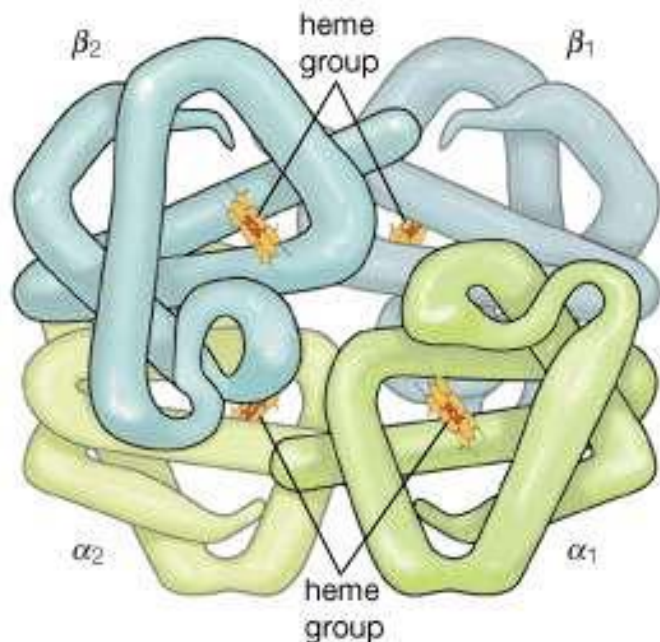




Faculty of Biological Science and Technology
Zoology and Botanical Department
Practical Animal Physiology

اندازه گیری میزان هموگلوبین خون به روش سیان مت هموگلوبین
(Hemoglobin Determination Based on Cyanmethemoglobin Method)

By: Shirin Kashfi
Ph.D in Animal Development
Sh.kashfi@staf.ui.ac.ir



© 2007 Encyclopædia Britannica, Inc.

- ▶ هموگلوبین جزء اصلی گلبول های قرمز است
- ▶ نوعی پروتئین هم دار است که در انتقال اکسیژن از ریه ها به سلول ها برای متابولیسم اکسیداتیو نقش دارد
- ▶ هر مولکول هموگلوبین از یک قسمت پروتئینی به نام گلوبین و یک رنگدانه آهن دار به نام هم تشکیل شده است
- ▶ گلوبین از چهار زنجیره پلی پپتیدی تشکیل شده است. در بالغین هموگلوبین نوع A (HbA) قسمت عمده هموگلوبین موجود در خون را تشکیل می دهد که از دو زنجیره α و دو زنجیره β تشکیل شده است
- ▶ هموگلوبین می تواند مقداری از دی اکسید کربن تولید شده در سلول ها را نیز به صورت کاربامات به ریه حمل کند
- ▶ هموگلوبین به اِزاء هر دو مولکول اکسیژنی که آزاد می کند می تواند به یک پروتون متصل شود، بنابراین در ایجاد ظرفیت بافری خون هم نقش دارد



- ▶ میزان طبیعی هموگلوبین :
 - ▶ در خانم ها 14 ± 2 g/dl
 - ▶ در آقایان 16 ± 2 g/dl
- ▶ در نوزادان به دلیل بالاتر بودن تعداد گلبول های قرمز میزان هموگلوبین آنها نیز بیشتر و به میزان 18 ± 2 g/dl است
- ▶ چون هموگلوبین در داخل گلبول های قرمز قرار دارد در اکثر مواقع کاهش یا افزایش آن در ارتباط با کاهش یا افزایش تعداد گلبول های قرمز است. اما مستقل از تعداد گلبول های قرمز هم می تواند تغییر کند
- ▶ تغییر فیزیولوژیک میزان هموگلوبین: بر اساس جنسیت، بارداری یا ارتفاع می تواند تغییر کند
- ▶ تغییر پاتولوژیک میزان هموگلوبین:
 - ▶ کاهش مقدار هموگلوبین: در اثر خونریزی یا نقص در مغز استخوان
 - ▶ افزایش میزان هموگلوبین: در هر حالتی که تعداد گلبول های قرمز بیش از حد طبیعی شود

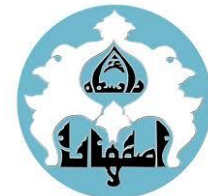


اهمیت اندازه گیری میزان هموگلوبین

- ▶ اندازه گیری میزان هموگلوبین یکی از متداولترین تست های بررسی یک نمونه خون است. با اندازه گیری هموگلوبین می توان به طور غیر مستقیم ظرفیت حمل اکسیژن توسط خون را ارزیابی کرد. همچنین برای تشخیص انواعی از آنمی ها کاربرد دارد
- ▶ اندازه گیری میزان هموگلوبین یک نمونه خون بر اساس روش سیان مت هموگلوبین انجام می گیرد

اصول روش سیان مت هموگلوبین

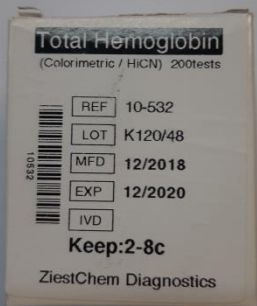
- ▶ براساس روش های فتومتری بنا شده است که در آن هموگلوبین موجود در نمونه خون به کمک درابکین (Drabkin reagent) به سیان مت هموگلوبین تبدیل می شود
- ▶ میزان سیان مت هموگلوبین تولید شده بستگی به میزان هموگلوبین موجود در نمونه دارد
- ▶ سپس جذب نوری این محلول سیان مت هموگلوبین در طول موج ۵۴۰ نانومتر و در مقابل بلانک قرائت شده و با جذب نوری یک محلول استاندارد هموگلوبین مقایسه می شود تا غلظت هموگلوبین نمونه مجهول به دست آید



مواد و وسایل مورد نیاز

- ▶ خون کامل همراه با ضد انعقاد
- ▶ کیت اندازه گیری هموگلوبین توتال به روش سیان مت هموگلوبین
- ▶ لوله آزمایش
- ▶ پیپت سرنگی
- ▶ پیپت هموگلوبین (پیپت Sahli) همراه با مکند دهانی یا سمپلر با حجم ۲۰ میکرولیتر
- ▶ دستگاه اسپکتروفوتومتر
- ▶ کووت
- ▶ پنبه و الکل
- ▶ پارافیلیم

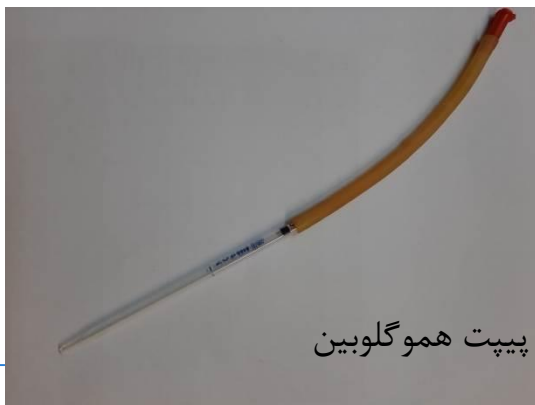
کیت اندازه گیری هموگلوبین توتال



پیپت سرنگی

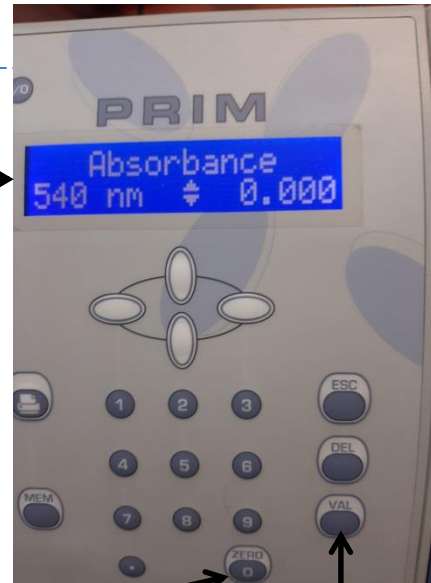


پیپت هموگلوبین





صفحه نمایش

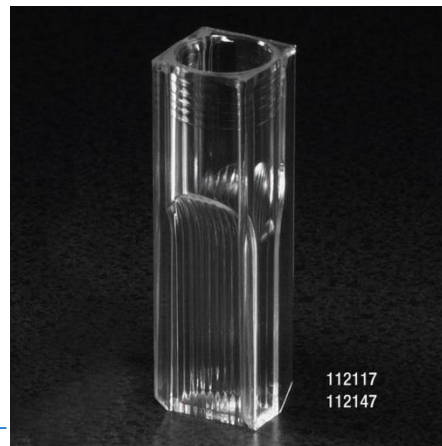


دگمه صفر کردن

دگمه تایید



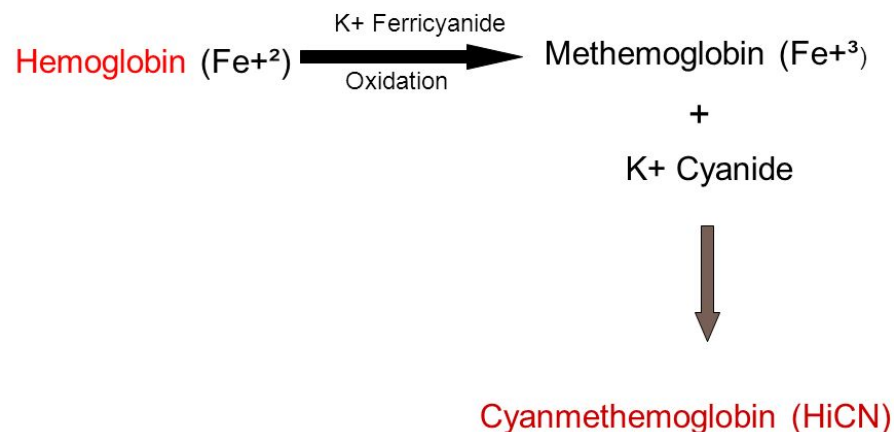
محل قرار دادن کووت



کووت (cuvette)



- ▶ ترکیب درابکین شامل فروسیانید پتاسیم و سیانید پتاسیم در یک محیط قلیایی است
- ▶ . فروسیانید پتاسیم موجود در درابکین می تواند آهن دو ظرفیتی هم را اکسید کرده و در نتیجه مت هموگلوبین تولید می شود. مت هموگلوبین تمایل زیادی برای باند شدن با سیانیدها دارد بنابراین با سیانید پتاسیم ترکیب سیان مت هموگلوبین را تولید می شکند
- ▶ درابکین با هیچ یک از پروتئین های خون به غیر از هموگلوبین واکنش نمی دهد
- ▶ درابکین به رنگ زرد روشن است و باید در ظروف تیره نگهداری شود
- ▶ هنگام استفاده از محلول درابکین باید توجه نمود که بیش از یک ماه از تهیه آن نگذشته باشد و هنگام پیپت کردن کف نکند
- ▶ در این آزمایش داربکین به عنوان بلانک برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر و نیز برای رقیق کردن محلول استاندارد غلیظ هم به کار می رود





- ▶ محلول های استاندارد با غلظت های ۸، ۱۲ و ۱۶ گرم درصد از روی استاندارد غلیظ ۲۰ گرم درصد تهیه کنید
- ▶ ۵ میلی لیتر از محلول درابکین را داخل یک لوله آزمایش خشک و تمیز پیپت کنید
- ▶ به میزان ۲۰ μ l خون کامل با کمک پیپت هموگلوبین یا سمپلر بردارید. دقت کنید که میزان لازم خون را دقیق برداشت کنید و با کمک پنبه اطراف سر پیپت را تمیز کنید تا خون اضافه برداشت نشود
- ▶ خون را داخل درابکین با دقت تخلیه کنید. توجه کنید که درابکین کف نکند
- ▶ در لوله آزمایش را با پارافیلیم مسدود کرده و به آرامی لوله را سر و ته کنید تا خون و درابکین کاملاً مخلوط شوند
- ▶ لوله آزمایش محتوی خون و درابکین را به مدت ده دقیقه در حرارت محیط قرار دهید
- ▶ جذب نوری محلول مجهول خود و نمونه های استاندارد تهیه شده را در طول موج ۵۴۰ نانومتر قرائت کنید
- ▶ با استفاده از نرم افزار Excel منحنی استاندارد رسم کرده و غلظت هموگلوبین نمونه مجهول را به دست آورید



تهیه محلول های استاندارد هموگلوبین

- ▶ با استفاده از محلول استاندارد غلیظ موجود در آزمایشگاه و درابکین غلظت های مختلفی از محلول استاندارد می توان تهیه نمود
- ▶ حجم محلول های تهیه شده بستگی به گنجایش کووت دستگاه اسپکتروفتومتر مورد استفاده دارد
- ▶ از رابطه زیر برای به دست آوردن مقداری که باید از محلول استاندارد غلیظ برداشت شود، استفاده می شود

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

Starting concentration → C_1

Starting volume → V_1

Final concentration → C_2

Final volume → V_2

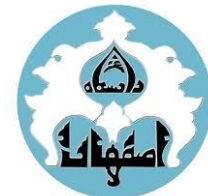
- ▶ چون حجم کووت موجود در آزمایشگاه (منظور آزمایشگاه فیزیولوژی جانوری دانشگاه اصفهان است) ۱ میلی لیتر (معادل ۱۰۰۰ میکرولیتر) است، پس از به دست آوردن مقدار لازم از محلول استاندارد غلیظ آن را از ۱۰۰۰ کم کرده تا حجم درابکینی که باید به استاندارد غلیظ اضافه شود تا غلظت مورد نظر به دست آید، محاسبه شود



تهیه محلول های استاندارد هموگلوبین

- ▶ مثال برای به دست آوردن محلول استاندارد با غلظت ۸ گرم بر دسی لیتر از محلول استاندارد غلیظ ۲۰ گرم بر دسی لیتر در حجم نهایی ۱ میلی لیتر محاسبات به طریق زیر است:

$$\begin{aligned} C_1 V_1 &= C_2 V_2 \\ C_1 \text{ غلظت اولیه} &= 20 \text{ gr/dl} \\ V_1 &= ? \\ C_2 \text{ غلظت نهایی} &= 8 \text{ gr/dl} \\ V_2 \text{ حجم نهایی} &= 1000 \text{ ml} \\ 20 \times ? &= 8 \times 1000 \text{ ml} \\ V_1 &= 400 \text{ ml} \quad \text{مقدار لازم از استاندارد غلیظ} \\ 1000 - 400 &= 600 \text{ ml} \quad \text{== == رقیق == ==} \end{aligned}$$



تهیه محلول های استاندارد هموگلوبین

► به این ترتیب برای تهیه ۱ میلی لیتر از پنج غلظت مختلف از استاندارد هموگلوبین با غلظت ۲۰ گرم بر دسی لیتر می توان از جدول زیر استفاده نمود:

غلظت استاندارد (گرم بر دسی لیتر)	محلول استاندارد 20 گرم بر دسی لیتر (μl)	محلول درابکین (μl)
0	0	1000
8	400	600
12	600	400
16	800	200
20	1000	0

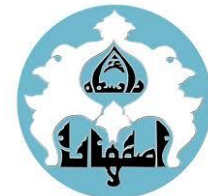


روش محاسبه غلظت هموگلوبین نمونه خون مجهول

- ▶ الف) استفاده از منحنی استاندارد
- ▶ با استفاده از نرم افزار Excel منحنی استاندارد رسم کرده و معادله خط منحنی رسم شده را به دست آورید. سپس با قرار دادن جذب نوری نمونه مجهول در معادله خط غلظت هموگلوبین نمونه مجهول را به دست آورید
- ▶ ب) استفاده از فرمول زیر

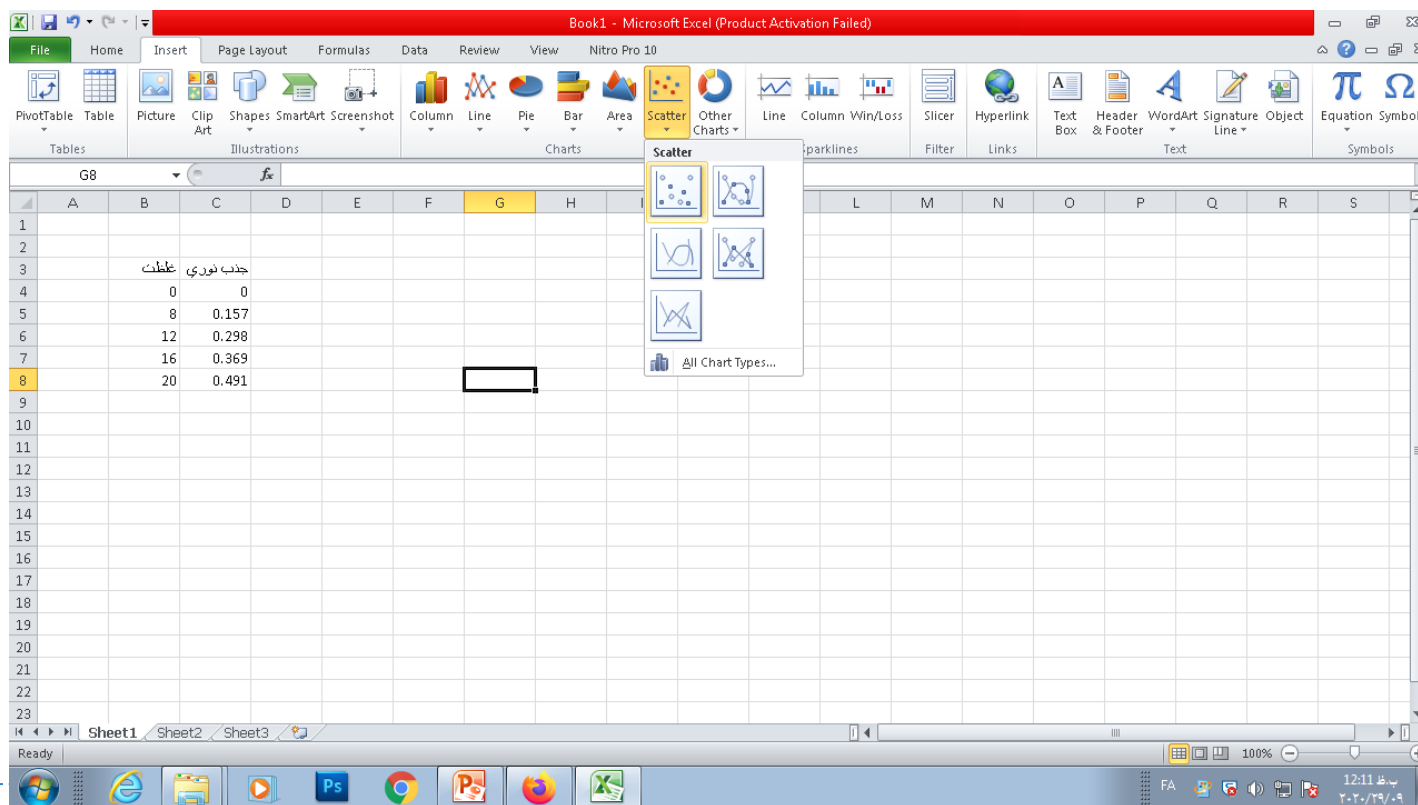
$$\text{Calculation} = \frac{\text{OD of test}}{\text{OD of standard}} \times \text{Conc. of standard} = \text{Hemoglobin of test in g/dL}$$

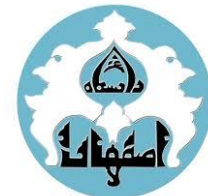
- ▶ در فرمول بالا باید از غلظت استاندارد غلیظ استفاده کرد
- ▶ استفاده از منحنی استاندارد روش دقیقتری است



رسم منحنی استاندارد با استفاده از نرم افزار Excel

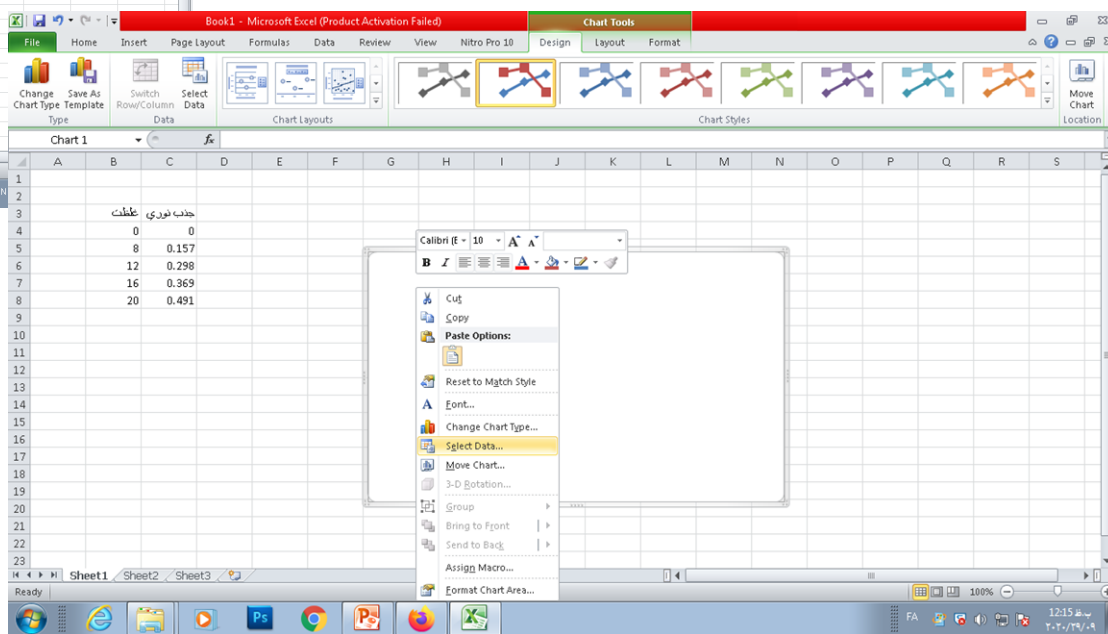
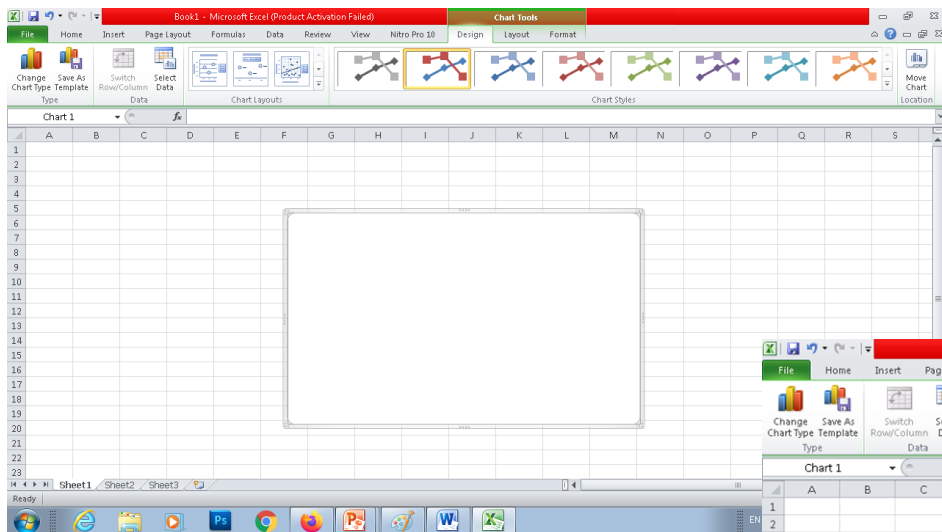
- ▶ در صفحه Excel غلظت ها را در یک ستون و جذب نوری هر یک را در ستون دیگری وارد کنید (می توان در دو ردیف هم وارد کرد)
- ▶ در منوی insert روی گزینه scatter کلیک کرده و اولین نمونه از انواع منحنی های موجود را انتخاب کنید

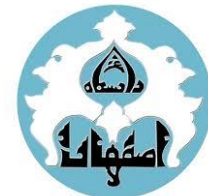




رسم منحنی استاندارد با استفاده از نرم افزار Excel

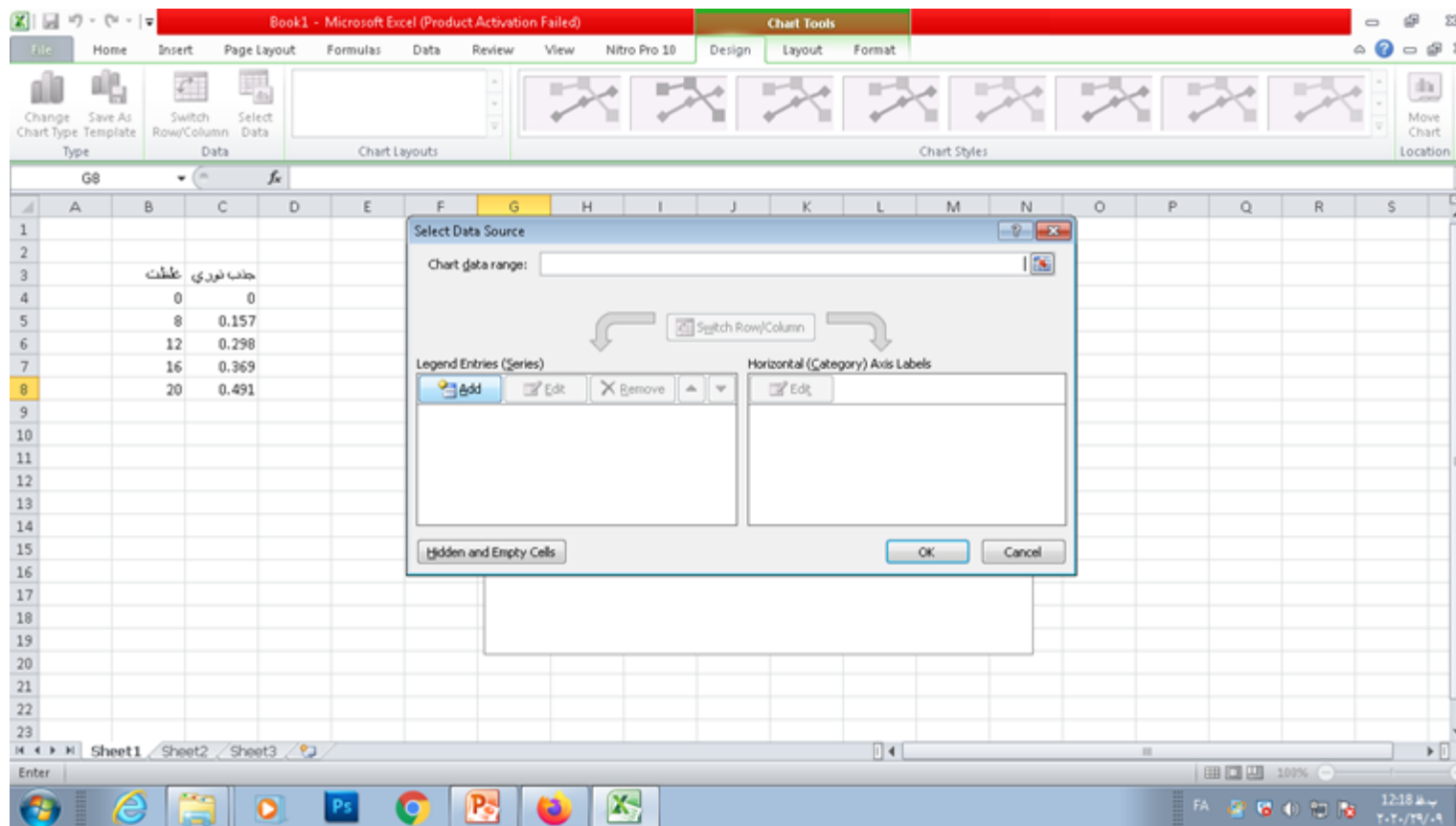
روی صفحه سفید کادر منحنی باز شده کلیک راست کرده و از منوی باز شده گزینه select data را انتخاب کنید





رسم منحنی استاندارد با استفاده از نرم افزار Excel

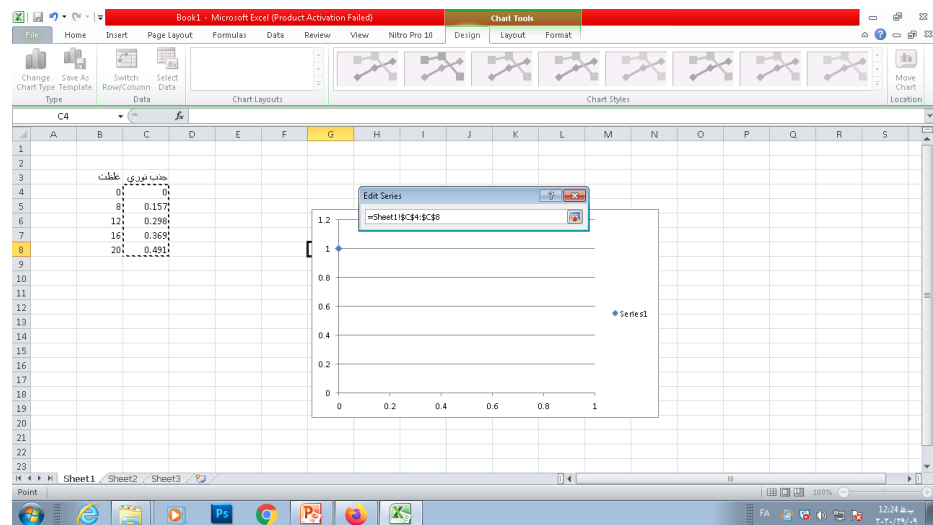
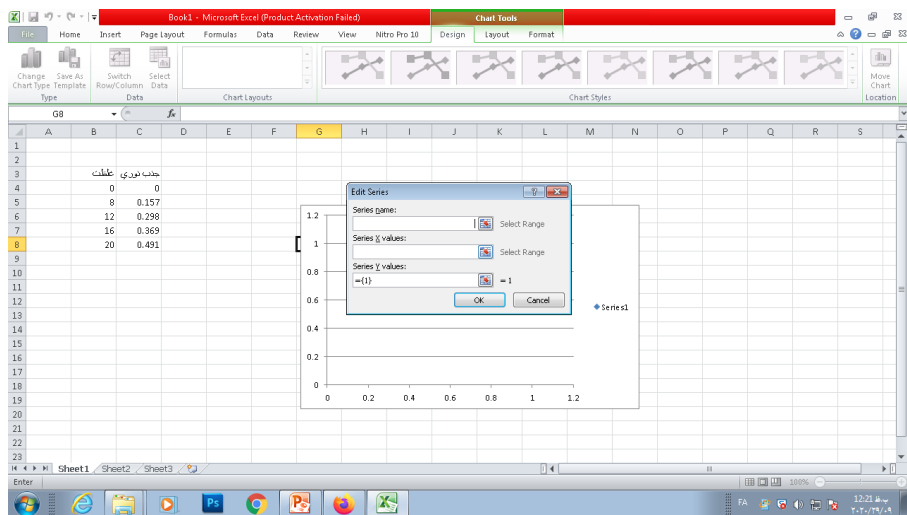
در پنجره باز شده روی گزینه Add کلیک کنید ▶

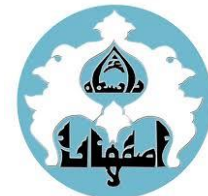




رسم منحنی استاندارد با استفاده از نرم افزار Excel

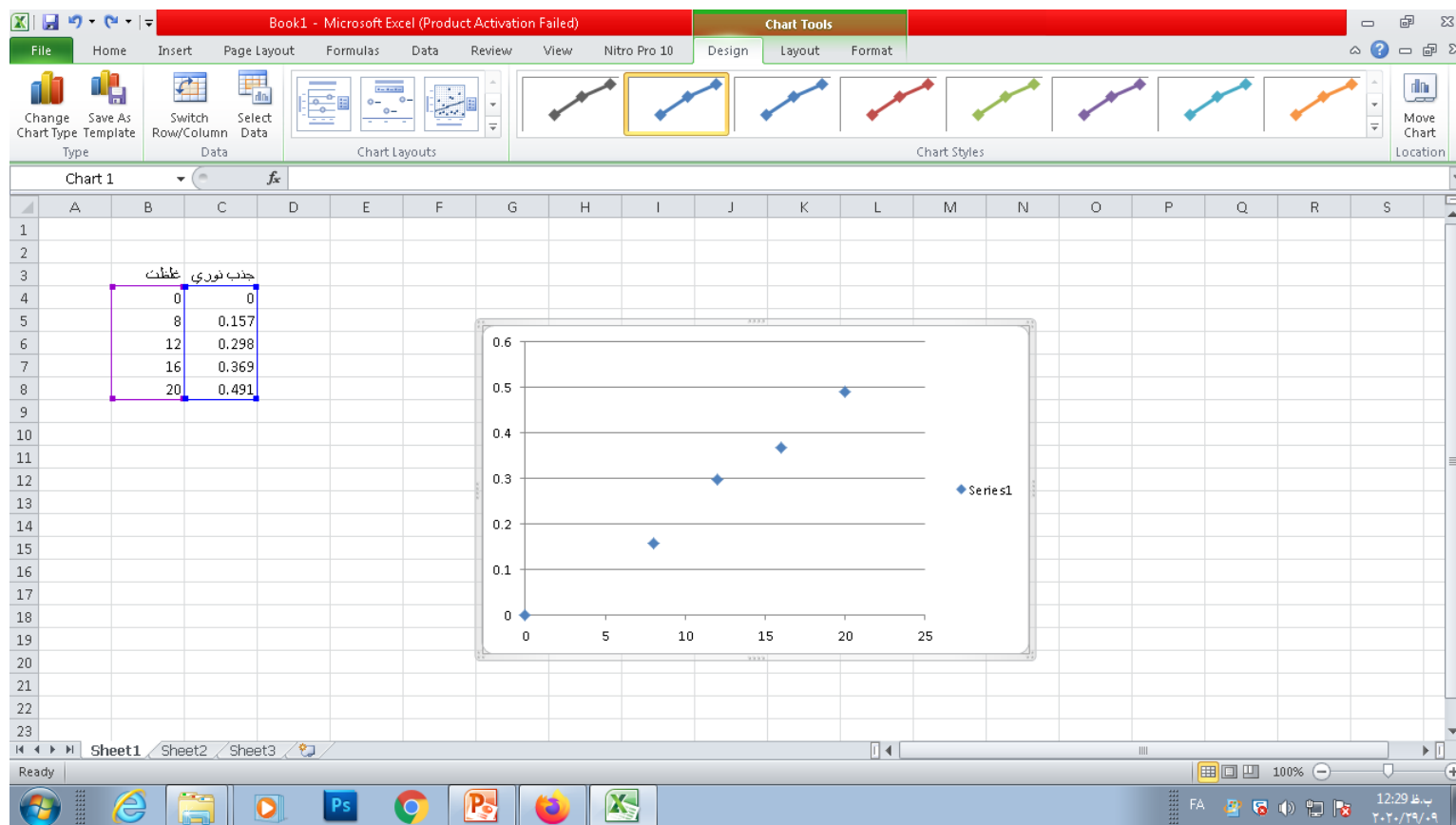
- ▶ در پنجره باز شده روی فلش قرمز مربوط به کادر series X value کلیک کرده و سپس با click & drag مقادیر مربوط به غلظت را در این کادر وارد کنید و دوباره فلش قرمز را بزنید
- ▶ سپس فلش قرمز مربوط به کادر series Y value را کلیک کرده و سپس با click & drag مقادیر مربوط به جذب نوری را در این کادر وارد کنید و دوباره فلش قرمز را بزنید
- ▶ در پایان با زدن Ok مربوط به هر پنجره از این مرحله خارج شوید؛ به این ترتیب نقاط متناظر غلظت و جذب نوری روی منحنی رسم شده مشخص می شود

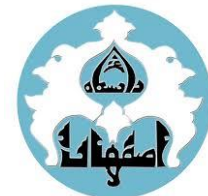




رسم منحنی استاندارد با استفاده از نرم افزار Excel

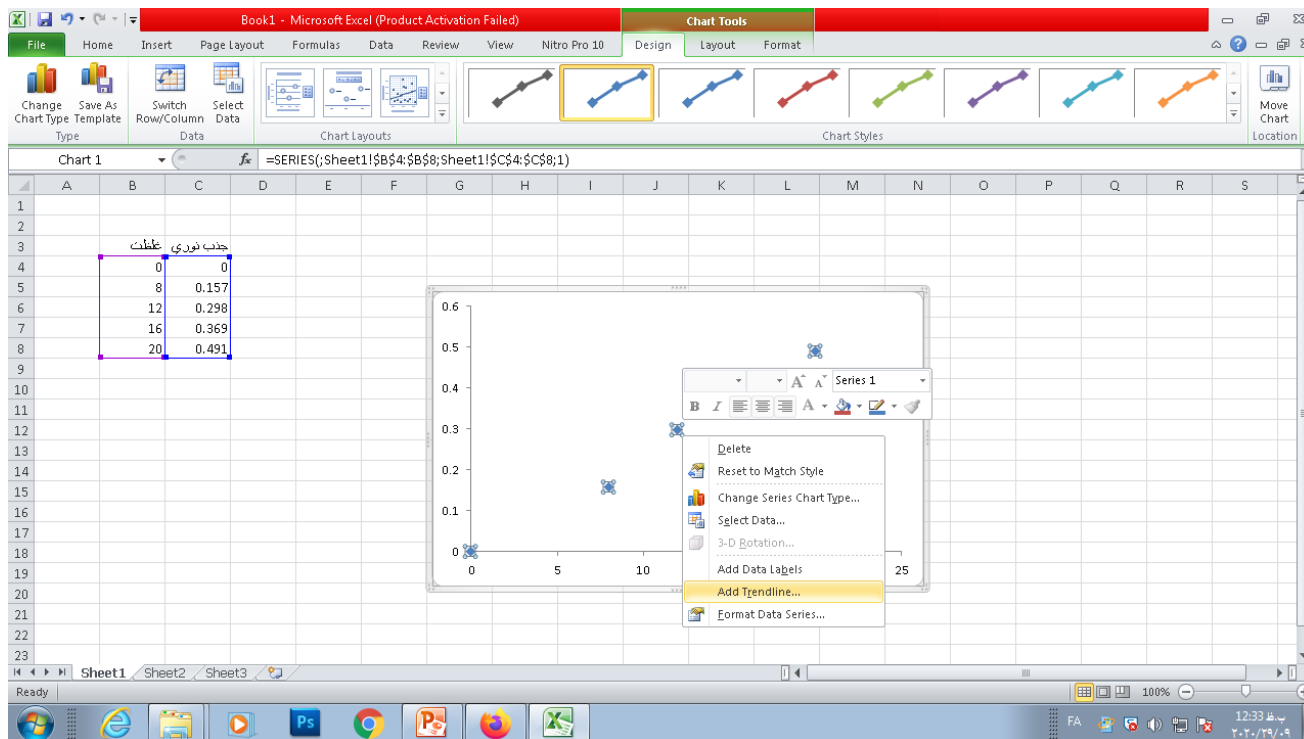
- ▶ با کلیک روی یکی از خطوط افقی آنها را انتخاب و حذف کنید
- ▶ در صورت تمایل می توانید باکس series در گوشه سمت راست را حذف یا مطلب مورد نظر خود را در آن بنویسید و جای آن را هم تغییر دهید





رسم منحنی استاندارد با استفاده از نرم افزار Excel

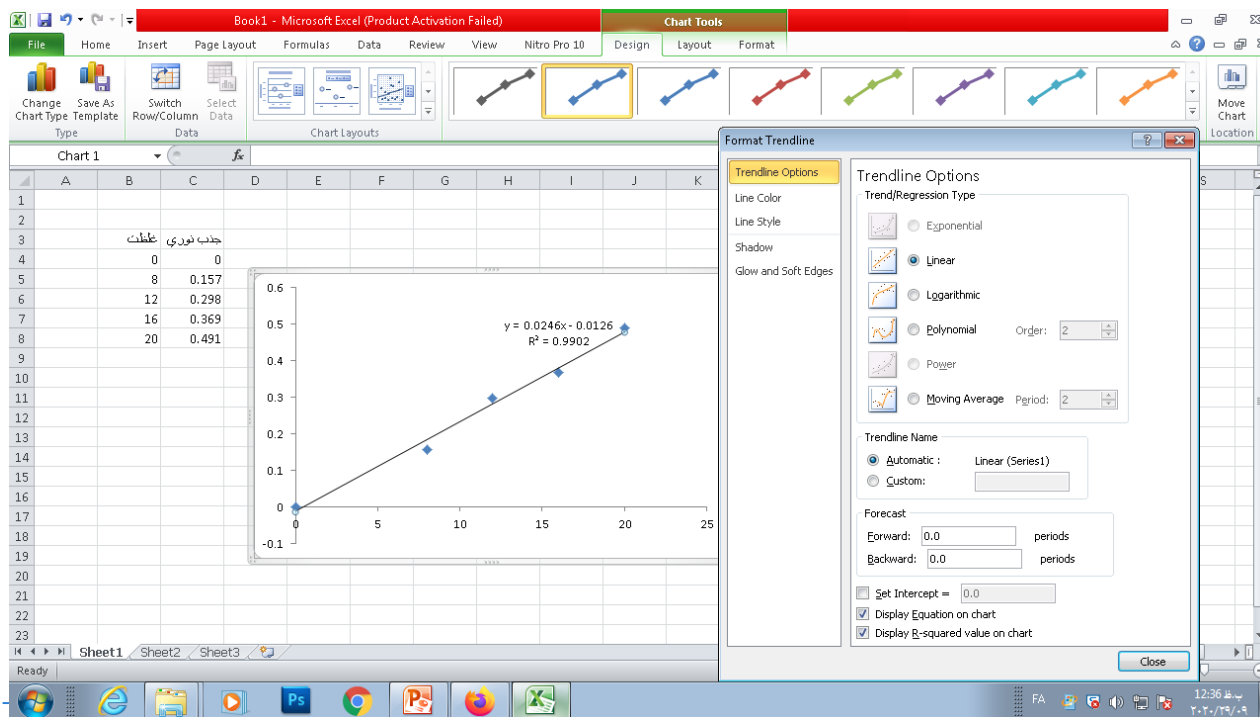
برای رسم بهترین خط روی یکی از نقاط داده شده روی منحنی راست کرده و از پنجره باز شده گزینه add trendline را انتخاب کنید

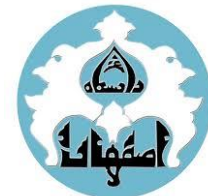




رسم منحنی استاندارد با استفاده از نرم افزار Excel

- ▶ در پنجره باز شده گزینه خطی (linear) را مشخص کنید
- ▶ همچنین گزینه های نمایش معادله خط روی نمودار (display equation on chart) و در صورت تمایل R^2 -display square value on chart را فعال کنید
- ▶ با بستن پنجره باز شده همه موارد مشخص شده روی نمودار نشان داده خواهند شد
- ▶ چون نمودار خطی است، معادله خط به صورت کلی $y=ax-b$ خواهد بود

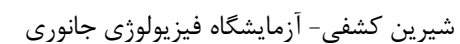
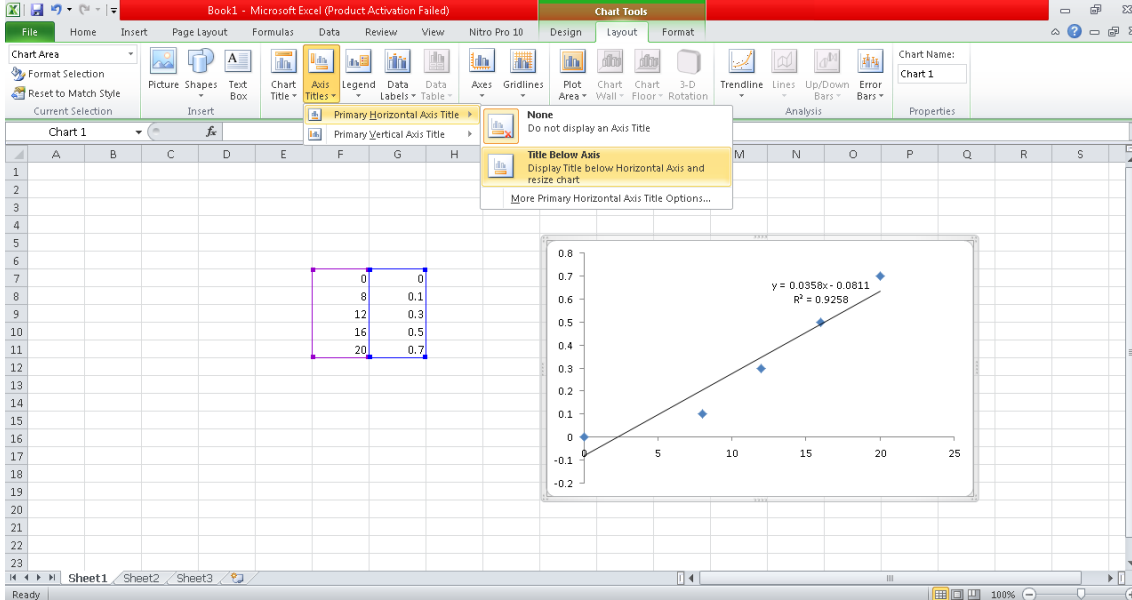


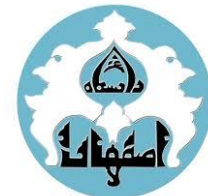


رسم منحنی استاندارد با استفاده از نرم افزار Excel

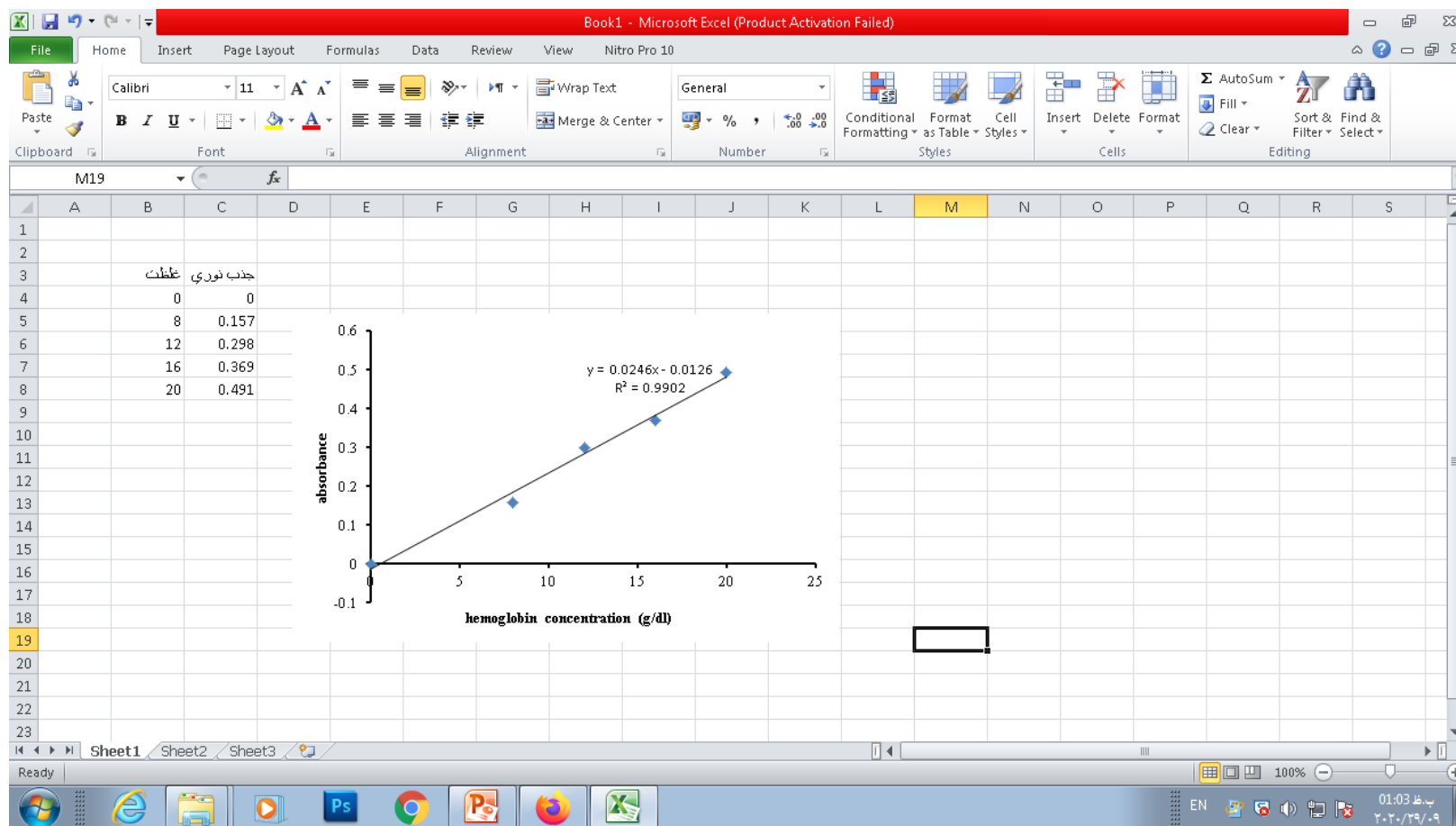
► برای مشخص کردن هر یک از محورهای نمودار به روش زیر عمل کنید:

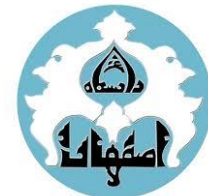
1. روی صفحه منحنی کلیک کنید تا منوی های بیشتری در اختیار شما قرار گیرد؛ سپس منوی layout را در نوار بالای برنامه اکسل انتخاب کنید
2. از گزینه Axis titles ابتدا گزینه primary horizontal axis title و سپس title below axis را انتخاب کنید
3. در باکس مشخص شده روی نمودار مطلب خود که نشان دهنده آن است که محور Xها چه چیز را نشان می دهد، بنویسید
4. دوباره از گزینه Axis title ابتدا گزینه primary vertical axis title و سپس rotated title را انتخاب کنید
5. در باکس مشخص شده روی نمودار مطلب خود که نشان دهنده آن است که محور Yها چه چیز را نشان می دهد، بنویسید





رسم منحنی استاندارد با استفاده از نرم افزار Excel





رسم منحنی استاندارد با استفاده از نرم افزار Excel

