

[Akceptuje](#)

W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej [Polityce Prywatności](#)

[Portal](#) [Informacje](#) [Katalog firm](#) [Praca](#) [Szkolenia](#) [Wydarzenia](#) [Porównania międzylaboratoryjne](#)
[Kontakt](#)



[Laboratoria](#)
[.net](#)
[Innowacje](#)
[Nauka](#)
[Technologie](#)

[Logowanie](#) [Rejestracja](#) [pl](#)

Newsletter

zapisz się



- [Nowe technologie](#)
- [Felieton](#)
- [Tygodnik "Nature"](#)
- [Edukacja](#)
- [Artykuły](#)
- [Przemysł](#)

[Strona główna](#) > [Artykuły](#)

Właściwości i wybrane metody oznaczania stężenia hemoglobiny cz.II

Hemoglobina jest z pewnością najczęściej badanym białkiem w historii. Analizowana jest na wielu płaszczyznach: od jej właściwości biologicznych, strukturalnych i allosterycznych do szczegółowych mechanizmów regulacyjnych. Jej właściwości zostały dostrzeżone przez Darwina, kiedy to pisał, że czerwone krwinki biora udział w wiązaniu i transporcie tlenu [8].

Określanie całkowitej hemoglobiny (Hb) jest jednym z najczęściej zamawianych badań laboratoryjnych. Parametr ten ma także duże znaczenie w diagnostyce anemii, a ciągły pomiar

hemoglobiny pozwala na śledzenie postępów leczenia choroby, utraty krwi i skuteczności terapii mających na celu przywrócenie wartości Hb do normalnego poziomu. Tradycyjny pomiar hemoglobiny wymaga inwazyjnego pobrania krwi żyłnej. Krew następnie poddawana jest analizie za pomocą specjalnych urządzeń laboratoryjnych (np. CO-oksymetru). CO-oksymetr pozwala na analizowanie hemolizowanej krwi, opierając się na detekcji spektrofotometrycznej. Dokładność tego urządzenia jest funkcją wielu zmiennych (np. długości fal stosowanego światła). W urządzeniach laboratoryjnych stosowanych do określania stężenia Hb możliwe jest zastosowanie jako próbki badanej krwi żyłnej lub tętniczej. Należy jednak mieć na uwadze, że pomiar hemoglobiny może się różnić w zależności od tego, czy zastosowano krew żylną czy tętniczą. Mokken i wsp. oraz Yang Za i wsp. przeprowadzili badania, w których udowodniono, że pomiar hemoglobiny w krwi żyłnej wykazuje mniejsze stężenie (w zakresie 0,7 - 1.0 g/dL) w porównaniu do krwi tętniczej. Choć całkowita ilość krwinek czerwonych i Hb pozostaje stosunkowo stała w krwi tętniczej i żyłnej, procentowe stężenie w osoczu waha się w krwi tętniczej i żyłnej pod wpływem różnych czynników fizjologicznych [1].

Methemoglobina (metHgb)

Methemoglobina (metHgb) jest zmienioną formą hemoglobiny, w której atom żelaza w cząsteczce (krytyczna część obszaru wiązania tlenu) został przekształcony na wyższy stopień utlenienia. To powoduje, że jest on zdolny do wiązania tlenu. Wysokie poziomy metHgb we krwi (tzw. methemoglobinemia) mogą powodować uszkodzenia w dostarczaniu tlenu. U zdrowych osób, normalny poziom methemoglobiny jest mniejszy niż 1% całkowitej hemoglobiny. Jeżeli wartości te odbiegają od normy (przekroczenie 1% lub 2% całkowitej hemoglobiny), wtedy mówi się o methemoglobinemii [7].

Otrzymywanie methemoglobiny (wg Kłyszajko-Stefanowicz L., 2003)

Wykonanie:

Materiałem do przeprowadzenia oznaczenia jest roztwór oksyhemoglobiny, który traktuje się kilkoma kroplami roztworu heksacyjanożelazianu (III) (żelazicyjanku) potasowego $K_3[Fe(CN)_6]$. W wyniku reakcji z powyższym środkiem utleniającym Hb-Q przechodzi w Met-Hb (methemoglobina). W próbówce zabarwienie krwi zmienia się na brunatne, a w spektroskopie pojawiają się 4 charakterystyczne słabe smugi absorpcyjne. Wykazują one maksimum absorbancji przy długości fali równej odpowiednio $\lambda = 631$, $\lambda = 576$, $\lambda = 540$ oraz $\lambda = 500$ nm. W wyniku dodania do próbki roztworu $Na_2S_2O_4$ zachodzi reakcja redukcji, w efekcie czego powstaje hemoglobina (wykazująca jedną charakterystyczną smugę w spektroskopie) [2].

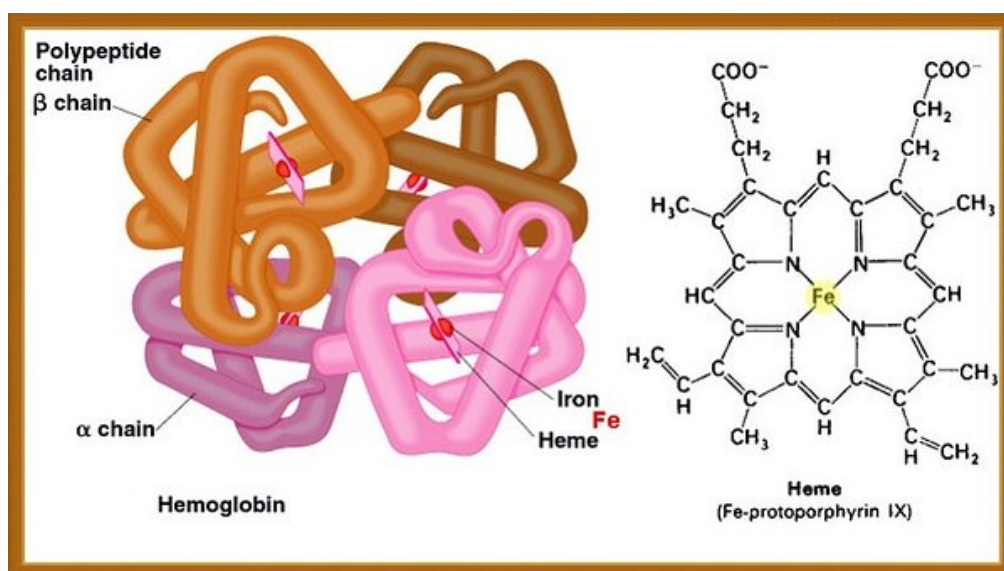
Próba benzydynowa - wykrywanie hemoglobiny (wg Kłyszajko-Stefanowicz L., 2003)

Wykonanie:

Kilka kryształków benzydyny należy rozpuścić w lodowatym kwasie octowym. Do próbki dodać równą objętość 3% roztworu nadtlenu wodoru. Roztwór ten nie może się zabarwić (ani na niebiesko ani na zielono), gdyż dopiero dodanie do próbki rozcieńczonego roztworu hemoglobiny powoduje zmianę zabarwienia na niebieski. Dzieje się tak, ponieważ hemoglobina (tak jak i peroksydaza) ma zdolność utleniania substratów w obecności nadtlenu wodoru [2].

Karboksyhemoglobina a tlenek węgla

Tlenek węgla jest związkami, który ulega szybkiej absorpcji przez płuca. We krwi CO łączy się z hemoglobina dając karboksyhemoglobina (HbCO). Powinowactwo CO do hemoglobiny jest ponad 200 razy większe niż tlenu do hemoglobiny. Toksyczność CO wiąże się z zablokowaniem części hemoglobiny jako transportera tlenu, a obecność HbCO powoduje przesunięcie krzywej dysocjacji HbO₂ w lewo. W wyniku tak przebiegających reakcji dochodzi do zmniejszenia ilości oddysocjowanego tlenu z hemoglobiny utlenowanej w tkankach, co jest zjawiskiem bardzo niekorzystnym [3]. Oznaczanie karboksyhemoglobiny znalazło zastosowanie w diagnostyce, ale tylko w przypadku, gdy oznaczenie HbCO wykonane jest w czasie krótszym niż 2-3 godzin od momentu pobrania krwi. Ma to związek z bardzo szybkimi zmianami stężenia karboksyhemoglobiny we krwi pacjenta, w wyniku czego oznaczenie tego parametru po upływie dopuszczalnego czasu nie ma korelacji z aktualnym stanem chorego. Zatrucie CO powoduje również zmiany w innych płynach ustrojowych (np. we krwi obserwuje się wzrost aktywności kinazy kreatynowej i dehydrogenazy mleczanowej, zaś w moczu można stwierdzić obecność mioglobiny, która wskazuje na martwicę mięśni) [3].



Zdjęcie: struktura hemoglobiny, budowa hemu,
<http://pharmacistimes.com/category/human-anatomy-physiology/the-blood/>

Wykrywanie tlenu węgla

Wykrywanie tlenu węgla jest jednym z parametrów stosowanych w diagnostyce i analityce. Poziom powstałej karboksyhemoglobiny służy do szacowania nasilenia zatrucia tlenkiem węgla [6]. Zazwyczaj do wykrywania CO wykorzystywane są metody kolorymetryczne, spektrofotometryczne oraz chromatografię gazową [4]. W badaniach toksykologicznych przyjmuje się, że stężenie we krwi karboksyhemoglobiny (COHb) wynoszące więcej niż 50% jest stężeniem śmiertelnym. Wysycenie krwi tlenkiem węgla w granicach 10% - 50% wskazuje na inhalację gazu zawierającego CO [4]. Mechanizm toksycznego działania tlenu węgla opiera się na blokowaniu transportu tlenu, w wyniku konkurencyjnego wiązania z atomem żelaza w cząsteczce hemu. W wyniku tego tworzona jest karboksyhemoglobina (COHb). Badania wykazały, iż powinowactwo tlenu węgla do hemoglobiny,

ferrytyny i mioglobiny jest ok. 200-300 razy większe niż powinowactwo tlenu. Oddychanie powietrzem zawierającym CO prowadzi do niedotlenienia anemiczno-cytotoksyczno-zastoinowego, ponadto zwolnione zostają procesy metaboliczne, a w komórkach dochodzi do gromadzenia się kwaśnych metabolitów. Co więcej, zmniejsza się napięcie ścian naczyń mózgowych, dochodzi do przekrwienia mózgu oraz rozwinięcia ciężkiej hipoksji tkankowej i kwasicy mleczanowej [4]. Okres półtrwania karboksyhemoglobiny (COHb $t_{1/2}$) u osób z zatruciem CO potraktowanych 100% O₂ często podawany jest jako 80 min. Dane te pochodzą z prac dostarczonych przez Peterson'a JE. i Stuart'a RD.(1970). Wyniki te zostały uśrednione z dwóch pomiarów (od dwóch zdrowych ochotników), którzy oddychali przez maskę z O₂ po eksperymentalnej ekspozycji na CO. Peterson i Stewart (1970) nie mierzyli okresu półtrwania u osób, które uległy przypadkowemu lub celowemu zatruciu CO [5].

Oznaczenie COHb

Karboksyhemoglobina zamiast tlenu w swojej budowie posiada związany tlenek węgla. Hemoglobina ma silne powinowactwo do tlenku węgla, przez co bardzo skutecznie wypiera tlen z cząsteczek, a zatem zakłóca jego dostarczenie. Normalny poziom karboksyhemoglobiny we krwi wynosi od 1% - 3% całkowitej hemoglobiny. Jawne toksyczne objawy zatrucia tlenkiem węgla pojawiają się, gdy stężenie karboksyhemoglobiny osiągnie wartość 15% - 20%. Poziom COHb powyżej 40% wiąże się z pojawieniem się halucynacji i stanem szoku [7].

W praktyce toksykologii sądowej największe zastosowanie w wykrywaniu karboksyhemoglobiny znalazły metody chemiczne, kolorymetryczne, spektrofotometryczne oraz chromatografia gazowa (z różnymi systemami detekcji)- podobnie jak w przypadku wykrywania CO [4].

Otrzymywanie karboksyhemoglobiny (wg Kłyszajko-Stefanowicz L., 2003)

Wykonanie:

Roztwór hemoglobiny należy wysycić gazem świetlnym, w skład którego wchodzi ok. 8% CO (tlenku węgla). W wyniku reakcji zachodzi nieznaczne przesunięcie smugi absorpcyjnej z 578 nm do 572 nm oraz z 540 nm do 535 nm (przejście Hb-O₂ w Hb-CO). W wyniku reakcji nie zachodzi zmiana zabarwienia roztworu- nawet po dodaniu do próbki dwutlenku sodu [2].

Wykrywanie karboksyhemoglobiny na drodze chemicznej (wg Kłyszajko-Stefanowicz L., 2003)

1) Próba Kunkela

Do 2 probówek należy dodać po 1 ml stężonego roztworu Hb-O₂ oraz Hb-CO w stosunku: 1 ml krwi + 1 ml wody. Następnie, do każdej probówki dodać po kilka kropli 3% roztworu taniny, w wyniku reakcji zachodzi zmiana barwy próbek. Osad krwi normalnej ma barwę szaro-różową, zaś osad karboksyhemoglobiny (Hb-CO)przybiera intensywnie różowy kolor. Barwy roztworów nie ulegają zmianie nawet po dłuższym odstaniu próbek.

2) Próba z zasadą

W porcelanowej parownicze należy zmieszać 4 krople krwi z 4 kroplami 25% roztworu wodorotlenku sodu. Próbkę należy ogrzewać na siatce azbestowej (nad płomieniem) przez 1 minutę. Pojawienie się w parownicze czerwonego strątu świadczy o obecności w próbce karboksyhemoglobiny. Pojawienie się zielono-szarego strątu świadczy z kolei o obecności

oksyhemoglobiny [2].

Ilościowe oznaczanie hemoglobiny w obecności amoniaku (wg Homolka J., 1961)

W trakcie hemolizy erytrocytów dochodzi do przemiany hemoglobiny w oksyhemoglobinę. Oksyhemoglobina w obecności dwutlenku sodu oddaje tlen, a sama przekształca się w hemoglobinę. Towarzyszy temu zmiana zabarwienia roztworu na czerwono-fioletowy. Dodanie do próbki rozcieńczonego roztworu amoniaku (o pH=8) zapobiega powstawaniu zmętnienia-powodowanego wytrącaniem się w próbce białek [9].

Wykonanie:

Jako materiał do badań służy krwe pobrana z opuszki palca.

0,1 ml krwi należy mieszać z 9,9 ml 0,04% roztworu amoniaku (NH₃). Do próbki dodać kilka kryształów dwutlenku sodu, całość dokładnie wymieszać, aż do momentu całkowitego rozpuszczenia się kryształów. W wyniku reakcji w próbce pojawia się fioletowe zabarwienie. Zmierzyć wartość absorbancji dla badanego roztworu względem wody przy długości fali różnej $\lambda = 570$ nm. Analogicznie wykonać oznaczenie z wzorcowym roztworem hemoglobiny. Na podstawie otrzymanych wyników należy obliczyć stężenie hemoglobiny w g/100 ml wg wzoru:

$$\mathbf{Hb[g/100\ ml]} = A_{(pr\acute{o}ba\ badana)} / A_{(pr\acute{o}ba\ wzorcowa)} \cdot C_{(wzorca)} \mathbf{[g/100\ ml\ (\%)]} \mathbf{[9].}$$

Ilościowe oznaczenie hemoglobiny metodą cyjanomethemoglobinową (wg Krawczyk J., 1967)

Hemoglobina w reakcji z odczynnikiem Drabkina przechodzi w trwałą pochodną cyjanową - cyjanomethemoglobinę. Maksimum jej absorpcji przypada na $\lambda = 540$ nm. Milimolowy współczynnik absorpcji przy tej długości fali ma wartość 44,0.

Wykonanie:

Do 5 ml odczynnika Drabkina (tj.: w kolbie rozpuścić 0,305 g K₃[Fe(CN)₆], 1 g NaHCO₃, 0,5 g KCN- całość uzupełnić wodą do objętości 1000 ml), a następnie dodać 0,02 ml krwi. Po upływie 15 minutowej inkubacji należy odczytać wartość absorbancji (przy $\lambda = 540$ nm) wobec odczynnika Drabkina.

Obliczenia: na podstawie otrzymanych wyników oblicza się stężenie hemoglobiny, przyjmując wartość 44 dla milimolowego współczynnika absorpcji (me) przy 540 nm.

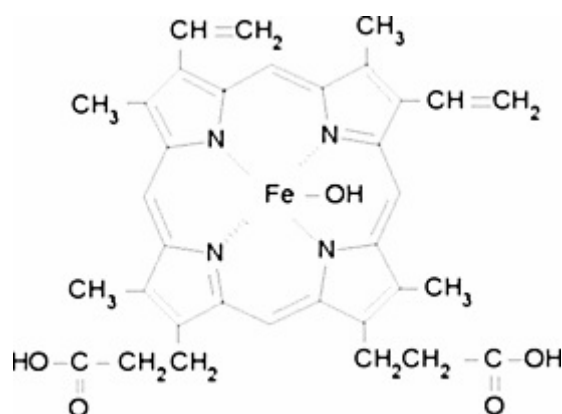
$$\mathbf{Hb[g/100\ ml]} = A \cdot \text{masa molowa Hb} \cdot \text{rozcieńczenie krwi} / \text{me} \cdot 10 \cdot 100 = A \cdot 64 \cdot 400 \cdot 251 / 44 \cdot 10\ 000 = A \cdot 36,7 \mathbf{[10].}$$

Hematyna

Hematyna zaliczana jest do pochodnych hemu, w budowie której wyróżnia się trójwartościowy atom żelaza (Fe³⁺). Związek ten powstaje z hemoglobiny bądź z hemu pod wpływem działania bardzo

silnych związków utleniających. Krystalizacja hematyny jest niezbędnym składnikiem fizjologii pasożytów malarii. Uważa się, że leki przeciwmalaryczne mają zdolność hamowania krystalizacji, dzięki czemu pasożyty wystawione są na toksyczne działanie rozpuszczalnej hematyny. Dlatego też, poznanie mechanizmów hamowania krystalizacji hematyny jest kluczowe dla projektowania nowych leków [11].

Główną przeszkodą w badaniach mikroskopowych, spektroskopowych i krystalograficznych dotyczących krystalizacji hematyny były problemy z otrzymaniem dużych kryształów hematyny w warunkach identycznych, jakie stwarzają pasożyty malarii. Dzięki badaniom, Olafson KN. i wsp. (2014) opracowali biomimetyczną metodę powtarzalnego wzrostu dużych kryształów hematyny, osiągających długość 50 μm . W badaniach naśladowano wakuole trawienne pasożyta *Plasmodium falciparum* przez zastosowanie dwufazowego roztworu oktanolu i buforu cytrynowego. Pomiędzy fazą wodną i organiczną powstają „zarodki” kryształów, gdzie uporządkowane warstwy cząsteczek oktanolu służą jako substrat do tworzenia tychże „zarodków”. Powstałe „zarodki” przenoszone są następnie do oktanolu nasyconego hematyną w kontakcie z buforem cytrynowym. Kryształy rosną w warstwie organicznej (oktanol), gdy bufor dostarcza jony wodorowe niezbędne do wiązania cząsteczek hematyny w kryształy. Dostępność dużych cząsteczek hematynowych otwiera nowe możliwości dla badań hematynowej detoksykacji pasożytów malarii w erytrocytach gospodarza [11], [12].



Zdjęcie: Hematyna, <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h3281?>>

Otrzymywanie kwasowej hematyny (wg Kłyszajko-Stefanowicz L., 2003)

Wykonanie:

Jako materiał do doświadczenia wykorzystuje się 10x rozcieńczoną krew do której należy dodać kilka kropli 2 M roztworu kwasu solnego. W wyniku reakcji roztwór zmienia kolor na brunatny, co jest wynikiem zachodzącego rozkładu hemoglobiny (hemoglobina rozpada się na globinę oraz kwasową hematynę). Z hematyny w obecności jonów Cl⁻ powstaje chlorowodorek hematyny (znany jako hemina). Brunatne zabarwienie heminy może być wykorzystywane do oznaczania hemoglobiny [2].

Berczeller L.(1918) i Wu H. (1922) w swoich badaniach donosili, że pojawianie się zabarwienia w metodzie służącej do wykrywania kwasowej hematyny, związane jest z obecnością w osoczu niehemoglobinowych substancji. Wniosek ten spowodował, że Wu H. (1922) wprowadził swoją własną metodę oznaczania alkalicznej hematyny, jednakże metoda ta nigdy nie została dokładnie oceniona. Błędne wyniki w alkalicznej metodzie Wu H. (1922) uzyskiwano na różnych etapach badania nawet

wtedy, gdy z osocza usuwano wszystkie potencjalne zanieczyszczenia, a analizę przeprowadzano na separowanych komórkach.

W swoich badaniach Ponder E. (1942) analizował błędy związane z alkaliczną metodą wprowadzoną przez Wu H. (1922). Jako materiał do badań wykorzystywano pełną krew ludzką lub upakowane czerwone krwinki (wirowane przez 2h z szybkością 4000 rpm/minutę). Oznaczanie hemoglobiny przeprowadzano w temperaturze pokojowej z wykorzystaniem metod służących do określania kwasowej i alkalicznej hematyny (jak to opisali Peters JP. i Van Slyke DD., 1932). Otrzymane wyniki porównywano z wynikami oznaczania hemoglobiny zmodyfikowaną metodą Wong'a (1942) na podstawie zawartości żelaza, zakładając, że hemoglobina zawiera 336 mg/dL żelaza [13]. Metoda oznaczania hematyny kwasowej w upakowanych erytrocytach nie była do końca wiarygodna, gdyż pojawiające się w trakcie oznaczenia zmiany zabarwienia, świadczące o zajściu reakcji zmieniały się w próbkach w różnych czasach i z różnym natężeniem. Wartości obliczanego stężenia hemoglobiny metodą kwasową nie były porównywalne do metody, gdzie na podstawie zawartości żelaza w próbce obliczano stężenie hemoglobiny. Próby wykrycia tych błędów podjął Peters i Van Slyke, opierając się na założeniu, że duże rozbieżności w oznaczaniu kwasowej hematyny są większe niż w metodzie oznaczania żelaza, ponieważ rozwijający się w próbkach kolor zależy od substancji innych niż hemoglobina. Stwierdzono, że osocze zawiera takie substancje jak lipidy i pigmenty, które wpływają na rozproszenie pochodnych hemoglobiny (hematyny) i ich absorpcję barw. Wniosek ten nie został ogólnie uznany, jednakże w doświadczeniach z hematyną alkaliczną usuwano osocze z komórek, co automatycznie powodowało zanik zakłóceń w metodzie [13].

Autor: Lidia Koperwas

Literatura:

- [1]. Total hemoglobin Measurements: accuracy of laboratory devices and impact of Physiologic variation, 2009. Technical Bulletin, <http://www.masimo.com/pdf/sphb/lab5447a.pdf>
- [2]. Kłyszajko-Stefanowicz L, 2003. Ćwiczenia z biochemii. Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003, s. 585-587
- [3]. http://www.emedea.pl/pacjent/opisbadania/karboksyhemoglobina_hbco_krew
- [4]. Nowicja J., Grabowska T., Kulikowska J., Celiński R., Korczyńska M., Drożdżiak K., 2011. Metody oznaczania tlenu węgla we krwi sekcijnej- zalety i ograniczenia. ARCH. MED. SĄD. KRYMINOL., 2011, LXI, 75-79. Prace poglądowe. http://www.amsik.pl/archiwum/1_2011/1_11n.pdf
- [5]. Lindell K., Weaver MD., Howe S., Hopkins R., Chan J.K., 2000. Carboxyhemoglobin Half-life in Carbon Monoxide-Poisoned Patients Treated With 100% Oxygen at Atmospheric Pressure. Clinical Investigations in Critical Care | March 2000. Chest. 2000;117(3):801-808. <http://journal.publications.chestnet.org/article.aspx?articleid=1078676>
- [6]. Myers RA., Britten JS., 1989. Are arterial blood gases of value in treatment decisions for carbon monoxide poisoning?. Crit Care Med. 1989 Feb;17(2):139-42. Abstract: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2644066>
- [7]. Question: How do the presence of methemoglobin and carboxyhemoglobin affect InSpectra™ StO2 Measurements?. 2014 Hutchinson Technology Incorporated. http://www.htbiomeasurement.com/technology/faq/methemoglobin_and_carboxyhemoglobin/
- [8]. Gladwin M.T., Kim-Shapiro D.B., 2008. The functional nitrite reductase activity of the heme-globins. Blood: 112 (7), 2008. <http://www.bloodjournal.org/content/112/7/2636?sso-checked=true>
- [9]. Homolka J., 1961. Diagnostyka biochemiczna. PZWL, Warszawa, s. 268.

[10]. Krawczyński J., Osiński T., 1967. Laboratoryjne metody diagnostyczne. PZWL, Warszawa, s.135-138.

[11]. Olafson KN., Rimer J.D., Vekilov PG., 2014. Growth of Large Hematin Crystals in Biomimetic Solutions. ACS Publication, <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cg5002682>

[12]. Kumar S., Guha M., Choubey V., Maity P., Bandyopadhyay U., 2006. Antimalarial drugs inhibiting hemozoin (β -hematin) formation: A mechanistic update. Life Science, Elsevier, Volume 80, Issue 9, 6 February 2007, Pages 813-828

[13]. Ponder E., 1942. ERRORS AFFECTING THE ACID AND THE ALKALI HEMATIN METHODS OF DETERMINING HEMOGLOBIN. J. Biol. Chem. 1942, 144: 339-342

<https://laboratoria.net/arttykul/22474.html>

Informacje dnia: [Nośniki eków po 14 miesiącach na Międzynarodowej Stacji Kosmicznej Flexicon FPC50 w dydaktyce pracy laboratoryjnej Blisko 2,8 mln zł na badania nad terapią Studenci AGH zaprezentowali swój najnowszy bolid elektryczny](#) [Naukowcy sprawdzili, czy protony są wieczne](#) [Polska wśród krajów z najniższym poziomem stresu psychicznego](#) [Nośniki eków po 14 miesiącach na Międzynarodowej Stacji Kosmicznej Flexicon FPC50 w dydaktyce pracy laboratoryjnej Blisko 2,8 mln zł na badania nad terapią Studenci AGH zaprezentowali swój najnowszy bolid elektryczny](#) [Naukowcy sprawdzili, czy protony są wieczne](#) [Polska wśród krajów z najniższym poziomem stresu psychicznego](#)

Partnerzy