

ODNOS IZMEĐU METODA ZA ODREĐIVANJE
ERITROCITNOG PROTOPORFIRINA (EP)
I CINK-PROTOPORFIRINA (ZPP)

LJ. SKENDER, D. PRPIĆ-MAJIĆ i V. KARAČIĆ

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

(Primljeno 9. X 1981)

U svrhu izbora najprikladnije metode za određivanje eritrocitnog protoporfirina (EP), vrlo važnog biokemijskog pokazatelja u ocjeni povećane apsorpcije olova, ispitan je odnos između spektrofotometrijske metode Chisolm-Brown i spektrofotometrijske metode Cripps-Peters za određivanje EP, kao i odnos između obje metode s direktnim određivanjem cink-protoporfirina (ZPP) na hematofluorometru. S pomoću koeficijenta korelacije utvrđena je značajna povezanost između sve tri ispitane metode. S pomoću pravca regresije utvrđena je veća osjetljivost spektrofotometrijske metode Chisolm-Brown od spektrofotometrijske metode Cripps-Peters za određivanje EP. Metoda direktnog određivanja ZPP na hematofluorometru je također osjetljivija od spektrofotometrijske metode Cripps-Peters. Dokazano je da je spektrofotometrijska metoda Chisolm-Brown specifična, točna, osjetljiva i ponovljiva. Pored toga je relativno brza i lako izvediva, ne zahtijeva veliku količinu biološkog uzorka i komplicirane tehničke uređaje. Zbog tih osobina preporučuje se kao metoda izbora za određivanje EP u odraslih i djece za ispitivanje povećane apsorpcije olova, sideropenične anemije te u nekim genetskim bolestima poremećene sinteze porfirina.

Eritrocitni protoporfirin (EP) je vrlo koristan biokemijski pokazatelj u ocjeni povećane apsorpcije olova budući da je koncentracija EP u perifernoj krvi odraz endogenog učinka olova na glavni krvotvorni organ koštanu srž (1). Pod stabilnim uvjetima ekspozicije koncentracija EP odražava bolje od drugih raspoloživih pokazatelja olovo koje se može kelirati (2). Kod profesionalne ekspozicije olovu (3, 4), a naročito kod lagano povećane koncentracije olova u krvi (5) dokazana je važnost primjene tog testa. Na razini probira («screening») analiza EP se uz koncentraciju olova u krvi smatra najboljim pokazateljem povećane apsorpcije olova u djece (6—9).

Određivanje EP nakon izdvajanja iz biološkog materijala postupkom višestruke ekstrakcije organskim spojevima i razrijeđenom solnom kise-

linom provodi se fluorometrijskim ili spektrofotometrijskim metodama (7, 8, 10-14). Od prve kvantitativne analize 1928. godine (11), pa do jedne od zadnjih objavljenih mikrometoda u 1975. godini (8), izvršen je niz modifikacija s obzirom na točnost metode, vrijeme izrade i količinu uzorka za analizu. Spektrofluorometrijske mikrometode (7, 8, 15) su naročito dobre metode budući da su vrlo osjetljive, precizne i reproducibilne, a zahtijevaju vrlo malenu količinu uzorka i relativno su brze. Među njima naročito treba istaći metodu *Chisolm-Brown* (8), koja se po svojim osobinama može preporučiti kao metoda izbora.

Ubrzo nakon što je ustanovljeno da se kod povećane apsorpcije olova i sideropenične anemije eritrocitni protoporfirin ne nalazi slobodan, već vezan u obliku kelata s cinkom (16), objavljena je metoda za određivanje Zn-protoporfirina (ZPP) s pomoću fluorometra (»hematofluorometar«) (17). Budući da je u toj metodi postupak pojednostavljen do te mjere da se ZPP može određivati direktno bez prethodne ekstrakcije i bez mjerenja količine krvi, a konačni rezultat dobiti za manje od pet minuta, primjena određivanja ZPP na razini probira postala je rutinskom analizom u ocjeni povećane apsorpcije olova (17—20).

Svrha ovog rada je usporedba spektrofluorometrijske (8) i spektrofotometrijske (14) metode za određivanje EP, te spektrofluorometrijskog (8) i spektrofotometrijskog (14) određivanja EP s direktnim određivanjem ZPP na hematofluorometru (17). Takva analiza uz primjenu odgovarajućih standarda omogućava objektivnu evaluaciju pojedinih metoda i upućuje na metodu izbora.

MATERIJAL I METODE

Ispitivanja su izvršena na venskoj krvi 20 ispitanika bez poznate ekspozicije olovu i 27 ispitanika različito eksponiranih olovu. Među njima je bilo 37 ispitanika muškog, a 10 ispitanika ženskog spola. Za analizu EP spektrofluorometrijskom metodom krv je skupljena u epruvete (B—D vacutainer R »Becton, Dickinson and Co«), koje su u 2 ml sadržavale 0,04 ml 0,17 M K_3EDTA . Za analizu EP spektrometrijskom metodom i za analizu ZPP krvi je sakupljena u obične epruvete, koje su u 5 ml sadržavale 0,1 ml heparina. Uzorci krvi su bili zaštićeni od svjetla i do analize pohranjeni na $+4^{\circ}C$. Koncentracija ZPP je određena u istom danu kada je krv izvađena, a koncentracija EP s obje metode unutar tri dana.

a) Spektrofluorometrijsko određivanje EP

U spektrofluorometrijskom određivanju EP iskorištava se svojstvo porfirina da u kiselom mediju fluoresciraju s maksimumom između 590—700 nm kada su pobuđeni ultraljubičastim svjetlom u području Soretove vrpce (350—360 nm). Protoporfirini se iz krvi ekstrahiraju smjesom etilacetata i octene kiseline, te ponovno ekstrahiraju s razrijeđenom sol-

nom kiselinom. U solno kiselom ekstraktu protoporfirina izmjeri se intenzitet fluorescencije pod optimalnim uvjetima ekscitacije.

Prema metodi *Chisolm-Brown* (8) pažljivo se pipetira 40 μ l krvi i prenese na dno epruvete u koju se odmah dodaju 2 ml smjese etilacetata i octene kiseline (3:1). Sadržaj epruvete se dobro promućka i epruveta centrifugira 2 min na 2 000 g. Ekstrahirani EP se prenese u posebnu epruvetu, ostatak ispere s 2 ml etilacetata i pomiješa s prvim supernatantom. Zatim se dodaju 2 ml 3N solne kiseline, dobro promućka i centrifugira 1 min na 2 000 g. Sloj organskog otapala na površini se odvoji s pomoću vodene sisaljke i u bistrom ostatku izmjeri fluorescencija. Za spektrofotometar tvrtke Perkin-Elmer, model 204 A, utvrđena je maksimalna fluorescencija kod 605 nm uz ekscitaciju svjetlom valne duljine 410 nm. Konačni rezultati analize EP u eritrocitima uz poznati hematokrit (Hct), koji je određen standardnim postupkom prema Wintrobeu, izraženi su u μ mol L⁻¹.

Kao standard primijenjen je cink-protoporfirin («Porphyrin Products») (ZPP) čiji je sadržaj u jednoj epruveti deklariran od proizvođača kao 10 μ g protoporfirina. Prisutni cink-protoporfirin se otopi u 0,1 ml posebnog otapala pod nazivom «Proto-solv» («Porphyrin Products»), te uz dodatak 10 ml 3M solne kiseline pretvori u slobodni protoporfirin, čija se koncentracija odredi spektrofotometrijski i izračuna iz dobivene apsorbancije i milimolarnog apsorpcijskog koeficijenta za protoporfirin ($E_{mM} = 241 \text{ mmol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$) (21). Iz te matične otopine pripravljena je serija standardnih uzoraka protoporfirina koncentracije 5—100 ng ml⁻¹ koji su obrađeni na isti način kao i krv, a iz dobivenih rezultata je izračunat regresijski pravac. Budući da je protoporfirin u otopini solne kiseline nestabilan i može se upotrijebiti samo isti dan kada je i pripremljen, za »dnevno« baždarenje instrumenata je upotrijebljen standard koproporfirina I od 5 mg («Sigma»), koji je mnogo stabilniji i manje osjetljiv na svjetlo od protoporfirina.

b) Spektrofotometrijsko određivanje EP

U spektrofotometrijskom određivanju EP mjeri se intenzitet maksimuma apsorpcije u užem području Soretove vrpce (395—415 nm) slobodnog protoporfirina u solno kiselom ekstraktu, nakon prethodne ekstrakcije protoporfirina iz krvi smjesom etilacetata i solne kiseline.

Prema *Rimingtonovoj* metodi (13), koju su modificirali *Cripps* i *Peters* (14), uzorku krvi od 2 do 10 ml očita se volumen i odredi hematokrit. Eritrociti se odvoje od plazme i obrađuju sa 50 ml smjese etilacetata i octene kiseline (4:1) i ostave stajati preko noći na 4° C. Sljedeći dan smjesa se filtrira i filtrat obradi zasićenom otopinom natrijeva acetata. Slijedi niz ekstrakcija s 3M solnom kiselinom dok zadnji ekstrakt više ne pokazuje crvenu fluorescenciju pod živinom lampom. Kiseli ekstrakt se neutralizira krutim natrijevim acetatom i ekstrahira najprije s eterom, a

zatim sa 1,5 M solnom kiselinom. Zabilježi se ukupni volumen ekstrahiranog protoporfirina i apsorbancija izmjeri na 380 nm, 430 nm i na maksimumu apsorpcije. Koncentracija EP u eritrocitima izračuna se prema korekcijskoj formuli (24), a izražava u $\mu\text{mol L}^{-1}$.

c) Određivanje ZPP na hematofluorometru

Kod određivanja ZPP na hematofluorometru iskorištava se svojstvo ZPP-globina da fluorescira za razliku od normalnog hemoglobina, koji ne fluorescira, pa se na posebno konstruiranom instrumentu s iluminacijom na »prednjoj površini« (»front surface« illumination) može direktno mjeriti fluorescencija ZPP u punoj krvi bez prethodne ekstrakcije.

Za analizu ZPP upotrijebljen je Aviv-hematofluorometar model ZPP-metar kalibriran u mmol ZPP po molu hemoglobina (mmol mol^{-1}) i primijenjena metoda *Fischbeina* i sur. (17). Kap krvi se stavi na posebno pokrovno staklo, uzorak oksigenira miješanjem krvi oko 1 min dok se na ekranu instrumenta ne pojavi ista vrijednost koncentracije ZPP za tri uzastopna mjerenja. Koncentracija ZPP se očitava direktno na ekranu, a instrument baždari s poznatim koncentracijama ZPP, koje su komercijalno pripremljene na posebnim pokrovnim staklima.

REZULTATI I DISKUSIJA

Sve tri opisane metode određivanja EP i ZPP analitički su provjerene.

Točnost spektrofluorometrijskog određivanja EP u eritrocitima prema metodi *Chisolm-Brown* (8) provjerena je s pomoću dodavanja poznatih

Tablica 1.

Provjera točnosti spektrofluorometrijske metode *Chisolm-Brown* (8) za određivanje EP u eritrocitima dodavanjem poznatih koncentracija EP u krv

Uzorak	EP $\mu\text{mol L}^{-1}$		% »recovery«
	dodan	analizom dobiven	
1	—	1,11	—
2	2,23	3,34	100,0
3	4,45	5,34	96,0
4	8,90	9,12	91,0
5	13,35	14,33	99,2
6	20,03	19,14	90,5

koncentracija EP u istu krv, u rasponu od 2,23 do 20,03 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (»recovery« test). Svi uzorci su bili analizirani tokom cijelog postupka. Rezultati prikazani na tablici 1. pokazuju da je metoda dovoljno točna za istraživačka i rutinska ispitivanja.

Preciznost metode je određena s 11 analiza istog uzorka na tri različita nivoa koncentracije EP. Izražena u obliku relativne standardne devijacije (CV) preciznost metode je bila 5,0% ($\bar{x} = 1,65 \mu\text{mol L}^{-1}$); 5,5 ($\bar{x} = 4,98 \mu\text{mol L}^{-1}$) i 3,1% ($\bar{x} = 12,10 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Posebno je ispitan mogući utjecaj upotrebe različitog antikoagulansa (K_3EDTA , heparin) na koncentraciju EP. Između krvi s K_3EDTA i krvi s heparinom, ali pod uvjetom da se analiza izvrši u istom danu kada je krv izvađena, prema koeficijentu korelacije ($r = 0,994$; $N = 13$) nema značajne razlike. Međutim, za krv koja se ne može obraditi u istom danu, što je česta pojava u praktičnom radu, treba primijeniti K_3EDTA , budući da se kod primjene heparina stajanjem u krvi stvaraju ugrušci.

Mogući utjecaj interferencije bilirubina kod spektrofotometrijskog određivanja EP metodom *Chisolm-Brown* (8) ispitan je *in vitro* u krvi zdravog čovjeka (Hct: $0,45 \text{ L}^{-1}$; Bil: $11,46 \mu\text{mol L}^{-1}$; EP: $1,32 \text{ L}^{-1}$) s dodavanjem poznatih koncentracija liofiliziranog standarda bilirubina («Boehringer») početne koncentracije $538,8 \mu\text{mol L}^{-1}$. Analitički uvjeti eksperimenta i dobiveni rezultati koncentracije EP skupa s paralelno određenom koncentracijom ZPP prikazani su na tablici 2. Kao što je vidljivi-

Tablica 2.

Koncentracija EP i ZPP nakon dodavanja različitih koncentracija bilirubina u krv čovjeka *in vitro*

Uzorak	Serum u uzorku (ml)	Bilirubin ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		EP ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	ZPP (mmol mol ⁻¹)
		dodan	ukupni		
1	1,11	0,00	11,46	1,32	0,13
2	1,06	0,05	35,23	1,30	0,18
3	1,01	0,10	59,00	1,36	0,23
4	0,91	0,20	106,36	1,30	0,39
5	0,71	0,40	201,44	1,34	0,61
6	0,41	0,70	343,88	1,34	0,84

vo iz dobivenih rezultata, prisutnost bilirubina ne interferira s određivanjem EP opisanom metodom, ali značajno interferira s određivanjem ZPP na hematofluorometru, kao što je već u literaturi i objavljeno (22, 23). To je još jedan razlog više da metoda *Chisolm-Brown* (8) bude metoda izbora za određivanje EP.

Provjera metode je izvršena i s pomoću interlaboratorijske kontrole određivanja koncentracije EP, koju organizira Centar za kontrolu bolesti (Center for Disease Control) u Atlanti (SAD). U do sada ukupno primlje-

na 24 uzorka krvi, između srednjih prihvaćenih vrijednosti iz 160 laboratorija u SAD i vrijednosti dobivenih radom dvojice autora ovog rada, dobivena je izvrsna podudarnost ($r = 0,989$).

Provjera točnosti spektrofotometrijske metode *Cripps-Peters* (14) analizirana je dodavanjem poznatih koncentracija standarda (Protophyrin IX-dimethyl ester »Sigma«) u istu krv (tablica 3). U rasponu koncentracija EP od 0,31 do 12,24 $\mu\text{mol L}^{-1}$ bilo je moguće dokazati 76,8 do 100,0% dodatnog protoporfirina.

Tablica 3.

Provjera točnosti spektrofotometrijske metode *Cripps-Peters* (14) za određivanje EP u eritrocitima dodavanjem poznatih koncentracija EP u krv

Uzorak	EP $\mu\text{mol L}^{-1}$		% »recovery«
	dodan	analizom dobiven	
1	—	0,45	—
2	0,31	0,76	100,0
3	0,61	0,94	88,7
4	1,22	1,40	83,8
5	3,06	2,98	84,9
6	6,12	5,73	87,2
7	12,24	9,75	76,8

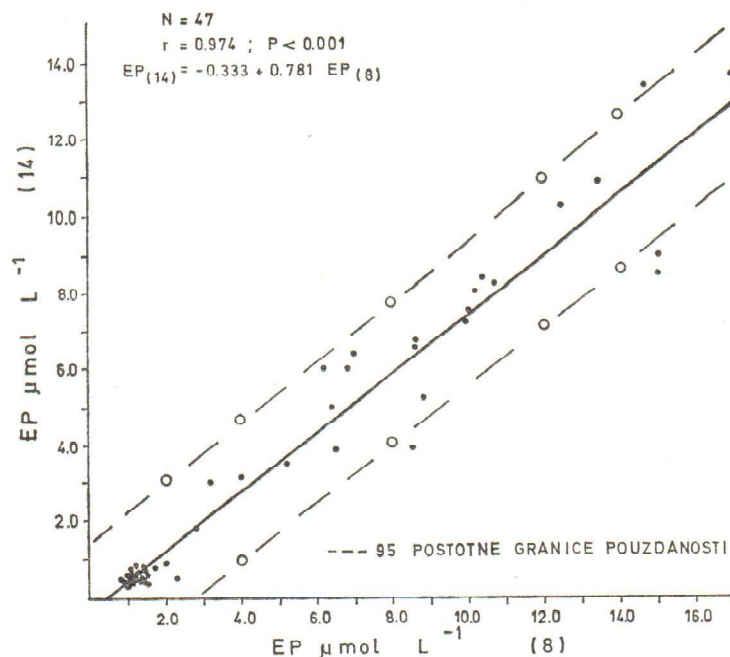
Ovom metodom su gubici tokom analize veći od onih pomoću spektrofotometrijske metode (tablica 1), naročito na višim vrijednostima, vjerovatno zbog višestruke ekstrakcije.

Preciznost metode provjerena je paralelnom analizom osam uzoraka iste krvi. Za dobivenu srednju vrijednost od 3,69 $\mu\text{mol L}^{-1}$ relativna standardna devijacija (CV) je iznosila 4%.

Preciznost direktnog određivanja ZPP na hematofluorometru (17) određena je s 10 analiza istog uzorka na tri različita nivoa koncentracije ZPP. Izražena u obliku relativne standardne devijacije (CV) preciznost metode je bila 5,0% ($\bar{x} = 0,41 \text{ mmol mol}^{-1}$); 1% ($\bar{X} = 0,92 \text{ mmol mol}^{-1}$) i 1% ($\bar{x} = 1,91 \text{ mmol mol}^{-1}$).

Međusobne usporedbe spektrofotometrijske (8) i spektrofotometrijske (14) metode za određivanje EP skupa s određivanjem ZPP na hematofluorometru (17) izvršene su s pomoću pravca regresije i analize korelacije; na slikama su označene 95%-tne granice pouzdanosti (25).

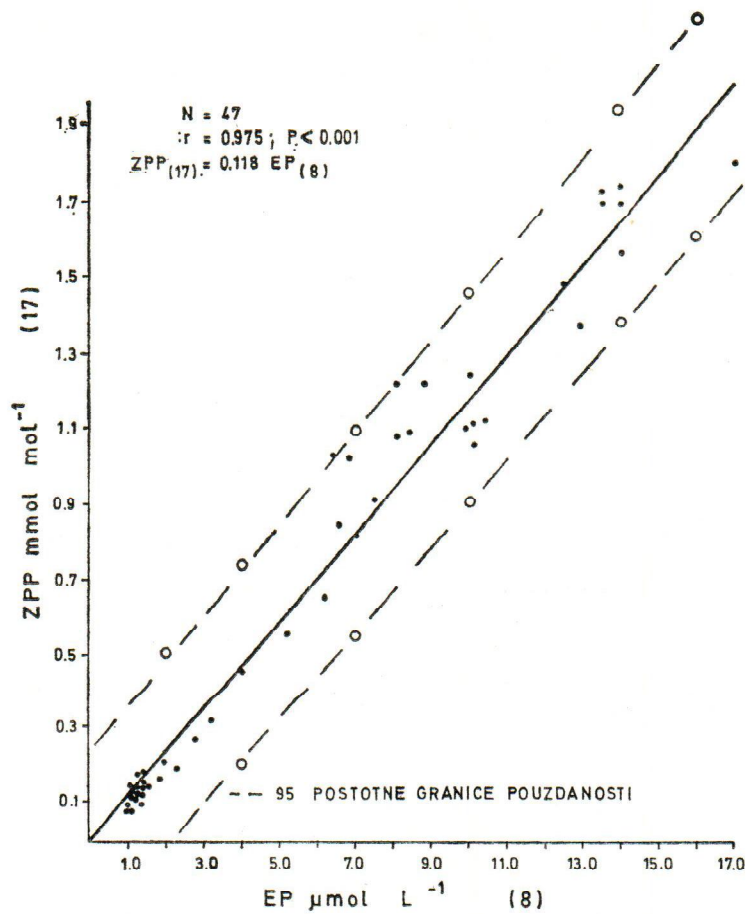
Odnos između koncentracije EP u eritrocitima određene spektrofotometrijskom (8) i spektrofotometrijskom (14) metodom prikazan je na sl. 1.



Sl. 1. Linearni odnos između koncentracije EP određene spektrofotometrijskom (8) i spektrofotometrijskom metodom (14)

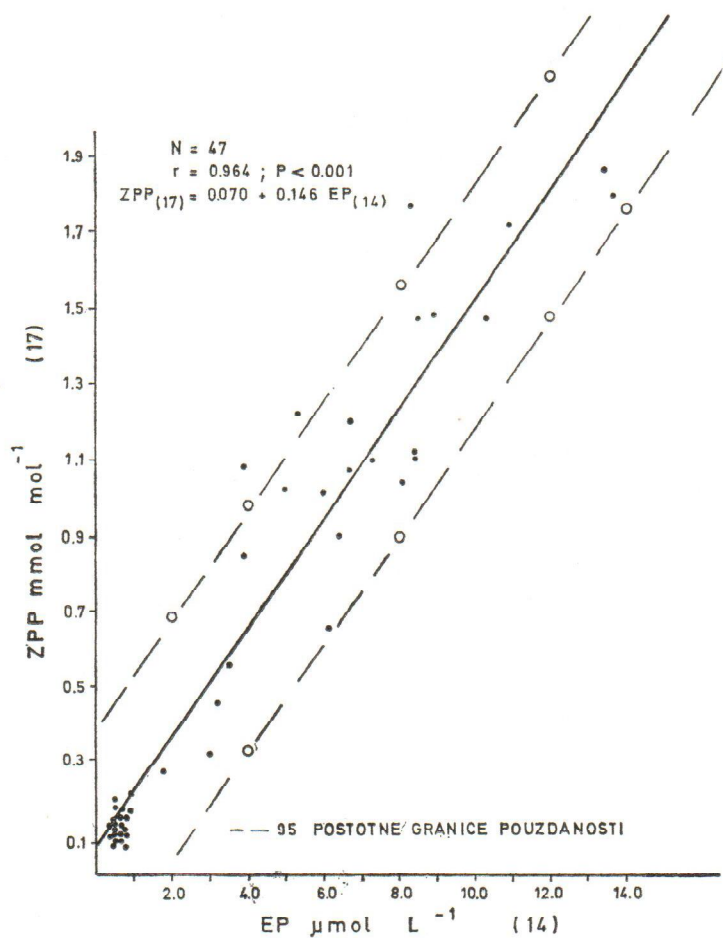
Dobivena je visoko značajna korelacija ($r = 0,974$, $P < 0,001$). Pravac regresije ima mali, ali značajan negativni odsječak na ordinati, što upućuje na veću osjetljivost spektrofotometrijske od spektrofotometrijske metode. Značajna odstupanja od regresijskog pravca za četiri ispitanika u korist viših vrijednosti EP određene spektrofotometrijskom metodom to također potvrđuju. Normalne vrijednosti EP određene spektrofotometrijskim metodama (7, 8, 15) su najmanje dva puta više od onih dobivenih spektrofotometrijskim metodama (11, 12, 14). U ovom radu za 20 zdravih ispitanika (15 muškaraca i 5 žena), bez poznate ekspozicije olovu, vrijednosti EP određene spektrofotometrijskom metodom *Chisolm-Brown* (8) bile su $1,19 \pm 0,176 \mu\text{mol L}^{-1}$, a metodom *Crippsa i Petersa* (14) $0,56 \pm 0,113 \mu\text{mol L}^{-1}$. Veća osjetljivost spektrofotometrijske od spektrofotometrijske metode vrlo je važan razlog za davanje prednosti spektrofotometrijskoj metodi.

Odnos između koncentracije EP u eritrocitima određene spektrofotometrijskom metodom *Chisolm-Brown* (8) i koncentracije ZPP izmjerene na hematofluorometru (17) prikazuje slika 2.



Sl. 2. Linearni odnos između koncentracije EP u eritrocitima spektrofotometrijskom metodom (8) i koncentracije ZPP izmjerene na hematofluorometru (17)

Dobivena korelacija je visoko značajna ($r = 0,975$, $P < 0,001$), a pravac regresije prolazi ishodištem. Uočava se vrlo dobra podudarnost do vrijednosti EP $6,2 \mu\text{mol L}^{-1}$. Međutim, kod viših vrijednosti rasap rezultata u odnosu na regresijski pravac značajno je veći, vjerojatno zbog interferencije drugih supstancija koje povećavaju očitavanje ZPP (23). Dobivena vrijednost korelacije ($r = 0,975$) je u saglasnosti s rezultatima drugih autora (17, 23, 26, 27).



Sl. 3. Linearni odnos između koncentracije EP u eritrocitima određene spektrofotometrijskom metodom Cripps-Peters (14) i koncentracije ZPP izmjerene na hematofluorometru (17)

Odnos između koncentracije EP u eritrocitima određene spektrofotometrijskom metodom Cripps-Peters (14) i koncentracije ZPP izmjerene na hematofluorometru (17) prikazuje slika 3. Korelacija je također visoko značajna ($r = 0,964$, $P < 0,001$), a koeficijent korelacije malo niži od koeficijenta dobivenog za spektrofotometrijsko određivanje EP i mjerenje ZPP na hematofluorometru. Odsječak na ordinati je značajan,

što ukazuje da je određivanje ZPP na hematofluorometru osjetljivije od određivanja EP spektrofotometrijskom metodom.

Ako se usporede regresijski pravci iz sl. 2. i 3, tada se najbolje može uočiti koliko je metoda *Chisolm-Brown* (8) osjetljivija od metode *Cripps-Peters* (14). Takvi su se rezultati mogli i očekivati budući da je iskorištenje («recovery») EP spektrofotometrijskom metodom puno bolje od spektrofotometrijske metode (tablice 1 i 3).

Metoda određivanja ZPP na hematofluorometru potpuno zadovoljava zahtjeve metode na razini probira. Ona je čak, kao što je u ovom radu dokazano, osjetljivija od kvantitativne spektrofotometrijske metode *Cripps-Peters* (14). Međutim, interferencija bilirubina (22, 23), a i karboksihemoglobina (23, 28) može u većoj i manjoj mjeri utjecati na rezultat, što uvjetuje obaveznu usporedbu rezultata s jednom od kvantitativnih metoda za EP.

Prema rezultatima ovog rada, spektrofotometrijska metoda *Chisolm-Brown* (8) je metoda izbora. Ona ima sve karakteristike koje se očekuju od metoda za analizu biološkog uzorka, jer je specifična, točna, osjetljiva i ponovljiva, relativno brza i lako izvediva, a ne zahtijeva komplicirane tehničke uređaje. Potrebna količina uzorka je malena (samo 40 μ l), što je posebna prednost kod analize EP u djece. Sve te, u ovom radu analitički provjerene osobine su baza za preporuke da se ta metoda u nas uvrsti u metodu izbora za određivanje EP u odraslih i djece. Osim u dijagnostici povećane apsorpcije olova, ona se može korisno primijeniti za utvrđivanje povećane koncentracije EP kod sideropenične anemije i u nekim genetskim bolestima poremećene sinteze porfirina.

ZAKLJUČAK

Na osnovi određivanja odnosa između spektrofotometrijske metode *Chisolm-Brown* (8) i spektrofotometrijske metode *Cripps-Peters* (14) za analizu EP, te određivanja odnosa obih metoda s direktnim očitavanjem ZPP na hematofluorometru ispitivanjem specifičnosti, točnosti i ponovljivosti svake metode posebno, može se zaključiti da je metoda *Chisolm-Brown* metoda izbora. Ta metoda ima sve osobine da bude preporučena kao metoda izbora za određivanje EP u odraslih i djece kod povećane apsorpcije olova, sideropenične anemije, i u nekim genetskim bolestima poremećene sinteze porfirina. Spektrofotometrijska metoda *Cripps-Peters* koja je manje osjetljiva i metoda određivanja ZPP s pomoću hematofluorometra, koja je nedovoljno specifična u prisutnosti većih koncentracija bilirubina i karboksihemoglobina, mogu se također upotrebljavati, ali uz obaveznu provjeru s preporučenom spektrofotometrijskom metodom.

Literatura

1. Sassa, S., Granick, J. L., Granick, S., Kappas, A., Levere, R. D.: *Biochem. Med.*, 8 (1973) 135.
2. Zielhuis, R. L.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 39 (1977) 59.
3. Alessio, L., Bertazzi, P. A., Toffoletto, F., Foà, V.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 37 (1976) 73.
4. Alessio, L., Castoldi, M. R., Buratti, M., Maroni M., Bertazzi, P. A.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 40 (1977) 283.
5. Tomokuni, K., Osaka, I., Ogata, M.: *Arch. Environ. Health*, 30 (1975) 588.
6. Kamholz, L. P., Thatcher, L. G., Blodgett, F. M., Good, T. A.: *Pediatrics*, 50 (1972) 625.
7. Piomelli, S.: *J. Lab. Clin. Med.*, 81 (1973) 932.
8. Chisolm, J. J. Jr, Brown, D. H.: *Clin. Chem.*, 21 (1975) 1669.
9. A Statement by the Center for Disease Control: U. S. Dehew, PHS, Center for Disease Control, Bureau of State Services, Environmental Health Services Division, Atlanta, 1978.
10. Bergh, A. A. H. van den, Grotepass, W.: *Klin. Wochensch.*, 12 (1933) 586.
11. Schwartz, S., Berg, M. H., Bossenmaier, I., Dinsmore, H.: U: Glick, D. (ed), *Methods of Biochemical Analysis*, vol. 8 Interscience, New York, 1960, str. 221.
12. Wranne, L.: *Acta. Pediatr. (Suppl 124)* 49 (1960) 1.
13. Rimington, C.: *Lancet*, 2 (1963) 318.
14. Cripps, D. J., Peters, H. A.: *Arch. Dermatol.*, 96 (1967) 712.
15. Granick, S., Sassa, S., Granick, J. L., Levere, R. D., Kappas, A.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 69 (1972) 2381.
16. Lamola, A. A., Yamane, T.: *Science*, 186 (1974) 936.
17. Fischbein, A., Eisinger, J., Blumberg, W. E.: *Mt. Sinai J. Med.*, 2 (1976) 294.
18. Lilis, R., Fischbein, A., Eisinger, J., Blumberg, W. E., Diamond, S., Anderson, H. A., Rom, W., Rice, C., Sarkozi, L., Kon, S., Selikoff, I. J.: *Environ. Res.*, 14 (1977) 255.
19. Joselow, M. M., Flores, J.: *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 38 (1977) 63.
20. Grandjean, P., Lintrup, J.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 38 (1978) 669.
21. Committee on Specification and Criteria for Biochemical Compounds: National Academy of Sciences, 1972., str. 198.
22. Buhrmann, E., Mentzer, W. C., Lubin, B. H.: *J. Lab. Clin. Med.*, 91 (1978) 710.
23. Karačić, V., Prpić-Majić, D., Telišman, S.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 47 (1980) 165.
24. Rimington, C.: *Assoc. Clin. Path., Broad Sheet No. 36*, 1961.
25. Cooper, B. E.: *Statistics for Experimentalist*, Pergamon Press., Oxford, London, 1969., str. 217.
26. Blumberg, W. E., Eisinger, J., Lamola, A. A., Zuckerman, D. M.: *J. Lab. Clin. Med.*, 89 (1977) 712.
27. Alessio, L., Castoldi, M. R., Buratti, M., Calzaferrri, G., Odone, P., Ivana, C.: *Med. Lav.*, 69 (1978) 563.
28. Telišman, S., Karačić, V., Meczner, J., Prpić-Majić, D.: *Proceedings of the Second International Congress on Toxicology*, Brussels., 1980. Ur. B. Holmstedt, R. Lauwerys, M. Mercier, M. Roberfroid, Elsevier, North Holland Biochemical Press, Amsterdam, 1980., str. 591.

Summary

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE METHODS FOR THE DETERMINATION OF ERYTHROCYTE PROTOPORPHYRINS (EP) AND ZINC PROTOPORPHYRINS (ZPP)

In order to find the most convenient method for erythrocyte protoporphyrin (EP) determination, a very important biochemical parameter in the evaluation of increased lead absorption, the relationship between the Chisolm-Brown spectrofluorometric method and the Cripps-Peters spectrophotometric method for EP determination, as well as the relationship between the two methods and direct zinc-protoporphyrin (ZPP) determination by means of a haematofluorometer were examined. A very significant connection between all the three examined methods was established by means of the correlation coefficient. From the regression line the sensitivity of the Chisolm-Brown spectrofluorometric method was found to be higher than of the Cripps-Peters method for EP. The method of direct ZPP determination also proved to be more sensitive than the Cripps-Peters spectrophotometric method. The Chisolm-Brown spectrofluorometric method was shown to be specific, accurate, sensitive and reproducible. In addition, it is relatively quick and easy to apply, does not need a large quantity of biological samples and complicated technical instruments. Because of these characteristics it is recommended as a method of choice for EP determination in adults and children for examination of increased lead absorption, sideropenic anaemia and in some genetic diseases of disturbed porphyrin synthesis.

Institute for Medical Research and Occupational Health, Zagreb

*Received for publication
October 9, 1981*