Sveučilište u Zagrebu Ivana Zrinski

 Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Kolegij: Integrirani kemijski sustavi

**Određivanje hemoglobina u krvi**

Metode za određivanje hemoglobina (Hb) razvile su se prije više od jednog stoljeća, te je spektrofotometrijska metoda određivanja hemoglobina u krvi jedna od prvih koje se i danas primjenjuju i nadograđuju.

Hemoglobin je kuglasta molekula, metaloprotein koji se sastoji od dva para podjedinica koje su presavijeni polipeptidni lanac (dio globina) sa skupinom hem (iz porfirina). U središtu svake prostetičke skupine hem je jedan dvovalentni atom željeza koji je odgovoran za crvenu boju krvi. Hemoglobin je prijenosnik kisika (oksihemoglobin,svjetlocrveni pigment) u organizmu te odvodi ugljikov dioksid iz organa natrag u pluća (karboksihemoglobin, tamno crveni pigment), a nalazi se u eritrocitima.

**Princip metode:** Krv se razrijedi u otopini koja sadrži kalijev fericijanid i kalij cijanid. Kalijev fericijanid oksidira željezo u hemi do trovalentnog stanja kako bi se formirao methemoglobin koji se pretvara u hemiglobincijanid (HiCN) kalijevim cijanidom.

 Hemiglobicijanid (HiCN) je stabilan produkt u boji koji u otopini ima maksimum apsorbancije na 540 nm i strogo slijedi Lambert – Beerov zakon. Apsorbancija razrijeđenog uzorka na 540 nm uspoređena je s apsorbancijom na istoj valnoj duljini standardne otopine hemiglobicijanida čija je ekvivalentna koncentracija hemoglobina poznata.

 Većina derivata hemoglobina mogu se određivati ovom metodom zbog konverzije u hemiglobicijanid.

**Reagensi : Darbkinsonova otopina;**

Kalijev fericijanid (K3Fe(CN)6), 200 mg, kalijev cijanid 50 mg, dihidrogen kalijev fosfat (KH2 PO4) 140 mg, neionski detedžent (e.g. Triton X-100) 1mL, destilirana voda 1000 mL

**Postupak:**
25 µL krvi doda se u 5,0 mL reagensa – Darbkinsova otopina (razrijeđenje u omjeru 1:201), pomiješa se i ostavi 3-10 minuta. Apsorbancija se očitava pri 540 nm u odnosu na čisti reagens kao bazu. Apsorbancija standardne otopine hemiglobicijanida (HiCN) mjeri se na isti način .

Nedostatak ove metode jest potreban precizan spektrofotemetar, precizno pipetiranje, štetan reagens, ograničena upotreba izvan laboratorija, ne razlikjuje hemoglobinske derivate koje ne prenose kisik (MetHb, COHb, SHb) i na takav način se može precijeniti kapacitet krvi za kisik u njihovoj abnormalnoj prisutnosti te podložnost interferencijama lipida, proteina, plazme i leukocita, iz kojeg razloga se uzorak mora razrijediti u velikim omjerima. No, prednosti su jeftin reagens, prilagođenost automatiziranim hematološkim analizatorima, temeljito ispitana metoda.

**Literatura:**

* van Kampen EJ, Zijlstra WJ., Standardization of hemoglobinometry II, The hemiglobincyanide method. Clin Chim Acta (1961) **6** 538-44
* Vanzetti G., An azide-methemoglobin method for hemoglobin determination in blood., J Lab & Clin Med ( 1966) **67** 116-26