.2.1. Anyagok, eszközök.....	68
3.2.1.2.2. A kiindulási FIA-módszer leírása.....	68
3.2.1.2.3. A FIA-módszer optimálása kísérlettervezés alkalmazásával	70
3.2.1.2.3.1. A célfüggvény meghatározása (1. lépés).....	70
3.2.1.2.3.2. Lehetséges befolyásoló faktorok meghatározása (2. lépés).....	70
3.2.1.2.3.3. A várhatóan ténylegesen ható, kézmentartható faktorok kiválasztása (3. lépés)	71
3.2.1.2.3.4. A faktorok beállítási szintjeinek meghatározása (4. lépés)	73
3.2.1.2.3.5. Döntés: egyterves vagy kétterves optimalás? (5. lépés).....	74

3.2.1.2.3.6. A faktorok számának csökkentése (6. lépés).....	75
3.2.1.2.3.7. A teljes faktoros terv végrehajtása, az optimum meghatározása (7. lépés).....	77
3.2.1.2.4. Az acetontartalom meghatározására alkalmas optimált FIA-módszer leírása.....	79
3.2.1.2.5. Az acetontartalom meghatározására alkalmas FIA-módszer érvényesítése.....	80
3.2.1.2.5.1. Mérési tartomány.....	80
3.2.1.2.5.2. Linearitás és érzékenység.....	81
3.2.1.2.5.3. Szelektivitás és specifitás.....	85
3.2.1.2.5.4. Ismételhetség, reprodukálhatóság.....	85
3.2.1.2.5.5. Kimutatási határ.....	87
3.2.1.2.5.6. Meghatározási határ.....	88
3.2.1.2.6. FIA- és a HS-GC-eljárás összehasonlítása.....	88
3.2.2. <i>Összketonanyag-tartalom gázkromatográfiás meghatározása</i>	90
3.2.2.1. Anyagok, eszközök.....	90
3.2.2.2. Mintaelőkészítés fejlesztése összketonanyag-tartalom HS-GC meghatározásához.....	90
3.2.2.3. Az új HS-GC összketonanyag-tartalom meghatározási módszer leírása.....	94
3.2.3. <i>A citromsav-tartalom fluorimetriás meghatározása</i>	94
3.2.3.1. Anyagok, eszközök.....	95
3.2.3.2. Mintaelőkészítés fejlesztése citromsav-tartalom fluorimetriás meghatározásához.....	95
3.2.3.3. Az adaptált citromsav-tartalom meghatározási módszer leírása.....	96
3.2.4. <i>Statisztikai értékelés</i>	97
4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS.....	98
4.1. A KIDOLGOZOTT MÉRÉSI ELJÁRÁSOK GYAKORLATI ALKALMAZÁSA ÉS EREDMÉNYEI NYERS TEHÉNTÉJ MINTÁKBAN.....	98
4.1.1. <i>A nyerstejek ketonanyag-tartalma</i>	98
4.1.1.1. A nyerstejek ketonanyag-tartalmának alakulása az elléstől számított idő függvényében.....	100
4.1.2. <i>A citromsav-tartalom alakulása nyerstejben</i>	103
5. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEGZÉSE.....	106

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	109
IRODALOM.....	110
FÜGGELÉK	119

1. BEVEZETÉS, A VIZSGÁLATOK CÉLJA

A nagyüzemi, intenzív állattartás viszonyai között számos olyan kedvezőtlen következmény fellépésével lehet számolni, amelyek a tejlő tehének egészségügyi, takarmányozási, illetve egyéb tartási körülményeiből erednek. A takarmányozási hibák szubklinikai vagy klinikai tünetekben is megnyilvánuló anyag- és energiaforgalmi betegségeket, ezzel összefüggésben szaporodásbiológiai zavarokat, tejtermelés-csökkenést okozhatnak. Általános törekvés, hogy az anyagcsere-zavarokat szubklinikai állapotban fedezzük fel, amikor még nagyobb veszteségek nélkül, sikeresen avatkozhatunk be a gyakran súlyos következményekkel járó folyamatokba.

A betegségek kialakulása során lezajló változások a testfolyadékok összetételi változásával követhető nyomon. A tehének testnedveinek karbamid- és ketonanyag-tartalma (aceton, acetecetsav és β -hidroxi-vajsav) az állat energia- és fehérje-ellátottságának indikátora. Az említett komponensek koncentrációjának megváltozása az élettani egyensúly megbomlását jelzi. Az összetételi változások korai felismerése a szubklinikai állapot azonosítására alkalmas, így a súlyosabb állategészségügyi következmények kialakulása elkerülhető.

Az állatorvosi laboratóriumi diagnosztikai gyakorlatban elsősorban a vér, a vizelet, valamint a bendőfolyadék vizsgálata terjedt el. Az ilyen típusú vizsgálatok esetében a mintavételezés állatorvosi szakértelmet, jelentős rutint kíván, emellett az állatok számára sem közömbös és higiéniai problémákat is felvet. Az utóbbi évek kutatási eredményei azt mutatják, hogy a vérben megfigyelhető változások időkéséssel ugyan, de a nyerstejben is kimutathatók. A nyerstej vizsgálatának lehetősége a egyszerűsíti mintavételezést és lehetőséget biztosít állománymonitorozási diagnosztikai rendszerek kialakítására is. Ennek alapfeltétele azonban a megfelelő hatékonyságú, rutinszerűen alkalmazható, gyorsvizsgálati analitikai módszerek kidolgozása és alkalmazási feltételeinek kialakítása.

Kutatómunkám alapvető két célja a következő volt:

- Nyerstej minták ketonanyag- és citromsav-tartalmának meghatározására alkalmas összehasonlító és gyorsvizsgálati analitikai módszerek fejlesztése, optimalása és érvényesítése.

- A nyers tehéntejben mérhető ketonanyagok koncentrációi és a tej citromsav-tartalma közötti összefüggések tanulmányozása előkísérleti jelleggel annak megállapítására, hogy a citrátkör intermedierje, a citromsav mennyiségi meghatározásán keresztül lehetséges-e a szubklinikai ketózis előrejelzése, megállapítása.

A dolgozatban szereplő fontosabb fogalmak, rövidítések értelmezése

<i>BHB teszt</i>	β -hidroxi-vajsav meghatározására alkalmas kereskedelmi forgalomban kapható teszt
<i>Brij-35</i>	detergens
<i>diabetes</i>	cukorbetegség
<i>FIA</i>	flow injection analysis, áramló injektálásos analitikai eljárás
<i>FTIR</i>	Fourier transformation infrared spectroscopy, Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiai eljárás
<i>GC</i>	gas chromatography, gázkromatográfia
<i>glükoneogenezis</i>	glükóz-újraképzés
<i>HS-GC</i>	headspace gas chromatography, headspace gázkromatográfia (gőztéranalízis)
<i>hyper-/hypoglycaemia</i>	emelkedett/csökkent vércukor koncentráció
<i>hyper-/hypoinzulinaemia</i>	emelkedett/csökkent vér inzulin-koncentráció
<i>hyper-/hypoketonaemia</i>	emelkedett/csökkent vér ketonanyag-koncentráció
<i>INT</i>	jodo-nitro-tetrazónium-klorid
<i>ketogenezis</i>	ketonanyagok termelődése
<i>ketolactia</i>	ketonanyagok felhalmozódása a tejben
<i>ketolízis</i>	ketonanyagok felhasználása az extrahepatikus szövetekben
<i>ketonaemia</i>	ketonanyagok felhalmozódása a vérben
<i>ketonuria</i>	ketonanyagok felhalmozódása a vizeletben
<i>klinikai ketózis</i>	a ketózis azon formája, amely már klinikai tünetekben is megnyilvánul
<i>laktáció</i>	tejtermelés
<i>laminitis</i>	gyulladásos csülökbetegségek
<i>mastitis</i>	tőgygyulladás
<i>metritis</i>	méhgyulladás
<i>monogastricus</i>	együregű gyomrú
<i>MS</i>	mass spectrometry, tömegspektrometria
<i>NEFA</i>	non esteryfied fatty acids, nem észteresített zsírsavak
<i>nyerstej</i>	egy vagy több szarvasmarha, juh, kecske vagy bivaly tejmirigyei által kiválasztott, emberi táplálkozás céljára alkalmas olyan folyadék, amelyet nem melegítettek 40°C fölé, illetve ezzel egyenértékű kezelésben nem részesítettek
<i>RSD%</i>	relatív szórás
<i>SD</i>	korrigált tapasztalati szórás
<i>szárazonállás</i>	a vemhesség ideje, amely alatt nincs tejtermelés
<i>szubklinikai ketózis</i>	a ketózis klinikai tüneteinek megjelenése előtti, a ketonanyagok fokozott termelődésével jellemezhető tünetegyüttes
<i>TRIS</i>	trisz-(hidroximetil)-aminometán

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A KETONANYAGOK ÉS A CITROMSAV SZEREPE AZ ANYAGCSERE-FOLYAMATOKBAN

2.1.1. A ketonanyagok anyagcseréjének alapfolyamatai

A német- és angol nyelvű szakirodalomban összegezve „ketontestek”-nek (ketone bodies, Ketokörpern) nevezik a zsírsav-anyagcsere folyamán kis mennyiségben élettani körülmények között is keletkező ketonanyagokat: az acetont, acetecetsavat, izopropanolt és a β -hidroxil-vajsavat. (Ez utóbbi, bár keto-csoportot nem tartalmaz, a klinikai szóhasználatban mégis a ketonanyagok közé sorolják.)

A ketonanyagok viszonylag poláros, vízdoldható vegyületek, a biológiai membránokon könnyen átjutnak, transzportjukhoz hordozófehérje nem szükséges. Ennek megfelelően a különböző szövetekben keletkező ketonanyagok könnyen kerülnek a testfolyadékokba. A ketonanyagok kis mennyiségben egészséges állatok, sőt az ember vérében is megtalálhatók.

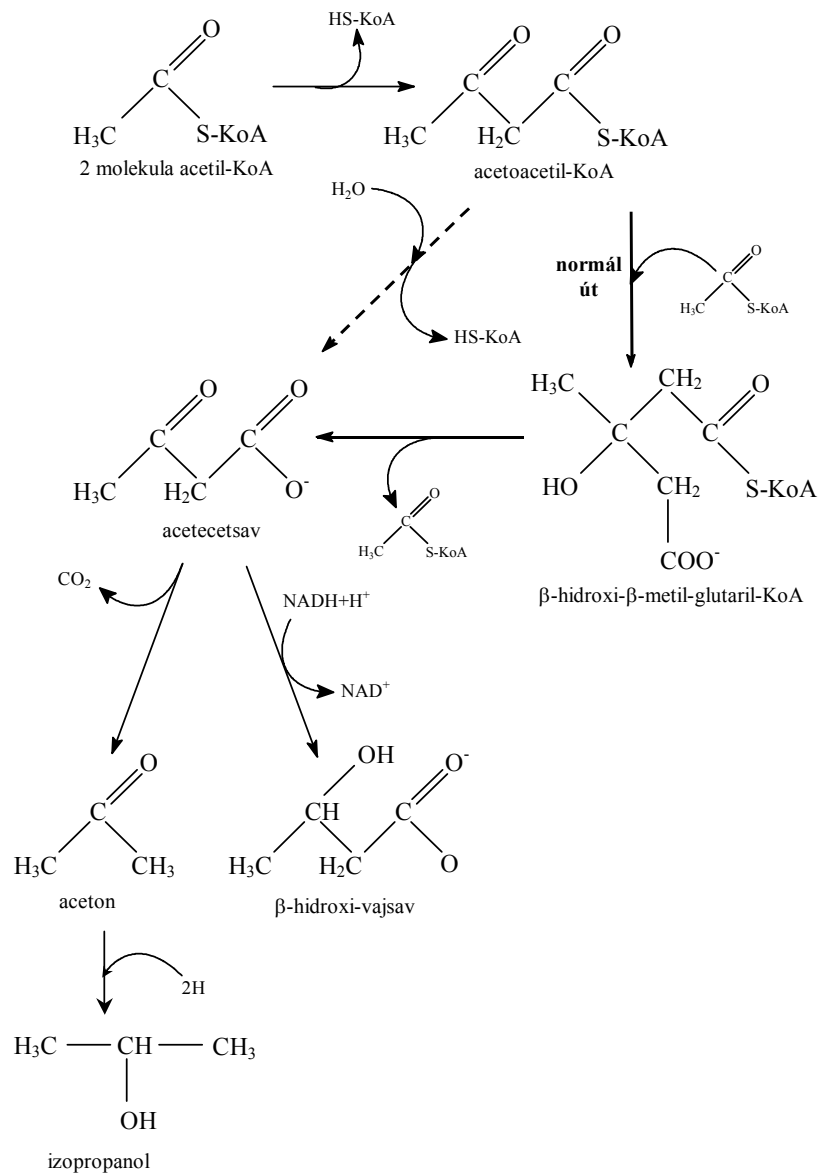
Egyes betegségeknel (pl. ketózisnál, cukorbetegségnél) vagy éhezéskor a testfolyadékokban mérhető koncentrációjuk többszöröződik.

2.1.1.1. A ketonanyagok szintézisének és felhasználásának biokémiai alapfolyamatai

A ketonanyagok hosszú szénláncú zsírsavakból kiinduló szintézise (a ketogenezis) főként a máj hepatociták mitokondriumainak mátrixában zajlik, de tejelő tehenekben kisebb mennyiségben a tőgyben és a bendő falában is képződnek. Minden olyan endogén hormon- vagy anyagcserehatás növelheti a ketogenezist, amely szabaddá teszi a szervezet saját zsírszövetét, ritkábban a takarmányok lipidjeinek zsírsavait. A szabad zsírsavak mennyiségének növekedésével fokozódik a ketonanyag- és csökken a CO_2 -képződés (a zsírsavak lebontási folyamatában keletkező acetyl-KoA felhasználása a citrátkörben). Ez kiváló példája annak a tézisnek, mely szerint „az egyik anyagcsereút stimulálása az alternatív utak szupresszióját vonja maga után” [McGarry és mtsai., 1973].

A ketogenezis élettani körülmények között minimális (1. ábra: normál út). Ilyenkor a zsírsav-anyagcsereben a két molekula acetyl-KoA-ból keletkező acetoacetyl-KoA a β -hidroxil- β -metil-glutaril-KoA-szintáz enzim hatására β -hidroxil- β -metil-glutaril-KoA-vá alakul (HMG-

KoA); ez a vegyület egyébként az izoprénvázas lipidek szintézisének intermedierje. A keletkezett HMG-KoA a *β*-hidroxi-*β*-metil-glutaril-KoA-liáz hatására acetecetsavvá (acetoacetáttá) és acetyl-KoA-vá bomlik. Az acetecetsav részben *NAD*-függő *dehidrogenázzal* (*hidroxibutirát-dehidrogenáz*) *β*-D-hidroxibutiráttá (*β*-hidroxi-vajsav), részben spontán dekarboxileződéssel acetonná alakulhat. Az acetonnól két hidrogén felvételével izopropanol képződhet (1. ábra).



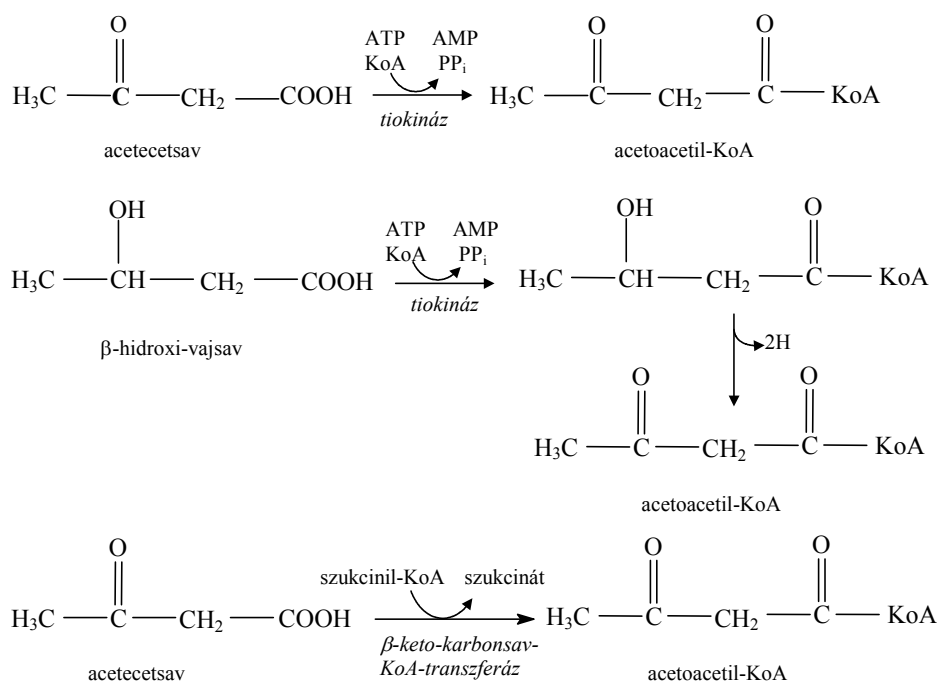
1. ábra: Ketonanyagok keletkezése a máj hepatocitáiban [Elődi, 1981]

Az elmondottak tükrében könnyen belátható a terminológia ésszerűsége: az acetont és az acetecetsavat együttesen „oxidált ketonanyag-tartalom”-nak, míg a *β*-hidroxi-vajsav és izopropanol mennyiségének összegét „redukált ketonanyag-tartalom”-nak is nevezik. Az

oxidált és redukált ketonanyag-tartalom együttes mennyiségére az „összketonanyag-tartalom” elnevezést használják.

Amennyiben a májsejtekben olyan magas az acetyl-KoA szint, hogy azt a citrátkör már nem képes felvenni (pl. a glükóz-anyagcsere elégtelensége miatt), akkor a *tioláz (acetyl-KoA-acetyl-transferáz)* enzim hatására a β -oxidáció utolsó lépésének megfordításával fokozott mennyiségű acetoacetyl-KoA keletkezik. Ez vagy a HMG-KoA-n keresztül vagy közvetlen deacilezéssel (az *acetoacetyl-KoA-deacetyláz* enzim katalizálja a folyamatot), vagy a *β -ketosav-KoA-transferáz* enzim katalitikus hatására acetecetsavvá alakul, miközben szukcinil-KoA keletkezik. Az acetecetsav pedig az előbb ismertetett utakon alakulhat át különböző ketonanyagokká.

A máj a ketonanyagok képzésének fő szerve, de csak azok kis részét oxidálja, döntő hányaduk változatlanul kerül a keringésbe, majd az extrahepatikus szövetekben (pl. izom-, agyszövet, tőgy) kerülnek felhasználásra (ketolízis). A ketonanyagok hasznosítására a belőlük kiinduló acetoacetyl-KoA képződés ad lehetőséget. Ezek lényegében a ketonanyag képződés inverz folyamatai és csak a perifériás szövetekben játszódnak le (2. ábra). A keletkező acetoacetyl-KoA pedig a β -oxidációnak megfelelően hasznosul.



2. ábra: A ketonanyagok hasznosulása az extrahepatikus szövetekben [Elődi, 1981]

2.1.1.2. A ketogenezis

Az egészséges monogastricus (együregű gyomrú) állatokban (és az emberben is) a ketogenezis kizárólagos helyszíne a máj, a termelődött ketonanyagok mennyisége csekély, a vérplazmában mérhető koncentrációjuk alacsony. Az emlősök vérében élettani koncentrációjuk általában $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ alatt marad. A nagyobb fokú ketonanyag-termelés háttérében mindig a szervezet energiaháztartásának (szénhidrát- és zsíryanycsere) zavara áll (pl. diabetes, éhezés).

A kérődzők szervezetében több helyen (a májban, a bendő falában és a tejmirigyben) termelődnek ketonanyagok, de a perifériás szövetekben – különösen az egészséges, szénhidrátokkal megfelelően ellátott (energiaegyensúlyban levő) szarvasmarha szervezetében – jelentős mértékben oxidálódnak is (ketolízis). Tovább árnyalja a képet, hogy a kifejlett, egészséges szarvasmarha vércukorszintje speciális energiaháztartása miatt a monogastricus fajokhoz képest lényegesen alacsonyabb, azokhoz képest hypoglikaemiás, ami a nem tejelő tehenek és a bikák esetében semmi káros következménnyel nem jár. A laktáló (tejelő) teheneknek azonban a tejtermelés miatt (a laktóz képzéséhez) fokozott a glükózigénye, ami az energiaegyensúly fenntartását nehezíti. Mindezek következtében a tejelő tehen energiaegyensúlya sérülékeny.

Ha a ketogenezis fokozódásával a ketonanyagok hasznosítása már nem tud lépést tartani, azok a vérben (ketonaemia), a vizeletben (ketonuria) és a tejben (ketolactia) is felszaporodnak. Ezt a laboratóriumi tünetegyüttest és a jelentkező klinikai tüneteket nevezik *ketózis*nak, ami az egyik leggyakoribb anyagforgalmi zavar a kérődzőkben, a tejelő tehen számára valóságos „élettani rizikófaktor” [Gaál, 1999/a].

2.1.1.2.1. A ketogenezis kialakulásának feltételei

A szénhidrát-anyagcsere zavarai és a ketonanyagok fokozott termelődése/ürítése közötti összefüggés régóta ismert, de a kérődzőkben lejátszódó biokémiai folyamatok intenzív tanulmányozása csak az 1970-es évek elejétől indult meg, amikor a májsejtek anyagcseréjének biokémiai folyamatai többé-kevésbé tisztázódtak. Ezt követően jelentős számú publikáció látott napvilágot a zsíryanycsere és a ketózis összefüggéseivel kapcsolatban is.

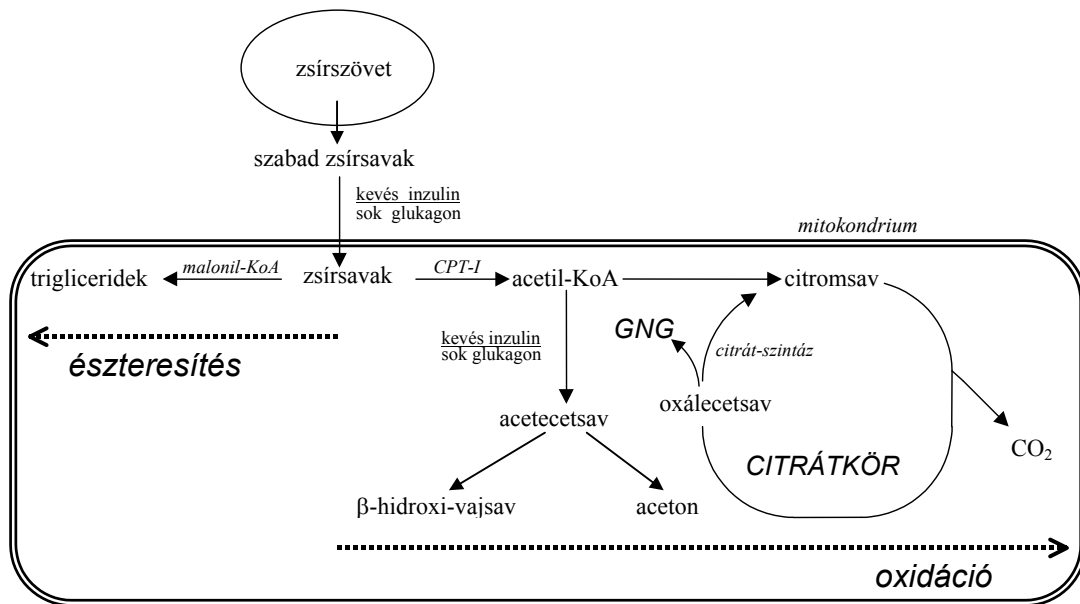
A ketogenezisre alapvető hatással van az intramitokondriális oxálecetsav koncentráció. A prekursoraiból termelődő oxálecetsav a glükóz-újraképzésben

(glükoneogenezis) glikogén és glükóz szintézisére, a citrátkörben pedig energiatermelésre fordítható (3. ábra). Tejelő tehenekben a tejcukor szintéziséhez nagy mennyiségű vér glükózra van szükség. A megnövekedett glükózigény a glükoneogenezis fokozódását vonja maga után, ami „elszívja” az oxálecetsavat. Az alacsony oxálecetsav-koncentráció miatt az acetil-KoA citrátkörbe lépése gátolt [Krebs, 1966]. Az így kialakult acetil-KoA-felesleg pedig ketonanyag-képződéshez vezet. Ezen kívül a ketogenezis biokémiai folyamataira hatással van a *citrát-szintáz* enzim gátlása, amit az ATP, a hosszú szénláncú acil-KoA-k, a megnövekedett citromsav-koncentráció és különböző inhibitorok idézhetnek elő [Bremer és Davis, 1974].

A ketonanyag-képződés témakörében átütő jelentőségű volt a zsírsavészterésítés és zsírsavoxidáció kompetíciójának felismerése [McGarry és Foster, 1972]. A fokozott ketogenezis feltételei a következők szerint összegezhetők [Holtenius és Holtenius, 1996]:

- alacsony inzulin/glukagon arány,
- megnövekedett zsírbontás (lipolízis),
- alacsony malonil-KoA koncentráció.

A májsejtek zsírsav-anyagcseréjének fontosabb, a ketogenezissel összefüggésben álló folyamatai és szabályozásuk vázlatát a 3. ábrán látható.



3. ábra: A zsírsavak májbeli anyagcseréjének szabályozási folyamatai (CPT-I: karnitin-palmitil-transzferáz; GNG: glükoneogenezis)

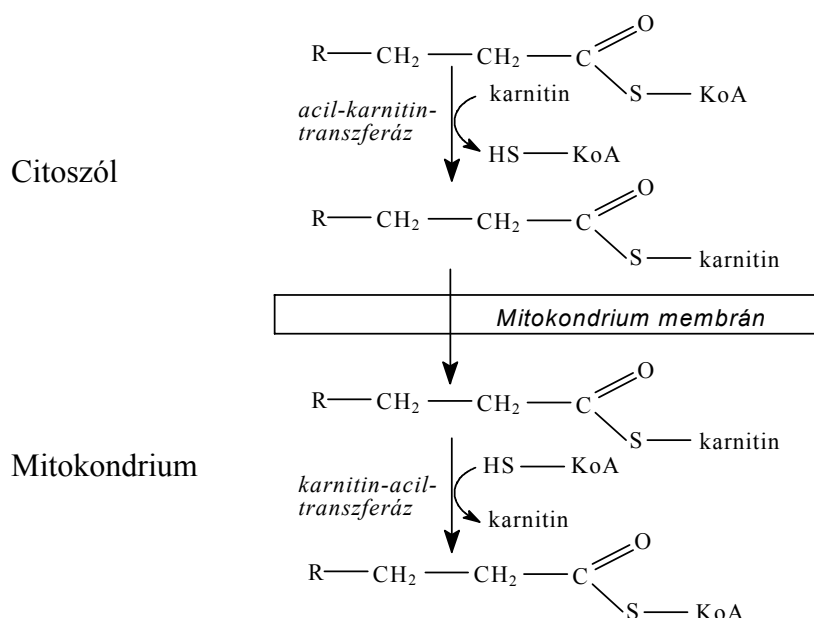
A májban a zsírsav-anyagcsere enzimes reakciói hormonális felügyelet alatt állnak, melyet két antagonistá hormon, az inzulin és a glukagon lát el. Ezek ellentétes hatása miatt a

kettő aránya tölti be a fontos szabályozó szerepet. Az alacsony inzulin/glukagon arány fokozza a zsírszövetben a lipolízist és a májban a ketogenezist. A trigliceridbontást végző *hormonszenzitív lipáz*t a cAMP aktiválja, melynek szintjét a glukagon emeli, az inzulin pedig csökkenti. Az inzulin relatív hiánya tehát önmagában is növeli a lipáz-aktivitást.

A hormonális szabályozás jelentős szerepet tölt be abban, hogy a szervezet képes legyen reagálni a különböző takarmányozási és/vagy élettani körülmények változásaira. A tejelő teheneknél megfigyelték, hogy az anyagcsere igazodik az ellés és a laktációs periódus változásaihoz: a tejtermelés utolsó szakaszában, valamint az azt követő szárazonállás kezdetén a tehén felépítő jellegű anyagcserét folytat. Az ellés kezdete előtti néhány héttől kezdve a folyamat megfordul, és a lebontás kerül előtérbe. Az anabolikus állapotból a katabolikus felé történő átmenet idején az inzulin/glukagon arány csökken, melynek elvi magyarázata az inzulinszint csökkenése [Holtenius, 1994], mivel az inzulin alapvetően anabolikus, a glukagon katabolikus hatású. A korai laktációs periódus kis inzulin-koncentrációja növeli a zsírszövetekben a lipolízist és a zsírsavak májbeli oxidációját és csökkenti a triglicerid-képzést a máj malonil-KoA koncentrációjának csökkentésén keresztül [Zammit, 1990]. A zsírsavak bioszintézisének közbenső terméke, a malonil-KoA (mely acetyl-KoA-ból szén-dioxid felvételével keletkezik), serkenti a zsírsavészterésítést, gátolja a zsírsavak oxidációját és a ketonanyag-képzést. A malonil-KoA zsírsav-anyagcserében betöltött szerepét kutatva a propionsav anyagcsere köztiterméke, a metil-malonil-KoA zsírsav-oxidációra kifejtett gátló hatását sikerült igazolni juhok májában [Brindle és mtsai., 1985].

Mások nagy tejtermelésű tehenek laktációjának korai periódusából származó májmintákban tanulmányozták a palmitinsav oxidációját. A palmitinsavból kiinduló ketogenezis a laktációs periódus 30. és 60. napja között a legintenzívebb. A ketonanyag képződés ütemét a hosszú szénláncú zsírsavaknak a máj mitokondriumjaiba történő transzportja szabja meg [Aiello és mtsai., 1984]. Mielőtt a zsírsavak oxidációs ciklusa megkezdődik, a zsírsavaknak a citoszólban egy komplex enzimes folyamatban aktiválódniuk kell, majd a mitokondrium membránján át kell jutniuk az oxidáció helyére. Minthogy a membrán permeabilitása a hosszú szénláncú aktivált acil-KoA-ra nézve kicsi, az áthatoláshoz megfelelő transzportmechanizmusra van szükség. Régóta ismert, hogy a karnitin stimulálja a zsírsavak lebontását, de sokáig nem volt világos, hogy mi a folyamat mechanizmusa. Aiello és mtsai. azt találták, hogy a karnitin fokozza a palmitinsav oxidációját, és gátolja annak észterésítését. A karnitin kiegészítés zsírsav-oxidációra kifejtett serkentő hatása a mitokondriális *karnitin-palmitil-transzferáz* enzimen (CPT-I, lásd: 4. ábra) keresztül valósul

meg, ugyanis az enzim működése karnitin-függő. A transzportálandó aktivált palmitinsav (palmitil-KoA) acil-csoportja enzimes úton a karnitin hidroxil-csoportjával O-észter kötést alakít ki és ez a palmitil-karnitin-komplex az intramitokondriális térbe kerül, ahol ugyancsak enzimes úton visszaalakul. Az ily módon transzportálódott zsírsav válik a zsírsav-oxidációs ciklus vagy a ketogenezis szubsztrátjává (4. ábra). A kísérletek során a propionát hozzáadása viszont csökkentette a palmitinsav oxidációját. Tetradecil-gliceridinsavat alkalmazva, mely gátolta a CPT-I enzimet, bizonyítható volt, hogy a propionsav említett hatását nem a CPT-I-en keresztül érvényesíti [Drackley és mtsai., 1991]. A páratlan szénatomszámú zsírsavak oxidációjában keletkező propionsav ugyanis az ATP terminális foszfátjának energiájával és CO₂-felvétellel metil-malonil-KoA-vá képes alakulni, mely az előzőekben ismertetett módon gátolja a zsírsavak oxidációját és a ketonanyag-képzést.



4. ábra: A zsírsavak intramitokondriális tér felé történő transzportjának mechanizmusa

2.1.1.2.2. A ketonanyagok szerepe

A ketonanyagok fokozott termelődése egyrészt az emlős szervezet energiahiányos állapotának indikátora, másrészt a perifériás szövetek ketonanyag felhasználása részben „glükóz helyettesítő” anyagként lényegében glükózt takarít meg és energiát szolgáltat. A glükóz helyettesítésével a szervezet fehérjéinek glükóz-előanyagként történő hasznosítását (fehérjékből kiinduló glükoneogenezist) akadályozzák meg [Robinson és Williamson, 1980].

A ketózisos tehenek vérplazma-alaninszintje (mely a fő glukogenetikus aminosav) kb. egyharmada az egészséges állatokénak. Baird és mtsai. kísérletekkel is alátámasztották, hogy a β -hidroxivajsav infúzióban történő adagolása csökkenti a vérplazma alaninszintjét, valamint ugyancsak csökkenti a nitrogénürítés mennyiségét. Ugyanilyen hatást mutattak ki anyajuhok esetében is [Baird és mtsai., 1968].

A ketonanyagok az előbb említett helyettesítő funkciók kivül az emlősökben számos fontos szabályozó szerepet is ellátnak [Holtenius és Holtenius, 1996]. Gátolják:

- a glükóz oxidációját (kérődzőkben, együregű gyomrú állatokban, valamint emberben),
- a lipolízist,
- az izomfehérjék lebontását,
- a glükoneogenezist,
- a szövetek glükóz-felhasználását,

Nagyobb mennyiségű ketonanyag képes befolyásolni saját termelődését a szabad zsírsavak májba történő transzportjának szabályozásával.

2.1.1.3. A ketózis

Ketózisnak nevezik a kérődzőknek azt a klinikai tünetekkel járó betegségét, amelyet a testfolyadékok emelkedett ketonanyag-koncentrációi is jellemeznek. Etiológiai szempontból azonban a tejelő tehenek esetében fontos az anyagcsere-betegség két alaptípusának, az emelkedett ketonanyag-koncentráció (hyperketonaemia) mellett alacsony vércukor (hypoglycaemia) és inzulinszinttel (hypoinzulinaemia), valamint a magas vércukor (hyperglycaemia) és inzulinszinttel (hyperinzulinaemia) párosuló formák megkülönböztetése [Holtenius és Hotenius, 1996]. A Holtenius testvérek összefoglaló tanulmányán alapuló nevezéktan, vagyis az *I. és II. típusú ketózis* elnevezések egyelőre nem általánosan elfogadottak. A két ketózis forma megkülönböztetését azonban indokoltnak tartom, és dolgozatomban alkalmazom is, mivel a kétféle betegség kialakulásának háttérében eltérő biokémiai folyamatok állnak. Ennek következtében a két betegség különböző megelőző és gyógyító tevékenységet is igényel. Az I. és a II. típusú ketózis alapvonásainak összehasonlítását az 1. táblázatban foglaltam össze.

Összehasonlítási szempont	I. típusú ketózis	II. típusú ketózis
<i>Kiváltó okok:</i>	A nagy tejtermelésű egyedek laktáció miatti energiadeficitjének következménye. - glükóz hiány és - elégtelen glükoneogenezis	A szárazonállás alatti túltáplálás következménye. - inzulin-rezisztencia - glükóz-intolerancia
<i>A jelentkezés ideje:</i>	A laktáció 3. és 6. hete között a leggyakoribb.	Már ellés után néhány nappal jelentkezhet.
<i>Társbetegségek:</i>	Nem fordulnak elő.	Metritis, laminitis, mastitis stb.
<i>Vérplazma glükózsztintje:</i>	Alacsony.	Magas.
<i>Vérplazma inzulinsztintje:</i>	Alacsony.	Magas.
<i>Glukagon-injekcióra adott inzulin- és glükózválasz:</i>	Gyenge.	Erős.
<i>Májelzsírosodás előfordulása:</i>	Nem fordul elő.	Gyakori.

1. táblázat: Az I. és II. típusú ketózis néhány megkülönböztető jegyének összefoglalása [Holtenius és Holtenius, 1996]

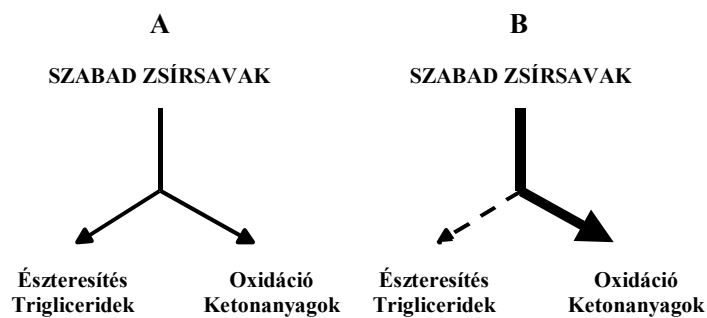
2.1.1.3.1. Az I. típusú ketózis

A beteg teheneket alacsony vércukor- és inzulinsztint, valamint magas ketonanyag-koncentrációk jellemzik. A glukagon-injekcióra adott inzulin- és glükózválasz gyenge. Ennek hátterében a májsejtek kevés glikogéntartalma mellett a fehérjéből történő cukorújraképzés gátlásából eredő glükózhiány áll. A hasnyálmirigy (pancreas) β -sejtjeinek az inzulin szekréciójához megfelelő glükóz-koncentrációra van szükségük, ami nem áll rendelkezésre. Bizonyított, hogy nem egyszerűen a vérplazma glükózsztintje váltja ki az inzulinválaszt [Hove, 1978; Meirhaege és mtsai., 1988; Newgard és mtsai., 1995]. Az egészséges tehenek nagyobb plazmainzulinsztint-növekedéssel válaszolnak a glükóz-injekcióra, mint a ketózisosak. Az inzulinválasz kiváltását a hasnyálmirigy β -sejtjeinek glükóz-anyagcseréje és az ide történő glükóztranszport-ráta szabja meg. Utóbbi kutatók valószínűsítik, hogy a ketózisos tehenek glükóz-anyagcseréje nem olyan aktív, mint az egészségeseké, ami magyarázatául szolgálhat a biokémiai kísérletekben tapasztalt jelenségre.

A ketotikus állapot kialakulásának közvetlen oka tehát a nagy glükózhiány és az elégtelen glükoneogenezis. A májsejtekben a lipidszintézis feltételeinek hiányában zsírákkumuláció nem tapasztalható [Holtenius és Holtenius, 1996].

A betegség leggyakrabban a laktáció 3-6. hete között jelentkezik, és nem kombinálódik egyéb betegségekkel, ezért sokszor elsődleges vagy primer ketózisnak is nevezik. (A megfogalmazás azonban nem helytálló, hiszen a hyperketonaemia nem elsődleges jelenség, hanem az anyagcserében történt változások következménye.)

Az elmondottakat összefoglalóan az 5. ábra szemlélteti: az egészséges tehen szervezetében (A) a lipidekből keletkező és a májba kerülő szabad zsírsavakból keletkező acetyl-CoA-t lipogenezisre, oxidatív lebontásra, illetve ketonanyag-képzésre egyaránt felhasználja. Az I. típusú ketózisban szenvedő tehen (B) esetén a tejtermeléskor előálló glükózhiány meghaladja a glükoneogenezis kapacitását, mert a szervezet fehérjéiből kiinduló glükoneogenezis gátolt. A vérplazma glükóz- és inzulin-koncentrációja alacsony, ami fokozott lipolízishez, és a májban a szabad zsírsavak oxidációjára, illetve ketonanyagok képzésére történő felhasználásához vezet.



5. ábra: A májbeli zsírsav-anyagcsere utak egészséges (A) és I. típusú ketózisban szenvedő tehenekben (B)

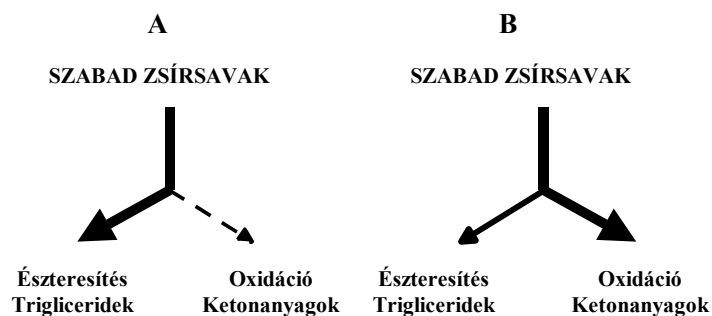
2.1.1.3.2. A II. típusú ketózis

A ketózis e változata sok tekintetben eltér az előbbitől. A tünetek a laktáció igen korai szakaszában jelentkeznek és gyakran kombinálódik társbetegségekkel (metritis, mastitis, laminitis, egyéb csülökbetegségek stb.). A beteg állatoknak magas a ketonanyag, a vércukor- és az inzulinszintje. A szervezet glukagon-injekcióra adott inzulinválasza erős. A tehenek az inzulin-rezisztencia, glükóz-intolerancia és egyes esetekben a nem-inzulin-függő diabetes (II. típusú diabetes) tüneteit mutatják. Az említett tüneteken kívül a betegség különböző mértékű májelzsírosodással is együtt jár.

A II. típusú ketózis etiológiai háttere is eltér az I. típustól. Az egyik fontos hajlamosító tényező a szárazonállás időszakában történt túltáplálás, mely önmagában is a vérplazma

glükóz- és inzulinszintjének növekedéséhez vezet [Holtenius és Holtenius, 1996]. Az ellés körüli napokat a zsírszövetben erőteljes zsírbontás, de a májban csak alacsony szintű zsírsavészterésítés jellemzi [Smith és Walsh, 1988]. Az ellést követő héten sem a glükóz-, sem az inzulin-stimulált zsírsavészterésítés nem figyelhető meg [Metz és van den Bergh, 1977]. Ha az állat stresszhatást szenved el (pl. ellés körüli szövődmények), a szabad zsírsavak májba történő transzportja fokozódik, a vérplazma glükóz- és inzulinszintje megemelkedik. Ezek a hatások elősegíthetik a májban a lipidszintézist, ami „zsírmáj” kialakulásához vezethet.

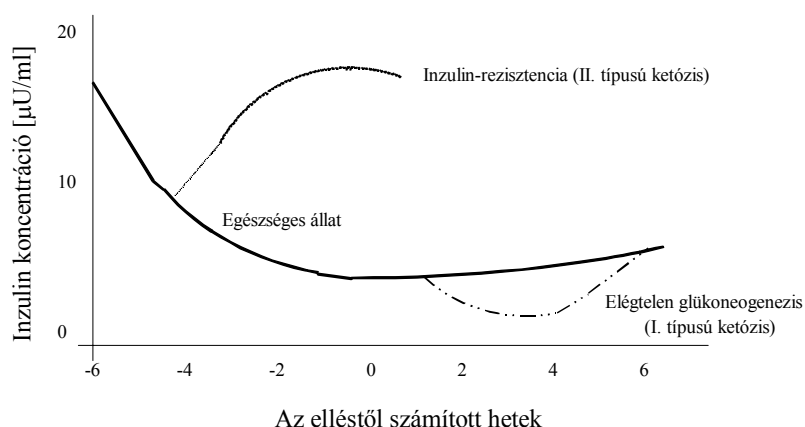
A zsírmáj és a legtöbb esetben az önkéntes takarmányfelvétel mértékének csökkenése ellenére az állatok hyperglycaemiások és a glukagon-injekció után erőteljes plazma glükózsztint növelésre képesek [Holtenius és Holtenius, 1996]. A máj elzsírosodása miatt elvileg a glikogénbeépülés számára kevesebb hely marad a sejtekben, mint az egészséges májsejtekben. Ezért tűnik ellentmondásosnak a megfigyelt, glukagon-injekció utáni glükózsztint-növekedés. Clore és mtsai. [1992] emberben tanulmányozták az említett glükózválaszt háromnapos éhezést követően egészséges és II. típusú diabetesben szenvedő betegeknél. A betegek a csökkent glikogén-raktározás dacára az erőteljes glükoneogenezis miatt hasonlóan nagyobb glükózválaszt adtak, mint egészséges társaik. Ez a megfigyelés analóg a zsírmájjal terhelt teheneknél tapasztaltakkal. A hasnyálmirigyben termelt inzulin a portális vénán keresztül jut a májba, ahonnan nagy része távozik (tejelő teheneknél 60, nem tejelők esetén mintegy 85%). A zsírsavak és a trigliceridek azonban gátolják az inzulin lebomlását, ami hyperinzulinaemiához vezet [Arner és mtsai., 1983]. A tejelő tehenek májában a csökkent inzulinkötődés miatt fokozódhat a glükóztermelés [McGarry, 1994], és a zsírsavak anyagcsereútja a lipogenezisről oxidációra és ketogenezisre válthat át. (Ezek a folyamatok egyébként igen hasonlóak a nem-inzulin-függő diabetes inzulin- és glükóz-intoleranciájának kialakulásához.)



6. ábra: A zsírmáj kialakulásának folyamata (A) és a már zsírmájjal terhelt tehének májbeli ketogenezise (B)

A fent vázolt folyamatok lényegét a 6. ábra foglalja össze. A szárazonállási periódusban túltáplált teheneket emelkedett vérplazma-inzulin- és -glükózsztint jellemzi. Stresszhatásra a szabad zsírsavak mobilizálása és a glükóz termelése fokozódhat. A magas koncentrációjú glükóz, inzulin és szabad zsírsav elősegíti a májban a zsírsavak észterezését és a zsírákkumulációt (A). A már elzsírosodott májszövetben az inzulinlebonthatóság csökkenése miatt a hormon nagy része a perifériás keringésbe kerül. A májban az alacsonyabb inzulinkötődés a glükóztermelés növekedését és a zsírsav-metabolizmus oxidáció és ketonanyag-termelés felé történő eltolódását eredményezheti (B).

Az egészséges, valamint az I. és II. típusú ketózisban szenvedő tehenek vérplazma-inzulin szintjeinek alakulását az ellés előtt és után, az idő függvényében a 7. ábra mutatja be.



7. ábra: A vérplazma inzulin szintjének változása egészséges és ketózisos tehenek esetén

2.1.1.4. Éhezéses hyperketonaemia

Az éhezés a ketózishoz hasonlóan a vérplazma inzulin- és glükózsintjének csökkenését okozza, ami a szabad zsírsavak nagy mennyiségű képződéséhez, valamint a máj zsírsav-oxidációjának fokozódásához vezet. Egészséges tehenekben a takarmányfelvételt követően önmagától rendeződik a glükoneogenezis, az inzulinszekréció és a szabad zsírsavak termelése.

2.1.1.5. A ketózis klinikai jelei, tünetei

A ketózis előfordulása a különböző állatállományokban különböző gyakoriságú, a laktációs periódus első 65 napját figyelemmel kísérve a vizsgált állományokban a gyakoriság 0-33.9% között változott [Dohoo és Martin, 1984].

A betegség, az ún. klinikai ketózis kialakulása fokozatos. A klinikai tünetek megjelenése nélküli szubklinikai szakaszban (ami a klinikai ketózis előállapotának tekinthető), a betegség várható fellépésére csak a megemelkedett vér-, vizelet- és tejketonanyag-koncentrációkból, valamint az önkéntes takarmányfelvétel és a tejtermelés csökkenéséből következtethetünk. A bántalom nagyarányú előfordulásához, – mely végső soron az állat negatív energiaegyensúlyának következménye – általában több hajlamosító tényező, rizikófaktor együttes jelenléte szükséges. A rizikófaktorokat alapvetően két nagy csoportba lehet sorolni (2. táblázat).

Egyedi tényezők:	Tartási körülményekkel összefüggő tényezők:
- fajta	- általános tartási körülmények (pl. legeltetés vagy intenzív tartás)
- genetikai adottságok	- takarmány összetétele
- kor	
- ellések száma	
- ellés körüli szövődmények	
- laktáció hete	
- társbetegségek	

2. táblázat: A ketózisra hajlamosító tényezők, Andersson és Emanuelson [1985] nyomán

Az energiahányos állapot kimutatására egyaránt alkalmas lehet a vér glükóz-, valamint nem észterészített zsírsavszintjének (NEFA), továbbá a vér, a vizelet és a tej

ketonanyag-koncentrációinak mérése. Az energiaegyensúly általában szoros összefüggést mutat a vér glükóz- és ketonanyag-szintjével ugyanúgy, mint a mintavételt követő hét tejtermelésével.

Az eddig alkalmazott úgynevezett anyagcsereprofil vizsgálatok (vér-, vizelet- és bendőfolyadék-vizsgálatok) kellően informatívak, de hátrányuk, hogy a tehenészetekben a mintavételezés szakképzett munkaerőt igényel, időigényes és az állatok számára sem közömbös. Ezért állományvizsgálati szempontból nagy jelentőségű és napjainkban egyre gyakoribb megoldás, hogy a ketonanyagok koncentrációját a tejből határozzák meg. A laktáció első hónapjában az energiahiányos állapot egyik legjobb indikátorának a tej acetontartalma bizonyult [Fekete és mtsai, 1999].

A tej aceton-koncentrációja és a fent említett rizikófaktorok összefüggéseit vizsgálva a kutatók megállapították, hogy a genetikailag nagy tejtermelésű egyedek tejének aceton-koncentrációi általában nagyobbak. A ketonanyag-szint emelkedése még klinikailag egészséges tehenekben is csökkentheti a tejtermelést. A fent felsorolt többi hajlamosító tényező tejtermelésre kifejtett hatását állományszinten vizsgálva, a fajtára, állományra, laktációs periódusra, laktációk számára és hetére statisztikailag szignifikáns hatást sikerült igazolni. Az évszakok hatása és a laktációs periódusok száma, valamint azok hete közötti összefüggés is bizonyítást nyert [Andersson és Emanuelson, 1985]. Dohoo és Martin [1984] ketózisos tehenek 1-1,4 kg/nap-nyi tejtermelés-csökkenését állapította meg. Miettinen [1993] a fentiekkel összhangban az általa vizsgált állományokban szubklinikai ketózisban szenvedő teheneknél 2-9%-os, míg ketózisos állatoknál mintegy 26%-os tejtermelés-csökkenést tapasztalt.

A különböző kutatók azt a határértéket, mely alatt tejtermelés csökkenés nem várható 0,4 és 0,7 mmol·l⁻¹ közötti tej aceton koncentráció értékekben állapították meg [Fekete és mtsai., 1999]. A határérték (3. táblázat) mind a mai napig vita tárgyát képezi, hiszen nyilvánvalóan fajta- és állományfüggő adatként kell kezelni. Ezt a megállapítást támasztják alá Andersson és Emanuelson [1985] kutatásai. A vér összketonanyag- és a tej aceton-, valamint redukált ketonanyag-tartalma között találtak szoros összefüggést, azonban a klinikai tünetek és az aceton-koncentráció közötti párhuzam már nem volt ilyen egyértelmű: egyes egyedek 2,2 mmol·l⁻¹-nél még nem, mások 1 mmol·l⁻¹ tej aceton esetén már mutatták a klinikai tüneteket. Egyedszinten tehát az egyéni ketonaemia érzékenységet hatását sem szabad figyelmen kívül hagyni.

Az egyedi érzékenységet is figyelembe véve egyértelmű, hogy ha sikerül elkerülni a fokozott ketonanyag-termelődést és -felhalmozódást, várhatóan nőni fog a tejtermelés is.

Osztály	Koncentráció [mmol·l ⁻¹]	Hatás a tejtermelésére
normál	< (0,4 -) 0,7	nincs
enyhe	0,7 – 1,4	nincs, vagy csak csekély csökkenés (0,1 –0,2 liter/nap) „Figyelmeztető jel”
magas	> 1,4	jelentős csökkenés (1,9 liter/nap)

3. táblázat: A tej acetontartalma és a tejtermelés közötti összefüggés [Fekete és mtsai., 1999]

A klinikai ketózis állapotában a beteg tehén néhány napon belül akár 100 kg-ot is fogyhat, amit súlyosbít a rossz étvágy, amely esetenként a takarmány elutasításában is megnyilvánulhat. A fokozott ketonanyag-termelődés és -ürítés miatt a kilélegzett levegőnek, vizeletnek és a tejnek acetonszaga lesz. Az idegrendszeri szövődmények következtében a beteg állat tántorogva jár. Gyógyulásra csak a hajlamosító társbetegségek egyidejű kezelésekor számíthatunk. A gyulladással (pl. mastitis, metritis) kombinálódó bántalom esetén a helyzetet csak súlyosbítja az immunrendszer gyengülése. Igazolták, hogy a ketonanyagok negatív hatást fejtenek ki a makrofágok fagocita-aktivitására [Kluciński és mtsai., 1988], valamint a leukociták kemotaxisára [Suriyasathaporn és mtsai., 1999]. Az elhullott állatok soványak, bennük kevés zsír található, a máj, a vese és a szív azonban zsírral átszövődött. A máj sárgásan elszíneződött, lágy, könnyen szétmorzsolható, elhúzódó esetekben elhalásos területeket is tartalmaz. Szövettanilag kimutatható az agyalapi mirigy, a hasnyálmirigy és a pajzsmirigy károsodása [Fekete és mtsai., 1999]. A beteg állatok nem termékenyíthetők, nemi ciklusuk késik, ami az energiahiány okozta alacsony progeszteronszinttel magyarázható. A tej acetonszintje és a termékenyíthetőség közötti összefüggés egyedszinten még nem, de állományszinten már kimutatható [Andersson és Emanuelson, 1985].

A kezelés szőlőcukor intravénás és glükokortikoidok intramuscularis adagolása, propilén-glikol (vagy egyéb glükóz-előanyag) per os nyújtása lehet [Kégl, 1992]. Az állatokat a kezelés idejére célszerű kivonni a tejtermelésből.

Sokkal fontosabb azonban a megelőzés, hiszen a súlyos, klinikai tünetekkel járó ketózis gyógykezelése gyakran kétes kimenetű, általában már későinek bizonyuló törekvés. A klinikai kép alapján feltételezett (elsődleges) ketózis igazolását általában a vizeletből, majd a vérből történő vizsgálatokkal (glükóz, zsírsav, ketonanyagok mérése) végzik, azonban a vizsgált jellemzők megváltozott értékeit (4. táblázat) egyéb betegségek is előidézhetik, ami a diagnosztikai értékelés megbízhatóságát rontja [Gaál, 1999/b]. Az eddig elvégzett klinikai

vizsgálatok ezt a feltételezést alátámasztották: különböző súlyossági fokú és a laktáció eltérő periódusaiban levő ketózisban szenvedő állatokra vonatkozó eredmények gyakorta ellentmondanak egymásnak [Fekete és mtsai., 1999].

	Egészséges	Szubklinikai ketózis	Klinikai ketózis
Glükóz [mmol·l ⁻¹]	2,2-3,3	1,6-2,8	<2
Összketonanyag [mmol·l ⁻¹]*	0,3-0,9	0,9-1,7	1,7-20,0
Aceton [%]	0-2	30	40
Acetecetsav [%]	0-2	15	10-15
β-hidroxi-vajsav [%]	94-100	50-55	40-45

*: acetonra vonatkoztatva

4. táblázat: A tehénvér glükóz-koncentrációja és ketonanyag-összetétele [Gaál, 1999/b]

Általános törekvés, hogy az anyagcsere-zavarokat szubklinikai állapotban állapítsuk meg, amikor még nagyobb veszteségek nélkül, sikeresen avatkozhatunk be a gyakran súlyos következményekkel járó folyamatokba.

2.1.2. A citromsav anyagcseréjének alapfolyamatai

A ketonanyagok diagnosztikai jelentőségének felismerésével nagyjából egyidőben, ugyancsak az 1960-as évek végén, a '70-es évek elején fordult a figyelem a citrátkör (Krebs-ciklus, Szent-Györgyi-Krebs-ciklus, citrát-ciklus) intermedierjeinek intenzívebb tanulmányozása felé. A kidolgozásra került minőségi, majd egyre érzékenyebb mennyiségi analitikai módszerek nagy segítséget jelentettek a biokémiai összefüggések tisztázásához, így a ciklus nem megfelelő működésével összefüggésbe hozható (elsősorban humán) anyagcsere-betegségek kóroktanának megismeréséhez. Bár történtek vizsgálatok a kérdőzőkben folyó anyagcsere-folyamatok mind teljesebb megismerésére is, a teljes biokémiai összefüggés-rendszer (legalábbis ami a tejelő tehének ketózisának és a citrátkör működésének összefüggéseit illeti) mind a mai napig nincs feltérképezve.

A citrátkör az élővilágban az aerob mikroorganizmusoktól az emberig mindenütt előforduló központi jelentőségű, elsősorban energiefel szabadító szerepet betöltő katalitikus körfolyamat. A különböző tápanyagok (fehérjék, lipidek, szénhidrátok) oxidációja során közös intermedierként acetil-KoA keletkezik, aminek az acetilgyöke a citrátkörben széndioxiddá és vízzé oxidálódik. A ciklus kiindulópontján az acetil-KoA a kondenzáló *citrát-szintáz* enzim hatására az oxálecetsavval kapcsolódik és a KoA szabaddá válása közben citromsav keletkezik, ami aztán enzimes úton alakul át különböző intermediereké, végül pedig az oxálecetsav újraképződik. A ciklus összes enzime a sejtek mitokondriumaiban található meg, ezért az acetil-KoA oxidációja, vagyis a citrátkör működése a mitokondriumokban zajlik és azok egyik jellegzetes funkciója. Energetikai szempontból vizsgálva a citrátkör működését egy molekula acetil-KoA oxidálása végső soron - a légzési lánc működése következtében - 12 makroerg foszfátkötés szintézisét teszi lehetővé, tehát a citrátkör meghatározó szerepet tölt be a sejtek oxidatív anyagcseréjében.

A *citrát-szintáz* enzim szűk szubsztrátspecifitású, működéséhez az oxálecetsav esszenciális és az acetil-KoA is csak kismértékben helyettesíthető propionil- vagy fluoro-acetil-KoA-val. Bremer és Davis [1974] a citrátszintézis reverzibilitását vizsgálták egérmáj mitokondriumokban és megállapították, hogy a citrát és a fluoro-citrát kompetitív inhibitorai a *citrát-szintáz* enzimnek: a májmitokondriumok nagyobb citrát- és fluoro-citrát-koncentrációjának hatására a citrátszintézis visszaszorul és ezzel párhuzamosan a ketogenezis fokozódik.

A citrátkör intermedierjeinek koncentráció-változásait nyomonkövetve sokféle energiaforgalmi betegség kóroktanára derült fény az utóbbi néhány évtizedben. Számos olyan súlyos következménnyel járó megbetegedés addig ismeretlen oka tisztázódott, amiben a főszerepet a citrátkör valamely enzimének nem megfelelő működése játssza. Az energiaforgalmi betegségek diagnosztizálásában a vizsgált citrátkör-intermedierek abszolút mennyiségeinek meghatározásán túl az intermedierek fluxusváltozásainak is jelentős szerepet tulajdonítanak. A szubsztrátfelvétel és a termékképződés sebesség-változásai, valamint a sejtek redoxállapot-változásának vizsgálata jól alkalmazható a betegségek kóroktanának tisztázásában [Haas és mtsai., 1988].

Annak ellenére, hogy viszonylag hamar felismerték, hogy a citromsav jelentős mennyiségben fordul elő a tejben is, elenyészően kevés hivatkozás található a szakirodalomban, ami tejminták analízisével foglalkozik. A citromsav, a citrátkör egyik intermedierjeként, fontos szerepet tölt be az aerob szervezetek energiaháztartásában, de a tejben egyéb fontos biokémiai funkciói is ismertek [Kirst és mtsai., 1995]:

- meghatározó alkotórésze a tej pufferrendszerének,
- befolyásolja a tej savasságát,
- a kalciummal és a magnéziummal komplexet képezve stabilizálja a tejfehérjéket a hő hatására történő flokkulálódás ellen,
- a tej savanyodási folyamatában az aromakomponensek képzésének, valamint
- a Streptococcusok növekedésének fontos szubsztrátja.

A tehéntejben a citromsav kis hányadában (az összes mennyiség 5-10%-a) kazeinhez kapcsolódva (kolloidális citromsavként), nagyrészt oldott állapotban (oldott citromsavként) van jelen. Az egészséges tehének tejében mért összes citromsav-koncentráció átlagos értéke 8-10 mmol·l⁻¹ [White és Davies, 1958; White és Davies, 1963, Kirst és mtsai., 1995], de ez az érték az alkalmazott vizsgálati módszer és a laktációs idő függvényében egyedenként is változik. (Egészséges tehének vérében az élettani koncentrációja mindössze 0,09-0,14 mmol·l⁻¹). A tehéntej citromsav-tartalma a kis részben a vérből kerül a tejbe, döntő hányada a tőgy alveoláris sejtjei mitokondriumában a citrátkör, illetve a ciklus egyes intermedierjein (citromsav, izo-citromsav, α -ketoglutársav) keresztül a hozzá kapcsoló és a citoszolban működő izocitrát-dehidrogenáz-ciklus működése következtében keletkezik és kerül át a tejbe [Kirst, 1995].

A laktáló egészséges állatban sok egyéb tejalkotó makro- és mikrokomponenssel együtt a citromsav mennyisége is változik (csökken) a tejtermelés előrehaladtával, bár a

változás irányának kérdésében a kutatók között még nincs egyetértés. Sato és mtsai. [1998] egy éven át, két különböző állományból, egészséges tehenektől származó és a havi rendszeres mintavételek alkalmával vett nyerstej minták több más komponense mellett, azok citromsav-tartalmának változásait vizsgálta. Eredményeik alapján megállapították, hogy a nyerstejek citromsav-tartalma a laktóztartalomhoz hasonló változásokat mutat: a laktáció kezdeti szakaszában nagyobb koncentráció-értékek jellemzik, míg a tejtermelés előrehaladásával a tejek laktóz- és citromsav-tartalma párhuzamosan csökken. Kent és mtsai. [1998] anyakocák laktációjának korai szakaszából származó tejek citromsav koncentráció-változását vizsgálták. Megállapították, hogy a citrát fontos szerepet játszik a tej kalcium-tartalmának meghatározásában, mennyiségeik pedig fodítva változnak: a laktáció előrehaladtával a citromsav- csökken, míg a kalcium-koncentráció nő a tejben. Hasonló megállapításra jutottak Neville és mtsai. [1994] is női tejet és tehéntejet vizsgálva.

Bizonyos betegségek, előfordulása esetén a tejben jelenlevő citromsav-mennyiségnek kifejezett diagnosztikai jelentősége lehet. Bitman és mtsai. [1989] diabetesben szenvedő anyáknál vizsgálták a laktáció első hetében a női tej összetételének változásait és mérési eredményeiket összehasonlították az egészséges kontrollcsoport adataival. A beteg anyák teje citromsav-tartalom tekintetében nem mutatott eltérést az egészségesekétől. White és Davies [1958] szubklinikai mastitisben szenvedő és egészséges tehenek tejének összetételét vizsgálva a beteg állatok tejében citromsavtartalom-csökkenést állapítottak meg. Ugyanazon egyed egészséges és kórokozókkal fertőzött tőgybimbóiból származó tejminták összehasonlító analízise alapján megállapítást nyert, hogy a betegségben szenvedő állatok tejében mérhető citromsavtartalom-csökkenést a mastitis okozza [Oshima és Fuse, 1981]. Illek és mtsai. [1997] egészséges és szubklinikai ketózisban szenvedő tehenek tejének citromsav-tartalmát összehasonlítva megállapították, hogy az energiahányos állapotban levő egyedek tejében mért citromsav-koncentrációk kisebbek ($8,093 \pm 0,82 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$), mint az energiaegyensúlyban levő állatokban ($9,432 \pm 0,759 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$). Ugyanakkor a ketózis tüneteinek diagnosztizálásához alkalmazott ketonanyag-komponensek és a citromsav tejben (illetve más biológiai folyadékban) mérhető koncentrációi közötti összefüggés vizsgálatára vonatkozó irodalmi hivatkozást nem találtam, bár ennek a kapcsolatnak a vizsgálatát és értelmezését indokoltnak tartom.

2.2. A KETONANYAGOK ÉS A CITROMSAV VIZSGÁLATÁRA ALKALMAS ANALITIKAI MÓDSZEREK ÁTTEKINTÉSE

2.2.1. A ketonanyagok analitikai vizsgálata

Az analitikai módszerek történeti fejlődését tekintve jól nyomon követhető a biokémiai folyamatok megismerésével való párhuzam. Jelenleg még nincsenek teljesen felderítve sem az emberben, sem a kérődzőben zajló folyamatok. Nem tisztázott, hogy az egyes ketonanyag-alkotók mennyisége, egymáshoz viszonyított aránya vagy összes mennyisége milyen szerepet játszik a ketózis kóroktanában és diagnosztikai lehetőségeiben. A ketonanyagokkal foglalkozó eddig megjelent publikációk döntő többsége biokémiai, állatorvosi oldalról közelíti a problémakört, és azokban csak kevés analitikai módszertani hivatkozás található.

A rutin-analízisben alkalmazott módszerek általában csak az egyik vagy a másik ketonanyag mennyiségi meghatározására használhatók, és az előbb említett tisztázatlan biokémiai összefüggések miatt azok diagnosztikai értéke is megkérdőjelezhető.

Az elmondottakat lényegében összegzi az a tény, hogy a mai napig nem áll rendelkezésre referencia, összehasonlító vagy valamely nemzetközi szervezet által hivatalosan ajánlott eljárás az egyes ketonanyagok és az összketonanyag vérből, vizeletből, vagy tejből történő meghatározására.

2.2.1.1. A vizsgálati módszerek csoportosítása

Az eljárások alapvetően a félkvantitatív és a kvantitatív módszerek csoportjába sorolhatók.

A félkvantitatív módszerek általában kémiai reakciókon vagy enzimés meghatározási elveken alapuló kolorimetriás tesztek formájában valósulnak meg. Ezeket gyakran alkalmazzák a napi állatorvosi gyakorlatban, mivel gyorsan ugyan, de csak közelítő eredményt szolgáltatnak, és problémát jelent a különböző mintamatrixokban való felhasználhatóságuk (pl. a véranalízisben jól alkalmazható tesztek gyakran hibás eredményt szolgáltatnak vizelet- vagy tejmintákban).

A kvantitatív módszerek a meghatározás analitikai elve szerinti osztályozhatók. A korábbi manuális, kémiai reakciókon alapuló kolorimetriás módszereket mára már jórészt

felváltották a szelektív és érzékeny enzimes, illetve gázkromatográfiás eljárások, azonban ezek költség- és/vagy időigénye jelentős, így rutinmódszerként nem alkalmazhatók. A laboratóriumi körülmények között elvégezhető állományvizsgálat céljára az áramló injektálásos analitikai módszerrel (flow injection analysis, FIA) automatizált eljárások tűnnek a legmegfelelőbbnek, amelyekkel rövid idő alatt nagy számú minta elemezhető alacsony költségigénnyel [Marstorp és mtsai., 1983].

A módszerek analitikai elvük alapján történő felosztásukon kívül aszerint is csoportosíthatók, hogy az adott eljárással mely ketonanyag mennyisége határozható meg. Az irodalomban fellelhető eljárások egy része csak az acetont, vagy az acetont és az acetecetsavat, más része csak az acetecetsavat és/vagy a β -hidroxivajsavat mennyiségi meghatározására alkalmas. Az acetont meghatározásán alapuló módszerek úgy terjeszthetők ki a többi ketonanyag meghatározására is, ha azokat kémiai vagy enzimes mintaelőkészítési eljárással acetonná alakítják. Az acetont formában történő mennyiségi meghatározás azonban magában hordozza a konverzió problémáit. Az acetecetsav/ β -hidroxivajsav meghatározására alkalmas enzimes reakciókon alapuló eljárásokat általában nem használják összketonanyag mérésre, bár itt is lenne lehetőség az acetonná történő alakításra [Kimura és mtsai., 1985].

Azok a módszerek tehát, melyek egyszerre alkalmasak egyedi ketonanyagok és összketonanyag mennyiségi meghatározására, vagy idő- és költségigényesek, vagy nem megfelelően pontosak és megismételhetők, vagy pedig egyszerűen nem automatizálhatók.

2.2.1.2. Félkvantitatív eljárások (gyorstesztek)

Az állatorvosi és a humán orvosi gyakorlatban is már több mint 50 évre tekint vissza a különböző gyorsesztek alkalmazása, melyekkel a ketotikus állapot gyorsan, bár gyakran viszonylag gyenge megbízhatósággal igazolható (sok a hamis pozitív és negatív teszteredmény).

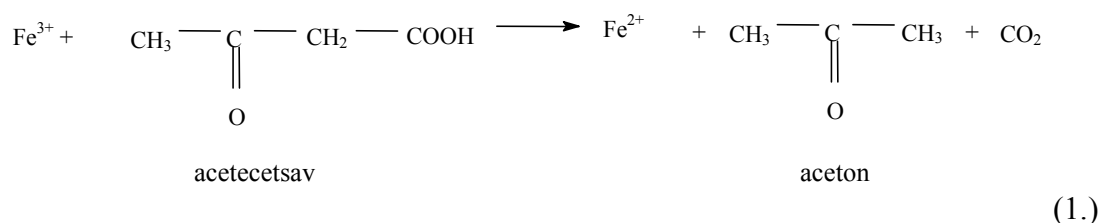
Az állatorvosi területen hazánkban elsősorban a vizeletből történő acetecetsav-tartalom meghatározása terjedt el, mert a tapasztalatok alapján ketózisban a vizelet ketonanyag-tartalma a legnagyobb, és 7-10 nappal megelőzi a ketózis klinikai tüneteinek megjelenését [Kégl, 1992]. Ehhez képest a vérplazmában és a tejben csak jóval alacsonyabb ketonanyag-mennyiség mérhető. A nemzetközi gyakorlatban [Gaál, 1999/a] és a humán orvosi területen inkább a vér acetecetsav vagy β -hidroxivajsav mennyiségét mérik. A

gyakorlati körülmények között kivitelezhető szemikvantitatív módszerekkel mindhárom biológiai folyadék ketonanyag-tartalma vizsgálható.

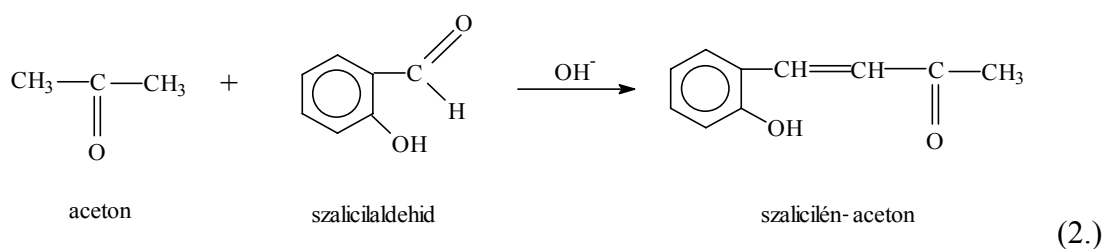
A felhasználásra kerülő ketonanyag-tesztrendszerek analitikai elvüket tekintve két fő csoportba sorolhatók: kémiai kolorimetriás és enzimes eljárások különböztethetők meg. Technikai megvalósításuk változatos, a forgalomba kerülő tesztek között folyadék reagensek, tesztsíkok vagy tabletták egyaránt megtalálhatók. Kiértékelésüknél általában az 1+...5+ színintenzitási skálát alkalmazzák.

A kémiai színképzési reakciókon alapuló meghatározási módszerek további alcsoportokba sorolhatók a színképző kémiai reakciók szerint:

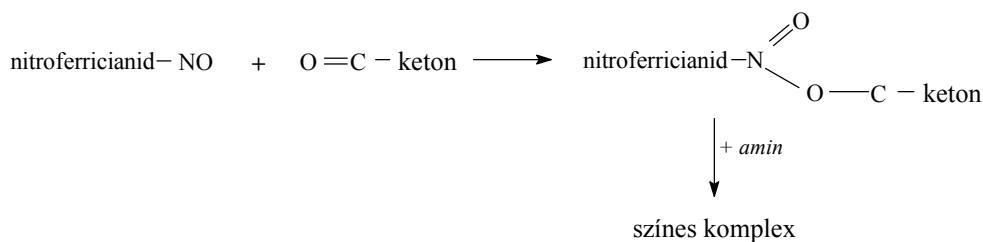
- *Vas(III)-kloridos tesztek* (1. reakcióegyenlet), melyek elsősorban vizeletből történő acetecetsav meghatározására szolgálnak (pl. Gerhardt teszt). A pozitív reakció (a vizeletben az urobilinogén jelenléte miatt) mélyvörös szín kialakulásával jár.



- *Szalicilaldehides tesztek* (2. reakcióegyenlet) vérből, vizeletből vagy tejből való acetontartalom meghatározására (Behre- és Frommer tesztek). A pozitív reakciót narancs színű elszíneződés kíséri.



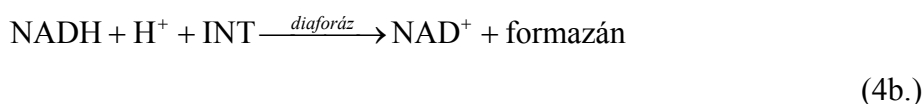
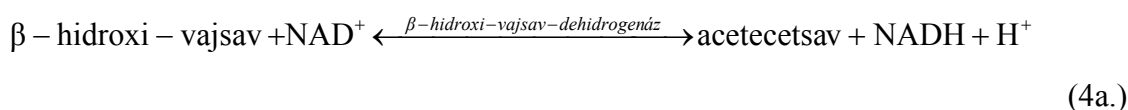
- *Nátrium-nitroprusszidos tesztek* (3. reakcióegyenlet) aceton és acetecetsav vizeletből, tejből és vérből történő meghatározására (Legal, Acetest, Ketostix, Ross és Rothera tesztek). A pozitív teszteredményt lila szín megjelenése jelzi.



(3.)

Az enzimes reakción alapuló β -hidroxi-vajsavra/acetecetsavra érzékeny tesztek általában alkalmasak mindhárom említett biológiai folyadékából az analízis elvégzésére (BHB- és Ketolac teszt tejvizsgálatra).

- A meghatározás elvét a 4a. reakcióegyenlet mutatja be. A β -hidroxi-vajsav-dehidrogenáz enzim jelenlétében a reverzibilis enzimreakció pH=7-nél a β -hidroxi-vajsav, míg magasabb pH-értékeknél (pH>7,6) az acetecetsav irányába tolódik el. Attól függően, hogy a pH-t milyen értékre állítják, mindkét komponens meghatározható. A detektálás gyors tesztek esetén általában egy kapcsolt formazán-képzési reakció (4b. reakcióegyenlet; INT: jodo-nitro-tetrazónium-klorid) segítségével történik, melyben lila színű reakciótermék (formazán) keletkezik.



Számos tanulmány látott napvilágot a különböző tesztek összehasonlításával és azok diagnosztikai lehetőségeinek vizsgálatával, értékelésével kapcsolatban. Killander és mtsai. [1961] négy különböző vizeletteszt összehasonlító elemzése után arra a következtetésre jutottak, hogy az általuk vizsgált Ketostix, Gerhardt, Acetest és Legal tesztek sokkal érzékenyebbek acetecetsavra, mint acetone. Ezek a tesztek jól alkalmazhatók, hiszen kóros állapotban a vizeletben általában sokkal nagyobb mennyiségben van jelen az acetecetsav, mint az acetone. Hasonló megállapítást tett Shultz és Myers [1959] is. Fraser és mtsai. [1964] a Ketostix és a Rothera tesztek alkalmazhatóságát vizsgálták humán betegek esetén és jelentős eredménykülönbségeket találtak a vizeletből és a vérből nyert teszteredmények között. A vizelettel végzett vizsgálatok sokkal erősebb pozitív reakciót adtak, mint a vérrel elvégzettek. Csako [1987] azt tanulmányozta, hogy miért adnak gyakran hamis pozitív eredményt a vizelettel végzett nátrium-nitroprusszidos tesztek. A tapasztaltak magyarázatának a savas közegben levő szabad szulfhidril-csoportok nagyobb mennyiségű jelenlétét tekintette, amelyek fokozzák a nitroprusszid reaktivitását és ezáltal hamis pozitív eredményt szolgáltatnak. Heydrych és Więckowski [1991] szalicilaldehides tejacetone-tesztek állománymonitorozásra való alkalmazását javasolta, mellyel gyorsan és könnyen kiszűrhetők a kezelésre szoruló állatok. Dirksen és Breitner [1993], valamint Yorritsma és mtsai. [1998] a β -hidroxi-vajsav enzim teszt tejben való alkalmazását vetették fel állománymonitorozás

céljára. A Ketolac teszttel tejben $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ β -hidroxi-vaajsav-koncentrációnál nagyobb eredmény a tehenek szubklinikai ketózisát igazolta, míg a vérben $1,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ felett igényelték az állatok kezelést.

2.2.1.3. Kvantitatív eljárások

2.2.1.3.1. Spektrofotometriás eljárások

A kémiai reakciókon alapuló kolorimetriás meghatározások elvi alapjának lefektetése Thin és Robertson [1952] nevéhez köthető, melyet a '70-es évek elejéig többen optimaltak [Procos, 1961; Steger és Voigt, 1970].

Az eljárások a biológiai folyadékokban (vér, vizelet, tej) jelenlevő egyes ketonanyagok különböző oxidációs módszerekkel történő acetonná alakításán, majd a keletkezett aceton színképző reakcióba (lásd: 2. reakcióegyenlet) vitelét követő mennyiségi meghatározásán alapulnak. A biológiai mintákat szükség esetén először bárium-hidroxidos és cink-szulfátos kezeléssel fehérjementesítették. A szabad aceton meghatározását egy kettős falú zárható mikrodifúziós edényben (Conway-edény) hajtották végre, melynek belső terébe került a színképző reagens, a külső térbe pedig a minta. Az edényt meghatározott ideig termosztálták, miközben a minta acetontartalma átdiffundált a belső térbe és az ott levő lúgos szalicilaldehiddel reagálva jól kolorimétrálható narancsvörös színű terméké alakult, melynek színintenzitása arányos az aceton mennyiségével [Thin és Robertson, 1952].

A módszer kritikus pontja az acetecetsav és a β -hidroxi-vaajsav acetonná történő konverziója. Az acetecetsav savas közegben dekarboxileződik és acetonná alakul, ami zavarja a szabad aceton meghatározását. Ez a hatás lúgos reagens alkalmazásával küszöbölhető ki. Amennyiben az aceton és acetecetsav együttes mennyiségének meghatározása szükséges, a mintát magas hőmérsékleten ásványi savval hidrolizálják, majd az előbb ismertetett módon mérik az aceton mennyiségét. A β -hidroxi-vaajsavval egyesített összketonanyag meghatározáshoz a mintát magas hőmérsékleten hosszabb ideig oxidatív (ásványi sav + kálium-bikromát) reagenssel kezelik és a keletkezett konverziós terméket mérik. A módszerfejlesztések a színképző, a savas és az oxidatív reagensek kémiai összetételének és alkalmazott mennyiségének, valamint a hőkezelések idejének optimalására irányultak (5. táblázat).

A kémiai konverzió elvének mint mintaelőkészítési módszernek a megtartásával, és/vagy annak az enzimes konverzió irányába történő továbbfejlesztésével a gázkromatográfiás eljárásoknál ma is találkozunk.

Irodalmi hivatkozás	Lúgos reagens (aceton)	Savas reagens (aceton+acetecetsav)	Oxidatív reagens (összketonanyag)	Átlagos visszanyerések		
				acetonra	acetecetsavra	β -hidroxivajsavra
Thin és Robertson, 1952	4 mol·l ⁻¹ KOH	10 mol·l ⁻¹ H ₂ SO ₄ (5' refluxon)	7,8 mol·l ⁻¹ H ₂ SO ₄ + 1,5 % K ₂ Cr ₂ O ₇ (10' refluxon)	100%	85%	60%
Procos, 1961	4 mol·l ⁻¹ KOH	10 mol·l ⁻¹ H ₂ SO ₄ (10' refluxon)	10 (6,2) mol·l ⁻¹ H ₂ SO ₄ + 0,5 % K ₂ Cr ₂ O ₇ (10' refluxon)	100%	100%	100%
Steger és Voigt, 1970	4 mol·l ⁻¹ KOH	10 mol·l ⁻¹ H ₂ SO ₄ (5' 100°C-on)	10 mol·l ⁻¹ H ₂ SO ₄ + 0,5 % K ₂ Cr ₂ O ₇ (30' 100°C-on)	100%	nincs adat	98,7%

5. táblázat: Néhány manuális kémiai kolorimetriás ketonanyag-meghatározási módszer összehasonlítása

A klinikai rutinanalitikában elsősorban az előbbi módszereknél szelektívebb és érzékenyebb enzimes meghatározási módszereket alkalmaznak. A meghatározások elvi alapját a β -hidroxivajsav redox-koenzim-függő acetecetsavvá (vagy az alkalmazott pH függvényében fordítva) történő enzimes átalakítása képezi, melyet elsőként Williamson és mtsai. [1962] publikáltak. (Ilyen alapon működő tesztek is forgalomba kerültek és a mai napig használatban vannak.) Mindkét irányú reakciót a *β -hidroxivajsav-dehidrogenáz* enzim katalizálja. A reakcióban keletkezett/fogyott redox koenzimek UV-spektrofotometriásan, fluorimetriásan vagy színképző reakció kapcsolásával kolorimetriásan is detektálhatók. Az egyes módszerváltozatok az alkalmazott pH, redox koenzim, illetve a kapcsolt reakciók tekintetében különböznek egymástól.

A Williamson és mtsai. által közölt módszer elvét is a 4a. reakcióegyenlet mutatja be. A reakció egyensúlya pH=8,5-en teljesen az acetecetsav, pH=7-en pedig a β -hidroxivajsav irányába tolódik el. Így a reakcióelegy pH-jától függően a minta acetecetsav-, illetve β -hidroxivajsav-tartalma is meghatározható a redukált/oxidált NAD fogyasztásának vagy keletkezésének UV-spektrofotometriás (340 nm) mérésével. A módszert eredetileg heparinózott és perklórsavval fehérjementesített vérminták analízisére dolgozták ki, de publikálása óta más biológiai mintamatrixok és élelmiszerek vizsgálatára is adaptálták. Az eljárás érzékeny, alacsony koncentráció-tartományokban (0,046 mmol·l⁻¹ felett) is jól alkalmazható, időigénye mintaelőkészítéssel együtt kb. 1 óra. Hátránya, hogy mintaignéye

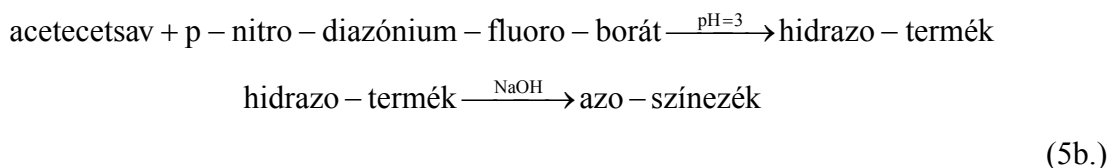
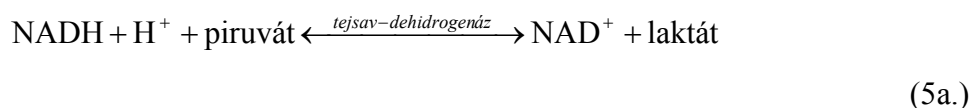
nagy, vérből 3 ml. Alkalmazásával a visszanyerési százalék acetecetsavra $99\pm 6,25\%$, β -hidroxi-vajsavra $104\pm 5,75\%$. Williamson és mtsai. elvégezték az acetecetsavra vonatkozó stabilitási vizsgálatokat is, és megállapításaik szerint a mintákat $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ alatt tárolva az acetecetsav spontán dekarboxileződése megakadályozható.

Az előbbi módszer egyszerűsített változatát képviseli a Työppönen és Kauppinen [1980] által publikált eljárás. A NAD-koenzim abszorbancia változásait UV-spektrofotometriásan (340 nm-es hullámhosszon) követve, ugyancsak meghatározható mind a két ketonanyag. A reakció egyensúlya $\text{pH}=9,5$ -en az acetecetsav, míg $\text{pH}=6,9$ -en a β -hidroxi-vajsav képződés irányába tolható el. A kutatók szintén vizsgálták a ketonanyagok stabilitását, és arra a megállapításra jutottak, hogy hosszabb idejű (6-8 hétig tartó) $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os mintatárolás mellett az acetecetsav és a β -hidroxi-vajsav is stabil, visszanyeréseik nem változnak.

Fontos megemlíteni a *fluorimetriás detektálási módszereket* bár rutinanalitikai jelentőségük kisebb. Ezek szintén az előzőekben már többször említett enzimikus reakcióban (4a. reakcióegyenlet) a NADH fluoreszcencia-változásán alapulnak. E módszerek nagy előnye, hogy igen kis mintamennyiségekből (0,1-0,2 ml) tesznek lehetővé pontos meghatározásokat [Young és Renold, 1966]. Olsen [1970] összevetette a korábbi eljárásokat és az általa kifejlesztett fluorimetriás módszert és az előző módszerekkel kapcsolatban kritikaként megjegyezte, hogy azoknál problémát jelentett a mintamátrixban levő egyéb redox komponensek jelenléte, melyek zavarták a NADH reakciót. Azt is hátrányukként említette, hogy a korábbi eljárásoknál, melyeket nagyobb mennyiségű (néhány ml) mintából végeztek el, a fluoreszcenciás detektálásnál gyakran nem volt lineáris az összefüggés az emittált fluoreszcencia-intenzitás és a koncentráció között, ami egyedi kalibrációs összefüggések megállapítását követelte meg minden mintára.

Az enzimikus alapszámítás egyik, *kolorimetriás detektálás* alapuló változatát képviseli a 4a. és 4b. reakcióegyenletekkel korábban már ismertetett eljárás [Bergmeyer és Bernt, 1965]. Itt az enzimikus reakciót színeképző reakcióval kapcsolják. A jodo-nitro-tetrazónium-kloridból (INT) keletkező színes termék 492 nm -en kolorimetrálható. Az eljárás különféle mintaelőkészítési eljárásokkal vér, vizelet, tej és élelmiszerek analízisére egyaránt alkalmas.

A vérszérum acetecetsav és β -hidroxi-vajsav tartalmának meghatározására használható másik kolorimetriás módszert Harano és mtsai. [1983] publikálták. Az enzimikus alapreakció megegyezik az előzővel (lásd: 4a. reakcióegyenlet). A kapcsolt színeképző reakciósort a 5a. (β -hidroxi-vajsav) és 5b. (acetecetsav) reakcióegyenlet mutatja be.



A keletkezett, 645 nm-en kolorimétrálható azo-színezék moláris abszorbanciája mintegy ötszöröse a NAD-énak. A vérminták aszkorbinsav-tartalma nem, azonban az oxálecetsav-tartalom reagál a diazóniumsóval, nagyobb mennyiségben tehát zavarja a meghatározást.

Az enzimes alapú UV-spektrofotometriás, kolorimetriás és fluorimetriás detektálású módszerek érzékenysége nagyjából megegyezik a kémiai reakciókon alapuló kolorimetriás meghatározásokéval, de lényegesen gyorsabbak azoknál.

Az enzimes reakciók UV-spektrofotometriás és kolorimetriás detektálású vér-, vizelet- és tejmintákra adaptált változatai képezik a ketózisos tehének β -hidroxi-vajsav (ritkábban aceticetsav) meghatározásának gyakorlatban vagy rutinvizsgálatokban alkalmazott analitika háttérét [Andersson, 1984; Andersson és Emanuelson, 1985; Dargel, 1987; Shizuo és mtsai., 1987].

2.2.1.3.2. Kromatográfiai módszerek

A kromatográfiai módszerek között a nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiai (high performance liquid chromatography, HPLC) eljárások mellett a gázkromatográfiai (gas chromatography, GC) eljárások alkalmazása meghatározó a ketonanyagok (elsősorban az oxidált formák) vérből, vizeletből vagy tejből történő mennyiségi analitikájában.

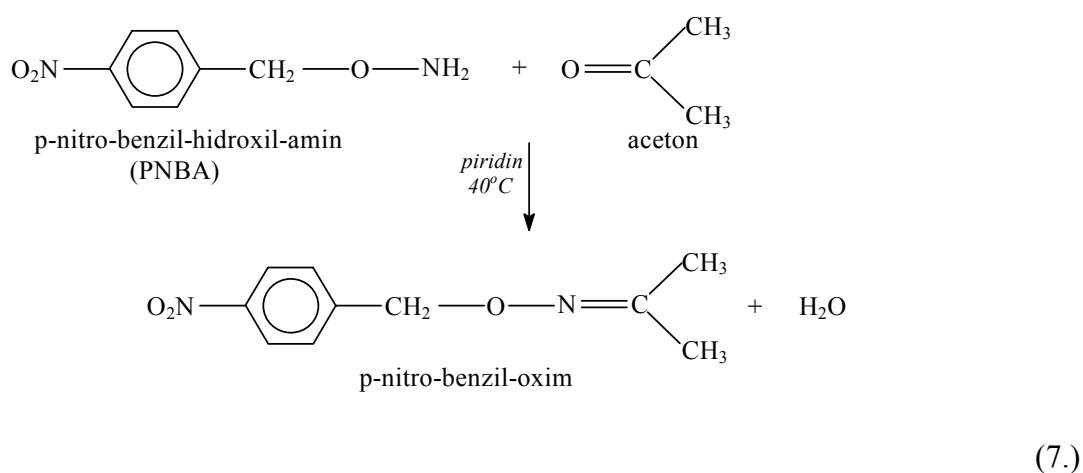
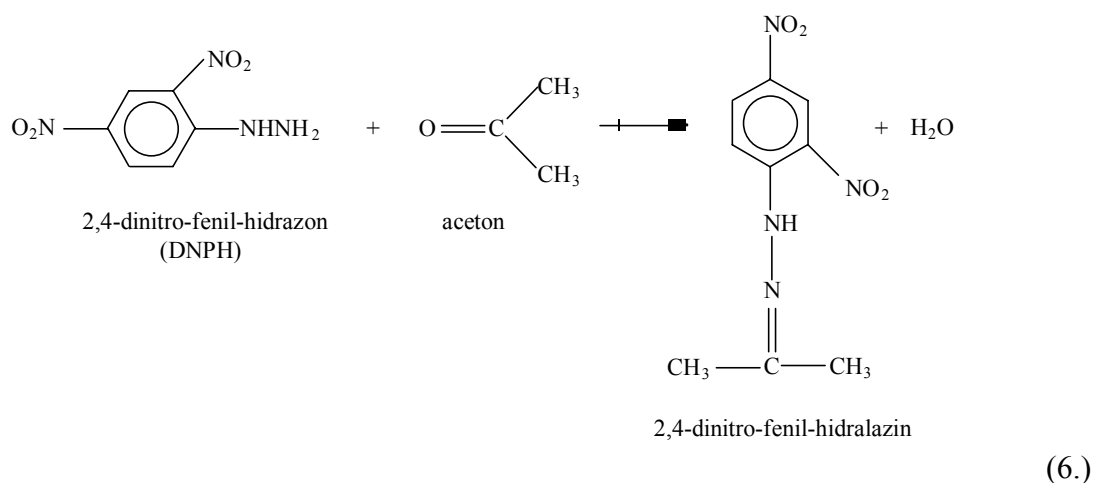
A vékonyréteg-kromatográfiát (thin layer chromatography, TLC) csak minőségi analitikai eljárásként alkalmazzák. Rink és Herrmann [1963] acetone és aceticetsav elválasztását vizsgálta cellulóz alapú állófázison metanol/víz/ammónia, illetve n-propanol/ammónium-karbonát eluenskeverékeket alkalmazva. A detektálást 2,4-dinitro-fenilhidrazonos előhívással (elvé: 6. reakcióegyenlet) végezték. A két ketonanyag-komponens mindkét vizsgált eluens alkalmazásával jól elvált.

Az eljárások gyakorlati jelentősége a többi eljáráshoz képest elhanyagolható.

2.2.1.3.2.1. Nagyhatékonyságú folyadékkromatográfia

Az acetontartalom meghatározására alkalmas HPLC-s módszerek származékképzésen alapulnak, mivel az aceton natív állapotban folyadékkromatográfias módszerrel nem határozható meg.

A biológiai minták acetontartalmának meghatározására kifejlesztett módszerek leggyakrabban a 2,4-dinitro-fenil-hidrazon (6. reakcióegyenlet) vagy p-nitro-benzil-hidroxil-amin (7. reakcióegyenlettel) reagensekkel végzett származékképzésen alapulnak [Lingemann és Underberg, 1990].



Brega és mtsai. [1991] DNPH-származékképzésen alapuló vizsgálati eljárást dolgoztak ki humán vér- és vizeletminták acetontartalmának elemzésére. A diabeteses betegektől származó, K₂EDTA antikoagulánssal és hűtéssel (+4 °C) előkészített vérmintákat acetonitrillel fehérjementesítették (mely egyben megakadályozta a keletkező DNPH-

származékok kikristályosodását a reakcióelegyből), a vizeletmintákat pedig 0,2 µm-es pórusátmérőjű szűrőn szűrték. Sósavas 2,4-dinitro-fenil-hidrazon reagenst alkalmazva a származékképzési reakció 5 perc alatt végbement. A folyadékkromatográfiás elválasztást C₁₈-as fordított fázisú oszlopon, acetonitril/víz eluenssel végezték UV-detektálás mellett. Az aspecifikus származékképzési reakcióban keletkezett hidrox-aceton (acetol) és acetecetsav-származékok a meghatározást nem zavarták. A szerzők megállapítása szerint a módszerrel (az acetonszármazék 2,7 perc körüli retenciós idejét figyelembe véve) 5 óra alatt akár 100 minta is elemezhető.

Diabeteses eredetű ketoacidózisban szenvedő patkányok és humán páciensek éhezést követően levett vérmintáira acetol-DNPH-származékolásos HPLC-s eljárást fejlesztett ki Casazza és Fu [1985]. Az állati vérminták acetol-tartalma 11,2, míg a humán mintáké 16 nmol·ml⁻¹ volt. A szerzők szerint az acetol jelenléte a vérben – emelkedett acetol és acetecetsav koncentrációk mellett – arra utal, hogy az acetecetsavból történő glükózképzés az acetonná, acetollá és 1,2-propán-diollá alakuláson keresztül valósul meg.

2.2.1.3.2.2. Gázkromatográfia

A közvetlen (származékképzés nélküli) gázkromatográfiás módszerek a kémiai kolorimetriás eljárásokhoz hasonlóan általában csak a vizsgálandó minták acetontartalmának meghatározását teszik lehetővé, mivel a többi ketonanyag-alkotó kevésbé illékony, bomlás nélkül nem párologtatható el.

Ismertek az irodalomban olyan származékképzésen alapuló eljárások, amelyekkel a β-hidroxi-vajsav meghatározására is lehetőség nyílik. A Staruszkiewicz és mtsai. [1970] által kidolgozott módszer elvi alapja, hogy a minta β-hidroxi-vajsav tartalmát BF₃-propanol reagenssel reagáltatva a β-hidroxi-vajsav propil-észterét lehet előállítani. A reakcióelegyből ezután kloroformos extrakcióval nyerhető ki az észter. Dietilén-glikol-szukcinát tartalmú töltött oszlopon izoterm körülmények között a propil-észter jól elválasztható. Acetofenon belső standarddal a minta β-hidroxi-vajsav-tartalma a csúcsterületek arányából számítható. A módszert tojásmintákra alkalmazva a visszanyerési százalékok 90% felettinek adódtak.

A származékképzés nélküli módszerek további felosztásának alapját a mintavételi eljárás különbözősége képezi. Eszerint megkülönböztethetők a minta folyadékfázisából és a gőzfázisából (headspace gas chromatography, HS-GC) történő mintavételt alkalmazó módszerek.

A *folyadék-minta injektálását alkalmazó meghatározási módszerek* ismertek tej- és tejtermékek illó komponenseinek (pl. aceton, izopropanol) mennyiségi analitikájában [Palo és Ilková, 1970]. Az elválasztást Porapack Q és Porapack P jelű adszorbensekkel töltött vegyes töltetű oszlopon, lángionizációs detektorral (flame ionization detector, FID), acetonitril belső standardot alkalmazva végezték. A folyadék-minták mintaelőkészítése a minták pH-jának 7,5-8-ra történő beállítása volt.

A folyadékfázisból történő mintavételes GC-módszerek tovább osztályozhatók az egyes ketonanyag-alkotók acetonná történő konverziója alapján. Ismertek *enzimes* és *hőkonverziós*, sőt e kettőt egyesítő módszerek [Siegel és mtsai., 1977]. Az enzimes átalakítást és hőkonverziót együtt alkalmazó eljárás során egy lépésben meghatározható a vérszérum minta összketonanyag tartalma. A konverziós folyamatok lényegét a 4a. és 5a. reakcióegyenlet szerinti enzimes átalakítások képezik, melyet az acetecetsav hő hatására történő dekarboxilezési reakciójával egészítettek ki. A reakciósor eredményeként a minta összketonanyag-tartalmával megegyező mennyiségű aceton keletkezik, ami már közvetlenül gázkromatografálható. Az elválasztást Porapack adszorpciós oszlopon végezve az összketonanyagra kapott visszanyerés 92,3% fölött volt.

A *headspace* technika ketonanyag-meghatározás-célú alkalmazása azonban áthidalja a folyadékfázisból történő meghatározás nehézségeit, ugyanis az időigényes mintaelőkészítési lépések nélkül, az aceton (illékonyága miatt) közvetlenül meghatározható a termosztált minta feletti egyensúlyi gőztérből vett mintából. A módszerek további csoportosítása hasonlóan a folyadékfázisú technikákhoz, a konverziós megoldások alapján történhet.

A *kémiai konverziós headspace eljárások* esetén a spektrofotométeres módszereknél ismertetett többlépéses oxidációs megoldásokat alkalmazzák. Eriksson [1972] perklórsavval fehérjementesített vér- és májszövet, Hradecký és mtsai. [1978] natív vér-, tej-, vizelet- és magzatvíz-minták, míg López-Soriano és Argilés [1985] vérplazma-, máj-, vese- és tüdőszövet-homogenátum-minták aceton-formában történő ketonanyag-meghatározását végezte el HS-GC-technikával. Mindhárom szerző optimalta a lúgos, savas és oxidatív reagensek kémiai összetételét és az egyes kezelések idejét. Az 6. táblázatban a továbbfejlesztett eljárások főbb jellemzőit foglaltam össze.

Irodalmi hivatkozás	Lúgos reagens (aceton)	Savas reagens (aceton+acetecetsav)	Oxidatív reagens (összketonanyag)	Átlagos visszanyerés		
				acetonra	acetecetsavra	β -hidroxivajsavra
Eriksson, 1972	3 mol·l ⁻¹ KOH	0,6 mol·l ⁻¹ HClO ₄	7,8 mol·l ⁻¹ H ₂ SO ₄ + 0,46% K ₂ Cr ₂ O ₇	100%	101%	83-86%
Hradecký és mtsai., 1978	5 mol·l ⁻¹ KOH	5 mol·l ⁻¹ H ₃ PO ₄	5 mol·l ⁻¹ H ₃ PO ₄ + 0,1 mol·l ⁻¹ K ₂ Cr ₂ O ₇	100%	100%	100%
Lopez-Soriano és Argilés, 1985	3 mol·l ⁻¹ NaOH	0,6 mol·l ⁻¹ HOCl	5 mol·l ⁻¹ H ₃ PO ₄ + 0,2 mol·l ⁻¹ K ₂ Cr ₂ O ₇	100%	99,5%	91%

6. táblázat: Kémiai konverziós eljárások körülményei ketonanyagok gázkromatográfias meghatározásaihoz

Eriksson 0,5 ml minta vizsgálatával acetoacetátra 101, β -hidroxivajsavra 83-86%-os visszanyerést ért el RSD%=5-9 közötti hiba mellett. Hradecký és mtsai. vizsgálataik alapján megállapították, hogy az aceton tenzióját a hőmérséklet növelésén kívül kálium-szulfát hozzáadásával is lehet növelni, ami egyben a mátrixhatást is ellensúlyozza. A savas reagensekben foszforsavat használva kénsav helyett gyorsítható a dekarboxilálás, és a β -hidroxivajsav krotonsavvá alakulása is megakadályozható. Az oxidatív reagensként hagyományos bikromát-kénsav elegyet bikromát-foszforsav eleggyel helyettesítve a konverzió fok 80-85%-ról 100%-ra növelhető. A kidolgozott módszerrel 0,2 ml vér-, tej-, magzatvíz vagy vizeletmintából mindhárom ketonanyagra 100%-os konverziót értek el. A módszer reprodukálhatósága RSD%=2,5 volt. Megállapították továbbá, hogy a kémiai konverziót minden olyan, a mintában jelenlevő anyag zavarhatja, mely a konverzió körülményei között acetonná vagy más zavaró komponenssé képes átalakulni (pl. glükóz, fruktóz, laktóz, laktát stb.). López-Soriano és Argilés 0,125 ml mintából acetecetsavra 99,53%, β -hidroxivajsavra 91,04% visszanyeréseket értek el RSD%=1,5-3,6 hibával.

Az *enzimes konverziós headspace módszerek* alapját leggyakrabban a már többször hivatkozott 4a. reakcióegyenlet szerinti enzimes reakció képezi. Kimura és mtsai. [1985] humán egészséges és diabetes-ben szenvedő betegek vérmintáinak analizésére a *β -hidroxivajsav-dehidrogenáz/laktát-dehidrogenáz* enzimrendszert alkalmazta. β -hidroxivajsavra 0,02 mmol·l⁻¹ detektálási határt és 97,9% visszanyerést értek el. Az eljárás érdekessége, hogy az acetecetsav acetonná történő átalakítását *acetoacetát-dekarboxiláz* enzim segítségével végezték. A piruvát azonban az említett enzim kompetitív inhibitora, és ugyancsak gátolja az enzim aktivitását nagyobb mennyiségű etil-metil-ke-ton (2-butanon) belső standard alkalmazása is.

Az újabb, *tömegspektrometriával (mass spectrometry, MS) kapcsolt gázkromatográfias (GC-MS) módszerek* a GC nagy felbontóképességét a tömegspektrométer nagy szelektivi-

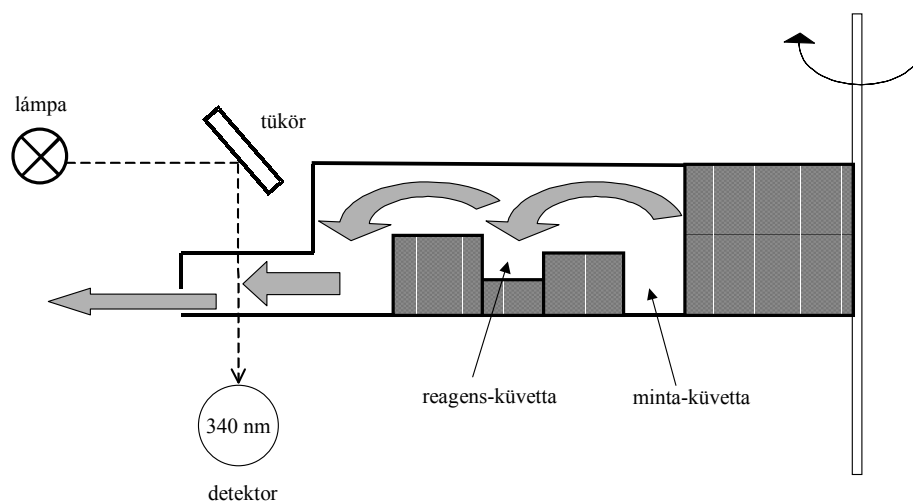
tásával egyesítik. Dobbelaar és mtsai., [1996] GC-MS kombináció alkalmazásával vizsgálták a ketózisos állatok által kilélegzett levegő acetontartalmát. Az acetontartalom jó korrelációt mutatott a vérszérum β -hidroxi-vajsav ($r=0,81$), illetve a tej oxidált ketonanyag-tartalmával ($r=0,70$). A *HS-GC-MS* kombinációval, nagy pontossággal határozható meg vér-, vizelet- és tejminták acetontartalma, bár az eljárás meglehetősen költséges [Winterbach-Hanlie és Apps, 1991].

Az előző fejezetekben bemutatott eljárások vagy olcsón és gyorsan, de viszonylag gyenge megbízhatósággal (félkvantitatív eljárások), vagy megbízhatóan, ám jelentős költség- és időfelhasználással (kvantitatív eljárások) tesznek lehetővé analitikai meghatározásokat. A következő fejezetben bemutatásra kerülő automatizált analitikai rendszer (áramló injektálós analitika, FIA) a gyors tesztek és a kvantitatív eljárások előnyeit egyaránt magában hordozza.

2.2.1.4. Automatizált analitikai rendszerek

A nedveskémiai analitikai módszerek automatizálása alapvetően kétféle módon képzelhető el. A *tételes analízis* során a meghatározás egyes lépései elkülönülten mennek végbe, így az egymást követő minták nem okozhatnak átszennyeződést. Az ilyen elven működő analizátorok azonban technikailag rendkívül bonyolultak [Tömösközi, 1992/a]. Nywayhid és mtsai. [1988] a β -hidroxi-*vajsav-dehidrogenáz* enzim által katalizált egyensúlyi enzimreakció elvén működő automatizált mérőrendszert dolgoztak ki diabetesben szenvedő emberek vérérszám-mintáiból történő acetecetsav és β -hidroxi-*vajsav* együttes mennyiségének meghatározására. A meghatározásokat Multistat III típusú centrifugálanalizátorral végezték el, melynek működési elvét a 8. ábra mutatja be.

A vizsgálat analitikai alapját a már korábban ismertetett enzimes reakció (4a. reakcióegyenlet) képezi.



8. ábra: Az acetecetsav/ β -hidroxi-*vajsav* tartalom meghatározására alkalmazott Multistat III típusú centrifugálanalizátor működési elve

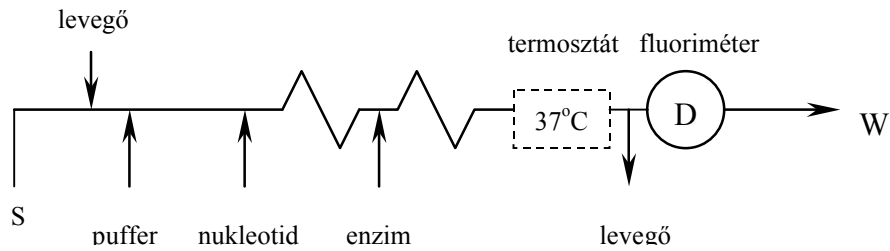
Az acetecetsav β -hidroxi-*vajsav*vá történő redukciója redukált NAD-felesleg és pH=7 mellett teljes mértékben végbemegy, míg az inverz oxidációs reakció oxidált NAD-feleslegnél és pH=9,5-en ad mennyiségi átalakulást. Az analízist két lépésben végezték el. A vizsgálati mintát, az enzimet és a redukált NAD-ot pH=6,9-re pufferelve a minta-küvettába, az oxidált NAD pH=9,5-re pufferelt oldatát pedig a reagens-küvettába helyezték. A rotort ezután 10 percig 30 °C-on termosztálták, aminek következtében a minta acetecetsav-tartalma β -hidroxi-*vajsav*vá alakult. Ezután a rotort a készülékbe helyezték, és megindították a centrifugálást. A

centrifugálás hatására a minta-küvetta tartalma átkerült a reagens-küvetába, ahol az oxidációs lépés végbement. E lépés mérésbe iktatásának oka, hogy az oxidált NAD-nak a detektálás hullámhosszán (340 nm) kicsi a háttér-abszorbanciája. A detektorban a 10 másodperc múlva mérhető abszorbancia-növekedést detektálták (oxidált NAD-fogyás). A módszer előnye, hogy gyors és megbízható eredményt szolgáltat kis mennyiségű (2 µl) vérszérum-mintából, azonban alacsonyabb koncentrációk mérésére (2,5 mmol·l⁻¹ alatt) a szerzők nem tesztelték. Hasonló megoldást dolgoztak ki Harano és mtsai. [1985] vérszérum- és vizeletminták acetecetsav- és β-hidroxi-vajsav tartalmának meghatározására. Az analitikai elv azonos az előbb ismertetettel, azzal a különbséggel, hogy ez esetben a redukciós és az oxidációs lépés után is történt detektálás (340 nm-en abszorbancia-növekedés és -csökkenés), mellyel a két vizsgált ketonanyag alkotó külön-külön is meghatározható volt. A centrifugálanalizátor ebben az esetben egy automatikus bemérő egységgel egészült ki. A vizsgált koncentrációtartomány pedig egy nagyságrenddel kisebb volt, mint az előbb ismertetett. A módszer egyszerre 26 minta vizsgálatát tette lehetővé.

A mérések automatizálásának másik lehetősége a folyadékáramoltatásos analitika (flow analysis, FA), melynél a meghatározás folyamatos folyadékáramban történik. E technika flexibilitásának köszönhetően számos analitikai eljárás automatizálására kínál alkalmat, elsősorban a környezeti analitika, az orvosi és állatorvosi diagnosztika, valamint az élelmiszervizsgálatok területén.

A FA technikákat alapvetően további két csoportba lehet sorolni. A történetileg is első *buborékszegmentált* (segmented flow analysis, SFA) és az *áramló injektációs* (flow injection analysis, FIA) technikákra.

A buborékszegmentációs analitikai technika általában gyors, pontos, azonban a mintazónákat elválasztó levegőbuborékokat a detektor előtt el kell távolítani, mert azok zavarják a detektálást [Ružička és Hansen, 1988]. Levegőszegmentációs enzimikus elvű fluorimetriás FA-eljárást fejlesztettek ki Ozand és mtsai. [1975] acetecetsav és β-hidroxi-vajsav meghatározására patkány- és humán vérminták elemzésére. A modulrendszerű Technicon Analyzer berendezés kis módosítással alanin, piruvát, laktát és glükóz meghatározását is lehetővé tette a vizsgálati mintákból. A mérőrendszer felépítését a 9. ábra foglalja össze.

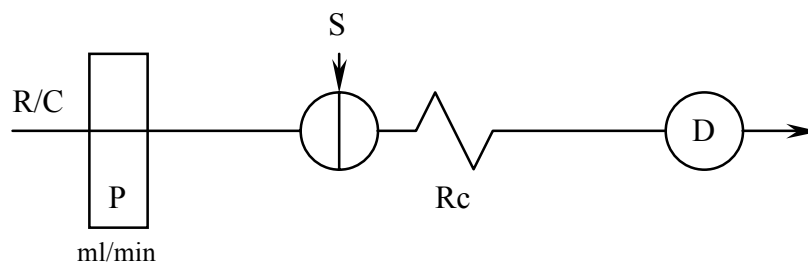


9. ábra: Az acetecetsav/ β -hidroxi-vajsav tartalom meghatározására alkalmazott Technicon Analyzer felépítése (S: minta, D: detektor, W: regdő)

Az eljárás gyors, az analízisidő minta-előkészítéssel együtt 20 perc alatt maradt. A módszer reprodukálhatósága $RSD\%=2,8$. A szerzők a β -hidroxi-vajsav és acetecetsav standardokra vonatkozó visszanyeréseket 98-101% közötti értékekben állapították meg.

2.2.1.4.1. A FIA analitika elve

A FIA-technika alkalmazásakor [Ružička és Hansen, 1988] folytonos vivőfolyadék áramba injektáljuk be a minta kismennyiségű részletét. A szükséges reagenseket vagy a hordozófolyadék (carrier, C) tartalmazza, vagy később, a detektor felé vezető úton adják a mintához. A minta (sample, S) és a reagensek (reagent, R) kölcsönhatásával történik meg a reakcióspirálban (reaction coil, Rc) az analitikai jelet szolgáltató reakció. A detektorban (detector, D) az analitikai jel regisztrálása folyamatosan, átfolyócellás megoldással történik (10. ábra).



10. ábra: Az áramló injektálásos analitikai rendszer (FIA) felépítése (R: reagens, C: hordozófolyadék, P: pumpa, S: minta, Rc: reakcióspirál, D: detektor)

A hordozófolyadékba injektált minta az injektálás helyétől a detektor felé vezető úton konvekciós és diffúziós folyamatok következtében felhígul. Mivel a FIA dinamikus mérési módszer, sem a diszperziós folyamatoknak, sem pedig az analitikai jelet szolgáltató kémiai reakcióknak nem kell elérniük az állandósult állapotot, vagyis például ha a detektálás a kémiai reakcióban kialakult szín intenzitásának mérésével történik, a színintenzitást nem a maximális intenzitásnál, hanem a szín-kialakulási folyamat egy ezt megelőző pontjában elégséges mérni. Fontos azonban, hogy a mérés mindig ugyanabban az időpontban történjen. Az állandósult állapot előtti méréssel az egy analízisre eső idő (ciklusidő) jelentősen csökken.

A ciklusidő az alábbi módon épül fel:

$$\text{ciklusidő} = \text{injektálási idő} + \text{töltési idő} = \text{mosási idő} + \text{mintaszívási idő}.$$

Az injektálás után a mintazóna parabolikus sebességprofil alakít ki. Ez a lamináris áramlás jellemzője. Az ilyen áramlás során ugyan van bizonyos fokú elegyedés a hordozófolyadék és a minta között, de a homogenitás soha sem lesz teljes. Ennek ellenére a mérési eredmények a helyesen beállított paraméterek esetén pontosak és jól reprodukálhatóak. A FIA-technika alkalmazásának feltételei [Ružička és Hansen, 1988]:

- reprodukálható időzítés,
- a minta impulzusszerű bevitele (injektálás),
- ellenőrzött diszperzió.

Ezek közül a legtöbb problémát a harmadik tényező okozza. Ismert, hogy az injektált minta az áramló folyadékban felhígul, ami jelentősen befolyásolja az analízis érzékenységét. A hígulás során kialakuló diszperzitásviszonyokat a D diszperziós állandóval lehet jellemezni, mely a meghatározandó anyag diszpergálás előtti és utáni koncentrációjával fejezhető ki (8. egyenlet).

$$D = C_o / C_{\max} \tag{8.}$$

ahol C_o a minta eredeti koncentrációja,

C_{\max} a detektoron áthaladó koncentráció.

A FIA-rendszerben kialakuló viszonyok másik jellemzője a tartózkodási idő (T). E kettő (D és T) szabályozása biztosítja a mérés reprodukálhatóságát.

A legtöbb FIA-rendszernél az analitikai információt a csúcsmagasság hordozza. A jel sok fizikai és kémiai hatás kombinációjának köszönhető. A csúcs alakját befolyásolják:

- a csőhossz, geometriai viszonyok
- a tartózkodási idő
- az összefolyási pontok (pl. összefolyó folyadékáramok relatív sebességei)
- az áramlás pulzálása stb.

2.2.1.4.2. A FIA-rendszerek felépítése

A legegyszerűbb FIA-rendszerek a következő részekből állnak (10. ábra):

- *Perisztaltikus pumpa*, mely a hordozófolyadék/reagensek mozgását biztosítja. A pumpafejek görgői számának növelésével az áramlás pulzálása minimalizálható.
- *Az injektáló rendszer* a mintának az áramló folyadékba való bejuttatására szolgál. A minta pillanatszerű és reprodukálható bevitelére általában számítógép által vezérelt forgó injektorszelepeket alkalmaznak, melyekben az injektálási térfogat a hurok hosszának és átmérőjének alkalmas megválasztásával könnyen megváltoztatható.
- *A reakcióegységben* (manifold, chemifold) a mintazóna összekeveredik és reagál a hordozófolyadék által tartalmazott vagy megfelelően odavezetett reagensekkel.
- *A detektor és regisztráló egység* feladata a kialakuló analitikai jel detektálása és regisztrálása. A FIA-rendszerekhez számos detektortípus csatlakoztatható. Igen elterjedt detektálási mód a fotometriás detektálás, mely kis térfogatú (10 µl), átfolyó küvettás fotométerrel történik. Nagyobb térfogatoknál ugyanis a cellabeli diszperzió növekedésével, így az érzékenység és a meghatározási sebesség csökkenésével kellene számolni.
- *Kiegészítő elemek*, pl. gázdifúziós, dialízises, oldószeres extrakciós egység, töltött oszlopok stb.

Az egyes FIA változatok a folyadékszallító rendszer felépítése, a rendszerbe illesztett kiegészítő műveletek és az alkalmazott detektorok alapján három fő csoportba sorolhatók [Tömösközi, 1992/b]:

- *Az egyszerű felépítésű FIA-rendszerek* egy vagy több áramlási útvonalat tartalmaznak, melyen keresztül a reagenst tartalmazó hordozófolyadék vagy a reagensek külön-külön áramlanak a detektor felé (10. ábra).
- *A késleltetett áramoltatású rendszerek* esetén a minta hordozófolyadékba történő injektálása után az áramlás egy időre megszakad. Ha a minta ekkor a reakcióspirálban

tartózkodott, úgy a reakcióidő növelhető. Ha a mintát a detektortérben állítjuk meg, a reakciók kinetikája tanulmányozható, ami hasznos információkat szolgáltat a mérőrendszer paramétereinek beállításához.

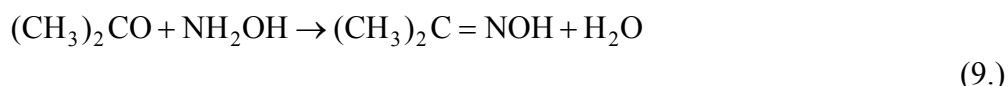
- Az *alternatív áramoltatású rendszerek* alkalmazásának előnye, hogy két felváltva működő pumpa beépítésével az analízisek sebességének növelése és a reagensigény csökkentése együttesen oldható meg. Ugyanezt a célt szolgálja a párhuzamosan többcsatornás injektálásra alkalmas szelep használata is.

Egy általános FIA-rendszer jellemző paraméterei a következők:

- mintatérfogat: 40 – 400 μl ,
- csőátmérő: 0,35 – 1,5 mm,
- csőhossz: 10 – 200 cm,
- áramlási sebesség: 0,5 – 3,5 ml/perc,
- átfolyócella térfogata: 8 – 40 μl ,
- ciklusidő: 20 – 100 s,
- mérési sebesség: 60 – 200 minta/óra.

2.2.1.4.3. Ketonanyag-tartalom meghatározása FIA-módszerrel

Marstorp és mtsai. [1983] oxidált ketonanyagok (aceton és acetoacetát együttes) analitikai meghatározására alkalmas gázdifúzióval kapcsolt FIA-mérőrendszert fejlesztettek ki tejminták analízisére. A minta acetecetsav-tartalmát magas hőmérsékleten (100 °C), savas közeget alkalmazva acetonná alakították, majd az acetont illékonyága alapján gázdifúziós teflon membrán segítségével elválasztották a minta többi komponensétől. A mennyiségi meghatározás analitikai elvét a primer aminok és az aceton között lejátszódó specifikus oximálási reakció képezte (9. reakcióegyenlet), melyet a reagensben alkalmazott metilnarancs sav-bázis indikátor színváltozásával detektáltak 520 nm-en.



Az eljárással a detektálás alsó határa 0,1 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. A módszer 0,2-5 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentrációtartományban a referenciamódszerként alkalmazott gázkromatográfiás eljárással mért eredményekkel összevetve pontos ($r=0,995$) és reprodukálható ($\text{RSD}\%=6,3$), az egy óra alatt elvégezhető analízisek száma kb. 100. Hasonló elven működő FIA-rendszerről számoltak be Diekmann és mtsai. [1986] is, akik az analitikai mérőrendszert tartósított

nyerstej minták acetontartalmának rutinjellegű meghatározására alkalmazták. A módszerrel rövid idő alatt alacsony költséggel (0,03 DM/minta) nagy számú nyerstejminta elemezhető (100 minta/óra).

2.2.2. A citromsav analitikai vizsgálata

2.2.2.1. Spektrofotometriás eljárások

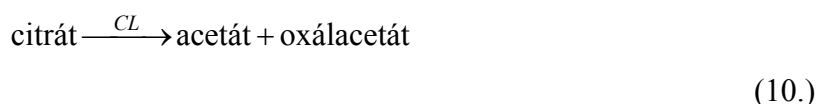
A citromsav-tartalom tejből történő meghatározási módszerei közül időrendben először a *kémiai reakciókon alapuló kolorimetriás meghatározási módszerek* terjedtek el, azonban gyakorlati jelentőségük mára már elhanyagolható. A White és Davies [1963] által tejmintákra optimált meghatározási módszer analitikai elvét a piridin és ecetsavanhidrid reagensek valamint a citromsav között lejátszódó reakció képezi, melyben a keletkező színes termék 428 nm-en kolorimetrálható. Kent és mtsai. [1997] triklór-ecetsavas fehérjementesítést követően határozták meg anyakocák tejének citrát-tartalmát.

*Kémiai reakción alapuló fluoreszcens származékképzés*es mennyiségi analitikai eljárást dolgoztak ki Hori és mtsai. [1974] vér és vérplazma minták citromsav-tartalmának meghatározására. A származékképzés kémiai alapját a metafoszforsavas fehérjementesítést követően a citromsav és a foszforsavban oldott o-aminotiofenol között lejátszódó, több lépésből álló reakció képezte, melyben az etil-acetáttal extrahált reakciótermék 415 nm-es gerjesztés mellett 450 nm-en detektálható emissziós intenzitást mutatott. A módszer a cisz- és transz-akonitsav kismértékű (9% alatti relatív fluoreszcencia-intenzitás) zavaró hatásától eltekintve szelektív, érzékeny és jól megismételhető (RSD%=2,5). Alacsony citromsav koncentrációk (0-70 mg/100 ml) meghatározására alkalmas, azonban hátránya a fluoreszcens termék kialakulásának hosszú, 15 órás reakcióideje.

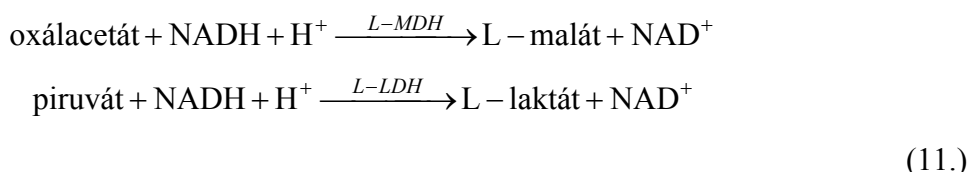
A enzimes reakciókon alapuló módszerek igen gyakoriak az orvosi, állatorvosi, de az élelmiszeranalitikai rutin eljárások között is. A legkülönbözőbb analitikai célokra alkalmas számtalan változatuk kit-ek formájában kapható a kereskedelmi forgalomban, melyek gyorsaságban és érzékenységben, de legfőképpen áraikban vetélkednek egymással.

A citromsav-tartalom meghatározásnál felhasznált enzimek a liázok csoportjába tartoznak, melyek valamely kémiai csoportnak a szubsztrátról való eltávolítását vagy hozzákapcsolását katalizálják hidrolízis, oxidáció vagy redukció nélkül. A transzferázoktól elsősorban az különbözteti meg őket, hogy az említett csoportok a reakció eredményeképpen szabad állapotba kerülnek.

A leggyakoribb meghatározások elvi alapja: a citromsav (citrát) a *citrát-liáz* enzim (CL) által katalizált enzimreakcióban oxálacetáttá és acetáttá alakul (10. reakcióegyenlet).



Malát-dehidrogenáz (MDH) és *laktát-dehidrogenáz* (LDH) jelenlétében a keletkező oxálacetát, és annak dekarboxilezett terméke a piruvát redukálható a NAD-koenzim oxidálódása mellett (11. reakcióegyenletek).



A meghatározás a redukált NAD-koenzim UV-abszorpciójának mérésével detektálható 334, 340 vagy 365 nm-en.

Bremer és Davis [1974] a fenti elven alapuló enzimtesztet alkalmazott egérmáj mitokondriumok citráttermelésének és a citráttermelés regulációjának tanulmányozására. Megállapította, hogy a citrátkörben az oxálacetát-citrát átalakulás inverz reakciójának sebessége 40-ed része a citrátszintézis reakciósebességének, valamint azt, hogy a citrát és a fluoro-citrát kompetitív inhibitorai a citrátszintézisnek, s egyben a ketogenezist fokozzák. Bitman és mtsai. [1989] ugyancsak enzimes teszttel vizsgálták diabetesben szenvedő nők korai laktációjában (a szülés utáni 3-7. napon) az anyatej több más összetevője mellett annak citromsav-tartalmát. Eltérést az egészséges kontrollcsoporthoz képest nem állapítottak meg.

2.2.2.2. Kromatográfiai módszerek

A citromsav analitikai meghatározásának tárgykörében megjelent publikációk nagy része *nagyhatékonyságú folyadékkromatográfias (HPLC)* eljárást alkalmaz, melynél az extrakciós mintaelőkészítési eljárás után az elválasztást általában erős kationcserélő analitikai oszlopon végzik. A HPLC-s módszerek között az alkalmazott extrakciós eljárások alapján lehet legkönnyebben különbséget tenni. Haas és mtsai. [1988] humán anyagcsere-betegségek tanulmányozásához jól felhasználható eljárást fejlesztettek ki a citrátkör egyes intermedierjeinek vérplazmából történő meghatározására. Az analitikai elválasztást Aminex HPX-87H oszlopon végezték 36 °C-on, a mozgófázis 0,7 ml/perc áramlási sebességű 0,002 mol·l⁻¹-os kénsav oldat volt, a detektálást pedig 205 nm-en végezték. A citromsav átlagos retenciós ideje 15 perc volt. Munkájuk során összehasonlították az acetonitrillel, illetve a perklórsavval végzett extrakciós módszerek visszanyerésre gyakorolt hatását, és azt állapították meg, hogy a perklórsavas vagy triklór-ecetsavas kezeléssel a vizsgált

karboxisavakra kapott gyengébb visszanyerések a detektálást zavaró csúcsok megjelenésével magyarázhatóak. Az oxálecetsav mutatkozott az alkalmazott vizsgálati körülmények között a leglabilisabbnak $67\pm 2\%$ -os visszanyeréssel. Fernandez-Garcia és McGregor [1994] az előbb említett analitikai oszlopot alkalmazta szerves savak fermentált és fermentálatlan tejmintákból történő meghatározására. Az analitikai oszlop hőmérséklete $65\text{ }^{\circ}\text{C}$, az eluens $0,7\text{ ml/perc}$ áramlási sebességű $0,0075\text{ n H}_2\text{SO}_4$ volt, a detektálást pedig 210 nm -en végezték. A citromsav retenciója 7 perc körülnek adódott. A szerves savak extrakcióját acetonitriles és kénsavas eleggyel is végrehajtották. A visszanyerések tükrében megállapították, hogy a hozzáadott citromsavra a kénsavas extrakciós módszer megfelelőbb, mivel az acetonitriles kezeléssel csak 70% körüli, míg a kénsavval $90\text{-}95\%$ -os visszanyerést értek el joghurtminták esetén. Oshima és Fuse [1981] mintaelőkészítésként 10% -os perklórsavas kezeléssel fehérjementesített egészséges és mastitis-ben szenvedő tehének tejéből határozták meg a citromsav koncentrációját. Az analitikai meghatározást automatikus karboxisav-analizátorral végezték, melynél az anioncserélő kromatográfiás oszlopon történt elválasztást követően kolorimetriás detektálást alkalmaztak. A módszer nagy hátránya a hosszú, 72 perc körüli ciklusidő.

Littmann és mtsai. [1982] *gázkromatográfiás (GC)* mérési eljárást dolgoztak ki citromsav és más olyan szerves savak együttes mennyiségi meghatározására tojásból és tojástermékekből, melyek a minta higiéniai állapotát jól jellemzik. A mintaelőkészítési eljárás előzetes fehérje- és zsírmentesítési lépéseit, valamint a származékképzést követően a Celite és nátrium-szulfát $1:1$ arányú keverékén szárított minta etil-acetátos extrakciójával történt. A metilészter-származékok analitikai elválasztását Fluorad FC-431 típusú kapilláris oszlopon végezték. Az eljárás mintaszükséglete nagy, a minta típusától függően $4\text{-}25\text{ g}$. A módszer viszonylagos bonyolultsága miatt számtalan pontatlansági lehetőséget hordoz magában, melyet a kutatók belső standardok alkalmazásával korrigáltak. Ennek megfelelően az eljárás, bár érzékeny, rutinalkalmazásra nem javasolható.

2.3. A KÍSÉRLETTERVEZÉS ALKALMAZÁSA ANALITIKAI MÉRŐ-RENDSZER OPTIMÁLÁSÁRA

Új vizsgálati eljárások kidolgozásának, összetett analitikai rendszerek paramétereinek optimális beállításának vagy az analízis eredményeit befolyásoló hatások azonosításának hatékony és korszerű lehetősége a matematikai-statisztikai eszközöket alkalmazó kísérlettervezés és értékelés. A kísérleti munkám során alkalmazott matematikai-statisztikai eljárások elméleti hátterének rövid, általánosított összefoglalását tartalmazza a következő fejezet.

A kísérletek tervezésének általános értelemben vett célja minden esetben az, hogy a vizsgálat tárgyát képező objektumról közvetlenül vagy közvetve hasznosítható információt szerezzünk [Kemény és Deák, 2000]. A megismerés tárgya, az objektum, sokféle lehet: egy rendszer, egy folyamat, egy berendezés stb. Azonban bármilyen objektummal álljunk is szemben, a megismerési folyamat (vagyis a kísérletek célszerű megtervezése, azok végrehajtása és kiértékelése) nem egyszerűen matematikai-statisztikai tevékenység, hiszen nem „fekete dobozat” vizsgálunk, hanem olyan rendszereket tételezünk fel, melyek működése sokféle ismert vagy megismerhető, gyakorta általunk is befolyásolható tényező (faktor) hatásának függvényeként értelmezhető. Így minden esetben szükségünk van a műszaki és a matematikai-statisztikai gondolkodás együttes alkalmazására.

Egy rendszer (pl. analitikai mérőrendszer) működése nagyon leegyszerűsítve úgy képzelhető el, mintha egy többváltozós matematikai függvény (célfüggvény) lenne: pl.: $Y=b_0+b_1x_1+b_2x_2+b_{12}x_1x_2+\dots$, ahol Y az általunk meghatározott függő változó (pl. az analitikai jel intenzitása), x_i független változók, vagy faktorok, amelyektől Y értéke függ (pl. hőmérséklet, koncentráció stb.), a b_i együtthatók pedig a faktorok hatásának irányát és nagyságát jellemző számértékek. Amennyiben e matematikai modellt optimalásra kívánjuk felhasználni, a célfüggvény szélsőértékét (pl. a detektorban mérhető analitikai jel maximumát, vagy ha a reagensfogyasztás a választott függő változó, akkor minimumát) keressük, melyhez a faktorok e szempontból optimális beállítási értékei (faktorok szintjei) tartoznak. A faktorok mennyiségi és minőségi jellemzők egyaránt lehetnek.

A rendszer valamely választott szempontból optimális beállítási szintjeinek meghatározásához több út is vezet. Az egyik lehetséges és gyakorta alkalmazott megoldás az „lépésről lépésre optimalás”. Ilyenkor egyszerre mindig csak egy faktor beállítási szintjét

változtatjuk kísérletről kísérletre, miközben a többi faktor szintjét állandó értéken tartjuk. Ez a megoldás csak nagyon sok kísérlet elvégzésével vezet el biztosan az optimumig, és a szükséges kísérletek számát (a kísérletek száma a faktorok számának exponenciális függvénye) sem lehet előre megmondani.

A másik lehetőség az „egyterves optimálás”, melynél a faktorok összes lehetséges beállítás-kombinációjánál elvégezzük a kísérleteket („teljes kísérleti tervet” hajtunk végre). Amennyiben pl. 3, két szinten (alsó és felső szint) értelmezett faktorunk van, összesen 2^3 , vagyis 8 kísérletet kell elvégeznünk, de a siker – amennyiben a lényeges faktorok kiválasztása helyes volt – garantált. Ha több faktorunk van, ráadásul nemcsak két, hanem több szinten, a kombinatorika szabályainak megfelelően természetesen nő az elvégzendő kísérletek száma. Ennek megfelelően a vázolt módszer alkalmazhatóságát korlátozza, ha nagyon sok és/vagy több szinten értelmezett faktorial kell dolgoznunk.

A harmadik lehetőség a fokozatos, „kétterves optimálás”. Ebben az esetben először az összes, első megközelítésben lényegesnek tartott faktorial egy alkalmasan választott ún. „részfaktortervet” hajtunk végre úgy, hogy a faktorok szintjeit a különböző beállítás-kombinációk esetén egyszerre változtatjuk – így egy-egy elvégzett kísérlet minden változó hatásáról ad információt – és csak bizonyos beállítás-kombinációknál végezzük el a kísérleteket. A részterv eredményeinek függvényében csökkenthető a faktorok száma, vagyis kiválaszthatók azok, amelyek valóban lényeges hatást gyakorolnak a választott célfüggvény függő változójának értékére. Ezután a már kevesebb számú faktorial teljes kísérleti tervet végrehajtva az optimális beállítási szintek kevesebb kísérletből, gyorsan meghatározhatók [Kemény és Deák, 2000].

A vázolt eljárások közötti választást minden esetben az idő-, költségráfordítások, valamint a velük nyerhető információtartalom figyelembevételével egyedileg kell mérlegelni. Azt viszont nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a megalkotott matematikai modell helyességét ellenőrző vizsgálatok elvégzésével is alá kell támasztani.

2.4. AZ ANALITIKAI MÓDSZEREK ÉRVÉNYESÍTÉSE

Az analitikai módszerek alkalmazásának alapfeltétele, hogy az adott vizsgálati eljárás az előre meghatározott céloknak megfelelő eredményeket szolgáltatson. A legtöbb esetben adott komponens/komponensek meghatározására különböző, sok esetben eltérő elméleti alapokon működő vizsgálati eljárás között kell választanunk, illetve a módszerfejlesztés irányát meghatároznunk. A döntés az eljárások analitikai teljesítményjellemzőinek ismerete alapján történik, amik a mérés pontosságáról, helyességéről stb. (lásd később) adnak információt. Ezeknek az analitikai teljesítményjellemzőknek a meghatározását nevezik érvényesítésnek (validálásnak).

Az új módszerek kidolgozásánál azok érvényesítése minden esetben szükségszerű, mivel a módszer alkalmazhatóságát, illetve az alkalmazhatóság korlátait az érvényesítési eljárás eredményeként kapott teljesítményjellemzők alapján ítélni lehet meg. A módszervalidálás értelemszerű alkalmazását a vizsgáló-laboratóriumok működését szabályozó új szabvány, az MSZ ISO/IEC 17025:2001 (2003. január 1-től minden vizsgáló- és kalibráló laboratóriumra érvényes) is előírja [Magyar Szabványügyi Testület, 2001].

Mivel dolgozatom jelentős részében analitikai módszerek fejlesztésével foglalkozom, célszerűnek tartom az analitikai módszerek érvényesítésével kapcsolatos ismeretanyag rövid összefoglalását.

Az említett szabvány, illetve a kapcsolódó háttérdokumentum (NAR-20) alapján az alábbi analitikai teljesítményjellemzők meghatározása és értelmezése célszerű a gyakorlatban [Nemzeti Akkreditáló Testület, 2002]:

- Mérési tartomány
- Linearitás
- Érzékenység
- Szelektivitás és specificitás
- Pontosság
- Helyesség
- Kimutatási határ
- Meghatározási határ
- Zavartűrés

Mérési tartomány. Azt a koncentrációtartományt, amelyben a módszer előre meghatározott pontosságú és helyességű.

Linearitás. A módszer munkatartományának azon része, amelyben az analitikai jel és a koncentráció vagy anyagmennyiség (kémiai jel) összefüggése meghatározott biztonsággal mellett egyenesnek tekinthető.

Érzékenység. A módszer válaszjelében (analitikai jel) bekövetkező legkisebb érzékelhető változáshoz tartozó koncentráció- vagy anyagmennyiség-különbség.

Szelektivitás és specificitás. Egy módszer szelektivitása azt jelenti, hogy a módszer milyen mértékben képes adott alkotó(k) meghatározására komplex mintamátrixban, a mátrix egyéb komponenseinek zavaró hatása mellett. Azt a módszert, amely egy vagy több komponensre tökéletesen szelektív, specifikusnak nevezik.

Pontosság. A módszer pontossága a független vizsgálati eredmények közötti egyezés mértéke. Két különböző módon is megadható attól függően, hogy meghatározása milyen körülmények között történik:

Az ismételhetőség a pontosság azon fajtája, amely az ismételhetőség vizsgálati körülmények között elvégzett kísérletekre vonatkozik (azonos laboratórium, módszer anyag, kezelő, rövid időintervallum).

A reprodukálhatóság a pontosság azon fajtája, amely a reprodukálhatóság vizsgálati körülmények között elvégzett kísérletekre vonatkozik (azonos módszer, különböző laboratórium, kezelő, módszer, hosszú időintervallum).

Helyesség. A módszer helyessége a mért érték és a valódi érték egyezésének mértéke.

Kimutatási határ. Egy komponens kimutatási határa azt a koncentrációt vagy anyagmennyiséget jelenti, amelyre adott válaszjel értéke a vak minta közepes válaszjele és a tapasztalati szórás háromszorosának összege.

Meghatározási határ. A meghatározási határ az a legkisebb koncentráció vagy anyagmennyiség, amely adott helyességgel és pontossággal határozható meg.

Zavartűrés. Azt fejezi ki, hogy a módszer alkalmazása során történő kis változások milyen hatással vannak a módszer teljesítményére.

A kísérlettervezésnél alkalmazott matematikai-statisztikai eljárások (pl. statisztikai próbák, regresszió-analízis, variancia-analízis stb.) az analitikai módszerek kidolgozása, majd ezt követően az új/továbbfejlesztett módszer teljesítményjellemezőinek meghatározása során egyaránt felhasználhatók.

3. KÍSÉRLETI RÉSZ

3.1. VIZSGÁLATI MINTÁK

Kísérleti munkám során a gödöllői Állattenyésztési Teljesítményvizsgáló Kft. (ÁT Kft.) által rendelkezésemre bocsátott nyers tehéntej mintákat használtam. A minták az ország hét különböző tehenészetéből, klinikailag egészséges tehenektől származtak.

A szokásos reggeli fejés során levett (tehenészetenként és egyedenként azonosított) mintákat közvetlenül mintavétel után 2 db. tartósító tableta (Multitabs, D&F Control System Inc., USA) 20 ml nyerstejben történő feloldásával tartósították, majd hűtve (+4°C) szállították az ÁT Kft. gödöllői telephelyére. Ott beltartalmi paramétereiket (fehérje, zsír, laktóz, karbamid stb.) határozták meg Milkocsan 5000 típusú FTIR (Foss Group, Dánia) készülékkel.

A minták a beltartalmi vizsgálatok elvégzése után egy-két, néhány esetben több (maximum tíz) nappal kerültek laboratóriumunkba, ahol ketonanyag- és citromsav-tartalmukat vizsgáltam. A ketonanyagok további kémiai átalakulásának (főként az acetecetsav spontán dekarboxileződése) megelőzése céljából a mintákat felhasználásig mélyhűtve tároltam [Työppönen és Kauppinen, 1980].

3.2. ALKALMAZOTT ANYAGOK, MÓDSZEREK ÉS MÓDSZERFEJLESZTÉSEK

Kísérleti munkám jelentős részében a nyerstej minták ketonanyag- és citromsav-tartalmának rutinszerű vizsgálatára alkalmas analitikai háttér kidolgozásával foglalkoztam. Mivel az említett komponensek meghatározására nincs érvényes hazai vagy nemzetközi szabvány, illetve a szakterület által általánosan elfogadott analitikai módszert a szakirodalom áttekintése során nem találtam, ezért különböző módszerek fejlesztése, optimalása és validálása vált szükségessé. Ennek megfelelően ebben fejezetekben – rendhagyó módon – az alkalmazott módszerek egyszerű ismertetése helyett az elvégzett fejlesztőmunka lépéseit és eredményeit is bemutatom.

A tárgyalás során az alábbi logikai felépítést követem:

- az aceton meghatározására alkalmas, összehasonlító módszerként használható gázkromatográfias eljárások fejlesztése, a módszerek érvényesítése, összehasonlító értékelése, illetve a laboratóriumi körülmények között sorozatvizsgálatokra alkalmas, műszeres gyorsvizsgálati eljárás (áramló injektációs analitika, FIA) optimalása és az optimális eljárás érvényesítése a kísérlettervezés módszertanának alkalmazásával, valamint az összehasonlító gázkromatográfias módszerrel kapott eredmények felhasználásával;
- összketonanyag nyerstejből történő meghatározására alkalmas gázkromatográfias analitikai eljárás fejlesztése – az összehasonlító gázkromatográfias eljárás továbbfejlesztésével;
- a citromsav-tartalom meghatározása nyerstej mintákban – módszeradaptálás a mintamátrixnak megfelelő mintaelőkészítési eljárás kidolgozásával.

3.2.1. Acetontartalom meghatározása

3.2.1.1. Az acetontartalom gázkromatográfias meghatározása

A különböző analitikai mérések eredményeinek összehasonlíthatósága megköveteli a referencia vagy összehasonlító módszerek alkalmazását. Mivel az acetontartalom nyerstejből történő meghatározására mindeztidáig nincs referencia vagy hivatalosan ajánlott

összehasonlító módszer, célul tűzttem ki olyan mérőrendszer kialakítását, mellyel ez az igény kielégíthető.

Nyerstejek acetontartalmának meghatározására alkalmas két új gázkromatográfias módszert fejlesztettem, érvényesítettem. A két módszert a meghatározásra került teljesítményjellemzők alapján összehasonlítottam és kiválasztottam az összehasonlító módszerként alkalmazhatót.

Ezt követően az összehasonlító módszert fejlesztettem tovább – megfelelő mintaelőkészítési eljárás kidolgozásával – összketonanyag meghatározásra.

3.2.1.1.1. Anyagok, eszközök

A felhasznált vegyszerek kivétel nélkül analitikai minőségűek voltak (7. táblázat).

Vegyszerek megnevezése	Gyártó / forgalmazó	Cikkszám / kódszám / katalógusszám
Aceton	Merck, Németország	100020
Etil-alkohol	Reanal Rt., Magyarország	05031-6-69
Etil-metil-ke-ton	Merck, Németország	109709
Triklór-ecetsav	Reanal Rt., Magyarország	20105-1-38

7. táblázat: Felhasznált vegyszerek – az acet-on gázkromatográfias meghatározásaihoz

Az analitikai elválasztásokat Carlo Erba Vega Series 2 (Carlo Erba, Németország) típusú készülékkel, 6 láb (181,8 cm) hosszú adszorpciós kolonnával (Porapack Q, 80/100 mesh, Waters Ltd., USA) lángionizációs detektálás (FID Detector System, Carlo Erba, Németország) mellett végeztem. Az adatgyűjtés és adatfeldolgozás HP 35900 típusú AD konverterrel, HP ChemStation kromatográfias szoftverrel történt (Hewlett Packard, USA).

3.2.1.1.2. A minták folyadékfázisából történő mintavételt alkalmazó gázkromatográfias analitikai eljárás (GC-eljárás) fejlesztése

A szakirodalomban csak nagyon kevés olyan gázkromatográfias eljárás található, amely a tej- vagy tejtermék-minták folyadékfázisából, származékképzés nélkül végzi az illékony komponensek meghatározását. Ketonanyagok nyerstejből történő meghatározására vonatkozó irodalmi hivatkozást pedig egyáltalán nem találtam. Ennek egyik okát a tej- és tejtermék-minták összetételében látom, ugyanis nagy mennyiségben tartalmaznak fehérje- és

lipidkomponenseket, melyeket az általánosan alkalmazott adszorpciós analitikai oszlopok megóvása érdekében a mérés előtt megfelelő mintaelőkészítéssel el kell távolítani. Ezen kívül a folyadékminták magas víztartalma is kedvezőtlenül befolyásolhatja az analitikai oszlop teljesítményét. Véleményem szerint a másik ok a méréstechnikai fejlesztések napjainkban tapasztalható irányához kapcsolódik. A bonyolult biológiai folyadékminták illékony komponenseinek meghatározására szinte kizárólag headspace gázkromatográfiás eljárások, illetve ezek tömegspektrometriával kapcsolt változatai terjedtek el. Ezek ugyan érzékenyek, pontosak, jól reprodukálhatók és szükségtelemmé teszik a bonyolult, hosszadalmas mintaelőkészítési eljárások alkalmazását, de az ilyen integrált módszerek nagyon költségesek, ezért állományvizsgálati célra kevésbé terjedtek el.

Munkám e részében célul tűztem ki egy új, folyadékminta injektálásával történő gázkromatográfiás eljárás kifejlesztését, mellyel a nyerstejek acetontartalma nagyszámú minta esetében is pontosan, gyorsan és olcsón meghatározható.

A módszerfejlesztés lépéseit a módszerleírásoknak megfelelő sorrendben tárgyalom.

3.2.1.1.2.1. Mintaelőkészítés fejlesztése a GC-eljáráshoz

A tejből folyadékminta injektálását alkalmazó gázkromatográfiás eljárások esetén mindig szükség van a minta fehérje- és zsírmentesítésére, amellyel megakadályozható az analitikai oszlop károsodása.

A fehérjementesítésre alkalmazott reagensek közül a leggyakrabban alkalmazott triklór-ecetsav reagenst (TCA) választottam, mivel nagy koncentrációban és kis mennyiségben használható, így elérhető a kívánt fehérjekiválás, miközben a minta hígulása gyakorlatilag elhanyagolható marad. A minta hígulásának mértékét a 4 ml minta 5%-ában maximáltam (200 μ l), ehhez kerestem meg a szükséges triklór-ecetsav koncentrációt. A különböző koncentrációjú (0,5, 1, 2 és 3 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) TCA-oldatokkal elvégzett kísérleteimben a 3 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (49,02 g/100 ml) koncentrációjú TCA alkalmazásával kaptam a legjobb eredményt. (A TCA koncentráció további növelését az oldat túltelítettség miatti kikristályosodása akadályozta meg.) A TCA-kezelés hatására kicsapódott fehérjéket a minta zsírtartalmával együtt fizikai eljárással választottam el, mivel a zsírmentesítésre gyakorta használt kémiai, szerves oldószeres extrakciós eljárások a GC-meghatározásnál nem alkalmazhatóak, mert az oldószer-csúcsok a vizsgált komponenstől nem különíthetők el. A fizikai fázis-separációs módszerek közül a gyors és olcsó centrifugálás, és az azt követő szűrés alkalmazása mellett döntöttem. Kísérleteket végeztem a centrifugálás szükséges fordulatszámának (3000-

8000/perc) és idejének (5-30 perc) meghatározására. A különböző fordulatszámon és különböző ideig történő centrifugálások közül teljes fáziselválást (tiszta felülúszót) a 7000/perc (2200g) fordulatszámon 20 percig történő centrifugálás adta. A felülúszót 45 µm-es szűrőn utószűrve víztiszta folyadékot kaptam, mely már injektálható volt a kromatográfba.

További kísérleteimmel tisztáztam, hogy az alkalmazott mintaelőkészítési eljárás a bemért aceton és a belső standardok mennyiségét szignifikánsan nem változtatta meg. Aceton standard oldatokra a mintaelőkészítési eljárás alkalmazásával, illetve a nélkül mért visszanyerések között szignifikáns eltérés nem volt kimutatható. A TCA-kezelés utáni semlegesítés ugyancsak szükségtelennek bizonyult (8. táblázat).

A kidolgozott mintaelőkészítési eljárást nyerstejből acetontartalom meghatározásához a módszerleírás (3.2.1.1.2.3. fejezet) tartalmazza.

Minta típusa	Bemért aceton [mmol·l ⁻¹]	Mintaelőkészítés	Visszanyert aceton [mmol·l ⁻¹]
Vizes oldat	1,00	Mintaelőkészítés nélkül	0,99±0,021
Vizes oldat	1,00	Mintaelőkészítéssel	1,00±0,014
Vizes oldat	1,00	Mintaelőkészítés + semlegesítés	0,98±0,062

8. táblázat: Mintaelőkészítés hatásának vizsgálata aceton standard oldatokra GC-eljárásnál (a mért értékek 3 független meghatározás átlagát és szórását reprezentálják)

3.2.1.1.2.2. Az analitikai meghatározás fejlesztése a GC-eljáráshoz

A gázkromatográfias elválasztás paraméter-beállításait irodalmi adatokra [Palo és Ilkova, 1970], illetve saját kísérleteimre alapozva állapítottam meg.

Az adszorpciós analitikai oszlop megóvása érdekében 5 cm hosszú, üvegyapottal töltött előtéoszlopot készítettem és alkalmaztam. A töltetet 20-25 injektálás után szükséges kicserélni. Az analitikai meghatározás kidolgozott körülményeit a GC-eljárás módszerleírása tartalmazza.

A kialakított kromatográfias rendszer a vizes kalibráló oldat komponenseinek elválasztására mind az analízis ideje, mind a felbontás vonatkozásában megfelelő volt. Tejminták vizsgálatánál azonban a mátrixból olyan komponensek is megjelentek a kromatogramon, amelyek az alkalmazott körülmények között nem voltak elkülöníthetők a vizsgált komponensektől, ráadásul a kevésbé illékony komponensek deszorpciója érdekében egy lefűtési programot kellett alkalmazni, ami miatt mintegy négyszeresére nőtt az

analízisidő. A 9. táblázat tartalmazza a különböző komponensek nyerstej-mintákban mért retenciós időit.

Komponens	Retenciós idő [perc]
Etanol	1,73
Aceton	2,47
Etil-metil-ke-ton	*5,10 (mintában nem azonosítható)

9. táblázat: Retenciós idők alakulása nyerstej-mintákban GC-eljárás alkalmazásánál (*: standard oldattal mért retenciós idő)

A mennyiségi meghatározást belső standard módszerrel végeztem.

A tejjel és a vizes oldattal végzett kalibrációk között szignifikáns eltérést nem tapasztaltam. A vizes standarddal készített kalibrációs összefüggés: $y=0,9978x$, $R^2=0,9982$, míg ugyanez tejes oldatokkal: $y=1,0584x$, $R^2=0,9963$. (Az elvégzett linearitás-vizsgálat eredményei szerint a kalibrációk a 0-10 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentrációtartományban lineárisak és a kalibrációs egyenesek átmennek az origón.) A kalibrációkat nyerstej-minták analízisével teszteltem. A mért eredményeket a 10. táblázatban foglaltam össze. A 6 különböző tejminta elemzése után a két különböző kalibrációval számított aceton-koncentrációkat t-próba segítségével hasonlítottam össze. Egy minta kivételével (1. számmal jelölt) szignifikáns eltérést nem tapasztaltam, amiből arra következtettem, hogy a vizes oldatokkal történő kalibráció is megfelelő.

Mintaazonosító	Átlag ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Szórás ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Átlag ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Szórás ($\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$)
1.	3,68	0,052	4,03	0,057
2.	5,56	0,839	6,08	0,918
3.	0,53	0,065	0,58	0,071
4.	4,26	0,856	4,66	0,935
5.	2,59	0,057	2,83	0,063
6.	1,11	0,216	1,22	0,236
	(tejes standardok)		(vizes standardok)	

10. táblázat: Tejes és vizes kalibráló oldatokkal mért aceton koncentrációk 6 nyerstej mintára, GC-eljárással (a mért értékek 3 független meghatározás eredményét reprezentálják)

Az analitikai meghatározás alkalmazott paramétereit összefoglalóan a módszerleírás tartalmazza.

3.2.1.1.2.3. Az új GC-eljárás leírása

A folyadékfázisból történő gázkromatográfiás analitikai módszerhez felhasznált anyagokat, eszközöket és berendezéseket a 3.2.1.1.1. fejezet tartalmazza.

Mintaelőkészítés: 10 ml-es centrifugacsőbe 4 ml szobahőmérsékletű homogenizált nyerstej-mintát pipettáztam, majd 0,4 µl etil-alkohol belső standardot és 200 µl 3 mol·l⁻¹ koncentrációjú frissen elkészített triklór-ecetsav (TCA) oldatot adtam hozzá. Kémcsőkeverő segítségével homogenizáltam az oldatot, majd 20 percig 7000/perc (2200g) fordulatszámon centrifugáltam. A felülúszót leöntöttem és 45 µm pórusátmérőjű szűrőn (katalógusszám: HVLP02500, Millipore, Írország) szűrtem. Az injektált térfogat 2 µl volt.

A kalibrációhoz acetona 10 mmol·l⁻¹ koncentrációjú, 0,1 µl/ml belső standardot tartalmazó desztillált vizes kalibráló törzsoldatot készítettem. A kalibráló munkaidőket a törzsoldatból, a belső standardot azonos koncentrációban tartalmazó desztillált vízzel hígítottam a 0,05 és 5 mmol·l⁻¹ közötti koncentrációtartományban.

Az analitikai mérőrendszer alkalmazott beállításait a 11. táblázat tartalmazza. Az analitikai oszlop elé, annak védelme érdekében 5 cm hosszú, üveggyapottal töltött előtétoszlopot tettem, melyet a mintaszámtól függő időközönként (20-25 analízis után) cseréltem.

A minták koncentrációját a mintákra mért csúcsterületek standardokra vonatkoztatott arányából (területarány) a kalibrációs összefüggés segítségével számítottam ki.

Paraméter	Beállítás
Analitikai oszlop:	mikrotöltött
Adsorbens:	Porapack Q
Oszlophőmérséklet:	izoterm, 200 °C
Injektálás:	on column
Injektálási hőmérséklet:	125 °C
Injektált mintamennyiség:	2 µl
Belső standard:	etil-alkohol (0,1 µl/ml)
Detektor:	FID
Detektor hőmérséklet:	125 °C
Vivőgáz:	He

11. táblázat: A mérőrendszer GC-eljárásnál alkalmazott paraméter-beállításai

3.2.1.1.2.4. Az új GC-eljárás teljesítményjellemzőinek meghatározása

A kézzel történő mintabemérés hibájának meghatározása érdekében 2 különböző koncentrációjú standard oldatot injektáltam 5-5 alkalommal. A mért területarányokat és azok hibáit a 12. táblázat tartalmazza. Az injektálás hibája a kisebb-aceton koncentrációjú minták esetén nagynak adódott, míg nagyobb koncentrációknál a területarány 1%-át sem haladta meg. (Az eredmények összehasonlító értékelését a 3.2.1.1.3.4. fejezet tartalmazza.)

Minta	A/A _{istd}	Átlag	Szórás	RSD%
0,10 mmol·l ⁻¹ koncentrációjú aceton standard oldat	0,075			
	0,116			
	0,248	0,126	0,0708	56,19
	0,110			
	0,079			
1,00 mmol·l ⁻¹ koncentrációjú aceton standard oldat	0,639			
	0,651			
	0,644	0,648	0,0059	0,91
	0,652			
	0,652			

12. táblázat: A manuális mintabemérés hibájának meghatározása GC-eljárásnál

A módszer helyességét ismert mennyiségű aceton nyerstejhez történt addícióját követően a visszanyerések átlagával jellemeztem (13. táblázat). A mérési eredmények feldolgozása után a módszer helyessége: 98,9% (átlagos visszanyerési %).

Aceton addíció [mmol·l ⁻¹]	Visszanyerés [%]
0,25	105,26±2,421
2,50	88,76±5,135
5,00	102,67±1,281

13. táblázat: A GC-eljárás helyessége
(a mért értékek 5 független meghatározás átlagát és szórását reprezentálják)

3.2.1.1.3. A minták gőztéréből történő mintavételt alkalmazó gázkromatográfiás analitikai eljárás (HS-GC-eljárás) fejlesztése

A folyadékminta injektálásával történő gázkromatográfiás mérési eljárás alkalmazása során arra jutottam, hogy a módszer nagy számú minta gyors vizsgálatára a hosszadalmas mintaelőkészítési eljárás és az előtét-, valamint az analitikai oszlop gyakori tisztításának szükségessége miatt nehézkes. Ezért felmerült az előbbi problémák kiküszöbölésére a headspace gázkromatográfiás (HS-GC) meghatározás kidolgozásának igénye.

A vonatkozó szakirodalomban a biológiai minták acetontartalmának gázkromatográfiás meghatározási módszerei közül leggyakrabban headspace mintavétellel végrehajtott eljárásokról számolnak be [van Stekelenberg és De Bruyn, 1970; Eriksson, 1972; Hradecký és Jagoš, 1978; Kimura és mtsai., 1985; López-Soriano és Argilés, 1985; Winterbach-Hanlie és Apps, 1991]. A tej és tejtermékek esetén a gőztérből történő mintavételt alkalmazó módszerek nagy előnye a folyadékfázisból történő analízishez képest, hogy a meghatározandó illékony mintakomponens analíziséhez nincs szükség bonyolult mintaelőkészítésre. Ez esetben a mintaelőkészítés a belső standard hozzáadásából, homogenizálásból, és a minta adott hőmérsékleten történő adott idejű termosztálásából áll.

3.2.1.1. 3.1. Mintaelőkészítés fejlesztése a HS-GC-eljáráshoz

A tej- és tejtermék-minták injektálás előtti termosztálása az irodalmi hivatkozásokban 50, 60 vagy 65 °C hőmérsékleten történik [Kimura és mtsai., 1985; López-Soriano és Argilés, 1985; Eriksson, 1972]. Az általam elvégzett kísérletekben azonos rendszerbeállítás mellett az 50 és a 60 °C alkalmazása között mintegy 15-20 %-os érzékenység-növekedést mértem, míg a 65 °C-os termosztálás már nem növelte tovább az érzékenységet, így a 60 °C-os headspace-hőmérséklet alkalmazása mellett döntöttem.

3.2.1.1.3.2. Az analitikai meghatározás fejlesztése a HS-GC eljárásához

A kromatográfiás elválasztás kidolgozásánál a már meglévő kromatográfiás mérőrendszert (lásd: 3.2.1.1.1. fejezet) alakítottam át úgy, hogy gőzfázisú mintavételezésre alkalmas, headspace-feltétet csatlakoztattam hozzá. A rendszer új paraméter-beállításait, az irodalmi adatokat felhasználva, saját kísérleteimre támaszkodva határoztam meg.

A kromatogramok alapján elmondható (11/a. és 11/b. ábrák), hogy mind a standard oldatokra, mind pedig a nyerstej mintákra kapott csúcsok jól elváltak egymástól.

A 14. táblázat az egyes komponensek átlagos retenciós időit tartalmazza.

Komponens	Retenciós idő [perc]
Etanol	3,56
Aceton	5,14
Etil-metil-ke-ton	10,01

14. táblázat: Retenciós idők a HS-GC-eljárásnál

A vizes standardokkal készített kalibrációk kalibrációs összefüggése etil-alkohol belső standarddal $y=0,6503x$, $R^2=0,9991$, míg etil-metil-ke-tonnal $y=0,4532x$, $R^2=0,9992$. (A kalibrációk a 0-10 mmol·l⁻¹ koncentrációtartományban lineárisak és az illesztett egyenesek átmennek az origón.) A kétféle belső standard közül az etil-metil-ke-ton alkalmazása mellett döntöttem, ugyanis a kalibrációk reprodukálhatósága és az elválasztás is kedvezőbb volt.

Minta	A/A _{istd}	Átlag	Szórás	RSD%
0,05 mmol·l ⁻¹ koncentrációjú acet-on standard oldat	0,039	0,059	0,0141	23,89
	0,059			
	0,065			
	0,053			
	0,077			
0,50 mmol·l ⁻¹ koncentrációjú acet-on standard oldat	0,239	0,229	0,0177	7,73
	0,245			
	0,200			
	0,224			
	0,235			

15. táblázat: A mintabemérés hibájának meghatározása a HS-GC-eljárásnál

Az analitikai meghatározás alkalmazott paramétereit összefoglalóan a módszerleírás tartalmazza.

3.2.1.1.3.3. Az új HS-GC-módszer leírása

A headspace-gázkromatográfias analitikai módszerhez felhasznált anyagokat, eszközöket és berendezéseket a 3.2.1.1.1. fejezet tartalmazza.

Mintaelőkészítés: 20 ml-es üvegedénybe 10 ml szobahőmérsékletű homogenizált nyerstej mintát és 1 µl etil-metil-ke-ton belső standardot mértem be. Az edényt szeptummal légmentesen zártam, majd analízis előtt 60 °C-ra temosztáltam. A gőztérből a mintavevő hurok térfogata által meghatározott mennyiségű mintát (3 ml) injektáltam a gázkromatográfba.

A kalibrációhoz acetontra 10 mmol·l⁻¹ koncentrációjú, 0,1 µl/ml belső standardot tartalmazó desztillált vizes kalibráló törzsoldatot készítettem. A kalibráló munkaadatokat a törzsoldatból, a belső standardot azonos koncentrációban tartalmazó desztillált vízzel hígítottam a 0,05 és 5 mmol·l⁻¹ közötti koncentrációtartományban.

A HS-GC analitikai eljárás körülményeit a 16. táblázat tartalmazza.

A minták koncentrációját a mért területarány alapján a kalibrációs összefüggés segítségével határoztam meg.

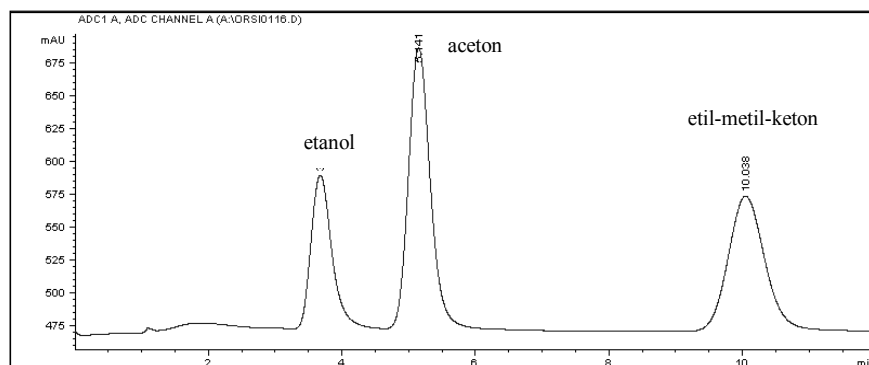
Paraméter	Beállítás
Analitikai oszlop:	mikrotöltött
Adsorbens:	Porapack Q
Oszlophőmérséklet:	izoterm, 175 °C
Mintavétel:	headspace
Mintabemérő hurok térfogata:	3 ml
Belső standard:	etil-metil-ke-ton (0,1 µl/ml)
Detektor:	FID
Detektor hőmérséklet:	120 °C
Vivógáz:	He

16. táblázat: A mérőrendszer HS-GC-eljárásnál alkalmazott paraméter-beállításai

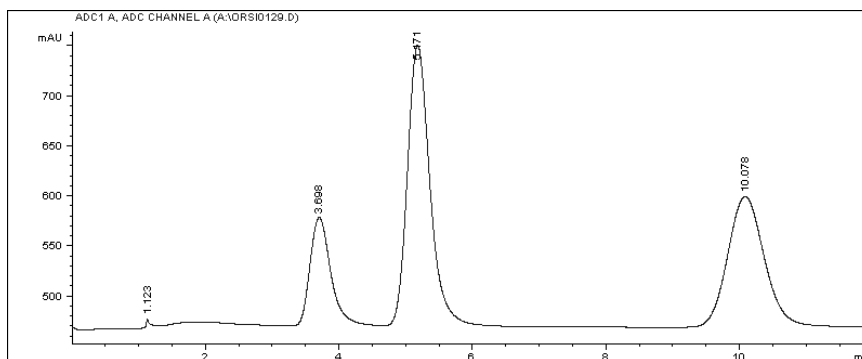
3.2.1.1.3.4. Az új HS-GC-eljárás teljesítményjellemzőinek meghatározása

A gázkromatográfias bemérés hibájának meghatározására 2 különböző koncentrációjú standardot injektáltam 5-5 alkalommal. A mért területarányokat és azok hibáit a 15. táblázat tartalmazza. A bemérés hibája (hasonlóan a GC-eljárásnál tapasztaltakhoz) kisebb

koncentrációtartományban nagyobb, míg nagyobb koncentrációtartományban kisebb. Bár a HS-GC vizsgálatoknál a kiválasztott két koncentráció fele akkora volt, mint a folyadékfázisból történő meghatározásnál, a mért hiba lényegesen kisebbnek adódott. Ennek az a magyarázata, hogy a fecskendővel történő mintabemérés kevésbé reprodukálható, mint a headspace mintabemérés.



11/a. ábra: 3 mmol·l⁻¹ koncentrációjú aceton standard oldat HS-GC-kromatogramja etil-alkohol és etil-metil-keton belső standarddal



11/b. ábra: Nyerstev minta HS-GC-kromatogramja etil-alkohol és etil-metil-keton belső standarddal

A HS-GC-módszer helyességét – a GC-módszernél alkalmazott metodikához hasonlóan, ismert mennyiségű aceton addícióját követő visszanyerésekkel jellemeztem (17. táblázat). A két gázkromatográfiai módszerrel elért eredményeket összehasonlítva, a HS-GC-eljárás esetén mind átlagértékekben, mind szórásokban kedvezőbb eredményeket kaptam. A HS-GC-eljárás helyessége: 100,5% (átlagos visszanyerési %).

Aceton addíció [mmol·l ⁻¹]	Visszanyerés [%]
0,25	102,51±1,147
2,50	100,37±0,268
5,00	98,64±2,405

17. táblázat: A GC-eljárás helyessége
(a mért értékek 5 független meghatározás átlagát és szórását reprezentálják)

3.2.1.1.4. A GC- és a HS-GC-eljárás összehasonlítása

A kifejlesztett kétféle új gázkromatográfiás meghatározási módszert teljesítményjellemzőik szempontjából vettem össze. Az összehasonlítási szempontokat és a megállapított jellemzők értékeit a 18. táblázatban foglaltam össze.

Teljesítményjellemző	GC	HS-GC
Detektálási határ [mmol·l ⁻¹]	0,01	0,01
Lineáris tartomány [mmol·l ⁻¹]	0-10	0-10
Kalibráció gyakorisága	kalibráció ellenőrzés	kalibráció ellenőrzés
Érzékenység	0,998 [területarány/konc. arány]	0,777 [területarány/konc. arány]
Analitikai meghatározás hibája [SD %]	<1	<1
Reprodukálhatóság [SD %]	<2,0	<2,0
Helyesség [átlagos visszanyerési %]	98,9	100,5
Aceton retenciója [perc]	2,74	5,14
Mintaelőkészítés	komplex	minimális
Analízisidő mintaelőkészítéssel [perc]	180	15
Költség / minta [USD]	3	5

18. táblázat: Az acetontartalom GC- és HS-GC-eljárással történő meghatározásának összehasonlítása

A gyors és egyszerű mintaelőkészítés, az ezzel összefüggő rövidebb analízisidő és költségcsökkentés, valamint a sorozatvizsgálatokra való alkalmasság alapján (18. táblázat adatai) a HS-GC-eljárást találtam megfelelőbbnek. A továbbiakban ezt alkalmaztam a gyorsvizsgálati módszer összehasonlító eljárásaként, valamint terjesztettem ki a másik két fontos ketonanyag-alkotó, az acetecetsav és a β -hidroxi-vajsav meghatározására is.

3.2.1.2. Acetontartalom meghatározása áramló injektálásos (FIA) analitikai eljárással

Munkám következő részében áramló injektálásos elven működő acetontartalom mérési eljárást adaptáltam [Diekmann és mtsai., 1986], fejlesztettem tovább és validáltam, amely alkalmas automatikus eljárással a nyerstejek aceton-koncentrációjának meghatározására.

3.2.1.2.1. Anyagok, eszközök

Minden felhasznált vegyszer analitikai minőségű volt (19. táblázat).

Vegyszerek megnevezése	Gyártó / forgalmazó	Cikkszám / kódszám / katalógusszám
Aceton	Merck, Németország	100020
Brij-35, 30%-os oldat	Foss-Tecator, Svédország	A21-0110-33
Hidroxil-amin-kloridot	Reanal Rt., Magyarország	08034-2-38
Metilnarancs	Reanal Rt., Magyarország	13073-6-21
Nátrium-dihidrogén-foszfátot	Reanal Rt., Magyarország	14035-1-38
Nátrium-hidroxid	Reanal Rt., Magyarország	14052-1-38
Sósav, 37%-os	Reanal Rt., Magyarország	19055-1-65
Trisz-(hidroximetil)-aminometán	Reanal Rt., Magyarország	20130-6-38

19. táblázat: Felhasznált vegyszerek – acetontartalom FIA meghatározása

A vizsgálatokat a következő készülék-összeállítással hajtottam végre: Enviroflow 5012 System, 5042 Detector System, 5027 Sampler amelyet Chemifold V XS típusú gázdifúziós egységgel, valamint FIAstar 5101 típusú termosztáttal egészítettem ki (Foss-Tecator, Svédország). Az adatgyűjtést és adatfeldolgozást az SuperFlow Duo szoftver (Foss-Tecator, Svédország) segítségével végeztem.

3.2.1.2.2. A kiindulási FIA-módszer leírása

A FIA gyorsvizsgálati eljárás kiindulási módszerét az irodalomból átvett paraméterek alkalmazása mellett [Diekmann és mtsai., 1986] a rendelkezésemre álló áramló injektálásos analitikai mérőrendszerrel valósítottam meg.

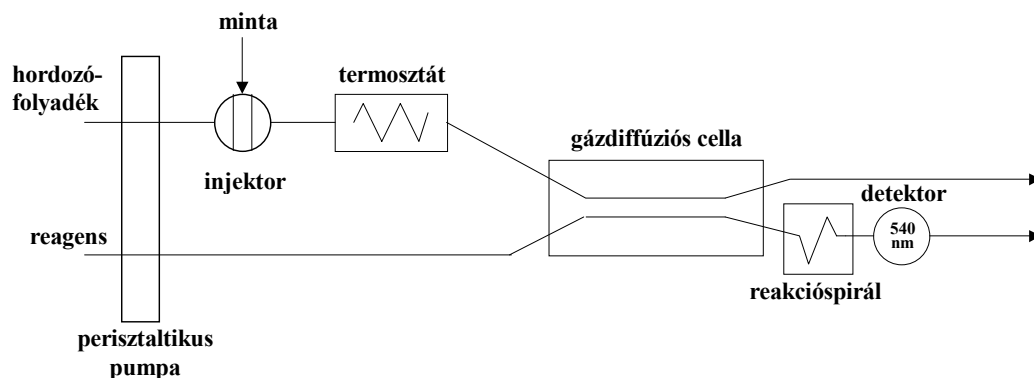
Reagensek, oldatok:

- hidroxil-amin törzsoldat: 20 g hidroxil-amin-kloridot 1000 ml desztillált vízben oldottam fel (az elkészült oldat az irodalmi hivatkozás szerint 1 hónapig stabil);
- indikátor törzsoldat: 0,25 g metilnarancs indikátort 2 ml 1 mol·l⁻¹-es NaOH-ban oldottam fel, majd 1000 ml-re egészítettem ki desztillált vízzel (az elkészült oldat az irodalmi hivatkozás szerint 1 hónapig stabil);
- hordozófolyadék (C): 15,6 g két kristályvizes nátrium-dihidrogén-foszfátot és 12,1 g TRIS-t kb. 950 ml desztillált vízben oldottam fel. Az oldat pH-ját 1 mol·l⁻¹-es sósavval 7-re állítottam, majd 1,2 g 30%-os Brij-35-öt adtam hozzá. Végül az egészet desztillált vízzel 1000 ml-re töltöttem fel (az elkészült oldat az irodalmi hivatkozás szerint 1 hónapig stabil);
- reagens-oldat (R): 100 ml indikátor törzsoldatot 150 ml hidroxil-amin törzsoldattal elegyítettem, majd az egészet 1000 ml-re egészítettem ki desztillált vízzel (az elkészült oldat az irodalmi hivatkozás szerint 1 hétig stabil);
- mosófolyadék: 1000 ml desztillált vízben 1,2 g 30%-os Brij-35-öt oldottam fel;
- a kalibrációhoz 10 mmol·l⁻¹ koncentrációjú desztillált vizes törzsoldatot készítettem. A kalibráló oldatok a kalibráló törzsoldat desztillált vizes hígításával készültek 0-5 mmol·l⁻¹ aceton koncentráció tartományban.

Az analitikai mérőrendszer felépítését az 12. ábra, az irodalmi paraméter-beállításokat a 20. táblázat tartalmazza.

Paraméter	Alapbeállítási szint
Injektált mintamennyiség:	200 µl
Hordozófolyadék:	C oldat, 2,0 ml/perc térfogatárammal
Reagens:	R oldat, 1,5 ml/perc térfogatárammal
Detektálás:	540 nm
Ciklusidő:	80 s
Reakcióspirál:	0,5-60 cm
Termosztát:	80 °C

20. táblázat: A FIA-mérőrendszer kiindulási paraméter-beállításai



12. ábra: Az acetontartalom meghatározására alkalmas FIA-mérőrendszer felépítése

3.2.1.2.3. A FIA-módszer optimalítása kísérlettervezés alkalmazásával

Az általam kidolgozott és alkalmazott optimalizációs eljárás általános lépéseit a Függelék 1. ábráján foglaltam össze. A konkrét alkalmazási példa bemutatását az ábrán látható lépéseknek megfelelően közlöm.

3.2.1.2.3.1. A célfüggvény meghatározása (1. lépés)

FIA-mérőrendszerem vizsgálatánál célként a megfelelő jelalak mellett maximális analitikai jelintenzitás (540 nm-en mérhető abszorbancia) elérését (érzékenység-növelés) választottam, lehetőleg minél rövidebb ciklusidő (kisebb analízisidő és kevesebb reagensfogyasztás) felhasználása mellett. A célfüggvény tehát az analitikai jel intenzitása volt.

3.2.1.2.3.2. Lehetséges befolyásoló faktorok meghatározása (2. lépés)

A független változókat faktoroknak, beállítási értékeiket szinteknek nevezik. Azzal a feltételezéssel éltem, hogy e szinteket pontosan be tudom állítani. Gyakorlatilag ez azt jelentette, hogy a beállítások bizonytalansága elhanyagolható ahhoz az intervallumhoz képest, amelyben értéküket változtattam.

Az analitikai rendszerről előzetesen szerzett ismereteimre, előkísérleteimre, valamint elméleti megfontolásokra támaszkodva sorba vettem valamennyi, a célfüggvényt feltételezhetően befolyásoló faktort, melyek a vizsgálat tárgyát képező FIA-rendszer esetén az alábbiak voltak:

- környezeti hőmérséklet,
- környező levegő relatív páratartalma,
- légnyomás,
- termosztálás hőmérséklete,
- termosztálás ideje,
- minta minősége,
- minta koncentrációja,
- injektált minta mennyisége,
- hordozófolyadék kémiai összetétele,
- reagens kémiai összetétele,
- hordozófolyadék térfogatárama,
- reagens térfogatárama,
- gázdifúziós membrán minősége,
- reakcióidő,
- személyzet,
- egyéb előre nem jelezhető hatások.

3.2.1.2.3.3. A várhatóan ténylegesen ható, kézben tartható faktorok kiválasztása (3. lépés)

A következő munkafázisban a fenti faktorok számát elméleti úton redukáltam: kizártam azokat a faktorokat, amelyeken nem kívánok változtatni (pl. kémiai összetételek), valamint azokat, amelyek a laboratórium felszereltségi szintjén nem tarthatóak kézben (pl. környezeti tényezők), vagyis szintjeiket nem állt módomban beállítani.

Ezt követően az alábbi elméleti megfontolásaimra támaszkodva végiggondoltam a maradék faktorok lehetséges hatásait abból a célból, hogy a hatásuk becsléséhez szükséges beállítási szintjeiket meghatározzam. Ezek a következők:

Termosztálás: a hordozófolyadék és így a minta hőmérsékletének növelésével a diffúziósebesség – a diffúziós együttható hőmérsékletfüggése miatt – általában nő. Magasabb termosztálási hőmérsékletet választva tehát valószínű, hogy az analitikai jel intenzitása növekszik. Túl magas hőmérsékleten az oldatban buborékok keletkezhetnek, melyek a gázdifúziós membránon keresztül a reagensáramba jutva a detektálást lehetetlenné tehetik.

Minta minősége: a tejes aceton-oldat a vizes oldathoz képest eltérő fiziko-kémiai tulajdonságú közeg, ezért várható, hogy a kétféle közegben a diffúzió sebessége különböző lesz, ami a jel alakját, intenzitását befolyásolhatja.

Minta koncentrációja: a nagyobb mennyiségű acetont tartalmazó oldat bizonyosan magasabb csúcsot ad az alkalmazott koncentrációtartományon belül, ez teszi lehetővé az analízist.

Hordozófolyadék minősége: előkísérleteim során kiderült, hogy az irodalmi hivatkozásban alkalmazott, detergenst tartalmazó foszfát-puffer (C oldat) a deklarált 1 hónappal szemben csak 1-2 napig stabil. Az instabil oldat koncentrációarányosan ugyan, de csökkenti a jelintenzitást, alacsony koncentrációtartományokban ($0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ alatt) pedig – ugyancsak koncentrációarányos –, de negatív jelet ad. Ezt elkerülendő a puffer oldatot azonos mennyiségű detergenst tartalmazó desztillált vízzel (C' oldat) helyettesítettem.

Injektált minta mennyisége: a rendszerbe kerülő minta mennyiségének növelésével a jelintenzitás növekszik, azonban túl nagy mennyiségű mintát alkalmazva az analitikai jel torzulása (jelszélesedés, kettős csúcs) várható, emellett a szükséges ciklusidő is növekszik.

Hordozófolyadék és reagens térfogataramai: várakozásom szerint a mérőrendszerben e kettő aránya az, ami a leginkább befolyásolja a jelintenzitást és a jelalakot. A kontrollált diszperzitású FIA-rendszerben uralkodó lamináris-közeli áramlási viszonyokat feltételezve, a mintát tartalmazó hordozófolyadék és a reagens a gázdifúziós celláig közelítően dugószerűen áramlik, ott azonban azonos térfogat áll mindkettő rendelkezésére, amely térfogatokat a gázdifúziós membrán választja el. Ilyen körülmények között a gázdifúzió határfoka elméletileg nagyobb kell legyen, ha a hordozófolyadék a reagensáramhoz képest lényegesen nagyobb térfogatárammal rendelkezik. A hordozófolyadékot nagyobb, a reagenst kisebb térfogatárammal áramoltatva a reagens cellában eltöltött tartózkodási ideje nő meg, ami a jelintenzitás növekedését elősegítheti. Túl nagy tartózkodási idő azonban a jelalak torzulását és a periódusidő növekedését eredményezheti.

Reakcióspirál hossza: amennyiben a reakcióspirál hosszát növelem, ugyancsak nő a tartózkodási idő, ami elméletben az analitikai jelet szolgáltató kémiai reakció reakcióidejét növeli. Mivel az áramló oldatos rendszerekben (az analitikai reakciónál megfelelően nagy kezdeti reakciósebességet feltételezve) a reakciókat sosem hagyjuk eljutni az állandósult (steady state) állapotig, a reakcióspirál hosszának, vagyis a reakcióidőnek a növelése a jelintenzitás növekedéséhez vezet. Túl nagyra választva a tartózkodási időt az előbb említett problémák (jelalak-torzulás, periódusidő-növekedés) itt is megjelenhetnek.

A felsorolt faktorok egyedi hatásain (főhatások) kívül természetesen ezek bármilyen kombinációjának hatása (interakciók) is jelentős lehet.

Előzetes ismereteim, előkísérleteim és a fenti megfontolásaim szerint a jelintenzitás alakulására elméletileg az alább felsorolt faktoroknak (F) lehet jelentős hatása:

- F1: termosztálás hőmérséklete,
- F2: minta minősége,
- F3: minta koncentrációja,
- F4: hordozófolyadék minősége,
- F5: injektált minta mennyisége,
- F6: hordozófolyadék térfogatárama,
- F7: reagens térfogatárama,
- F8: reakcióspirál hossza.

Elvégzendő kísérleteimnél tehát ezek valódi hatását kívántam tisztázni.

3.2.1.2.3.4. A faktorok beállítási szintjeinek meghatározása (4. lépés)

Amennyiben a célfüggvény és a faktor hatása között lineáris összefüggést tételezek fel, a faktorokat elég két szinten vizsgálni, míg nemlineáris összefüggés feltételezése esetén minimum 3 szinten szükséges a beállítások vizsgálata. A FIA-mérőrendszerben a rendszer egyes elemeinek változtathatósága korlátozott, a kiválasztott faktorok beállítási szintjei csak bizonyos, diszkrét értékeket vehetnek fel. Ennek megfelelően a faktorok általam választott szintjei a következők:

Kétszintes faktorok:

- F1: termosztálás hőmérséklete (2 szint: 50 és 90 °C),
- F2: minta minősége (2 szint: vizes oldat és tejes oldat),
- F3: minta koncentrációja (2 szint: 1 és 5 mmol·l⁻¹),
- F4: hordozófolyadék minősége (2 szint: desztillált víz és foszfát-puffer).

Háromszintes faktorok:

- F5: injektált mintamennyiség (3 szint: 100, 200 és 300 µl),
- F6: hordozófolyadék térfogatárama (3 szint: 1,2, 1,5 és 2,0 ml/perc),

F7: reagens térfogatárama	(3 szint: 0,8, 1,2 és 1,5 ml/perc),
F8: reakcióspirál hossza	(3 szint: 30, 60 és 90 cm).

3.2.1.2.3.5. Döntés: egyterves vagy kétterves optimálás? (5. lépés)

A kiválasztott faktorokkal megvalósítandó „egyterves optimáláshoz” szükséges teljes faktoros kísérleti terv (4 kétszintes és 4 háromszintes faktorial végrehajtandó terv) összesen 1296 kísérlet elvégzését kívánná meg. Tekintetbe véve, hogy a felsorolt főhatásokon kívül egyéb (idővel változó és itt figyelembe nem vett) hatások is megjelenhetnek, a kísérletek sorrendjét célszerű random módon választani. Ezt azonban a következő korlátozza: az általában 100 másodperc körüli ciklusidőt, a beállításokhoz szükséges szerelési időt, valamint a termosztát felmelegítéséhez és lehűléséhez szükséges időt figyelembe véve a kísérletek csak minimum két és fél hónap alatt (1 személlyel és 5 napos munkahéttel számolva napi 8 órás munkaidőben) lennének elvégezhetőek, ami túl hosszú időtartam. Emellett a környezeti és egyéb körülmények ez idő alatt jelentősen megváltozhatnak, ami kerülendő és nehezen azonosítható hatásokat jelenthet.

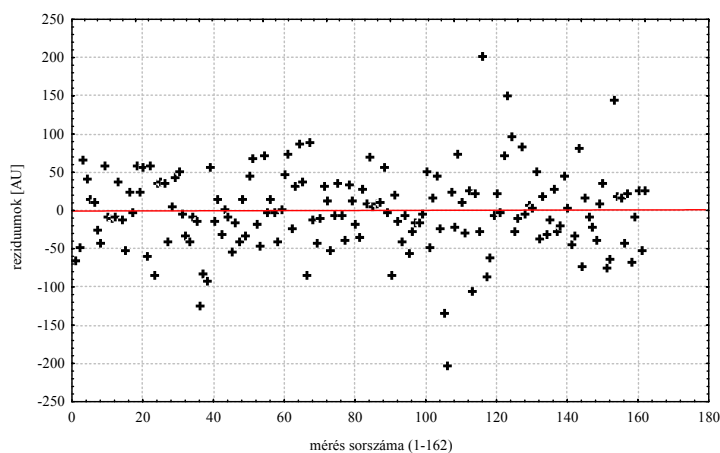
A teljes faktoros terv helyett részfaktortervet (1/8-os terv: 162 kísérlet) alkalmazva a kísérletek elvégzéséhez szükséges idő kb. 1 hétre csökkenthető úgy, hogy a teljes randomizálás helyett előbb az alacsonyabb, majd a magasabb hőmérsékleten elvégzendő kísérleteket végezzük el, hogy a termosztát felfűtési/lehűlési idejét ne kelljen minden kísérlet előtt kivárni (időbeli korlátozás). Ez természetesen bizonyos információvesztéssel járhat, azonban lényegesen gyorsabban kapunk eredményt.

A kiválasztott 1/8-os kísérleti terv (Függelék 2/a. táblázat) előnyei tehát összefoglalva:

- az összes kísérleteknek csak az 1/8-át kell elvégezni (1296 helyett 162 kísérlet),
- a lényeges faktorok és kölcsönhatások kiválaszthatók,
- a lényegtelen faktorok elhagyásával a faktorok száma várhatóan csökkenthető.

A kísérletek elvégzése előtt azonban fontos tisztázni, hogy az általam összeállított részterv végrehajtása milyen információvesztéssel jár: mely hatások vizsgálhatók tiszta formában és melyek azok a hatások, amelyek a faktorok egyszerre történő változtatása, valamint a statisztikai program kiválasztási algoritmusai miatt keveredhetnek egymással. Ezért megvizsgáltam, hogy az egyes faktorok, illetve kölcsönhatásaik keveredése milyen mértékű lehet. A statisztikai program által mátrix-formában kiadott vizsgálat eredményei szerint

egyetlen keveredés sem haladta meg a 11%-ot, ami azt jelenti, hogy az egyik hatásban jelenlevő másik hatás sehol sem nagyobb, mint 11%, vagyis nincs jelentős keveredés.



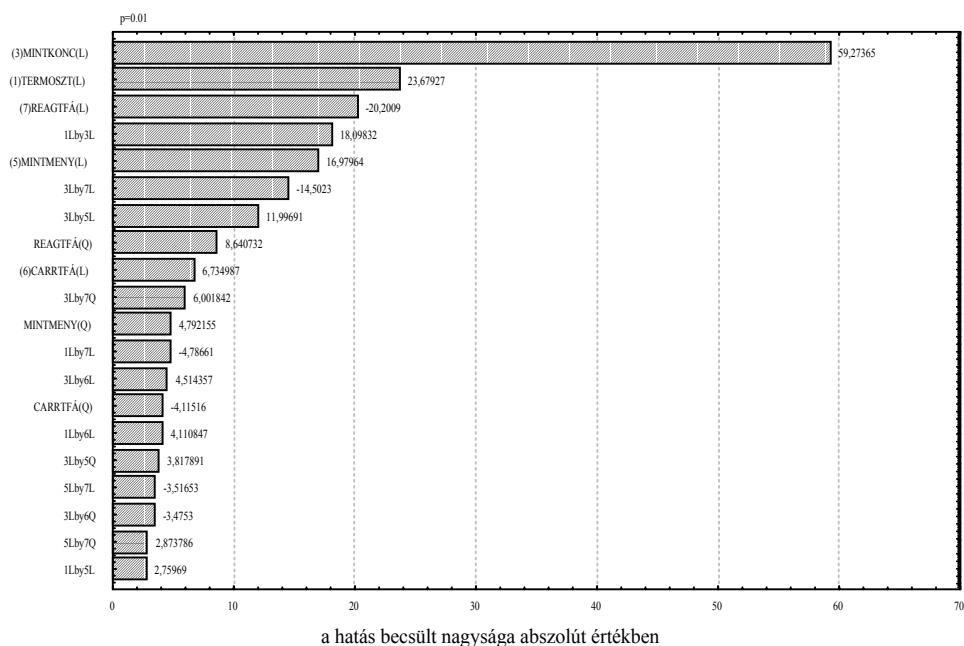
13. ábra: Az acetontartalom meghatározására alkalmas FIA-eljárás optimalása: a reziduumok alakulása az 1/8-os részfaktor-terv szerint elvégzett kísérletek sorrendjében

A tervben meghatározott kísérletek végrehajtása után a reziduumokat (a mért és számított értékek eltérései) a kísérletek sorszámanak függvényében vizsgálva a 13. ábrán látható képet kaptam.

A mérések sorrendjében vizsgálva az eltéréseket tájékozódhattam a később ismertető modellhez illesztett függvény megfelelőségéről. Mint az ábrán is látható, a pontoknak nincs menete, tehát valószínű, hogy nem jelentkezett a kísérletsorozatban előre nem várt, időfüggő hatás és az illesztett függvény is megfelelőnek minősíthető. Itt kell megjegyezni, hogy ez összecseng a gázdifúziós membrán változását vizsgáló előkísérleteimmel, ahol a membránt hosszú időn keresztül túlterhelve sem állapítottam meg abszorbancia-változást, bár elvileg elképzelhető volt a membrán öregedésével (tehát az idővel) együtt járó abszorbancia-csökkenés.

3.2.1.2.3.6. A faktorok számának csökkentése (6. lépés)

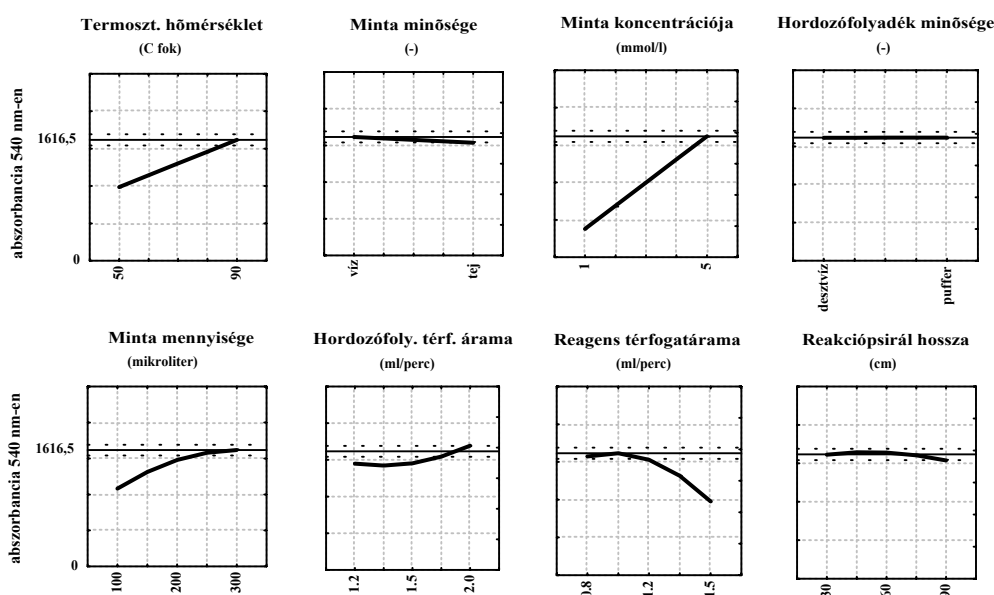
A t-próbát elvégezve, az összes vizsgált hatás (Függelék 2/b. táblázat) közül kiválaszthatók voltak a szignifikáns ($p < 0,01$) hatások és interakciók. A 14. ábrán az egyes szignifikáns hatások Pareto-diagramon ábrázolva (abszolút értékeik szerinti sorrendben) szerepelnek.



14. ábra: Az acetontartalom meghatározására alkalmas FIA-eljárás optimalása: az 1/8-os részfaktor-terv szerint elvégzett kísérletek alapján a hatások Pareto-diagramja

Az 15. ábráról leolvashatók a vizsgált faktorok résztervben megismerhető hatásai. Az ábrán láthatók szerint a minta és a hordozófolyadék minőségének, valamint a reakcióspirál hosszának nincs jelentős hatása a jelintenzitásra. Amint várható volt, a mintaoldat koncentrációja és a termosztálási hőmérséklet hatása igen jelentős, és a várakozásnak megfelelő. A hordozófolyadék térfogatárama minél nagyobb kell legyen, míg a reagens térfogatáramát alacsony szinten érdemes tartani. A főhatások mellett természetesen jelentkeztek szignifikáns interakciók is. Ezekkel azonban a részterv esetén még nem foglalkoztam, mivel várakozásaimnak megfelelően, csak a jelentősnek bizonyult hatások között fellépő kölcsönhatások bizonyultak szignifikánsnak.

A fenti összefüggések értelmében, matematikai formában is megfogalmazható a célfüggvény lényeges faktoroktól való függése.



15. ábra: Az acetontartalom meghatározására alkalmas FIA-eljárás optimalása: az 1/8-os részfaktorterv szerint elvégzett kísérletek alapján a faktorok becsült hatásai

3.2.1.2.3.7. A teljes faktoros terv végrehajtása, az optimum meghatározása (7. lépés)

A részterv végrehajtásával nyert információk alapján kiválasztottam a lényeges hatásokért felelős faktorokat. Mivel a résztervvel a faktorok hatásának keveredése miatt csak közelítőleg adható meg azok iránya és a többi hatáshoz és interakcióhoz viszonyított nagysága, szükség volt a kiválasztott faktorok – most már információvesztés nélküli – hatásának tisztázására. Ezt egy teljes faktoros terv végrehajtásával végeztem el (Függelék 3. táblázat). A termosztálás és a mintakonzentráció hatásáról a részterv alapján egyértelműen bebizonyosodott, hogy lineáris összefüggésben állnak az analitikai jel intenzitásával, így ezeket a továbbiakban már nem vizsgáltam. Az analitikai jel további növelését céloztam meg, így a FIA lehetőségeit teljesen kihasználva határoztam meg a térfogatáramok beállítási szintjeit. A tervben (2^3 teljes faktoros terv, 8 kísérlet) alkalmazott beállítások a következők voltak:

Állandó beállítások:

- termosztálás hőmérséklete (90 °C),
- minta minősége (vizes oldat),
- minta koncentrációja (5 mmol·l⁻¹),

hordozófolyadék minősége	(desztillált víz),
reakcióspirál hossza	(30 cm).

A vizsgált faktorok:

F1: injektált minta mennyisége	(2 szint: 200 és 300 μ l),
F2: hordozófolyadék térfogatárama	(2 szint: 2,0 és 2,8 ml/perc),
F3: reagens térfogatárama	(2 szint: 0,8 és 1,2 ml/perc).

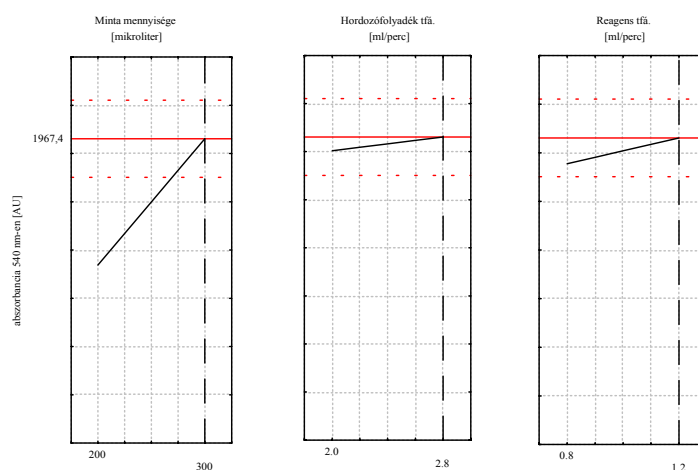
A vizsgálatokat 2 ismétléssel teljes randomizálás mellett végeztem el. A kísérletek során feljegyeztem az egyes beállításoknál mért abszorbancia értékeket, valamint a ciklusidő csökkenthetősége érdekében a csúcsok jelentkezésének idejét is (Függelék 3/a. táblázat). A kiértékelést ennek megfelelően kétféle célfüggvényre is elvégeztem: az analitikai jel intenzitásának maximumát, és a csúcshelyek minimumát kerestem. A kísérleti terv kiértékelése a részfaktortervnel bemutatott eljárásnak megfelelően történt, így annak részletes ismertetésétől most eltekintek, csak az optimumkeresések végeredményét közlöm. (Az optimalás a faktorok szintjeinek különböző beállításaihoz számolt célfüggvény-értékek itt be nem mutatott szélsőérték-keresésével történt.)

A jelintenzításra (Függelék 3/b. táblázat) mindhárom vizsgált faktornak jelentős hatása volt, kölcsönhatásaiknak viszont nem befolyásoltak. A maximális jelintenzitás elérése érdekében mindhárom faktort a magasabb szintre kell beállítani.

A csúcshelyre (Függelék 3/c. táblázat) lényegében a hordozófolyadék térfogatáramának volt hatása, bár az injektált mintamennyiségre is gyenge szignifikáns hatást mutatott. A térfogatáramot a magasabb szintre (2,8 ml/perc) kell állítani annak érdekében, hogy a ciklusidő (csúcshely) minimális legyen, így a szükséges beállítási szint azonos az előbbi maximumkeresésnél tapasztaltakkal.

A 16. ábráról leolvashatók az optimált rendszer paraméter-beállításai (szaggatott vonal).

A FIA mérőrendszer maximális jelintenzitáshoz és minimális ciklusidőhöz tartozó optimális paraméter-beállításait összefoglalóan a módszerleírás tartalmazza.



16. ábra: Az acetontartalom meghatározására alkalmas FIA-eljárás optimalása: a 2^3 teljes faktorterv szerint elvégzett kísérletek alapján a vizsgált faktorok hatásai

3.2.1.2.4. Az acetontartalom meghatározására alkalmas optimalált FIA-módszer leírása

Reagensek, oldatok:

- hidroxil-amin törzsoldat: 20 g hidroxil-amin-kloridot 1000 ml desztillált vízben oldottam fel (az elkészült oldat 1 hónapig stabil);
- indikátor törzsoldat: 0,25 g metilnarancs indikátort 2 ml $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ -es NaOH-ban oldottam fel, majd 1000 ml-re egészítettem ki desztillált vízzel (az elkészült oldat 1 hónapig stabil);
- hordozófolyadék (C'): 1000 ml desztillált vízben 1,2 g 30%-os Brij-35-öt oldottam fel;
- reagens-oldat (R): 100 ml indikátor törzsoldatot 150 ml hidroxil-amin törzsoldattal elegyítettem, majd az egészet 1000 ml-re egészítettem ki desztillált vízzel (az elkészült oldat 1 hétig stabil);
- mosófolyadék: 1000 ml desztillált vízben 1,2 g 30%-os Brij-35-öt oldottam fel;
- a kalibrációhoz $10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentrációjú desztillált vizes törzsoldatot készítettem. A kalibráló oldatok a kalibráló törzsoldat desztillált vizes hígításával készültek $0\text{-}5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ aceton koncentráció tartományban.

Az analitikai mérőrendszer optimalált paraméter-beállításait a 21. táblázat tartalmazza.

Paraméter	Optimális beállítási szintje
Injektált mintamennyiség:	300 µl
Hordozófolyadék:	C' oldat, 2.8 ml/perc térfogatárammal
Reagens:	R oldat, 1.2 ml/perc térfogatárammal
Detektálás:	540 nm
Ciklusidő:	70 s
Reakcióspirál:	0,5-30 cm
Termosztát:	90 °C

21. táblázat: Az acetontartalom meghatározására alkalmas optimált FIA-módszer paraméter-beállításai

3.2.1.2.5. Az acetontartalom meghatározására alkalmas FIA-módszer érvényesítése

Az optimált áramló injektációs mérőrendszert validáltam, vagyis meghatároztam a rendszer analitikai teljesítményjellemzőit.

3.2.1.2.5.1. Mérési tartomány

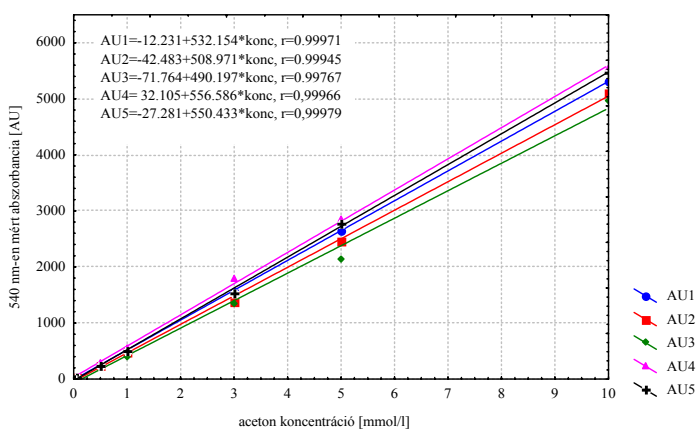
A kijelölésre kerülő tartományra az alábbiaknak kell teljesülni:

- A kijelölt tartomány tartalmazza (lehetőleg) a lineáris tartományt.
- Összhangban legyen a felhasználói igényekkel és a technikai lehetőségekkel.
- A tartomány alsó határán a mintára mért értékek szignifikánsan különbözzenek a vakra mért értékektől.
- A mérési módszer a tartományon belül a megkívánt analitikai jellemzőkkel rendelkezzen.

A termelői nyerstej acetontartalmának meghatározására kidolgozott áramló injektációs mérési módszer elsősorban gyorsvizsgálati módszerként kerülhet felhasználásra. Szakirodalmi adatokra [Fekete és mtsai, 1999], valamint az elvégzett előzetes vizsgálatok eredményeire támaszkodva a termelői nyerstejek acetontartalma kevés kivétellel a 0-3 mmol·l⁻¹ koncentrációtartományba esik.

Az analitikai rendszerrel szemben támasztott igényekkel összhangban a vizsgálati eljárás munkatartományát a 0-10 mmol·l⁻¹, a kalibrációs tartományt pedig 0-5 mmol·l⁻¹ koncentrációtartományban határoztam meg. A munkatartomány és a lineáris tartomány vizsgálatára felhasznált mérési adatállományt (0-10 mmol·l⁻¹) a Függelék 4. táblázata

tartalmazza. Mint az a 17. ábrán látható, a kijelölt munkatartomány egyben lineáris tartomány is.



17. ábra: Az acetontartalom meghatározására alkalmas optimált FIA-módszer validálása: a munkatartomány meghatározása

3.2.1.2.5.2. Linearitás és érzékenység

A linearitás vizsgálatához és az érzékenység meghatározásához ugyanazon 5 különböző időpontban elvégzett kalibrációt használtam fel. A mérési adatállományt a 4. Függelék tartalmazza. A kapott kalibrációs egyenesek és a kalibrációs összefüggések a 17. ábrán láthatóak. Az ábrán közölt adatok alapján a teljes munkatartomány lineáris, melyet az illesztett egyenesek igen jó korrelációs koefficiensei is alátámasztanak ($0,99767 < r < 0,99979$).

Az érzékenység meghatározásához a $0-5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ koncentrációtartományban végzett 5 különböző kalibráció alapján a lineáris kalibrációs egyenesek meredekségének átlagát számítottam ki. A vizsgálatot egyváltozós lineáris regresszió-analízis segítségével végeztem, melynek eredményeit a 22. táblázatban foglaltam össze.

Regression Summary for Dependent Variable: AU1-5 R=0,99097463 R ² =0,98203071 Adjusted R ² =0,98138895 F(1,28)= 1530,2 p<0,00000 Std.Error of estimate: 131,69						
	BETA	St. Err. Of BETA	B	St. Err. Of B	t(28)	p-level
Intercept			-8,5830	31,87961	-0,26923	0,789726
KONC1-5	0,990975	0,025333	514,4815	13,15205	39,11795	0,000000

22. táblázat: Az acetontartalom meghatározására alkalmas optimált FIA-módszer validálása: az 5 különböző napon végrehajtott kalibrációra együtt alkalmazott lineáris regresszió legfontosabb információinak összegzése (BETA: iránytangens becült értéke, St. Err Of BETA: BETA hibája, B: az illesztett függvény konstansai, St.

Err. Of B: a konstansok szórásai, t: t-statisztika értéke a zárójelben jelzett szabadsági fokon, p-level: valószínűség)

Univariate Tests of Significance for AU1-5 (kalibr.sta)					
Over-parameterized model					
Type III decomposition					
	SS	df	MS	F	p
Intercept	1257	1	1257	0,887	0,357578
NAP-KONC1-5	26793662	5	5358732	3780,330	0,000000
NAP	1930	4	482	0,340	0,847503
Error	28351	20	1418		

23. táblázat: Az acetontartalom meghatározására alkalmas optimált FIA-módszer validálása: az 5 különböző napon végrehajtott kalibrációra alkalmazott kovariancia-analízis eredménye (SS: eltérés-négyzetösszegek, df: szabadsági fok, MS: szórásnégyzet, F: F-statisztika értéke, p: valószínűség, intercept: tengelymetszet, error: véletlen hiba)

A 22. táblázat adataiból a következők olvashatók ki: az 5 illesztett egyenes becsült átlagos tengelymetszete: $-8,58 \pm 31,880$ abszorbancia egység (AU), becsült átlagos meredeksége pedig $514,48 \pm 13,152$ abszorbancia egység (AU)/ $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, mely utóbbi a módszer érzékenységének felel meg. A tengelymetszet és a meredekség szóráseértékei viszonylag nagyok, bár fontos megjegyezni, hogy a FIA módszerrel mért 10000 abszorbancia egység (absorbance units, AU) felel meg a spektrofotométereken mérhető 1,0000 abszorbancia egységnek (E), vagyis a FIA készülékben alkalmazott detektor legalább egy nagyságrenddel érzékenyebb az általánosan alkalmazásra kerülő spektrofotométereknél. Az eltérések fő oka, hogy a vizsgálatokat öt különböző időpontban végeztem el, minden esetben frissen készített oldatokkal. Ez a jelenség egyben a FIA-méréstechnika sajátossága is, hiszen a dinamikus mérőrendszer igen érzékenyen reagál a különböző változásokra (pl. új reagensek, standardok, gázdifúziós membrán stb.), ezért a gyakorlati tapasztalat az, hogy minden egyes mérésorozat elvégzése előtt szükséges új kalibrációt készíteni. (Az illesztett egyeneseket az alkalmazott statisztikai szoftverrel origón átmenő egyenesekként is lehetett volna értékelni, de ezt a megoldást azért nem választottam, mert a FIA-készülékhez tartozó szoftver kalibrációs módszere ezt nem teszi lehetővé.)

Annak megállapítására, hogy az 5 különböző napon elvégzett kalibráció különbözőségének mi az oka, kovariancia-analízist végeztem (23. táblázat). A modellben a függő változó a mért abszorbancia (AU1-5) volt, a napokat (NAP) kategórikus, míg a koncentráció-értékeket (KONC1-5) folytonos változóként adtam meg. A táblázat adatai alapján megállapítottam, hogy a napok között szignifikáns eltérés nem tapasztalható. A tengelymetszetek zérustól való eltérése sem szignifikáns, viszont a meredekségek eltérése szignifikáns. Az egyes napokon elvégzett kalibrációk közötti szóródás 38 abszorbancia

egységnek (AU) adódott. Az elvégzett analízissel statisztikailag is igazoltam a FIA-méréstechnika érzékenységére vonatkozó gyakorlati tapasztalatot: minden mérés elvégzése előtt szükséges kalibrálni.

A regresszió alapfeltételeinek teljesülését is ellenőrizni kell, ezt a reziduumok analizálásával végeztem. Itt azonban már figyelembe vettem, hogy a különböző időpontokban végzett kalibrációk között jelentős eltérések vannak, így három párhuzamos kalibráció adatait dolgoztam fel (Függelék 5. táblázat).

A regresszió alapfeltételei:

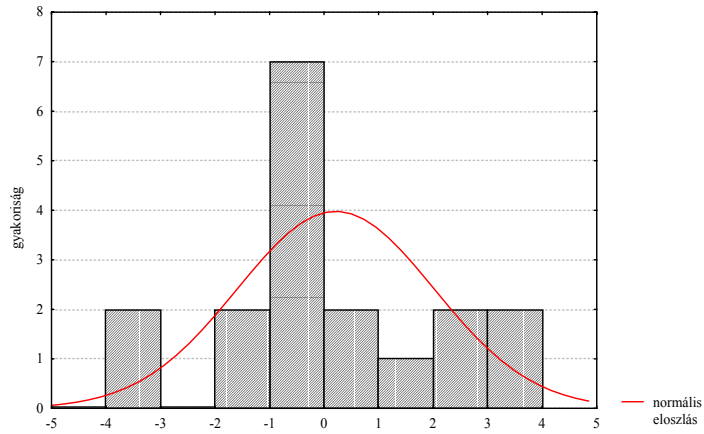
- a mérési hibák egymástól függetlenek,
- variációjuk konstans,
- a két változó közötti függvénykapcsolat lineáris.

A Durbin-Watson próba (24. táblázat) annak ellenőrzésére szolgál, hogy a mérés során elkövetett hibák egymástól függetlenek-e, vagyis a hibáknak nincs-e valamilyen „menete, trendje”. A nullhipotézis: nincs korreláció az elkövetett hibák között. A számított próbastatisztika értéke ($d=1,316172$), míg a kritikus értékek: ($n=18$ mérés esetén, $\alpha=0,05$ elsőfajú hibánál, $K=1$ független változó mellett) $d_L=1,04$ és $d_U=1,26$ tehát a nullhipotézist el kell fogadnom, azaz az elkövetett hibák függetlenek.

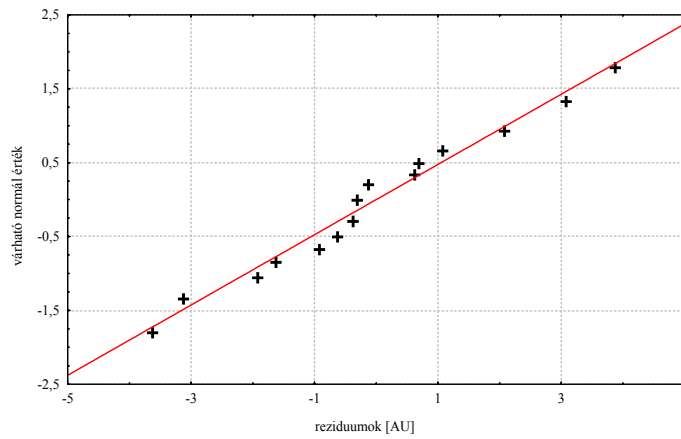
Durbin-Watson d (szakmervalid.sta) and serial correlation of residuals		
	Durbin-Watson d	Serial Corr.
Estimate	1,316172	0,323952

24. táblázat: Az acetontartalom meghatározására alkalmas optimált FIA-módszer validálása: a mérési hibák függetlenségére vonatkozó Durbin-Watson próba eredményei (estimate: becsült értékek, Durbin-Watson d: a próbastatisztika értéke, Serial Correlation of residuals: szintén a hibák függetlenségét méri, a mérés sorrendje és a reziduum közötti kapcsolat alapján)

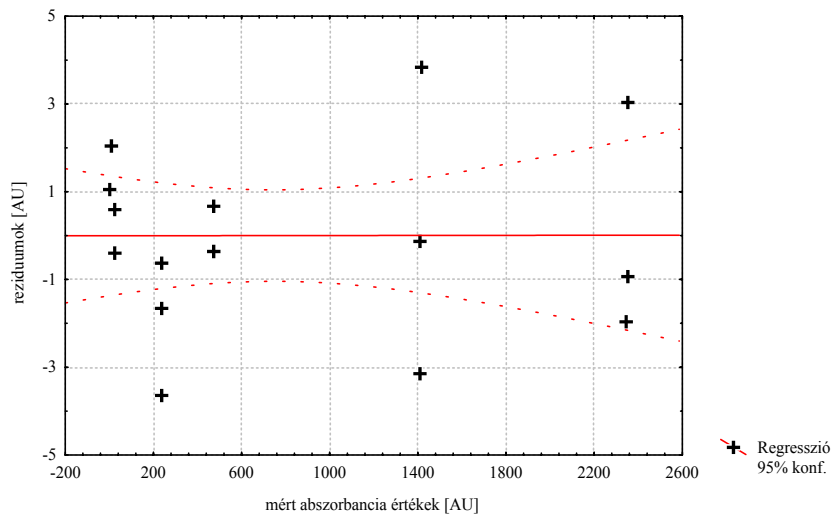
Ha az alkalmazott lineáris modell adekvát – vagyis a valódi függvény lineáris –, a reziduumok eloszlásának típusa, várható értéke és variációjuk megegyezik a mérési hibáéval. A reziduumok tulajdonságait grafikusan ellenőriztem. A 18. ábra a reziduumok gyakorisági hisztogramját, a 19. ábra eloszlásukat, míg a 20. ábra a reziduumokat a mért abszorbancia értékek függvényében mutatja be.



18. ábra: Az acetontartalom meghatározására alkalmas optimált FIA-módszer validálása: a reziduumok gyakorisági hisztogramja



19. ábra: Az acetontartalom meghatározására alkalmas optimált FIA-módszer validálása: a reziduumok normális eloszlásának vizsgálata



20. ábra: Az acetontartalom meghatározására alkalmas optimált FIA-módszer validálása: a reziduumok ábrázolása a mért abszorbancia függvényében

Mint az utóbbi három ábrából is kiderül, a kalibrációnál elkövetett mérési hibák normális eloszlásúaknak fogadhatók el, varianciájuk konstans és véletlenszerűen szórnak a zérus körül, vagyis az alkalmazott modell adekvát, tehát a valódi függvény lineáris.

3.2.1.2.5.3. Szelektivitás és specifitás

Mivel a FIA-eljárás analitikai elve a primer aminok és a ketonok között lejátszódó nonspecifikus oximálási reakció, elvileg elképzelhető, hogy más, a mintában található keton is adja a reakciót. Ugyanakkor az irodalmi adatok szerint a tejmintákban az acetonnal összemérhető illékonyaságú keton nem fordul elő, tehát a módszer specifikusnak tekinthető annak ellenére, hogy maga a kémiai reakció nem az.

A módszer szelektivitását ismert mennyiségű standardok addíciója után a vizes oldatban és a mintamátrixban mért visszanyerésekkel jellemeztem (25. táblázat).

	Aceton addíció [mmol·l ⁻¹]	Visszanyerés [%]
Vizes oldatban	1,0	91,79±4,152
	2,5	97,46±2,638
	5,0	98,34±1,117
Tejben	1,0	89,30±6,524
	2,5	93,95±3,498
	5,0	88,88±5,154

25. táblázat: Az acetontartalom meghatározására alkalmas optimált FIA-módszer validálása: a módszer szelektivitásának meghatározása (a közölt adatok minden esetben 3 független meghatározás átlagát és szórását reprezentálják)

A vizes standard oldatban mért visszanyerések a tejmintákban mért visszanyerésekhez képest valamivel jobb eredményre vezettek, de a FIA gyorsvizsgálati módszerrel szemben támasztott követelményeim (90 % feletti átlagos visszanyerés) kielégíti, megfelelően szelektív.

3.2.1.2.5.4. Ismételhetőség, reprodukálhatóság

Az ismételhetőségi és reprodukálhatósági vizsgálatok alkalmával hat 5 mmol·l⁻¹ koncentrációjú aceton standard oldatra két személy által, két külön időpontban, két ismétléssel mért abszorbancia értékeket vettem össze.

Az eredmények matematikai statisztikai értékelését a mennyiségi statisztikában szokásos Gage R&R (ismételhetőség & reprodukálhatóság) technikával végeztem el. A feldolgozásra került mérési eredményeket a Függelék 6. táblázata tartalmazza.

Variance Components; Variable: MEASURE (szakmismrepr.sta)						
Mean=2625,33 Std.Dv=164,462						
Operators: 2 Parts: 6 Trials: 2						
	Estimated Sigma	0,90 Lower Conf.Lim	0,90 Upper Conf.Lim	Estimated Variance	% of R & R	% of Total
Repeatability	160,3927	121,1703	243,047	25725,83	56,6318	54,6432
Operator	140,3591	51,9524	2147,226	19700,67	43,3682	41,8454
Interaction (OP)	0,0000	0,0000	0,000	0,00	0,0000	0,0000
Part-to-Part	40,6593	0,0000	111,317	1653,17		3,5114
Combined R & R	213,1349	140,5039	2260,375	45426,50	100,0000	96,4886
Total	216,9785			47079,68		100,0000

26. táblázat: Az acetontartalom meghatározására alkalmas optimált FIA-módszer validálása: az ismételhetőség és a reprodukálhatóság vizsgálatának eredményei (measure: mért abszorbancia értékek, operators: technikusok, parts: oldatok, Trials: ismétlések, Estimated Sigma: becsült szórás, 0,90 Lower/Upper Conf. Lim: a becsült szórás 90%-os konfidencia intervallumának alsó/felső határai, Estimated Variance: becsült variancia, % of R&R: a mérés varianciájának összetevőkre bontása, % of Total: teljes ingadozás varianciájának fölbontása, Repeatability sor: ismételhetőség, Operator sor: reprodukálhatóság, Interaction (OP) sor: kölcsönhatás oldatok és a technikusok között, Part-to-Part: oldatok hatása, Combined R&R: ismételhetőség és reprodukálhatóság együtt)

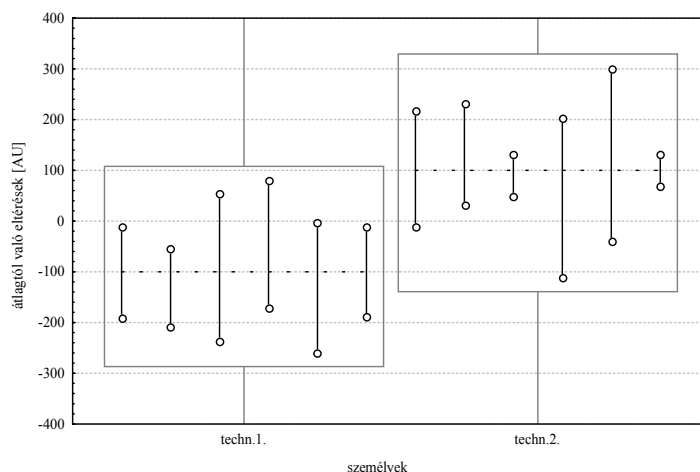
A variancia-analízis eredményei (26. táblázat) azt mutatták, hogy a vizsgálatok során az ismételhetőség nem kielégítő, ez adja a mérési variancia 56,63%-át, tehát ez a mérőeszköz által okozott hiba. Az is látható, hogy az oldatok és a technikusok között nincs kölcsönhatás, az oldatok különbözősége elhanyagolhatóan kicsi, azonban a mérés varianciájának igen jelentős része a különböző személyek alkalmazásának köszönhető. A becsült variancia (Estimated Variance) oszlopban található értékek négyzetgyökei adják az egyes variancia-elemek becsült szórását.

Számszerűsítve tehát:

- A mérés megismételhetősége: 160,39 AU (RSD% = 6,11)
- A mérés reprodukálhatósága: 140,36 AU (RSD% = 5,35)

Tovább fontos információ az egyes mérések közötti teljes szórás (Estimated variance oszlop Combined R&R sora), mely figyelembe veszi, hogy különböző napokon, különböző személyek és ismétléssel végezték a meghatározást, a vizsgált FIA-eljárásra: 213 AU.

Összességében elmondható, hogy a mérési hibáért fele-fele részben az alkalmazott mérési módszer, illetve az azt használó személy tehető felelőssé. Ez az állítás grafikusan is igazolható.



21. ábra: Az acetontartalom meghatározására alkalmas optimált FIA-módszer validálása: ismételhetőség, reprodukálhatóság grafikusán ábrázolva

A 21. ábrán a mért oldatokra vonatkozó (technikus és ismétlés szerinti) átlagos értékektől való eltérést tüntettem fel. A két személynek megfelelő „doboz” elhelyezkedése lehetővé teszi annak gyors észrevételét, ha a mérést végző torzítva mér. Az egyes ismétléseket függőleges vonalak kötik össze, a vízszintes szaggatott vonalak a technikus átlagos mérési eredményeit mutatják. Amennyiben a reprodukálhatóság tökéletes lenne, a függőleges vonalak ponttá zsugorodnának, a vízszintes szaggatott vonalak pedig az origón mennének keresztül. A viszonylag nagy relatív szórások a már említett és a mérőrendszert általánosan jellemző érzékenységek tudhatók be. Az optimált FIA-eljárást az irodalmi adatokkal ismételhetőség és reprodukálhatóság szempontjából összehasonlítva elmondhatom, hogy az irodalmi hivatkozásokban szereplő módszerek általában hasonlóan magas (6-6,3 %) relatív szórásokkal jellemezhető pontosságúak [Diekmann és mtsai., 1986; Marstorp és mtsai., 1983]. Ennek ellenére a módszer a gyorsvizsgálati eljárásokkal szemben támasztott követelményeknek megfelel.

3.2.1.2.5.5. Kimutatási határ

A kimutatási határt a $0 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ koncentrációjú standardra (vak) kapott jel átlagának és háromszoros szórásának összegéből számítottam. A kimutatási határ 17 AU, mely a kalibrációs összefüggések felhasználásával koncentráció-értékre átszámítva $<0,05 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ aceton-koncentrációnak felel meg.

3.2.1.2.5.6. Meghatározási határ

A meghatározási határként (a vak-ot kivéve) a kalibrációs egyenes legsó pontját jelöltem ki, ez 0,05 mmol·l⁻¹ acetón-koncentráció.

3.2.1.2.6. FIA- és a HS-GC-eljárás összehasonlítása

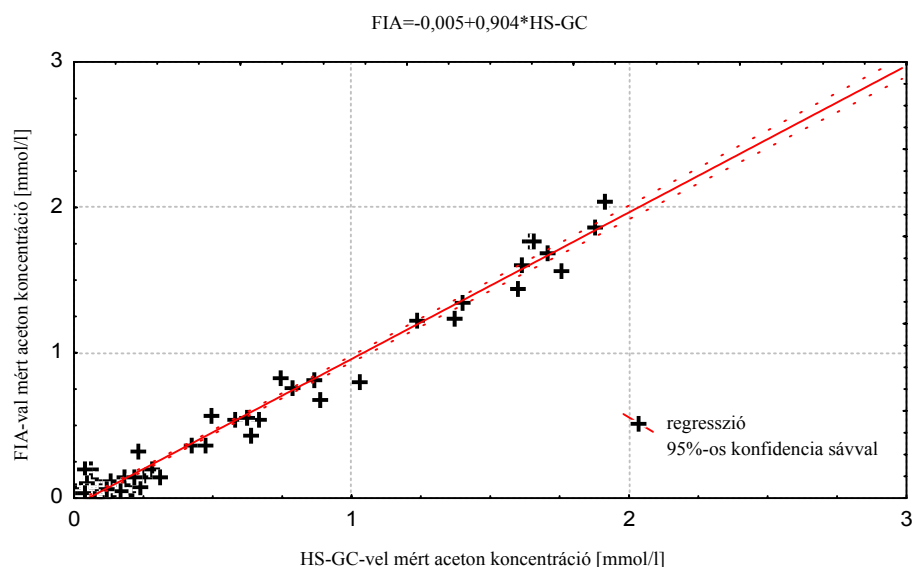
A módszervalidálási eljárás során meghatároztam az optimált FIA-rendszer teljesítményjellemzőit. Az összehasonlító headspace-gázkromatográfias módszer (HS-GC) megfelelő adataival való összevethetőség érdekében azokat együtt, a 27. táblázatban foglaltam össze.

Teljesítményjellemző	FIA	HS-GC
Lineáris tartomány [mmol·l ⁻¹]	0-10	0-10
Detektálás alsó határa [mmol·l ⁻¹]	>0,05	0,01
Meghatározási határ [mmol·l ⁻¹]	0,05	0,015
Kalibráció gyakorisága	minden mérési sorozat előtt	csak kalibráció-ellenőrzés
Érzékenység	514,5 [AU/mmol·l ⁻¹]	0,777 [területarány/konc. arány]
Reprodukálhatóság [SD %]	<6,2	<2,0
Helyesség [átlagos visszanyerési %]	97,1	100,5
Mintaelőkészítés	csak homogenizálás	homogenizálás, termosztálás
Analízisidő [perc]	1,5	15
Költség / minta [USD]	0,2	5

27. táblázat: Az acetontartalom meghatározására alkalmas FIA- és HC-GC-eljárás meghatározott teljesítményjellemzőinek összehasonlítása

Az áramló injektációs analitikai rendszer 0-10 mmol·l⁻¹ tartományban lineáris összefüggéssel kalibrálható, ami a nyerstej élettani acetontartalma, valamint az irodalmi források szerint a ketózisnál tapasztalható acetontartalom teljes tartományát lefedi. Bár a FIA-módszer a detektálási és meghatározási határ, valamint reprodukálhatóság tekintetében alatta marad az összehasonlító HS-GC-módszert jellemző értékeknek, nagy előnye a rövid analízisidő, az alacsony költségigény, és a gyakorlati körülmények közötti alkalmazhatóság.

Az optimált FIA- és az összehasonlító HS-GC-módszerrel 102 nyerstej minta párhuzamos vizsgálatát végeztem el. A mérési eredményeket a Függelék 7. táblázata tartalmazza. A két módszerrel kapott eredmények összevetése a 22. ábrán látható. A mért eredmények között szoros korrelációt állapítottam meg ($r=0,991$).



22. ábra: FIA-val és a HS-GC-vel mért 102 tejmintákra kapott aceton-koncentráció eredmények korrelációja

T-test for Dependent Samples (fug8.sta)								
Marked differences are significant at $p < 0,05000$								
	Mean	Std.Dv.	N	Diff.	Std.Dv. Diff.	t	df	p
HS-GC	0,405363	0,710966						
FIA	0,361853	0,653062	102	0,04351	0,133065	3,302362	101	0,001326

28. táblázat: FIA-val és a HS-GC-vel mért 102 tejmintákra kapott aceton-koncentráció eredmények összehasonlítása páros t-próbával (Mean: átlag, Std.Dv.: szórás, N: mérések száma, Diff.: eltérés, Std.Dv.Diff.: eltérés szórása, t: t-statisztika értéke, df: szabadsági fok, p: valószínűség)

A kétféle eljárással mért aceton-koncentrációk páronkénti összehasonlítását páros t-próbával végeztem el (28. táblázat). A próba eredménye szerint a két különböző analitikai módszerrel mért eredmények között szignifikáns eltérés mutatható ki: a FIA-módszerrel mért eredmények kb. 10%-kal alacsonyabbak a gázkromatográfiás eljárással mért aceton-koncentrációknál. Ez az eltérés azonban korrigálható és elfogadható, hiszen a FIA gyorsvizsgálati módszerként kerül felhasználásra.

Összegezve tehát, a gyors és olcsó FIA-módszer megfelelő alternatívája a HS-GC-eljárásnak.

3.2.2. Összketonanyag-tartalom gázkromatográfiás meghatározása

Az összketonanyag-tartalom analitikai meghatározására megfelelő mintaelőkészítési eljárással kiegészítve a HS-GC-mérőrendszert alkalmaztam. Az egyes ketonanyagok kémiai úton acetonná történő konverzióját egy három lépésből álló egyszerű mintaelőkészítéssel valósítottam meg. Az aceton formában történő meghatározásokat a 3.2.1.1.3.3. fejezetben ismertetett gázkromatográfiás rendszerrel és az ott közölt módszerleírás szerint végeztem.

3.2.2.1. Anyagok, eszközök

A vizsgálatokhoz felhasznált anyagokat a 29. táblázat tartalmazza.

Vegyszerek megnevezése	Gyártó / forgalmazó	Cikkszám / kódszám / katalógusszám
Aceton	Merck, Németország	100020
Etil-metil-ke-ton	Merck, Németország	109709
Lítium-acetoacetát	Sigma, Németország	3483-11-2
Kálium-bikromát	Reanal Rt., Magyarország	11048-2-38
Kénsav (cc.)	Reanal Rt., Magyarország	11128-7-65
Triklór-ecetsav	Reanal Rt., Magyarország	20105-1-38
β -hidrox-i-va-jsav	Sigma, Németország	150-83-4

29. táblázat: Felhasznált vegyszerek – összketonanyag gázkromatográfiás meghatározása

Az acetontartalom meghatározására kidolgozott és validált HS-GC-eljárás (3.2.1.1.3.3. fejezet) más ketonanyag-alkotók meghatározására is alkalmassá tehető, ha az acetecetsavat és a β -hidrox-i-va-jsavat megfelelő mintaelőkészítéssel acetonná alakítjuk, majd az említett ketonanyagokat aceton formájában meghatározzuk.

3.2.2.2. Mintaelőkészítés fejlesztése összketonanyag-tartalom HS-GC meghatározásához

A konverziós eljárások alapvetően kétféle elven működnek: vagy enzimes úton alakítják át a β -hidrox-i-va-jsavat acetecetsavon keresztül acetonná, vagy kémiai úton, oxidációval. Az enzimes konverzió elég gyakori a vonatkozó irodalmakban [Williamson és mtsai, 1962; Työppönen és Kauppinen, 1980; Harano és mtsai., 1983; Andersson, 1984;

Andersson és Emanuelson, 1985; Dargel, 1987; Shizuo és mtsai., 1987], de lényegesen drágább, mint a kémiai, ezért ez utóbbi megoldás alkalmazása mellett döntöttem.

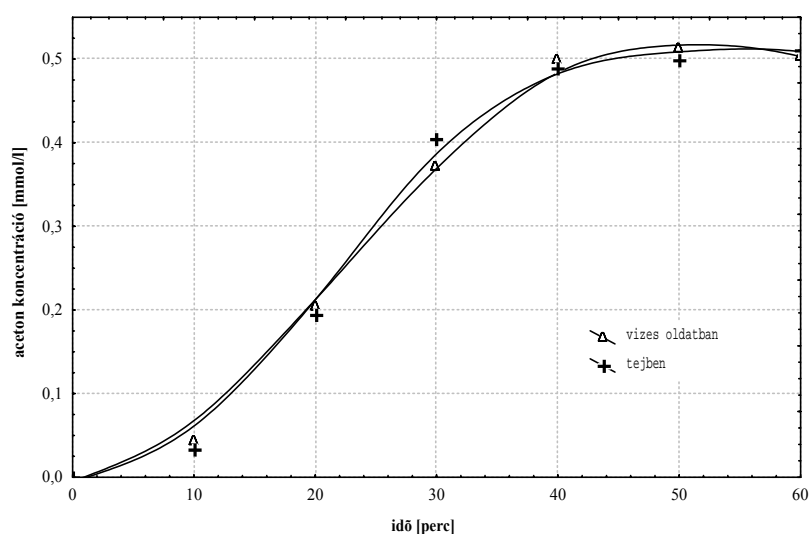
Az acetecetsav acetonná alakítására kémiai úton kétféle megoldás ismert. Az irodalomban fellelhető módszerek egy része rövid idejű, magas hőmérsékleten, ásványi savval végzett kezeléssel [Thin és Robertson, 1952; Procos, 1961; Steger és Voigt, 1970], más része csak hőkezeléssel végezte a konverziót [Siegel és mtsai., 1977]. Ásványi sav alkalmazásával és anélkül elvégzett konverziós kísérleteim tapasztalata alapján szükségtelennek tartottam az erélyesebb reagens (ásványi sav) alkalmazását, ugyanis az acetecetsav magasabb hőmérsékleten instabil, spontán módon is acetonná alakul.

Legelőször tisztáztam, hogy az acetontartalom HS-GC meghatározásánál alkalmazott 5-10 perces 60 °C-os termosztálás hatására nem következik-e be hőkonverzió. Ehhez 4 mmol·l⁻¹ koncentrációjú Li-acetoacetát standard oldatot készítettem, és 0, 5, 10 perces 60 °C-os hőkezelés után mértem az acetontartalmat. A minták egyikében sem tudtam kimutatni detektálható mennyiségű acetont, így arra a következtetésre jutottam, hogy a 60 °C-os 5-10 perces termosztálás nem módosítja a minták ketonanyag összetételét. A hőkonverzióhoz alkalmazott hőkezelés hőmérsékletét az irodalmi adatok alapján 100 °C-ban állapítottam meg. A feladatom tehát a 100 °C-os hőkezelés idejének optimalálása volt. Az acetecetsav lítium sójából 0,5 mmol·l⁻¹ koncentrációjú standard oldatot készítettem és a mintákat különböző idejű 100 °C-os hőkezelésnek tettem ki, majd megmértem a keletkezett aceton mennyiségét. A hő hatására történő konverzió időbeli alakulását a 23. ábra mutatja be. Amint az ábrán látható, 40 perces 100 °C-os hőkezelés hatására az acetoacetát mennyiségileg acetonná alakul. A vizsgálatot tejmintákkal elvégezve is hasonló eredményeket kaptam, a tejmátrix tehát nem befolyásolta a gőztér összetételét.

Ezután mindkét komponensre 0,5, illetve 4,0 mmol·l⁻¹ koncentrációjú aceton/Li-acetoacetát keverékoldatok hőkezelés nélküli és hőkezelés utáni acetontartalmát határoztam meg. Az eredményeket a 30. táblázatban foglaltam össze.

Aceton-koncentráció [mmol·l ⁻¹]	Acetecetsav-koncentráció [mmol·l ⁻¹]	Visszanyerés acetonra [%]	Visszanyerés acetecetsavra [%]
0,5	0,5	101,3±1,40	98,7±2,41
4,0	4,0	98,2±2,25	97,5±2,73

30. táblázat: Aceton és acetecetsav egymás melletti meghatározása HS-GC-eljárással (a mért értékek 3 független meghatározás átlagát és szórását reprezentálják)



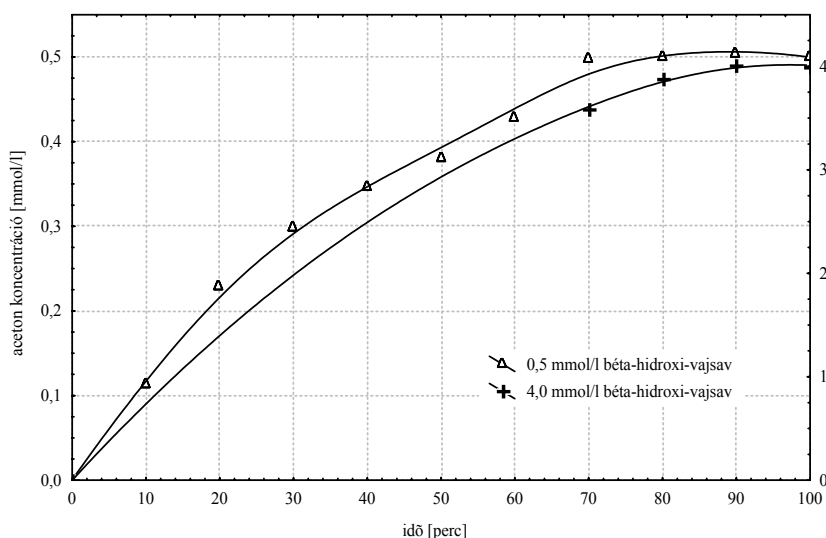
23. ábra: Acetecetsav hőkonverziója tejes és vizes standard oldatokban 100 °C-os hőkezelés hatására, HS-GC-eljárást alkalmazva

Az acetecetsav átalakítására kidolgozott mintaelőkészítési eljárást 0,5 és 4,0 mmol·l⁻¹ koncentrációjú β -hidroxi-vajsav oldatokkal is teszteltem, azonban egyik esetben sem tudtam kimutatni az aceton jelenlétét. Ebből arra a következtetésre jutottam, hogy az acetecetsav hőkonverzió körülményei között a β -hidroxi-vajsav nem alakítható acetonná.

A β -hidroxi-vajsav acetonná alakítására az irodalomban számos eljárást találtam. Egyes kutatók [van Stekelenburg és Bruyn, 1970] szerint a β -hidroxi-vajsav egyszerű hőkezeléssel is acetonná alakul, aminek az általam tapasztaltak nyilvánvalóan ellentmondanak. Mások különböző ásványi savakat (kénsav, foszforsav) és káliumbikromátot tartalmazó oxidáló reagensek alkalmazásával értek el megfelelő konverziót [Thin és Robertson, 1952; Procos, 1961; Steger és Voigt, 1970; Eriksson, 1972; Hradecký és mtsai., 1978; López-Soriano és Argilés, 1985]. Kísérletekkel tisztáztam, hogy a kénsav és a foszforsav önmagában nem okoz β -hidroxi-vajsav→aceton átalakulást, azonban az ásványi savban oldott káliumbikromát reagenssel elérhető a kívánt átalakulás. Az irodalmi hivatkozásokban az ásványi savakat magas koncentrációban alkalmazták (7,8-10 mol·l⁻¹ kénsav), melynek káliumbikromát tartalma általában 0,5-1,5%.

Konverziós kísérleteimet az irodalmi adatokra támaszkodva a leggyakrabban alkalmazott 7,8 mol·l⁻¹ kénsavban 1,5% káliumbikromátot tartalmazó oxidatív reagens alkalmazásával végeztem. A 10 ml 0,5 mmol·l⁻¹ koncentrációjú β -hidroxi-vajsav standard oldataimhoz (ugyancsak az irodalomból véve a mennyiséget) egyenként 835 μ l oxidatív

reagenst adtam és különböző ideig 100 °C-on termosztáltam. A hőkezeléseket követően HS-GC-eljárással acetontartalom meghatározást végeztem. A kísérletek eredménye a 24. ábrán látható.



24. ábra: 0,5 és 4,0 mmol·l⁻¹ β-hidroxi-vajsav konverziója acetonná kénsavas-bikromát-reagens és 100 °C-os hőkezelés hatására HS-GC-eljárást alkalmazva

A teljes átalakuláshoz szükséges időt 90 percen határoztam meg. Ezt alátámasztották a 4,0 mmol·l⁻¹ koncentrációjú standarddal végzett ellenőrző kísérletek, melyeknél a teljes átalakuláshoz szükséges idő egyértelműen 90 perc volt.

A 3 lépésből álló összketonanyag-tartalom meghatározására kidolgozott mintaelőkészítési eljárást a 3.2.2.3. fejezetben foglaltam össze. Az eljárást mindhárom komponensre 0,5, illetve 4,0 mmol·l⁻¹ koncentrációjú keverék-oldatok analízisével teszteltem. Az eredményeket a 31. táblázat tartalmazza.

Aceton-koncentráció [mmol·l ⁻¹]	Acetecetsav-koncentráció [mmol·l ⁻¹]	β-hidroxi-vajsav-koncentráció [mmol·l ⁻¹]	Visszanyerés acetonra [%]	Visszanyerés acetecetsavra [%]	Visszanyerés β-hidroxi-vajsavra [%]
0,5	0,5	0,5	92,7±6,14	97,3±3,45	97,6±2,24
4,0	4,0	4,0	96,1±4,36	101,1±2,17	96,4±3,70

31. táblázat: Aceton, acetecetsav és β-hidroxi-vajsav egymás melletti meghatározása HS-GC-mérőrendszerrel (a mért értékek 3 független meghatározás átlagát és szórását reprezentálják)

3.2.2.3. Az új HS-GC összketonanyag-tartalom meghatározási módszer leírása

Reagens:

- Oxidáló reagens: 1,5%(m/v)-nyi kálium-bikromátot 7,8 mol·l⁻¹ koncentrációjú kénsav oldatban oldottam fel.

Mintaelőkészítés:

1. lépés: acetontartalom meghatározása

Az acetontartalom meghatározása a 3.2.1.1.3.3. fejezetben ismertetett módszerleírás szerint történt.

2. lépés: aceton és acetecetsav (oxidált ketonanyag) meghatározása

Az acetontartalom meghatározására már egyszer felhasznált mintát 40 percre 100 °C-on termosztáltam. A hőkezelés következtében a minta acetecetsav-tartalma kvantitatíve acetonná alakult. Az aceton meghatározása az 1. lépés szerint történt.

3. lépés: aceton, acetecetsav és β-hidroxi-vajsav (összketonanyag) együttes meghatározása

Az előbbi mintához 835 µl oxidáló reagenst adtam és 90 percig 100 °C-on termosztáltam. Az oxidatív kezelés hatására a minta β-hidroxi-vajsav-tartalma is acetonná alakult. Az acetonformában történő összketonanyag-meghatározás pedig ebben az esetben is az 1. lépés szerint történt.

Ugyanabból a mintából a három különböző mennyiségű aceton meghatározásából számítható a minták aceton-, acetecetsav-, β-hidroxi-vajsav-, valamint összketonanyag-tartalma.

3.2.3. A citromsav-tartalom fluorimetriás meghatározása

A meghatározási módszert (a mintaelőkészítés egyes elemeitől eltekintve) a szakirodalomból vettem át. Munkám során egy vérre kidolgozott fluorimetriás citromsavtartalom-meghatározási eljárást [Hori és mtsai, 1974] adaptáltam és fejlesztettem tovább nyerstej minták analízisére.

A Hori és mtsai. által publikált eljárást először ismert koncentrációjú desztillált vizes citromsav-oldatok analízisével teszteltem. Vizsgálataim eredményei megfeleltek az irodalmi hivatkozásban közölt adatoknak. Az eredeti eljárás humán vérplazma- és vérminták

analízisére szolgált. Azonban a szerzők nem végeztek vizsgálatokat a módszer más mintamátrixban való alkalmazhatóságára, így célul tűztem ki egy olyan mintaelőkészítési eljárás kidolgozását, amellyel a módszer nyerstej mintákra adaptálható.

3.2.3.1. Anyagok, eszközök

A felhasználásra került analitikai tisztaságú vegyszerek listáját a 32. táblázat tartalmazza.

Vegyszerek megnevezése	Gyártó / forgalmazó	Cikkszám / kódszám / katalógusszám
Citromsav	Reanal Rt., Magyarország	03125-2-38
Etil-acetát	Reanal Rt., Magyarország	05029-6-69
Foszforsav, 85%-os	Reanal Rt., Magyarország	06098-1-65
Metafoszforsav	Reanal Rt., Magyarország	13048-2-33
Nátrium-klorid	Reanal Rt., Magyarország	14064-4-38
o-aminotiofenol	Aldrich, Németország	27,424-0

32. táblázat: Felhasznált vegyszerek – citromsav-tartalom fluorimetriás meghatározása

A nyerstejek citromsav-tartalmának meghatározásához Jasco FP 920 típusú fluorimétert (Able Jasco, Japán) használtam.

3.2.3.2. Mintaelőkészítés fejlesztése citromsav-tartalom fluorimetriás meghatározásához

A mintaelőkészítési módszer fejlesztése során abból a tényből indultam ki, hogy a vér és a tej makrokomponensei nagyon hasonlóak, csak arányuk más. Először kipróbáltam az eljárást a szerzők által javasolt mintaelőkészítést (metafoszforsavas kezelést követően a kicsapódott fehérjék 3000/perc, 10 percig történő centrifugálásos elválasztása) 10 mg/100 ml citromsav-tartalmú tejmintákban. A kis mennyiségű (0,05 ml) nyerstej-minták bemérése a magas fehérjetartalom, és a zsírtartalom gyors felfölöződése miatt nehézkes volt és a kapott visszanyerések is lényegesen alatta maradtak a szerzők által vérben meghatározott 95,4%-nak (Függelék 8/a. táblázat). A következő kísérletsorozatban magas fordulatszámon végzett (10000/perc, 10 perc) centrifugálással eltávolítottam a fehérje- és lipidkomponensek nagy részét, és a felülúszóból végeztem el a meghatározást, mely kedvezőbb eredményre vezetett

(Függelék 8/b. táblázat). Végül a centrifugálás idejét 20 percben határoztam meg (Függelék 8/c. táblázat).

Összegezve tehát az eredeti mintaelőkészítési eljárásban alkalmazott fehérjementesítést ki kell egészíteni zsírmentesítéssel is. A kidolgozott mintaelőkészítési eljárást a 3.2.3.3. fejezet tartalmazza.

3.2.3.3. Az adaptált citromsav-tartalom meghatározási módszer leírása

Reagensek, oldatok:

- o-ATH (o-aminotiofenol) reagens: 0,75 g /100 ml foszforsavban (52,5 v%);
- metafoszforsav oldat: 2 g/100 ml desztillált vízben;
- a kalibrációhoz 60 mg/100 ml koncentrációjú desztillált vizes citromsav törzsoldatot készítettem. A kalibráló oldatokat a törzsoldat desztillált vizes hígításával készítettem el 0-60 mg/100 ml koncentrációtartományban.

Mintaelőkészítés: 4 ml szobahőmérsékletű, homogenizált nyerstejet a kivált fehérjék és a zsírok durva eltávolítása céljából 10000/perc fordulatszámon ($g=3100$) 20 percig centrifugáltam, és a felülúszót használtam az analitikai eljáráshoz. 0,05 ml mintát (vagy standard oldatot), 0,95 ml desztillált vizet és 1 ml metafoszforsav oldatot kémcsőben elegyítettem. Az elegyet 5 percig rázógépen rázattam, majd a fehérjék eltávolítása céljából 3000/perc fordulatszámon (950g) 10 percig centrifugáltam.

Analitikai eljárás: A felülúszóból 1ml-t csavaros teflonbetétes kupakkal zárható tetejű 12 ml-es roncsoló edénybe mértem, és 2 ml o-ATH oldatot pipettáztam hozzá. Nitrogén gáz átáramoltatása után az edényt zártam, és 15 órára 125 °C-os szárítószekrénybe helyeztem. A reakcióelegy lehűlése után 3 g nátrium-kloridot, majd 4 ml etil-acetátot adtam hozzá. Az edény tartalmát (kb. 5 percig) rázógépen rázattam, majd az etil-acetátos fázis emittált fluoreszcencia intenzitását (415 nm-es gerjesztési hullámhosszat alkalmazva) 450 nm-en detektáltam.

A minták citromsav-koncentrációját (mg/100 ml) a kalibrációs összefüggés segítségével határoztam meg. A koncentrációkat $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ egységben adtam meg.

3.2.4. Statisztikai értékelés

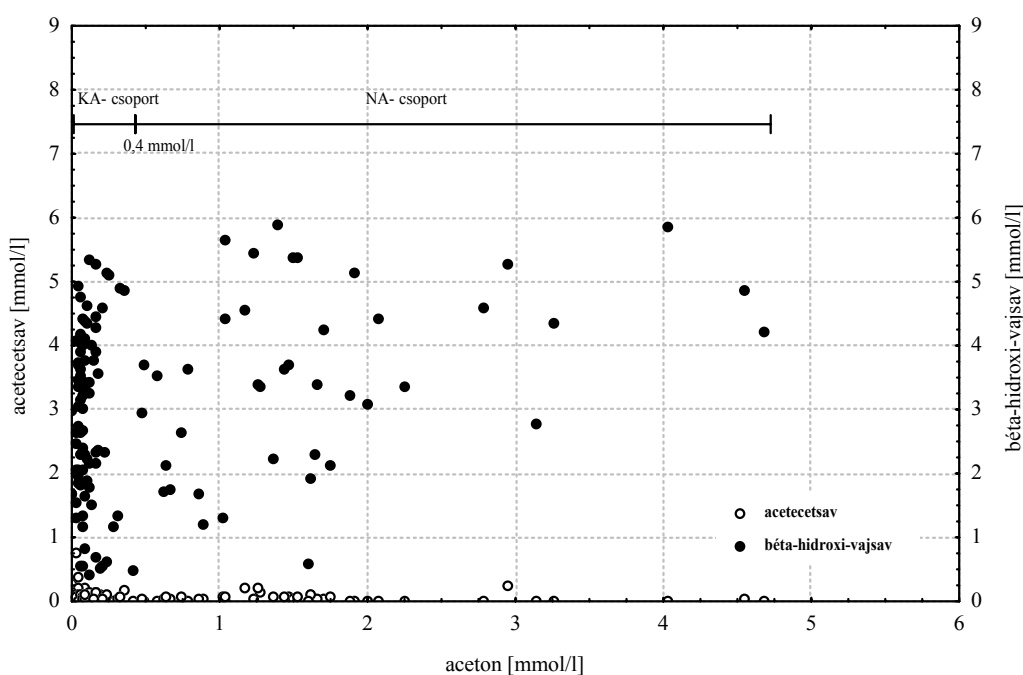
Valamennyi kísérleti terv elkészítését és az eredmények matematikai-statisztikai feldolgozását, valamint a módszervalidálások során a mérési eredmények statisztikai kiértékelését a Statistica 5.5 for Windows (StatSoft, USA) szoftverrel végeztem el.

4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉS

4.1. A KIDOLGOZOTT MÉRÉSI ELJÁRÁSOK GYAKORLATI ALKALMAZÁSA ÉS EREDMÉNYEI NYERS TEHÉNTÉJ MINTÁKBAN

4.1.1. A nyerstejek ketonanyag-tartalma

A nyerstejek összketonanyag tartalmának meghatározására kifejlesztett HS-GC-eljárással 119 nyerstej minta teljes ketonanyag analízisét (aceton, acetecetsav és β -hidroxivajsav meghatározás) végeztem el (25. ábra). A mérési adatállományt a Függelék 9. táblázat tartalmazza.



25. ábra: A HS-GC-eljárással mért ketonanyagok 119 nyerstej mintában (KA: kis acetontartalmú minták, NA: nagy acetontartalmú minták)

Az irodalmi hivatkozásokban a szubklinikai ketóziást a nyerstejben mért acetontartalom alapján $0,4-0,7 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ acetone-koncentrációnál már valószínűsítik [Gustaffson és Emanuelson, 1996; Fekete és mtsai., 1999], bár ezt a határértéket mindenképpen egyed- és állományfüggő adatként kell kezelni. Ezen az alapon a vizsgálati mintákat retrospektív módon, a mért acetontartalom alapján két csoportba osztottam: magas acetontartalmú minták

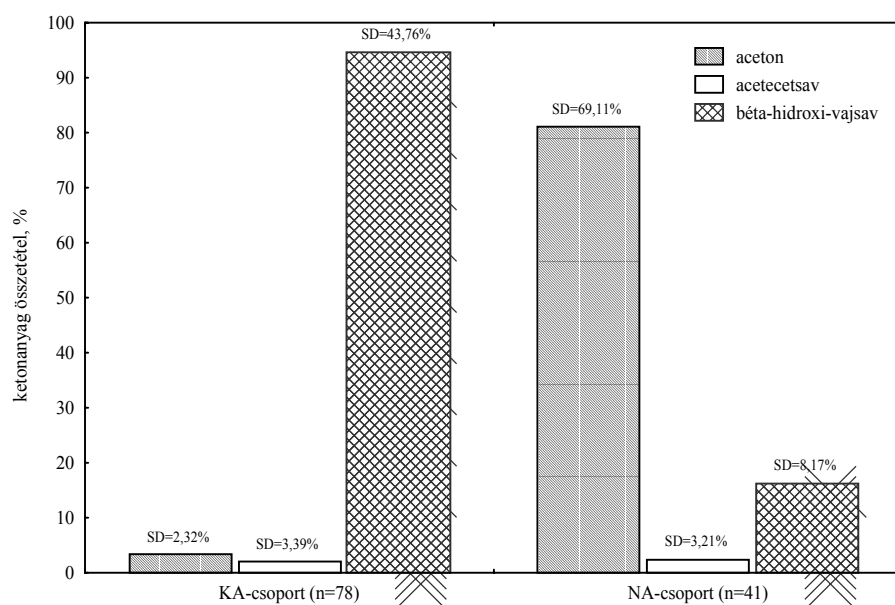
(NA-csoport, ahol a mért acetón-koncentráció nagyobb volt, mint $0,4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$); illetve kis acetontartalmú minták (KA-csoport, ahol az acetontartalom $\leq 0,4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$).

A két csoportban az egyes ketonanyagok százalékos megoszlását a 26. ábra mutatja. Mind a KA-, mind pedig a NA-csoportban igen alacsony acetecetsav-koncentrációkat mértem. A KA-csoportban a ketonanyagok döntő hányada (95%-a) β -hidroxi-vajsav formájában volt jelen, amihez viszonyítva a másik két ketonanyag aránya elenyésző. A NA-csoportban viszont inkább az acetontartalom dominált (81%), kevesebb β -hidroxi-vajsav (16%) és nagyon kis mennyiségű acetecetsav jelenléte mellett. Mérési eredményeimet az irodalmi adatokkal (4. táblázat) összevetve a következő megállapításokat tettem:

1. A KA-csoportban a tejben mért ketonanyag-összetétel megfelel a vér élettani ketonanyag-összetételének.
2. A NA-csoportban a vér ketonanyag összetételéhez képest eltérő ketonanyag összetételt tapasztaltam:
 - az acetón aránya kb. két-háromszorosa,
 - a β -hidroxi-vajsav aránya kb. fele-harmada a vérben mérhető arálynak,
 - miközben az acetecetsav aránya igen alacsony, a vizsgált minták többségében acetecetsavat gyakorlatilag egyáltalán nem találtam.

Ismert tény, hogy az acetecetsav vizes oldatban instabil. A mindkét csoportban tapasztalt nagyon kicsi acetecetsav-koncentráció magyarázata lehet, hogy a vizsgálati minták tárolása, szállítása közben spontán dekarboxileződési folyamat játszódott le, aminek következtében az acetecetsav-tartalom acetonná alakult. Työppönen és Kauppinen [1980] vizsgálta ennek az átalakulásnak a sebességét és megállapították, hogy $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ -os tárolás esetén dekarboxileződés nem történik, $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tárolva a vizsgálati mintákat $6 \text{ } \%/ \text{nap}$, míg szobahőmérsékleten ($+20 \text{ }^\circ\text{C}$) $6 \text{ } \%/ \text{óra}$ sebességgel alakul az acetecetsav acetonná. Az általam elemzett nyerstej-mintákat a mintavételtől a laboratóriumunkba kerülésük előtt átlagosan 1-10 napig $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ -on szállították/tárolták. Bár a mintákat a laboratóriumunkba érkezésük után közvetlenül mélyhűtöttem ($-18 \text{ }^\circ\text{C}$), az előzetes átalakulásokat már nem akadályozhattam meg. Az átalakulási sebességeket és a minták előéletét figyelembe véve, az alacsony acetecetsav arány tehát a spontán dekarboxileződés következménye. Mivel a KA-csoportban a β -hidroxi-vajsavhoz képest a másik két ketonanyag-alkotó csak nagyon kis mennyiségben volt jelen, a spontán dekarboxileződés a ketonanyagok arányán már jelentősen nem változtatott. A KA-csoportban tapasztaltakhoz hasonlóan a NA-csoportban mért magas acetón arányt is részben az átalakulási folyamat magyarázza, viszont nem magyarázza a relatíve

alacsony β -hidroxivajsav arányt, hiszen ez utóbbi hőstabil molekula, a hagyományos tárolás/szállítás ismertett körülményei között nem alakulhatott acetonná.

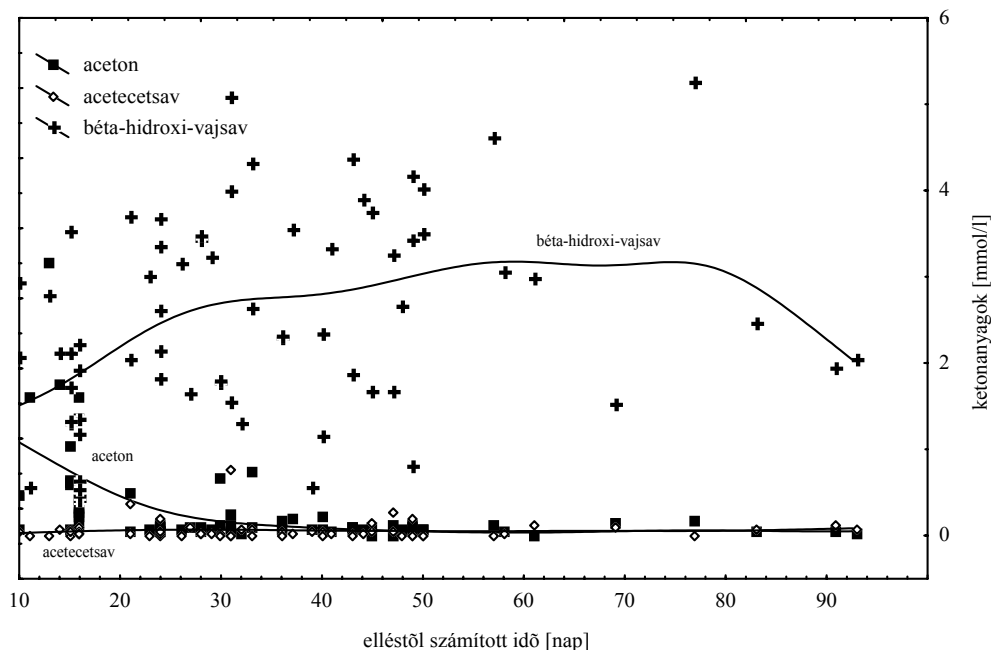


26. ábra: A vizsgálati csoportokban a ketonanyag-tartalom százalékos összetétele

Következésképpen megállapítottam, hogy a szubklinikai és a klinikai ketózis tehének (NA-csoport) véréhez képest a nyerstejben a ketonanyagok összetétele eltérő: az acetone aránya nagyobb, míg a β -hidroxivajsav aránya kisebb, valamint a hagyományos mintavételi, mintaszállítási és -tárolási gyakorlatot alkalmazva, a nyerstejek acetecetsav-tartalma acetonná alakul.

4.1.1.1. A nyerstejek ketonanyag-tartalmának alakulása az elléstől számított idő függvényében

Az egyedre azonosított vizsgálati minták az egyedek laktációs periódusának eltérő idejéből származtak, ezért a ketonanyag-alkotók időbeli változásait is vizsgáltam. A 27. ábrán az egyes ketonanyagok mért mennyiségeit az elléstől a mintavételig eltelt napok függvényében ábrázoltam azoknál a mintáknál, ahol az ellési és mintavételi idő pontosan megállapítható volt (lásd: Függelék 9. táblázat). Az ábrán a függvényillesztések a legkisebb hibanégyzetek módszerével készültek.



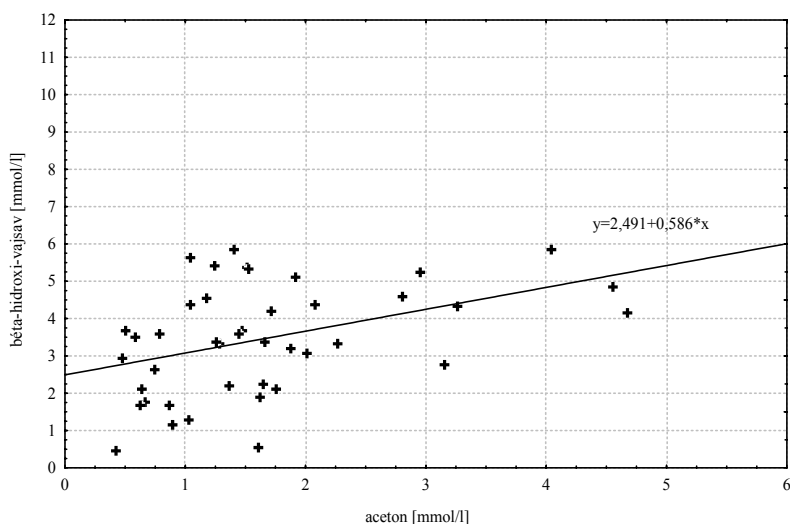
27. ábra: Ketonanyagok változásai az elléstől számított napok függvényében

Az összes, e vizsgálatba bevont egyed (n=67) figyelembe véve az elléstől számított napok függvényében az acetecetsav mennyisége a több napos mintákban gyakorlatilag nem változott, mindvégig nagyon alacsony maradt. A laktáció előrehaladtával az acetontartalom kifejezetten csökkenő, míg a β -hidroxi-vajsav koncentráció kismértékben növekvő, majd újra csökkenő tendenciát mutatott. A változások iránya megfelel az állatorvosi tapasztalatoknak: a szubklinikai/klinikai ketózis előfordulása a laktációs periódus korai szakaszán várható. A 100 ketózisos esetből 90 a laktáció első két hónapjában fordul elő [Geishauser és mtsai, 2000], ezzel összhangban vannak a mérési eredményeim: az elléstől számított 6 hét után nem volt olyan egyed, amelynél jelentős mennyiségű acetontartalmat mértem volna.

Megvizsgálva az egyes ketonanyag-alkotók közötti korrelációt a két csoportban, érdekes új eredményre jutottam (33. táblázat): a NA-csoportban szignifikáns pozitív korrelációt kaptam az acetone- és a β -hidroxi-vajsav-koncentrációja között. Figyelembe véve az egyedi változékonyságot és a biológiai kísérleteknél általában tapasztalható nagyobb hibákat, a NA-csoportba tartozó nyerstej mintákban a β -hidroxi-vajsav és az acetone mennyisége között szignifikáns lineáris összefüggést állapítottam meg (28. ábra). Ez azt jelenti, hogy a tejben mért megemelkedett acetontartalom összefügg a tej β -hidroxi-vajsav tartalmával, a megállapított matematikai összefüggés segítségével pedig az egyik komponens mérésével a másik mennyiségére következtetni lehet.

	KA-csoport		NA-csoport	
	Aceton	Acetecetsav	Aceton	Acetecetsav
β -hidroxi-vajsav	0,066	-0,372 ^{xx}	0,623 ^{xxx}	0,164
Acetecetsav	-0,208		-0,157	

33. táblázat: A ketonanyagok nyerstejben HS-GC-eljárással mért értékei közötti korrelációs koefficiensek (x: szignifikáns, p<0.05; xx: p<0.01; xxx: p<0.001)



28. ábra: Az aceton- és a β -hidroxi-vajsav-tartalom összefüggése nyerstejben a NA-csoportban

A ketonanyagok nyerstejéből történő meghatározásánál tapasztalt összefüggések ráirányították figyelmemet a ketonanyag-képződés biokémiájára. A ketogenezis és a különböző ketonanyagok átalakulásainak, valamint a citrátkör működésének alapvető összefüggéseit a 3. ábrán mutattam be. Mivel a magas acetontartalmú (véltetően szubklinikai/klinikai ketózisban szenvedő egyedektől származó) nyerstej mintáknál az általam ismert irodalmi adatokhoz képest eltérő vagy új eredményre jutottam, céltom volt a citrátkör működése és a nyerstej ketonanyag-összetétele közötti összefüggés tisztázása.

Abból a hipotézisből indultam ki, hogy a fokozott ketonanyag-termelést folytató sejtekben a citrátkör élettani működésének valamilyen zavara, gátlása történik (pl. fokozott glükoneogenezis miatti oxálecetsav-hiány, enzimek gátlása, hormonális hatások stb.), mely hatás nyomonkövethető a citrátkör intermedierjeinek koncentrációváltzásában. Feltételeztem azt is, hogy ez a hatás a nyerstejben is kimutatható. A citrátkör intermedierjei közül az analízisek kivitelezhetősége szempontjából számomra a legegyszerűbb megoldás, a citromsav-tartalom vizsgálata mellett döntöttem.

4.1.2. A citromsav-tartalom alakulása nyerstejben

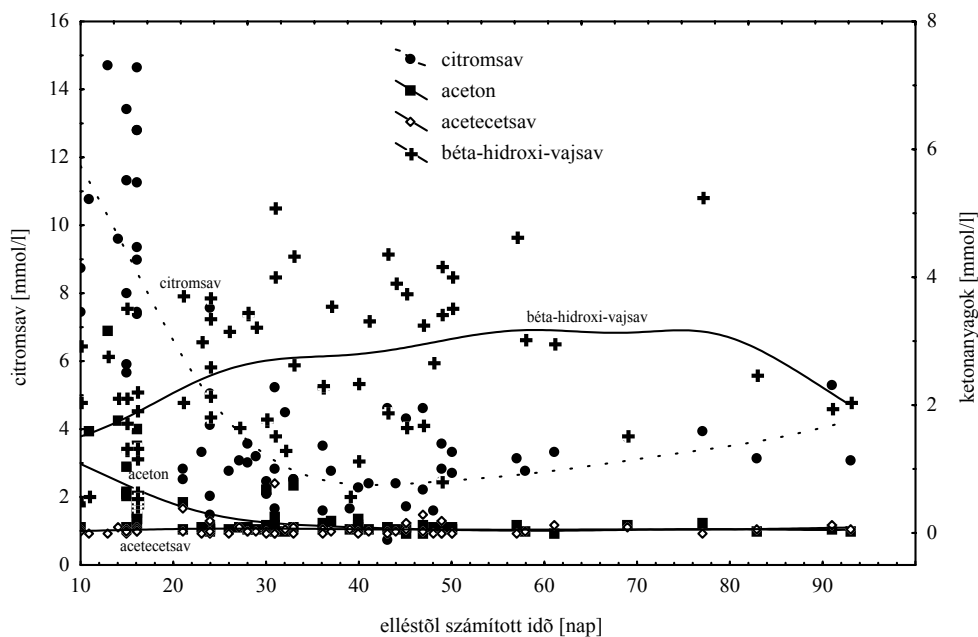
A ketonanyag-vizsgálatokra is felhasznált 119 nyerstej-minta citromsav-tartalmát mértem meg a nyerstejre adaptált, továbbfejlesztett (a 3.2.3.3. fejezetben ismertetett) fluorimetriás eljárással (Függelék 9. táblázat).

Az elléstől számított idő függvényében a nyerstejek (n=67) citromsav-tartalma az első hat héten az acetontartalomhoz hasonló változást mutatott, a laktáció előrehaladtával erőteljesen csökkent (29. ábra). Ezt követően egy minimális szint elérése után enyhe növekvő tendencia tapasztalható. A tejtermelés fokozódásával a nyerstejek citromsav-tartalmának csökkenése megegyezett az irodalmi hivatkozásokban megállapított változásokkal [White és Davies, 1958; White és Davies, 1963; Sato és mtsai., 1998]. Azonban a ketonanyagok és a citromsav-tartalom nyerstejben mérhető koncentrációinak összefüggéseivel kapcsolatban kevés az irodalmi hivatkozás, mindössze két olyan forrás található a szakirodalomban, ami ezzel a kérdéskörrel foglalkozik. Illek és mtsai. [1997], valamint Khaled és mtsai. [1999] egészséges és szubklinikai ketózisban szenvedő tehének, illetve utóbbi kutatók kecskék tejének citromsav-tartalmát vizsgálva arra a megállapításra jutottak, hogy energiahiányos állapotban a citromsav koncentrációja alacsonyabb. A különböző ketonanyagok és a citromsav mennyiségei összefüggéseinek vizsgálatára azonban irodalmi hivatkozást nem találtam.

A nyerstejek esetén az elléstől számított idő függvényében tapasztalt aceton- és citromsav-koncentrációváltozás hasonlósága arra indított, hogy megvizsgáljam az egyes ketonanyagok mennyiségeinek és a mért citromsav-koncentrációk közötti összefüggéseket a már említett, acetontartalom alapján kiválasztott két csoportban. A kérdéses komponensek korrelációját a 34. táblázat tartalmazza.

	KA-csoport	NA-csoport
	Citromsav	Citromsav
β -hidroxi-vajsav	-0,380 ^{xx}	-0,579 ^{xxx}
Acetecetsav	0,002	-0,170
Aceton	-0,081	0,469 ^{xxx}

34. táblázat: A nyerstejben HS-GC-eljárással mért ketonanyag- és fluorimetriás módszerrel meghatározott citromsav-koncentrációk közötti korrelációs együtthatók
(^x: szignifikáns, p<0.05; ^{xx}: p<0.01; ^{xxx}: p<0.001)

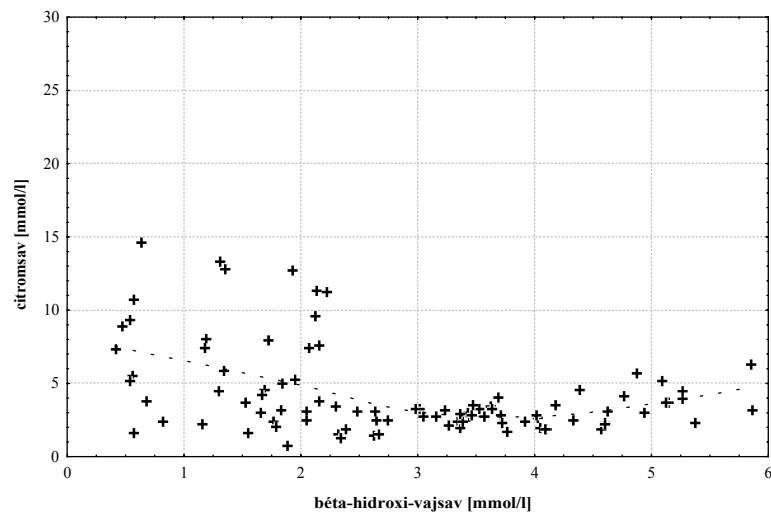


29. ábra: A nyerstejek citromsav- és ketonanyag-tartalmának változása az elléstől eltelt idő függvényében

Mindkét csoportban a β -hidroxivajsav- és a citromsav-tartalom között szignifikáns negatív, valamint a NA-csoportban az acetone és a citromsav között szignifikáns pozitív korrelációt állapítottam meg. A 30. ábra a NA-csoportban a β -hidroxivajsav- és a citromsav-koncentráció alakulását ábrázolja. A legkisebb hibanégyzetek módszerével illesztett görbe kifejezett minimumot mutat. A citromsav koncentráció minimuma a 2,9-3,4 mmol·l⁻¹ β -hidroxivajsav-koncentrációtartományba esik. Az acetone és a β -hidroxivajsav között megállapított lineáris összefüggést felhasználva, a kérdéses tartomány terjedelme acetoneban kifejezve: 0,70-1,55 mmol·l⁻¹. Ez gyakorlatilag egybeesik azzal a kritikus irodalmi acetone-tartománnyal (0,7-1,4 mmol·l⁻¹), melyet szubklinikai és klinikai ketózis közötti átmeneti tartománynak állapítottak meg [Fekete és mtsai., 1999] (3. táblázat).

Megállapítottam tehát, hogy a nyerstejek citromsav-tartalma a laktáció előrehaladtával az acetontartalomhoz hasonlóan csökken. Az első hat héten mért magas acetone-koncentrációk a nyerstejben a szubklinikai ketózt valószínűsítik. A szubklinikai ketózisban szenvedő tehének esetén az emelkedett acetone és β -hidroxivajsav tartalom csökkent citromsav-tartalommal jár együtt.

A citromsav-tartalom meghatározása az acetontartalomhoz hasonlóan tehát a ketózis kialakulásának előrejelzésében is felhasználható. Azoknál az állatoknál, amelyeknél a megemelkedett tejketonanyag-koncentrációk alacsony tej citromsav-koncentrációkkal kísérve fordulnak elő, a klinikai ketózis kialakulásának nagyobb a valószínűsége.



30. ábra: A citromsav-koncentráció alakulása a β -hidroxi-vajsav függvényében a NA-csoportban

Az általam vizsgált állatállományban nem volt gyulladós társbetegségekkel pl. tőgygyulladással (mastitis) terhelt egyed. A szakirodalomban utalást találtam arra vonatkozóan, hogy a szubklinikai és klinikai mastitisben szenvedő állatoknál szignifikánsan alacsonyabb a tejben mérhető citromsav-tartalom, mint az egészséges állatoknál [White és Davies, 1958; Oshima és Fuse, 1981]. Ezzel összhangban érdekes újabb hipotézis állítható fel: amennyiben az alacsony citromsav-koncentráció nem párosul emelkedett ketonanyag szinttel, de magas a nyerstej szomatikus sejtszáma, a citromsav-tartalom meghatározása a gyulladós betegségek diagnosztikájában is felhasználható lehet.

Összegezve tehát a nyerstejek citromsav-tartalmának meghatározása egyrészt a ketózis, másrészt a ketózissal gyakorta együttjáró, társbetegséggént előforduló mastitis korai felismerésében is alkalmazható lehet.

5. AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEGZÉSE

A nagy tejtermelésű tehenek energiaegyensúlyának megbomlása a fokozódó ketogenezis következtében a különböző biológiai folyadékokban (vér, vizelet, tej) mérhető ketonanyag-koncentrációk (aceton, acetecetsav és β -hidroxivajsav) növekedéséhez vezet. E folyamat eredményeként szubklinikai vagy klinikai ketózis alakulhat ki. Az intenzíven tartott állatállományokban a szubklinikai ketózis előfordulása igen gyakori, mintegy 30-40 %-ra tehető (míg a klinikai ketózis rizikója 5%) és nagy gazdasági kárt okoz a tejhozam csökkenése, rosszabb szaporodásbiológiai mutatók és egyéb betegségek előfordulásának növekedése miatt. A veszteségek csökkentése érdekében a tehenészetekben egyre kifejezettebb igény mutatkozik a szubklinikai ketózis korai felismerésére alkalmas analitikai eljárások kifejlesztésére.

Munkám során a fenti igényt kielégítő, tejszűrést alapuló ketózis-monitoring rendszer analitikai háttérének kidolgozását és az ezzel összefüggő egyes biokémiai folyamatok értelmezését céloztam meg.

Kutatómunkámban alapvetően a következő két célt fogalmaztam meg:

- nyerstej minták ketonanyag- és citromsav-tartalmának meghatározására alkalmas összehasonlító és gyorsvizsgálati analitikai módszerek fejlesztése, optimalítása és érvényesítése, valamint
- a nyers tehéntejben mérhető ketonanyagok koncentrációi és a tej citromsav-tartalma közötti összefüggések tanulmányozása előkísérleti jelleggel annak megállapítására, hogy a citrátkör intermedierje, a citromsav mennyiségi meghatározásán keresztül lehetséges-e a szubklinikai ketózis előrejelzése, megállapítása.

A munkám során elért eredményeket a következőképpen foglalhatom össze:

- Kidolgoztam és validáltam egy gázkromatográfiás (GC) és egy headspace-gázkromatográfiás (HS-GC) eljárást, melyek alkalmasak az acetontartalom nyerstejből történő meghatározására. A mintaelőkészítés követelményei és az analitikai teljesítményjellemzők összehasonlítása alapján megállapítottam, hogy a HS-GC-eljárás sorozatvizsgálatok végzésére megfelelőbb, mint a GC-eljárás.
- A HS-GC-eljárás továbbfejlesztésével analitikai eljárást dolgoztam ki a tejminták acetecetsav- és β -hidroxivajsav-tartalmának meghatározására.

- A háromlépéses mintaelőkészítést tartalmazó HS-GC-módszer összehasonlító / referencia eljárásként alkalmazható a nyerstejek egyedi- és összketonanyag-tartalmának meghatározására.
- Laboratóriumi körülmények között végezhető, állománymonitorozási feladatokra is alkalmas áramló injektálásos analitikai (FIA) eljárást optimáltam a tehéntej minták acetontartalmának automatikus gyorsvizsgálati meghatározására. Az analitikai mérőrendszer változtatható paramétereinek meghatározásához a kísérlettervezés matematikai-statisztikai módszerét alkalmaztam. Meghatároztam az optimált módszer analitikai teljesítményjellemzőit.
- Elvégeztem 119 nyers tehéntej minta egyedi ketonanyag- és citromsav-tartalmának meghatározását. Megállapítottam, hogy:
 - a hagyományos mintavétel, tárolás és szállítás körülményei között a nyerstejben az acetecetsav dekarboxileződik és acetonná alakul;
 - a laktációs periódus energiaegyensúly szempontjából kritikusnak tekinthető első hat hetében a tej aceton- és β -hidroxi-vajsav-tartalma ellentétes irányban változik, az elléstől számított napok számának növekedésével az acetontartalom csökken, míg a β -hidroxi-vajsav-tartalom nő;
 - azokban a mintákban, amelyekben a tej aceton-koncentrációja $0,4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ feletti, az aceton és a β -hidroxi-vajsav koncentrációja között szignifikáns, lineáris függvény segítségével közelíthető összefüggés van;
 - a nyerstejek citromsav-koncentrációja a laktációs idő növekedésével az acetontartalommal megegyező módon változik, ami a citrátkör és a ketogenezis biokémiai folyamatai alapján jól értelmezhető;
 - a $0,4 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ -t meghaladó tej aceton-koncentrációjú mintákban a citromsav-tartalom és az aceton-tartalom között szignifikáns pozitív, míg a citromsav-tartalom és a β -hidroxi-vajsav-tartalom között szignifikáns negatív korreláció áll fenn.

Amennyiben elfogadjuk az irodalmi hivatkozásokban található és a szubklinikai/klinikai ketózis állapotok elkülönítésére használható tej aceton-koncentráció határértékeket, abban az esetben a fentiek alapján a citromsav mennyiségi meghatározása is

alkalmas lehet a tejelő tehenek energiahiányos állapotának előrejelzésére, illetve megállapítására.

A fenti feltételezés igazolásához további vizsgálatokra van szükség:

- A citromsav-tartalom rutinszerű meghatározása gyorsvizsgálati módszer kidolgozását igényli, melyet enzimes elven működő FIA-eljárás kidolgozásával, vagy a nyerstejek többi beltartalmi paraméteréhez hasonlóan, Fourier transzformációs infravörös spektroszkópiai (FTIR) módszer alkalmazásával tartok megvalósíthatónak.
- A biokémiai folyamatok mélyebb értelmezéséhez olyan további, friss tejmintákból történő mérések elvégzése szükséges, ahol a tejminták eredete, valamint az állatok állatorvos által megállapított állapota ismert és megfelelően dokumentált.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton is szeretném kifejezni őszinte hálámat mindazoknak, akik szakmai és emberi oldalról támogattak munkámban.

Először családomnak, édesanyámnak és édesapámnak, aki már sajnos nem érhetette meg a dolgozat elkészültét, valamint kisfiamnak köszönöm a sok-sok szeretetet, lemondást, kitartást és türelmet, amit e három év alatt irányomban tanúsítottak.

Köszönöm témavezetőm, Dr. Tömösközi Sándor egyetemi docens odaadó figyelmét, szakmai és emberi hozzáállását, amellyel munkámat irányította.

Külön köszönettel tartozom Dr. Vida László tudományos főmunkatársnak (BME Kémiai Technológiai Tanszék) a gázkromatográfiás módszerfejlesztések és mérések elvégzése, illetve Dr. Kemény Sándor egyetemi tanárnak (BME Vegyipari Műveletek Tanszék) a kísérlettervezés és a kísérletek kiértékelése terén nyújtott szakmai és emberi segítségét, továbbá Dr. Gaál Tibornak a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kara Belgyógyászati Tanszéke egyetemi tanárának, aki a mérési eredmények állatorvosi oldalról történő értékelésében volt fáradhatatlan segítőm.

Köszönöm a gödöllői Állattenyésztési és Teljesítményvizsgáló Kft. munkatársainak, Dr. Lejtényi György ügyvezető igazgatónak, Bajkai Tibor laborigazgatónak, Prokai Sándornak, Dr. Katona Ferencnek, Dr. Kerényi Jánosnak, Dr. Gundel Jánosnének és Demes Ágnesnek, valamint a Kft. többi dolgozójának, hogy rendelkezésemre bocsátották a vizsgálati mintákat.

Utoljára, de nem utolsósorban nagyon hálás vagyok Dr. Salgó Andrásnak, a BME Biokémiai és Élelmiszertechnológiai Tanszék tanszékvezető egyetemi tanárának, aki lehetővé tette és folyamatos figyelemmel kísérte kutatómunkámat, valamint a tanszék valamennyi oktatójának és dolgozójának, akik az évek során adódott kisebb-nagyobb nehézségeim megoldásában segítségemre voltak.

IRODALOM

- Aiello, R. J., Kenna, T. M. és Herbein, J. H. (1984):
Hepatic gluconeogenic and ketogenic interrelationships in the lactating cow
J. Dairy Sci. **67**, 1707-1715.
- Andersson, L. (1984):
Concentrations of blood and milk ketone bodies, Blood isopropanol and plasma glucose in dairy cows in relation to degree of hyperketonaemia and clinical signs
Zbl. Vet. Med. A. **31**, 683-693.
- Andersson, L. és Emanuelson, U. (1985):
An epidemiological study of hyperketonaemia in Swedish dairy cows; determinants and the relation to fertility
Prev. Vet. Med. **3**, 449-462.
- Arner, P., Einarsson, K., Backman, L., Nilsell, K., Lerea, K. és Livingston, J. (1983):
Studies of insulin receptors in non-obese and obese human subjects
J. Clin. Invest. **72**, 1729-1736.
- Baird, G. D., Hibbit, K. G., Hunter, G. D., Lund, P., Stubbs, M. és Krebs, H. A. (1968):
Biochemical aspects of bovine ketosis
Biochem. J. **107**, 683-689.
- Bergmeyer, H. U. és Bernt, E. (1965):
Enzymatische Bestimmung von Keton-Körpern im Blut
Enzymol. Biol. Clin. **5**, 65-76.
- Bitman, J., Hamosh, M., Hamosh, P., Lutes, V., Neville, M.C., Seacat, J. és Wood, D.L. (1989):
Milk composition and volume during the onset of lactation in a diabetic mother
Am. J. Clin. Nutr. **50**, 1364-1369.
- Brega, A., Villa, P., Quadrini, G., Quadri, A. és Lucarelli, C. (1991):
High-performance liquid chromatographic determination of acetone in blood and urine in the clinical diagnostic laboratory
J. Chrom. **553**, 249-254.
- Bremer, J. és Davis, J. E. (1974):
Citrate as a regulator of acetyl-CoA metabolism in liver mitochondria
Biochim. Biophys. Acta **370**, 564-572.
- Brindle, P. J., Zammit, V. A. és Pogson, C. I. (1985):
Regulation of carnitine palmitoyltransferase activity by malonyl-CoA in mitochondria from sheep liver, a tissue with low capacity for fatty acid synthesis
Biochem. J. **232**, 177-182.

- Casazza, J. P. és Fu, J. L. (1985):
Measurement of acetol in serum
Anal. Biochem. **148/2**, 344-348.
- Clore, J. N., Post, E. P., Bailey, D. J., Nestler, J. E. és Blackard, W. G. (1992):
Evidence for increased liver glycogen in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus after a 3-day fast
J. Clin. Endocrinol. Metab. **74**, 660-666.
- Csako, Gy. (1987):
False positive results for ketone with the drug mesna and other free-sulfhydryl compounds
Clin. Chem. **33/2** 289-292.
- Dargel, von D. (1987):
Zur enzymatischen Bestimmung von Azatazetát und D-(-)-3-Hydroxybutyrát im Blut und in der Milch von Kühen
Mh. Vet.-Med. **42**, 244-247.
- Diekmann, von L., Pabst, K. és Gravert, H. O. (1986):
Routinebestimmungen des Acetons in Milch in der Fließinjektionsanalyse
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte, **38**, 205-213.
- Dirksen, G. és Breitner, W. (1993):
A new quick-test for semiquantitative determination of beta-hydroxybutyric acid in bovine milk
J. Vet. Med. A **40**, 779-784.
- Dobbelaar, P., Mottram, T., Nyabadza, C., Hobbs, P., Elliott-Martin, R. J. és Schukken, Y. H. (1996):
Detection of ketosis in dairy cows by analysis of exhaled breath
Vet. Quart. **18/4**, 151-152.
- Dohoo, I. R. és Martin, S. W. (1984):
Subclinical ketosis: prevalence and associations with production and disease
Can. J. Comp. Med. **48**, 1-5.
- Drackley, J. K., Beitz, D. C. és Young, J. W. (1991):
Regulation of in vivo palmitate oxidation in liver from dairy cows during early lactation
J. Dairy Sci. **74**, 1884-1892.
- Elódi, P. (1981):
Biokémia (2. kiadás)
Akadémiai Kiadó, Budapest
- Eriksson, C. J. P. (1972):
Micro method for determination of ketone bodies by head-space gas chromatography
Anal. Biochem. **47**, 235-243.

- Fekete, S., Andrásófszky, E., Lejtényi, Gy., Kerényi, J. és Katona, F. (1999):
A tej ketonszintjének genetikai és állománydiagnosztikai jelentősége – Első hazai tapasztalatok
Proceedings of The 1st Middle-European Buiatrics Congress, Balatonfüred, Hungary
309-315.
- Fernandez-Garcia, E. és McGregor, J. U. (1994):
Determination of organic acids during the fermentation and cold storage of yoghurt
J. Dairy Sci. **77**, 2934-2939.
- Fraser, J., Fetter, M. C., Mast, R. L. és Free, A. H. (1965):
Studies with a simplified nitroprusside test for ketone bodies in urine, serum, plasma, and milk
Clin. Chim. Acta **11**, 372-378.
- Gaál, T. (szerk.) (1999/a):
Állatorvosi klinikai laboratóriumi diagnosztika
Sík kiadó, Budapest
- Gaál, T. (szerk.) (1999/b):
Állatorvosi kórélettan előadás kivonatok (egyetemi jegyzet)
SZIE Állatorvos-tudományi Kar, Budapest
- Geishauser, Th., Leslie, K., Kelton, D. És Duffild, T. (2000):
Lohnt regelmäßige Überwachung auf Ketose in Milchkuhherden?
Prakt. Tierarzt **81**, 850-858.
- Gustaffson, A.H. és Emanuelson, U. (1996):
Milk acetone concentration as an indicator of hyperketonaemia in dairy cows
Anim. Sci. **63**, 183-188.
- Haas, R. H., Breuer, J. és Hammen, M. (1988):
High-performance liquid chromatographic measurement of selected blood citric acid cycle intermediates
J. Chrom. **425**, 47-57.
- Harano, Y., Kogusi, K., Hyosu, T., Uno, S., Ichikawa, Y. és Shigeta, Y. (1985):
Sensitive and simplified method for the differential determination of serum levels of ketone bodies
Clin. Chim. Acta **134**, 327-336.
- Heydrych, E. M. és Więckowski, W. (1991):
Nowy test barwny do wykrywania acetonu w mleku.
Medycyna Wet. **47/2**, 84-86.
- Holtenius, P. (1994):
The metabolic capacity, a factor of impedance for health and production in dairy cows
Proc XVII. Nord. Vet. Congr. Reykjavik, Iceland **2**, 185-189.

- Holtenius, P. és Holtenius, K. (1996):
New aspects of ketone bodies in energy metabolism of dairy cows: A review
J. Vet. Med. A **43**, 579-587.
- Hori, M., Kometani, T., Ueno, H. és Morimito, T. (1974):
A new fluorometric analysis of citric acid
Biochem. Med. **11**, 49-59.
- Hove, K. (1978):
Insulin secretion in lactating cows: Responses to glucose infused intravenously in normal, ketonemic, and starved animals
J. Dairy Sci. **61**, 1407-1413.
- Hradecký, P., Jagoš, P. és Janák, J. (1978):
Gas chromatographic head-space analysis of clinically interesting ketone bodies
J. Chrom. **146**, 327-332.
- Illek, J., Sindelar, M., Sedlakova, D. és Pechova, A. (1997):
Concentration of citric acid in milk of high-yielding dairy cows with subclinical ketosis
EAAP-48th Annual meeting, Bécs
- Kégl, T. (1992):
A ketonuria csökkentése glükokortikoidok alkalmazásával ellés után levő holsten-fríz teheneknél
Magyar Állatorvosok Lapja **4**, 162-163.
- Kemény, S. és Deák, A. (2000):
Kísérletek tervezése és értékelése
Műszaki Könyvkiadó, Budapest
- Kent, J. C., Arthur, P. G. és Hartmann, P. E. (1997):
Citrate, calcium, phosphate and magnesium in sows' milk at initiation of lactation
J. Dairy Res. **65**, 55-68.
- Khaled, N.F., Illek, J. És Gajdůšek, S. (1999):
Interactions between nutrition, blood metabolic profile and milk composition in dairy goats
Acta Vet. Brno **68**, 253-258.
- Killander, J., Sjölin, S. és Zaar, B. (1962):
Rapid test for ketonuria. A comparative study
Scandinav. J. Clin. And Lab. Investigation **15**, 311-314.
- Kimura, M., Kobayashi, K., Matsuoka, A., Hayashi, K. és Kimura, Y. (1985):
Head-space gas-chromatographic determination of 3-hydroxybutyrate in plasma after enzymic reactions, and the relationship among the three ketone bodies
Clin Chem. **31/4**, 596-598.

- Kirst, E., Jacobi, U. és Bauer, J. (1995):
Über die Variabilität des Citratgehaltes der Huhnmilch und dessen Zusammenhang mit Verrarbeitungseigenschaften der Rohmilch
Deutsche Milchwirtschaft, **46(1)**, 40-43.
- Kluciński, W., Degórski, A., Miernik-Degórska, E., Targowski, S. és Winnicka, A. (1988):
Effect of ketone bodies on the phagocytic activity of bovine milk macrophages
J. Vet. Med. A **35**, 632-639.
- Krebs, H. A. (1966):
Bovine ketosis
Vet. Rec. **78**, 187-192.
- Lingemann, H. és Underberg, W. J. M. (szerk.) (1990):
Detection-oriented derivatization techniques in liquid chromatography
Chromatographic science series/48. Marcel Dekker, New York
- Littmann, S., Schulte, E. és Acker, L. (1982):
Beurteilung des hygienischen Zustandes von Eiprodukten vor der Pasteurisierung über das Muster der organischen Säuren
Z. Lebensm Unters Forch, **175**, 101-105.
- López-Soriano, F. J. és Argilés, J. M. (1985):
Simultaneous determination of ketone bodies in biological samples by gas chromatographic headspace analysis
J. Chrom. Sci. **23**, 120-123.
- Magyar Szabványügyi Testület (2001):
MSZ EN ISO/IEC 17025:2001: Vizsgáló és kalibráló laboratóriumok felkészültségének általános követelményei
Magyar Szabvány
- Marstorp, P., Anfält, T. és Andersson, L. (1983):
Determination of oxidized ketone bodies in milk by flow injection analysis
Anal. Chim. Acta **149**, 281-289.
- McGarry, J. D. (1994):
Disordered metabolism in diabetes: Have we underemphasized the fat component?
J. Cell Biochem. **55S**, 29-38.
- McGarry, J.D. és Foster, D.W. (1972):
Regulation of ketogenesis and clinical aspects of the ketotic state
Metabolism **25**, 471-489.
- McGarry, J.D., Meier, J.M. és Foster, D.W. (1973):
The effect of starvation and refeeding on carbohydrate and lipid metabolism in vivo and in the perfused rat liver. The relationship between fatty acid oxidation and esterification in the regulation of ketogenesis
J. Biol. Chem. **248**, 270-278.

- Meirhaege, H. van, Deprez, P., van Hende, C. és Muylle, E. (1988):
Plasma glucose clearance and insulin response in cows with abomasal displacement
J. Vet. Med. A **35**, 221-228.
- Metz, H. H. M. és Bergh, van den S. G. (1977):
Regulation of fat metabolism in adipose tissue of dairy cows in the period around parturition
Neth. J. Agric. Sci. **25**, 198-211.
- Miettinen, P. V. A. (1993):
Relationship between milk acetone and milk yield in individual cows
J. Vet. Med. A **56**, 102-109.
- Nemzeti Akkreditáló Testület (2002):
Útmutató az MSZ EN ISO/IEC 1705:2001 szabvány alkalmazásához (NAR-20)
Útmutató
- Newgard, C. B. és McGarry, J. D. (1995):
Metabolic coupling factors in pancreatic β -cell transduction
Ann. Rev. Biochem. **64**, 689-719.
- Neville, M.C., Keller, R.P., Casey, C. és Allen, J.C. (1994):
Calcium partitioning in human and bovine milk
J. Dairy Sci. **77**, 1964-1975.
- Nywayhid, N.F., Johnson, G.F. és Feld, R.D. (1988):
Kinetic measurement of the combined concentrations of acetoacetate and β -hydroxybutyrate in serum
Clin. Chem. **34/9**, 1790-1793.
- Olsen, C. (1971):
An enzymatic fluorimetric micromethod for the determination of acetoacetate, β -hydroxybutyrate, pyruvate and lactate
Clin. Chim. Acta **33**, 293-300.
- Oshima, M. és Fuse, H. (1981):
Citric acid concentration in subclinical mastitic milk
J. Dairy Res. **48**, 387-392.
- Ozand, P.T., Hawkins, R.L., Collins, R.M., Tildon, J.T. és Cornblath, M. (1975):
A micro-automatic procedure developed for the determination of ketone bodies, gluconeogenic amino acids, pyruvate, lactate and glucose in metabolic studies
Biochem. Med. **14**, 170-183.
- Palo, V. és Ilková, H. (1970):
Direct gas chromatographic estimation of lower alcohols, acetaldehyde, acetone and diacetyl in milk products
J. Chrom. **53**, 363-367.

- Procos, J. (1961):
Modification of the spectrophotometric determination of ketone bodies in blood enabling the total recovery of β -hydroxybutyric acid
Clin. Chem. **7**, 97-106.
- Rink, M. és Herrmann, S. (1963):
Nachweis von Acetessigsäure und Aceton im Harn mit Hilfe der
Dünnschichtchromatographie
J. Chrom. **12**, 249.
- Robinson, A. M. és Williamson, D. H. (1980):
Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues
Physiol. Rev. **60**, 143-187.
- Ružička, J. és Hansen, E.H. (1988):
Flow injection analysis (2nd Ed.)
John Wiley & Sons, New York
- Sato, H., Kurosawa, T., Oikawa, S., Endo, S., Sudo, S. és Suzuki, H. (1998):
Milk citric acid levels and its relations to other milk constituents in dairy cows
Anim. Sci. and Tech. **69(4)**, 381-386.
- Shizuo, U., Shinobu, I., Masayau, K., Yamaoka, Y., Kamiyama, Y. és Kazue, O. (1987):
A simple and sensitive assay for blood ketone bodies using highly purified 3-
hydroxybutyrate dehydrogenase
Clin. Chim. Acta **168**, 253-255.
- Shultz, L. H. és Myers, M. (1959):
Milk test for ketosis in dairy cows
J. Dairy Sci. **42**, 705-710.
- Siegel, L., Robin, N. I. és McDonald, L. J. (1977):
New approach to determination of total ketone bodies in serum
Clin. Chem. **23/1**, 46-49.
- Smith, R. W. és Walsh, A. (1988):
Effects of pregnancy and lactation on the metabolism of bovine adipose tissue
Res. Vet. Sci. **44**, 349-353.
- Staruszkiewicz, W. F., Bond, J.F. és Salwin, H. (1970):
Quantitative gas chromatographic determination of β -hydroxybutyric acid with
application to eggs
J. Chrom. **51**, 423-432.
- Steger, H. és Voigt, J. (1970):
Bestimmungen von Ketokörpern in Blut und Milch
Arch. Tierernahrung **20**, 631-639.

- Stekelenburg, van G. J. és De Bruyn, J. W. (1970):
A simple gas chromatographic determination of acetone and β -ketobutyric acid in blood serum by means of head space gas sampling
Clin. Chim. Acta **28**, 233-237.
- Suriyasathaporn, W., Daemen, A. J. J. M., Noordhuizen-stassen, E. N., Dieleman, S. J., Nielen, M. és Schukken, Y. H. (1999):
 β -hydroxybutyrate levels in peripheral blood and ketone bodies supplemented in culture media affect the in vitro chemotaxis of bovine leukocytes
Vet. Immunology and Immunopathology **68**, 177-186.
- Thin, C. és Robertson, A. (1952):
The estimation of acetone bodies
Biochem. J. **51**, 218-223.
- Tömösközi, S. (1992/a):
Az áramló injektálásos analitika élelmiszeripari alkalmazása 1.
Él. Ip. **2**, 43-47.
- Tömösközi, S.: (1992/b):
Az áramló injektálásos analitika élelmiszeripari alkalmazása 2.
Él. Ip. **3**, 78-81.
- Työppönen, J. és Kauppinen, K. (1980):
The stability and automatic determination of ketone bodies in blood samples taken in field conditions
Acta Vet. Scand. **25**, 55-61.
- White, J.C.D. és Davies, D.T. (1958):
The relation between the chemical composition of milk and the stability of the caseinate complex
J. Dairy Res. **25**, 236-255.
- White, J.C.D. és Davies, D.T. (1963):
The determination of citric acid in milk and milk sera
J. Dairy Res. **30**, 171-189.
- Williamson, D. H., Mellanby, J. és Krebs, H. A. (1962):
Enzymic determination of D(-)- β -hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood
Biochem. J. **82**, 90-96.
- Winterbach-Hanlie, E. K. és Apps, P. J. (1991):
A gas-chromatographic headspace method for the determination of acetone in bovine milk, blood and urine
J. Vet. Res. **58**, 75-79.
- Yorritsma, R., Baldée, S. J. C., Schukken, Y. H., Westing, Th. És Wentink, G. H. (1998):
Evaluation of a milk test for detection of subclinical ketosis
Vet. Quart. **20/3**, 108-110.

Young, D. A. B. és Renold, A. E. (1966):

A fluorimetric procedure for the determination of ketone bodies in very small quantities of blood

Clin. Chim. Acta **13**, 791-793.

Zammit, V. A. (1990):

Ketogenesis in the liver of ruminants – adaptations to a challenge

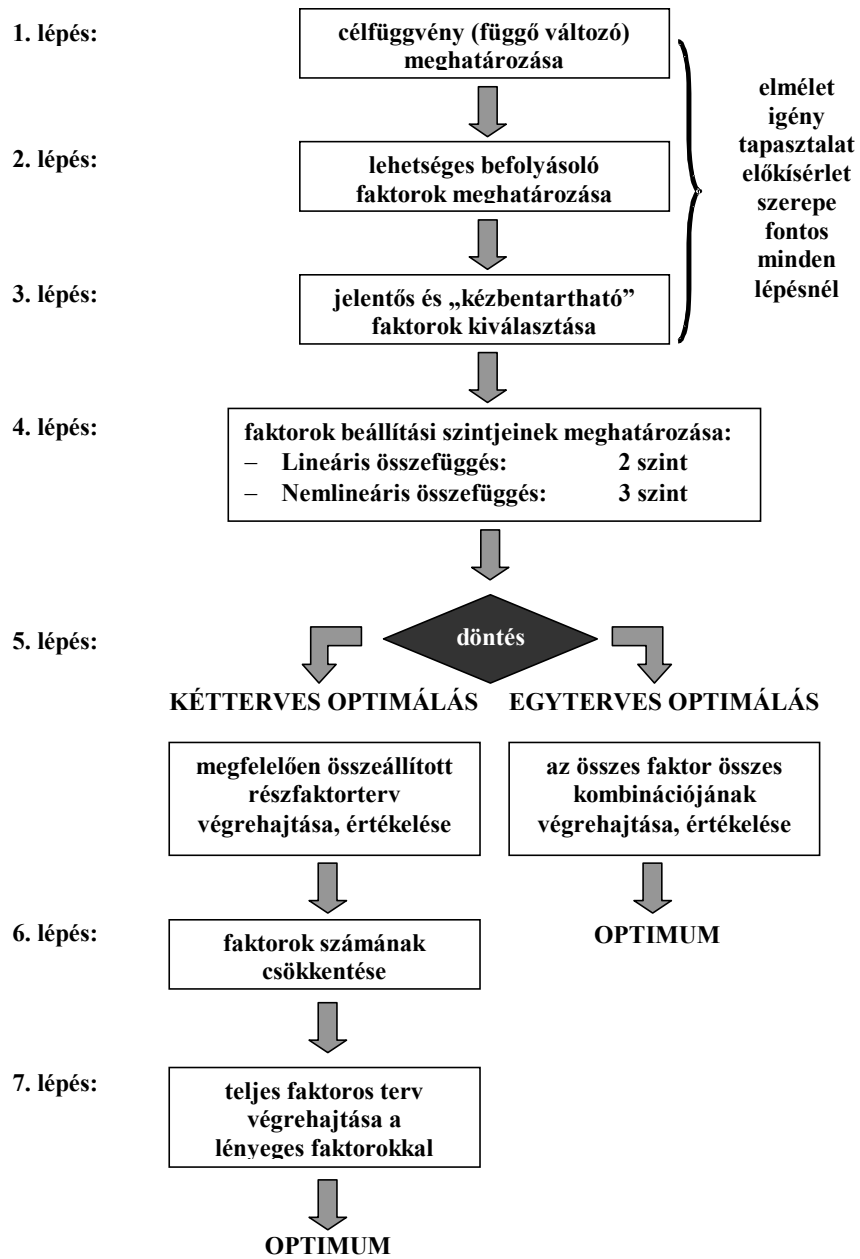
J. Agric. Sci. **115**, 155-162.

FÜGGELÉK

A Függelék ábrái és táblázatai:

- Függelék 1. ábra: Az analitikai mérőrendszer optimalálására kidolgozott eljárás általános lépései
- Függelék 2/a. táblázat: A FIA-módszer optimalálása: az 1/8-os részfaktorterv felépítése és a mérési eredmények
- Függelék 2/b. táblázat: A FIA-módszer optimalálása: az 1/8-os részfaktorterv kiértékelése, a becsült hatások ANOVA-táblázata
- Függelék 3/a. táblázat: A FIA-módszer optimalálása: a 2^3 teljes faktorterv felépítése és a mért eredmények
- Függelék 3/b. táblázat: A FIA-módszer optimalálása: a 2^3 teljes faktorterv kiértékelése az analitikai jelintenzitás szerint. A becsült hatások ANOVA-táblázata
- Függelék 3/c. táblázat: A FIA-módszer optimalálása: a 2^3 teljes faktorterv kiértékelése a csúcshely szerint. A becsült hatások ANOVA-táblázata
- Függelék 4. táblázat: Mérési adatállomány a FIA-módszer munka-, lineáris- és kalibrációs tartományának vizsgálatához
- Függelék 5. táblázat: Mérési adatállomány a FIA-módszer kalibrációjának vizsgálatához
- Függelék 6. táblázat: Az optimált FIA-módszer validálása: mérési adattartomány a reprodukálhatóság és ismételhetőség meghatározására
- Függelék 7. táblázat: A HS-GC-vel és a FIA-val mért acetonszénhidrogén koncentrációk 102 nyerstej mintára
- Függelék 8. táblázatok: Mintaelőkészítési módszer fejlesztése citromsav-tartalom nyerstejből történő fluorimetriás meghatározásához
- Függelék 9. táblázat: Összesített mérési adatok a vizsgálatokba bevont teljes állományról

Függelék 1. ábra: Az analitikai mérőrendszer optimalizálására kidolgozott eljárás általános lépései



Függelék 2/a. táblázat: A FIA-módszer optimalálása: az 1/8-os részfaktorterv felépítése és a mérési eredmények

(F1: termosztálás hőmérséklete, F2: minta minősége, F3: minta koncentrációja, F4: hordozófolyadék minősége, F5: injektált mintamennyiség, F6: hordozófolyadék térfogatárama, F7: reagens térfogatárama, F8: reakcióspirál hossza, AU: 540 nm-en mért abszorbancia)

sorszám	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	AU1	AU2	AUátlag
61	50 fok	víz	1 mM	desztvíz	100	1.2 ml/p	1.5 ml/p	30 cm	50	46	48,0
44	50 fok	víz	1 mM	desztvíz	100	1.5 ml/p	1.2 ml/p	60 cm	91	92	91,5
52	50 fok	víz	1 mM	desztvíz	100	2.0 ml/p	0.8 ml/p	90 cm	92	90	91,0
59	50 fok	víz	1 mM	desztvíz	200	1.2 ml/p	1.2 ml/p	90 cm	140	137	138,5
57	50 fok	víz	1 mM	desztvíz	200	1.5 ml/p	0.8 ml/p	30 cm	140	145	142,5
39	50 fok	víz	1 mM	desztvíz	200	2.0 ml/p	1.5 ml/p	60 cm	80	79	79,5
45	50 fok	víz	1 mM	desztvíz	300	1.2 ml/p	0.8 ml/p	60 cm	159	155	157,0
37	50 fok	víz	1 mM	desztvíz	300	1.5 ml/p	1.5 ml/p	90 cm	82	82	82,0
54	50 fok	víz	1 mM	desztvíz	300	2.0 ml/p	1.2 ml/p	30 cm	159	159	159,0
42	50 fok	víz	1 mM	puffer	100	1.2 ml/p	1.2 ml/p	90 cm	92	84	88,0
53	50 fok	víz	1 mM	puffer	100	1.5 ml/p	0.8 ml/p	30 cm	99	100	99,5
38	50 fok	víz	1 mM	puffer	100	2.0 ml/p	1.5 ml/p	60 cm	56	56	56,0
51	50 fok	víz	1 mM	puffer	200	1.2 ml/p	0.8 ml/p	60 cm	145	154	149,5
56	50 fok	víz	1 mM	puffer	200	1.5 ml/p	1.5 ml/p	90 cm	82	87	84,5
17	50 fok	víz	1 mM	puffer	200	2.0 ml/p	1.2 ml/p	30 cm	123	128	125,5
60	50 fok	víz	1 mM	puffer	300	1.2 ml/p	1.5 ml/p	30 cm	77	77	77,0
48	50 fok	víz	1 mM	puffer	300	1.5 ml/p	1.2 ml/p	60 cm	154	148	151,0
5	50 fok	víz	1 mM	puffer	300	2.0 ml/p	0.8 ml/p	90 cm	170	168	169,0
29	50 fok	víz	5 mM	desztvíz	100	1.2 ml/p	1.5 ml/p	90 cm	242	237	239,5
55	50 fok	víz	5 mM	desztvíz	100	1.5 ml/p	1.2 ml/p	30 cm	486	484	485,0
43	50 fok	víz	5 mM	desztvíz	100	2.0 ml/p	0.8 ml/p	60 cm	478	471	474,5
1	50 fok	víz	5 mM	desztvíz	200	1.2 ml/p	1.2 ml/p	60 cm	713	701	707,0
16	50 fok	víz	5 mM	desztvíz	200	1.5 ml/p	0.8 ml/p	90 cm	658	650	654,0
58	50 fok	víz	5 mM	desztvíz	200	2.0 ml/p	1.5 ml/p	30 cm	461	453	457,0
4	50 fok	víz	5 mM	desztvíz	300	1.2 ml/p	0.8 ml/p	30 cm	830	831	830,5
41	50 fok	víz	5 mM	desztvíz	300	1.5 ml/p	1.5 ml/p	60 cm	437	431	434,0
47	50 fok	víz	5 mM	desztvíz	300	2.0 ml/p	1.2 ml/p	90 cm	879	873	876,0
46	50 fok	víz	5 mM	puffer	100	1.2 ml/p	1.2 ml/p	30 cm	473	476	474,5
50	50 fok	víz	5 mM	puffer	100	1.5 ml/p	0.8 ml/p	60 cm	518	515	516,5
62	50 fok	víz	5 mM	puffer	100	2.0 ml/p	1.5 ml/p	90 cm	300	302	301,0
49	50 fok	víz	5 mM	puffer	200	1.2 ml/p	0.8 ml/p	90 cm	808	807	807,5
30	50 fok	víz	5 mM	puffer	200	1.5 ml/p	1.5 ml/p	30 cm	335	343	339,0
40	50 fok	víz	5 mM	puffer	200	2.0 ml/p	1.2 ml/p	60 cm	793	781	787,0
15	50 fok	víz	5 mM	puffer	300	1.2 ml/p	1.5 ml/p	60 cm	416	414	415,0
25	50 fok	víz	5 mM	puffer	300	1.5 ml/p	1.2 ml/p	90 cm	782	784	783,0
19	50 fok	víz	5 mM	puffer	300	2.0 ml/p	0.8 ml/p	30 cm	864	868	866,0
124	50 fok	tej	1 mM	desztvíz	100	1.2 ml/p	0.8 ml/p	90 cm	96	104	100,0
32	50 fok	tej	1 mM	desztvíz	100	1.5 ml/p	1.5 ml/p	30 cm	67	71	69,0
162	50 fok	tej	1 mM	desztvíz	100	2.0 ml/p	1.2 ml/p	60 cm	105	103	104,0
18	50 fok	tej	1 mM	desztvíz	200	1.2 ml/p	1.5 ml/p	60 cm	69	67	68,0
22	50 fok	tej	1 mM	desztvíz	200	1.5 ml/p	1.2 ml/p	90 cm	127	116	121,5
27	50 fok	tej	1 mM	desztvíz	200	2.0 ml/p	0.8 ml/p	30 cm	144	125	134,5
123	50 fok	tej	1 mM	desztvíz	300	1.2 ml/p	1.2 ml/p	30 cm	162	162	162,0
121	50 fok	tej	1 mM	desztvíz	300	1.5 ml/p	0.8 ml/p	60 cm	172	173	172,5
107	50 fok	tej	1 mM	desztvíz	300	2.0 ml/p	1.5 ml/p	90 cm	115	115	115,0
119	50 fok	tej	1 mM	puffer	100	1.2 ml/p	0.8 ml/p	30 cm	77	76	76,5
21	50 fok	tej	1 mM	puffer	100	1.2 ml/p	1.5 ml/p	60 cm	44	45	44,5
20	50 fok	tej	1 mM	puffer	100	1.5 ml/p	1.2 ml/p	90 cm	81	86	83,5
117	50 fok	tej	1 mM	puffer	100	1.5 ml/p	1.5 ml/p	60 cm	50	46	48,0
14	50 fok	tej	1 mM	puffer	100	2.0 ml/p	0.8 ml/p	30 cm	93	87	90,0
125	50 fok	tej	1 mM	puffer	100	2.0 ml/p	1.2 ml/p	90 cm	88	72	80,0
109	50 fok	tej	1 mM	puffer	200	1.2 ml/p	1.2 ml/p	30 cm	106	107	106,5
28	50 fok	tej	1 mM	puffer	200	1.2 ml/p	1.5 ml/p	90 cm	60	71	65,5
31	50 fok	tej	1 mM	puffer	200	1.5 ml/p	0.8 ml/p	60 cm	111	100	105,5
110	50 fok	tej	1 mM	puffer	200	1.5 ml/p	1.2 ml/p	30 cm	110	106	108,0
114	50 fok	tej	1 mM	puffer	200	2.0 ml/p	0.8 ml/p	60 cm	120	117	118,5
34	50 fok	tej	1 mM	puffer	200	2.0 ml/p	1.5 ml/p	90 cm	79	75	77,0
113	50 fok	tej	1 mM	puffer	300	1.2 ml/p	0.8 ml/p	90 cm	131	134	132,5
23	50 fok	tej	1 mM	puffer	300	1.2 ml/p	1.2 ml/p	60 cm	129	129	129,0
103	50 fok	tej	1 mM	puffer	300	1.5 ml/p	0.8 ml/p	90 cm	125	132	128,5
104	50 fok	tej	1 mM	puffer	300	1.5 ml/p	1.5 ml/p	30 cm	76	74	75,0
111	50 fok	tej	1 mM	puffer	300	2.0 ml/p	1.2 ml/p	60 cm	135	129	132,0
102	50 fok	tej	1 mM	puffer	300	2.0 ml/p	1.5 ml/p	30 cm	82	78	80,0
116	50 fok	tej	5 mM	desztvíz	100	1.2 ml/p	0.8 ml/p	60 cm	550	551	550,5
8	50 fok	tej	5 mM	desztvíz	100	1.5 ml/p	1.5 ml/p	90 cm	245	241	243,0
9	50 fok	tej	5 mM	desztvíz	100	2.0 ml/p	1.2 ml/p	30 cm	400	392	396,0
105	50 fok	tej	5 mM	desztvíz	200	1.2 ml/p	1.5 ml/p	30 cm	406	426	416,0
26	50 fok	tej	5 mM	desztvíz	200	1.5 ml/p	1.2 ml/p	60 cm	605	608	606,5
122	50 fok	tej	5 mM	desztvíz	200	2.0 ml/p	0.8 ml/p	90 cm	842	868	855,0
106	50 fok	tej	5 mM	desztvíz	300	1.2 ml/p	1.2 ml/p	90 cm	872	858	865,0
33	50 fok	tej	5 mM	desztvíz	300	1.5 ml/p	0.8 ml/p	30 cm	774	825	799,5
115	50 fok	tej	5 mM	desztvíz	300	2.0 ml/p	1.5 ml/p	60 cm	569	569	569,0
35	50 fok	tej	5 mM	puffer	100	1.2 ml/p	1.2 ml/p	60 cm	280	265	272,5
11	50 fok	tej	5 mM	puffer	100	1.5 ml/p	0.8 ml/p	90 cm	448	436	442,0
24	50 fok	tej	5 mM	puffer	100	2.0 ml/p	1.5 ml/p	30 cm	240	242	241,0
118	50 fok	tej	5 mM	puffer	200	1.2 ml/p	0.8 ml/p	30 cm	815	817	816,0
36	50 fok	tej	5 mM	puffer	200	1.5 ml/p	1.5 ml/p	60 cm	144	170	157,0
108	50 fok	tej	5 mM	puffer	200	2.0 ml/p	1.2 ml/p	90 cm	817	813	815,0
112	50 fok	tej	5 mM	puffer	300	1.2 ml/p	1.5 ml/p	90 cm	492	491	491,5
3	50 fok	tej	5 mM	puffer	300	1.5 ml/p	1.2 ml/p	30 cm	753	735	744,0

sorszám	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	AU1	AU2	AUátlag
120	50 fok	tej	5 mM	puffer	300	2.0 ml/p	0.8 ml/p	60 cm	961	978	969,5
92	90 fok	víz	1 mM	desztvíz	100	1.2 ml/p	1.2 ml/p	60 cm	136	150	143,0
63	90 fok	víz	1 mM	desztvíz	100	1.5 ml/p	0.8 ml/p	90 cm	177	161	169,0
98	90 fok	víz	1 mM	desztvíz	100	2.0 ml/p	1.5 ml/p	30 cm	113	128	120,5
82	90 fok	víz	1 mM	desztvíz	200	1.2 ml/p	0.8 ml/p	30 cm	240	249	244,5
84	90 fok	víz	1 mM	desztvíz	200	1.5 ml/p	1.5 ml/p	60 cm	140	129	134,5
86	90 fok	víz	1 mM	desztvíz	200	2.0 ml/p	1.2 ml/p	90 cm	258	247	252,5
79	90 fok	víz	1 mM	desztvíz	300	1.2 ml/p	1.5 ml/p	90 cm	148	145	146,5
73	90 fok	víz	1 mM	desztvíz	300	1.5 ml/p	1.2 ml/p	30 cm	273	265	269,0
67	90 fok	víz	1 mM	desztvíz	300	2.0 ml/p	0.8 ml/p	60 cm	329	333	331,0
7	90 fok	víz	1 mM	puffer	100	1.2 ml/p	0.8 ml/p	60 cm	139	140	139,5
13	90 fok	víz	1 mM	puffer	100	1.5 ml/p	1.5 ml/p	90 cm	97	92	94,5
75	90 fok	víz	1 mM	puffer	100	2.0 ml/p	1.2 ml/p	30 cm	167	174	170,5
12	90 fok	víz	1 mM	puffer	200	1.2 ml/p	1.5 ml/p	30 cm	103	100	101,5
81	90 fok	víz	1 mM	puffer	200	1.5 ml/p	1.2 ml/p	60 cm	190	193	191,5
68	90 fok	víz	1 mM	puffer	200	2.0 ml/p	0.8 ml/p	90 cm	263	263	263,0
91	90 fok	víz	1 mM	puffer	300	1.2 ml/p	1.2 ml/p	90 cm	199	202	200,5
95	90 fok	víz	1 mM	puffer	300	1.5 ml/p	0.8 ml/p	30 cm	229	213	221,0
88	90 fok	víz	1 mM	puffer	300	2.0 ml/p	1.5 ml/p	60 cm	203	162	182,5
74	90 fok	víz	5 mM	desztvíz	100	1.2 ml/p	0.8 ml/p	30 cm	944	943	943,5
10	90 fok	víz	5 mM	desztvíz	100	1.2 ml/p	1.5 ml/p	60 cm	410	387	398,5
72	90 fok	víz	5 mM	desztvíz	100	1.5 ml/p	1.2 ml/p	90 cm	914	898	906,0
101	90 fok	víz	5 mM	desztvíz	100	1.5 ml/p	1.5 ml/p	60 cm	568	544	556,0
78	90 fok	víz	5 mM	desztvíz	100	2.0 ml/p	0.8 ml/p	30 cm	1039	1043	1041,0
80	90 fok	víz	5 mM	desztvíz	100	2.0 ml/p	1.2 ml/p	90 cm	852	842	847,0
6	90 fok	víz	5 mM	desztvíz	200	1.2 ml/p	1.2 ml/p	30 cm	1015	1021	1018,0
70	90 fok	víz	5 mM	desztvíz	200	1.2 ml/p	1.5 ml/p	90 cm	734	745	739,5
97	90 fok	víz	5 mM	desztvíz	200	1.5 ml/p	0.8 ml/p	60 cm	1311	1299	1305,0
71	90 fok	víz	5 mM	desztvíz	200	1.5 ml/p	1.2 ml/p	30 cm	1348	1351	1349,5
85	90 fok	víz	5 mM	desztvíz	200	2.0 ml/p	0.8 ml/p	60 cm	1552	1558	1555,0
90	90 fok	víz	5 mM	desztvíz	200	2.0 ml/p	1.5 ml/p	90 cm	872	870	871,0
64	90 fok	víz	5 mM	desztvíz	300	1.2 ml/p	0.8 ml/p	90 cm	1370	1398	1384,0
2	90 fok	víz	5 mM	desztvíz	300	1.2 ml/p	1.2 ml/p	60 cm	1262	1259	1260,5
93	90 fok	víz	5 mM	desztvíz	300	1.5 ml/p	0.8 ml/p	90 cm	1335	1380	1357,5
87	90 fok	víz	5 mM	desztvíz	300	1.5 ml/p	1.5 ml/p	30 cm	712	714	713,0
94	90 fok	víz	5 mM	desztvíz	300	2.0 ml/p	1.2 ml/p	60 cm	1805	1824	1814,5
83	90 fok	víz	5 mM	desztvíz	300	2.0 ml/p	1.5 ml/p	30 cm	852	847	849,5
77	90 fok	víz	5 mM	puffer	100	1.2 ml/p	0.8 ml/p	90 cm	869	879	874,0
100	90 fok	víz	5 mM	puffer	100	1.5 ml/p	1.5 ml/p	30 cm	542	511	526,5
89	90 fok	víz	5 mM	puffer	100	2.0 ml/p	1.2 ml/p	60 cm	1085	1082	1083,5
65	90 fok	víz	5 mM	puffer	200	1.2 ml/p	1.5 ml/p	60 cm	716	717	716,5
66	90 fok	víz	5 mM	puffer	200	1.5 ml/p	1.2 ml/p	90 cm	1265	1268	1266,5
96	90 fok	víz	5 mM	puffer	200	2.0 ml/p	0.8 ml/p	30 cm	1792	1794	1793,0
69	90 fok	víz	5 mM	puffer	300	1.2 ml/p	1.2 ml/p	30 cm	1432	1506	1469,0
76	90 fok	víz	5 mM	puffer	300	1.5 ml/p	0.8 ml/p	60 cm	1390	1403	1396,5
99	90 fok	víz	5 mM	puffer	300	2.0 ml/p	1.5 ml/p	90 cm	985	1011	998,0
161	90 fok	tej	1 mM	desztvíz	100	1.2 ml/p	1.2 ml/p	30 cm	171	170	170,5
138	90 fok	tej	1 mM	desztvíz	100	1.5 ml/p	0.8 ml/p	60 cm	162	159	160,5
142	90 fok	tej	1 mM	desztvíz	100	2.0 ml/p	1.5 ml/p	90 cm	116	105	110,5
127	90 fok	tej	1 mM	desztvíz	200	1.2 ml/p	0.8 ml/p	90 cm	212	200	206,0
131	90 fok	tej	1 mM	desztvíz	200	1.5 ml/p	1.5 ml/p	30 cm	121	118	119,5
144	90 fok	tej	1 mM	desztvíz	200	2.0 ml/p	1.2 ml/p	60 cm	269	263	266,0
156	90 fok	tej	1 mM	desztvíz	300	1.2 ml/p	1.5 ml/p	60 cm	140	120	130,0
128	90 fok	tej	1 mM	desztvíz	300	1.5 ml/p	1.2 ml/p	90 cm	231	210	220,5
133	90 fok	tej	1 mM	desztvíz	300	2.0 ml/p	0.8 ml/p	30 cm	310	302	306,0
137	90 fok	tej	1 mM	puffer	100	1.2 ml/p	1.5 ml/p	90 cm	57	57	57,0
130	90 fok	tej	1 mM	puffer	100	1.5 ml/p	1.2 ml/p	30 cm	106	93	99,5
159	90 fok	tej	1 mM	puffer	100	2.0 ml/p	0.8 ml/p	60 cm	112	106	109,0
132	90 fok	tej	1 mM	puffer	200	1.2 ml/p	1.2 ml/p	60 cm	136	123	129,5
136	90 fok	tej	1 mM	puffer	200	1.5 ml/p	0.8 ml/p	90 cm	131	117	124,0
126	90 fok	tej	1 mM	puffer	200	2.0 ml/p	1.5 ml/p	30 cm	121	112	116,5
141	90 fok	tej	1 mM	puffer	300	1.2 ml/p	0.8 ml/p	30 cm	173	172	172,5
153	90 fok	tej	1 mM	puffer	300	1.5 ml/p	1.5 ml/p	60 cm	98	87	92,5
135	90 fok	tej	1 mM	puffer	300	2.0 ml/p	1.2 ml/p	90 cm	215	185	200,0
151	90 fok	tej	5 mM	desztvíz	100	1.2 ml/p	1.2 ml/p	90 cm	833	821	827,0
146	90 fok	tej	5 mM	desztvíz	100	1.5 ml/p	0.8 ml/p	30 cm	882	886	884,0
152	90 fok	tej	5 mM	desztvíz	100	2.0 ml/p	1.5 ml/p	60 cm	562	561	561,5
150	90 fok	tej	5 mM	desztvíz	200	1.2 ml/p	0.8 ml/p	60 cm	1213	1193	1203,0
155	90 fok	tej	5 mM	desztvíz	200	1.5 ml/p	1.5 ml/p	90 cm	693	667	680,0
154	90 fok	tej	5 mM	desztvíz	200	2.0 ml/p	1.2 ml/p	30 cm	1456	1492	1474,0
143	90 fok	tej	5 mM	desztvíz	300	1.2 ml/p	1.5 ml/p	30 cm	657	662	659,5
157	90 fok	tej	5 mM	desztvíz	300	1.5 ml/p	1.2 ml/p	60 cm	1273	1280	1276,5
158	90 fok	tej	5 mM	desztvíz	300	2.0 ml/p	0.8 ml/p	90 cm	1710	1708	1709,0
140	90 fok	tej	5 mM	puffer	100	1.2 ml/p	1.5 ml/p	30 cm	446	435	440,5
139	90 fok	tej	5 mM	puffer	100	1.5 ml/p	1.2 ml/p	60 cm	805	790	797,5
145	90 fok	tej	5 mM	puffer	100	2.0 ml/p	0.8 ml/p	90 cm	998	977	987,5
147	90 fok	tej	5 mM	puffer	200	1.2 ml/p	1.2 ml/p	90 cm	1110	1124	1117,0
149	90 fok	tej	5 mM	puffer	200	1.5 ml/p	0.8 ml/p	30 cm	1224	1214	1219,0
148	90 fok	tej	5 mM	puffer	200	2.0 ml/p	1.5 ml/p	60 cm	860	861	860,5
160	90 fok	tej	5 mM	puffer	300	1.2 ml/p	0.8 ml/p	60 cm	1372	1400	1386,0
134	90 fok	tej	5 mM	puffer	300	1.5 ml/p	1.5 ml/p	90 cm	672	658	665,0
129	90 fok	tej	5 mM	puffer	300	2.0 ml/p	1.2 ml/p	30 cm	1592	1585	1588,5

Függelék 2/b. táblázat: A FIA-módszer optimalálása: az 1/8-os részfaktorterv kiértékelése, a becsült hatások ANOVA-táblázata (szignifikáns a hatás, ha $p < 0,01$)

(F1: termosztálás hőmérséklete, F2: minta minősége, F3: minta koncentrációja, F4: hordozófolyadék minősége, F5: injektált mintamennyiség, F6: hordozófolyadék térfogatárama, F7: reagens térfogatárama, F8: reakcióspirál hossza, Fi-Fj: Fi és Fj faktorok közötti kölcsönhatás, AU: 540 nm-en mért abszorbancia, L: lineáris, Q: négyzetes, SS: eltérés-négyzetösszegek, df: szabadsági fok, MS: szórásnégyzet, F: F-statisztika értéke, p: valószínűség, error: véletlen hiba, Total SS: összes eltérés-négyzetösszeg)

ANOVA; Var.:AUátlag; R-sqr=0,98661; Adj:0,97521 (orsistat3.sta)					
4 2-level factors, 4 3-level factors, 162 Runs					
DV: AUátlag; AUátlag Variable 9-10; MS Residual=5050,266					
	SS	df	MS	F	p
F1 (L)	2831723	1	2831723	560,708	0,000000
F2 (L)	28913	1	28913	5,725	0,018877
F3 (L)	17743428	1	17743428	3513,365	0,000000
F4 (L)	2918	1	2918	0,578	0,449265
F5 (L+Q)	1572011	2	786006	155,636	0,000000
F6 (L+Q)	314604	2	157302	31,147	0,000000
F7 (L+Q)	2437958	2	1218979	241,369	0,000000
F8 (L+Q)	941	2	471	0,093	0,911098
F1-F2	16934	1	16934	3,353	0,070505
F1-F3	1654211	1	1654211	327,549	0,000000
F1-F4	22	1	22	0,004	0,947505
F1-F5	51601	2	25800	5,109	0,007984
F1-F6	87744	2	43872	8,687	0,000363
F1-F7	149827	2	74914	14,834	0,000003
F1-F8	29747	2	14874	2,945	0,057862
F2-F3	4015	1	4015	0,795	0,375040
F2-F4	28130	1	28130	5,570	0,020507
F2-F5	6413	2	3207	0,635	0,532411
F2-F6	11870	2	5935	1,175	0,313607
F2-F7	1316	2	658	0,130	0,878038
F2-F8	7168	2	3584	0,710	0,494634
F3-F4	12274	1	12274	2,430	0,122629
F3-F5	800478	2	400239	79,251	0,000000
F3-F6	163917	2	81959	16,229	0,000001
F3-F7	1244083	2	622041	123,170	0,000000
F3-F8	1985	2	993	0,197	0,821906
F4-F5	1234	2	617	0,122	0,885184
F4-F6	6116	2	3058	0,605	0,548090
F4-F7	465	2	233	0,046	0,955013
F4-F8	37369	2	18684	3,700	0,028704
F5-F6	55378	4	13845	2,741	0,033572
F5-F7	122474	4	30618	6,063	0,000237
F5-F8	62704	4	15676	3,104	0,019415
F6-F7	7320	4	1830	0,362	0,834786
F6-F8	12546	4	3137	0,621	0,648696
F7-F8	28405	4	7101	1,406	0,238668
Error	439373	87	5050		
Total SS	32805087	161			

Függelék 3/a. táblázat: A FIA-módszer optimalálása: a 2³ teljes faktorterv (2 ismétléssel) felépítése és a mért eredmények

(ISM: ismétlés, F1: injektált mintamennyiség, F2: hordozófolyadék térfogatára, F3: reagens térfogatára, AU: 540 nm-en mért abszorbancia, CSHELY: csúcs helye)

sorszám	ISM	F1	F2	F3	AU1	AU2	AUátlag	CSHELY
1	2	200	2,0 ml/p	0,8 ml/p	870	874	872	54
2	1	200	2,8 ml/p	1,2 ml/p	1575	1564	1569,5	37
3	2	200	2,8 ml/p	0,8 ml/p	1346	1273	1309,5	35
4	2	300	2,0 ml/p	0,8 ml/p	1089	1064	1076,5	54
5	2	300	2,8 ml/p	0,8 ml/p	1490	1455	1472,5	37
6	1	300	2,0 ml/p	0,8 ml/p	1155	1113	1134	53
7	2	200	2,0 ml/p	1,2 ml/p	1437	1411	1424	50
8	2	200	2,8 ml/p	1,2 ml/p	1731	1680	1705,5	38
9	1	200	2,8 ml/p	0,8 ml/p	1394	1280	1337	36,5
10	2	300	2,0 ml/p	1,2 ml/p	1617	1596	1606,5	55
11	1	300	2,0 ml/p	1,2 ml/p	1667	1620	1643,5	55
12	2	300	2,8 ml/p	1,2 ml/p	1969	1905	1937	37
13	1	200	2,0 ml/p	1,2 ml/p	1536	1509	1522,5	50
14	1	300	2,8 ml/p	0,8 ml/p	1607	1530	1568,5	37
15	1	300	2,8 ml/p	1,2 ml/p	1943	1978	1960,5	37
16	1	200	2,0 ml/p	0,8 ml/p	1198	1187	1192,5	47

Függelék 3/b. táblázat: A FIA-módszer optimalálása: a 2³ teljes faktorterv (2 ismétléssel) kiértékelése az analitikai jelintenzitás szerint. A becsült hatások ANOVA-táblázata (szignifikáns a hatás, ha p<0,05)

(F1: injektált mintamennyiség, F2: hordozófolyadék térfogatára, F3: reagens térfogatára, Fi-Fj: Fi és Fj faktorok közötti kölcsönhatás, AU: 540 nm-en mért abszorbancia, SS: eltérés-négyzetösszegek, df: szabadsági fok, MS: szórásnégyzet, F: F-statisztika értéke, p: valószínűség, error: véletlen hiba: Total SS: összes eltérés-négyzetösszeg)

ANOVA; Var.:AUátlag; R-sqr=0,94511; Adj:0,89708 (5mmolterv.sta) 2**(3-0) design; MS Residual=9132.391 DV: AUátlag					
	SS	df	MS	F	p
F1	134414	1	134413,9	14,71837	0,004972
F2	356558	1	356558,3	39,04326	0,000246
F3	725265	1	725265,1	79,41679	0,000020
F1-F 2	20129	1	20128,5	2,20408	0,175944
F1-F3	9288	1	9288,1	1,01705	0,342745
F2-F3	11908	1	11908,3	1,30396	0,286515
F1-F2-F3	311	1	310,6	0,03402	0,858264
Error	73059	8	9132,4		
Total SS	1330932	15			

Függelék 3/c. táblázat: A FIA-módszer optimalálása: a 2^3 teljes faktorterv (2 ismétléssel) kiértékelése a csúcshely szerint. A becült hatások ANOVA-táblázata (szignifikáns a hatás, ha $p < 0,05$)

(F1: injektált mintamennyiség, F2: hordozófolyadék térfogatára, F3: reagens térfogatára, CSHELY: csúcs helye, Fi-Fj: Fi és Fj faktorok közötti kölcsönhatás, AU: 540 nm-en mért abszorbanca, SS: eltérés-négyzetösszegek, df: szabadsági fok, MS: szórásnégyzet, F: F-statisztika értéke, p: valószínűség, error: véletlen hiba: Total SS: összes eltérés-négyzetösszeg)

ANOVA; Var.:CSHELY; R-sqr=0,97384; Adj:0,95095 (5mmolterv.sta) 2**(3-0) design; MS Residual=3.328125 DV: CSHELY					
	SS	df	MS	F	p
F1	19,141	1	19,1406	5,7512	0,043301
F2	953,266	1	953,2656	286,4272	0,000000
F3	1,891	1	1,8906	0,5681	0,472622
F1-F 2	13,141	1	13,1406	3,9484	0,082148
F1-F3	0,016	1	0,0156	0,0047	0,947054
F2-F3	0,141	1	0,1406	0,0423	0,842272
F1-F2-F3	3,516	1	3,5156	1,0563	0,334122
Error	26,625	8	3,3281		
Total SS	1017,734	15			

Függelék 4. táblázat: Mérési adatállomány a FIA-módszer munka-, lineáris- és kalibrációs tartományának vizsgálatához (a mérések 5 különböző napon történtek)

mmol·l ⁻¹ st.	AU1	AU2	AU3	AU4	AU5
10,00	5322	5104	4965	5547	5481
5,00	2635	2456	2136	2865	2769
3,00	1568	1368	1355	1798	1542
1,00	512	466	402	568	509
0,50	248	236	199	298	246
0,05	22	21	17	27	22
0,00	11	2	7	3	1

Függelék 5. táblázat: Mérési adatállomány a FIA-módszer kalibrációjának vizsgálatához (3 párhuzamos méréssorozat)

mmol·l ⁻¹ st.	AU1	AU2	AU3
5,00	2346	2350	2345
3,00	1408	1412	1405
1,00	470	469	469
0,50	233	231	234
0,05	23	24	23
0,00	2	1	2

Függelék 6. táblázat: Az optimált FIA-módszer validálása: mérési adattartomány a reprodukálhatóság és ismételhetőség meghatározására

(OPERATOR: technikusok, PART: oldatok, TRIALS: ismétlések, MEASURE: 540 nm-en mért abszorbancia)

OPERATOR	PART	TRIALS	MEASURE
techn1	oldat1	ism1	2635,00
techn1	oldat2	ism1	2513,00
techn1	oldat3	ism1	2756,00
techn1	oldat4	ism1	2660,00
techn1	oldat5	ism1	2598,00
techn1	oldat6	ism1	2643,00
techn1	oldat1	ism2	2456,00
techn1	oldat2	ism2	2359,00
techn1	oldat3	ism2	2466,00
techn1	oldat4	ism2	2410,00
techn1	oldat5	ism2	2342,00
techn1	oldat6	ism2	2465,00
techn2	oldat1	ism1	2635,00
techn2	oldat2	ism1	2598,00
techn2	oldat3	ism1	2752,00
techn2	oldat4	ism1	2469,00
techn2	oldat5	ism1	2561,00
techn2	oldat6	ism1	2723,00
techn2	oldat1	ism2	2865,00
techn2	oldat2	ism2	2798,00
techn2	oldat3	ism2	2834,00
techn2	oldat4	ism2	2782,00
techn2	oldat5	ism2	2902,00
techn2	oldat6	ism2	2786,00

Függelék 7. táblázat: A HS-GC-vel és a FIA-val mért aceton koncentrációk 102 nyerstej mintára

minta	HS-GC [mmol/l]	FIA [mmol/l]	minta	HS-GC [mmol/l]	FIA [mmol/l]
1	0,17	0,07	52	0,16	0,00
2	0,78	0,76	53	0,11	0,01
3	0,07	0,00	54	0,11	0,00
4	0,05	0,01	55	1,70	1,69
5	4,67	3,91	56	0,16	0,00
6	0,88	0,69	57	0,18	0,10
7	0,19	0,03	58	0,07	0,00
8	0,16	0,05	59	0,07	0,00
9	0,10	0,00	60	0,16	0,00
10	0,08	0,00	61	1,39	1,34
11	0,07	0,00	62	1,91	2,04
12	0,06	0,00	63	1,23	1,23
13	0,10	0,02	64	1,88	1,87
14	0,74	0,83	65	1,64	1,77
15	0,08	0,03	66	1,66	1,77
16	0,12	0,06	67	0,86	0,81
17	0,06	0,00	68	0,13	0,03
18	0,05	0,00	69	0,00	0,02
19	0,10	0,08	70	0,04	0,00
20	0,06	0,00	71	0,00	0,06
21	0,66	0,55	72	0,04	0,04
22	0,16	0,00	73	0,03	0,02
23	0,22	0,09	74	0,00	0,04
24	0,11	0,04	75	0,03	0,04
25	0,12	0,00	76	0,04	0,08
26	0,08	0,01	77	0,16	0,05
27	0,10	0,00	78	0,58	0,55
28	0,49	0,58	79	0,11	0,07
29	0,08	0,00	80	0,09	0,05
30	0,13	0,13	81	0,25	0,15
31	0,07	0,02	82	0,04	0,11
32	0,07	0,00	83	0,04	0,06
33	0,05	0,03	84	0,04	0,04
34	0,07	0,01	85	0,05	0,34
35	0,18	0,15	86	0,28	0,20
36	0,09	0,05	87	0,62	0,55
37	0,10	0,07	88	1,61	1,60
38	0,05	0,02	89	1,02	0,80
39	0,06	0,00	90	1,75	1,56
40	0,21	0,39	91	0,64	0,44
41	0,07	0,20	92	1,37	1,24
42	0,06	0,13	93	0,23	0,08
43	0,23	0,33	94	0,11	0,07
44	0,06	0,21	95	0,42	0,37
45	0,06	0,13	96	0,30	0,15
46	0,07	0,19	97	0,08	0,01
47	0,04	0,19	98	0,21	0,15
48	0,05	0,20	99	1,60	1,45
49	0,04	0,21	100	0,47	0,37
50	0,04	0,26	101	0,07	0,00
51	0,05	0,17	102	3,15	2,57

Függelék 8. táblázatok: Mintaelőkészítési módszer fejlesztése citromsav-tartalom nyerstejből történő fluorimetriás meghatározásához

Függelék 8/a. táblázat: Mintaelőkészítési módszer fejlesztése I.:

(mintaelőkészítés: metafoszforsavas kezelést követően a kicsapódott fehérjék 3000/perc, 10 percig történő centrifugálása; a mért értékek 2 független meghatározás átlagát reprezentálják)

Minta	Hozzáadott citromsav [mg/100 ml]	Átlagos visszanyerés [%]
1	10	75,46
2	10	67,12
3	10	76,59

Függelék 8/b. táblázat: Mintaelőkészítési módszer fejlesztése II.:

(mintaelőkészítés: metafoszforsavas kezelést követően a kicsapódott fehérjék 10000/perc, 10 percig történő centrifugálása; a mért értékek 2 független meghatározás átlagát reprezentálják)

Minta	Hozzáadott citromsav [mg/100 ml]	Átlagos visszanyerés [%]
1	10	95,56
2	10	97,64
3	10	96,37

Függelék 8/c. táblázat: Mintaelőkészítési módszer fejlesztése III.:

(mintaelőkészítés: metafoszforsavas kezelést követően a kicsapódott fehérjék 10000/perc, 20 percig történő centrifugálása; a mért értékek 2 független meghatározás átlagát reprezentálják)

Minta	Hozzáadott citromsav [mg/100 ml]	Átlagos visszanyerés [%]
1	10	98,67
2	10	99,23
3	10	101,45

Függelék 9. táblázat: Összesített mérési adatok a vizsgálatokba bevont teljes állatállományról

id	cit/1	cit/2	cit átlag	cit SD	acFIA/1	acFIA/2	acFIA átlag	acFIA SD	acGC/1	acGC/2	acGC átlag	acGC SD
	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]
1	3,77	3,78	3,78	0,011	0,050	0,088	0,069	0,0269	0,165	0,170	0,167	0,0041
2	3,51	3,49	3,50	0,015	0,080	1,444	0,762	0,9645	0,801	0,763	0,782	0,0268
3	5,54	5,53	5,54	0,007	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,068	0,070	0,069	0,0013
4	3,26	3,23	3,24	0,017	0,010	0,016	0,013	0,0042	0,065	0,045	0,055	0,0141
5	9,66	9,63	9,64	0,021	4,020	3,798	3,909	0,1570	4,651	4,698	4,675	0,0336
6	8,11	7,98	8,05	0,086	0,840	0,534	0,687	0,2164	0,912	0,855	0,884	0,0400
7	5,26	5,07	5,17	0,138	0,000	0,054	0,027	0,0382	0,210	0,166	0,188	0,0314
8	3,76	3,89	3,82	0,095	0,030	0,060	0,045	0,0212	0,165	0,154	0,160	0,0075
9	2,54	2,35	2,45	0,135	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,090	0,103	0,096	0,0095
10	3,11	3,00	3,05	0,074	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,088	0,080	0,084	0,0059
11	3,42	3,54	3,48	0,087	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,075	0,056	0,065	0,0128
12	1,54	1,82	1,68	0,194	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,060	0,065	0,063	0,0039
13	0,69	0,80	0,74	0,079	0,000	0,038	0,019	0,0269	0,120	0,082	0,101	0,0270
14	2,64	2,45	2,54	0,136	1,050	0,616	0,833	0,3069	0,789	0,698	0,744	0,0641
15	2,21	2,31	2,26	0,071	0,002	0,054	0,028	0,0368	0,085	0,071	0,078	0,0096
16	2,21	2,21	2,21	0,001	0,100	0,014	0,057	0,0608	0,112	0,130	0,121	0,0131
17	1,56	1,46	1,51	0,074	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,065	0,047	0,056	0,0130
18	2,45	2,41	2,43	0,027	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,052	0,042	0,047	0,0068
19	1,81	1,66	1,73	0,110	0,120	0,046	0,083	0,0523	0,102	0,090	0,096	0,0088
20	2,45	2,40	2,42	0,038	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,061	0,062	0,062	0,0008
21	2,46	2,42	2,44	0,032	0,610	0,484	0,547	0,0891	0,662	0,664	0,663	0,0012
22	1,62	1,56	1,59	0,045	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,162	0,157	0,160	0,0034
23	1,30	1,27	1,29	0,019	0,124	0,056	0,090	0,0481	0,221	0,211	0,216	0,0071
24	2,68	2,93	2,80	0,176	0,000	0,070	0,035	0,0495	0,113	0,112	0,113	0,0010
25	2,00	2,17	2,08	0,118	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,120	0,118	0,119	0,0015
26	1,65	1,56	1,60	0,058	0,020	0,006	0,013	0,0099	0,081	0,071	0,076	0,0075
27	1,89	2,17	2,03	0,198	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,080	0,112	0,096	0,0225
28	2,69	3,01	2,85	0,232	0,612	0,546	0,579	0,0467	0,504	0,484	0,494	0,0146
29	2,65	2,76	2,71	0,083	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,085	0,067	0,076	0,0121
30	2,98	2,66	2,82	0,230	0,130	0,120	0,125	0,0071	0,132	0,127	0,130	0,0033
31	3,27	3,37	3,32	0,075	0,040	0,008	0,024	0,0226	0,072	0,061	0,066	0,0076
32	3,45	3,22	3,34	0,162	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,069	0,080	0,074	0,0076
33	3,64	3,51	3,58	0,094	0,034	0,018	0,026	0,0113	0,065	0,043	0,054	0,0154
34	3,13	3,27	3,20	0,104	0,000	0,030	0,015	0,0212	0,071	0,067	0,069	0,0032
35	2,81	2,71	2,76	0,074	0,178	0,130	0,154	0,0339	0,020	0,344	0,182	0,2293
36	3,10	2,91	3,01	0,133	0,045	0,063	0,054	0,0127	0,099	0,084	0,091	0,0109
37	2,45	2,55	2,50	0,071	0,089	0,059	0,074	0,0212	0,098	0,099	0,099	0,0010
38	3,60	3,53	3,57	0,048	0,046	0,002	0,024	0,0311	0,050	0,046	0,048	0,0030
39	2,80	2,73	2,77	0,047	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,060	0,061	0,061	0,0012
40	2,42	2,32	2,37	0,067	0,215	0,557	0,386	0,2418	0,221	0,207	0,214	0,0099
41	1,90	1,88	1,89	0,013	0,045	0,355	0,200	0,2192	0,080	0,067	0,073	0,0094
42	2,60	3,19	2,89	0,416	0,074	0,186	0,130	0,0792	0,061	0,052	0,056	0,0069
43	3,85	3,66	3,76	0,128	0,279	0,383	0,331	0,0735	0,240	0,223	0,231	0,0123
44	2,14	1,88	2,01	0,180	0,045	0,369	0,207	0,2291	0,060	0,056	0,058	0,0033
45	1,79	1,97	1,88	0,127	0,085	0,184	0,134	0,0700	0,062	0,056	0,059	0,0039
46	4,22	4,10	4,16	0,081	0,045	0,339	0,192	0,2079	0,065	0,068	0,066	0,0018
47	3,10	2,94	3,02	0,116	0,054	0,334	0,194	0,1980	0,040	0,037	0,039	0,0020

id	cit/1	cit/2	cit átlag	cit SD	acFIA/1	acFIA/2	acFIA átlag	acFIA SD	acGC/1	acGC/2	acGC átlag	acGC SD
	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]
48	2,40	2,36	2,38	0,026	0,042	0,352	0,197	0,2188	0,051	0,046	0,049	0,0036
49	2,01	1,87	1,94	0,101	0,065	0,351	0,208	0,2022	0,040	0,034	0,037	0,0040
50	3,21	3,06	3,14	0,111	0,054	0,472	0,263	0,2956	0,037	0,034	0,036	0,0024
51	2,46	2,64	2,55	0,128	0,090	0,240	0,165	0,1065	0,062	0,042	0,052	0,0140
118	3,85	3,68	3,77	0,119	0,000	0,050	0,025	0,0354	0,132	0,138	0,135	0,0036
119	4,72	4,52	4,62	0,141	0,000	0,034	0,017	0,0240	0,000	0,000	0,000	0,0000
120	5,02	5,02	5,02	0,001	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,041	0,038	0,039	0,0025
121	4,32	4,27	4,29	0,031	0,000	0,116	0,058	0,0820	0,000	0,000	0,000	0,0000
122	5,33	5,28	5,31	0,035	0,045	0,035	0,040	0,0071	0,042	0,043	0,043	0,0004
123	4,50	4,48	4,49	0,017	0,026	0,012	0,019	0,0099	0,031	0,026	0,028	0,0039
124	3,30	3,36	3,33	0,043	0,000	0,074	0,037	0,0523	0,000	0,000	0,000	0,0000
125	3,20	3,01	3,10	0,137	0,015	0,073	0,044	0,0410	0,033	0,026	0,029	0,0043
126	3,15	3,18	3,16	0,025	0,045	0,105	0,075	0,0424	0,040	0,035	0,037	0,0040
127	4,06	3,85	3,96	0,144	0,000	0,102	0,051	0,0721	0,165	0,156	0,161	0,0063
128	5,70	5,65	5,68	0,033	0,546	0,552	0,549	0,0042	0,578	0,580	0,579	0,0016
129	3,24	3,08	3,16	0,110	0,120	0,018	0,069	0,0721	0,112	0,108	0,110	0,0026
130	4,60	4,65	4,62	0,034	0,103	0,000	0,051	0,0728	0,105	0,079	0,092	0,0185
131	5,30	5,19	5,24	0,078	0,189	0,119	0,154	0,0495	0,251	0,247	0,249	0,0031
132	2,82	2,73	2,77	0,061	0,090	0,124	0,107	0,0245	0,043	0,037	0,040	0,0042
133	4,21	4,02	4,11	0,136	0,050	0,068	0,059	0,0127	0,041	0,042	0,041	0,0004
134	1,65	1,68	1,66	0,026	0,035	0,043	0,039	0,0057	0,036	0,036	0,036	0,0004
135	2,54	2,54	2,54	0,001	0,089	0,587	0,338	0,3521	0,051	0,049	0,050	0,0019
136	2,51	2,32	2,42	0,137	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,170	0,156	0,163	0,0101
137	2,72	2,69	2,70	0,019	0,000	0,022	0,011	0,0156	0,110	0,106	0,108	0,0026
138	1,82	1,93	1,88	0,074	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,123	0,101	0,112	0,0158
139	2,65	2,60	2,62	0,033	1,699	1,683	1,691	0,0113	0,745	2,660	1,703	1,3544
140	1,22	5,18	3,20	2,799	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,162	0,158	0,160	0,0031
141	2,50	2,48	2,49	0,014	0,156	0,048	0,102	0,0764	0,179	0,174	0,177	0,0035
142	3,11	2,94	3,02	0,114	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,073	0,058	0,065	0,0099
143	2,31	2,29	2,30	0,013	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,072	0,068	0,070	0,0028
144	3,12	3,12	3,12	0,001	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,166	0,163	0,164	0,0018
145	2,32	1,92	2,12	0,282	1,389	1,299	1,344	0,0636	0,142	2,646	1,394	1,7703
146	3,52	3,39	3,45	0,093	2,106	1,974	2,040	0,0928	0,191	3,622	1,906	2,4259
147	2,52	2,61	2,57	0,066	1,240	1,210	1,225	0,0212	0,236	2,228	1,232	1,4089
148	1,00	1,05	1,03	0,038	1,882	1,862	1,872	0,0141	1,942	1,808	1,875	0,0948
149	2,34	2,30	2,32	0,027	1,669	1,879	1,774	0,1485	1,640	1,634	1,637	0,0041
150	2,28	2,26	2,27	0,012	1,678	1,866	1,772	0,1329	1,665	1,648	1,656	0,0113
151	3,46	3,43	3,44	0,024	0,845	0,781	0,813	0,0453	0,821	0,898	0,859	0,0539
153	7,58	7,36	7,47	0,158	0,211	0,191	0,201	0,0141	0,288	0,266	0,277	0,0156
154	8,01	8,03	8,02	0,010	0,588	0,520	0,554	0,0481	0,631	0,616	0,624	0,0105
155	12,75	12,82	12,78	0,048	1,678	1,530	1,604	0,1047	0,625	2,598	1,611	1,3954
156	13,45	13,34	13,40	0,076	1,021	0,585	0,803	0,3083	1,031	1,017	1,024	0,0097
157	9,55	9,68	9,61	0,092	1,752	1,374	1,563	0,2673	1,810	1,695	1,752	0,0815
158	11,26	11,40	11,33	0,099	0,546	0,326	0,436	0,1556	0,660	0,614	0,637	0,0328
159	11,35	11,19	11,27	0,117	1,289	1,193	1,241	0,0679	1,360	1,371	1,366	0,0080
160	14,67	14,60	14,64	0,051	0,045	0,119	0,082	0,0523	0,233	0,232	0,232	0,0009
161	7,45	7,30	7,38	0,109	0,058	0,090	0,074	0,0226	0,120	0,103	0,112	0,0121
162	8,84	9,09	8,97	0,174	0,542	0,200	0,371	0,2418	0,425	0,412	0,419	0,0091
163	12,95	12,70	12,82	0,170	0,256	0,042	0,149	0,1513	0,312	0,297	0,305	0,0106
164	5,85	6,02	5,93	0,121	0,021	0,001	0,011	0,0141	0,098	0,062	0,080	0,0252

id	cit/1	cit/2	cit átlag	cit SD	acFIA/1	acFIA/2	acFIA átlag	acFIA SD	acGC/1	acGC/2	acGC átlag	acGC SD
	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]
165	9,43	9,23	9,33	0,141	0,203	0,103	0,153	0,0707	0,231	0,195	0,213	0,0253
166	1,08	20,46	10,77	13,703	1,562	1,336	1,449	0,1598	1,599	1,598	1,598	0,0009
167	8,70	8,80	8,75	0,072	0,421	0,319	0,370	0,0721	0,482	0,465	0,474	0,0117
168	7,46	7,44	7,45	0,013	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,082	0,065	0,074	0,0117
169	14,85	14,59	14,72	0,185	3,051	2,095	2,573	0,6760	3,241	3,053	3,147	0,1331
213	3,25	3,06	3,15	0,129					1,512	1,489	1,501	0,0166
214	2,51	2,85	2,68	0,240					1,035	1,028	1,032	0,0054
215	2,74	2,68	2,71	0,042					2,088	2,060	2,074	0,0196
218	2,18	2,04	2,11	0,102					0,034	0,617	0,326	0,4123
1001	3,78	3,62	3,70	0,111	5,261	4,949	5,105	0,2206	5,455	5,449	5,452	0,0042
1002	4,51	4,50	4,51	0,006	2,451	2,735	2,593	0,2008	2,956	2,930	2,943	0,0184
1003	5,62	5,78	5,70	0,112	4,260	3,540	3,900	0,5091	4,562	4,521	4,541	0,0290
1004	2,01	1,88	1,95	0,092	1,205	0,797	1,001	0,2885	1,201	1,132	1,166	0,0488
1006	2,42	2,24	2,33	0,127	1,542	1,258	1,400	0,2008	1,532	1,521	1,527	0,0076
1007	6,45	6,15	6,30	0,210	5,664	4,096	4,880	1,1087	4,926	5,065	4,995	0,0987
1008	2,50	2,31	2,40	0,136	1,156	0,908	1,032	0,1754	1,275	1,240	1,257	0,0244
1009	3,33	3,20	3,26	0,088	1,462	1,160	1,311	0,2135	1,441	1,445	1,443	0,0029
1010	3,01	2,84	2,93	0,120	2,240	2,160	2,200	0,0566	2,246	2,269	2,257	0,0164
1011	2,32	2,17	2,25	0,102	2,541	2,041	2,291	0,3536	2,801	2,783	2,792	0,0124
1012	3,22	3,18	3,20	0,030	3,846	3,354	3,600	0,3479	4,062	4,003	4,032	0,0420

id	acacGC/1	acacGC/2	acacGC átlag	acacGC SD	bohbgGC/1	bohbgGC/2	bohbgGC átlag	bohbgGC SD	tenyészet id	napok
	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]		
1	0,115	0,153	0,134	0,0275	2,165	2,137	2,151	0,0201		
2	0,000	0,000	0,000	0,0000	3,624	3,614	3,619	0,0071		
3	0,052	0,074	0,063	0,0154	0,559	0,555	0,557	0,0026		
4	0,023	0,042	0,033	0,0137	1,834	1,820	1,827	0,0102		
5	0,000	0,000	0,000	0,0000	4,163	4,225	4,194	0,0441		
6	0,054	0,038	0,046	0,0113	1,195	1,180	1,188	0,0106		
7	0,088	0,090	0,089	0,0012	0,523	0,536	0,529	0,0090		
8	0,123	0,122	0,123	0,0007	0,669	0,685	0,677	0,0116	5	36
9	0,196	0,197	0,197	0,0013	0,822	0,815	0,819	0,0049	5	39
10	0,090	0,102	0,096	0,0087	1,654	1,662	1,658	0,0054	5	17
11	0,022	0,076	0,049	0,0386	2,301	2,288	2,294	0,0094	5	26
12	0,022	0,072	0,047	0,0356	0,532	0,599	0,566	0,0475	5	29
13	0,012	0,024	0,018	0,0079	1,844	1,912	1,878	0,0479	5	33
14	0,035	0,120	0,077	0,0604	2,645	2,635	2,640	0,0073	5	23
15	0,043	0,033	0,038	0,0064	1,155	1,147	1,151	0,0055	5	30
16	0,043	0,037	0,040	0,0046	3,256	3,262	3,259	0,0044	5	37
17	0,034	0,033	0,034	0,0006	2,632	2,611	2,622	0,0147	5	14
18	0,029	0,026	0,027	0,0016	3,340	3,338	3,339	0,0013	5	31
19	0,054	0,033	0,044	0,0150	3,765	3,752	3,758	0,0095	5	35
20	0,033	0,029	0,031	0,0024	4,012	3,806	3,909	0,1454	5	34
21	0,021	0,017	0,019	0,0033	1,765	1,761	1,763	0,0025	5	20
22	0,000	0,000	0,000	0,0000	2,322	2,308	2,315	0,0098	5	26
23	0,000	0,000	0,000	0,0000	2,345	2,329	2,337	0,0116	5	30
24	0,000	0,000	0,000	0,0000	3,422	3,450	3,436	0,0197	5	39
25	0,000	0,000	0,000	0,0000	1,779	1,797	1,788	0,0125	5	20

id	acacGC/1	acacGC/2	acacGC átlag	acacGC SD	bohbgGC/1	bohbgGC/2	bohbgGC átlag	bohbgGC SD	tenyészet id	napok
	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]		
26	0,000	0,000	0,000	0,0000	2,655	2,664	2,659	0,0063	5	38
27	0,000	0,000	0,000	0,0000	3,356	3,358	3,357	0,0016	5	14
28	0,021	0,013	0,017	0,0059	3,715	3,709	3,712	0,0042	5	11
29	0,000	0,000	0,000	0,0000	4,031	4,009	4,020	0,0157	5	40
30	0,000	0,000	0,000	0,0000	4,001	4,015	4,008	0,0101	5	21
31	0,000	0,000	0,000	0,0000	3,512	3,521	3,516	0,0063	5	40
32	0,000	0,000	0,000	0,0000	3,015	3,016	3,015	0,0004	5	13
33	0,000	0,000	0,000	0,0000	4,184	4,164	4,174	0,0143	5	39
34	0,016	0,020	0,018	0,0030	3,230	3,216	3,223	0,0099	5	19
35	0,000	0,034	0,017	0,0238	3,533	3,598	3,565	0,0462	5	27
36	0,000	0,021	0,010	0,0147	3,414	3,430	3,422	0,0114	5	18
37	0,000	0,010	0,005	0,0068	4,335	4,327	4,331	0,0056	5	23
38	0,000	0,020	0,010	0,0139	3,482	3,460	3,471	0,0156	5	18
39	0,000	0,013	0,006	0,0090	3,152	3,147	3,150	0,0032	5	16
40	0,000	0,000	0,000	0,0000	4,602	4,588	4,595	0,0099		
41	0,000	0,000	0,000	0,0000	2,380	2,381	2,380	0,0005		
42	0,000	0,000	0,000	0,0000	3,456	3,448	3,452	0,0054		
43	0,000	0,004	0,002	0,0026	5,132	5,153	5,142	0,0146		
44	0,000	0,013	0,006	0,0091	4,049	4,045	4,047	0,0028		
45	0,000	0,020	0,010	0,0142	4,201	4,004	4,103	0,1393		
46	0,013	0,012	0,013	0,0005	4,783	4,736	4,759	0,0327		
47	0,000	0,008	0,004	0,0058	4,926	4,948	4,937	0,0159		
48	0,000	0,019	0,009	0,0131	3,720	3,717	3,719	0,0019		
49	0,000	0,034	0,017	0,0239	4,096	4,068	4,082	0,0194		
50	0,021	0,015	0,018	0,0042	2,641	2,619	2,630	0,0156		
51	0,023	0,020	0,021	0,0023	2,746	2,738	2,742	0,0056		
118	0,056	0,114	0,085	0,0408	1,521	1,515	1,518	0,0041	4	59
119	0,215	0,329	0,272	0,0804	1,678	1,682	1,680	0,0031	4	37
120	0,200	0,202	0,201	0,0015	1,835	1,837	1,836	0,0014	4	14
121	0,132	0,158	0,145	0,0184	1,679	1,657	1,668	0,0151	4	35
122	0,102	0,115	0,109	0,0093	1,946	1,941	1,943	0,0030	4	81
123	0,051	0,085	0,068	0,0239	1,299	1,290	1,295	0,0060	4	22
124	0,105	0,134	0,120	0,0208	2,984	2,978	2,981	0,0048	4	51
125	0,075	0,062	0,068	0,0094	2,052	2,034	2,043	0,0121	4	83
126	0,056	0,066	0,061	0,0074	2,483	2,470	2,476	0,0088	4	73
127	0,000	0,000	0,000	0,0000	5,301	5,231	5,266	0,0498	4	67
128	0,000	0,000	0,000	0,0000	3,533	3,535	3,534	0,0015	4	5
129	0,000	0,000	0,000	0,0000	4,625	4,622	4,623	0,0016	4	47
130	0,000	0,000	0,000	0,0000	4,396	4,367	4,381	0,0205	4	33
131	0,000	0,000	0,000	0,0000	5,090	5,086	5,088	0,0030	4	21
132	0,000	0,025	0,013	0,0178	3,051	3,044	3,047	0,0052	4	48
133	0,000	0,022	0,011	0,0159	3,702	3,673	3,688	0,0206	4	14
134	0,745	0,793	0,769	0,0337	1,532	1,548	1,540	0,0112	4	21
135	0,315	0,429	0,372	0,0808	2,047	2,038	2,042	0,0059	4	11
136	0,162	0,130	0,146	0,0223	4,276	4,261	4,268	0,0104	1	
137	0,123	0,101	0,112	0,0156	2,222	2,202	2,212	0,0143	1	
138	0,154	0,130	0,142	0,0169	2,351	8,333	5,342	4,2294	1	
139	0,000	0,049	0,025	0,0348	4,246	4,223	4,235	0,0162	1	
140	0,000	0,052	0,026	0,0367	3,912	3,905	3,908	0,0052	1	
141	0,098	0,105	0,102	0,0052	2,382	2,371	2,376	0,0079	1	

id	acacGC/1	acacGC/2	acacGC átlag	acacGC SD	bohGC/1	bohGC/2	bohGC átlag	bohGC SD	tenyészet id	napok
	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]	[mmol/l]		
142	0,113	0,128	0,121	0,0106	3,624	3,623	3,624	0,0004	1	
143	0,088	0,061	0,074	0,0189	4,431	4,411	4,421	0,0142	1	
144	0,102	0,142	0,122	0,0282	4,435	4,443	4,439	0,0054	1	
145	0,000	0,000	0,000	0,0000	5,889	5,892	5,890	0,0019	6	
146	0,000	0,006	0,003	0,0043	5,122	5,130	5,126	0,0054	6	
147	0,051	0,031	0,041	0,0143	5,462	5,420	5,441	0,0299	6	
148	0,012	0,017	0,014	0,0034	3,210	3,200	3,205	0,0067	2	
149	0,042	0,036	0,039	0,0038	2,280	2,279	2,279	0,0012	3	
150	0,036	0,034	0,035	0,0014	3,385	3,380	3,383	0,0038	3	
151	0,230	0,000	0,042	0,1626	1,666	1,723	1,695	0,0407	3	
153	0,021	0,014	0,018	0,0052	1,173	1,185	1,179	0,0086	7	6
154	0,040	0,038	0,039	0,0013	1,710	1,727	1,718	0,0117	7	5
155	0,085	0,090	0,087	0,0042	1,952	1,886	1,919	0,0468	7	6
156	0,056	0,078	0,067	0,0154	1,306	1,304	1,305	0,0016	7	5
157	0,084	0,067	0,076	0,0119	2,125	2,123	2,124	0,0013	7	4
158	0,065	0,047	0,056	0,0130	2,123	2,135	2,129	0,0084	7	5
159	0,055	0,052	0,054	0,0020	2,241	2,202	2,222	0,0276	7	6
160	0,089	0,109	0,099	0,0141	0,639	0,629	0,634	0,0074	7	6
161	0,035	0,069	0,052	0,0244	0,420	0,402	0,411	0,0131	7	6
162	0,014	0,015	0,014	0,0013	0,466	0,470	0,468	0,0033	7	6
163	0,024	0,033	0,028	0,0063	1,340	1,349	1,345	0,0068	7	6
164	0,014	0,063	0,038	0,0346	1,352	1,330	1,341	0,0156	7	5
165	0,033	0,016	0,024	0,0115	0,546	0,524	0,535	0,0157	7	6
166	0,000	0,000	0,000	0,0000	0,562	0,573	0,568	0,0079	7	5
167	0,062	0,039	0,051	0,0165	2,956	2,938	2,947	0,0127	7	5
168	0,025	0,044	0,034	0,0135	2,069	2,062	2,065	0,0048	7	5
169	0,000	0,000	0,000	0,0000	2,780	2,773	2,776	0,0053	7	5
213	0,042	0,020	0,031	0,0158	5,372	5,402	5,387	0,0217		
214	0,068	0,103	0,086	0,0249	5,661	5,642	5,652	0,0135		
215	0,000	0,000	0,000	0,0000	4,412	4,400	4,406	0,0083		
218	0,046	0,066	0,056	0,0144	4,914	4,897	4,905	0,0123		
1001	0,000	0,000	0,000	0,0000	5,132	5,118	5,125	0,0102		
1002	0,231	0,279	0,255	0,0338	5,246	5,275	5,260	0,0210		
1003	0,030	0,024	0,027	0,0040	4,866	4,875	4,870	0,0063		
1004	0,156	0,228	0,192	0,0509	4,565	4,569	4,567	0,0029		
1006	0,102	0,066	0,084	0,0256	5,371	5,367	5,369	0,0026		
1007	0,000	0,100	0,050	0,0704	5,862	5,844	5,853	0,0123		
1008	0,156	0,239	0,197	0,0585	3,395	3,375	3,385	0,0139		
1009	0,065	0,046	0,055	0,0138	3,593	3,667	3,630	0,0528		
1010	0,000	0,000	0,000	0,0000	3,371	3,350	3,360	0,0147		
1011	0,000	0,000	0,000	0,0000	4,599	4,589	4,594	0,0067		
1012	0,000	0,000	0,000	0,0000	5,872	5,852	5,862	0,0140		

NYILATKOZAT

Alulírott Baticz Orsolya kijelentem, hogy ezt a doktori értekezést magam készítettem és abban csak a megadott forrásokat használtam fel. Minden olyan részt, amelyet szó szerint, vagy azonos tartalomban, de átfogalmazva más forrásból átvettem, egyértelműen, a forrás megadásával megjelöltem.

Budapest, 2002. március 20.

.....
Baticz Orsolya