

Sposób otrzymywania próbek surowicy krwi do oznaczania stężenia kotyniny oraz nowe zastosowanie tetrafluoroboranu 1-metylo-3-oktyloimidazoliowego

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania próbek surowicy krwi ludzkiej wykorzystywanych w badaniach zawartości kotyniny zwłaszcza za pomocą testu ELISA. Przedmiotem jest również zastosowanie tetrafluoroboranu 1-metylo-3-oktyloimidazoliowego do usuwania hemu i/lub hemoglobiny z próbek surowicy krwi wykorzystywanych w badaniach zawartości kotyniny.

Palenie tytoniu jest nadal jedną z głównych przyczyn śmiertelności i zachorowalności na choroby układu krążenia, choroby płuc i raka [Akter S, Nakagawa T, Honda T, et al. *Circ J* 2018, 82, 3005; Samet JM. *Thorac Surg Clin* 2013, 23, 103]. Ponadto palenie tytoniu może znacząco zwiększyć ryzyko powikłań pooperacyjnych, w tym infekcji, upośledzonego gojenia się ran, czasu rekonwalescencji, czy komplikacji krążeniowo-oddechowych [Yoshikawa R, Katada J. *BMJ Open* 2019, 9, e029913].

Dokładna ocena statusu palenia ma kluczowe znaczenie dla udokumentowania stanu pacjenta oraz oszacowanie ryzyka chorób związanych z paleniem tytoniu [Warren CW, Jones NR, Eriksen MP, Asma S. *Lancet* 2006, 367, 749]. Do oceny narażenia na dym tytoniowy zwykle stosuje się standaryzowany kwestionariusz (ankieta), który jednak nie zawsze jest wiarygodny z uwagi na stronniczość respondentów. Z tego powodu do oceny statusu palenia stosuje się zwykle markery biologiczne. Biomarkery narażenia na tytoń obejmują stężenia składników związanych z dymem, ich metabolitów lub produktów interakcji między chemikaliami w dymie, a cząsteczkami docelowymi w materiałach biologicznych [National Research Council. *Biologic Markers of Pulmonary Toxicology*, National Academy Press: Washington, DC, USA, 1989].

Nikotyna jest biomarkerem specyficznym dla tytoniu, podobnie jak jej metabolity. Nikotyna jest metabolizowana do kotyniny w wątrobie, a jej okres półtrwania w organizmie wynosi około 2–3 h, a kotyniny 12–20 h [Jaakkola MS, Jaakkola JJ. *Eur Respir J* 1997, 10, 2384]. Niewielka ilość

kotyniny (10-15%) jest wydalana z moczem, a pozostała część jest dalej metabolizowana do trans-3'-hydroksykotyniny i innych produktów ubocznych [Benowitz NL, Jacob P III, Fong I, Gupta SJ. *Pharmacol Exp Ther* 1994, 268, 296]. Na poziomie tych biomarkerów, podobnie jak innych ksenobiotyków, wpływają procesy wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i eliminacji chemikaliów (absorption, distribution, metabolism, and excretion, ADME) z organizmu po wystąpieniu ekspozycji. Ze względu na dłuższy okres półtrwania, kotynina w ślinie, moczu lub surowicy, jest powszechnie stosowanym biomarkerem narażenia na dym tytoniowy [Etter JF, Vu DT, Perneger TV. *Am J Epidemiol* 2000, 151, 251; Hegaard HK, Kjaergaard H, Moller LF, Wachmann H, Ottesen B. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2007, 86, 401]. Zgodnie z zaleceniem Towarzystwa Badań nad Nikotyną i Tytoniem (The Society for Research on Nicotine and Tobacco, SRNT) kotynina, obok tlenku węgla (CO) i rodanku (SCN) jest rekomendowana w badaniach klinicznych, jako podstawowy biomarker używania tytoniu [SRNT Subcommittee on Biochemical Verification. *Biochemical verification of tobacco use and cessation. Nicotine Tob Res* 2002, 4, 149].

Poziom kotyniny w surowicy, ślinie lub moczu jest podstawą różnicowania palaczy od osób niepalących. Problemem pozostaje określenie wartości granicznej, aby dokonać właściwej selekcji. W 2016 roku Kim [Kim S. *Int J Environ Res Public Health*. 2016, 13, 1236] zebrał dane epidemiologiczne z okresu 1985-2014, odnośnie poziomu tego biomarkera. Opracowane zestawienie pozwoliło na wyróżnienie szerokiego przedziału stężeń, w którym mieści się wartość odcięcia dla stężenia kotyniny w surowicy w zakresie od 10 do 20 ng/ml.

Do mierzenia poziomu metabolitów nikotyny w płynach ustrojowych można zastosować takie techniki, jak testy immunologiczne, np. radioimmunotest (RIA), enzymatyczny test immunosorpcyjny (ELISA), immunoznaczenie fluorescencyjne (FIA), techniki spektrofotometryczne i chromatograficzne [Park S, Lee DH, Park JG, Lee YT, Chung J. *Clin Chim Acta* 2010, 411, 1238; Baj J, Flieger W, Przygodzka D, Buszewicz G, Teresiński G, Pizoń M, Maciejewski R, Flieger J. *Molecules* 2022, 27, 682; Kim I, Darwin WD, Huestis, MA. *J Chromatogr B* 2005, 814, 233; Acosta M, Buchhalter A, Breland A. et al., *Nicotine Tob Res* 2004, 6, 615; Torano JS, van Kan HJ. *Analyst* 2003, 128, 838; Heinrich-Ramm R, Wegner R, Garde AH, Baur X. *Int J Hyg Environ Health* 2002, 205, 493; Kataoka H, Inoue R, Yaki K, Saito

K. J Pharm Biomed Anal 2009, 49, 108; Gray TR, Shakleya DM, Huestis MA. J Chromatogr. B 2008, 863, 107; Chadwick CA, Keevil B. Ann Clin Biochem 2007, 44, 455; Murphy SE, Villalta P, Ho SW, Weymann LB. J Chromatogr B 2007, 857, 1; Beyer J, Peters, FT, Kraemer T, Maurer HH. J Mass Spectrom 2007, 42, 621; Rabkaa-Khabbaz L, Abi Daoud R, Karam-Sarkis D..J Chromatogr Sci 2006, 44, 535]. Najpopularniejszymi metodami ilościowego oznaczania nikotyny i jej metabolitów są chromatografia gazowa (GC) i cieczowa (LC) w połączeniu z detektorami płomieniowo-jonizacyjnymi (FID), ultrafioletowym (UV) i spektrometrią masową (MS). Należy podkreślić, że metody chromatograficzne wymagają pracochłonnej procedury przygotowania próbek do analizy, niekiedy derywatywacji [Yasuda M, Ota T, Morikawa A, Mawatari K, Fukuuchi T, Yamaoka N, Kaneko K, Nakagomi K. J Chromatogr B 2013, 934, 41] lub czułego detektora (MS, FL), aby uzyskać LOD na poziomie kilku ng/ml [Avagyan R, Spasova M, Lindholm J. Separations 2021, 8, 77; Scheidweiler KB, Shakleya DM, Huestis MA. Clin. Chim Acta 2012, 413, 978; Chazeron I, Daval S, Ughetto S, Richard D, Nicolay A, Lemery D, Llorca PM, Coudoré F. Pulm Pharmacol Ther 2008, 21, 485]. Dzięki tym technikom można oznaczać kotyninę na poziomie 2 ng/ml [Baumann F, Regenthal R, Burgos-Guerrero IL, Hegerl U, Preiss R. J Chromatogr B 2010, 878, 107], 0,1 ng/ml [Jacob P III, Yu L, Duan M, Ramos L, Yturralde O, Benowitz NL. J Chromatogr B 2011, 879, 267], a nawet na poziomie 0,050 ng/ml metodą UHPLC-QQQ-MS/MS [Xia B, Blount BC, Wang L. ACS Omega 2021, 6, 13962].

W przeciwieństwie do powyższych zaawansowanych technik analitycznych, immunoenzymatyczny test fazy stałej ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) to test o wysokiej swoistości, który uchodzi w przeciwieństwie do wymienionych, za metodę szybką, dokładną i tanią [Hnasko RM. Methods Mol Biol. 2015, 1318, 51]. „Cotinine ELISA Kit” posiada czułość na poziomie 1 ng/ml w mierzonym zakresie 0-100 ng/ml i pozwala na oznaczanie kotyniny w surowicy, moczu i ślinie:

[http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?catalog_id=KA0930].

Na testy immunologiczne, w większości przypadków, hemoliza nie ma wpływu. Jednak jest zdecydowanie niewskazana w przypadku testów immunologicznych przeznaczonych dla nietrwałych analitów, takich jak insulina, glukagon, kalcytonina, parathormon, ACTH i gastryna, ze względu na uwalnianie enzymów proteolitycznych, które je degradują. Hemoliza może

również zakłócać niektóre etapy generowania sygnału w testach immunologicznych. Wolna hemoglobina może bowiem wiązać się niespecyficznie na fazie stałej, dając fałszywie pozytywny wynik. Dlatego do dobrej praktyki analitycznej należy unikanie próbek surowicy ze śladami hemolizy, ponieważ nigdy nie ma pewności co do jej wpływu na wynik testu [Reimers TJ, McCann JP, Cowan RG, Concannon PW. *Proc Soc Exp Biol Med* 1982, 170, 509; Parra MD, Bernal LJ, Cerón JJ. *Can J Vet Res* 2004, 68, 98; Koseoglu M, Hur A, Atay A, Cuhadar S. *Biochem Med (Zagreb)*. 2011, 21, 79]. W 2021 r. Wang i in. [Wang T, Li Z, Jia Y, Zhu B, Cao Z. *Int J Legal Med* 2021, 135, 1661] potwierdzili wpływ hemolizy na analizę całkowitego IgE za pomocą komercyjnego testu immunologicznego ECLIA.

Hemoliza jest to pęknięcie błony czerwonych krwinek (RBC), powodujące uwolnienie hemoglobiny i innych składników wewnętrznych do otaczającego płynu. Hemoliza jest częstym zjawiskiem, które nadaje surowicy lub osoczu odcień od różowego do czerwonego. Proces hemolizy może mieć miejsce *in vivo*, jako wynik autoimmunologicznej niedokrwistości hemolitycznej, jako reakcja poprzetoczeniowa [Lippi G, Plebani M, Di Somma S, Cervellin G. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011, 48, 143] oraz *in vitro* jako skutek nieprawidłowego pobrania, obróbki lub transportu próbek [Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Brocco G, Guidi GC. *Clin Chem Lab Med*. 2006, 44, 311]. Eliminacja hemoglobiny z lizatów (krwi lub erytrocytów) jest niezbędna do wykonania proteomiki metodą spektrometrii mas lub elektroforezy [D'Amici GM, Rinalducci S, Zolla L. *Nat Protoc* 2011, 7, 36], gdyż zaburza ilościowe oznaczanie innych białek. W ostatnich latach wykazano, że wolny hem, protetyczna grupa hemoglobiny, może także gromadzić się w erytrocytach i jest uwalniany podczas lizy czerwonych krwinek [Aich A, Freundlich M, Vekilov PG. *Blood Cells Mol Dis* 2015, 55, 402]. Średnie stężenie wolnego hemu w erytrocytach oszacowana na $21 \pm 2 \mu\text{M}$. Należy zaznaczyć, że uwalnianie hemu zależy od stężenia hemoglobiny [Edelstein SJ, Rehmar MJ, Olson JS, Gibson QH. *J Biol Chem* 1970, 245, 4372]. Przy niskich stężeniach hemoglobiny, jej formy tetrameryczne rozpadają się na dimery i hem uwalnia się szybciej [Hargrove MS, Whitaker T, Olson JS, Vali RJ, Mathews AJ. *J Biol Chem* 1997, 272, 17385]. Zatem hem, obecny w hemolizacie, nie tylko pochodzi z cytozolu krwinek czerwonych, ale może być uwalniany przy rozcieńczeniu hemoglobiny. Niezwiązany z białkiem hem, wykazuje działanie cytotoksyczne, które wynika z aktywności redoks żelaza i

hydrofobowość protoporfiryny [Sachar M, Anderson KE, Ma XJ. *Pharmacol Exp Ther* 2016, 356, 267; Donegan RK, Moore CM, Hanna DA, Reddi AR. *Free Radical Biol Med* 2019, 133, 88].

Zgodnie z wytycznymi analitycznych i klinicznych granic decyzyjnych odnośnie hemolizy, zakres raportowanej wartości hemoglobiny powinien być niższy niż 1 mg/ml. Tylko w tym przypadku nie ma konieczności komentowania i dodatkowego potwierdzania uzyskanych wyników [Lippi G, Cadamuro J, von Meyer A, Simundic AM. *Clin Chem Lab Med* 2018, 56, 718]. Nie zmienia to jednak faktu, że istnieje potrzeba opracowania skutecznych i selektywnych metod ekstrakcji śladowych ilości hemu/hemoglobiny z próbek surowicy i badania wiarygodności różnych testów analitycznych. W 2008 roku Cheng i wsp. [Cheng DH, Chen XW, Shu Y, Wang JH. *Talanta* 2008, 75, 1270] po raz pierwszy wyekstrahowali hemoglobinę heksafluorofosforanem 1-butylo-3-trimetylosiloloimidazoliowym (BtmsimPF₆), bez dodatkowych ekstrahentów. Autorom udało się usunąć 100 ng/μl hemoglobiny z wydajnością 93%. Firma BioTech Support Group, (Deer Park Drive, Suite M, Monmouth Junction, New Jersey, USA) oferuje w tym celu HemogloBind, będący biopolimerem zarówno w postaci żelu, jak i zawiesiny, który jest specjalnie przeznaczony do usuwania hemoglobiny z próbek surowicy, osocza i hemolizowanej krwi. Pomimo istnienia nielicznych technik usuwania hemoglobiny z surowicy, wciąż istnieje zapotrzebowanie na proste, tanie, łatwo dostępne, ekologiczne metody ograniczające zużycie organicznych rozpuszczalników oraz zapewniające satysfakcjonującą wydajność.

Wynalazek rozwiązuje problem otrzymywania dobrej jakości próbek wykorzystywanych do oznaczania stężenia kotyniny poprzez usuwanie śladowych ilości hemu i/lub hemoglobiny z próbki surowicy krwi za pomocą odpowiedniej cieczy hydrofobowej i jej ilości, nie zmieniając składu pozostałych białek. Sposób pozwala uzyskać próbki odpowiednie do badań biochemicznych, a w szczególności do oznaczania zawartości kotyniny przy wykorzystaniu testu ELISA o wysokiej swoistości. Oznaczanie zawartości kotyniny w próbkach surowicy ma szczególne znaczenie dla odróżniania palaczy od nie palaczy.

Wynalazek dotyczy także zastosowania tetrafluoroboranu 1-metylo-3-oktyloimidazoliowego (OMIM BF₄) do selektywnego usuwania hemu i/lub hemoglobiny z próbek surowicy krwi ludzkiej.

Tetrafluoroboran 1-metylo-3-oktyloimidazoliowy (OMIM BF₄) jest znaną substancją wykorzystywaną do różnych zastosowań. Znane jest jej zastosowanie np. jako rozpuszczalnika do ekstrakcji tiofenu i jego pochodnych z benzyny (Kazmi S, Awan Z, Hashmi S. IJCCE, 2019, 38, 209), jako ekologiczne medium do syntezy organicznej (Sharifi A, Barazandeh M, Saeed Abaee M, Mirzaei M. J. Heterocyclic Chem. 2012,49, 933; Sharifi A, Barazandeh M, Saeed Abaee M, Mirzaei M. Tetrahedron Letters 2010, 51, 1952), jako ekstrahent do ekstrakcji związków fenolowych (Wan H, Huang D-Y, Cai Y, Guan G-F. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities 2008, 22, 162).

Sposób otrzymywania próbek surowicy krwi do oznaczania stężenia kotyniny charakteryzuje się tym, że do próbki surowicy krwi dodaje się tetrafluoroboran 1-metylo-3-oktyloimidazoliowy (OMIM BF₄) w ilości od 0.1 g do 1.0 g korzystnie od 0.7 do 1.0 g na co najwyżej 3 ml surowicy krwi i składniki miesza się. Proces mieszania można prowadzić w rotatorze w czasie co najmniej 5 minut maksymalnie 15 min korzystnie 10 min, aż do całkowitego skontaktowania obu faz, następnie otrzymaną mieszaninę odwirowuje się i po oddzieleniu mieszaniny hydrofobowej, otrzymuje się surowicę oczyszczoną z hemoglobiny i/lub hemu. Powyższy skład mieszaniny oraz sposób otrzymywania próbki do oznaczania zawartości kotyniny pozwala na usunięcie nawet 94.89% hemu i/lub hemoglobiny.

Przedmiotem wynalazku jest także zastosowanie tetrafluoroboranu 1-metylo-3-oktyloimidazoliowego (OMIM BF₄) do selektywnego usuwania hemu i/lub hemoglobiny z próbek surowicy krwi ludzkiej.

Jak się okazało tetrafluoroboran 1-metylo-3-oktyloimidazoliowy (OMIM BF₄) ekstrahuje hemoglobinę i/lub hem w sposób efektywny, dzięki czemu, po oddzieleniu faz mieszaniny, otrzymana próbka surowicy krwi jest oczyszczona i pozbawiona śladowych ilości hemoglobiny i/lub hemu, które wpływają na wiarygodność badań biochemicznych.

Surowica po usunięciu hemu/hemoglobiny tą metodą nie zmienia składu pozostałych białek i nadaje się do badań biochemicznych, a szczególnie oznaczania zawartości kotyniny za pomocą testu ELISA. Próbki po usunięciu śladowych ilości hemu/hemoglobiny w jednym etapie za pomocą hydrofobowej cieczy jonowej OMIM BF₄, umożliwiają poprawę dokładności testu na zawartość kotyniny do ponad 30% oraz precyzji oznaczeń (CV%, SD).

Otrzymanie próbek surowicy poprzez usunięcie śladowych ilości hemu i/lub hemoglobiny ma szczególne znaczenie w badaniach biochemicznych przy oznaczaniu zawartości kotyniny, gdyż pozwala dokonać dokładnego pomiaru stężenia kotyniny w próbce i na tej podstawie odróżnić palaczy od osób niepalących.

Selektywne usuwanie hemoglobiny z lizatów krwi może mieć zastosowanie w wielu dziedzinach. Obecność hemoglobiny powoduje bowiem interferencje spektroskopowe, co zaburza pomiary absorpcyjne w analizach biochemicznych, a nawet pomiary immunologiczne, skutkując nieprawidłowymi wynikami. Wysoce specyficzne usuwanie hemoglobiny można osiągnąć metodami immunologicznymi (Chou PP, Kerkay J, Gupta MK, Anal. Lett., 14:1071, 1981), albo stosując selektywne wytrącanie za pomocą organicznych rozpuszczalników np. 8% (v/v) 1-butanol w etanolu, lub chlorku cynku w 10-15-krotnym nadmiarze molowym w stosunku do hemoglobiny (Frantzen F, Grimsrud K, Heggli D.-E, Sundrehagen E. Hemoglobin 1997, 21, 155). Metody wytrąceniowe zmieniają jednak skład surowicy. Firma BioTech oferuje w tym celu HemogloBind, który jest specjalnie przeznaczony do usuwania hemoglobiny z próbek surowicy (koszt 5 ml zawiesiny 350 USD). W 2008 roku Cheng i wsp. [Cheng DH, Chen XW, Shu Y, Wang JH. Talanta 2008, 75, 1270] syntetyzowali nową ciecz jonową heksafluorofosforan 1-butylo-3-trimetylosililoimidazoliowy (BtmsimPF₆) do ekstrakcji hemoglobiny.

Przykład 1: Warunki ekstrakcji hemu i/lub hemoglobiny z surowicy krwi

Do próbek z odważoną cieczą jonową Tetrafluoroboran 1-metylo-3-oktyloimidazoliowy (dostępny w handlu, także oznaczany skrótem OMIM BF₄) w ilościach kolejno: 0.1; 0.3; 0.5; 0.6; 0.7; 0.8; 0.9; 1.0 g dodano po 3 ml surowicy z hemoglobina rozcieńczoną tak, by absorbancja przy 410 nm wynosiła około 1 (0.15 mg/ml). Próbki umieszczono w rotatorze na 15 min. przy maksymalnych obrotach (30 RPM), a następnie wirowano przez 5 min tak, aby doszło

do dokładnego zmieszania obu faz (tj. dwóch składników). Zdjęcia próbek po ekstrakcji przedstawiono na ilustracji – Fig.1, gdzie pokazano dwufazowy układ powstały po zmieszaniu OMIM BF₄ oraz surowicy (Sigma-Aldrich, H4522) wzbogaconej o 0.15 mg/ml hemoglobiny (Sigma-Aldrich, H 7379). Po odwirowaniu wykonano pomiary spektrofotometryczne dla wodnej fazy górnej stosując spektrofotometr GENESYS 20 (Thermo Spectronic, USA). Widma rejestrowano w zakresie od 350 nm do 500 nm.

Surowica po usunięciu hemu/hemoglobiny tą metodą nie zmienia składu pozostałych białek i nadaje się do badań biochemicznych, a szczególnie oznaczania zawartości kotyniny za pomocą testu ELISA.

Najlepsze efekty izolacji hemu i/lub hemoglobiny zapewnia dodatek cieczy jonowej w zakresie od 0.7 do 1.0 g na nie więcej niż 3 ml surowicy zawierającej 0.15 mg/ml hemoglobiny. Powyższy skład mieszaniny zapewnił usunięcie co najmniej 94.89% hemoglobiny. Dodając od 0.1 g do 0.6 g cieczy jonowej usunięto z próbki surowicy od 54.1% do 88.66 % hemoglobiny.

Zależność absorbancji próbki surowicy zawierającej hemoglobinę na poziomie 0.15 mg/ml od masy cieczy jonowej OMIM BF₄ użytej do ekstrakcji (pomiary wykonano przy 410 nm) i (powyżej) widmo surowicy przed ekstrakcją (0 g OMIM BF₄) oraz po ekstrakcji za pomocą 0.1 g i 0.7 g OMIM BF₄ (na rysunku w kolejności od góry do dołu) przedstawiono na Fig. 2.

Czas wytrząsania mieszaniny ekstrakcyjnej został zoptymalizowany. Próbki zawierające 0.7 g cieczy jonowej, 3 ml wodnego roztworu hemoglobiny o stężeniu 0.125 mg/ml analizowano w czasie od 0 do 20 minut. Próbki wytrząsano przez odpowiedni czas (rotator) i wirowano. Po wirowaniu analizowano wodną fazę górną. Wyniki eksperymentu zamieszczono na Fig. 3. Wynika z nich, że najlepszy czas potrzebny do ekstrakcji hemu/hemoglobiny w warunkach analizy nie może być krótszy niż 5 min. Zależność czasu wytrząsania mieszaniny ekstrakcyjnej od stężenia hemoglobiny w fazie wodnej przedstawiono na Fig.3.

Na Fig. 4 przedstawiono wyniki badań wpływu stężenia hemoglobiny w surowicy na efektywność ekstrakcji w badanym układzie 3 ml surowicy + 0.7 g IL. Przebieg zależności

pozwała na ustalenie, że zawartość hemoglobiny 0.125 mg/ml jest usuwana z 94.89 % wydajnością. Wzrost stężenia hemoglobiny pogarsza efektywność ekstrakcji.

Przykład 2. Elektroforeza surowicy oraz surowicy wzbogaconej hemoglobina.

Elektroforezę białek wykonano w celu wykazania selektywności ekstrakcji. Z surowicy konieczne było usunięcie albumin z uwagi na wysokie stężenie utrudniające detekcję innych białek. Surowica przed (D) i po ekstrakcji za pomocą OMIM BF₄ (E) nie różni się intensywnością prążków. Z kolei na wzorcu hemoglobiny, którą zatężono 20-krotnie (F), widać znaczne zmniejszenie intensywności prążków po ekstrakcji (G).

Na rysunku Fig.5 przedstawiono elektroforezę jednokierunkową w warunkach denaturujących wykonaną dla prób: A-surowica wzbogacona hemoglobina w stężeniu 0.15 mg/ml przed ekstrakcją, B-surowica wzbogacona hemoglobina w stężeniu 0.15 mg/ml po ekstrakcji, C-standard mas cząsteczkowych, D-surowica po usunięciu albumin wzbogacona hemoglobina w stężeniu 0.15 mg/ml przed ekstrakcją, E-surowica po usunięciu albumin wzbogacona hemoglobina w stężeniu 0.15 mg/ml po ekstrakcji, F-wzorzec hemoglobiny o stężeniu 0.15 mg/ml zatężony 20-krotnie przed ekstrakcją, G- wzorzec hemoglobiny o stężeniu 0.15 mg/ml zatężony 20-krotnie po ekstrakcji. Albuminy usunięto przy użyciu zestawu odczynników Pierce™ Albumin Depletion Kit (85160, ThermoFisher). Próby zatężono 20-krotnie przy użyciu Ultra 0.5 Centrifugal Filter - Amicon Centrifugal Filter Unit z punktem odcięcia 3 kDa (Merck Millipore, UFC5003, 3 kDa MWCO). Elektroforezę wykonano na żelu poliakrylamidowym w układzie Laemmli'ego (Laemmli UK. Nature 1970, 227, 680), procentowość żelu 12%, napięcie 100V (Mini-PROTEAN® Tetra Cell, PowerPac™ HC, Bio-Rad). Po elektroforezie białek wybarwiono solami srebra zgodnie z procedurą Shevchenko (Shevchenko A, i in. Anal Chem 1996, 68, 850).

Przykład 3. Zastosowanie testu ELISA („Cotinine ELISA Kit”)

Do testu ELISA wykorzystano próbki surowicy (3 ml) zawierające hemoglobinę na poziomie < 0.5 mg/ml (0.05 mg/ml; 0.1 mg/ml; 0.2 mg/ml), który odpowiada 1 stopniowi hemolizy (hemolysis index level) niewidocznej gołym okiem. Surowicę wzbogacono o kotyninę (Sigma-Aldrich, C5923) i analizowano testem ELISA przed i po ekstrakcji za pomocą OMIM BF₄ (0.7 g). Krzywa będąca podstawą oznaczenia ilościowego została zamieszczona na Rys.6. Zgodnie z protokołem testu, krzywa została przygotowana dla następujących stężeń kotyniny: 0; 5; 10; 25; 50; 100 ng/ml. Do dalszych pomiarów wybrano stężenie 20 ng/ml, leżące w środkowej części krzywej. Jest to wartość krytyczna stosowana do odróżnienia palaczy od osób niepalących. Ponadto z przebiegu krzywej można wnioskować, że oznaczenie wartości skrajnych będzie obarczone zbyt dużym błędem.

Na Fig. 6 przedstawiono krzywą kalibracyjną ilustrującą zależność stężenia kotyniny [ng/ml] od absorbancji wykonaną testem „Cotinine ELISA Kit”.

Wyniki pomiarów wraz z parametrami statystycznymi (CV%, SD, średnia) zostały zaprezentowane w Tabeli 1. Błąd względny pomiarów stężenia kotyniny poprawił się po usunięciu hemoglobiny występującej na poziomie 0.05 mg/ml z 16.23% na 10.66%, czyli o 5.57%; zaś dla wyższej zawartości hemoglobiny (0.1 mg/ml) nie uległ zmianie lub (0.2 mg/ml) spadł z 32.18% do -0.09%, czyli o 32.27%. Precyzja poszczególnych pomiarów (CV%, SD) uległa poprawie po usunięciu hemoglobiny.

Tabela 1. Wyniki pomiarów zawartości kotyniny w próbkach surowicy, zawierającej hemoglobinę na trzech poziomach stężeń (0.05 mg/ml; 0.1 mg/ml; 0.2 mg/ml) oraz wybranego stężenia kotyniny (20 ng/ml) wykonanych testem „Cotinine ELISA Kit”.

Tryb pomiaru	Parametr	Stężenie hemoglobiny w próbkach surowicy			
		0 mg/ml	0.05 mg/ml	0.1 mg/ml	0.2 mg/ml
Pomiary testem Cotinine ELISA Kit bez usuwania hemoglobiny	absorbancja	0.562	0.560	0.465	0.345
		0.652	0.519	0.521	0.442
		0.517	0.445	0.580	0.396
	Stężenie [ng/ml]	21.904	21.955	24.314	28.042
		19.95	22.917	22.891	24.953
		22.971	24.867	21.496	26.314
	Stężenie średnie	21.608	23.246	22.900	26.436
SD	1.532	1.484	1.409	1.548	
CV%	7.090	6.382	6.153	5.856	
Błąd względny %	8.04	16.23	14.5	32.18	
Pomiary testem Cotinine ELISA Kit po ekstrakcji hemoglobiny	absorbancja	-	0.625	0.830	0.625
			0.546	0.803	0.642
			0.493	0.759	0.684
	Stężenie [ng/ml]	-	20.523	16.464	20.515
			22.288	16.964	20.145
			23.588	17.793	19.287
	Stężenie średnie	-	22.133	17.074	19.982
SD	-	1.538	0.671	0.630	
CV%	-	6.951	3.932	3.153	
Błąd względny %	-	10.66	14.6	-0.09	