

## ODREĐIVANJE GLIKOZILOVANIH PROTEINA SERUMA: POREĐENJE METODA SA TIOBARBITURNOM KISELINOM I FENOL-SUMPORNOM KISELINOM

Ljuba Mandić<sup>1</sup>, Srdan Stojanović<sup>1</sup>, Ana Čolović<sup>2</sup>, Nenad Milin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

<sup>2</sup>Institut za nuklearne nauke, Vinča, Beograd

**Kratak sadržaj:** Određivanje sadržaja glikozilovanih proteina je važno za otkrivanje i kontrolu stanja dugotrajne hiperglikemije u dijabetesu. U ovom radu određivan je sadržaj glukoze vezane za proteine seruma kod obolelih od dijabetesa, spektrofotometrijskim metodama s fenol-sumpornom kiselinom (PS) i s tiobarbiturnom kiselinom (TBA). Vrednosti vezane glukoze dobijene s PS reagensom ( $80,6 \pm 22,8 \mu\text{mol glukoze/g proteina}$ ) su bile znatno više od dobijenih s TBA metodom ( $3,71 \pm 1,34 \mu\text{mol glukoze/g proteina}$ ). Analiza faktora, koji bi mogli dovesti do ove značajne razlike, je pokazala da su više vrednosti dobijene PS metodom posledica dodatne dehidracije ugljenih hidrata oslobođenih u toku hidrolize glikozilovanih proteina. Do dehidracije dolazi pri izvođenju bojene reakcije s fenol-sumpornom kiselinom. Zaključeno je da, iako se osetljivost obe metode za fruktozu kao standard ne razlikuje značajno, TBA metoda je pouzdanija od PS metode i preporučuje se za kliničku praksu.

**Ključne reči:** glikozilovani proteini, fenol-sumporna metoda, tiobarbiturna metoda.

### Uvod

Do danas su objavljeni brojni radovi koji se bave mehanizmom neenzimskog glikozilovanja proteina u dijabetesu, odnosno serijom reakcija koje počinju vezivanjem glukoze za primarne amino-grupe proteina, nastavljaju se stvaranjem Amadori proizvoda, a završavaju Maillard-ovom reakcijom. Amadori proizvodi se reakcijama dehidracije i premeštanja pretvaraju u stabilne kovalentne adukte, krajnje proizvode reakcije glikozilovanja. Smatra se da je povećana sinteza i akumulacija ovih proizvoda u tkivima jedan od značajnih mehanizama koji učestvuju u patogenezi dijabetičnih komplikacija (1–3). Stoga je određivanje glikozilovanog hemoglobina ( $\text{HbA}_{1c}$ ) (4), glikozilovanih serumskih proteina (5) i fruktozamina (6, 7) značajno za dijagnozu i kontrolu dijabetes melitusa (8–10) u kliničkoj praksi.

Za spektrofotometrijsko određivanje sadržaja glikozilovanih proteina primenjuje se više metoda. Jedna od njih se zasniva na reakciji hidrolizom oslobođenog 5-hidroksimetilfurfurala (5-HMF) (11, 12) s reagensima kao što su tiobarbiturna kiselina (TBA) (12, 13) ili fenol-sumporna kiselina (PS) (14, 15). Pri određivanju sadržaja glukoze vezane za proteine seruma PS metodom dobijaju se znatno više vrednosti u odnosu na iste dobijene TBA metodom (14). Budući da su uslovi hidrolize u obe metode jednaki, pretpostavlja se da je uzrok ovom povećanju dodatno dehidratiranje monosaharida do 5-HMF pri izvođenju bojene reakcije s fenol-sumpornom kiselinom. Da bi se detaljnije sagledali uzroci koji dovode do povećanja sadržaja 5-HMF, kao i pouzdanost metode sa PS reagensom, ispitivane su reakcije različitih ugljenih hidrata (glukoza, manozna, fruktoza, arabinozna, ramnoza) sa PS i TBA i faktori koji bi mogli uticati na rezultate dobijene sa oba reagensa (uslovi hidrolize glukoze vezane za proteine, uslovi stvaranja bojenog proizvoda, koncentracija reagenasa, temperatura).

Adresa za korespondenciju

dr Ljuba Mandić

Hemijski fakultet

p.p. 158, Studentski trg 16

11001 Beograd

e-mail: ljmandic@helix.chem.bg.ac.yu

## Materijal i metode

Glikozilovani proteini su određivani u serumima dijabetičara ( $n=62$ ) i zdravih osoba ( $n=15$ ). U alikvotne seruma (0,1 mL), koji su razblaženi s fiziološkim rastvorom (1:10), doda se po 0,5 mL rastvora trihlorsirćetne kiseline (TCA) koncentracije 2,5 mol/L. Posle centrifugiranja s 4000 obrtaja u minuti odlije se supernatant i talog proteina resuspenduje u 1,0 mL fiziološkog rastvora. U dobijeni rastvor doda se 1,0 mL oksalne kiseline, koncentracije 1 mol/L i rastvor zagreva na 100 °C u toku 4 sata. Po završetku hidrolize, rastvor se ohladi i dopuni destilovanom vodom do 2,0 mL. Potom se proteini, koji ne hidrolizuju pri datim uslovima hidrolize, istalože sa 0,5 mL rastvora TCA koncentracije 2,5 mol/L i odvoje centrifugiranjem s 4000 obrtaja u minuti u toku 15 do 20 minuta. U alikvotima supernatanta izvode se bojene reakcije s TBA i PS reagensom.

*Reakcija sa fenol-sumpornom kiselinom.* Alikvot supernatanta (0,2 mL) razblaži se destilovanom vodom do 1,0 mL i u dobijeni rastvor doda 0,10 mL rastvora fenola koncentracije 9 mol/L i 3,0 mL koncentrovane sumporne kiseline. Posle intenzivnog mešanja (Vorteks), boja se razvija na sobnoj temperaturi u toku 30 min. Apsorbancija obojenog proizvoda meri se na 480 nm (14).

*Reakcija sa tiobarbitnom kiselinom.* U alikvot supernatanta (2,0 mL) doda se 0,5 mL zasićenog rastvora TBA. Posle inkubiranja rastvora na 37 °C u toku 40 minuta meri se apsorbancija obojenog proizvoda na 440 nm (12).

Sadržaj glikozilovanih proteina izražen je u  $\mu\text{mol}$  glukoze ili fruktoze po gramu proteina (i kao srednje vrednosti,  $\pm$  S.D). Proteini su određeni biuretском metodom (16). Pri izradi kalibracionih prava korišćeni su standardni rastvori fruktoze u opsegu koncentracija od 20 do 120  $\mu\text{mol/L}$  (TBA metoda) i glukoze u opsegu koncentracija od 0,2 do 2,0 mmol/L (PS metoda). Pre izvođenja bojenih reakcija s TBA i PS reagensom standardni rastvori monosaharida (1 mL) su podvrgnuti kao i glikozilovani proteini napred opisanom postupku hidrolize, odnosno dehidracije. Za statističku obradu rezultata primenjen je Studentov t-test, a pri poredenju biohemijjskih varijabla primenjena je linearna regresiona analiza i Pirsonov koeficijent korelacije (17).

## Rezultati i diskusija

U tabeli 1 prikazani su rezultati dobijeni primenom TBA i PS metode za određivanje sadržaja glikozilovanih proteina u serumu obolelih od dijabetesa i zdravih osoba.

Srednja vrednost sadržaja glikozilovanih proteina seruma, određena TBA metodom kod dijabetičara ( $3,71 \pm 1,34 \mu\text{mol}$  fruktoze/g proteina) je statistički

Tabela 1 Sadržaj ugljenih hidrata vezanih za proteine, određen s PS i TBA metodom, u serumu dijabetičara i zdravih osoba

Grupa	Broj ispitanika	TBA	PS
		$\mu\text{mol}$ ugljenih hidrata/g proteina	
Zdravi	15	$1,71 \pm 0,68$	$51,6 \pm 11,7$
Dijabetičari	62	$3,71 \pm 1,34^a$	$80,6 \pm 22,8^b$

<sup>a</sup> $p < 0,001$ ; <sup>b</sup> $p < 0,01$ , poredenje prema kontrolnoj grupi

značajno viša ( $p < 0,001$ ) od vrednosti određenih kod kontrolne grupe ( $1,71 \pm 0,68 \mu\text{mol}$  fruktoze/g proteina). Odgovarajuće vrednosti sadržaja glikozilovanih proteina za grupu obolelih od dijabetesa i kontrolnu grupu, određene s PS metodom, iznose redom  $80,6 \pm 22,8$  i  $51,6 \pm 11,7 \mu\text{mol}$  glukoze/g proteina. Razlika između ove dve srednje vrednosti je manje značajna ( $p < 0,01$ ) od vrednosti dobijenih s TBA metodom.

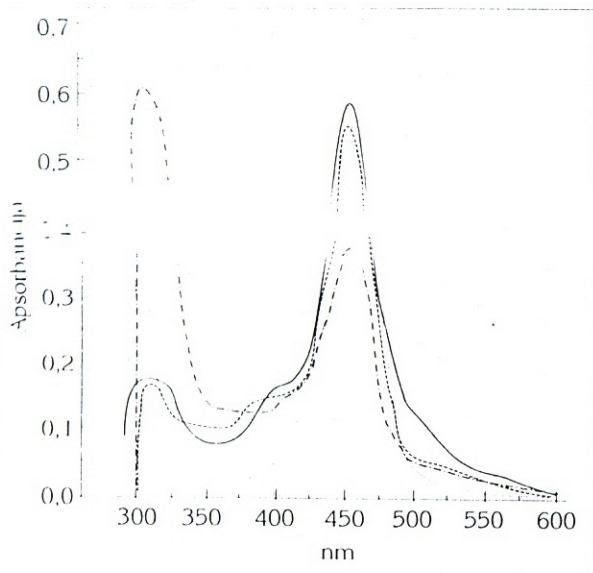
Može se uočiti da je sadržaj monosaharida određen pomoću PS metode 20 do 30 puta veći nego pomoću TBA metode. Zato je zapremina alikvota supernatanta koji se odmerava pri određivanju s fenol-sumpornom kiselinom manja u odnosu na TBA metodu. U cilju da se pronade uzrok uočenih razlika u sadržaju glikozilovanih proteina, kada se primenjuje TBA i PS metoda, ispitano je nekoliko relevantnih parametara.

### Reakcije različitih ugljenih hidrata sa TBA i PS metodom

Pri izradi kalibracionih pravih standardni rastvori monosaharida su podvrgnuti kompletnom postupku kome se podvrgavaju i glikozilovani proteini (hidroliza i bojena reakcija).

Za izradu baždarnih prava sa PS reagensom kao standardi upotrebljeni su rastvori monosaharida (glukoza, arabinoza, manoz, ramnoza, fruktoza) i furfurala u opsegu koncentracija od 0,2 do 2,0 mmol/L. Apsorpcioni spektri obojenih proizvoda ovih ugljenih hidrata koncentracije 2 mmol/L sa PS reagensom prikazani su na slici 1. Svi ispitivani monosaharidi daju obojene proizvode sa maksimumom apsorbancije na 480 nm, koja je linearno zavisna od koncentracije u ispitivanom opsegu (Tabela II).

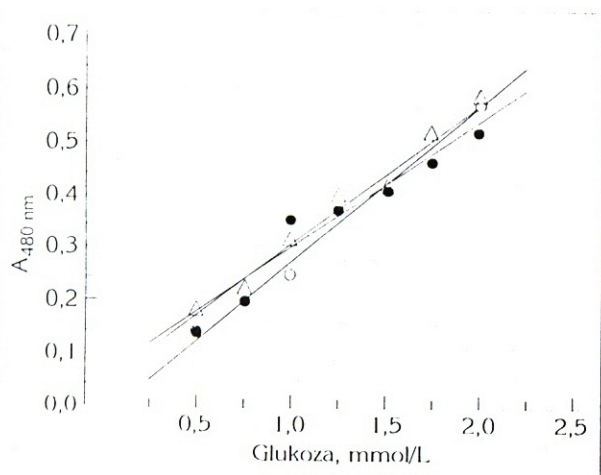
Može se uočiti da nema značajnih razlika u zavisnostima apsorbancije na 480 nm od koncentracije za većinu ispitanih monosaharida kao i za furfural. Ispitujući reakciju galaktoze i manoze sa PS reagensom do sličnog zaključka došli su Rao i Pattabiraman (18). Jedino su za arabinozu (Tabela I) dobijene niže vrednosti apsorbancije pri višim koncentracijama šećera. Pretpostavlja se da je ovo smanjenje posledici



Slika 1. Apsorpcioni spektri obojenog proizvoda glukoze (—), ramnoze (---), furfurala (.....) i fruktoze (-.-.-) sa PS reagensom pri 2 mmol/L koncentraciji rastvora monosaharida

Tabela II Zavisnost apsorbancija od koncentracije ugljenih hidrata, određena PS metodom na 480 nm.

Ugljeni hidrat	Jednačina	Koeficijent korelacije
glukoza	$y_x = 0,293x - 0,024$	0,991
manozza	$y_x = 0,285x + 0,028$	0,996
fruktoza	$y_x = 0,278x - 0,082$	0,997
arabinoza	$y_x = 0,197x + 0,051$	0,994
ramnoza	$y_x = 0,279x + 0,013$	0,992
furfural	$y_x = 0,289x - 0,017$	0,945



Slika 2. Zavisnost apsorbancije obojenog proizvoda na 480 nm od koncentracije glukoze. Hidroliza je vršena bez oksalne (Δ Δ;  $Y_x = 0,269x + 0,050$ ;  $r = 0,995$ ) i sa dodatkom oksalne kiseline koncentracije 1 mol/L (○ ○;  $Y_x = 0,299x - 0,006$ ;  $r = 0,996$ ) i 2 mol/L (● ●;  $Y_x = 0,268x + 0,038$ ;  $r = 0,968$ ).

ca različite brzine stvaranja 5-HMF kod heksoza, odnosno HMF kod pentozza (19).

Za izradu baždarne prave sa TBA reagensom korišćeni su standardni rastvori fruktoze u opsegu koncentracija od 20 do 120 μmol/L; merena je apsorbancija na 440 nm i dobijena je linearna zavisnost,  $y_x = 0,003x - 0,020$ ,  $r = 0,997$ . Za TBA metodu kao standard korišćena je fruktoza jer se samo ovaj monosaharid pri hidrolizi glikozilovanih proteina s oksalnom kiselinom dehidratirše do količine 5-HMF koja je merljiva sa TBA.

Za razliku od TBA metode, u reakciji sa PS svi ispitani monosaharidi reaguju na isti način, što ukazuje da sumporna kiselina vrši dodatnu dehidraciju monosaharida i olakšava njihov prelazak u HMF, odnosno 5-HMF. Ovaj zaključak je potvrđen i eksperimentom u kome su standardni rastvori glukoze (0,2–2 mmol/L) podvrgnuti celom postupku hidrolize bez i sa dodatkom oksalne kiseline, koncentracije 1 i 2 mol/L. Posle izvođenja bojene reakcije sa PS reagensom, dobijene zavisnosti apsorbancije od koncentracije glukoze se nisu značajno razlikovale u slučaju hidrolize s kiselinom i bez prisustva kiseline (Slika 2). Dakle, u slučaju glukoze, najveći deo 5-HMF se dobija pri izvođenju bojene reakcije s fenol-sumpornom kiselinom.

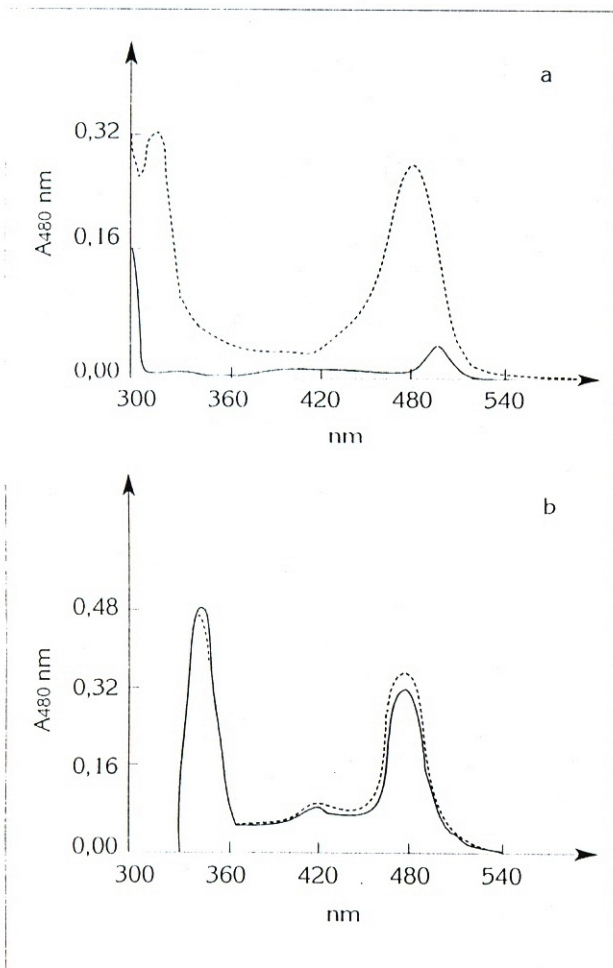
Uslovi izvođenja bojene reakcije

Daljoj dehidraciji glukoze i manoze u odnosu na fruktozu, verovatno doprinose uslovi izvođenja bojene reakcije, tj. povećanje temperature rastvora hidrolizata posle dodavanja koncentrovane sumporne kiseline. Ako se bojeni proizvod glukoze (2 mmol/L) i fruktoze (2 mmol/L) sa fenol-sumpornom kiselinom stvara u ledenom vodenom kupatilu, apsorbancija izmerena na 480 nm se znatno smanjuje (za 80,44%) u slučaju glukoze (Slika 3a), dok je ovo smanjenje u slučaju fruktoze niže (17,24%) (Slika 3b).

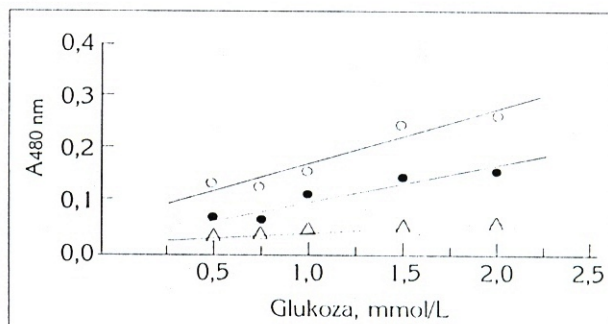
Uticaj uslova izvođenja bojene reakcije (zapremi-na fenola koncentracije 9 mol/L i temperatura) ispitan je, takode, primenom serije standardnih rastvora glukoze i fruktoze (opseg koncentracija od 0,5 do 2,0 mmol/L). Dobijeni rezultati prikazani su u tabeli III. Poređenjem nagiba prava zavisnosti apsorbancije obojenog proizvoda od koncentracije glukoze koje su dobijene na sobnoj temperaturi u odnosu na prave dobijene pri izvođenju reakcije u ledenom vodenom kupatilu uočava se smanjenje nagiba prave za deset puta. Smanjenje nagiba prava dobijenih za fruktozu je znatno manje. Može se zaključiti da se uticaj drugih monosaharida, koji se mogu osloboditi u toku hidrolize glikozilovanih proteina s oksalnom i dodatno dehidratirati pri izvođenju bojene reakcije, može izbeći ako se reakcija s PS reagensom izvodi u ledenom vodenom kupatilu sa prethodno ohlađenim reagensima.

Tabela III Uticaj zapremine rastvora fenola i temperature na zavisnost apsorbancije bojenog proizvoda od koncentracije glukoze i fruktoze

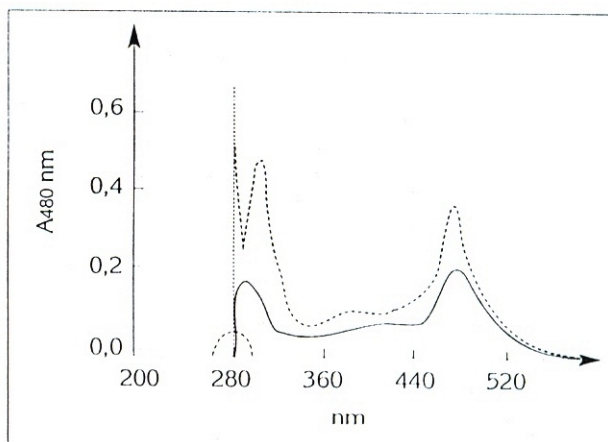
Temperatura	Fenol (mL)	Glukoza jednačina; koeficijent korelacije	Fruktoza jednačina; koeficijent korelacije
sobna	0,10	$y_x = 0,293x - 0,024, 0,991$	$y_x = 0,305x - 0,077, 0,999$
	0,05	$y_x = 0,156x + 0,017, 0,992$	$y_x = 0,240x - 0,073, 0,993$
ledeno vodeno kupatilo	0,10	$y_x = 0,029x + 0,005, 0,996$	$y_x = 0,278x - 0,082, 0,997$
	0,05	$y_x = 0,023x - 0,001, 0,959$	$y_x = 0,192x - 0,073, 0,997$



Slika 3. Apsorpcioni spektri obojenog proizvoda glukoze (2 mmol/L; a) i fruktoze (2 mmol/L; b) sa PS reagensom pri reakciji izvedenoj na sobnoj temperaturi (----) i u ledenom vodenom kupatilu (—)



Slika 4. Uticaj različitih koncentracija sumporne kiseline: 6 mol/L ( $\Delta$   $\Delta$ ;  $y_x = 0,018x - 0,001, r = 0,995$ ); 12 mol/L ( $\bullet$   $\bullet$ ;  $y_x = 0,090x - 0,020, r = 0,955$ ); i 18 mol/L ( $\square$   $\square$ ;  $y_x = 0,134x + 0,047, r = 0,976$ ) na stvaranje obojenog proizvoda glukoze (0,2 – 2 mmol/L) sa PS reagensom



Slika 5. Apsorpcioni spektri obojenog proizvoda fruktoze dobijeni korišćenjem 18 (----), 12 (—) i 6 (···) mol/L sumporne kiseline u PS reagensu

U cilju da se smanji uočeni efekat koncentrovane sumporne kiseline na dodatnu dehidraciju monosaharida, bojena reakcija je izvedena u prisustvu nižih koncentracija sumporne kiseline (12 mol/L i 6 mol/L). Rezultati dobijeni sa standardnim rastvorima glukoze, koncentracija od 0,2 do 2 mmol/L, prikazani su na slici 4. U slučaju kada je koncentracija sumporne kiseline 12 mol/L apsorbancija na

480 nm se za koncentraciju glukoze od 2 mmol/L smanjuje za 40,2%, a ako je koncentracija sumporne kiseline 6 mol/L ovo smanjenje je još veće (88,6%). Isto ispitivanje je urađeno i s rastvorom fruktoze koncentracije 2 mmol/L. Fruktoza je izabrana pošto se maksimalno dehidriše u uslovima hidrolize pa se može pratiti efekat kiseline na stvaranje obojenog proizvoda. Dobijeni apsorpcioni spektri su prikazani

na *slici 5*. Količina obojenog proizvoda se smanjuje snižavanjem koncentracije sumporne kiseline u PS reagensu. Pri koncentraciji sumporne kiseline od 12 mol/L apsorbanija obojenog proizvoda se smanjuje za 53%. a pri koncentraciji od 6 mol/L potpuno izostaje. Zaključuje se da je, pored fenola, u reagensu za stvaranje obojenog proizvoda s 5-HMF neophodno prisustvo koncentrovane sumporne kiseline.

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da se pri uslovima hidrolize glikozilovanih proteina sa oksalnom kiselinom oslobađa 5-HMF koji reaguje i sa TBA i sa PS reagensom. Pri navedenim uslovima hidrolize dehidriše se samo fruktoza, ali ne glukoza i manoza. Budući da se sa PS reagensom mogu dodatno dehidratisati i drugi ugljeni hidrati oslobođeni hidrolizom, rezultati dobijeni ovom metodom su znatno viši u odnosu na one dobijene TBA metodom. Kako određivanje HMF s fenol-sumpornom metodom

zavisí od uslova izvođenja bojene reakcije, dobijene vrednosti stoga ne odražavaju sadržaj glikozilovanih proteina niti stanje glikemije u nekom periodu.

Ova ispitivanja su pokazala da je određivanje sadržaja glikozilovanih proteina sa TBA reagensom mnogo pouzdanije od određivanja sa PS reagensom i stoga se preporučava za kliničku praksu.

*Zahvalnost:* Ovaj rad je urađen u saradnji sa Institutom za endokrinologiju, dijabetes i poremećaje metabolizma Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Autori se posebno zahvaljuju profesoru dr Predragu Dorđeviću i dr Vesni Dimitrijević na ukazanoj pomoći u istraživanjima koja su se bavila dijabetesom.

## DETERMINATION OF SERUM GLYCOSYLATED PROTEINS: COMPARISON OF THIOBARBITURIC ACID AND PHENOL-SULPHURIC ACID ASSAYS

Ljuba Mandić<sup>1</sup>, Srdan Stojanović<sup>1</sup>, Ana Čolović<sup>2</sup>, Nenad Milin<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Chemistry, University of Belgrade  
<sup>2</sup>VINČA Institute for Nuclear Science, Belgrade

*Summary:* The estimation of glycosylated proteins is useful in the detection and control of long-standing hyperglycemic conditions. In this paper the content of protein-bound glucose was determined in diabetics by spectrophotometric method with phenol-sulphuric acid (PS) and with thiobarbituric acid (TBA). The amounts of protein-bound glucose obtained with the PS reagent ( $80.6 \pm 22.8$  mmol glucose/g protein) were always considerably higher than those obtained by TBA method ( $3.71 \pm 1.34$   $\mu$ mol glucose/g protein). The analysis was made of parameters that might have led to such significant difference. It was shown that in the reaction with PS reagent there was an additional dehydration of carbohydrate released during the hydrolysis of glycosylated proteins. The additional dehydration was due to concentrated sulphuric acid which at higher temperature influenced chromogen formation. On the basis of the results obtained it was concluded that, although the sensitivity of the both methods for standard fructose was comparable, TBA method was more reliable than PS method. Therefore, it is recommended in clinical practice.

*Key words:* glycosylated proteins, phenol-sulphuric method, thiobarbituric method.

### Literatura

1. Friedman EA. Advanced glycosylated end products and hyperglycemia in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 1999; 22 Suppl 2: B65-71.
2. Furth AJ. Glycated proteins in diabetes. *Br J Biomed Sci* 1997; 54 (3): 192-200.
3. Cohen MP. Perspective: measurement of circulating glycated proteins to monitor intermediate-term changes in glycaemic control. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1992; 30 (12): 851-9.
4. Schnedl WJ, Leitner G, Lipp RW. Glycohaemoglobin and glycated proteins in management of diabetes mellitus. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 1997; 15: 359-61.
5. Schwartz JG. The role of glycohemoglobin and other proteins in diabetes management. *Diabetes Rev* 1995; 3: 269-287.
6. Armbruster DA. Fructosamine: Structure, analysis and clinical usefulness. *Clin Chem* 1987; 33: 2153-63.
7. Winocour PH, Bhatnagar D, Kalsi P, Hillier VG, Anderson DC. Relative clinical usefulness of glycosylated

- serum albumin and fructosamine during short-term changes in glycemic control in IDDM. *Diabetes Care* 1989; 12: 665-72.
8. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *New Engl J Med* 1993; 329: 977-86.
  9. American Diabetes Association. Tests of glycemia in diabetes. *Diabetes Care* 1997; 20 Suppl 1: S18-S20.
  10. Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, Rohlfing CL, Wilke AL. Is glycohemoglobin testing useful in diabetes mellitus? Lessons from the Diabetes Control and Complications Trial. *Clin Chem* 1994; 40: 1637-40.
  11. Fluckiger R, Winterhalter KH. In vitro synthesis of hemoglobin A<sub>1c</sub>. *FEBS Lett* 1976; 71: 356-60.
  12. Mc Farland KF, Catalano EW, Day JF, Thorpe SR, Baynes JW. Non-enzymatic glycosylation of serum proteins in diabetes mellitus. *Diabetes* 1979; 28: 1011-13.
  13. Pecoraro RE, Graf RJ, Halter JB, Beiter H, Porte D. Comparison of a colorimetric assay for glycosylated hemoglobin with ion exchange chromatography. *Diabetes* 1979; 28: 1120-23.
  14. Sudhakar Nayak S, Pattabiraman TN. A new colorimetric method for the estimation of glycosylated hemoglobin. *Clin Chim Acta* 1981; 109: 267-74.
  15. Rai K, Pattabiraman TN. Nature of contaminants interfering in glycated albumin estimation. *Biochem Arch* 1986; 2: 197-201.
  16. Doumas BT, Bayse DD, Carter RJ, Peters T, Schaffer R. A candidate reference method for determination of total protein in serum. I Development and validation. *Clin Chem* 1981; 27: 1642-50.
  17. Sachs L., *Angewandte Statistik*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1974: 298-344.
  18. Rao P, Pattabiraman TN. Further studies on the mechanism of phenol-sulfuric acid reaction with furfuraldehyde derivatives. *Anal Biochem* 1990; 189 (2): 178-81.
  19. Rao P, Pattabiraman TN. Reevaluation of the phenol-sulfuric acid reaction for the estimation of hexoses and pentoses. *Anal Biochem* 1989; 181: 18-22.

*Rad primljen: 2. 09. 1999*

*Prihvaćen za štampu: 25. 10. 1999*