

---

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ

*Пупкова В.И*

*Информационно-методическое пособие*

Кольцово, 2001

---

## Уважаемые коллеги!

*В данной брошюре приводятся основные сведения по строению, свойствам и методам определения гемоглобина. В работе рассматриваются наиболее используемые колориметрические методы - гемиглобинцианидный и гемихромный. Несмотря на кажущуюся простоту анализа, правильность определения гемоглобина невелика, поэтому подробно изложены методики и способы проведения анализа, позволяющие избежать различных погрешностей и получать правильные результаты; указаны источники возможных погрешностей.*

*Надеюсь, что данные материалы помогут Вам в Вашей благородной работе.*

*С уважением - Пупкова Валентина Ивановна, заведующая лабораторией аналитической биохимии, к.х.н.*

---

## СОДЕРЖАНИЕ

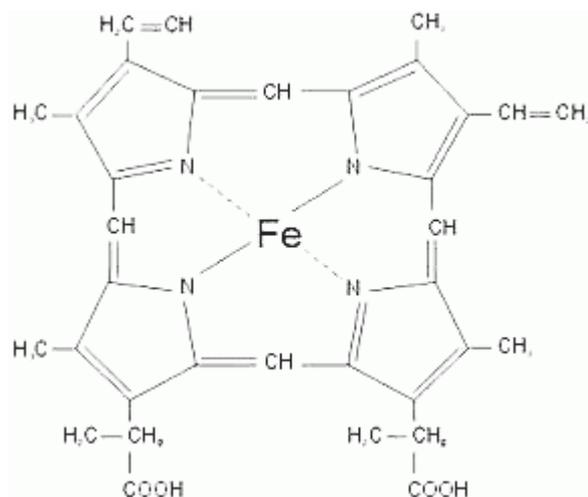
[ОСНОВНЫЕ ФУНКЦИИ. СТРОЕНИЕ. СВОЙСТВА](#)  
[МЕТОДЫ АНАЛИЗА](#)  
[ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ](#)

---

## **ОСНОВНЫЕ ФУНКЦИИ. СТРОЕНИЕ. СВОЙСТВА**

Гемоглобин - основной дыхательный пигмент и главный компонент эритроцита, выполняющий важные функции в организме человека: перенос кислорода из легких в ткани и углекислого газа из тканей в легкие. Он также играет существенную роль в поддержании кислотно-основного равновесия крови. Буферная система, создаваемая гемоглобином, способствует сохранению рН крови в определенных пределах.

Гемоглобин - красный пигмент крови человека и животных. Подсчитано, что в одном эритроците содержится около  $\sim 340000000$  молекул гемоглобина, каждая из которых состоит примерно из  $10^3$  атомов. В крови человека в среднем содержится  $\sim 14,5\%$  гемоглобина, его общее количество  $\sim 750$  г. Гемоглобин представляет собой сложный белок, относящийся к группе гемопротеинов; белковый компонент в котором представлен глобином, небелковый - простетической группой. Простетическая группа в молекуле гемоглобина представлена 4 одинаковыми железопорфириновыми соединениями, которые называются гемами. Молекула гема состоит из порфирина IX, связанного с железом двумя атомами азота ковалентными и двумя другими атомами азота координационными связями. Атом железа (II) расположен в центре гема и придает крови характерный красный цвет, степень его окисления не изменяется независимо от присоединения или отдачи кислорода.



Видовые различия гемоглобина обусловлены химическим составом и строением глобина. Гемоглобины представляют собой тетрамерные белки, молекулы которых образованы различными типами полипептидных цепей, обозначаемых как  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . В состав молекулы входят по 2 полипептидные цепи двух разных типов, каждая из которых оборачивает 1 гем гемоглобина. Гемоглобины различных видов различаются вторичной, третичной и четвертичной структурами, и индивидуальные свойства гемоглобинов неразрывно связаны с их структурами. Известно, что гемоглобин человека состоит из двух равных половин, каждая из которых образована двумя одинаковыми полипептидными цепями. У человека обнаружены гемоглобины различных типов, которые отличаются по химическому строению. В крови взрослого человека содержится гемоглобин А (HbA), состоящий из  $\alpha_2\beta_2$  цепей. В дополнение к основному HbA в крови взрослого человека обнаружен гемоглобин A<sub>2</sub> (HbA<sub>2</sub>), на долю которого приходится ~ 2,5% от всего гемоглобина. Кроме того, известен фетальный гемоглобин F (HbF) - гемоглобин новорожденных, имеющий структуру  $\alpha_2\gamma_2$ , и отличающийся от HbA вторичной, третичной и четвертичной структурами, что обуславливает их различия: по спектральным характеристикам, электрофоретической подвижности, устойчивости к тепловой денатурации и др. Кровь новорожденного ребенка состоит на ~ 80% из HbF, который к концу первого года жизни почти целиком заменяется на HbA (в крови взрослого человека содержится до ~ 1,5% HbF от общего количества гемоглобина).

Незначительное изменение аминокислотного состава глобина, иногда замена лишь одной аминокислоты, оказывается достаточным для полного изменения свойств гемоглобина. Так, замена в HbA глутаминовой кислоты на валин обуславливает появление гемоглобина S (HbS), который имеет структуру  $\alpha_2s_2$  и обнаружен у больных серповидно-клеточной анемией. HbS по ряду свойств отличается от нормального гемоглобина. После отдачи кислорода в тканях он превращается в плохо растворимую форму и выкристаллизовывается в эритроцитах, вызывая их деформацию (образование серповидных форм), что и приводит к нарушению функции крови.

Гемоглобин - кристаллическое вещество, хорошо растворимое в воде и нерастворимое в спирте, эфире и хлороформе. В эритроцитах гемоглобин находится в растворенном состоянии, несмотря на то, что его содержание более 30%. При изменении аминокислотного состава глобина может произойти и изменение его растворимости, как у HbS.

Растворы гемоглобина окрашены в темно-красный цвет и имеют характерные спектры поглощения в ультрафиолетовой и видимой областях спектра. Изоэлектрическая точка гемоглобина ~ 7. В кислой и щелочной среде гемоглобин легко денатурируется, скорость

денатурации различна у различных видов гемоглобинов. В кислой среде связь между гемом и глобином легко разрывается. Свободный гем легко окисляется кислородом воздуха до гематина, в котором атом железа трехвалентен.

Наиболее характерным свойством гемоглобина является обратимое присоединение газов  $O_2$ , CO и др. Образовавшиеся при этом соединения называются оксигемоглобином и карбоксигемоглобином, соответственно. Реакция присоединения молекулярного кислорода не является истинным окислением гемоглобина, так как валентность железа в гене при этом не изменяется, и эту реакцию правильнее называть оксигенацией. Истинное окисление гемоглобина происходит только тогда, когда железо переходит в трехвалентное состояние.

В крови гемоглобин существует по крайней мере в четырех формах: оксигемоглобин, дезоксигемоглобин, карбоксигемоглобин, метгемоглобин. В эритроцитах молекулярные формы гемоглобина способны к взаимопревращению, их соотношение определено индивидуальными особенностями организма.

### **Клиническое значение**

- *Снижение* концентрации гемоглобина: анемии.

*Повышение* концентрации гемоглобина: полицитемия, гемоконцентрация при дегидратации, ожогах, кишечной непроходимости, упорной рвоте; пребывание на больших высотах, чрезмерная физическая нагрузка или возбуждение; сердечно-сосудистая патология, обычно врожденная, приводящая к значительному венозному сбросу; заболевания легких, приводящие к снижению легочной перфузии, плохой аэрации легких, легочной артериальной фистуле; хроническое химическое воздействие нитритов, сульфонамидов, вызывающих образование мет- и сульфогемоглобина.

**Нормальные величины:** у мужчин 130-160 г/л; у женщин; 120-140 г/л.

Содержание гемоглобина обычно ниже у недоношенных, чем у доношенных новорожденных. Содержание гемоглобина снижается на ~ 10% в промежутке времени от 17 до 07 час утра, а также после еды. Снижение гемоглобина от нормальных величин на ~ 6% наблюдается при взятии пробы в положении лежа. Незначительное, но диагностически значимое, снижение нижнего порога нормальных величин гемоглобина встречается у мужчин возрастной группы 65-74 года.

## **МЕТОДЫ АНАЛИЗА**

### **Общая характеристика методов**

Определение содержания гемоглобина в крови человека является одним из самых важных и массовых показателей. Для определения гемоглобина чаще всего анализируют производные гемоглобина, образовавшиеся в процессе его окисления и присоединения к нему различных химических групп, приводящих к изменению валентности железа и окраски раствора.

Из “старых” методов, все еще применяемых в ряде лабораторий, остановимся на следующих: сапониновом и методе Сали.

При использовании сапонинового метода тельца Гейнца не растворяются, раствор остается мутноватым, за счет чего может меняться спектр поглощения раствора, и ошибка при этом достигает 20-30%.

В методе Сали измеряется гематин, образовавшийся при взаимодействии гемоглобина с соляной кислотой. Метод основан на визуальной оценке содержания гемоглобина путем сравнения окраски исследуемой пробы со стандартными растворами солянокислого гематина. Ошибка метода достигает ~ 30%, на результаты определения влияют многие факторы: время реакции между гемоглобином и соляной кислотой, которое может колебаться от 2 до 40 мин в зависимости от содержания белков крови; оттенок цвета геминхлорида, зависящий от содержания билирубина в крови; характера освещения и пр.

Химические и спектрофотометрические методы имеют высокую точность и рекомендуются в качестве референсных, но из-за трудоемкости и значительной стоимости анализа для рутинных определений не применяются.

Для рутинных лабораторных исследований наиболее предпочтительны колориметрические методы, как наиболее дешевые, простые и быстрые в исполнении. Кровь человека - это нормальная смесь производных гемоглобина с различными спектрами поглощения. При количественном определении гемоглобина колориметрическими методами возникает проблема в выборе реагента, который превращал бы все производные гемоглобина только в одну форму перед фотометрическим анализом. Лучшими методами, количественно превращающими гемоглобин в его производные, оказались гемиглобинцианидный (HbCN), гемихромный (HbChr) и гемиглобиназидный (HbN<sub>3</sub>), которые при фотометрировании дают наименьшую ошибку определения среди других методов анализа. Однако, некоторые данные не позволяют использовать гемиглобиназидный метод в качестве альтернативного в силу следующих причин: конечный продукт превращения гемоглобина - HbN<sub>3</sub> имеет слабый пик поглощения при  $\lambda = 540$  нм, что не дает возможности использовать фотометры с широкополосными фильтрами; иногда возникают проблемы, связанные с мутностью растворов; и наконец, раствор HbN<sub>3</sub> не хранится при комнатной температуре. Напротив, гемиглобинцианидный и гемихромный методы лишены этих недостатков и при дальнейших исследованиях им было отдано предпочтение.

### ***Интерференция при всех колориметрических методах анализа***

*Повышение гемоглобина:* гипертриглицеридемия, количество лейкоцитов более  $25 \times 10^9$ /л, прогрессирующие заболевания печени, наличие легко преципитирующихся глобулинов (при миеломной болезни или при макроглобулинемии Вальденстрема).

- *Понижение гемоглобина:* у заядлых курильщиков вследствие образования неактивного HbCO.

### **Гемиглобинцианидный метод**

*Принцип гемиглобинцианидного метода* основан на переводе всех форм гемоглобина в одну - гемиглобинцианид. Перевод гемоглобина в гемиглобинцианид осуществляется при его взаимодействии с трансформирующим раствором, содержащим феррицианид калия, цианид калия, дигидрофосфат калия и неионный детергент. Дигидрофосфат калия поддерживает уровень pH, при котором реакция проходит за 3-5 минут. Детергент усиливает гемолиз эритроцитов и предотвращает мутность, связанную с белками плазмы. Феррицианид калия окисляет все формы гемоглобина в метгемоглобин, который образует с цианистым калием гемиглобинцианид, имеющий красноватый цвет, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации гемоглобина в пробе.

*Характеристика метода*

Гемиглобинцианидный метод, разработанный в 1936 г Дробкиным, был одобрен Международным Комитетом по стандартизации в гематологии (ICSH) в 1963 г.

Экспериментальное изучение данного метода для его стандартизации в гемиглобинометрии имело следующие главные цели: найти точное значение коэффициента молярной экстинкции для HbCN при  $\lambda = 540$  нм; разработать требования для получения калибровочного раствора HbCN, обеспечивающие его стабильность в течение нескольких лет; усовершенствовать процедуру анализа при определении гемоглобина для снижения экспериментальных ошибок; оценить надежность других методов в сравнении с гемиглобинцианидным. На основе широкомасштабных исследований был определен коэффициент молярной экстинкции гемиглобинцианида, равный 11,00 ( $\epsilon_{540} = 11,00$ ), и выработаны требования к его качеству.

Основные достоинства гемиглобинцианидного метода:

- HbCN является стабильным производным гемоглобина, и все имеющиеся в крови формы гемоглобина могут быть быстро и количественно превращены в HbCN;
- спектр поглощения HbCN имеет плоский максимум при  $\lambda = 540$  нм, поэтому достаточная точность анализа возможна при измерении оптической плотности на фотометрах даже со светофильтрами;
- растворы HbCN строго подчинены закону Ламберта-Бера при  $\lambda = 540$  в широком диапазоне концентраций;
- калибровочный раствор HbCN устойчив в течение нескольких месяцев и даже лет.

### **Реагенты, необходимые для количественного определения гемоглобина**

#### *Трансформирующий реагент*

Назначение трансформирующих реагентов переводить все формы гемоглобина в гемиглобинцианид. Оптимальный состав и чистота исходных компонентов для трансформирующего раствора, предложенные Van Kampen и Zijlstra, позволяют количественно трансформировать все формы гемоглобина в гемиглобинцианид, получать результаты через 3-5 мин, которые практически не зависят от присутствия белков плазмы крови.

Состав трансформирующего раствора:  $K_3Fe(CN)_6$ , 200 мг; KCN, 50 мг;  $KH_2PO_4$ ; 140 мг; неионные детергенты типа Nonic 218, Nonidet P-40, Triton X-100 по 1 мл/л. Все компоненты растворяют и разбавляют до 1 л дистиллированной водой; pH приготовленного раствора должен быть в пределах 7,0-7,4.

#### *Модификации трансформирующего реагента*

Для гемиглобинцианидного метода оптимальный состав трансформирующего реагента указан выше. В некоторых коммерческих наборах реагентов, предназначенных для определения гемоглобина, состав и концентрация исходных компонентов трансформирующего реагента отличаются от оригинала. Так, KCN часто заменяют ацетонциангидрином,  $KH_2PO_4$  -  $NaHCO_3$ ; во многих наборах детергенты исключены совсем. Однако, замена рекомендуемых компонентов в определенной концентрации приводит к увеличению времени выхода реакции на устойчивые показатели оптической плотности (20 мин против 5) и меньшему сроку сохранности трансформирующего раствора.

Для устранения влияния некоторых компонентов, присутствующих в крови, в состав трансформирующих реагентов вводят соответствующие добавки. Введение липазы устраняет влияние липидов; увеличение концентрации  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  - солей аммония; введение метанола, этанола, этиленгликоля устраняет распад компонентов реагента при его замерзании. Эти добавки не влияют на правильность результатов анализа.

#### *Калибровочный раствор гемиглобинцианида*

При определении гемоглобина трансформирующий реагент только переводит все его формы в стойкое соединение гемиглобинцианид, но не определяет точность процедуры измерения гемоглобина. Для гарантии точности метода применяют калибровочные растворы с точно установленной концентрацией гемоглобина. Международный (стандартный) калибровочный раствор гемиглобинцианида готовится от имени ICSH и служит для аттестации коммерческих калибровочных растворов. Допустимая ошибка определения гемоглобина при использовании Международного калибровочного раствора - менее  $\pm 2\%$ .

Калибровочные растворы гемиглобинцианида получают, как правило, путем введения высокоочищенного раствора гемоглобина в трансформирующий раствор. Международный комитет по стандартизации в гематологии начал работу по стандартизации калибровочного раствора гемиглобинцианида в 60-х гг. Первый образец гемиглобинцианида был предложен ВОЗ в 1967 г., но в последующие годы (1980, 1981, 1983) еще проводились уточнения его характеристик, и только в 1985 г. был установлен международный стандарт гемиглобинцианида, отвечающий всем требованиям, сформулированным ICSH.

#### *Контрольные растворы гемоглобина*

Использование калибровочных растворов позволяет точно определить концентрацию гемоглобина в крови, если при анализе не было допущено различных погрешностей. Погрешности можно выявить с помощью контрольных растворов гемоглобина. Контрольные растворы гемоглобина - это высоко очищенные имитаторы крови человека, не содержащие примесей, искажающих результаты анализа. Концентрация гемоглобина в контрольных растворах определена с точностью  $\pm 2\%$ . Аттестация этих растворов проводится на фотометрах высокого класса точности при использовании дозаторов с погрешностью дозирования менее  $1\%$ .

Наличие панели наборов реагентов для определения гемоглобина в крови: трансформирующего реагента, калибровочных растворов гемиглобинцианида и контрольных растворов гемоглобина обеспечивает возможность получения результатов с погрешностью, не превышающей  $\pm 2\%$ .

#### **Требования безопасности при работе с раствором, содержащим цианистые соединения**

При всех положительных параметрах гемиглобинцианидного метода большим его недостатком является то, что он основан на применении ядовитых цианистых соединений (о чем уже как-то и забыли). Вместо цианистого калия многие применяют маскированный цианид - ацетонциангидрин, который в процессе приготовления трансформирующего раствора распадается с образованием цианид-иона. Характер действия ацетонциангидрина на человека сходен с действием синильной кислоты, но эффект развивается медленнее. Ацетонциангидрин всасывается через кожу и может вызывать тяжелые отравления. Его предельно-допустимая концентрация (ПДК) составляет  $0,9 \text{ мг/м}^3$ , класс опасности 2.

В НИИ экологии человека НЦМЭ Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН показали, что хроническая интоксикация цианистыми соединениями проявляется у людей в виде гиперплазии щитовидной железы с соответствующими изменениями гормонального фона.

Для работы с цианистыми соединениями необходимо соблюдение специальных мер предосторожности: применение фильтрующих противогазов, спецодежды; оснащение рабочего места местной и общей вытяжной вентиляцией; необходимостью проведения контроля за концентрацией ацетонциангидрина в воздухе, тщательную герметизацию аппаратуры и ее продувание перед началом работы

## **Гемихромный метод**

С развитием методов анализа для определения гемоглобина в крови разработан новый колориметрический метод, не содержащий в составе реагентов цианистых соединений, которые заменены жирными кислотами с феррицианидом калия или поверхностно-активными веществами, лучший из которых - додецилсульфат натрия (SDS).

### *Принцип гемихромного метода*

Принцип гемихромного метода основан на переводе всех форм гемоглобина в одну - гемихром. При взаимодействии гемоглобина с трансформирующим раствором, содержащим жирные кислоты с феррицианидом калия или додецилсульфат натрия, происходит его превращение в окисленную низкоспиновую форму - гемихром (HbChr), имеющую красноватый цвет, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации гемоглобина в пробе.

### *Характеристика метода*

Гемихромный метод определения гемоглобина в крови разработан Ахрем А.А. с соавторами в 1986 г. Набор реагентов для определения гемоглобина в крови, основанный на данном методе, одобрен Комитетом по новой медицинской технике МЗ РФ и рекомендован к применению в клинико-диагностических лабораториях уже в 1998 г.

Основные достоинства гемихромного метода:

- гемихром - стабильное производное гемоглобина, и все имеющиеся в крови формы гемоглобина могут быть быстро и количественно превращены в HbChr;
- спектр поглощения HbChr имеет плоский максимум вблизи  $\lambda = 540$  нм (533), поэтому достаточная точность анализа возможна при измерении оптической плотности на фотометрах даже со светофильтрами;
- растворы HbChr строго подчинены закону Ламберта-Бера при  $\lambda = 540$  нм в широком диапазоне концентраций;
- калибровочный раствор HbChr устойчив в течение нескольких месяцев и даже лет;
- трансформирующий реагент не ядовит и безвреден: в его составе не содержится цианистых соединений.

Молярный коэффициент экстинкции HbChr при  $\lambda = 540$  нм равен  $\sim 10,14$  ( $\epsilon_{540} \simeq 10,14$ ).

#### *Сравнение гемихромного и гемиглобинцианидного методов*

При широкомасштабных испытаниях гемихромного метода было показано, что в интервале концентраций гемоглобина от 40 до 200 г/л калибровочные графики гемиглобинцианида и гемихрома представляют прямую линию, выходящую из начала координат, а близкие углы наклона прямых указывают на сопоставимость обоих методов.

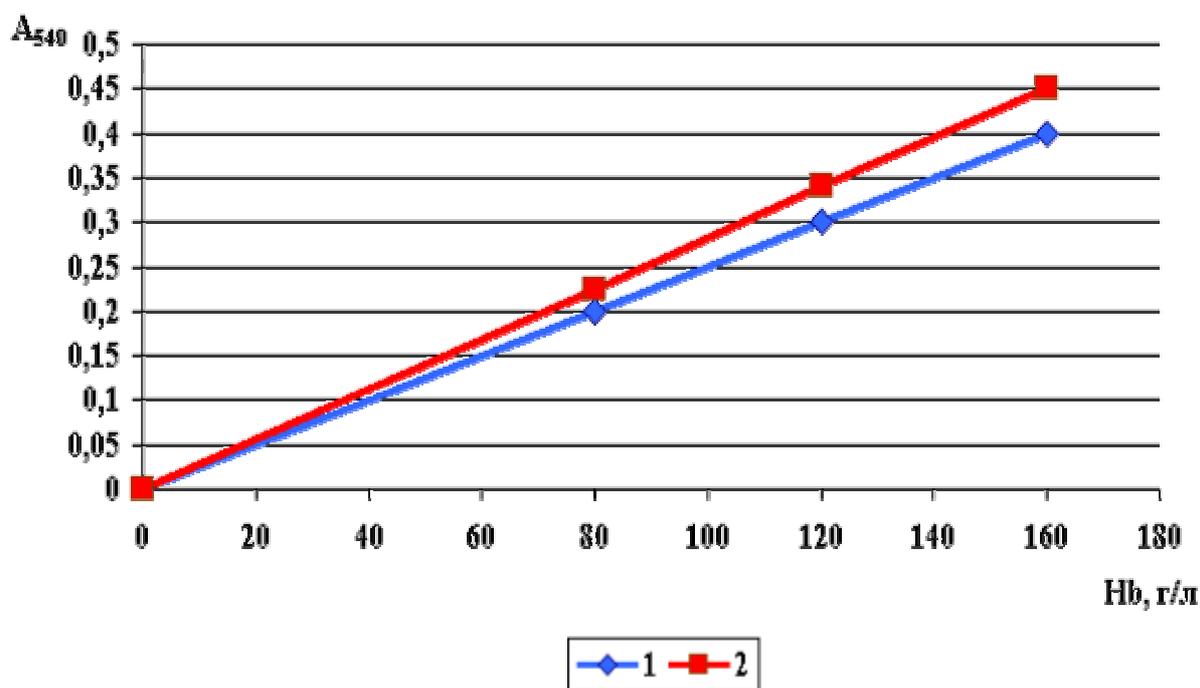


Рис.1 Величина оптической плотности гемихрома (1) и гемиглобинцианида (2)

При определении гемоглобина двумя методами Ахрем А.А. с соавторами показали, что большую точность (и меньшую  $s$ ) дает гемихромный метод. Авторы предполагают, что SDS способствует солюбилизации мембранных частиц и препятствует адсорбции белка на стекле пробирок и кювет, тем самым обеспечивается высокая точность анализа.

Сравнительная оценка результатов определения гемоглобина в крови двумя методами показала, что результаты сопоставимы, а коэффициент корреляции методов составляет 0,99.

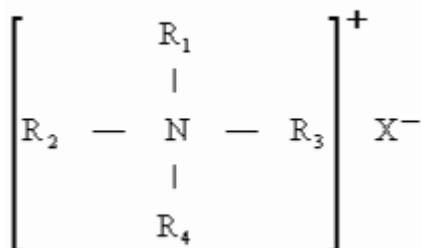
Таким образом, гемихромный метод определения гемоглобина в крови обладает всеми достоинствами гемиглобинцианидного метода, которые дополняются отсутствием в составе трансформирующего реагента высокотоксичных цианидов и других ядовитых веществ.

#### **Реагенты, необходимые для определения гемоглобина**

##### *Трансформирующие реагенты*

Для перевода гемоглобина в HbChr имеется несколько трансформирующих реагентов, отличающихся по составу:

- четвертичные аммониевые соли с ПАВ (третон X -100, бридж - 35), имеющие общую формулу:



где:

R<sub>1</sub> - R<sub>3</sub> - короткие алкильные группы, содержащие от 1 до 4 атомов углерода;

R<sub>4</sub> - алкильная группа, содержащая от 12 до 16 атомов углерода;

X - галоген.

- соли жирных кислот (C<sub>14</sub> - C<sub>20</sub>) с феррицианидом калия и ЭДТА в трисовом буфере;

- SDS.

Из перечисленных трансформирующих реагентов лучшим является SDS. Максимальная скорость превращения гемоглобина в HbChg отмечена именно при его взаимодействии с SDS, полное превращение которого происходит за 5 мин. Высокая скорость реакции позволяет использовать данный метод в качестве **экспресс-метода** и применять для определения гемоглобина при неотложных состояниях. Спектр поглощения HbChg в области 540 нм имеет большое сходство со спектром поглощения гемиглобинцианида.

#### *Калибровочный раствор гемихрома*

До последнего времени в практике гемихромного метода не было калибровочных растворов гемихрома и концентрацию гемоглобина в крови определяли по-разному. Наиболее часто расчет производили по коэффициенту молярной экстинкции, который по данным различных авторов находится в пределах 9,86-10,45. Есть несколько патентов российских ученых по созданию калибровочных растворов гемихрома, однако ни один из них пока не был внедрен в практику.

В качестве калибровочного раствора для гемихромного метода авторы и разработчики панели наборов реагентов для гемиглобинцианидного метода (Козлов А.А. с соавторами) предлагают использовать контрольный раствор гемоглобина, аттестованный с высокой степенью точности. Однако, использование контрольного раствора гемоглобина не адекватно применению готового калибровочного раствора (на что ранее указывали эти же авторы) по следующим причинам: с контрольным раствором гемоглобина необходимо проводить все операции, предусмотренные методикой определения гемоглобина, вследствие чего неизбежны ошибки при разведении растворов; его невозможно использовать для калибровки приборов, так как это не готовый раствор гемихрома, а проба крови, требующая соответствующей обработки и подготовки. Исходя из этого, применение контрольного раствора гемоглобина, как калибратора, не рекомендуется.

В 1998 г. Пупковой В.И. с соавторами разработан, запатентован и внедрен в практику Набор реагентов для определения гемоглобина гемихромным методом, содержащий калибровочный раствор гемихрома. Набор зарегистрирован в МЗ РФ и рекомендован к применению. Калибровочный раствор гемихрома обладает достаточной стабильностью (не менее 1 года) и обеспечивает высокую точность измерения гемоглобин при  $\lambda = 540$  нм. Созданный калибровочный раствор гемихрома соответствует всем требованиям,

предъявляемым к калибровочным растворам: это стерильный водный раствор, разлитый в ампулы из светозащитного стекла, прозрачен, его чистота:  $A_{533}/A_{498}$  - в пределах 1,59-1,63;  $A_{750} \leq 0,002$  (при длине оптического пути 10 мм).

Аттестация калибровочных растворов гемихрома проводится опосредованно относительно Государственного калибровочного раствора гемиглобинцианида с погрешностью, не превышающей  $\pm 2\%$ , поэтому и результаты одной пробы, полученные обоими методами, сопоставимы: их расхождение также не превышает  $\pm 2\%$ . При теоретическом молярном коэффициенте экстинкции гемиглобинцианида, равном 11,00, молярный коэффициент экстинкции гемихрома составляет  $\sim 10,14$ . Эту величину предстоит еще уточнить.

#### *Контрольные растворы гемоглобина*

Для гемихромного метода используются те же самые контрольные растворы гемоглобина, что и для гемиглобинцианидного метода.

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГЕМОГЛОБИНА В КРОВИ

**Проба и требование к ней:** свободнотекущая капиллярная или венозная кровь; в качестве антикоагулянтов - ЭДТА, гепарин, аммоний или калий оксалаты. Проба стабильна 48 час при  $4^\circ \text{C}$  или 24 час при  $23^\circ \text{C}$ .

#### **Преаналитическая фаза**

Укажем на некоторые факторы, связанные с отбором пробы и составом исследуемой крови, которые обуславливают получение заведомо неправильного результата:

- при взятии капиллярной крови не допускается чрезмерное давление или выжимание крови, вызывающее выход межклеточной жидкости, которая разбавляет пробу крови и приводит к ошибочно низкой концентрации гемоглобина;
- наложение жгута на руку более, чем на одну минуту может привести к пролонгированному сосудистому стазу и ошибочно высокой концентрации гемоглобина в венозной крови;
- использование негомогенной пробы, полученной при недостаточном перемешивании;
- липимическая кровь;
- кровь, содержащая большое количество лейкоцитов.

#### **Оборудование**

- Фотоэлектрические гемоглобинометры. Приборы измеряют концентрацию гемоглобина; на дисплее сразу выдается концентрация гемоглобина в г/100 (или 1000) мл. Эти приборы прокалиброваны калибровочными растворами гемиглобинцианида или гемихрома в зависимости от применяемого метода. Гемоглобинометры необходимо регулярно проверять и настраивать по калибровочным растворам.
- Фотометры со светофильтрами. Приборы измеряют оптическую плотность; при этом необходимо использовать светофильтры, поглощающие свет вблизи  $\lambda = 540 \text{ нм}$ . Расчет концентрации гемоглобина проводится по калибраторам или калибровочному графику, построенному с использованием гемихромных или гемиглобинцианидных калибровочных растворов.
- Спектрофотометры. Приборы измеряют оптическую плотность при  $\lambda = 540 \text{ нм}$ . Расчет концентрации гемоглобина проводят по калибратору или по калибровочному

графику, построенному с использованием гемихромных или гемиглобинцианидных калибровочных растворов, а также по коэффициенту молярной экстинкции гемиглобинцианида или гемихрома. Молярные коэффициенты экстинкции гемиглобинцианида ( $\epsilon = 11,00$ ) или гемихрома ( $\epsilon \sim 10,14$ ) определены при строго фиксированных условиях, и их величина меняется при изменении этих условий, поэтому применять их следует аккуратно, так как несоблюдение (или незнание) этих условий может привести к неправильному результату.

## **Дозаторы**

Для дозирования трансформирующего раствора используют обычные дозаторы с погрешностью дозирования 1-3%, для крови - пипетки Сали, механические дозаторы с погрешностью дозирования не более 1,0%.

## **Реагенты**

### ***1. Наборы реагентов для определения гемоглобина***

#### **Состав наборов**

Определение гемоглобина гемиглобинцианидным или гемихромным методами проводят с использованием коммерческих наборов реагентов. В состав наборов входят трансформирующие реагенты и калибраторы (последние - не во все наборы).

#### *Характеристика наборов*

Линейная область определения гемоглобина обоими методами в диапазоне концентраций 30 - 200 г/л, коэффициент вариации результатов измерений  $\leq 2\%$ , время выхода реакции на устойчивые показатели оптической плотности - 20 мин для гемиглобинцианидного и 5 мин - для гемихромного метода.

#### Трансформирующие реагенты

Трансформирующие реагенты в наборах разных фирм представлены различными формами: монореагентами (концентратами или лиофильно высушенной смесью всех компонентов, либо двумя реагентами, один из которых содержит ацетонциангидрин, второй - все другие. Приготовление трансформирующих растворов проводят согласно инструкциям к наборам. Растворы следует готовить в чисто вымытой посуде, каждый вновь приготовленный раствор переливать в сухую, чистую склянку.

Требования, предъявляемые к трансформирующим растворам для:

#### *гемиглобинцианидного метода:*

Трансформирующий раствор должен быть прозрачным и иметь слабо-желтую окраску, его оптическая плотность при  $\lambda = 540$  нм должна быть равна 0. При хранении некоторые характеристики раствора могут изменяться. В хранящихся растворах следует периодически проверять окраску оптическую плотность, прозрачность и pH. При изменении этих показателей растворы не использовать - возможна неполная трансформация гемоглобина в гемиглобинцианид. Приготовленные растворы не следует замораживать, они хранятся несколько месяцев при комнатной температуре.

Приготовленный раствор следует хранить в стеклянных бутылках из темного стекла, срок его годности ~ 3 мес. и более.

*гемихромного метода:*

Раствор должен быть прозрачным и бесцветным, иметь оптическую плотность при  $\lambda = 540$  нм равной 0. Приготовленный раствор можно хранить в стеклянных бутылках любого цвета, срок его годности 6 мес и более. При хранении характеристики раствора не изменяются. Для приготовления раствора необходимо использовать воду, соответствующую требованиям ГОСТ 6709-72, или кипяченую. Если в процессе хранения раствора появляется осадок, это указывает на плохое качество воды, используемой для его приготовления, или недостаточную чистоту посуды.

### Калибраторы

Часть наборов реагентов содержит калибратор - калибровочный раствор гемиглобинцианида (для гемиглобинцианидного метода) или гемихрома (для гемихромного метода). Калибровочный раствор находится в ампуле из светозащитного стекла, имеет строго определенную концентрацию гемоглобина, аттестованную с погрешностью, не превышающей  $\pm 2\%$ . Концентрация гемоглобина указана на этикетке. Раствор готов к применению и не требует дополнительной подготовки. Калибровочный раствор используется для определения концентрации гемоглобина.

## **2. Наборы калибровочных растворов**

*Состав наборов калибровочных растворов гемиглобинцианида*

- четыре ампулы с четырьмя концентрациями (в пересчете на гемоглобин), равными ~ 50, 100, 150 и 200 г/л. Это практически перекрывает весь диапазон нормы и патологии;
- десять ампул с одной концентрацией (в пересчете на гемоглобин), равной ~ 160 г/л.

*Состав набора калибровочных растворов гемихрома:*

- четыре ампулы с четырьмя концентрациями (в пересчете на гемоглобин), равными ~ 60, 100, 140 и 180 г/л.

*Характеристика наборов. Условия применения*

Требования, предъявляемые к калибровочным растворам: стерильный водный раствор, разлитый в ампулы из светозащитного стекла с чистотой:  $A_{750} \leq 0,002$ ;  $A_{540}/A_{504}$  (для гемиглобинцианида) и  $A_{533}/A_{498}$  (для гемихрома) в пределах - 1,59-1,63 (при длине оптического пути 10 мм).

Калибровочные растворы четырех концентраций поставляются в ампулах из светозащитного стекла, готовые к использованию и не требуют дополнительной подготовки. Производители наборов калибровочных растворов одной концентрации рекомендуют разводить высокую концентрацию для получения нескольких меньших. С точки зрения аналитической химии разведение калибровочных растворов не рекомендуется. В разведенных растворах концентрация гемоглобина будет отличаться от истинной за счет ошибки при разведении (суммарная ошибка пипеток, колб, ошибок рук, случайных ошибок).

Срок годности вскрытых калибровочных растворов - не менее 3 сут. в плотно закрытом виде при температуре 2-8° С.

### *Определение концентрации гемоглобина в калибровочных растворах*

Использование некачественных калибровочных растворов может привести к ошибкам при построении калибровочного графика или расчете фактора, поскольку реальная концентрация гемоглобина не будет соответствовать указанному значению. Снижение концентрации гемоглобина в калибровочных растворах может произойти при неправильном их хранении или по другим причинам. Уточнить концентрацию, если возникло сомнение, можно на поверенном фотометре высокого класса точности. Следует измерить оптическую плотность раствора при  $\lambda = 540$  нм в кювете с длиной оптического пути 10 мм, имеющей нулевое поглощение оптической плотности дистиллированной воды, относительно контрольной (холостой) пробы при температуре 18-25° С. Концентрацию гемоглобина (С) в г/л рассчитать по формуле :

$$C = \frac{A \times f \times 10}{l}$$

где:

f - теоретический фактор, равный 367,7 для гемиглобинцианидного метода и 398,0 - для гемихромного метода;

A - оптическая плотность измеряемого раствора, ед. опт. пл.;

10 - длина "идеальной" кюветы, мм;

l - реальная длина кюветы, указанная на ее боковой стороне, мм.

Уточненную концентрацию гемоглобина в калибровочных растворах следует использовать при расчете фактора или при построении калибровочного графика. Уточнение концентрации гемоглобина на приборах типа КФК не допускается. Следует помнить, что **калибровочные растворы гемиглобинцианида нельзя использовать при работе гемихромным методом и наоборот. Они не взаимозаменяемы.**

### **3. Наборы контрольных растворов гемоглобина**

#### *Состав наборов*

Наборы контрольных растворов гемоглобина необходимы для оценки правильности определения гемоглобина и для проведения внутреннего контроля качества. Наборы содержат 3 флакона по 2 мл контрольных растворов гемоглобина с концентрацией ~ 80, 120 и 160 г/л. Растворы готовы к применению и не требуют дополнительной подготовки. Следует использовать наборы, концентрация гемоглобина в которых аттестована с погрешностью не более  $\pm 2\%$ .

Срок годности вскрытых контрольных растворов гемоглобина не менее 3 мес. в плотно закрытом виде при температуре 2-8° С.

#### *Требования, предъявляемые к контрольным растворам гемоглобина*

Растворы должны быть гомогенны, не содержать сгустков крови и механических включений, хорошо очищены от липидов и других примесных соединений. Наличие этих примесей создает легкую мутность реакционной смеси и способствует завышению результатов определения гемоглобина, которое в дальнейшем приведет к неправильным результатам анализа. Определение гемоглобина в контрольных растворах проводят аналогично определению гемоглобина в крови.

## Последовательность проведения операций при определении гемоглобина в крови

1. Калибровка измерительного прибора и построение калибровочного графика;
2. Проведение внутреннего контроля качества;
3. Проведение анализа.

### *Калибровка измерительного прибора и построение калибровочного графика.*

Следует проводить калибровку всех приборов, используемых для определения гемоглобина в лаборатории. Для построения калибровочных графиков желательно использовать коммерческие наборы калибровочных растворов гемиглобинцианида или гемихрома (в зависимости от используемого метода) четырех концентраций, а не одной.

Перед измерением калибровочных растворов кюветы тщательно моют и проверяют их чистоту, измеряя оптическую плотность дистиллированной воды. Необходимо добиваться нулевой оптической плотности измерительной кюветы с дистиллированной водой при  $\lambda=540$  нм в (кювете с длиной оптического пути 10 мм) относительно аналогичной контрольной (холостой) кюветы. Чистота измерительной кюветы значительно влияет на точность измерения оптической плотности растворов: так, погрешность измерения в 0,004 ед. опт. пл. дает ошибку измерения гемоглобина до  $\pm 2\%$ .

Содержимое каждой ампулы вносят в кювету (с длиной оптического пути 10 мм) фотометра, предварительно сполоснув ее исследуемым раствором. Оптическую плотность растворов измеряют при  $\lambda = 540$  (520-560) нм и температуре 18-25° С. Следует обратить особое внимание на стабильность показаний фотометра. Необходимо, чтобы вариабельность оптической плотности не превышала 0,001 в течение всего времени ее измерения: от калибровочных растворов до исследуемой пробы. В противном случае результаты будут получены со значительной погрешностью. Калибровочный график зависимости оптической плотности от концентрации гемоглобина строят по 4 точкам измеренной оптической плотности, соответствующей определенной концентрации гемоглобина. График должен представлять собой прямую линию, выходящую из начала координат. Если при его построении получается кривая линия - это указывает на неисправность прибора. Полученный прямолинейный график использовать при расчете концентрации гемоглобина в пробах крови.

Калибровочный график следует строить не реже 1 раза в неделю.

Вместо построения калибровочного графика можно рассчитать фактор для данного измерительного прибора. Для этого рассчитывают фактор ( $f_i$ ) для каждого калибровочного раствора по формуле:

$$f_i = \frac{C_i}{A}$$

где:  $C_i$  - концентрация гемоглобина (указана на этикетке), соответствующая концентрации гемоглобина в  $i$ -той ампуле, г/л;

$A$  - оптическая плотность раствора исследуемой пробы, ед. опт. пл.

При условии, что полученные значения каждого фактора не различаются между собой на величину более  $\pm 2\%$ , их усредняют по формуле:

$$\bar{f} = \frac{1}{n} \sum f_i$$

где:

$n$  - число усредняемых факторов;

$f_i$  - значение фактора для  $i$ -той ампулы, г x л<sup>-1</sup>х ед.опт.пл.

Иногда случается, что фактор для первой концентрации калибровочных растворов отличается от 3 других на величину более  $\pm 2\%$ , тогда его отбрасывают и не усредняют с другими. Полученное среднее арифметическое значение фактора для данного измерительного прибора используют далее при расчете концентрации гемоглобина (С) в г/л по формуле:

$$C = A \times f$$

где:  $A$  - оптическая плотность раствора исследуемой пробы, ед. опт. пл.;

$f$  - среднее арифметическое значение факторов, г x л<sup>-1</sup>х ед.опт.пл.

Значение фактора необходимо периодически перепроверять по калибраторам, прилагающимся к наборам, или по калибровочным растворам из набора.

## ***2. Проведение внутреннего контроля качества***

При проведении исследований возможно возникновение различных погрешностей (систематических и случайных), связанных с ошибками операторов; приборными ошибками; неточностью пипеток; несоблюдением времени выхода реакции на устойчивые показатели оптической плотности; несоблюдением температурного режима; неомогенностью пробы и др. Эти и другие погрешности можно выявлять с помощью контрольных растворов гемоглобина, проводя внутренний контроль качества.

Определение гемоглобина следует проводить с использованием точно откалиброванных пипеток. Особое внимание следует уделять истинному объему крови (20 мкл), отбираемому микропипетками, поскольку погрешность в 1 мкл при последующем разведении крови трансформирующим раствором в 251 раз дает погрешность определения гемоглобина до 5%.

Большое влияние на правильность определения гемоглобина в крови имеет техника дозирования пробы крови. Как показали исследования, оптимальным способом является способ обратного дозирования. При этом наилучшие результаты достигаются в случае предварительного промывания наконечника трансформирующим раствором. При работе с механическими дозаторами следует обращать внимание на наконечник: он должен быть новым (либо абсолютно чистым), иметь узкое отверстие и хорошую стекаемость. При заборе и внесении крови в пробирку следует снять ее избыток с наружного края наконечника несколькими прикосновениями к стенке дополнительной пробирки (вытирать наконечник фильтровальной бумагой не рекомендуется), провести сброс жидкости в нижнюю часть пробирки, не касаясь раствора. Если результат определения гемоглобина в контрольных растворах попадает в диапазон указанных концентраций, это свидетельствует о том, что при проведении анализа погрешность определения менее 2%. Если результат не попадает в указанный диапазон - при проведении анализа допускаются систематические аппаратурные или случайные ошибки.

*Систематические аппаратурные ошибки:*

- - неправильная калибровка измерительного прибора (составляющая до 40% от общего числа допускаемых ошибок). Она может быть связана: с ошибками при построении

калибровочного графика; ошибками при расчете фактора; использованием некачественных калибровочных растворов; нелинейностью характеристик измерительного прибора, нестабильностью прибора;

- - использование неточно откалиброванных пипеток, что приводит к ошибкам разведения, составляющим ~ 50% от общего числа ошибок;
- - неправильный выбор способа дозирования пробы.

*Случайные ошибки:*

- - ошибки оператора вследствие: нарушения рекомендуемого температурного режима; несоблюдения необходимого времени выхода реакции на устойчивые показатели оптической плотности; использование некачественных или неправильно приготовленных трансформирующих реагентов; неправильного измерения или расчета;
- - ошибки, связанные с неправильным отбором пробы и составом крови (см “Преаналитическая фаза”).

Вначале следует исключить возможные систематические ошибки, связанные с влиянием аппаратного фактора, но если и тогда результат определения гемоглобина в контрольном растворе не попадает в диапазон допустимых значений, следует обратить внимание на возможность появления случайных ошибок. Так, несоблюдение температурного режима (использование контрольных, калибровочных или трансформирующего раствора, недоведенных до комнатной температуры (18-25° С), может приводить как к заниженным, так и к завышенным результатам). Несоблюдение времени выхода реакции на устойчивые показатели оптической плотности занижает результаты, так как оптическая плотность будет ниже максимальной. Использование трансформирующих реагентов, не отвечающих требованиям, изложенным выше, приводит к снижению результатов, так как возможна неполная трансформация гемоглобина в гемиглобинцианид или гемихром. При правильном определении гемоглобина в контрольных растворах можно приступать к определению его в крови.

### ***Проведение анализа***

В сухие чистые пробирки дозатором внести по 5 мл трансформирующего раствора, к ним прилить по 20 мкл крови поверенной пипеткой Сали или механическим дозатором со всеми предосторожностями, перечисленными в предыдущем разделе. Пробу тщательно перемешать на микровстряхивателе или вручную до достижения гомогенного раствора. Растворы выдержать при комнатной температуре время, указанное в инструкции к набору, и измерить оптическую плотность растворов на поверенном, калиброванном приборе в кювете, имеющей нулевое поглощение дистиллированной воды относительно аналогичной контрольной (с длиной оптического пути 10 мм). Окраска растворов устойчива до 5 час и более, что позволяет проводить измерения в любое удобное время в этом временном интервале. Расчет содержания гемоглобина в крови произвести по калибровочному графику или фактору, определенному на данном приборе.

Если соблюдены все перечисленные условия подготовки и проведения анализа, описанные выше, погрешность определения гемоглобина в крови не будет превышать  $\pm 2\%$ .

Кратко суммируем источники возможных ошибок при определении гемоглобина: использование некалиброванных пипеток и несовершенная техника дозирования проб крови; применение неповеренного оборудования, не обеспечивающего линейную зависимость оптической плотности от концентрации гемоглобина в требуемой области измерений;

нестабильность прибора; отсутствие внутрилабораторного контроля качества; недостаточная чистота кювет, особенно проточных; ошибки при построении калибровочных графиков и расчете факторов; использование контрольных растворов гемоглобина низкого качества; ошибки оператора, ошибки, допускаемые на преаналитической фазе.

## Литература

1. Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. // Биологическая химия, М., Медицина, 1990 г
2. Энциклопедия клинических лабораторных тестов под ред. Н. Тица, М., Лабинформ, 1997 г.
3. Медицинские лабораторные технологии и диагностика, под ред. А.И. Карпищенко. Справочник, т 1, С. Петербург, 1998 г.
4. Белки, пер. с англ., под ред. Г. Нейрата и К. Бейли, т.3, ч 1, М., 1958 г.
5. Справочник по клиническим методам исследования, под ред. Е.А. Кост, 2-е изд., М., 1975 г.
6. Гауровиц Ф. // Химия и биохимия белков, М. 1953.
7. Блюменфельд Л.А.. Гемоглобин и обратимое присоединение кислорода, М., 1957.
8. Drabkin D.I. Austin I.H. // I Biol Chem. (1935-1936), 112, 51.
9. Drabkin D.I. // Bibl. Haemat. (Basel), 1965, Fasc. 21.
10. Haemoglobin Cyanide Standart Preparation. International Committee for Standartisation in Haematology. // Wld Hlth. Org. Tech Rep.1967. Ser. 384, p. 14.
11. Tentory L., Salvaty F.A. // Methods in enzymologi. 1981 v. 76.
12. International Committee for Standartisation in Haematology: Recomendation for
13. Haemoglobinometry in Human Blood. // Brit. J Haemat. 1967 v. 13, Suppl. 71-75.
14. Kampen E.J., Zijlstra W.G. // Clin. Chim Acta. 1961, 6, 538.
15. International Committee for Standartisation in Haematology. // J. Clin. Pathol.,1978,31,139.
16. Assendelft O.W., Zijlstra W.G. // Anal. Biochem. 1975, 69,43.
17. Козлов А.А., Берковский А.Л., Простакова Т.М. // Клин. лаб. диагностика, 1997; №9, с. 19-20.
18. Козлов А.А. // Лаборатория, 1998; №11, с. 20-21.
19. Козлов А.А. // Лаб. Медицина, 1998; №1, с. 44-49.
20. Вредные вещества в промышленности, под ред. Н.В. Лазарева, Э.Н. Левиной, 7-е изд., т.1, 2, 1976 г.
21. Медицинская газета, №95, 08.12.2000.
22. Ахрем А.А., Андреюк Г.М, Кисель М.А. Киселева С.И. // Докл. АН СССР, 1986, т. 20, № 4, с. 1003-1006.
23. Ахрем А.А., Андреюк Г.М., Киселев М.А. и др. Патент РФ № 1386901, G 01 N 33/48, опубл. 15.01.90. Бюл. № 2.
24. Ахрем А.А., Андреюк Г.М., Киселева С.И. и др. // Лаб. дело, 1989, №5, с.13-15.
25. Авдеева Н.А. // Лаб. дело, 1987, № 10, с. 786-788.
26. Wong Show-Chu, Khoo Sylvia. US 94275466. 14.07.94, G 01 N 33/72.
27. Kim Young Ran, Stroupe Stephen D. US 95 524128. 31.08.95, G 01 N 33/52.
28. Власенко В.И., Прищепа М.И. Патент РФ № 2044319 кл, G 01 N 33/49, опубл. 20.09.95. Бюл. № 26.
29. Антонов В.С., Власенко В.И., Ованесов Е.Н. Патент РФ № 2052197, кл G 01 N 33/48, опубл. 10.01.96. Бюл. № 1.
30. Антонов В.С., Власенко В.И., Ованесов Е.Н. Патент РФ № 2054173, кл G 01 N 33/48, опубл. 10.02.96. Бюл. № 4.
31. Пупкова В.И., Банина Л.И., Войтова Н.И. Патент РФ № 2159442, G 01 N 33/72,33/52, опубл. 20.11.2000. Бюл. № 32.
32. Пупкова В.И., Офицеров В.И. // Новости “Вектор-Бест”, 1998; № 4, с. 8-9.
33. Пупкова В.И., Жданова В.В. // Новости “Вектор-Бест”, 2000; № 1, с. 9-11.

34. Дозирование цельной крови человека (по материалам статьи Vlatura S. // European Clin. Lab. October 1996 ), Лаборатория, 1997; №5, с. 21-22.