proLékaře.cz | 6.11.2026

doi: 10.48095/cctahd2025prolekare.cz5

Porovnání dvou metod měření volného hemoglobinu v supernatantu erytrocytových transfuzních přípravků

Comparison of two methods for measuring free haemoglobin in the supernatant of erythrocyte transfusion products

Řehořová L.[1], Matoušek P.[2], Procházková R.[1,3]

[1] *Transfuzní oddělení, Krajská nemocnice Liberec, a.s.*
[2] *Oddělení klinické biochemie, Krajská nemocnice Liberec, a.s.*
[3] *Fakulta zdravotnických studií, Technická univerzita v Liberci*

SOUHRN: **Úvod:** Při skladování erytrocytových transfuzních přípravků stoupá hladina volného hemoglobinu, markeru probíhající hemolýzy. Doporučení Rady Evropy *(Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components, 21st Edition)* a česká legislativa (Vyhl. č. 143/2008 Sb.) určují jeho maximální hodnotu jako 0,8 % erytrocytové hmoty na konci doby použitelnosti transfuzního přípravku. Měření % hemolýzy je také doporučeno u erytrocytových transfuzních přípravků, které jsou dále upravovány, např. promytím. Cílem práce bylo porovnat dvě metody měření volného hemoglobinu v supernatantu erytrocytových transfuzních přípravků přímou spektrofotometrií a zjistit vhodnost metody stanovení volného hemoglobinu v transfuzních přípravcích dle Harboea. **Soubor a metodika:** Do studie bylo zařazeno 20 jednotek erytrocytových transfuzních přípravků. Na konci exspirace byly odebrány vzorky supernatantu a změřena hodnota volného hemoglobinu metodou přímé spektrofotometrie stanovením absorbance vzorku při 540 nm (A) a změřením absorbance při vlnových délkách 415 nm, 450 nm a 380 nm dle Harboea (B). Procento hemolýzy erytrocytární masy pak bylo přepočítáno na objem a hematokrit erytrocytového transfuzního přípravku. **Výsledky:** Hladina volného hemoglobinu na konci doby skladování erytrocytových transfuzních přípravků nepřesáhla 0,8 % erytrocytové masy u všech jednotek – průměrně 0,31 % (A) a 0,29 % (B). Mezi oběma soubory nebyl zjištěn statisticky ani klinicky významný rozdíl. **Závěr:** Metoda měření absorbance při vlnových délkách 415 nm, 450 nm a 380 nm dle Harboea odpovídá běžně používané metodě měření při 540 nm a je vhodná k měření obsahu volného hemoglobinu v transfuzních přípravcích.

KLÍČOVÁ SLOVA: erytrocyty – hemolýza – spektrofotometrie

SUMMARY: **Introduction:** During the storage of erythrocyte transfusion products, the level of free haemoglobin, a marker of ongoing haemolysis, increases. The European Council's recommendations *(Guide to the preparation, use, and quality assurance of blood components, 21st Edition)* and Czech legislation (Decree No. 143/2008 Coll.) set the maximum level of free haemoglobin at 0.8% of erythrocyte mass by the end of the transfusion product's shelf life. Measuring the percentage of haemolysis is also recommended for erythrocyte transfusion products that undergo further processing, such as washing. The aim of this study was to compare two methods for measuring free haemoglobin in the supernatant of erythrocyte transfusion products: direct spectrophotometry and the Harboe method for determining free haemoglobin content in transfusion products. **Materials and Methods:** The study included 20 units of erythrocyte transfusion products. At the end of the shelf life, supernatant samples were collected, and the free haemoglobin level was measured using direct spectrophotometry by determining the absorbance of the sample at 540 nm (A) and measuring absorbance at wavelengths of 415 nm, 450 nm, and 380 nm according to Harboe (B). The percentage of haemolysis of the erythrocyte mass was then calculated based on the volume and haematocrit of the erythrocyte transfusion product. **Results:** The level of free haemoglobin at the end of the storage period did not exceed 0.8% of erythrocyte mass for any unit – on average, 0.31% (A) and 0.29% (B). No statistically or clinically significant differences were found between the two methods. **Conclusion:** The method of measuring absorbance at wavelengths of 415 nm, 450 nm, and 380 nm according to Harboe corresponds to the commonly used method at 540 nm and is suitable for measuring free haemoglobin content in transfusion products.

KEY WORDS: erythrocytes – haemolysis – spectrophotometry

proLékaře.cz | 6.11.2026

ÚVOD

Při skladování erytrocytových transfuzních přípravků dochází k poškození erytrocytů, které je doprovázeno metabolickými změnami, tzv. *red cell storage lesion*, které se odrážejí v poklesu pH, zvýšení kalia (K^+), laktátu dehydrogenázy (LDH), konsumpci glukózy, produkci laktátu a poklesu 2,3-difosfoglycerátu (2,3-DPG) a adenosintrifosfátu (ATP). Současně stoupá hladina volného hemoglobinu (vHb), markeru probíhající hemolýzy [1–3]. Doporučení Rady Evropy (*Guide to preparation, use and quality assurance of blood components, 21st Edition [4], dále EU Guide*), a česká legislativa (Vyhl. č. 143/2008 Sb. [5]) určují jeho maximální hodnotu jako 0,8 % erytrocytové hmoty na konci doby použitelnosti transfuzního přípravku. Ke zvýšené hemolýze erytrocytů může dojít již během zpracování a skladování přípravků, v důsledku nesprávného promíchání s antikoagulačním nebo aditivním roztokem, nesprávnou centrifugací nebo nedodržením správných skladovacích podmínek (např. teploty) [6]. Kromě nesprávného odběru, manipulace, zpracování nebo skladování může být zvýšená hemolýza v transfuzním přípravku (TP) způsobena také bakteriální kontaminací, vnitřními defekty v membránách erytrocytů dárce nebo jinými abnormalitami na straně dárce [6]. Některé erytrocytové transfuzní přípravky, jako jsou erytrocyty promyté, které jsou dodatečně upravovány, se proto mají kontrolovat již po jejich výrobě.

Volný hemoglobin způsobuje již při malé koncentraci v plazmě nebo resuspenzním roztoku zřetelně růžové zabarvení. Orientačně lze jeho přítomnost hodnotit vizuální kontrolou supernatantu TP, přesnější stanovení poskytuje měření absorbance vzorku při různých vlnových délkách. Při výpočtu % hemolýzy se vychází z objemu transfuzního přípravku, hodnoty hematokritu a z absorbance volného hemoglobinu změřené pomocí spektrofotometrického stanovení.

Běžně používaná metoda měření obsahu volného hemoglobinu [7] vychází z měření absorbance vzorku při 540 nm, která je podle Lambert-Beerova zákona přímo úměrná koncentraci volného hemoglobinu.

Metoda stanovení dle Harboea [8–10] vychází z hodnot absorbance při vlnových délkách 415 nm, 450 nm a 380 nm. Díky tomu lze odstranit interferující vliv bilirubin-albuminového komplexu a lipidů, které také vykazují absorpci při 415 nm (*peak* pro oxyhemoglobin).

Cílem práce bylo porovnat tyto dvě metody měření volného hemoglobinu v supernatantu erytrocytových transfuzních přípravků přímou spektrofotometrií a zjistit vhodnost metody stanovení vHb v transfuzních přípravcích dle Harboea.

MATERIÁL A METODIKA

Odběr krve a výroba transfuzních přípravků

Celkem bylo pro studii využito 20 jednotek erytrocytových TP vyrobených různým způsobem (EBR, ERD, EARD a EP). Odběr plné krve byl proveden standardním způsobem od dobrovolných bezpříspěvkových dárců. Odebírali jsme 460 ± 10 ml plné krve do vaků CompoFlowFlex CT32150 (Fresenius KABI, SRN) s antikoagulačním roztokem CPD v poměru 1 : 7 pro zpracování na EBR nebo do vaků CQ32250 Compoflow 4F C3 CPD / SAG-M pro zpracování na ERD. Plná krev byla následně zpracována na a) EBR centrifugací na centrifuze Cryofuge 6000i (Thermo Fisher Scientific, SRN) (14 min, 3 250 ot./min, teplota 22 °C, akcelerace 6, brzda 6) s oddělením plazmy na lisech Optipress II (Baxter Healthcare Corporation, USA) a resuspenzí 100 ml SAG-manitolu; nebo na b) ERD centrifugací na centrifuze Cryofuge 6000i (Thermo Fisher Scientific, SRN) (14 min, 3 250 ot./min, teplota 22 °C, akcelerace 6, brzda 6) s oddělením plazmy na lisech CompoMat G5 (Fresenius Kabi AG, SRN) a resuspenzí 100 ml SAG-manitolu. EARD byly připraveny aferézou při použití odběrových setů Trima Accel® Auto RBC, Plasma Set na separátoru Trima Accel (Terumo BCT Europe, Belgium). Erytrocyty promyté (EP) byly připraveny následným zpracováním ERD, promytím chlazeným NaCl v Ery wash setu uzavřeným způsobem (Fresenius HemoCare Austria GmbH) a centrifugací na centrifuze Cryofuge 6000i (Thermo Fisher Scientific, SRN) (10 min, 3 000 ot./min, teplota 6 °C, akcelerace 5, brzda 5).

Hodnocené parametry

U všech TP jsme v den odběru (den 0) hodnotili objem, obsah hemoglobinu, hematokrit. K posouzení měření % hemolýzy byly přípravky vyšetřeny po výrobě na začátku skladování (den 1) u erytrocytů promytých a na konci exspirace (den 42) u erytrocytů bez *buffy coat* resuspendovaných (EBR), u erytrocytů resuspendovaných deleukotizovaných (ERD) a u erytrocytů z aferézy (EARD). Hodnotili jsme hodnotu volného hemoglobinu (vHb) v % hemolýzy v supernatantu transfuzních přípravků.

Laboratorní analýza

Laboratorní analýza byla provedena v akreditované laboratoři na Oddělení klinické biochemie, KNL, a.s. Vyšetření obsahu vHb bylo provedeno spektrofotometricky (Shimadzu UV-2101 PC, Japonsko).

Odběr vzorků

Vzorky na biochemická stanovení byly získány v den vyšetření ze supernatantu po sterilním navaření na vak a následné centrifugaci (5 min, 3 400 ot. /min).

Výpočet hodnoty volného Hb

Výpočet % hemolýzy se stanovuje z objemu transfuzního přípravku, hodnoty hematokritu a z absorbance volného hemoglobinu změřené pomocí spektrofotometrického stanovení.

Běžně používaná metoda měření [7] je založena na měření absorbance vzorku při 540 nm, která je podle Lambert-Beerova zákona přímo úměrná koncentraci volného hemoglobinu. Z hodnot absorbance je vypočítána koncentrace volného hemoglobinu v mg/l dle vzorce $cHb = A540nm \times 10\,000 / 8{,}5$.

proLékaře.cz | 6.11.2026

Metoda měření dle Harboea [8–10] je založena na měření absorbance vzorku při vlnových délkách 415 nm (*peak* pro oxyhemoglobin), 450 nm a 380 nm. Vzorec pro výpočet koncentrace volného hemoglobinu v g/l: cHb = (2 × A415 – A380 – A450) / 11,96.

V obou případech se pak koncentrace volného hemoglobinu přepočítává na objem TP. Vypočtená hodnota volného hemoglobinu v mg se pak vztahuje k povolené ztrátě Hb hemolýzou, což je 0,8 % erytrocytové masy.

Statistické zpracování

Základní statistická analýza byla provedena v programu Excel 2010 (Microsoft Corporation, USA). Hodnotili jsme obsah vHb u jednotlivých typů přípravků změřených dvěma způsoby. Data byla hodnocena pomocí průměru, mediánu a směrodatné odchylky. K porovnání výběrů jsme použili dvouvýběrový t-test a párový test. Statistická významnost byla posouzena na hladině $p < 0,05$. Dále bylo provedeno porovnání výsledků měření obou metod dle doporučení České společnosti klinické biochemie ČLS JEP pomocí Bland-Altmanova diagramu.

VÝSLEDKY

Všechny hodnocené erytrocytové TP měly standardní parametry jakosti pro jednotlivé typy TP podle specifikací TO KNL, a.s. v souladu s Vyhl. č. 143/2008 Sb. a *EU Guide*. Výsledky uvádí tab. 1.

Předepsaný stupeň hemolýzy (< 0,8 % erytrocytové masy na konci skladování) byl vyhovující v obou sledovaných skupinách. Průměrná hodnota hemolýzy na konci skladování erytrocytových přípravků byla při měření vHb dle Fořtové 0,31 %, při měření dle Harboea 0,29 %.

Výsledky uvádějí tab. 2 a graf 1.

Mezi oběma soubory nebyl pro různé způsoby měření volného hemoglobinu v supernatantu TP zjištěn statisticky významný rozdíl. Obě metody měření byly shledány jako vyhovující.

Porovnání výsledků měření obou metod pomocí Bland-Altmanova diagramu uvádí graf 2. Vypočtený průměrný relativní *bias* (průměrná hodnota rozdílů) je výrazně menší, než je kritická diference metody. Obě metody jsou tedy pro klinické účely zaměnitelné. Mezi oběma metodami existuje statisticky zanedbatelný *bias*. Úroveň *bias* se s 95 % pravděpodobností pohybuje v rozmezí hodnot 0,01–0,03 se střední hodnotou 0,02, což znamená, že metoda měření při 540 nm bude dávat na celém intervalu hodnoty o 0,02 vyšší než měření podle Harboea.

Tab. 1. Výsledky parametrů jakosti transfuzních přípravků.

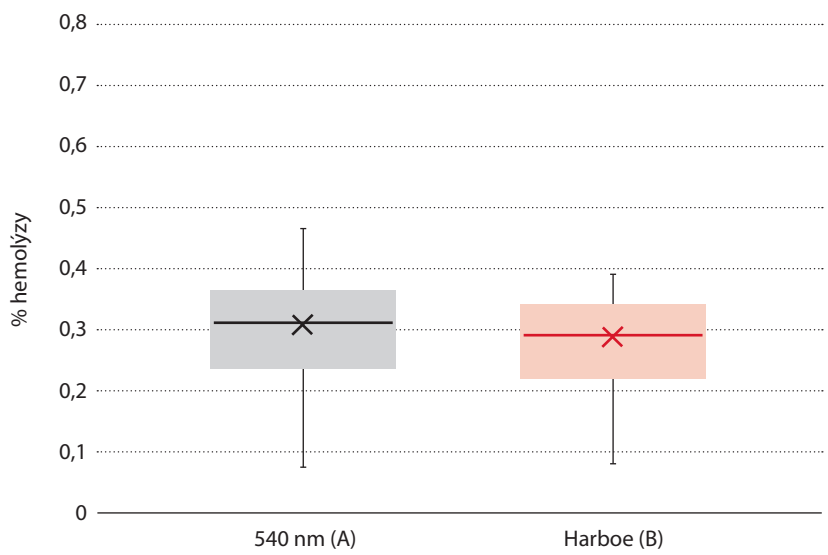
Transfuzní přípravek		objem	Hb	HCT
EBR	průměr ± SD	255 ± 18	50,3 ± 4,5	0,55 ± 0,03
ERD	průměr ± SD	224 ± 8	49,9 ± 5,2	0,58 ± 0,03
EARD	průměr ± SD	254 ± 2	44,6 ± 2,2	0,53 ± 0,02
EP	průměr ± SD	257 ± 24	47,2 ± 5,3	0,55 ± 0,03

EARD – erytrocyty z aferézy resuspendované deleukotizované; EBR – erytrocyty bez buffy-coat resuspendované; EP – erytrocyty promyté; ERD – erytrocyty resuspendované deleukotizované; Hb – hemoglobin; HCT – hematokrit; SD – směrodatná odchylka

Tab. 2. Výsledky markerů hemolýzy erytrocytů – volný hemoglobin (% hemolýzy)

Volný Hb (%)		540 nm (A)	Harboe (B)
n = 20	průměr ± SD	0,31 ± 0,13	0,29 ± 0,12
A vs. B		*p = 0,623	N

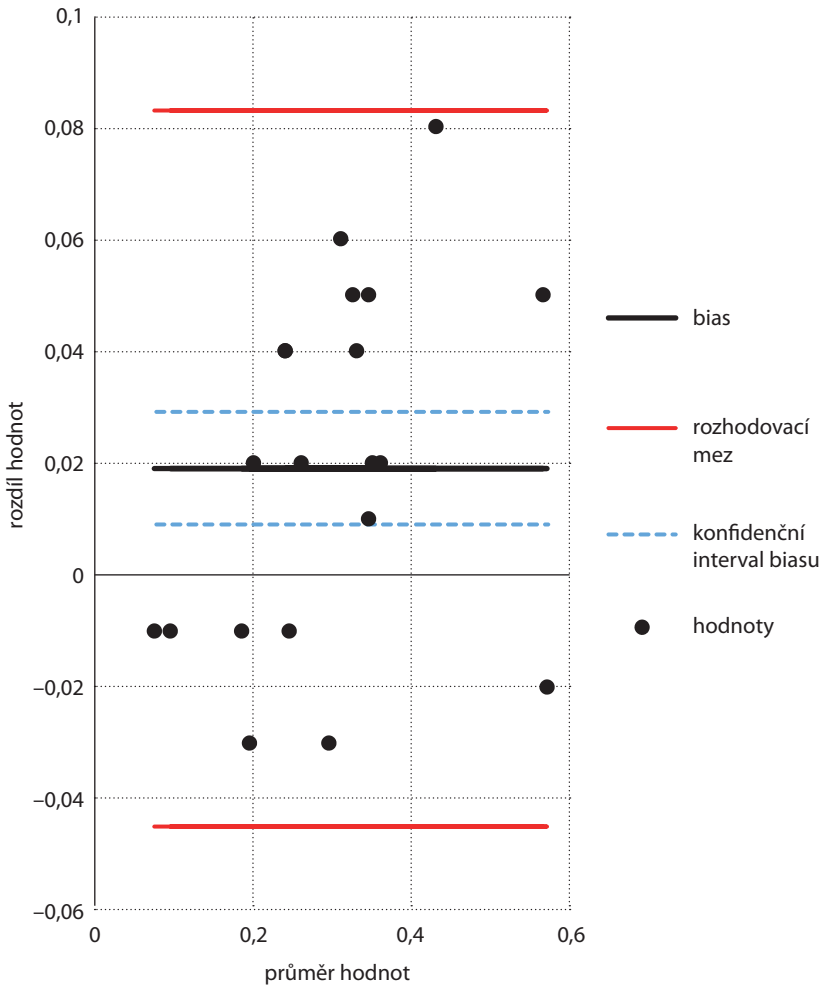
*t-test; Hb – hemoglobin; N – statisticky nesignifikantní; SD – směrodatná odchylka



Krabicový graf srovnání dvou metod měření volného Hb v erytrocytových přípravcích (n = 20).
Pole označují horní a dolní kvartily dat a sloupce označují střední hodnoty.
Křížky je vyznačen medián. Vousy označují minimální a maximální hodnoty.

Graf 1. Porovnání měření v Hb (% hemolýzy).

proLékaře.cz | 6.11.2026



Bland-Altmanův diagram znázorňující graf rozdílu mezi výsledky získanými dvěma metodami měření.
Červené čáry znázorňují meze shody. Černá čára ukazuje průměrnou hodnotu rozdílů (bias); ta je 0,02, což znamená, že měření při 540 nm bude dávat na celém intervalu hodnoty o 0,02 vyšší než měření podle Harboea. Úroveň bias se s 95 % pravděpodobností pohybuje v rozmezí hodnot 0,01–0,03 se střední hodnotou 0,02.
Jednotlivé datové body jsou rozmístěny přibližně rovnoměrně na obou stranách hodnoty bias a nepozorujeme typické trychtýřovité vzdalování se bodů od osy *bias*, které je typické pro srovnání metod s převažující složkou relativní chyby (metody se liší např. o 30 % na celém zkoumaném intervalu).

Graf 2. Bland-Altmanův diagram: porovnání výsledků měření dvou metod.

DISKUZE

Hladina volného Hb na konci doby skladování byla u všech erytrocytárních TP pod hranicí, kterou stanovují Vyhl. č. 143/2008 Sb. [5] a *EU Guide* [4]. Cílem práce bylo stanovit, zda je metoda měření vHb pomocí spektrofotometrického stanovení dle Harboea vhodná k rutinnímu použití při kontrolách jakosti erytrocytových TP v zařízení transfuzní služby.

Neexistuje žádná stanovená metoda měření % hemolýzy erytrocytárních TP. Velmi častou metodou stanovení je metoda měření dle Fořtové [7], která vychází z měření absorbance vzorku při 540 nm, která je podle Lambert-Beerova zákona přímo úměrná koncentraci volného hemoglobinu. Některá ZTS používají ke stanovení % hemolýzy optické měření metodou POCT na hemoglobinometru HemoCue, kdy je absorbance vzorku měřena při 570 nm a 880 nm. Výsledky při stanovení hemoglobinu v plazmě pomocí HemoCue mohou velmi dobře korelovat s výsledky získanými měřením klasickou spektrofotometrií [11]. HemoCue je velmi rychlý a jednoduchý na použití. Hemoglobinmetr může mít pro některá pracoviště i své nevýhody, jako je vyšší cena analýzy, obtížnější udržení přesnosti a správnosti analýzy a zajištění kontroly kvality.

Další možná metoda stanovení dle Harboea vychází z měření hodnot absorbance při vlnových délkách 415 nm, 450 nm a 380 nm. Díky tomu lze odstranit interferující vliv bilirubin-albuminový komplexu a lipidů, které také vykazují absorpci při 415 nm (peak pro oxyhemoglobin). V. Han et al. ve své studii stanovili metodu dle Harboea jako nejlineárnější a nejpřesnější pro měření koncentrace hemoglobinu v supernatantu TP s ohledem na měření v přítomnosti interferujících složek, jako jsou lipidy a bilirubin-albuminový komplex [8–10].

Další možná metoda měření je kyanomethemoglobinová (Drabkinova) metoda založená na měření koncentrace HiCN [12] a měření absorbance vzorku při 550 nm, kdy se koncentrace vHb vzorku počítá z lineární rovnice kalibrační křivky. Tato metoda je doporučena Mezinárodním výborem pro standardizaci v hematologii jako standardní metoda pro stanovení koncentrace Hb v plné krvi [13].

Jiná studie prokázala, že měření plazmatického hemoglobinu je mnohem přesnější za použití Harboeovy metody než při použití Drabkinovy metody [14]. Z tohoto důvodu jsme pro naši studii zvolili metodu měření dle Harboea. Dalším důvodem bylo také to, že pro metodu je dostupná EHK u společnosti INSTAND e.V., kontrolní cyklus Freies Hämoglobin.

ZÁVĚR

Metoda měření absorbance při vlnových délkách 415 nm, 450 nm a 380 nm dle Harboea odpovídá běžně používané

proLékaře.cz | 6.11.2026

metodě měření při 540 nm a je na základě námi získaných výsledků vhodná k měření obsahu volného hemoglobinu v supernatantu erytrocytových transfuzních přípravků.

POUŽITÉ ZKRATKY

CPD – antikoagulační roztok: citrát, fosfát, dextróza
EARD – erytrocyty z aferézy resuspendované deleukotizované
EBR – erytrocyty bez *buffy-coat* resuspendované
EHK – externí hodnocení kvality
EP – erytrocyty promyté
ERD – erytrocyty resuspendované deleukotizované
Hb – hemoglobin
HCT – hematokrit
KNL, a.s. – Krajská nemocnice Liberec, a.s.
LDH – laktát dehydrogenáza
NaCl – fyziologický roztok: chlorid sodný
POCT – Point of Care Testing
SAG-M – SAG-manitol: konzervační roztok
TP – transfuzní přípravek
V – objem
vHb – volný hemoglobin
ZTS – zařízení transfuzní služby

LITERATURA

1. Procházková R. Markery poškození krevních buněk. Transfuze Hematol Dnes. 2013;19:240–243.
2. Hess JR. Measures of stored red blood cell quality. Vox Sang. 2014;107(1):1–9. doi: 10.1111/vox.12130.
3. Putter JS, Seghatchian J. Cumulative erythrocyte damage in blood storage and relevance to massive transfusions: selective insights into serial morphological and biochemical findings. Blood Transfus. 2017;15(4):348–356. doi: 10.2450/2017.0312-16.
4. Guide to preparation, use and quality assurance of blood components, 21st Edition.
5. Vyhláška č. 143/2008 Sb., ve znění pozdějších předpisů.
6. Sowemimo-Coker SO. Red blood cell hemolysis during processing. Transfus Med Rev. 2002;16(1):46–60.doi:10.1053/tmrv.2002.29404.
7. Fořtová H, Kodíček M, Spalová H. Praktické možnosti stanovení nízkých koncentrací v plazmě. Klin Biochem Metab. 1993;1(22):79–83.
8. Han V, Serrano K, Devine DV. A comparative study of common techniques used to measure haemolysis in stored red cell concentrates. Vox Sang. 2010;98(2):116–123. doi: 10.1111/j.1423-0410.2009.01249.x.
9. Harboe M: A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry. Scand J Clin Lab Invest. 1959:11:66–70. doi: 10.3109/00365515909060410.
10. Cookson P, Sutherland J, Cardigan R. A simple spectrophotometric method for the quantification of residual haemoglobin in platelet concentrates. Vox Sang. 2004;87(4):264–271. doi: 10.1111/j.1423-0410.2004.00566.x.
11. Cardiagan R, Smith K. Evaluation of the HemoCue plasma haemoglobin analyser for assessing haemolysis in red cell concentrates during storage. Vox Sang. 2002;82(2):76–79. doi: 10.1046/j.0042-9007.2001.00149.x.
12. Balasubramaniam P, Malathi A. Comparative study of hemoglobin estimated by Drabkin's and Sahli's methods. J Postgrad Med. 1992;38(1):8–9.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Reference and selected procedures for the quantitative determination of hemoglobin in blood, approved standard – Third Edition. Document H15-A3. 2000;20:28.
14. Malinauskas RA. Plasma hemoglobin measurement techniques for the *in vitro* evaluation of blood damage caused by medical devices. Artif Organs. 1997;21(12):1255–1267. doi: 10.1111/j.1525-1594.1997.tb00486.x.

PODÍL AUTORŮ NA PŘÍPRAVĚ RUKOPISU

LŘ – design a provedení studie, zpracování výsledků a rukopisu
PM – provedení studie, revize rukopisu
RP – design studie, revize rukopisu.

PODĚKOVÁNÍ

Autoři děkují RNDr. P. Škrabálkovi z Oddělení klinické biochemie, KNL, a.s. za spolupráci při vyšetřování biochemických markerů a laborantkám Transfuzního oddělení, KNL, a.s. za odběry a zpracování vzorků z transfuzních přípravků.

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Autoři práce prohlašují, že v souvislosti s tématem, vznikem a publikací tohoto článku nejsou ve střetu zájmů a vznik ani publikace článku nebyly podpořeny žádnou farmaceutickou firmou.

Do redakce doručeno dne: 16. 8. 2024.
Přijato po recenzi dne: 14. 11. 2024.

RNDr. Lenka Řehořová
Transfuzní oddělení,
Krajská nemocnice Liberec, a.s.
Baarova 15
460 63 Liberec 1
e-mail: lenka.rehorova@nemlib.cz