

Документ подписан простой электронной подписью

Информация о владельце:

ФИО: Локтионова Оксана Геннадьевна

Должность: проректор по учебной работе

Дата подписания: 31.12.2020 13:36:44

Уникальный программный ключ:

0b817ca911e6668abb13a5d426d39e5f1c11eabbf73e943df4a4851fda56d089

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Юго-Западный государственный университет

## МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ К ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ ПО ДИСЦИПЛИНЕ

**«ПРИБОРЫ И КОМПЛЕКСЫ ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОГО АНАЛИЗА»**

(наименование дисциплины)

направление подготовки 12.03.04 Биотехнические системы и технологии \_\_\_\_\_

(Биотехнические и медицинские аппараты и системы) \_\_\_\_\_

форма обучения очная

## 1) Лабораторная работа N 1

### 2) Колориметрические методы анализа для определения гемоглобина в крови.

- 3) Гемоглобин – основной дыхательный пигмент и главный компонент эритроцита, выполняющий важные функции в организме человека: перенос кислорода из легких в ткани и углекислого газа из тканей в легкие. Он также играет существенную роль в поддержании кислотно-основного равновесия крови. Буферная система, создаваемая гемоглобином, способствует сохранению pH крови в определенных пределах. Гемоглобин представляет собой сложный белок, относящийся к группе гемопротеинов; белковый компонент в котором представлен глобином, небелковый – протетической группой. Протетическая группа в молекуле гемоглобина представлена 4 одинаковыми железопорфириновыми соединениями, которые называются гемами.
- 4) Определение содержания гемоглобина в крови человека является одним из самых важных и массовых показателей. Для определения гемоглобина чаще всего анализируют производные гемоглобина, образовавшиеся в процессе его окисления и присоединения к нему различных химических групп, приводящих к изменению валентности железа и окраски раствора.
- 5) Для рутинных лабораторных исследований наиболее предпочтительны колориметрические методы, как наиболее дешевые, простые и быстрые в исполнении. Кровь человека – это нормальная смесь производных гемоглобина с различными спектрами поглощения. При количественном определении гемоглобина колориметрическими методами возникает проблема в выборе реагента, который превращал бы все производные гемоглобина только в одну форму перед фотометрическим анализом. Лучшими методами, количественно превращающими гемоглобин в его производные, оказались гемиглобинцианидный (HbCN), гемихромный (HbChr) и гемиглобиназидный (HbN<sub>3</sub>), которые при фотометрировании дают наименьшую ошибку определения среди других методов анализа.
- 6) **Ход работы.** Определение гемоглобина в крови традиционно проводится на основе измерения окрашенного железопорфиринового комплекса. При этом используются разные фотометрические методы: цианметгемоглобиновый метод Драбкина, аммиачный метод и другие. Принцип этих методов заключается в подготовке из цельной крови с помощью трансформирующих растворов биопроб с последующим их фотометрированием.
- 7) Гемиглобинцианидный метод (метод Драбкина). В этом методе Fe<sup>+2</sup> гемоглобина окисляется до Fe<sup>+3</sup>метгемоглобина, который затем переводится в стабильный цианметгемоглобин (CNmetHb). Абсорбция CNmetHb измеряется при 540 нм, при которой имеется максимум абсорбции. Этот метод характеризуется высокой точностью, простотой исполнения, дешевизной и возможностью выполнения на гематологических анализаторах. Для гемиглобинцианида фактор пересчета коэффициента оптической плотности в концентрацию гемоглобина является известной величиной и равен 367.7 (X=540 нм). Расчет проводится по следующей формуле:
- 8) 
$$Hb(\text{г/л}) = 367,7 \times A_{540\text{нм}}$$
- 9)
- 10) где  $A_{540\text{нм}}$  - абсорбция раствора гемоглобина при длине волны 540 нм.
- 11)
- 12) **Ход определения.** В пробирку с 5 мл трансформирующего раствора добавляют 20 мкл крови (капилляр Сали, разведение 1:251). Содержимое пробирки тщательно перемешивают и оставляют на 10 мин. Измерения проводят на спектрофотометре при длине волны 540 нм или на

фотоэлектроколориметре при длине волны 520-560 нм (зеленый светофильтр) в кювете с длиной оптического пути 10 мм против холостой пробы (трансформирующий раствор).

13) При использовании спектрофотометра с точной величиной длины волны (540 нм), расчет проводят по указанной выше формуле. При использовании ФЭК и зеленого светофильтра расчёт содержания гемоглобина производят по специальному калибровочному графику, который строится отдельно для каждого фотометра.

14)

## 15) Лабораторная работа N 2

16) Изучение сахариметра и определение концентрации глюкозы в крови.

ВИ.

17)

18) При прохождении плоскополяризованного света через некоторые кристаллы и растворы органических соединений, таких как камфора, кокаин, никотин, сахаристые вещества, плоскость колебания вектора  $E_{\sim}$  поворачивается. Вещества, обладающие способностью вращать плоскость колебаний, называются оптически активными. На опыте установлено существование двух направлений вращения плоскости колебаний. Если поворот плоскости колебаний вектора  $E_{\sim}$  для наблюдателя, смотрящего навстречу проходящему лучу, совершается по часовой стрелке, то вещество называется правовращающим, а против часовой стрелки — левовращающим. Почти все оптически активные 3 вещества существуют в двух модификациях: правовращающие и левовращающие.

19) Зависимость угла поворота плоскости колебаний поляризованного света от концентрации оптически активных растворов дает возможность быстро и надежно определять их концентрацию. Метод определения заключается в следующем. Между скрещенными поляризатором и анализатором (установленными на темноту) помещают трубку с раствором вещества. В результате поворота плоскости поляризации поле зрения просветляется. Для определения угла поворота надо повернуть анализатор до получения первоначального состояния поля зрения. Если известны постоянная вращения  $\alpha_0$  и угол поворота  $\phi$ , то концентрацию легко рассчитать по приведенной выше формуле (2.1). Приборы, применяемые для определения концентрации оптически активных растворов, называются поляриметрами (частный случай — сахариметрами).

20) Описание установки В настоящей работе используется сахариметр СУ-3, внешний вид которого представлен на рис. 3.1. В состав сахариметра входят: (1) — измерительный узел, (2) — осветительный узел. Эти узлы соединены между собой траверсой (3), на которой укреплена камера (4) для поляриметрических кювет (трубок). С лицевой стороны измерительной головки прибора имеются зрительная труба (5) и лупа (6) в оправе для отсчета показаний по шкале. В нижней части измерительной головки расположена рукоят-ка (7) кремальерной передачи для компенсации поворота плоскости поляризации. На передней части основания (8) находится тумблер для включения осветительной лампы. С тыльной стороны основания имеются вилка разъема для подключения электролампы к трансформатору и вилка со шнуром для подключения трансформатора в сеть. В сахариметре угол поворота плоскости поляризации определяется по выравниванию освещенности двух частей поля зрения в зрительной трубе. Двойное поле получается в результате специальной обработки поляризационной призмы. Обычная поляризационная призма разрезается вдоль главного сечения, и у каждой половины сошлифовываются клинья приблизительно по  $2^{\circ}30'$ . Затем эти половины склеиваются (рис.3.3а, 3.3б). Свет, попадая на такую призму, выходит двумя поляризованными пучками. Угол между плоскостями колебаний векторов  $E_{\sim 1}$  и  $E_{\sim 2}$  в этих пучках составляет примерно  $5^{\circ}$ . Если прямая АА (рис. 3.4) — сечение плоскости пропускания колебаний анализатора плоскостью рисунка — перпендикулярна биссектриссе ОО угла между векторами  $E_{\sim 1}$  и  $E_{\sim 2}$ , то обе половинки поля зрения освещены равномерно.

21) Настройка сахариметра. Порядок настройки. 1. Включите прибор в сеть, а тумблер на передней панели поставьте в положение “Вкл.” 2. Установите на резкость окуляр зрительной трубы, ориентируясь при этом на линию раздела полей, которая должна быть видна абсолютно резко. (Резкость подстройте и после помещения в камеру кюветы с раствором.) 3. Установите на резкость лупу отсчетного устройства, ориентируясь при этом на шкалу. 8 4. Порядок выполнения работы 4. Проверьте положение “нуля” прибора. Для этого, при отсутствии в камере поляриметрической кюветы, вращением рукоятки кремальберной передачи добейтесь одинаковой освещенности обеих половин поля зрения. При этом нулевые деления шкалы и нониуса должны совпасть. (Если совпадения нет, то обратитесь к лаборанту для настройки прибора или учтите поправку на “нуль” при измерениях.) После настройки сахариметра приступите к измерениям.

22) Определение концентрации раствора сахара. Для определения концентрации в камеру поместите трубку с раствором неизвестной концентрации и найдите угол поворота плоскости поляризации, как в задании 3. Измерение угла поворота произведите не менее пяти раз. Результаты измерений занесите в таблицу 2, по форме аналогичную таблице 1. Концентрацию сахара в растворе рассчитайте по формуле  $c = \frac{\phi}{\alpha} \cdot \frac{1}{l}$ . Стандартную ошибку определите по формуле  $\Delta c = \frac{\partial c}{\partial \phi} \Delta \phi + \frac{\partial c}{\partial \alpha} \Delta \alpha + \frac{\partial c}{\partial l} \Delta l$ . Окончательно результат запишите в виде  $c = (c \pm \Delta c)$  г/см<sup>3</sup> при  $\alpha = 23$

23)

24)

## 25) Лабораторная работа N 3

### 26) Применение фотометрического анализа в стационарных оксиметрах.

27) Одной из важнейших функций крови в организме является дыхательная функция, которая заключается в обеспечении кислородного обмена. Как известно, кислород находится в крови в двух состояниях, в особой лабильной непрочной связи с гемоглобином, т.е. в виде оксигемоглобина, и в свободном растворенном виде в плазме крови. Свободный и связанный кислород находится между собой в состоянии равновесия. С изменением количества свободного, соответственно меняется количество связанного кислорода, которого, в принципе, в 80 -100 раз больше, чем свободного.

28) Свободный растворенный кислород, как всякий растворенный в жидкости газ, развивает определенное напряжение. Содержание растворенного кислорода прямо пропорционально его напряжению и зависит от растворимости газа (т.е. коэффициента его абсорбции) и от температуры. Коэффициент абсорбции кислорода  $a$  в плазме при температуре 37 равен 0,023 (для CO<sub>2</sub>  $a = 0,510$ ), а напряжение кислорода в артериальной крови равно 90 мм. рт. ст.

29) Оксигеметрией называется фотометрический метод непрерывного измерения степени насыщения крови кислородом, основанный на спектральных особенностях гемоглобина. Зависимость между пропусканием монохроматического света и концентрацией поглощающего свет вещества выражается законом Бугера - Ламберта - Бера, согласно которому числовое значение логарифма поглощения света пропорционально концентрации с растворенного вещества. Предложенная в 70-х годах методика фотооксигеметрии основана на использовании принципов фотоплетизмографии, позволяющих выделить артериальную составляющую абсорбции света для определения оксигенации артериальной крови. Измере-

ние этой составляющей дает возможность использовать спектрофотометрию для неинвазивного мониторинга сатурации артериальной крови кислородом. Согласно закону Бугера - Ламберта - Бера: интенсивность  $I_0$  падающего света при распространении в среде уменьшается по закону

$$I = I_0 \exp(-\epsilon c l),$$

где  $l$  - толщина слоя,  $\epsilon$  - показатель поглощения (на единицу концентрации с вещества), величина абсорбции света пропорциональна толщине слоя поглощающего вещества, т.е. при исследовании кровотока определяется размером сосуда или объемом крови, проходящим через исследуемый участок тканей.

30) Принцип действия прибора основывается на определении встроенным датчиком уровня концентрации растворённого кислорода. Химический процесс, называемый диффузией, направляет кислород внутрь датчика, на котором расположены электроды, производящие электрический ток. На основе тока, концентрация газа преобразовывается в цифровые данные, которые впоследствии передаются на дисплей. В условиях повышенной температуры и давления в жидкости используются оксиметры. Измерения таким прибором проводятся с помощью магнита, на основе того, что небольшое создаваемое магнитное поле легко притягивает элементы кислорода. Различные модификации современных анализаторов кислорода отличаются уровнем чувствительности, среднеквадратическим отклонением и диапазоном проведения измерений. Особенно ценится в модифицированных приборах линейность исследования – это точное снятие показателей на протяжении длительного времени. Газоанализатор кислорода имеет высокие эксплуатационные характеристики, приемлемую скорость калибровки и обладает незаменимыми техническими характеристиками. Качество прибора обуславливается повышенной эффективностью химических исследований.

31)

32)