

УДК 535.34:51-7
PACS number(s): 78.40.-q

АНАЛІЗ СПЕКТРІВ ПОГЛИНАННЯ СУЛЬФГЕМОГЛОБІНУ ХЕМОМЕТРИЧНИМИ МЕТОДАМИ

І. Яриновська, О. Білий, В. Саварин

*Львівський національний університет імені Івана Франка
факультет електроніки
кафедра фізичної та біомедичної електроніки
вул. Драгоманова, 50, 79005 Львів, Україна
e-mail: ivanka_82@rambler.ru*

Представлено результати досліджень абсорбційних спектрів оксигемоглобіну (HbO₂) та перехідної форми окси- в сульфформу на інтервалі довжин хвиль 450–750 нм. За допомогою методів хемометрії обчислено коефіцієнти молярної екстинкції сульфгемоглобіну (SHb). Проаналізовано переваги цього методу. Отримані результати зіставлені з описаними у літературі. Враховано похибки вимірювань.

Ключові слова: абсорбційні спектри сульфгемоглобіну, оксигемоглобін, коефіцієнти молярної екстинкції, хемометричні методи.

Статистична математична обробка та оцінка точності результатів експерименту є важливим і водночас нелегким етапом дослідницької роботи. Останнім часом для вирішення цих завдань особливого поширення набули хемометричні методи, які, зазвичай, використовують в аналітичній хімії [1]. На сьогодні зазначені методи мають своє застосування і в біомедицині, зокрема, для систематизації протеїнів, кількісної оцінки глюкози в крові, досліджень таких біологічних рідин, як кров, урина, неорганічних сполук, для калібрування нестабільних систем та ін. Об'єктами досліджень хемометрії є дані масивів експериментальних результатів, отриманих з абсорбційних спектрів поглинання видимого та інфрачервоного діапазонів, зі спектрів магнітного дихроїзму, коливних спектрів досліджуваних сполук, та ін. [2]. Найчастіше ці методи використовують з метою вирішення таких завдань:

- обробка інформації з результатів вимірів;
- оцінка достовірності результатів вимірів.

Як відомо [1], оцінку точності отриманого результату обчислюють середнім значенням (\bar{x}), дисперсією ($V(x)$), стандартним ($S(x)$) та відносним стандартним ($S_r(x)$) відхиленням, а також довірчим інтервалом (μ). Для їх обчислення використовують, відповідно, наступні математичні формули [3]:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}, \quad (1)$$

$$V(x) = S^2(x) = \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}, \quad (2)$$

$$S(x) = \sqrt{V(x)}, \quad (3)$$

$$S_y(x) = \frac{S(x)}{x}, \quad (4)$$

$$\mu = x \pm \Delta x, \quad (5)$$

$$\Delta x = S(x) \cdot t(p, f), \quad (6)$$

де $t(p, f)$ – коефіцієнт Ст'юдента при заданій довірчій ймовірності p (зазвичай приймається значення 95%) та числі ступенів вільності f .

$$\mu = \bar{x} \pm S(\bar{x}) \cdot t(p, f). \quad (7)$$

Довірчий інтервал використовують в одному з таких випадків:

1. Відоме істинне значення величини та інтервал. Необхідно знайти ймовірність того, що виміряне експериментальне значення потрапляє у цей інтервал.
2. Відоме істинне значення та задана ймовірність. Необхідно знайти інтервал, в який виміряне значення потрапляє із заданою ймовірністю.
3. Відоме експериментально виміряне значення та задана ймовірність, потрібно оцінити інтервал, в якому знаходиться істинне значення з цією ймовірністю.

У статті показано можливість застосування вищенаведених формул як хемометричних інструментів для оцінки достовірності результатів обчислення коефіцієнтів молярної екстинкції сульфгемоглобіну (SHb).

У крові людини можна виділити такі форми гемоглобіну: оксигемоглобін (HbO), карбоксигемоглобін (HbCO), метгемоглобін (MetHb), дезоксигемоглобін (RHb) та сульфгемоглобін (SHb). В нормальному стані оксигемоглобін становить (94–97)%, рівень карбоксигемоглобіну є (0–2)%, рівень дезоксигемоглобіну – (0–5)%, рівень метгемоглобіну – (1–2)%, сульфгемоглобіну (SHb) – немає [4, 5].

Фізіологічні процеси в організмі людини, які пов'язані зі збільшенням концентрації мет- та сульфгемоглобіну та зменшенням вмісту кисню у крові, називають у медицині, відповідно, мет- і сульфгемоглобінемією. In vitro, сульфгемоглобін утворюється у разі додавання сірководню (H_2S) до гемоглобіну [6]. In vivo, сульфгемоглобін утворюється з H_2S , який виробляється кишковими бактеріями, але режим утворення досі не пояснений. Вміст SHb рідко перевищує 10% від загальної кількості гемоглобіну [7, 8]. Зважаючи на сказане вище, кількісний і якісний аналіз похідних форм гемоглобіну в крові має важливе значення для оцінки транспортних властивостей крові.

На даний момент коефіцієнти молярних екстинкцій дезокси-, окси-, карбокси- та метгемоглобіну широко описані в літературі. При цьому досить скупо подано інформацію щодо коефіцієнта молярної екстинкції сульфгемоглобіну. Це пов'язано з тим, що неможливо отримати абсорбційний спектр даного деривату гемоглобіну в чистій формі [6, 9]. Однак точно відоме значення коефіцієнта молярної екстинкції сульфгемоглобіну на довжині хвилі $\lambda=620$ нм і дорівнює 20,8 л/ммоль·см. Ця довжина хвилі є аналітичною для визначення коефіцієнта молярної екстинкції сульфгемоглобіну.

Метою цієї статті було показати можливість застосування хемометричних методів до обробки спектрів поглинання оксигемоглобіну та перехідної форми гемоглобіну з окси- в сульфформу для отримання абсолютних значень коефіцієнтів молярної екстинкції сульфгемоглобіну.

У процесі виконання роботи було оброблено 30 спектрів поглинання оксигемоглобіну та спектрів поглинання перехідної форми гемоглобіну з окси- в сульфформу, що були отримані раніше. Методика підготовки зразків та проведення вимірювань наведені у [7, 8]. Отримані результати обробляли за такою методикою:

- знятий спектрометром спектр, що містив окси- та сульфпохідні гемоглобіну, нормували за значеннями оптичної густини на довжині хвилі максимуму спектра поглинання сульфгемоглобіну;
- з отриманих спектрів поглинання HbO_2 та спектра поглинання перехідної форми гемоглобіну з окси- у сульфформу визначали концентрацію сульфгемоглобіну на довжині хвилі 620 нм за відомою формулою по величинах коефіцієнтів молярної екстинкції, які дорівнювали 20,8 л/ммоль·см для сульфгемоглобіну і 0,24 л/ммоль·см для оксигемоглобіну [5];
- після того, як було отримано значення концентрації сульфгемоглобіну, визначалась концентрація оксигемоглобіну в загальному спектрі;
- наступним кроком була побудова модельного спектра оксигемоглобіну з мало змінною концентрацією за відомими літературними даними для коефіцієнта молекулярної екстинкції HbO_2 ;
- модельний спектр сульфгемоглобіну будували як різницю між сумарним і модельним спектрами оксигемоглобіну з мало змінною концентрацією;
- зі спектра сульфгемоглобіну з відомими оптичними густинами і обчисленою концентрацією можна побудувати спектральну залежність коефіцієнтів молярної екстинкції від довжини хвилі;
- брали до уваги такі відомі чинники: перетворення оксигемоглобіну в сульфгемоглобін досягає насичення у вмісті останнього у крові в концентраціях близьких до 50%; виникнення в процесі перетворення лише форми сульфгемоглобіну контролюється на максимумі 620 нм у спектрі поглинання останнього [10].

Метод визначення коефіцієнтів молярної екстинкції сульфгемоглобіну ґрунтується на такому рівнянні:

$$\varepsilon_{SHb}^{620} = \frac{A^{620} f}{S_{SHb} c_{Hb}^* l},$$

де ε_{SHb}^{620} – коефіцієнт екстинкції SHb при $\lambda=620$ нм; A^{620} – оптична густина при $\lambda=620$ нм; S_{SHb} – різниця між двома суспензіями, які утворюють фракцію SHb; c_{Hb}^* – загальна концентрація гемоглобіну; $l=1,00$ см – довжина оптичного шляху; f – коефіцієнт

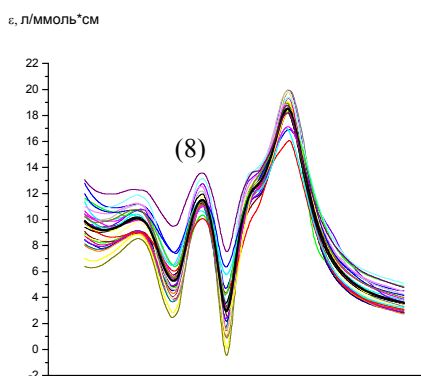


Рис. 1. Спектри коефіцієнтів молярної екстинкції сульфгемоглобіну

розчинності.

Отримані значення коефіцієнтів молярної екстинкції сульфгемоглобіну для 30 спектрів показані на рис. 1. За допомогою хемометричних методів була також оцінена похибка експерименту. На рис. 2 наведені отримані результати обчисленого стандартного відхилення та довірчого інтервалу. Як бачимо, похибка в обох випадках збігається.

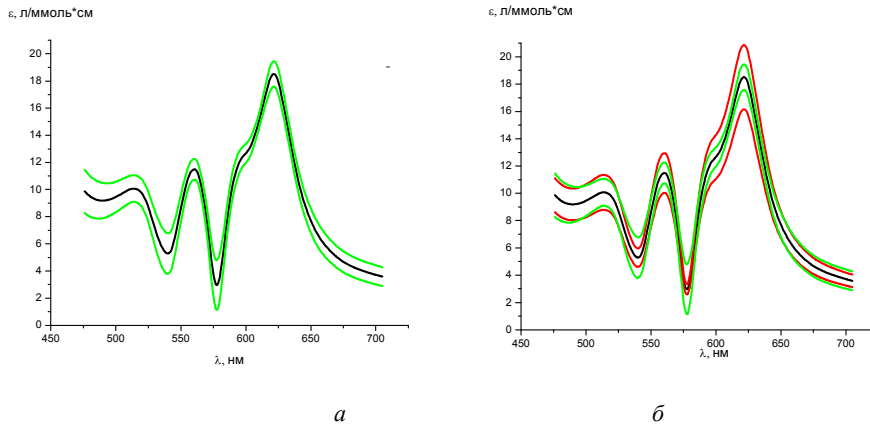


Рис.2. Стандартне відхилення (а), довірчий інтервал (б)

За допомогою методів хемометрії визначено спектри поглинання сульфгемоглобіну та обчислено значення коефіцієнтів молярної екстинкції цього деривату крові. Отримані значення для аналітичних довжин хвиль відрізняються від наведених в дослідженнях (рис. 3). Така відмінність, на нашу думку, пов'язана з різними підходами до методів вимірювань та підготовки зразків [11, 12]. Надалі планують уточнення значень коефіцієнтів молярної екстинкції сульфгемоглобіну за допомогою інших методів.

На підставі аналізу спектрів поглинання похідних форм гемоглобіну можна зробити такі висновки щодо хемометричного методу аналізу:

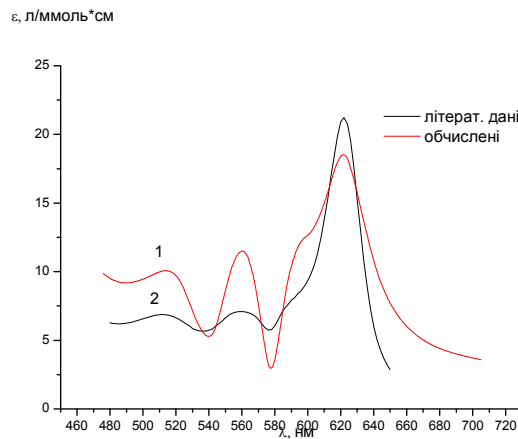


Рис. 3. Порівняння отриманих експериментально значень коефіцієнта молярної екстинкції сульфгемоглобіну (1) з літературними даними (2)

1. без застосування методу неможливо виділити спектр поглинання сульфгемоглобіну;
2. метод дає змогу оптимізувати вибір оптичних довжин хвиль;
3. оцінка похибки за допомогою методу допомагає оптимізувати необхідну кількість досліджуваних спектрів.

-
1. <http://chemstat.com.ru/lectons/html>
 2. *Kramer R.* Chemometric techniques for quantitative analysis. New York: Marcel Dekket Inc., 1998. P. 51–71.
 3. *Brereton R.G.* Chemometries. Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant. West Sussex: John Wiley & Sons Inc., 2003. P. 191–254.
 4. *Boylston M., Beer D.* Pulmonary Care. Methemoglobinemia: A Case Study // *Critical Care Nurse*. 2002. N 22. P. 50–55.
 5. *Сухомлинов Б.Ф., Тиунов Л.А., Лукьянец В.М.* та др. Спектрофотометрическое исследование системы лигандных форм гемоглобина в одной пробе крови // *Вестник ЛНУ. Биология*. 1988. N 18. С. 36–42.
 6. *Bilyi O.I., Veliky M.M., Dudok K.P.* Original method of concurrent determination of hemoglobin derivatives // *Proc. SPIE*. 2000. N 3926. P. 223–228.
 7. *Veliky M.M., Bilyi O.I., Dudok K.P.* Determination of hemoglobin derivatives in blood by method of optical density ratio // *Proc. SPIE*. 2001. N 4515 P. 199–201.
 8. *Дудок К., Білий І., Великий М., Бурда В., Федорович А.* Дослідження динаміки лігандних форм гемоглобіну у працівників взуттєвого виробництва // *Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.* 2001. № 27. С.47–52.
 9. *O.W.van Assendelft.* Visible and Near Infrared Absorption Spectra of Human and Animal Hemoglobin determination and application. JC Leiden, 2000, 368 p.
 10. *Olexander Bilyi, Oleg Bordun, Ivanna Yarynovska.* Luminescent spectroscopy of dry tailings urine // *Proc. SPIE*. 2006. N 6254. P. 448–453.
 11. *A. Zwart, I E. J. van Kampen, and W. G. Zijlstra.* Results of Routine Determination of Clinically Significant Hemoglobin Derivatives by Multicomponent Analysis // *Clin. Chem*. 1986. N 32/6. P. 972–978.
 12. *W.G.Zijlstra, A.Buurama, A.Zwart.* Performance of an Automated Six-Wavelength Measurement of Hemoglobin Derivatives // *Clin. Chem*. 1988. N 34. P. 149–152.

**CHEMOMETRIC TECHNIQUE FOR ANALYSIS OF ABSORPTION SPECTRA
OF SULFHEMOGLOBIN****I. Yarynovska, O. Bilyi, V. Savaryn***Ivan Franko Lviv National University, Radiophysic Department**Dragomanov Str., 19, UA-79005 Lviv, Ukraine**e-mail: vsavaryn@ukr.net*

Absorption spectrums of oxyhemoglobin (HbO₂) and transitional form from oxy- to sulfhemoglobin in the spectral range 450–750 nm were investigated. The chemometrical methods were used to calculate molar extinction coefficients of sulfhemoglobin (SHb). The advantages of the method were analyzed. The received results are compared with data that are described in the literature. Measuring mistakes were taken into account.

Key words: absorption spectrums of sulfhemoglobin, oxyhemoglobin, molar extinction coefficients, chemometry.

Стаття надійшла до редколегії 20.03.2007

Прийнята до друку 09.06.2008