

Zastosowanie:

Obecnie stosowaną metodą oznaczania hemoglobiny jest metoda cyjanomethemoglobinowa. Metoda ta jest stosowana w automatycznych analizatorach hematologicznych oraz w oznaczeniach manualnych.

Do jej zalet należą: przeprowadzenie do cyjanomethemoglobiny (HiCN) prawie wszystkich rodzajów hemoglobiny występujących we krwi (wyjątkiem jest sulfohemoglobina występująca w znikomych ilościach), szczyt widma HiCN przy 540 nm jest dosyć szeroki i płaski co umożliwia dokonanie dokładnych pomiarów na spektrofotometrach i kolorymetrach niższej jakości (o większej szerokości spektralnej), HiCN jest bardzo trwałą odmianą hemoglobiny dzięki czemu pomiary można dokonać w dowolnym czasie od przygotowania próbki.

Metoda polega na rozcieńczeniu krwi odczynnikiem Drabkina w skład którego wchodzi żelazicyjanek potasowy i cyjanek potasowy. Odczynnik jest hipotoniczny, następuje hemoliza krwinek a uwolniona hemoglobina i jej pochodne zostają utlenione przez żelazicyjanek do methemoglobiny. Methemoglobina natychmiast reaguje z cyjankiem tworząc cyjanomethemoglobinę.

Jedyną wadą jest czas potrzebny do całkowitej hemolizy krwi i przekształcenia się hemoglobiny do HiCN wynoszący ok. 20 minut od rozcieńczenia krwi. Można go skrócić do 5 min. posługując się zmodyfikowanym odczynnikiem Drabkina.

Sposób użycia:

1. Do próbki z 5 cm³ odczynnika Drabkina dodać 0,02 ml krwi, kilkakrotnie przepłukując pipetę.
2. Zawartość próbki dobrze wymieszać i odstawić na 20 – 25 min, w przypadku odczynnika tradycyjnego lub 5 minut przy odczynniku zmodyfikowanym – do całkowitej hemolizy.
3. Oznaczyć absorbancję mieszaniny w kuwetach o długości drogi optycznej 1 cm, przy długości fali 540 nm (zalecane) lub podobnej, lub w przypadku użycia kolorymetru przy filtrze żółtozielonym. Jako roztworu odniesienia użyć odczynnika Drabkina
4. W przypadku pomiaru przy długości fali innej niż 540 nm równolegle zmierzyć absorbancję wzorca cyjanomethemoglobiny (dostępnego w handlu).

Wyniki:

Zawartość hemoglobiny oblicza się wg wzoru:

Przy pomiarze przy długości fali 540 nm:

$$\text{Hb [g/100 ml]} = \text{absorbancja} * 36,8$$

Przy pomiarze przy długości fali innej niż 540 nm:

$$\text{Hb [g/100 ml]} = \text{absorbancja próby} / \text{absorbancja wzorca} * \text{współczynnik (dołączony do wzorca)}$$