

Лабораторная работа №3
Определение содержания
гемоглобина по методу
Сали

Оборудование и реактивы

- - гемометр Сали,
- - капиллярная пипетка от гемометра Сали,
- - глазная пипетка,
- - стеклянная палочка,
- - часовое стекло,
- - 0,1 н. раствор соляной кислоты,
- - дистиллированная вод,
- - фотоэлектроколориметр (ФЭК) или спектрофотометр с зеленым светофильтром и кюветами
- толщиной 1 см;
- - химические пробирки с пробками;
- - капиллярная пипетка от гемометра Сали объемом 20 мкл;
- - градуированная пипетка на 5 мл;
- - раствор Драбкина.

- Гемоглобин - это дыхательный пигмент, содержащийся в эритроцитах. Его количество в организме выражается в г/л и имеет важное диагностическое значение. Определять содержание гемоглобина можно двумя способами: по Сали и цианметгемоглобиновым методом.
- Наиболее распространенным и простым является метод определения гемоглобина по Сали. Однако он дает ряд объективных (постепенное усиление окраски) и субъективных (визуальное сравнение цвета) ошибок.
- Цианметгемоглобиновый метод является наиболее точным.

Метод определения гемоглобина по Сали

- Приготовление 0,1 н. раствора соляной кислоты:
- - на 1 л дистиллированной воды добавляют химически чистой 8,2 куб. см соляной кислоты с удельным весом 1,19 либо 0,1 н. фиксаж соляной кислоты.

Ход определения и учет результатов

- В градуированную пипетку гемометра Сали до метки "2" глазной пипеткой наливают децинормальный раствор соляной кислоты.
- В капиллярную пипетку от гемометра Сали набирают кровь до метки 20 мкл и выдувают ее в раствор соляной кислоты.
- Полученную смесь перемешивают стеклянной палочкой и оставляют на 10 минут. По истечении этого времени в пробирку по каплям доливают дистиллированную воду и, перемешивая стеклянной палочкой, подбирают цвет рабочего раствора до совпадения с цветом жидкости в стандартных пробирках.
- Количество гемоглобина отсчитывают по нижнему мениску рабочего раствора на градуированной пробирке (показатели в г % выражают в г/л), 1 г % равен 10 г/л.

Цианметгемоглобиновый фотометрический метод

- Приготовление раствора Драбкина, на 1 л реактива берут:
- Бикарбонат натрия - 1 г, красная кровяная соль - 0,2 г, цианистый калий или натрий - 0,05 г,
- дистиллированная вода - остальной объем.

Ход определения и учет результатов

- Мерной пипеткой в пробирку наливают 5 мл трансформирующего раствора Драбкина. Пипеткой от гемометра Сали добавляют 20 мкл крови.
- Содержимое пробирки хорошо перемешивают и оставляют в холодильнике на 20 минут. По истечении этого времени рабочий и трансформирующий растворы наливают в кюветы и, используя зеленый светофильтр, проводят измерения на ФЭКе.
- Расчет концентрации гемоглобина (г/л) на основе данного определения проводят по формуле:
- $X = \frac{D}{540} \times 367,1$ г/л, где:
- $\frac{D}{540}$ - показания ФЭК;

Определение гематокритной величины

- Гематокритное число - это отношение объема эритроцитов к общему объему крови, выраженное в л/л (1 л/л равен 100%).

1. Подготовка к исследованию

- Приготовление растворов антикоагулянта:
- - раствор Геллера и Пауля:
- на 100 мл воды: щавелевокислый аммоний - 1,2 г, щавелевокислый калий - 0,8 г;
- - 5% раствор трехзамещенного лимоннокислого натрия.

2. Ход определения и учет результатов

- Микрокапилляры предварительно обрабатывают одним из растворов антикоагулянта. Можно несколько раз сполоснуть их раствором гепарина и высушить при комнатной температуре или же в капилляры насыщают на 1/10 часть раствора Геллера и Пауля и высушивают в сушильном шкафу при 60 °С.
- В подготовленные таким образом капилляры набирают кровь. Конец капилляра закупоривают с помощью замазки и ставят центрифугировать до получения постоянного объема эритроцитов. Время центрифугирования зависит от скорости вращения центрифуги.
- Достигают эффекта полного осаждения эритроцитов. Отсчет объема эритроцитов и плазмы производят при помощи миллиметровой линейки.
- Процентное отношение столба эритроцитов к высоте всего столба крови является гематокритной величиной, которое переводят в размерность л/л.

Определение белка в сыворотке крови

- Содержание белка в сыворотке крови рыб служит экспресс-тестом для определения уровня физиологического состояния рыб при выращивании в современных рыбоводных хозяйствах.
- Концентрацию белка выражают в г % или в г/л; 1 г/л равен 10 г %.

Ход определения и учет результатов

- 2 - 3 мл крови помещают в подготовленные уленгутки или небольшие пробирки. После этого кровь центрифугируют 5 минут при 3000 об./мин.
- В случае отсутствия центрифуги проводят отстаивание крови в холодильнике 30 - 45 минут. Полученная после центрифугирования или отстаивания сыворотка отсасывается чистой пастеровской пипеткой и несколько ее капель помещают на пластинку рефрактометра. Регистрируют показатель преломления по его шкале.
- По таблице 1, приведенной ниже, определяют содержание белка в сыворотке крови. После каждого исследования обе поверхности призм протирают марлевым тампоном, смоченным в спирте.

Концентрация белка (в г %) при различном показателе преломления

Показатель преломления	Концентрация белка (в г %)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1,337	0,60	0,66	0,72	0,77	0,83	0,89	0,95	1,01	1,07	1,12
1,338	1,18	1,24	1,30	1,36	1,41	1,47	1,53	1,59	1,65	1,70
1,339	1,76	1,82	1,88	1,94	2,00	2,05	2,11	2,17	2,23	2,29
1,340	2,34	2,40	2,46	2,52	2,58	2,63	2,69	2,75	2,81	2,87
1,341	2,93	2,98	3,04	3,10	3,16	3,22	3,27	3,33	3,39	3,46
1,342	3,51	3,57	3,62	3,68	3,74	3,80	3,86	3,91	3,97	4,03
1,343	4,09	4,15	4,20	4,26	4,32	4,38	4,44	4,50	4,55	4,61
1,344	4,67	4,73	4,79	4,84	4,90	4,96	5,02	5,08	5,13	5,19
1,345	5,25	5,31	5,37	5,43	5,48	5,54	5,60	5,66	5,72	5,77
1,346	5,83	5,89	5,95	6,01	6,07	6,12	6,18	6,24	6,30	6,36
1,347	6,41	6,47	6,53	6,59	6,65	6,70	6,76	6,82	6,88	6,94
1,348	7,00	7,05	7,11	7,17	7,23	7,29	7,34	7,40	7,46	7,52
1,349	7,58	7,63	7,69	7,75	7,81	7,87	7,93	7,98	8,04	8,10
1,350	8,16	8,22	8,27	8,33	8,39	8,46	8,51	8,57	8,62	8,68
1,351	8,74	8,80	8,86	8,91	8,97	9,03	9,09	9,15	9,20	9,26
1,352	9,32	9,38	9,44	9,50	9,55	9,61	9,67	9,73	9,79	9,84
1,353	9,90	9,96	10,02	10,08	10,13	10,19	10,25	10,31	10,37	10,4