

## 血清헤모구로빈 測定에 關한 研究

서울大學校 醫科大學 生化學教室, 精神科學教室\*

蔡範錫 · 曹景煥 · 李哲奎\*

*Journal of Korean Nutrition Society*, 1974, 7 (4), 30-33. **A Spectrophotometric Method for the Estimation of**

B.S. Tchai, M.D., K.H. Cho, M.D., and J. Chai, M.D.

Department of Biochemistry, College of Medicine, Seoul National University

Hemoglobinemia is found in hemolytic anemia, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and paroxysmal hemoglobinuria. Recently increasing use of extracorporeal circulation in cardiac surgery has stimulated the development of more precise methods for rapidly evaluating the formation and clearance of extracorporeal hemoglobin.

A spectrophotometric method of analysis seemed to offer the best solution to the requirements. The method presented is on the basis of hemoglobin derivatives converted to cyanmethemoglobin, and the absorbance is measured in a spectrophotometer at 540 and 680 nm. The blank value is measured at 680 nm while the absorbance at 540 nm measures the hemoglobin derivatives. This method estimates all the hemoglobin derivatives such as oxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, methemoglobin, sulfhemoglobin and hemialbumin.

The method was tested in recovery experiments, which is given table 1. A good degree of correlation was obtained in a comparison with the method described by Crosby and Furth for non-hemolyzed serum. The spectrophotometric technique described offers many advantages in speed and simplicity over the chemical procedure.

### 緒 論

血清中の 헤모구로빈 量은 微量이며 約 1~4 mg/100 ml 程度이다. 臨床的으로 溶血性貧血, 夜間血色素尿症의 診斷 그리고 最近 心臟外科에서 體外循環의 應用이 늘어나고 여러가지 人工心肺의 開發서 血清헤모구로빈測定은 대단히 重要的 檢査로서 註目되게 되었다. 또한 臨床化學分析에서 溶血血清은 有意한 誤差의 原因이 된다. 檢査室에 보내은 血清中에는 肉眼的으로 溶血을 볼 수 있는 檢體가 相當數였으며 輕度의 溶血은 더 많을 것이다. 普通의 生化學的 檢査는 溶血로 因해서 크게 그 값이 變動되지 않는다 하더라도 微量金屬

本 論文의 要旨는 1974年 11月 9日 第8回 韓國營養學會 總會에서 發表하였음.

및 酵素의 測定時에도 肉眼으로 볼 수 없는 溶血로 有意한 誤差의 原因이 될 수 있다<sup>3)</sup>. 따라서 血清헤모구로빈의 測定은 迅速, 正確하고 簡單하게 測定할 수 있는 方法이 더욱 더 要求되고 있다.

헤모구로빈은 血清中에 遊離되면 酸化되어 헤모구로빈(hemoglobin methemoglobin)으로되며 이것은 血清 알부민(hemialbumin)으로 된다. 따라서 遊離헤모구로빈뿐만 아니라 헤미알부민까지 測定할 수 있을때 血清 헤모구로빈 測定은 信賴할 수 있는 成績을 얻을 수 있을 것이다<sup>4)</sup>.

血清 또는 血漿헤모구로빈의 測定에는 헤모구로빈 및 그 誘導體의 吸光係數를 使用하는 分光光度計法<sup>5)</sup>과 헤모구로빈과 헤마틴(hematin) 色素의 酸化觸媒作用을 利用한 벤지딘(benzidine)과 같은 基質의 變色度를 比色測定하는 方法<sup>6)</sup>으로 나눌 수 있다.

그러나 지금까지 알려진 여러가지 方法으로는 遊離 헤모구로빈誘導體 및 헤미알부민을 모두 測定할 수 없으나 헤모구로빈을 헤미구로빈사이아나이드(hemiglobin-cyanide, cyanmethemoglobin)로 變換시키면 이들 誘導體 모두를 測定할 수 있다.

따라서 著者等은 血清中の 헤모구로빈誘導體를 hemiglobincyanide로 바꾸어 波長 540 및 680 nm의 吸光度를 求하여 血清헤모구로빈을 測定<sup>4)</sup>하였으며 正常值 및 分光光度計法과 Crosby-Furth 法<sup>7)</sup>을 比較檢討하여 그 結果를 報告한다.

## 方 法

### 1) 對 象

肉眼的으로 溶血을 볼 수 없는 血清 97例와 人工心 肺使用患者의 血清 25例의 血清헤모구로빈濃度を 測定하였다.

### 2) 試 藥

#### a) 修正 Drabkin 溶液

KCN 50 mg,  $K_3Fe(CN)_6$  200 mg,  $KH_2PO_4$  140 mg, Sterox SE. 0.5 ml 를 蒸溜水에 溶解시켜 1,000 ml 로 만들었다.

#### b) 標準 hemiglobin cyanide 溶液

赤血球을 生理的食鹽水로 씻어 물을 加하여 溶血시킨 後 hemiglobin cyanide 法(分光光度計法)으로 그 濃度を 測定하여  $-20^{\circ}C$ 에 保存하였다. 使用時에 適當하게 稀釋하여 標準液으로 使用하였다.

### 3) 操 作

2.0 ml의 修正 Drabkin 溶液이 들어있는 分光光度計 cuvet( $d=1$  cm)에 血清 0.5 ml 를 加하고 pipet 를 여러 번 씻은 後 잘 混和한다. 5分後에 Drabkin 溶液이나 蒸溜水を 對照로 하여 540 nm 와 680 nm 에서 그 吸光度를 測定한다.

### 5) 計 算<sup>4)</sup>

血清헤모구로빈濃度は 다음 式으로 計算하였다.

血清헤모구로빈濃度(mg/100 ml)

$$= \frac{[A(540 \text{ nm}) - A(680 \text{ nm})] \times 16,114 \times 10^3}{10,800 \times 1 \times 10} \times \frac{2.5}{0.5}$$

16,114; 헤모구로빈分子量

10,800; 540 및 680 nm 間의 差에 對한 分子吸光

A; 吸光度

## 結 果

### 1) Hemiglobincyanide 法에 依한 回收實驗

本法의 回收率은 表 1과 같이 103%로 부터 120%이며 血清헤모구로빈濃도가 30 mg/100 ml 以下에서는 그 回收率이 높으며 그 以上에서는 比較的 낮아서 100%에 가깝다.

Table 1.

Hemoglobin Added (mg/100 ml)	Amount Found (mg/100 ml)	Amount Expected (mg/100 ml)	Recovery (%)
0	1.0	0	0
9.0	12.1	10	121.0
29.0	35.5	30	118.3
49.0	52.5	50	105.0
69.0	72.2	70	103.1
89.0	93.5	90	103.8
119.0	114.0	110	103.6

### 2) Crosby-Furth 法과의 相關關係

同一檢體를 本法과 Crosby-Furth 法으로 測定한 變動係數는 本法에서 1.62% 그리고 Crosby-Furth 法에서 1.57%였다.

任意的 30例의 測定值의 平均은 22.75 mg/100 ml 이며 Crosby-Furth 法은 22.68 mg/100 ml 로서 相關係數는  $r=0.965$ 이었다.

3) 肉眼的으로 溶血을 볼 수 없는 血清 97例의 血清헤모구로빈濃度は 28.94 $\pm$ 11.56 mg/ml 이었다.

4) 乾燥한 注射器로 檢出한 血清 126例에서 16例(12.6%)에서 肉眼的의 溶血을 볼 수 있었으며 나머지 110例는 肉眼的으로 溶血을 볼 수 있었다. 이 110例의 血清헤모구로빈濃度は 28.65 $\pm$ 19.76 mg/100 ml 이었다.

5) 人工心 肺使用前 患者 25名의 血清헤모구로빈濃度は 28.94 $\pm$ 17.68 mg/100 ml 이었다.

## 考 察

血清헤모구로빈測定法에는 Crosby-Furth 法<sup>7)</sup>, 同法의 Hanks<sup>8)</sup>等의 改良法이 있으며 또한 Vanzetti<sup>9)</sup>等은 微量測定의 方法을 報告하고 31例의 健康人 血漿헤모구로빈量은 平均 0.415 mg/100 ml 라고 報告하였다. 한편 血漿(血清)헤모구로빈의 測定은 檢血操作, 그 以後의 處理에 依한 人爲的인 溶血은 避하기 어려우며, 또한 그 程度를 肉眼的으로 判定하는 것은 不可能한 것이 指摘하였다.

血清헤모구로빈 濃도가 50 mg/100 ml 을 넘으면 溶血은 肉眼的으로 알 수 있으나 普通 눈으로 보아서 溶血이 되지 않았다고 생각되는 透明血清에 對해서도 artifact

에 의한 溶血을 否定할 수 없다.

Hanks 等<sup>8)</sup>은 Crosby-Furth 法<sup>7)</sup>을 다시 檢體量, 試藥의 濃度 및 反應時間을 改良하여 더욱 感度を 높혀서 微量헤모구로빈의 測定을 可能케 하였다.

그러나 本法은 Crosby-Furth 法과 달리 遊離헤모구로빈 뿐만아니라 血清中の 헤미알부민까지 測定되며 血清中の 모든 헤모구로빈 誘導體를 hemiglobincyanide 로 變換시켜 測定하므로 前 方法보다 높은 값을 나타내는 것 같다. 또한 一般으로 檢血에 使用되는 乾燥注射器나 注射筒과 피스톤이 잘 맞지 않아 이때 생기는 物理的 溶血도 相當하다고 생각된다.

本法은 正常狀態의 血漿헤모구로빈의 變化를 測定할 수 있으리만큼 銳敏하지는 못하나 本法에서 使用하는 試藥의 調製, 添加試藥의 種類 및 操作이 簡單하여 反復依賴되는 檢體處理에 있어서 迅速하고 正確하며 簡單하게 操作 測定할 수 있는 實用的인 方法이라고 생각된다.

### 結 論

著者は 血清헤모구로빈 測定法으로 hemiglobincyanide 分光光度計法을 使用하여 肉眼의으로 溶血을 볼 수 없는 血清 97例의 血清헤모구로빈을 測定하며  $28.94 \pm 11.56 \text{mg/ml}$ 의 값을 얻었다. 아울러 Crosby-Furth 法과 比較檢討하였으며 血清헤모구로빈 測定法으로 hemiglobincyanide 分光光度計法은 迅速하고 正確한 方法이란 結論을 얻었다.

### REFERENCES

1) Harmann, R.C., and Auditore, J.V.: *Paroxysmal*

*nocturnal hemoglobinuria. I. Clinical studies. Amer. J. Med., 27: 389-400, 1959.*

2) Keith, H. B., et al.: *Massive hemolysis in extracorporeal circulation, J. Thorac. Cardio. Surg., 41:404-409, 1961.*

3) Henry, R. J.: *Clinical chemistry: Principles and technics, Hoeber Medical Division, New York: Harper & Row, 1964. p. 786-789.*

4) Richterich, R.: *Clinical Chemistry; Theory and Practice. English Edition. S. Karger-Basel, New York, 1969. p. 341.*

5) Shinowara, G.Y.: *Spectrophotometric studies on blood serum and plasma; the physical determination of hemoglobin and bilirubin. Amer. J. Clin. Pathol., 24: 696-710, 1954.*

6) Jacobs, S. L. and A. A. Fernandez.: *Hemoglobin in plasma. Stand. Methods Clin. Chem., 6:107, 1970.*

7) Crosby, W. H., Furth, F. W.: *A modification of the benzidine method for measurement of hemoglobin in a plasma and urine. Blood, 11: 380-383, 1956.*

8) Hanks G. E., et al.: *Furthur modification of the benzidine method for measurement of hemoglobin in plasma. J. lab. & Clin. Med., 6:486-498, 1960.*

9) Vanzetti, G. and Valente, D.: *A sensitive method for the determination of hemoglobin in plasma. Clin Chim. Acta, 11:442-446. 1965.*