

Рекомендована д.ф.н., професором В.В.Болотовим

УДК 616-005.1-036.15-074

## ДО ПИТАННЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПРИХОВАНОЇ КРОВІ

М.Є.Блажеєвський

Українська фармацевтична академія

**Розглянуті методи визначення прихованої крові за гемоглобіном. Показано, що хемілюмінесцентний метод визначення прихованої крові з використанням люмінолу є найбільш простим, швидким та високочутливим.**

Для профілактики гепатитів, СНІДу та деяких інших інфекційних захворювань, які можуть передаватися через кров, важливе значення має якість передстерилізаційної очистки виробів медичного призначення від залишків крові.

В клінічних лабораторіях та санітарно-епідеміологічних закладах контроль за якістю очистки виробів медичного призначення здійснюють за допомогою проб на приховану кров — хімічної реакції на пероксидазу. Для постановки проби необхідні хромоген — речовина, що оксидується з утворенням барвника, та джерело кисню — окислювач. Як правило, окислювачем служить пероксид водню, а каталізатором — гемоглобін, який володіє високою пероксидазною активністю.

Класичною високочутливою реакцією на кров є проба з бензидином або ж з його похідними — орто-толїдином чи орто-діанїзидином [6, 11]. Однак ці сполуки канцерогенні і систематична робота з ними небезпечна для людини [10, 13]. До таких, потенційно небезпечних речовин належить і амідопірин — сполука, що використовується як хромогенний субстрат разом із аніліном у відомому реактиві для виявлення крові — азопірамі [2]. Тому питання розробки нових проб на приховану кров з використанням хромогенів, які б мали малу токсичність і не поступалися за чутливістю бензидиновій пробі, залишається і надалі актуальним.

Пізніше був запропонований 3,3',5,5'-тетраметилбензидин [20], який менш небезпечний та може бути використаний замість зазначених вище реагентів. Основним недоліком застосування тетраметилбензидину є низька стабільність продукту його оксидації.

Вважають [24], що є переконливі докази того, що ароматичний амін канцерогенний в тому випадку, коли аміногрупа знаходиться в такому

положенні поліядерної ароматичної системи, яке еквівалентне положенню 2 в нафтиламіні чи пара-положенню по відношенню до біфенільного зв'язку. Подальше введення замісників може посилювати або знижувати канцерогенну активність. Так, підсилення канцерогенних властивостей спостерігається в тому випадку, коли ароматичне кільце несе метильні або метоксильні замісники, в той час як гідроксильні, карбоксильні чи сульфо-групи зменшують канцерогенність аміну. Тому вибір хромогенних субстратів слід проводити, керуючись цими положеннями.

В роботі [18] вивчена чутливість, надійність і специфічність методів, в основі яких лежать кольорові реакції гемоглобіну та ряду інших гемопротейдів з відновленою формою малахітового зеленого, а також бензидином та о-діанїзидином для порівняння. При дослідженнях використовували буферну систему на основі гліцину і сечовини з рН 3,6. Встановлена тривала стабільність продукту оксидації в цій реакції. Визначенню гемоглобіну заважають хлорид заліза (III) та аскорбінова кислота. Метод характеризується більшою чутливістю і надійністю в порівнянні з бензидиновим методом.

Індійськими вченими як реагенти для визначення прихованої крові використовувались феноліази [17]. Визначення проводили в середовищі водного розчину оцтової кислоти в присутності етилендіамінотетраоцтової кислоти. Появу рожевого, червоного або блакитного (у випадку гідрохлориду метіомепразину) забарвлення, зумовленого утворенням стабільного сульфоксидного радикалу, розцінювали як позитивний результат. Інтенсивність та швидкість розвитку забарвлення залежала від кількості крові, яка містилась в біологічному матеріалі. Концентровані розчини пероксиду водню та розчину реагенту призводять до одержання неправильних результатів.

Дималеат прохлорперазину та гідрохлорид хлорпромазину рекомендовані, як кращі феноліази для звичайних досліджень в лабораторії.

В роботі показано, що зазначені вище субстрати в присутності рослинних пероксидаз, каталаз, катіонів багатьох металів (у тому числі Fe(II), Fe(III)) не дають правдивих результатів.

Описаний модифікований метод визначення мікрокількостей гемоглобіну в біологічному матеріалі з використанням гідрохлориду хлорпромазину. Даний реагент при окисації утворює вільний радикал з максимумом поглинання при 525 нм. Найбільший вихід цього продукту спостерігається в 40 мМ фосфатному буфері з рН 8,0; оптимальні концентрації пероксиду водню та субстрату — 6,8% і 0,5 М відповідно. Запропонований метод дозволяє визначити 0,8–1,2 мкг гемоглобіну крові в пробі. Слід зазначити, що вказаний реагент є малотоксичною сполукою і широко використовується в медичній практиці як лікарський препарат [1]. В ролі хромогену може використовуватись гваякова смола [15]. Однак реактиви на приховану кров, виготовлені на її основі, менш чутливі та надійні, ніж реактиви з бензидином [6].

Спроби використати інші хромогени не одержали широкого поширення при визначенні прихованої крові через недостатню інтенсивність забарвлення індикатора або ж складність постановки реакції, її недостатньої надійності та специфічності [4, 14, 16].

Інтерес викликають методи визначення гемоглобіну крові з використанням реакцій окисаційного сполучення. До таких, зокрема, належить вищезгадана азопірамова проба на основі двокомпонентного хромогену [8]. В процесі реакції анілін вступає в хімічну взаємодію з продуктами окисації амідопірину з утворенням нової стійкої і яскраво забарвленої сполуки реакції окисаційного сполучення. Дана реакція за специфічністю і чутливістю не поступається бензидиновій пробі і набагато перевищує названі показники відомої проби із власне амідопірином. Реактив азопірам дозволяє виявляти кров при розведенні 1:200000. Позитивним результатом азопірамової проби є проведення реакції у водно-спиртовому середовищі. За таких умов продукт окисації реактиву добре розчинний і має високе питоме поглинання. Значення холостої проби в середовищі розчину етанолу мінімальне в порівнянні з таким же, отриманим у водному розчині. Однак можливе утворення високотоксичних похідних в даних системах [3] ставить під сумнів подальше використання реактиву азопірам для контролю якості передстерилізаційної очистки медичного інструментарію. Такий же недолік мають і методи визначення слідових кількостей гемоглобіну крові з використанням в якості компонентів реакції 4-аміноантипірину і фенолу [19]. За чутливістю даний метод не по-

ступається бензидиновому. Використання буферних сумішей на основі фосфатної кислоти дозволяє уникнути високих значень холостої досліду. Недоліком методу є також тривалість визначення, коли його виконують при кімнатній температурі. Запропонований модифікований метод [21], який дозволяє в декілька разів підвищити чутливість аналізу за рахунок використання замість фенолу 2-окси-3,5-дихлорбензолсульфонату.

Принципово новим напрямком в ряду хімічних методів визначення гемопротеїдів є проведення аналізу люмінесцентним методом.

Відомо, що всі системи, в яких утворюються активні форми кисню, володіють хемілюмінесценцією [9]. До таких систем відноситься реактив Фентона, а також системи пероксиду водню з геміновими білками, котрі можуть каталізувати розпад пероксиду водню з утворенням гідроксильних радикалів [7]. Низька інтенсивність цього свічення та сильна залежність від випадкових домішок вимагає використання активаторів хемілюмінесценції. До таких речовин належить, зокрема, широко вживаний хемілюмінесцентний індикатор — люмінол. Останній, як відомо, вступає в пряму хімічну взаємодію з радикальними формами кисню та пероксиду водню, утворюючи пероксидний радикал. В результаті ряду внутрішньомолекулярних перебудов утворюється 3-аміно-фталат у збудженому електронному стані, перехід якого в основний стан супроводжується вилученням світла [22].

Ця реакція вперше була використана в 1937 році для виявлення слідів крові Шпектом [23] і в подальшому застосовувалась, як проба на кров в судовій хімії. Появу фіолетово-блакитного свічення розцінюють як позитивний результат. Проведення реакції в лужному середовищі сприяє підвищенню її чутливості за рахунок досягнення максимальної різниці між значеннями корисного сигналу та фонового свічення. Ця реакція дозволяє виявляти сліди крові при розведенні 1:1000000 [5, 12].

Безперечною перевагою даного способу виявлення слідів крові є низька вартість одиничного аналізу, доступність реактивів, простота виконання і висока чутливість.

Таким чином, з наведеного огляду видно, що серед відомих методів визначення прихованої крові хемілюмінесцентний метод є найбільш чутливим, простим та експресним, а використання як реагенту нешкідливого для людини гідразиду 3-амінофталевої кислоти (люмінолу) сприяє його широкому застосуванню в медичній практиці.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Государственная фармакопея СССР. — 10-е изд. — М.: Медицина, 1968. — 1079 с.
2. Методические рекомендации. Контроль качества предстерилизационной очистки изделий медицинского назначения с помощью реактива азопирам. Министерство здравоохранения СССР. Главное управление карантинных инфекций. — Л., 1988. — 7 с.
3. Беляев Е.Ю., Гидаспов Б.В. Ароматические нитрозосоединения. — Л.: Химия, 1988. — 176 с.

4. Берстон М. Гистохимия ферментов. — 1965. — С. 341.
5. Блажеевский Н.Е.// Тез. докл. республ. науч.-практ. конф. — Харьков, 1993. — С. 252.
6. Божуяева Н.И.// Справочник по клиническим лабораторным методам исследования/ Под ред. Е.А.Кост. — 2-е изд. — М., 1975. — С. 276-277.
7. Ефуни С.Н., Каплан Е.Я., Лукаш А.И. и др.// Бюлл. эксп. биол. и мед. — 1984. — Т. 97. — №7. — С. 42-43.
8. Иоганнсен М.Г. Двухкомпонентный неканцерогенный хромоген для определения скрытой крови// Лабораторное дело. — 1982. — №10. — С. 21-24.
9. Константинов-Шлезингер М.А. Люминесцентный анализ. — Л., 1948.
10. Лазарев Н.В. Вредные вещества в промышленности. — Л., 1963. — Т. 1. — С. 599-600.
11. Свобода В., Челеховска О. А.С.№607140 СССР G 01N 33/16. Оpubл. 1978 Б.И. №18.
12. Спосіб визначення прихованої крові: Заявка 93010078, Україна, МКВ<sup>3</sup>G 01N 33/48/ Блажеєвський М.Є. — Заявл. 21.12.92.
13. Тайхман Б., Шрамм Т. Канцерогенные вещества. 2-е изд. Берлин, 1976. — С. 32, 81.
14. Патент Великобританії 1186668, G 01N 33/16, 1970.
15. Патент США 3996006, G 01N 21/06, 1980.
16. Патент ФРН 1648840, G 01N 33/72, 1970.
17. Akheel S., Ahmed S., Sanke Gowda H.// Clin.Chem. Acta. — 1981. — Vol. 111. — №2/3. — P. 275-278.
18. Ahlquist D.A., Schwartz S.// Clin. Chem. — 1975. — Vol. 21. — №3. — P. 362-369.
19. Bauer Kurt.// J.Clin. Chem., Clin. Biochem. — 1981. — Vol. 19. — №9. — P. 971-976.
20. Holland V.R., Saunders B.C., Rose F.L. and Walpole A.L.// Tetrahedron. — 1974. — Vol. 30. — P. 3299.
21. Mc. Gowan M.W., Artiss J.D., Zak B.// J.Clin.Chem. Clin.Biochem. — 1981. — Vol. 19. — №8. — P. 769.
22. Misra H.P., Squatrio P.M.// Arch.Biochem. and Biophys. — 1982. — Vol. 215. — P. 59-65.
23. Specht M.// Angew. Chem. — 1937. — Vol. 50. — P. 155-157.
24. Wiesburger J.H. and Wiesburger E.K.// Chem. and Eng. News. — 1966. — Vol. 43. — P. 124-142.

УДК 616-005.1-036.15-074

#### К ВОПРОСУ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СКРЫТОЙ КРОВИ

Н.Е.Блажеевский

Рассмотрены методы определения скрытой крови по гемоглобину. Показано, что хемилюминесцентный метод определения скрытой крови с использованием люминола является наиболее простым, быстрым и высокочувствительным.

UDC 616-005.1-036.15-074

#### DETERMINATION OF OCCULT BLOOD

N.E.Blazheyevskij

Methods for determination of occult blood on haemoglobin are studied. It is shown, that the chemiluminescence method for determination of occult blood using luminol is most simple, express and sensitiv.

## ДОВІДНИК ВФ

### “ЛАТИНСЬКА МОВА ТА ОСНОВИ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ ТЕРМІНОЛОГІЇ”

(Учбово-методичний посібник для студентів-технологів факультетів промислової фармації) — Харків, 1994. (Анотація)

Учбовий посібник створений на основі учбового плану для факультетів промислової фармації фармацевтичних вузів і передбачає навчання спеціальної термінології майбутніх спеціалістів деяких профілів: технологів біохімічного синтезу, фітотерапевтів і спеціалістів з технології готових лікарських форм. Посібник містить відомості з сучасної фармацевтичної термінології, а також граматики латинської мови. Граматичний матеріал наведений в мінімальному об'ємі, необхідному для того, щоб студенти навчилися правильно читати і писати спеціальні терміни, рецепти, свідомо використовувати латинську професійну термінологію на практиці.

Підручник складатиметься з основного курсу, додатку, латинсько-російського і російсько-латинського словарів. Учбовий матеріал згрупований в окремі заняття, кожне з яких передбачає коротке викладення граматичної теми, контрольні питання, вправи і обов'язковий лексичний мінімум.

Посібник розрахований на 38 учбових годин.