**OZNACZANIE STĘŻENIA METHEMOGLOBINY**

**METODĄ ELVYN I MALLOYA**

ZASADA METODY

 Methemoglobina (MetHb) jest frakcją hemoglobiny, w której jon żelaza Fe2+ został utleniony do Fe3+. Metoda oznaczania stężenia methemoglobiny metodą Elvyn i Malloya polega na jej przekształceniu do cyjanowej pochodnej – cyjanomethemoglobiny (CyjHb), co powoduje zmianę widma absorbcyjnego. Szczyt absorbancji MetHb, znajdujący się przy λ=630 nm, zanika, co wykorzystuje się do ilościowego oznaczenia. Pomiaru dokonuje się wobec próby odniesienia,
w której cała wolna hemoglobina została utleniona do methemoglobiny za pomocą K3Fe(CN)6.

Fe2+

Hemoglobina

(HbO2, HbCO2)

K3Fe(CN)6

Fe3+

Methemoglobina

Methemoglobina

KCN

Cyjanomethemoglobina

**λmax=630 nm**

tylko dla próby odniesienia

CEL ĆWICZENIA

Celem ćwiczenia jest obliczenie procentowej zawartości MetHb i interpretacja uzyskanych wyników.

ODCZYNNIKI

1. 0,152M roztwór wodny żelazicyjanku potasu (przechowywać w ciemnej butelce)
2. 5% wodny roztwór KCN
3. 50mM bufor kolidynowy o pH 7,0
4. Materiał biologiczny (krew pełna)

WYKONANIE OZNACZENIA

Próbkę krwi dobrze wymieszać, pobrać 0,1ml i dodać 2,5ml wody destylowanej, a następnie intensywnie wymieszać i pozostawić na 10 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie do uzyskanego hemolizatu dodać 2,5ml buforu kolidynowego, wymieszać i odwirować (10 minut przy 3000obr./min.). W czasie wirowania przygotować dwie probówki i oznaczyć je jako: A (MetHb) i B (próba odniesienia, odzwierciedlająca ilość Hb całkowitej). Uzyskany supernatant należy użyć do wykonania doświadczenia według poniższej tabeli.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Próbka** | **A**(MetHb) | **B**(całkowita Hb, próba odniesienia) |
| Hemolizat (ml) | 1,5 | 1,5 |
| H2O dest  | 1 kropla | ----- |
| K3Fe(CN)6 | ----- | 1 kropla |
| Dokładnie wymieszać i odczytać absorbancje (Abs1) wobec wody przy λ=630nm | Abs1 (A) | Abs1 (B) |
| KCN | 1 kropla | 1 kropla |
| Dokładnie wymieszać i po 5 minutach ponownie odczytać absorbancje (Abs2) wobec wody przy λ=630nm | Abs2 (A) | Abs2 (B) |

OBLICZENIA

Procentową zawartość MetHb obliczyć według wzoru:

% MetHb = $\frac{Abs1 \left(A\right) -Abs2 (A) }{Abs1 \left(B\right) -Abs2 (B)}$

$$x 100 $$

INTERPRETACJA WYNIKÓW:

 W warunkach fizjologicznych tworzenie methemoglobiny odbywa się cały czas, a erytrocytarny system enzymatyczny utrzymuje jej wartość **poniżej 1%** hemoglobiny całkowitej. Objawy methemoglobinemii:

- <3% - zazwyczaj brak objawów

- 3-15% - sinica

- 15-30% - bóle głowy, nudności i zmęczenie

- 30-50% - duszność, zawroty głowy, męczliwość

- 50-70% - tachykardia, tachypnoe, arytmia,drgawki, kwasica metaboliczna,senność, śpiączka

- >70% - niewydolność wielonarządowa, zgon