

LUCJAN CZESŁAW KOZIOROWSKI, BARBARA FUDEM

## MIKROMETODA OZNACZANIA STĘŻEŃ HEMOGLOBINY

Z Samodzielnej Pracowni Analiz Klinicznych Instytutu Pediatrii,  
Akademii Medycznej we Wrocławiu

Dokładne określenie małych stężeń hemoglobiny, szczególnie przy jej frakcjonowaniu, napotyka na trudności z powodu braku odpowiednio precyzyjnych metod. Praktycznie znane są trzy metody w różnych modyfikacjach.

1. Wybarwienie elektroforogramu barwnikami białkowymi.

2. Elucja do roztworów buforowych (1).

3. Elucja do odczynnika Drabkina (3).

Wadą pierwszej metody jest to, że poza hemoglobina wybarwiają się i inne białka, co zniekształca wyniki. Niedogodnością dwóch pozostałych postępowań jest niezadowalająca dokładność oznaczania Hb A<sub>2</sub> związana z małą jej zawartością. Po rozdziale elektroforetycznym 10 µl 5—8 g<sup>0</sup>/<sub>0</sub> roztworu hemoglobiny ekstynkcja frakcji Hb A<sub>2</sub> w jednocentymetrowej kuwecie jest rzędu 0,015—0,05. Są to wartości zbyt małe do osiągnięcia wystarczającej dokładności pomiarów:

Praca przedstawia metodę pomiaru małych stężeń hemoglobiny przeszło 20 razy czulszą od dotychczas proponowanych.

## ZASADA METODY

Postępowanie opiera się na jakościowej metodzie piramidonowej oznaczania hemoglobiny (2), której zasadą jest przenoszenie przez hemoglobinę tlenu z nadtlenków na pierścień aromatyczny piramidonu. W wyniku tej reakcji powstaje związek barwny o maximum absorpcji przy 600 nm.

## ODCZYNNIKI

1. 5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> alkoholowy roztwór piramidonu — 5 g piramidonu rozpuścić w 100 ml etanolu 96<sup>o</sup>.
2. 3<sup>0</sup>/<sub>0</sub> woda utleniona.
3. 30<sup>0</sup>/<sub>0</sub> kwas octowy.

## POSTĘPOWANIE

Oznaczanie zawartości Hb przeprowadza się w dwóch równoległych próbach:

- 1) kontrolnej o znanej zawartości Hb,
- 2) badanej.

Próbę kontrolną należy rozcieńczyć tak, aby zawierała 5—25 µg/1 ml — w zależności od spodziewanego stężenia Hb w próbce badanej. Do 1 ml roztworu dodaje się 1 ml 30<sup>0</sup>/<sub>0</sub> kwasu octowego oraz 1 ml 5<sup>0</sup>/<sub>0</sub> alkoholowego roztworu piramidonu. Przed samym pomiarem do każdej z prób

dodaje się 0,2 ml 3<sup>0</sup>/<sub>0</sub> wody utlenionej. Powstające w próbie niebieskie zabarwienie uzyskuje maximum natężenia między drugą a trzecią minutą i w tym czasie mierzy się absorpcję prób przy długości fali 600 nm, wobec wody destylowanej.

#### OBLICZANIE WYNIKÓW

Wynik dla próby badanej oblicza się wg wzoru:

$$\frac{E_{600}^K \times C_K}{E_{600}^B} = C_B$$

$E_{600}$  — wartość ekstynkcyj przy 600 nm

C — stężenie Hb

K — próba kontrolna

B — próba badana

#### OZNACZANIE FRAKCJI $A_1$ , $A_2$

Na paski octanu celulozy nanosi się ok. 7  $\mu$ l 5—8 g<sup>0</sup>/<sub>0</sub> hemolizatu. Po rozdziale elektroforetycznym frakcje  $A_1$  i  $A_2$  eluuje się z wyciętych fragmentów do wody destylowanej. Hb  $A_1$  rozcieńcza się 30-krotnie, Hb  $A_2$  — dwukrotnie. Dalej postępuje się zgodnie z opisaną metodą oznaczania Hb, przy czym prowadzi się równoczesny pomiar pary Hb  $A_1$  — Hb  $A_2$ , bez udziału w tym wypadku próby kontrolnej. Procentowy udział Hb  $A_2$  oblicza się wg wzoru:

$$\frac{E_{600}^{A_2} \times 100}{A_{600}^{A_1} \times 15 + E_{600}^{A_2}} = \% \text{ Hb } A_2$$

#### OBLICZANIE BŁĘDU METODY

Srednie odchylenie procentowe obliczone w stosunku do przeciętnej wartości Hb  $A_2$  wynosi 6,45<sup>0</sup>/<sub>0</sub>. Błąd wyznaczono mierząc 20 par Hb  $A_1$   $A_2$  uzyskanych w rozdziale elektroforetycznym. Podobnym błędem obarczone były wyniki otrzymane przez Luciano Vettore i współpracowników (4), jednakże przy około 10 razy wyższych stężeniach hemoglobiny.

#### PISMIENICTWO

1. International Committee for Standardization in Haematology: Recommendations for selected methodes quantitative estimation of Hb  $A_2$  and for Hb  $A_2$  reference preparation. Br. J. Haematol., 38, 573—578, 1978.
2. Krawczyński J., Osiński T.: Laboratoryjne metody diagnostyczne, PZWL Warszawa 1967, 560.
3. Richterich R.: Chemia kliniczna, PZWL Warszawa, 1971, 336—338.
4. Vettore L., De Matteis M. C., Corvi C., Zanoleguacomo M.: Standardization of the simple method of the estimation of haemoglobin  $A_2$ . Clin. Chim. Acta 86, 129—134, 1978.

Adres autora: L. C. Koziarowski, Państwowy Szpital Kliniczny Nr 4, ul. H. Wrońskiego 13c, 50-376 Wrocław.