P- ISSN 1991-8941 E-ISSN 2706-6703 مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة (JUAPS) Open Access
2017,11 (1) :30-42

تقييم كفاءة بعض الطرائق المستعملة في تقدير يوريا مصل الدم

محمد دحام حميدي رفاه رزوق حميد

جامعة سامراء – كلية التربية

معلومات البحث:

تاريخ التسليم: 2017/02/14
تاريخ القبول: 2017/6/18
تاريخ النشر: 00 / 04 / 2017
DOI: 10.37652/juaps.2017.141450

الكلمات المفتاحية:

اليوريا،
طريقة المونوكسيم،
الدقة،
التوافقية،
معامل الاختلاف.

الخلاصة:

تم اجراء الدراسة الحالية للتعرف على توافقية ودقة وكفاءة الطرائق المستعملة لقياس يوريا الدم، أذ استعمل اربعة طرائق : احداها لونية (طريقة المونوكسيم) وثلاث طرائق انزيمية مجهزة من شركات (Biomaghreb, Biosystem, Randox) بشكل عدد جاهزة. حيث تم اجراء مقارنة بين هذه الطرائق من خلال قياس نسبة الاسترجاع والانحراف القياسي النسبي ونسبة الخطأ ومعامل الاختلاف للطرائق قيد الدراسة. اظهرت النتائج ان اكثر دقة وتوافقية وكفاءة كانت عند التركيز الاصلي 50 ملغم/100سم^3 للطرائق المونوكسيم وللعدد الجاهزة المجهزة من شركات Biomaghreb, Biosystem , وكانت اكثر دقة وتوافق ودقة للتركيز الاصلي 40 ملغم/100سم^3 لطريقة العدد الجاهزة المجهزة من شركت Randox باستعمال محاليل اليوريا القياسية. عدم وجود فروقات معنوية لمستوى اليوريا باستعمال محلول السيطرة باستعمال الطرائق الاربعة، في حين كانت للطريقة الرابعة اعلى دقة اذ بلغت نسبة الخطأ 2.106% في حين كانت اعلى توافقية للطريقة الثانية اذ بلغ نسبة الانحراف القياسي النسبي 0.001 %.عدم وجود فروقات معنوية لمستوى اليوريا في مصل الدم باستعمال الطرائق الاربعة في حين سجلت الطريقة الرابعة كفاءة عالية اذ بلغ معامل اختلاف لها 15.09%ئ

المقدمة:

استعملت الطرائق الطيفية في تقدير كثير من المواد مثل العقاقير والمركبات ذات الاهمية الطبية والتشخيصية وغيرها من المواد والتي من الممكن ان تكون دالة للتلوث البيئي او مؤشرا لتلوث الاغذية...الخ، وتعتمد هذه الطرائق على الخاصية اللونية لهذه المركبات مثل مراقبة سرعة اختفاء المادة الاساس Substrate الملونة بتأثير فعل الانزيم Action of enzyme، او قابلة بعض المركبات على تكوين مشتقات ملونة، اذ انه من الممكن قياس تركيز اي مادة ملونة او مادة تنتج مشتقا ملونا وذلك بمقارنة اللون المقاس لمحلولها بألوان محاليل قياسية ذات تراكيز معلومة مختلفة ولنفس المادة عن طريق قياس الامتصاصية Absorbance بواسطة جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer (1،2).

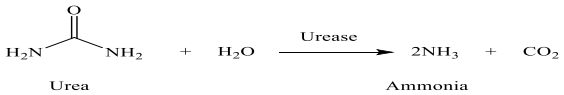
ونظرا لتباين الطرائق المستعملة لقياس اي مادة وخاصة المواد ذات الدلائل السريرية، وظهور طرائق تحليل جاهزة مجهزة من شركات مختلفة قد تختلف في كفاءتها ودقتها في التحليل وجد من المهم التعرف على النوعية التحليلية Analytical specify للطريقة فهي عبارة عن قابلية هذه الطريقة للانفراد في تعيين المادة او المواد التي خصصت الطريقة لتعيينها وعدم السماح للمواد الأخرى في التداخل في التفاعل الأساسي، وبعبارة أخرى فان النوعية التحليلية للطريقة المستخدمة لتعيين مادة ما هي امكانية تعيين هذه المادة لوحدها فقط دون تأثير ملحوظ بوجود مادة اخرى في مادة الفحص مثلا مصل الدم في مزيج التفاعل وخاصة المواد القريبة منها من حيث البنية الكيميائية المحددة للمادة المراد فحصها وتقديرها وهكذا فان النوعية تعد عالية اذا كان بالإمكان مثلا قياس الكلوكوز في مصل الدم لوحده رغم وجود سكريات الدهايدية او كيتونية سداسية ذرات الكربون مثل الكلاكتوز والمانوز والفركتوز (3,4).

واليوريا هي عبارة عن جزيئة صغيرة كثيرة الذوبان في الماء وهي ناتج نهائي لأيض الحوامض الامينية، صيغتها الجزيئية

* Corresponding author at: College ducation university of Samarra
E-mail address:

(NH2)2CO(5)، تتكون اليوريا داخل الجسم من الامونيا الناتجة عن الاحماض الامينية Amino acids، وهي من المركبات النيتروجينية غير البروتينية في الجسم Non Protein Nitrogen (NPN) والتي تضم اضافة الى اليوريا كلاً من الكرياتين Creatine والكرياتينين Creatinine وحامض اليوريك Uric acid والامونيا Ammonia والحوامض الامينية (7،6،5).

وتعتمد الطرائق الانزيمية اللونية على انزيم اليوريز لتحليل يوريا مصل الدم كما في المعادلة التالية:



وقد شاع استخدام الانزيم في جميع طرائق تقدير اليوريا الانزيمية في العدد الجاهزة باختلاف الشركات واختلاف الكواشف المستخدمة، واليوريز Urea amido hydrolase(EC 3.5.1.5) هو من الانزيمات التي تحتوي على النيكل الذي يحفز التحلل المائي لليوريا الى امونيا ومركب الكربواميت Carbamate، ثم يتحلل الكربواميت بدرجة حرارة 37o م واس هيدروجيني (6.9 – 6.4) ويستعمل هذا الانزيم في قياس تركيز اليوريا في الدم والبول(10-8).

ونظرا لاهمية تقدير يوريا مصل الدم في التطبيقات السريرية، توجه اهتمام الباحثين الى ايجد طرائق لونية متباينة لتقدير اليوريا، تتباين هذه الطرائق في دقتها وكلفتها وخاصة الانزيمية منها، وقد تبنت بعض الشركات الخاصة بتصنيع العدد الجاهزة الـ Kits هذه الطرائق وطرحت الى الاسواق عدد جاهزة متباينة في اسعارها ودقتها. لذا كان الهدف من دراستنا الحالية تقييم بعض الطرائق المستخدمة في تقدير اليوريا والمستخدمة في مختبرات قضاء سامراء.

المواد وطرائق العمل:

-المواد المستعملة: تم استعمال المواد المبينة في الجدول(1)

ت	اسم المادة	الشركة المصنعة والمنشأ
1	يوريا	Fluka,Switzerland
2	كبريتات الصوديوم اللامائية	Sigma,USA
3	كبريتات الزنك	Sigma,USA
4	ثنائي اسيتل مونوكسم	Fluka, Switzerland
5	حامض النتريك	BDH,UK
6	حامض الخليك	BDH,UK
7	حامض الفسفوريك	BDH,UK

العدد الجاهزة:

تم استعمال ثلاث من العدد الجاهزة والمجزة من شركات Randox- England ،Biosystem ،Biomaghreb –Tunes لتحليل اليوريا، جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer لقياس الامتصاصية.

-**عينات مصل الدم:** تم جمع (15) عينة دم لأشخاص اصحاء (متطوعين) تتراوح اعمارهم (22-30) سنة، تم جمعها من طلبة جامعة سامراء وذلك عن طريق سحب 8سم^3 من الدم الوريدي بواسطة محقنة طبية تستعمل لمرة واحدة، ووضعت في انابيب بلاستيكية Plain tube ذات غطاء محكم وخالي من المادة المضادة للتخثر، ثم تم وضعها في جهاز الطرد المركزي لمدة (10) دقائق وبسرعة 300 دوره/ دقيقة. تم سحب المصل بواسطة ماصة دقيقة Micro pipette ووضعت في انابيب نظيفة ومعقمة وحفظت مجمدة لحين القيام بأجراء فحص اليوريا.

-طرائق العمل:

تم استعمال ثلاث عدد جاهزة مجهزة من الشركات Biomaghreb, Biosystem, Randox وتم الاعتماد على طريقة العمل المرفقة مع العدد الجاهزة مع استعمال طريقة المونوكسيم كطريقة لونية غير انزيمية[5].

- **تحضير محاليل اليوريا القياسية:**تم تحضير التراكيز القياسية التالية (10،20،30،40،50) ملغم/100سم^3 لليوريا وذلك بوزن (10،20،30،40،50) ملغم من اليوريا واذابتها في 50سم^3 من الماء المقطر ثم اكمال الحجم الى حد العلامة بالماء المقطر في قنينة حجمية سعة 100 مل.

-**محلول السيطرة:**تم استعمال محلول السيطرة لغرض تقييم الطرائق المستخدمة والمجهز من قبل وزارة الصحة الى مختبرات المستشفيات لغرض تقييمها والحاوي على تركيز 50 ملغم/100سم^3 من اليوريا اضافة الى عدد من المكونات الحياتية الاخرى.

تم استعمال عدد من الطرائق المستعملة في قياس تركيز اليوريا، وذلك لقياس التراكيز القياسية لليوريا المحضرة وذلك لاحتساب دقة الطرائق المستعملة كما تم قياس تركيز اليوريا في محلول السيطرة، إضافة الى تركيز اليوريا في عينات مصل الدم وقد تم استعمال الطرائق التالية:-

- الطريقة الأولى: الطريقة اللونية (طرقة المونوكسيم).
- الطريقة الثانية: الطريقة الانزيمية اللونية لعدة الفحص الجاهزة المجهزة من شركة Biomaghreb.

- الطريقة الثالثة: الطريقة الانزيمية اللونية لعدة الفحص الجاهزة المجهزة من شركة Biosystem.
- الطريقة الرابعة: الطريقة الانزيمية اللونية لعدة الفحص الجاهزة المجهزة من شركة Randox.

-**التحليل الاحصائي:** تم تحليل النتائج احصائيا باستعمال برنامج الاكسل Excel وبرنامج Minitab ووفق تحليل التباين باتجاه واحد One way analysis of variance واختبرت المتوسطات الحسابية للمعاملات باستعمال اختبار دانكن Duncun لتحديد الاختلافات المعنوية Significant differences الخاصة بين المجاميع [11].

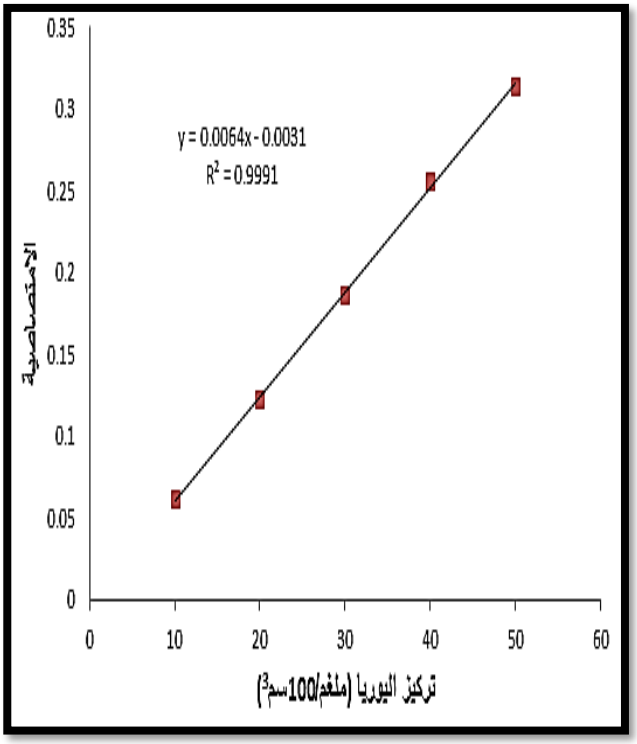
النتائج والمناقشة:

- **تقييم كفاءة طرائق تقدير اليوريا:**تم تقييم دقة وتوافقية وكفاءة العدد الجاهزة المستعملة والمجهزة من الشركات (Biomaghreb، Biosystems، Randox) مع الطريقة اللونية باستعمال طريقة المونوكسيم وذلك بتفاعلها مع المحاليل القياسية لليوريا.
- **توافقية ودقة وكفاءة الطريقة اللونية الأولى:**تم الحصول على المنحنى القياسي لتراكيز اليوريا المختلفة (10،20،30،40،50) ملغم/100 سم^3 وذلك بتفاعل محلول اليوريا القياسي مع المركب ثنائي اسيتل مونوكسيم في وسط حامضي قوي ليكون محلول ملون Coloring agent، تقاس شدة اللون له عند طول موجي 480 نانوميتر، ويوضح الجدول (2) معدل قيم معدل الإمتصاصية لتراكيز اليوريا المستعملة كمحاليل قياسية.

تم الحصول على منحني المعايرة من رسم العلاقة بين معدل الإمتصاصية والتركيز، وكما في الشكل (1)، وكان معامل الإرتباط للمنحني القياسي R^2= 0.9991 وكانت معادلة الخط المستقيم y=0.0064x−0.0031

جدول (2) : معدل الإمتصاصية للمعقد المتكون بإستعمال الطريقة الاولى.

ت	تركيز اليوريا (ملغم/100سم^3)	معدل الإمتصاصية
1	10	0.0624
2	20	0.122
3	30	0.1862
4	40	0.2562
5	50	0.314



شكل (1) : العلاقة ما بين معدل الإمتصاصية للمعقد المتكون وتركيز اليوريا للطريقة اللونية الأولى.

تم حساب توافقية الطريقة اللونية الاولى من خلال استعمال تراكيز مختلفة من اليوريا وذلك بحساب الإنحراف القياسي النسبي Relative standard deviation – RSD% لخمس تراكيز مختلفة من اليوريا وبواقع خمس مكررات، وقد وجد إن الإنحراف القياسي النسبي كان 0.878% لتركيز 10ملغم/100سم^3 من اليوريا، و0.580% لتركيز 20 ملغم/100سم^3 و0.588% لتركيز 30ملغم/سم^3 و0.445% لتركيز 40ملغم/100سم^3 أما التركيز 50 ملغم/100سم^3 فقد كان 0.390%.

أما نسبة الإسترداد المئوي Recovery% فقد كانت (102.344، 97.734، 98.593، 101.367، 99.093)% للتراكيز (10، 20، 30، 40، 50) ملغم/100سم^3، أما نسبة الخطأ Err% فقد كانت (2.344، −2.266، −1.406، 1.367، −0.906)% على الترتيب، وايضاً تم حساب معامل الإختلاف Coefficient of variance – CV حيث كان 8.592% للتركيز 10 ملغم/100سم^3 و2.960% للتركيز 20 ملغم/100سم^3 و1.985% للتركيز 30 ملغم/100سم^3 و1.096% للتركيز 40ملغم/100سم^3، أما عند التركيز 50 فقد كان 0.786%، وكما موضح في الجدول (3).

P- ISSN 1991-8941 E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2017,11 (1) :30-42

جدول (3) : التوافقية والدقة وكفاءة الطريقة الاولى لتقدير اليوريا.

ت	التركيز الأصلي (ملغم/100سم3)	التركيزالمتحصل عليه (ملغم/100سم3)	الامتصاصية	الانحراف القياسي النسبي %	الاسترداد المئوي%	نسبة الخطأ%	معامل الاختلاف %
1	10	10.219	0.062	0.878	102.344	2.344	8.592
2	20	19.594	0.122	0.580	97.734	-2.266	2.960
3	30	29.625	0.1862	0.588	98.593	-1.406	1.985
4	40	40.593	0.2564	0.445	101.367	1.367	1.096
5	50	49.594	0.314	0.390	99.093	-0.906	0.786

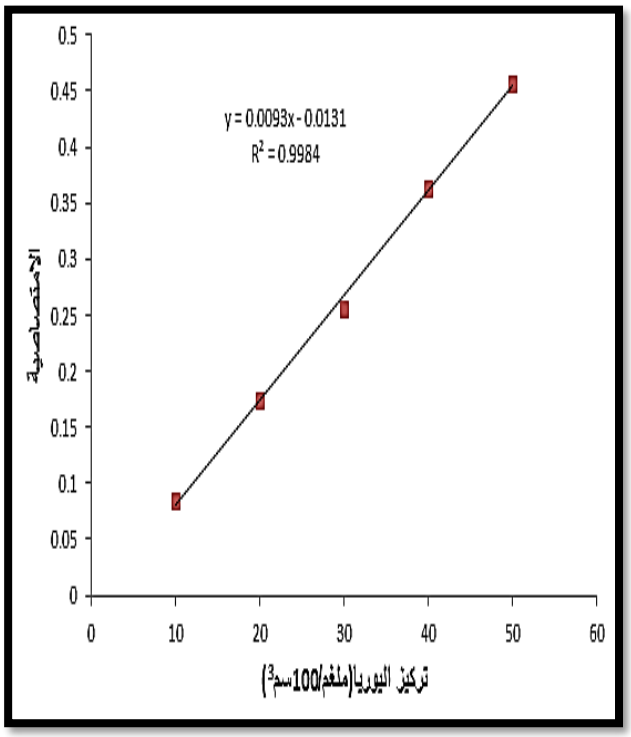
يتضح من النتائج أعلاه أن أقل قيمة للإنحراف القياسي النسبي كانت عند التركيز 50 ملغم/100سم^3 وهي القيمة الاعلى من المدى الطبيعي لليوريا في الدم، والذي ينتج عن خلل في وظائف الكلية[5]، في حين كانت أعلى قيمة للإنحراف القياسي النسبي عند التركيز 10 ملغم/100سم^3 وهذا يدل إن التوافقية للطريقة كان أعلى عند التراكيز العالية من اليوريا.

كما إن أقل نسبة للخطأ المطلق كانت عند التركيز 50 ملغم/100سم^3، أي إن أعلى دقة كانت عند هذا التركيز، ايضا تم حساب معامل الإختلاف لتراكيز اليوريا قيد الدراسة وقد أظهرت النتائج ان التركيز 50ملغم/100سم^3 يمتلك اقل قيمة لمعامل الإختلاف وبالتالي فان كفاءة الطريقة تعتبر عالية عند هذا التركيز،، ويمكن زيادة شدة التفاعل بوجود ايونات الحديديك Fe^{+3} وكذلك بوجود المركب ثايوسيميكاربازايد حيث ينتج من التفاعل مركب معقد التركيب وذئب ذو لون احمر له علاقة طردية بين شدة اللون الأحمر وتركيز اليوريا[5].

– **توافقية ودقة وكفاءة الطريقة اللونية الثانية:** تم الحصول على المنحنى القياسي لتراكيز اليوريا المختلفة (10،20،30،40،50) ملغم/سم^3 وذلك بتفاعل محلول اليوريا القياسي مع الفوسفات المنظم، وسالسيلات الصوديوم، وEDTA، ونايتروبروسيد الصوديوم، واليوريز ليكون محلول ملون Coloring agent وتقاس شدة اللون الناتج عند طول موجي 590 نانومتر، ويوضح الجدول (4) معدل قيم الامتصاصية لتراكيز اليوريا المستعملة كمحاليل قياسية. تم الحصول على منحني المعايرة من رسم العلاقة بين معدل الامتصاصية والتركيز وكما في الشكل (2)، وكان معامل الارتباط للمنحني القياسي R^2= 0.9984 4 وكانت معادلة الخط المستقيم y= 0.0093x−0.0131.

جدول (4) : معدل الإمتصاصية للمعقد المتكون بطريقة اللونية الثانية.

ت	تركيز اليوريا (ملغم/100سم^3)	معدل الامتصاصية
1	10	0.0843
2	20	0.1754
3	30	0.2573
4	40	0.3114
5	50	0.3856



شكل (2): العلاقة ما بين معدل الإمتصاصية للمعقد المتكون وتركيز اليوريا للطريقة اللونية الثانية.

تم حساب توافقية الطريقة الثانية من خلال استعمال تراكيز مختلفة من اليوريا وذلك بحساب الانحراف القياسي النسبي Relative standard deviation RSD% لخمسة تراكيز من اليوريا وبواقع خمس مكررات، وقد وجد ان الانحراف القياسي النسبي كان 0.183 %

لتركيز 10 ملغم/100سم^3 من اليوريا، و0.098 % لتركيز 20 ملغم/100سم^3 و0.075 % لتركيز 30 ملغم/100سم^3 و0.084% لتركيز 40 ملغم/100سم^3 اما التركيز 50 ملغم/100سم^3 فقد كان 0.067 %.

اما نسبة الاسترداد المئوي Recovery فقد كانت (104.624، 96.667،101.021، 100.941، 101.183)% للتراكيز (10، 20، 30، 40، 50) ملغم/100سم^3، اما نسبة الخطأ فقد كانت (4.624، 1.021، 3.334−، 0.941، 1.183) على الترتيب، كما تم حساب معامل الاختلاف Coefficient of variance – CV حيث كان 1.75% للتركيز 10 ملغم/100سم^3 و 0.49% للتركيز 20 ملغم/100سم^3 و 0.26% للتركيز 30 ملغم/100سم^3 و 0.21% للتركيز 40 ملغم/100سم^3، اما عند التركيز 50 فقد كان 0.13% وكما موضحة في الجدول (5).

جدول (5) : التوافقية والدقة وكفاءة الطريقة الثانية لتقدير اليوريا.

ت	التركيز الأصلي (ملغم/100سم3)	التركيز المتحصل عليه (ملغم/100سم3)	الامتصاصية	الانحراف القياسي النسبي %	الاسترداد المئوي%	نسبة الخطأ%	معامل الاختلاف %
1	10	10.462	0.0843	0.183	104.624	4.624	1.75
2	20	20.204	0.1754	0.098	101.021	1.021	0.49
3	30	29	0.2573	0.075	96.667	−3.334	0.26
4	40	40.376	0.3114	0.084	100.941	0.941	0.21
5	50	50.591	0.3856	0.067	101.183	1.183	0.13

يتضح من النتائج اعلاه ان اقل قيمة للانحراف القياسي النسبي كانت عند التركيز 50 ملغم/100سم^3، في حين كانت اعلى قيمة عند التركيز 10 ملغم/100سم^3 وهذا يدل ان التوافقية للطريقة كانت اعلى عند التراكيز العالية من اليوريا.كما ان اقل نسبة للخطأ المطلق كانت عند التركيز 40 ملغم/100سم^3، اي ان اعلى دقة كانت عند هذا التركيز.كما قد تم حساب معامل الاختلاف لتراكيز اليوريا قيد الدراسة وقد اظهرت النتائج ان التركيز 50 ملغم/100سم^3 يمتلك اقل معامل اختلاف وبالتالي فأن كفاءة الطريقة تعتبر عالية عند هذا التركيز.

وهذا يتفق مع ما جاء به Bretaudiere[12] حيث وجد ان كلما زاد تركيز المادة الاساس Substrate زادت الحساسية للطريقة الانزيمية وازدادت قيمة نسبة الاسترداد المئوي وكلما قل تركيز المادة الاساس كلما قلت الحساسية للطريقة وقلت قيمة نسبة الاسترداد المئوي.

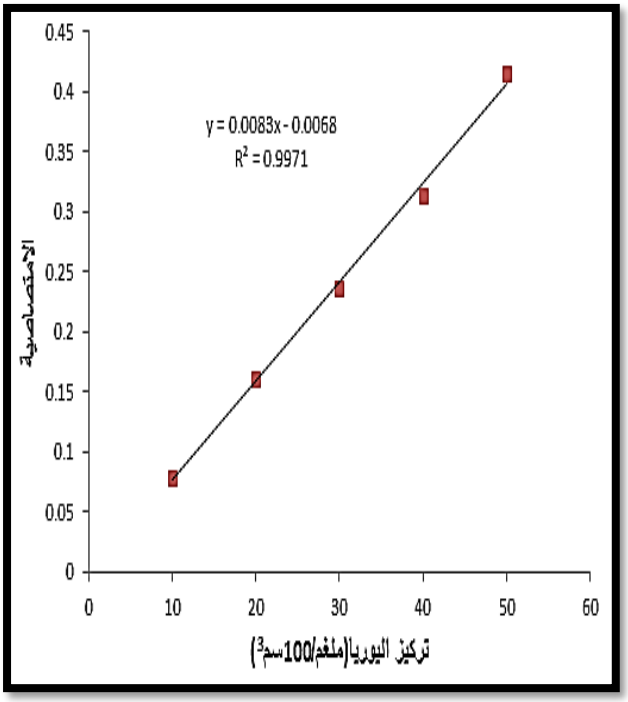
– **توافقية ودقة وكفاءة الطريقة اللونية الثالثة:** تم الحصول على المنحنى القياسي لتراكيز اليوريا المختلفة (10،20،30،40،50) ملغم/سم^3 وذلك بتفاعل محلول اليوريا القياسي مع محلول سالسيلات الصوديوم، نتروبروسيد الصوديوم، بفر فوسفات ليكون محلول ملون Coloring agent وتقاس شدة اللون الناتج عند طول موجي 600 نانومتر، ويوضح الجدول (6) معدل قيم معدل الإمتصاصية لتراكيز اليوريا المستعملة كمحاليل قياسية.

تم الحصول على منحني المعايرة من رسم العلاقة بين معدل الإمتصاصية والتركيز وكما في الشكل (3)، وكان معامل الارتباط للمنحني القياسي R^2= 0.9971 وكانت معادلة الخط المستقيم y= 0.0083x−0.0068.

جدول (6) : معدل الإمتصاصية للمعقد المتكون بطريقة اللونية الثالثة.

ت	تركيز اليوريا (ملغم/100سم^3)	معدل الإمتصاصية
1	10	0.078
2	20	0.1614
3	30	0.2378
4	40	0.314
5	50	0.4148

P- ISSN 1991-8941 E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2017,11 (1) :30-42



الشكل(3): العلاقة ما بين معدل الإمتصاصية للمعقد المتكون وتركيز اليوريا للطريقة اللونية الثالثة.

تم حساب توافقية الطريقة الثانية من خلال إستعمال تراكيز مختلفة من اليوريا وذلك بحساب الإنحراف القياسي النسبي Relative standard deviation RSD% لخمسة تراكيز من اليوريا وبواقع خمس مكررات، وقد وجد إن الإنحراف القياسي النسبي كان 0.066 % لتركيز 10 ملغم/100سم^3 من اليوريا، و0.706 % لتركيز20 ملغم/100سم^3 و 0.063% لتركيز 30 ملغم/100سم^3 و 0.028% لتركيز 40 ملغم/100سم^3 اما التركيز 50 ملغم/100سم^3 فقد كان 0.396 %.

أما نسبة الإسترداد المئوي Recovery% فقد كانت (102.451، 101.590، 97.675، 96.707، 101.325)% للتراكيز (10، 20، 30، 40، 50) ملغم/100سم^3، أما نسبة الخطأ فقد كانت (2.451، 1.590، 2.325-، 3.293-، 1.325) على الترتيب، كما تم حساب معامل الإختلاف Coefficient of variance – CV حيث كان 0.644% للتركيز 10 ملغم/100سم^3 و3.484% للتركيز 20 ملغم/100سم^3 و0.215% للتركيز 30 ملغم/100سم^3 و0.072% للتركيز 40 ملغم/100سم^3، اما عند التركيز 50 فقد كان 0.779%، وكما موضحة في الجدول(7).

جدول (7) : التوافقية والدقة وكفاءة الطريقة الثالثة لتقدير اليوريا.

ت	التركيز الأصلي (ملغم/100سم3)	التركيز المتحصل عليه (ملغم/100سم3)	الامتصاصية	الانحراف القياسي النسبي %	الاسترداد المئوي%	نسبة الخطأ%	معامل الاختلاف %
1	10	10.245	0.078	0.066	102.451	2.451	0.644
2	20	20. 795	0.1614	0.706	101.590	1.590	3.484
3	30	29.302	0.2378	0.063	97.675	-2.325	0.215
4	40	38.683	0.314	0.028	96.707	-3.293	0.072
5	50	50.265	0.4148	0.396	101.235	1.325	0.779

يتضح من النتائج أعلاه ان أقل قيمة للإنحراف القياسي النسبي كانت عند التركيز 40 ملغم/100سم^3، وهي القيمة القريبة من الحد الأعلى للمدى الطبيعي لليوريا في الدم تقريبا Higher normal limit for serum urea في بعض المصادر[4]، في حين كانت أعلى قيمة عند التركيز 10ملغم/100سم^3 وهذا يدل ان التوافقية للطريقة كانت أعلى عند التراكيز العالية من اليوريا.كما إن أقل نسبة للخطأ المطلق كانت عند التركيز 50 ملغم/100سم^3، وكان نسبة الإسترداد المئوي 101.325 إي إن أعلى دقة كانت عند هذا التركيز. كما قد تم حساب معامل الإختلاف لتراكيز اليوريا قيد الدراسة وقد أظهرت النتائج ان التركيز 40ملغم/100سم^3 يمتلك أقل معامل إختلاف وبالتالي فأن كفاءة الطريقة تعتبر عالية عند هذا التركيز.

وهذا يتفق مع ما جاء به Bretaudiere[12] حيث وجد ان كلما زاد تركيز المادة الاساس Substrate زادة الحساسية للطريقة الإنزيمية

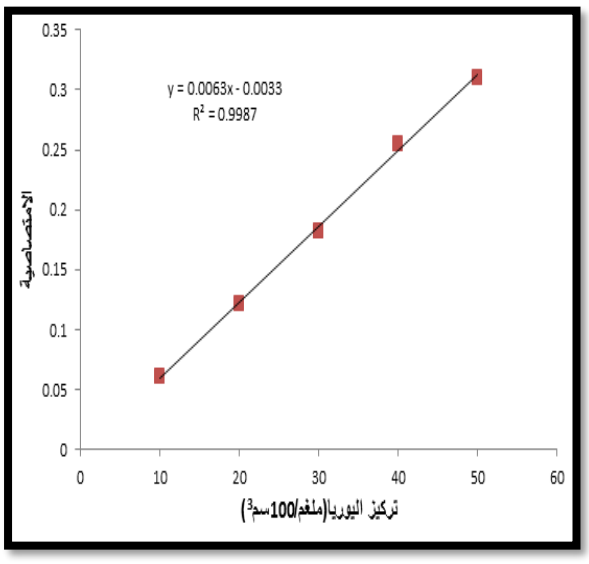
وإزدادت قيمة نسبة الاسترداد المئوي وكلما قل تركيز المادة الاساس كلما قلت الحساسية للطريقة وقلت قيمة نسبة الاسترداد المئوي.

- **توافقية ودقة وكفاءة الطريقة اللونية الرابعة:** تم الحصول على المنحنى القياسي لتراكيز اليوريا المختلفة (10،20،30،40،50) ملغم/سم^3 وذلك بتفاعل محلول اليوريا القياسي مع سالسيلات الصوديوم، نتروبروسيد الصوديوم و EDTA ليكون محلول ملون Coloring agent وتقاس شدة اللون الناتج عند طول موجي 600 نانومتر، ويوضح الجدول (8) معدل قيم الإمتصاصية لتراكيز اليوريا المستعملة كمحاليل قياسية.

تم الحصول على منحني المعايرة من رسم العلاقة بين معدل الإمتصاصية والتركيز وكما في الشكل (4)، وكان معمل الارتباط للمنحني القياسي R^2= 0.9987 وكانت معادلة الخط المستقيم y= 0.0063x−0.0033.

جدول (8) : معدل الإمتصاصية للمعقد المتكون بطريقة اللونية الرابعة.

ت	تركيز اليوريا (ملغم/100سم^3)	معدل الإمتصاصية
1	10	0.0614
2	20	0.1218
3	30	0.1816
4	40	0.2542
5	50	0.3106



الشكل(4): العلاقة ما بين معدل الإمتصاصية للمعقد المتكون وتركيز اليوريا للطريقة اللونية الرابعة.

تم حساب دقة الطريقة الرابعة من خلال إستعمال تراكيز مختلفة من اليوريا وذلك بحساب الإنحراف القياسي النسبي Relative standard deviation RSD% لخمسة تراكيز من اليوريا وبواقع خمس مكررات، وقد وجد ان الانحراف القياسي النسبي كان 0.223% لتركيز 10 ملغم/100سم^3 من اليوريا، و0.170% لتركيز 20 ملغم/100سم^3 و 0.118% لتركيز 30 ملغم/100سم^3 و 0.080% لتركيز 40 ملغم/100سم^3 اما التركيز 50 ملغم/100سم^3 فقد كان 0.099%.اما نسبة الإسترداد المئوي Recovery% فقد كانت (102.547، 101.398، 97.190،98.166، 98.952)% للتراكيز (10، 20، 30، 40، 50) ملغم/100سم^3، أما نسبة الخطأ فقد كانت (2.547، −1.834، −2.809، 1.398، −1.048) على الترتيب.

أيضا تم حساب معامل الاختلاف Coefficient of variance – CV حيث كان 2.175 للتركيز 10 ملغم/100سم^3 و 0.866 %للتركيز 20 ملغم/100سم^3 و 0.405% للتركيز 30 ملغم/100سم^3 و 0.197 % للتركيز 40 ملغم/100سم^3، اما عند التركيز 50 فقد كان 0.200. % وكما موضح في الجدول(9).

جدول (9) : التوافقية والدقة وكفاءة الطريقة الرابعة لتقدير اليوريا.

ت	التركيز الأصلي (ملغم/100سم3)	التركيز المتحصل عليه (ملغم/100سم3)	الإمتصاصية	الإنحراف القياسي النسبي %	الإسترداد المئوي%	نسبة الخطأ%	معامل الاختلاف %
1	10	10.255	0.0611	0.223	102.547	2.547	2.175
2	20	19.633	0.1211	0.170	98.166	-1.834	0.866
3	30	29.157	0.1821	0.118	97.190	-2.809	0.405
4	40	40.559	0.2550	0.080	101.398	1.398	0.197
5	50	49.476	0.3121	0.099	98.952	-1.048	0.200

يتضح من النتائج اعلاه إن أقل قيمة للإنحراف القياسي النسبي كانت عند التركيز 50 ملغم/100سم^3 وإن نسبة الإسترداد المئوي 98.952، في حين كانت أعلى قيمة عند التركيز 10 ملغم/100سم^3 وهذا يدل إن التوافقية للطريقة كان أعلى عند التراكيز العالية من اليوريا.كما ان أقل نسبة للخطأ المطلق كانت عند التركيز 50 ملغم/100سم^3، أي إن أعلى دقة كانت عند هذا التركيز.كما قد تم حساب معامل الإختلاف لتراكيز اليوريا قيد الدراسة وقد اظهرت النتائج ان التركيز 40 ملغم/100سم^3 يمتلك أقل معامل إختلاف وبالتالي فإن كفاءة الطريقة تعتبر عالية عند هذا التركيز.

وهذا يتفق مع ما جاء به Bretaudiere[12] حيث وجد ان كلما زاد تركيز المادة الاساس Substrate زادت الحساسية للطريقة الانزيمية وازدادت قيمة نسبة الإسترداد المئوي وكلما قل تركيز المادة الاساس كلما قلت الحساسية للطريقة وقلت قيمة نسبة الإسترداد المئوي.

- **تقييم دقة وتوافقية طرائق اليوريا بإستعمال محلول السيطرة** :تم إستعمال محاليل السيطرة المجهز من قبل وزارة الصحة للتعرف وتقييم المختبرات الخاصة ومختبرات المؤسسات الصحية، لغرض تقييم طرائق تقدير اليوريا المستعملة في الدراسة الحالية وذلك من خلال التعرف على الدقة والتوافق لكل طريقة.

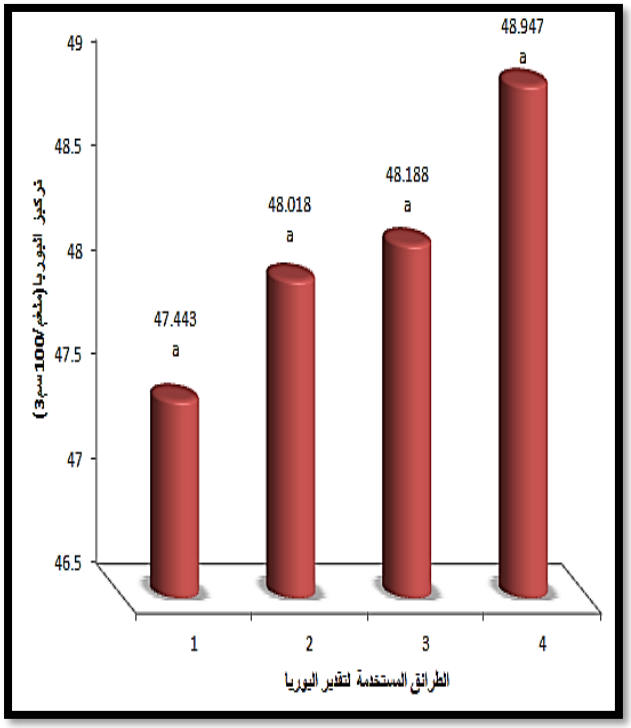
أظهرت النتائج إن الإنحراف القياسي النسبي كان 0.001818 % للطريقة الأولى، في حين كان 0.0004168 % للطريقة الثانية و 0.975651391 للطريقة الثالثة، أما الطريقة الرابعة فقد كان الإنحراف النسبي لها 0.117795 %، كما تم حساب نسبة الاسترداد المئوي للطرائق قيد الدراسة اذ كان 94.88 للطريقة الاولى و 96.036 للطريقة الثانية و96.376 للطريقة الثالثة و 97.89 للطريقة الرابعة، اما نسبة الخطأ فقد كانت 5.12- للطريقة الاولى و 3.96- للطريقة الثانية و 3.624- للطريقة الثالثة و 2.11- للطريقة الرابعة، وكما في الجدول (10).

جدول (10) : التوافقية والدقة وكفاءة الطريقة الرابعة لتقدير اليوريا.

الطريقة	التركيز الأصلي (ملغم/100سم3)	التركيز المتحصل عليه (ملغم/100سم3)	الإمتصاصية	الانحراف القياسي النسبي %	الإسترداد المئوي%	نسبة الخطأ%
الاولى	50	47.443a	0.275552	0.0018	94.88	-5.12
الثانية	50	48.018a	0.382224	0.00042	96.036	-3.964
الثالثة	50	48.188a	0.44141	0.97565	96.376	-3.62
الرابعة	50	48.947a	0.257466	0.1178	97.89	-2.11

أظهرت النتائج عدم وجود فروقات معنوية بين القيم المتحصل عليها لتراكيز اليوريا في محلول السيطرة وكما في الشكل (5).وهذا قد يعود الى ان تركيز اليوريا في محلول السيطرة كان 50ملغم/100سم^3 وهو التركيز الذي سجلت عنده اغلب الطرائق قيد الدراسة اعلى كفاءة واعلى دقة واعلى توافقية (ماعدا الطريقة الثالثة اذ كانت عند التركيز 40ملغم/سم^3).

أما أكثر الطرق دقة فقد كانت للطريقة الرابعة إذ كانت نسبة الخطأ المطلق 2.11- %، في حين سجلت الطريقة الثانية اعلى توافقية، رغم ان تركيز انزيم اليوريز كان الاقل (3000 وحدة/ لتر) مقارنة بـ (5000 وحدة/ لتر) للطرائق الانزيمية الثالثة والرابعة، وهذا قد يعود الى نقاوة الانزيم العالية وكفاءته والفة الانزيم المستخدم للمادة الاساس(اليوريا) التي يعمل عليها والمتمثلة بثابت ميكلس –ومنتن Menten–Michaelis(Km)، والتي قد تختلف للانزيم الواحد حسب مصدر الانزيم[1].



شكل(5): تركيز اليوريا في محلول السيطرة باستعمال الطرائق الاربعة.

- **تقييم كفاءة الطرائق اللونية لقياس يوريا الدم:** تم تقدير مستوي اليوريا في مصل الدم بإستعمال الطرائق الاربعة قيد الدراسة، وقد أظهرت النتائج أن المدى لمستوى اليوريا في مصل الدم بإستعمال الطريقة الاولى بلغ (39.60- 20.45) ملغم/100 سم^3 في حين كان المعدل ± الانحراف المعياري 27.173 ±5.740 ملغم/100سم^3.

في حين تراوح مدى مستوى اليوريا بإستعمال الطريقة الثانية (39.12- 22.72) ملغم/100سم وكان معدل ± الانحراف المعياري 28.425±5.182 ملغم/100سم^3، وللطريقة الثالثة تراوح مدى مستوى اليوريا (38.32- 19.38) ملغم/100سم^3 وكان معدل ± الإنحراف المعياري 27.804 ±5.283 ملغم/100سم^3، وللطريقة الرابعة بلغ المدى لمستوى اليوريا (41.80 - 23.61) ملغم/100سم^3 وكان معدل ± الانحراف المعياري 29.483 ±4.449ملغم/100سم^3. وكما في الجدول (10).

كما ويوضح الجدول (11) قيم معامل الإختلاف لمستوى اليوريا في مصل الدم باستخدام الطرائق الاربع قيد الدراسة، اذ بلغ 21.12% للطريقة الأولى، و 15.65% للطريقة الثانية، و 19.00% للطريقة الثالثة، أما الطريقة الرابعة فقد كان 15.09.

جدول (11) معدل ± الانحراف المعياري ومعامل الاختلاف لمستوى اليوريا في مصل الدم بإستعمال الطرائق قيد الدراسة.

الطرائق	المدى	معدل ± الإنحراف المعياري (ملغم/100سم^3)	معامل الإختلاف %
الطريقة الاولى	39.60 - 20.45	5.740±27.173	21.12
الطريقة الثانية	39.12 - 22.72	5.182±28.425	15.65
الطريقة الثالثة	38.32 - 19.38	5.283± 27.804	19.00
الطريقة الرابعة	41.80 - 23.61	4.449±29.483	15.09

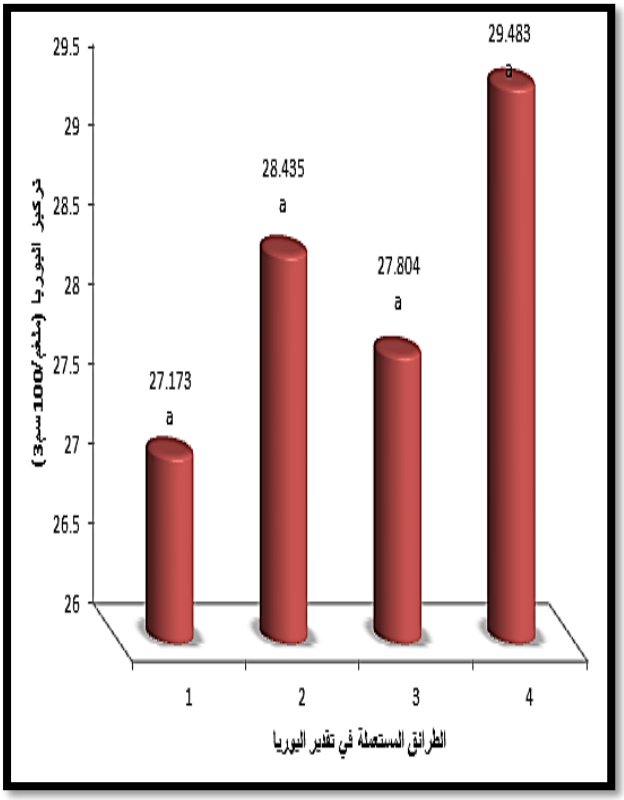
يتضح من النتائج أعلاه عدم وجود فروقات معنوية لمستوى اليوريا في مصل الدم بإستعمال الطرائق الاربعة قيد الدراسة وكما في الشكل (6). يتضح من النتائج ان معدل مستوى اليوريا للعينات قيد الدراسة كان ضمن المدى الطبيعي ليوريا الدم للاشخاص الاصحاء[5].

كما ويظهر معامل الإختلاف ان اكفأ الطرائق لتقدير اليوريا في الدم كانت للطريقة الرابعة إذ بلغ معامل الاختلاف لها 15.09% وأقل الطرائق كفاءة كانت لطريقة المونوكسيم (الطريقة الأولى) وهي طريقة لونية غير انزيمية.

إن كفاءة الطرائق الإنزيمية تعتبر عالية وهذا يعود إلى الكفاءة العالية للإنزيمات وخصوصيتها تجاه المواد الاساس التي تعمل عليها بدون نواتج اضافية وكذلك اختصار الوقت باعتبارها محفزات حياتية لذلك فان مقارنة الوقت اللازم لإنجاز تفاعل لوني غير انزيمي Non- Enzymatic reaction مع تفاعل لوني انزيمي Enzymatic reaction يتضح فيه الفرق الكبير لصالح الطرائق الانزيمية كونها تفاعلات سريعة توفر الوقت اذ تختصر من الوقت اللازم لإنجاز القياس المطلوب[12،13].

أما المقارنة بين كفاءة الطرائق الانزيمية فيما بينها فيلاحظ من قيم معامل الإختلاف إن التقارب كبير بين القيمة للطريقة الرابعة والطريقة الثانية (رغم اختلاف تركيز الانزيم في محلول التفاعل الانزيمي) في حين كان الفرق اكبر للطريقة الثالثة وهذا قد يعود إلى الإختلاف في درجة نقاوة الإنزيم المستعمل في تحضير العدة الجاهزة فكلما كانت النقاوة عالية كلما كان التفاعل الإزيمي أكفأ كما قد يعود الى الاختلاف الى التباين في قيمة القوة الايونية الـ pH للمحلول المنظم في عبوة التحليل الجاهزة، ومن المتعارف عليه ان القوة الايونية لها دورا

مهما في التحفيز الانزيمي اذ ان لكل انزيم pH مثلى Optimum pH[12].



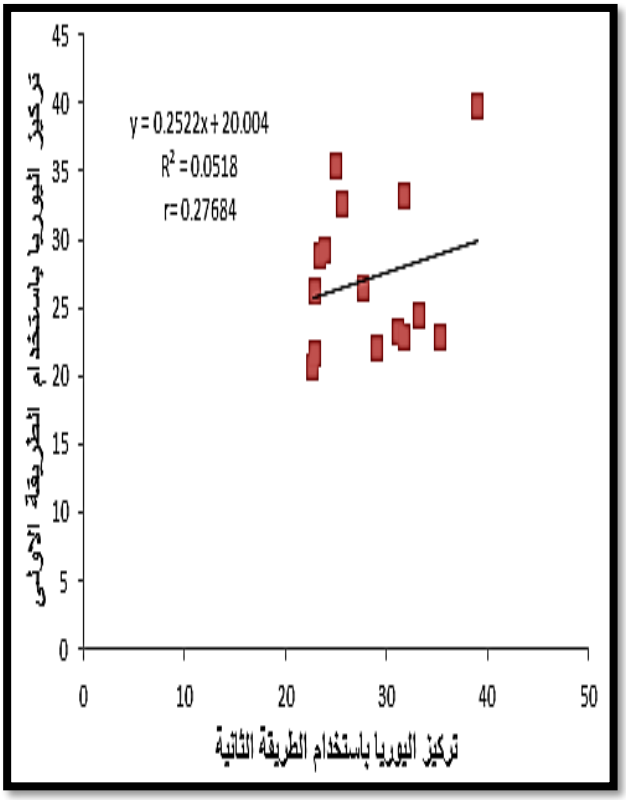
شكل (6): معدل تركيز اليوريا للطرائق المستعملة في تقدير اليوريا في مصل الدم.

- دراسة علاقة الارتباط بين الطريقة اللونية والطرائق الانزيمية باستعمال مصل الدم:

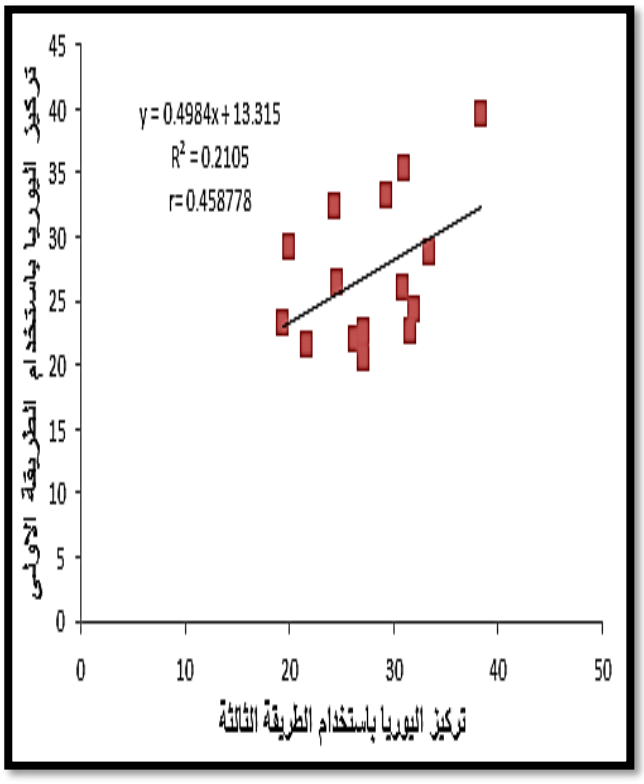
أ- **علاقة الارتباط بين الطريقة الأولى والثانية:** تم دراسة علاقة الارتباط بين مستوى اليوريا باستعمال الطريقة الأولى والطريقة الثانية وقد كانت العلاقة موجبة غير معنوية وقيمة معامل الارتباط (r=0.27684) كما في الشكل (7).

ب- **علاقة الارتباط بين الطريقة الأولى والثالثة:** تم دراسة علاقة الارتباط بين مستوى اليوريا بإستعمال الطريقة الأولى والطريقة الثالثة وقد كانت العلاقة موجبة معنوية وقيمة معامل الارتباط (r= 0.458778) كما في الشكل (7).

ت- **علاقة الارتباط بين الطريقة الاولى والرابعة:** تم دراسة علاقة الارتباط بين مستوى اليوريا بإستعمال الطريقة الاولى والطريقة الرابعة وقد كانت العلاقة موجبة معنوية عالية وقيمة معامل الارتباط (r= 0.66403) كما في الشكل (9).

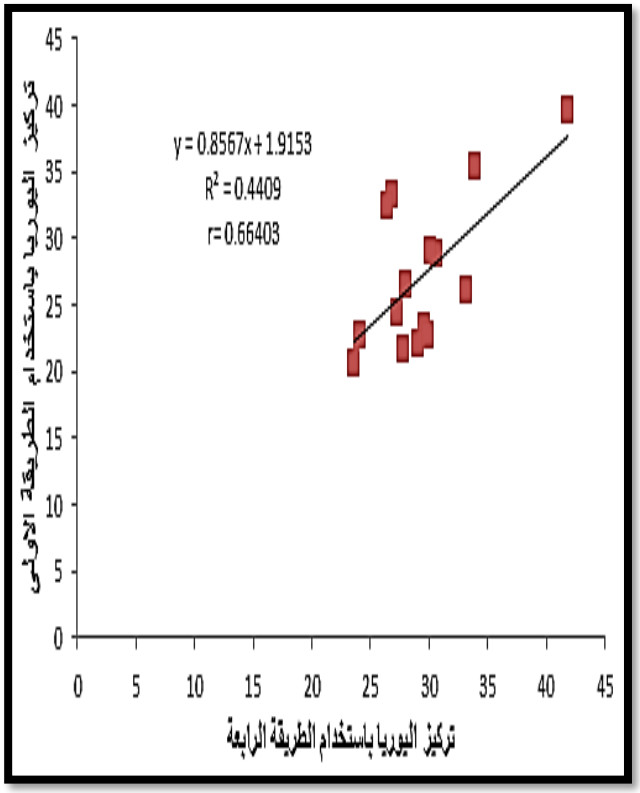


شكل (7): علاقة الارتباط بين الطريقة الأولى والثانية بإستعمال مصل الدم.

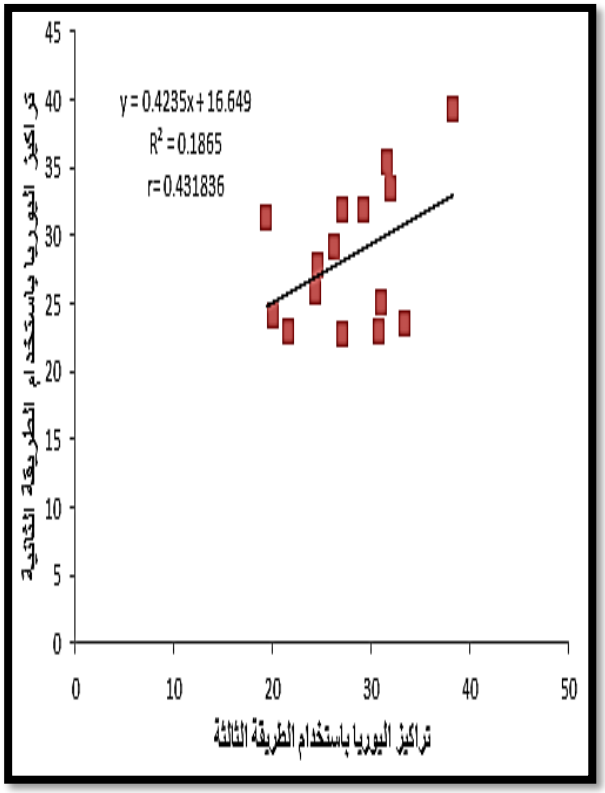


شكل (8): علاقة الارتباط بين الطريقة الأولى والثالثة بإستعمال مصل الدم.

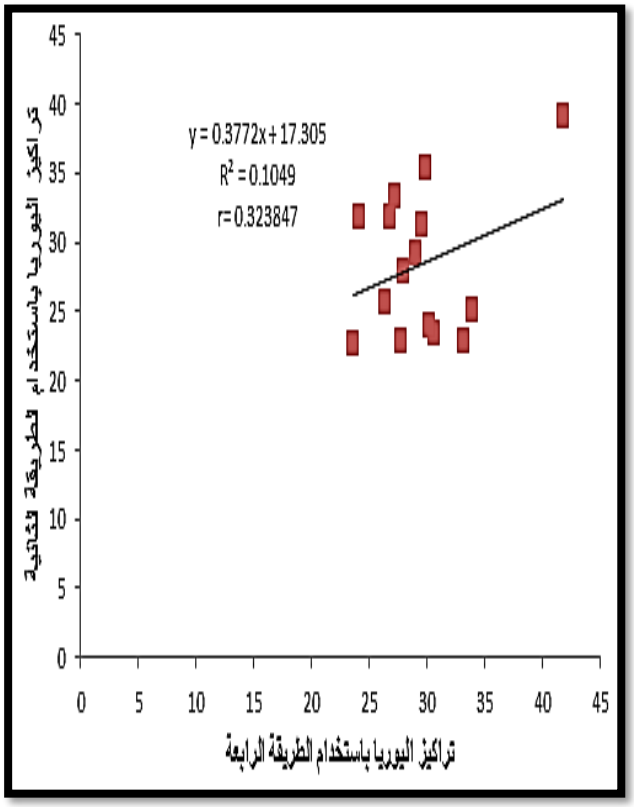
P- ISSN 1991-8941 E-ISSN 2706-6703 (JUAPS) مجلة جامعة الانبار للعلوم الصرفة Open Access
2017,11 (1) :30-42



شكل (9): علاقة الارتباط بين الطريقة الأولى والرابعة بإستعمال مصل الدم.



شكل (10): علاقة الارتباط بين الطريقة الثانية والثالثة بإستعمال مصل الدم.



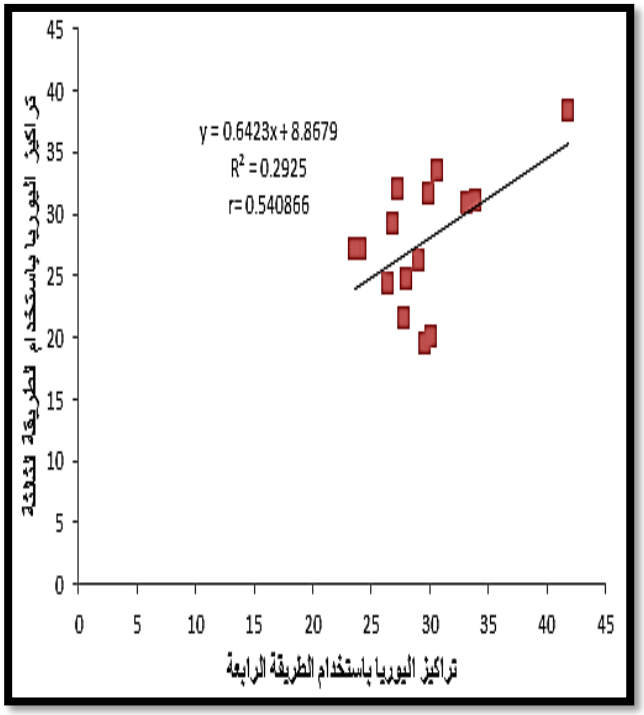
شكل(11): علاقة الارتباط بين الطريقة الثانية والرابعة بإستعمال مصل الدم.

– **دراسة علاقة الارتباط بين الطرائق الأنزيمية باستعمال مصل الدم:**

أ- **علاقة الارتباط بين الطريقة الثانية والثالثة:**تم دراسة علاقة الارتباط بين مستوى اليوريا بإستعمال الطريقة الثانية والثالثة وقد كانت العلاقة موجبة معنوية وقيمة معامل الارتباط (r= 0.431836) كما في الشكل (10).

ب- **علاقة الارتباط بين الطريقة الثانية والرابعة:**تم دراسة علاقة الارتباط بين مستوى اليوريا بإستعمال الطريقة الثانية والرابعة وقد كانت العلاقة موجبة غير معنوية وقيمة معامل الارتباط (r= 0.323847) كما في الشكل (11).

ج- **علاقة الارتباط بين الطريقة الثالثة والرابعة:**تم دراسة علاقة الارتباط بين مستوى اليوريا بإستعمال الطريقة الثانية والرابعة وقد كانت العلاقة موجبة معنوية وقيمة معامل الارتباط (r= 0.540866) كما في الشكل (12).



شكل (12): علاقة الارتباط بين الطريقة الثالثة والرابعة بإستعمال مصل الدم.

ان دراسة معامل الارتباط مهمة جدا في ايجاد الارتباط بين الطرائق القيد الدراسة، وتشير علاقات الارتباط المعنوية لمستوى اليوريا باستخدام الطريقة الاولى الغير انزيمية والطريقة الانزيمية الثالثة والرابعة الى دقة الطريقة اللونية الغير انزيمية والتي تكافيء الطرائق الانزيمية ذات الحساسية العالية.

اما علاقات الارتباط بين قيم اليوريا باستخدام الطرائق الانزيمية والتي كانت معنوية بين الطريقة الثانية والثالثة وكذلك بين الثالثة والرابعة فقد يعود الى تقارب حساسية الطرائق، في حين لم تظهر العلاقة معنوية بين الطريقة الثانية والرابعة وهذا قد يعود التباين في تركيز انزيم اليوريز في المحلول الانزيمي لعدة التحليل الجاهزة للطريقة الثانية.

الاستنتاجات:

- ان اعلى توافق كان عند التركيز 50 ملغم/100سم^3 من محلول اليوريا القياسي للطرائق الأولى والثانية في حين كان اعلى توافق للطريقة الثالثة والرابعة عند التركيز 40 ملغم/100سم^3.
- ان اعلى دقة كانت عند التركيز 50 ملغم/100سم^3 من محلول اليوريا القياسي للطرائق الاولى والثالثة في حين كانت اعلى دقة للطريقة الثانية الرابعة عند التركيز 40 ملغم/100سم^3.
- ان اعلى كفاءة كانت عند التركيز 50 ملغم/100سم^3 من محلول اليوريا القياسي للطرائق الأولى والثانية في حين كانت اعلى كفاءة للطريقة الثالثة والرابعة عند التركيز 40 ملغم/100سم^3.
- عدم وجود فروقات معنوية لمستوى اليوريا عند التركيز 50 ملغم/100سم^3 لمحلول السيطرة وكذلك في مصل الدم.
- تغير حساسية الطريقة اللونية مقارنة لحساسية الطرائق الانزيمية اذ اظهرت علاقات ارتباط معنوية.

المصادر

1. المظفر، سامي عبد المهدي. الكيمياء الحياتية، مطبعة جامعة بغداد، 1986، ص12-13.
2. Siddiqui,M.R.; Al-Othman, Z.A. and Rahman, N. Analytical technigues in pharmaceutical analysisiyevieu. Arabian Journal of chemistry،2013;4:16-29.
3. Kanagas,A.S.; Swaminathan ,S. and Selvakumar, R. Quality control in clinical biochemistry. Indian Journal of clinical biochemistry. 1996;11(1):7-25.
4. كيالي، نجيب. جودة النتائج المختبرية السريرية. مجلة التشخيص المختبري 2007، المجلد4، العدد4: ص26-31.
5. العمري، محمد رمزي. الكيمياء السريرية العملي، الطبعة الثانية. هيئة المعاهد الفنية، 2001, ص47,49,58,70,73,80,81.
6. Zachariah, P.P.; Mathew, A.; Rajesh, R. ; Kurien, G.and Unni, V.N. Nephrotic syndrome associated with meningioma. *Indian Journal of Nephrology*. 2013;23(1):63-66.
7. Annino, J.S. and Giese, R.W. , Clinical Chemistry. Principles and Procedures", 3rd Ed., Little, Brown and Company, Boston1979.
8. Richterich, R, : clinical ehemisty. S. kargen Bascl. 19.69
9. Karplus PA, Pearson MA, Hausinger RP: 70 Years of Crystalline Urease What Have We Learned? Acc Chem Res 1997: 30;330–337
10. Das, Nilanjana, Arvind M. Kayastha, and Punit K. Srivastava. "Purification and characterization of urease from dehusked pigeonpea (Cajanus cajan L.) seeds." Phytochemistry 61.5 (2002): 513-521.
11. الراوي، خاشع محمود وخلف الله، عبد العزيز محمد " تصميم وتحليل التجارب الزراعية"، دار الكتب للنشر. جامعة الموصل 2000.
12. Bretaudiere, J.P; Phung, H.T. and Bailly, M. Direct enzymatic determination of urea in plasma

13. آل فليح، خولة احمد. مدخل الى الكيمياء الحياتية. الطبعة الثانية، دار الكتب للطباعة والنشر، الموصل، العراق.2000. ص169،170.

and urine with a centrifugal analyzer. Clinical chemistry. 1976 Oct 1;22(10):1614-7.

Evaluating The Efficiency Of Some Methods Used For Urea Determination In Serum

Mohammed D. Hameedi **Rafah R. Hameed**

Abstract:

The determination of accuracy , precision and efficiency were carried out in this study , Four method were used : one of them was colorimetric (monoxam method) and three enzymatic method as kits which provided by (Biomaghreb, Biosystem, Randox) , In which the comparison between the four methods were carried out by using Relative stardard deviation –RSD%, Error percentage and variation coefficient (CV) for methods under investigation.The more accurate and consensual and efficient was wein original concentration of 50 mg /100 cm^3 for methods Monnoxam the number of ready-made processed Biomaghreb companies, Biosystem's, and was more accurate and agree and accuracy to focus the original 40 mg / 100 cm^3 to the way many ready-processed from its parent company Randox for used urea standard Solutions.The accuracy, precision and efficiency for the fourth method were higher at 40 mg/dl for standard urea solution , In which the RSD was 0.080% error % was 1.398% and CV was 0.197%.No significant variation were indicate for urea concentration in quality control solution by using the for the fourth method in which the error% was 2.106% , while the higher precision was indicate for the second method in which the RSD 0.001% .