
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.

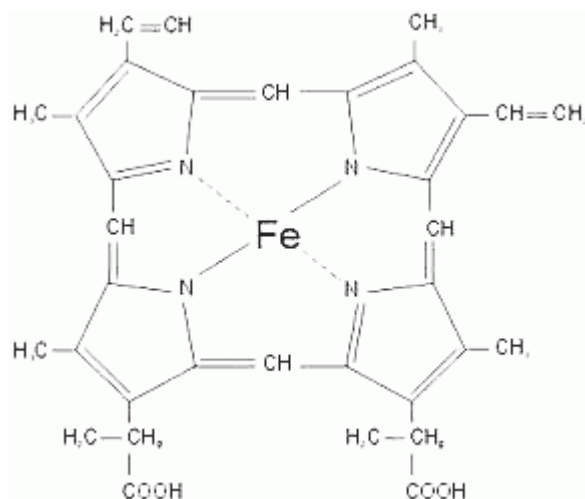
СОДЕРЖАНИЕ

[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 ~ 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 ~ 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 α , β , γ , δ . 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 A₂ (HbA₂), 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 α_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 (HbN₃), 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 - HbN₃ 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 HbN₃ 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 25×10^9 /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 KH_2PO_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.

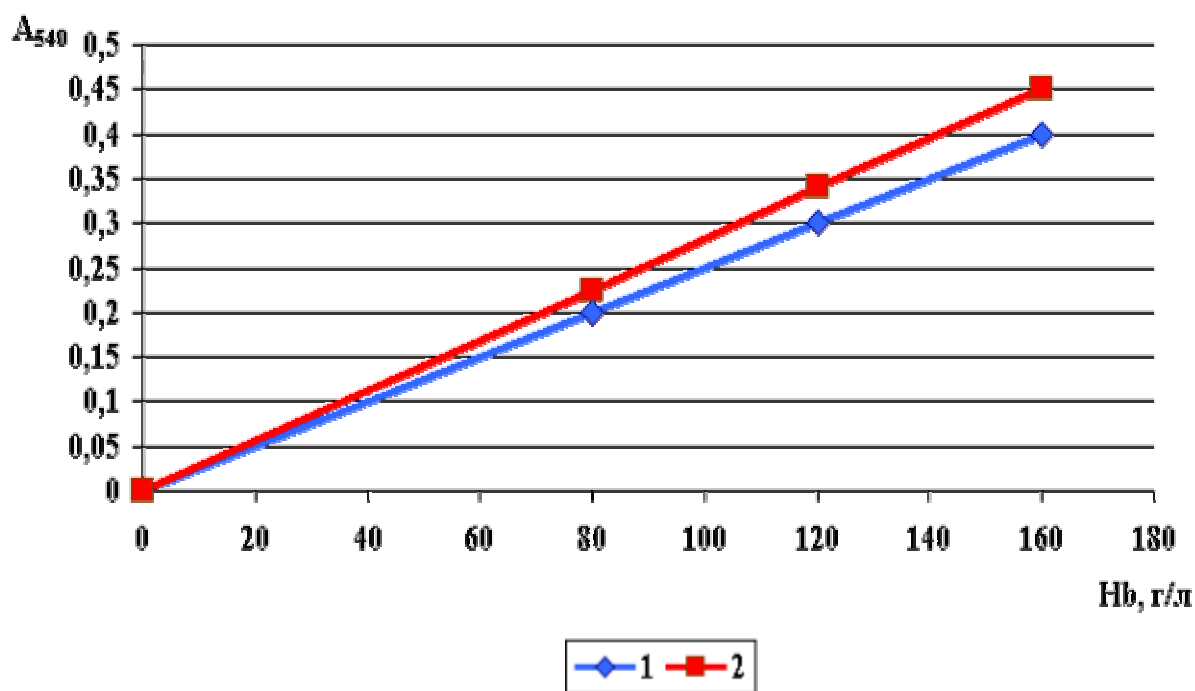


Рис.1 Величина оптической плотности гемихрома (1) и гемиглобинцианида (2)

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.

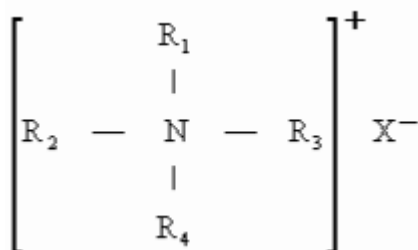
Таким образом, гемихромный метод определения гемоглобина в крови обладает всеми достоинствами гемиглобинцианидного метода, которые дополняются отсутствием в составе трансформирующего реагента высокотоксичных цианидов и других ядовитых веществ.

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:

R₁ - R₃ - короткие алкильные группы, содержащие от 1 до 4 атомов углерода;

R₄ - алкильная группа, содержащая от 12 до 16 атомов углерода;

X - галоген.

- соли жирных кислот (C₁₄ - C₂₀) 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°C или 24 час при 23°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⁻¹ x 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⁻¹ x 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.