

DETERMINACIÓN
MANUAL DE
HEMOGLOBINA
(M. Cianmetahemoglobina)

FUNDAMENTO

- El Fe(II) de la hemoglobina, oxihemoglobina y carboxihemoglobina es oxidado a Fe(III) por el ferricianuro, dando lugar a la metahemoglobina que en la presencia de ión cianuro, origina la cianmetahemoglobina compuesto de color rojo y estable, que se puede determinar fotométricamente.

MATERIAL

Muestra: Sangre anticoagulada con EDTA (Tapón morado)

Materiales:

- Reactivo de Drabkin.
- Patrón de 15g/dl de hemoglobina.
- Material de laboratorio: Pipetas automáticas, tubos desechables, puntas de pipeta, gradillas, cubetas espectrofotometro, etc.
- Espectrofotómetro.



TÉCNICA



1.- Preparar el reactivo de trabajo a partir del reactivo de Drabkin concentrado, la dilución depende de la marca utilizada. Una vez preparada debe preservarse de la luz.

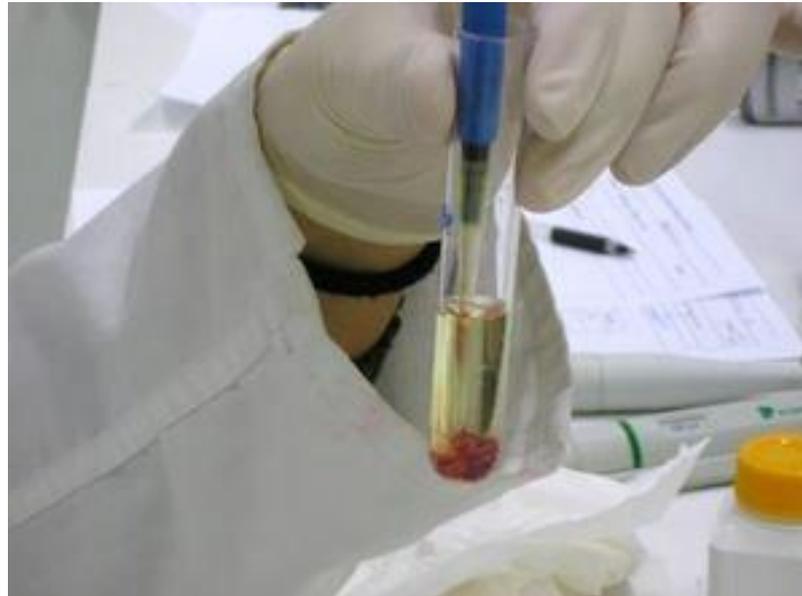
TÉCNICA



2.- Prepara en una gradilla tubo desechables (por ejemplo de capacidad 10ml), uno por cada muestra más uno para el patrón, ya que lo tratarás como una muestra más, y uno para el blanco (este puede ser opcional). No olvides identificar todos los tubos.

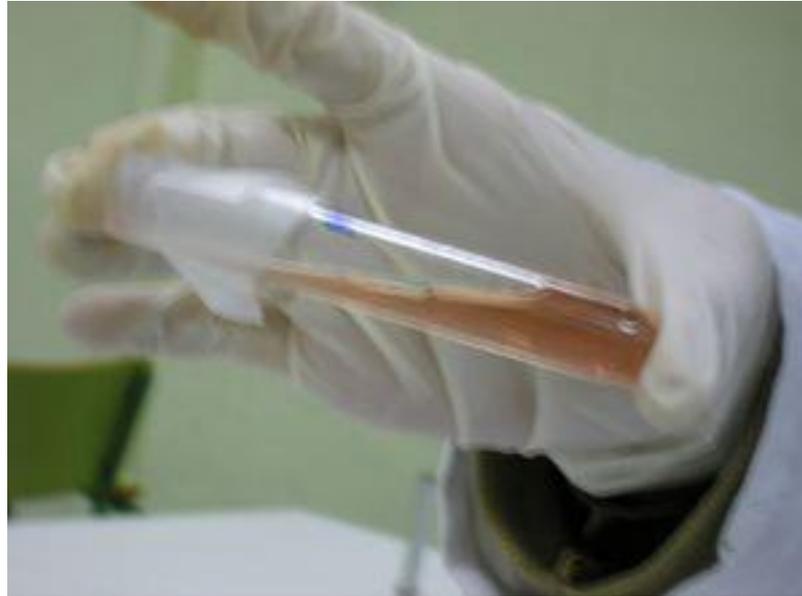
3.- Distribuye en cada tubo la cantidad de reactivo que marque el protocolo del fabricante que estés utilizando.

TÉCNICA



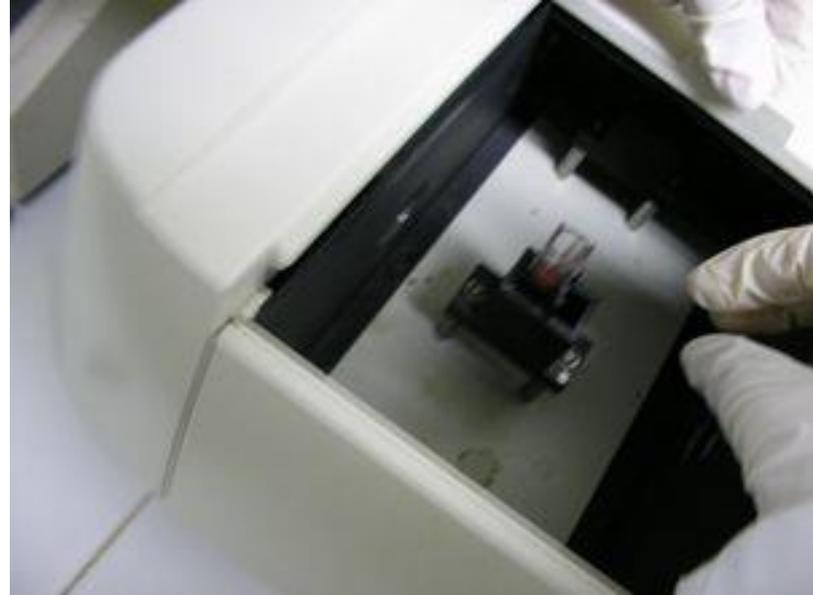
4.- Tras homogeneizar la sangre (ojo, no olvides nunca esta maniobra), toma la cantidad que marque el protocolo (generalmente entre 10 y 20 μl de muestra).

TÉCNICA



5.- Mézclala con el reactivo de Drabkin. Repite esta operación para cada muestra y para el patrón. Deja reposar entre 5 y 10 minutos.

TÉCNICA



- 5.-Ha llegado el momento de realizar las medidas espectrofométricas:
- Ajusta la longitud de onda a 540 nm.
 - Haz un blanco utilizando reactivo de Drabkin.
 - A continuación y utilizando distintas cubetas para cada muestra y para el patrón ve tomando las lecturas de cada una de ellas.

CONSIDERACIONES

1. Mantén las reglas de bioseguridad generales; guantes, bata, etc.
2. Prepara todo el equipo y material previamente.
3. Comprueba las condiciones de la muestra: Identificación, ausencia de hemólisis (el sobrenadante no debe estar rojizo), ausencia de burbujas, condiciones de conservación, etc.
4. Los valores de hemoglobina de las distintas muestras se obtienen relacionando la absorbancia del patrón, cuya concentración conocemos, con las absorbancias de las distintas muestras sabiendo que en las condiciones de trabajo existe una proporcionalidad directa entre absorbancia y concentración.

Ejemplo:

- Absorbancia patrón de 15 g/dl de hemoglobina es igual 0,420.
- Absorbancia de muestra de concentración de hemoglobina desconocida es igual a 0,390.

$$[\text{Hb muestra}] = (15 \text{ g/dl} \cdot 0,390) / 0,420 = 13,90 \text{ g/dl de hemoglobina}$$