



FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

265 475

(11) (B1)
(13)

(51) Int. Cl.⁴

G 01 N 33/00
G 01 N 33/72

(22) Přihlášeno 10 07 86

(21) PV 5253-86.E

(40) Zveřejněno 10 02 89

(45) Vydáno 15 12 89

(75)

Autor vynálezu

KANDRNÁL JAN RNDr. CSc., HAVÍŘOV

(54) Způsob fotometrického stanovení hemoglobinu

(57) Řešení umožňuje specifické a přesné stanovení hemoglobinu, zejména za přítomnosti oxyhemoglobinu, methemoglobinu a karbonylhemoglobinu. Způsob vyniká analyticky dostatečně rychlou tvorbou fotometrické komponenty, vhodnou zejména pro automatizované stanovení hemoglobinu. Výhodou je také použití snadno dostupných, levných, neagresivních a netoxických chemikálií a činidel při stanovení. Při způsobu fotometrického stanovení hemoglobinu se působením pufru typu aminoalkoholu, zejména Tris (hydroxymetyl)-aminomethanu za přítomnosti iontů Fe^{2+} a komplexotvorného činidla iontů Fe^{2+} a Fe^{3+} , zejména solí ethylendiaminotetraoctové kyseliny na oxyhemoglobin a/nebo methemoglobin vzniká derivát, jehož molekulové spektrum a stabilita v roztoku jsou identické s karbonylhemoglobinem.

Vynález se týká způsobu fotometrického stanovení hemoglobinu, založeného na konverzi oxyhemoglobinu ve vodném prostředí při pH 6,5 až 9 účinků iontů Fe^{2+} , peroxidu vodíku a komplexotvorného činidla (iontů Fe^{2+} a Fe^{3+}), zejména solí ethylendiaminotetraoctové kyseliny nebo citrátů, oxalátů nebo vinanů vhodných fotometrických vlastností. Při koncentraci hemoglobinu do $10 \mu\text{mol.l}^{-1}$ lze za uvedených podmínek dosáhnout kvantitativní konverze také bez přítomnosti peroxidu vodíku a obdobně reaguje také methemoglobin.

Principem stanovení hemoglobinu je přeměna všech přítomných hemoglobinových derivátů na jednotný produkt optimálních fotometrických vlastností. V současné době se k tomuto stanovení nejčastěji používá metoda kyanmethemoglobinová, metoda konverze na alkalický hematin, event. karbonylhemoglobin. Kromě prokazatelných výhod má metoda kyanmethemoglobinová také některé nevýhody, spočívající zejména: reagenta obsahuje toxický kyanid, a proto je třeba s činidlem zacházet velmi opatrně, transformační roztok je labilní na světle (i ve tmě není stabilita větší než 6 měsíců), koncentrace reakčních komponent, zejména kyanidu, je velmi kritické a lze ji obtížně testovat, reakční rychlost konverze některých derivátů, zejména karbonylhemoglobinu je relativně nízká, což je nevýhodou při rychlé měřicí periodě, zejména při automatizovaných analýzách. Nevýhodou metod alkalického hematinu je nutnost používat koncentrovaných roztoků hydroxidu. Při konverzi na karbonylhemoglobin účinkem plynného oxidu uhelnatého je nevýhodou toxicita a omezená možnost automatizace stanovení.

Výše uvedené nevýhody eliminuje způsob fotometrického stanovení hemoglobinu podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že do roztoku pufru typu aminoalkoholu, zejména Trix (hydroxymethyl)-aminomethanu s komplexotvorným činidlem, zejména solí ethylendiaminotetraoctové kyseliny se přidá roztok iontů Fe^{2+} se změní absorbance směsi proti směsi bez hemoglobinu při vlnové délce 420 nm v době od 30 sec, do 20 min. po smíchání, přičemž množství hemoglobinu musí být v rozmezí 0 až 6 mmolů na 1 ml směsi.

Výhodou způsobu podle vynálezu je, že umožňuje stanovení hemoglobinu za kineticky výhodných podmínek, zejména za přítomnosti oxyhemoglobinu, methemoglobinu a karbonylhemoglobinu. Reakční rychlost přeměny oxyhemoglobinu a methemoglobinu umožňuje provádět měření do 30 sekund a produkt je stabilní nejméně po dobu 20 minut.

Vlastní stanovení je možno provádět buď jako jednostupňovou reakci hemoglobinu a činidla výše uvedených koncentrací reakčních komponent, nebo jako dvojstupňovou s postupným přidáním hemoglobinu a iontů Fe^{2+} . Při odděleném uchování roztoku pufru s dvojdraselnou solí kyseliny ethylendiaminotetraoctové (K_2EDTA) a Fe^{2+} při 4 °C je stabilita těchto reakčních komponent delší než 6 měsíců. V rozmezí teplot 15 až 35 °C není reakce mezi činidlem a hemoglobinovými deriváty významněji závislá na teplotě.

Způsob podle vynálezu umožňuje specifické a přesné stanovení hemoglobinu, zejména za přítomnosti oxyhemoglobinu, methemoglobinu a karbonylhemoglobinu. Způsob vyniká analyticky dostatečně rychlou tvorbou fotometrické komponenty, vhodnou zejména pro automatizované stanovení hemoglobinu. Výhodou je také použití snadno dostupných, levných, neagresivních a netoxických chemikálií a činidel při stanovení.

Příklad 50 μl roztoku vzorku, obsahující 0,5 až 12 nmol hemoglobinu se napipetuje k 2 ml Tris pufru $0,05 \text{ mol.l}^{-1}$ pH 7,35, obsahujícímu 5 nmol.l^{-1} K_2EDTA a přidá se 20 μl roztoku $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$ FESO_4 v 2 nmol.l^{-1} H_2SO_4 . Po mírném promíchání se změní absorbance vzorku v 1 cm kyvetách proti slepému pokusu, připravenému stejným způsobem bez přídavku hemoglobinu. Měření je vhodné provést v době od 30 sekund do 20 minut po přidání Fe^{2+} při vlnové délce 420 nm.

Obsah hemoglobinu se určí z předem připravené lineární kalibrační závislosti standardních roztoků hemoglobinu, zpracovaných a vyhodnocených stejným způsobem jako roztok vzorku. Relativní směrodatná odchylka při analýze vzorku obsahujícího oxyhemoglobin, methemoglobin a karbonylhemoglobin mezi sériemi je do 3 %.

Při stanovení menších množství hemoglobinu, eventuálně při požadavku dosažení větší správnosti a přesnosti stanovení je vhodné použít pro měření diferenčního měření při 420 a 450 nm nebo metody derivační spektrofotometrie. Při derivačním způsobu se měření provádí proti vzduchu, slepý pokus se neprovádí. Vyhodnocuje se záznam druhé derivace grafickým způsobem mezi sousedními maximy derivačních amplitud.

Při stanovení hemoglobinu v plné krvi, eventuálně analýze jiných tekutin obsahujících intaktní erytrocyty je možné předem provést hemolýzu fyzikálním způsobem nebo běžnými chemickými činidly, zejména saponinem, Tritonem X 100 nebo Steroxem SE, nebo je možné přidat některý z uvedených hemolyzačních prostředků do používaného Trisového pufru.

Způsob fotometrického stanovení podle vynálezu je vhodný pro stanovení hemoglobinu v krvi i jiných tělesných tekutinách i vodných roztocích hemoglobinu umělého původu. Při stanovení v lidské krvi významně neinterferují žádné komponenty přítomné za fyziologických a patologických stavů v krvi. hemoglobin F i jiné alternativní hemoglobiny reagují stejně jako hemoglobin A.

P R E D M Ě T V Y N Á L E Z U

Způsob fotometrického stanovení hemoglobinu, vyznačující se tím, že do roztoku pufru typu aminoalkoholu, zejména Trix (hydroxymethyl)-aminomethanu s komplexotvorným činidlem, zejména soli ethylendiaminotetraoctové kyseliny se přidá roztok hemoglobinu a po přidání roztoku iontů Fe^{2+} se změří absorbance směsi proti směsi bez hemoglobinu při vlnové délce 420 nm v době od 30 sec do 20 min. po smíchání, přičemž množství hemoglobinu musí být v rozmezí 0 až 6 mmolů na 1 ml směsi.