

ПРАКТИЧНА РОБОТА № 5

Тема: Визначення кількості загального білка у плазмі крові за допомогою фотоколориметра та рефрактометра

ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Плазма крові складається з води (90-92%) і сухих речовин (10-8%) - білків, мінеральних елементів, вуглеводів, ліпідів, біологічно активних сполук.

У плазмі крові міститься 7% всіх білків організму при концентрації 60-80 г / л. Білки плазми крові виконують безліч функцій. Одна з них полягає в підтримці осмотичного тиску, так як білки пов'язують воду і утримують її в кровоносній руслі.

Основні білки: альбуміни - 4,0-4,5%, глобуліни - 2,8-3,1%, фібриноген - 0,1-0,4%.

Альбуміни завдяки високій концентрації в крові, великій рухливості і невеликим розмірам молекули визначають онкотичний тиск плазми і грають істотну роль в транспорті кров'ю різних речовин - білірубину, солей важких металів, жирних кислот, лікарських засобів (сульфаніламідів, антибіотиків і ін.).

Глобуліни плазми поділяють на кілька фракцій: α_1 -, α_2 -, β - і γ -глобуліни, які також неоднорідні і за допомогою методу імунофореза підрозділяються на субфракції. Наприклад, у фракції α_1 -глобулінів є білки, простетичну групу яких складають вуглеводи; в складі глікопротеїнів циркулює до 60% вуглеводів плазми. β -глобуліни беруть участь в транспорті фосфоліпідів, холестеролу, стероїдних гормонів, металевих катіонів. Наприклад, металовмісний білок трансферин здійснює перенесення заліза кров'ю - кожна молекула трансферину несе два атоми заліза.

Альбуміни, α - і β -глобуліни є також пластичними речовинами крові, вони безупинно утворюються в печінці і використовуються тканинами в процесі обміну речовин. γ -глобуліни мають найнижчу електрофоретичну рухливість. Вони виконують захисну функцію, будучи факторами специфічного і неспецифічного імунітету, є різні фракції антитіл, що захищають організм від вторгнення вірусів і бактерій: пропердин, що інактивує віруси і бактерії; інтерферон, що руйнує генетичну структуру вірусу, який потрапив до організму. До γ -глобулінів належать також аглютиніни крові. Глобуліни синтезуються в печінці і в клітинах мононуклеарної фагоцитарної системи (МФС).

Фібриноген займає проміжне положення між фракціями β - і γ -глобулінів. Білок синтезується в клітинах печінки, МФС і необхідний для згортання крові. Під впливом тромбіну розчинний білок фібрин починає приймати волокнисту структуру, переходить у фібрин, що обумовлює згортання крові і її перетворення протягом декількох хвилин у щільний згусток.

Сироватка крові відрізняється від плазми тільки відсутністю фібриногену.

Фібриноген і альбумін синтезуються в печінці.

До складу плазми входять небілкові азотовмісні речовини (аміак, сечовина, сечова кислота, креатин, креатинін, амінокислоти та ін.). Загальний їх зміст складає 30-40 мг%.

У плазмі крові містяться і інші органічні речовини, ммоль • л-1: глюкоза - 4,44-6,66, холестерол - 4,7-5,8, молочна кислота - 1,1-1,5; піровиноградна кислота - 0,14; ліпіди - 4,7-6,11. Неорганічні речовини плазми (або сироватки) складають близько 1% і представлені, ммоль • л-1: Na^+ (142), Ca^{2+} (2,5), K^+ (4,4), Mg^{2+} (0,9), Cl^- (103). Плазма містить бікарбонати - 24 ммоль • л-1 при співвідношенні бікарбонат / вугільна кислота 20: 1; фосфати - 1 ммоль • л-1 при співвідношенні двозаміщеного і однозаміщеного фосфату натрію 4: 1; сульфати - 0,5 ммоль • л-1.

Плазма містить компоненти, концентрація яких змінюється: ферменти (наприклад, ліпазу і амілазу), вітаміни, гормони, розчинні продукти гідролізу харчових речовин в шлунково-кишковому тракті, а також продукти, що підлягають екскреції.

Біохімічний аналіз крові кращий спосіб виявлення всіляких захворювань або порушень в організмі людини. Світові виробники медичного обладнання пропонують високоякісну і надійну продукцію, що дозволяє забезпечити оперативне отримання абсолютно точних результатів аналізу.

На сучасному етапі для проведення біохімічного аналізу крові використовується **автоматичний біохімічний аналізатор**, що дозволяє проводити всі дослідження в повністю автоматичному режимі.



Сучасний автоматичний біохімічний аналізатор являє собою досконалий пристрій, що дозволяє забезпечити проведення величезної кількості реакцій, аналізів і досліджень, з можливістю здійснення великого обсягу досліджень одночасно.

Фотоколориметри - прилади, призначені для визначення кількості пофарбованої речовини шляхом вимірювання величин поглинання і пропускання у видимій частині електромагнітного спектру.



Спектрофотометри

Основна відмінність спектрофотометру від фотоколориметра полягає в можливості пропустити через досліджуваний зразок світловий потік будь-якої необхідної довжини хвилі, проводити фотометричні вимірювання, скануючи (переглядаючи) весь діапазон довжин хвиль не тільки видимого (VIS) світла - від 380 до 750 нм, але і ближнього ультрафіолету (UV) - від 200 до 380 нм.



Рефрактометри

Рефрактометр призначений для вимірювання показника заломлення і середньої дисперсії неагресивних рідин і твердих тіл. Принцип дії рефрактометра заснований на явищі повного внутрішнього відображення при проходженні світлом кордону розділу двох середовищ із різними показниками заломлення. Рефрактометр оснащений проточним вимірювальним осередком; можливе проведення вимірювань у широкому температурному інтервалі від 10 до 40 ° C; вбудований термометр дозволяє контролювати температуру з точністю до 1.0 ° C. Пристосований для роботи, як в прямому, так і у відбитому світлі (тобто для дослідження прозорих і каламутних середовищ, відповідно).

Рефрактометр може застосовуватися:

1) У харчовій промисловості:

- Для контролю якості пива, вин, коньяків, горілок і лікерів;
- Для визначення масової частки розчинних сухих речовин в продуктах переробки плодів і овочів, в напоях, сиропах, консервах;
- Для вимірювання процентного вмісту жиру у твердих продуктах харчування;
- При визначенні вологості меду і т.д.

2) У медичних установах:

- Для визначення білка в сироватці крові за допомогою таблиці Рейса;
- Для визначення щільності сечі, субретинальної рідини ока;
- Для визначення концентрації ліків.

3) У фармацевтичній промисловості

- Для дослідження концентрації розчинів різних лікарських препаратів.



Методи визначення загального білка в сироватці крові засновані на різних принципах.

Азотометричні - на визначенні азоту, що міститься у білку (перший такий метод запропонований у 1883 р.). Вагові (гравіметричні) - на висушуванні білків до постійної маси і подальшому зважуванні на аналітичних вагах. Спектрофотометричні - на визначенні поглинання при 280 нм. Фотометричні - на вимірі забарвлених продуктів реакції. Рефрактометричні - на визначенні на рефрактометрі коефіцієнтів рефракції або заломлення світла. Найбільш поширені рефрактометричні і фотометричні (біуретовий) методи. Біуретовий реактив був запропонований в 1848 р. Але ця реакція для визначення загального білка в сироватці крові стала широко застосовуватися значно пізніше. У біуретовій реакції атом міді пов'язує атоми азоту білка з утворенням кольорових сполучень. Перші біуретові реактиви склалися з мідного купоросу і їдкою натру. Концентрація лугу може бути різною.

ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

Дослід № 1. Кількісне визначення білків за допомогою біуретового реактиву

ХІД РОБОТИ

Практичне значення роботи: Кількісні методи визначення білків використовуються при встановленні, наприклад, діагнозу багатьох захворювань шляхом проведення визначення концентрації білків у біологічних рідинах. Підвищення рівня концентрації білка до 120 г/л (гіперпротеїнемія) зустрічається рідко (наприклад, при деяких хронічних запальних процесах внаслідок утворення антитіл – поліартрит, ревматизм; при згущенні крові через значні втрати рідини). Зниження кількості білка (гіпопротеїнемія) спостерігається при недостатньому надходженні білків з їжею, при порушенні процесів біосинтезу білків в органах, при ураженні печінки.

Матеріали і реактиви. Робочий розчин біуретового реактиву, стандартний розчин альбуміну (1 мл стандартного розчину містить 0,1 г білка), фотоелектроколориметр, пробірки, піпетки, кювети з товщиною прошарку 1 см, міліметровий папір.

Хід роботи. До 5 мл робочого розчину біуретового реактиву додають, уникаючи утворення піни, 0,1 мл сироватки крові. Через 30 хв., саме пізніше через годину, пробу колориметрують на ФЕК в кюветі із шириною прошарку 10 мм при зеленому світлофільтрі (із максимумом пропускання 540 – 560 нм, краще 546 нм). Показники екстинції враховують у порівнянні з такими контрольної проби, що готують шляхом доливання до 5 мл робочого розчину біуретового реактиву 0,1 мл розчину хлориду натрію. Розрахунки ведуть за калібровочною кривою.



Для побудови каліброваного графіка в п'ять хімічних пробірок поміщають відповідно 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 мл розчину альбуміну, що містить 10 мг білка в 1 мл. Загальний об'єм у кожній пробірці доводять до 1 мл дистильованою водою і потім додають по 5 мл біуретового реактиву. Вміст пробірок перемішують і лишаяють на 30 хвилин, потім знімають показники екстинції. Після виміру отримані дані відкладають: на осі ординат величину оптичної щільності, а по осі абсцис – кількість білку, що відповідає цій величині. Потім визначають кількість білка в сироватці крові, також як і при одержанні каліброваної кривої. Концентрацію білка розраховують на 1 мл не розведеної сироватки.



Результат:

Оптична щільність розчину (екстинція) в п'яти пробірках відповідно склали: **0,07; 0,16; 0,24; 0,33; 0,37**. Концентрацію білка у розчині визначають за **калібрувальним графіком**, який потрібно побудувати. На осі абсцис (горизонтальної) позначають значення концентрацій, на осі ординат (вертикальній) – середні значення екстинцій, які відповідають взятим концентраціям білка. Через отримані точки проводять пряму лінію.

В двох дослідних пробах плазми крові екстинції склали **0,18** та **0,28**.

Визначити за калібрувальним графіком концентрацію білка у даних пробах.

Результати внести у таблицю

№ пробірки	Концентрація білка, г/л	Оптична щільність розчину
1	20	
2	40	
3	60	
4	80	
5	100	
Плазма 1		
Плазма 2		

В кінці роботи зробити **висновок**.

Дослід № 2. Визначення кількості загального білка у сироватці крові за допомогою рефрактометра

Принцип. В основу рефрактометричних методів аналізу покладено визначення показника (коефіцієнта) заломлення досліджуваної речовини - відношення синуса кута падіння променя світла до синуса кута його заломлення. У сироватці крові величина рефракції в першу чергу залежить від кількості білків.

Реактиви: плазма крові, етиловий спирт.

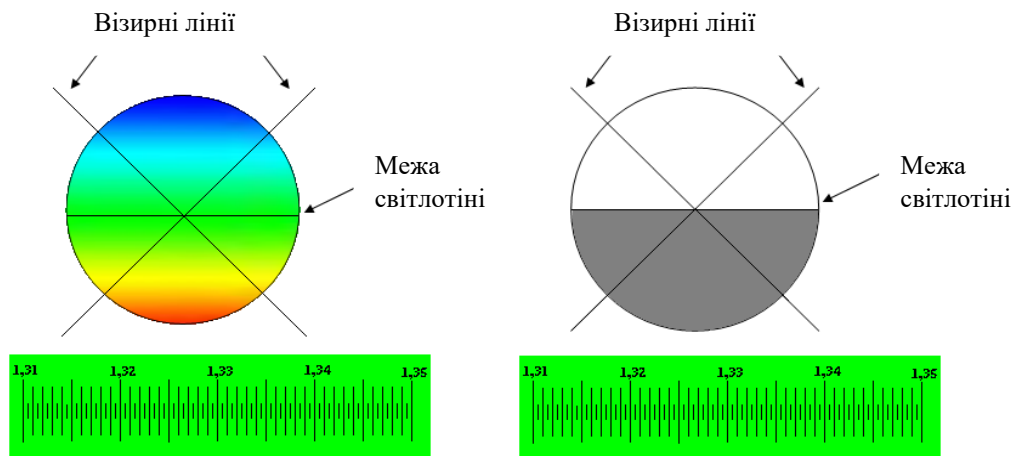
Устаткування: рефрактометр ИРФ-4546.

Хід визначення. Встановлюють прилад на нуль по дистильованій воді при температурі 20 ° С. Попередньо верхню і нижню камери протирають марлевою серветкою, змоченою спиртом і насухо - ватним тампоном. Поверхня призми при установці приладу на нуль і дослідженні зразка сироватки крові повинна бути чистою і сухою, від цього багато в чому залежить результат аналізу.

Перевірка нульової точки. На поверхню вимірювальної призми нанести 2-3 краплі дистильованої води, обережно закрити освітлювальною призмою. Відкрити освітлювальне віконце і встановити в напрямку найбільшої інтенсивності джерела світла за допомогою дзеркала. При правильній освітленості в окулярі повинне бути видно яскраве поле зору з виразною шкалою.

Обертаючи ручку переміщення шкали, розташовану з лівого боку приладу, домагаються появи в поле зору межі світлого і темного полів. Поєднують межу розділу з перехрестям штрихів в окулярі і знімають відлік по всій шкалі показників заломлення з точністю до четвертого знака.

Вертикальна лінія в нижньому віконце окуляра вказує результат вимірювання. Якщо рефрактометр справний і налаштований правильно, то для дистильованої води повинно вийти значення $n = 1,3333$ (при 20 ° С). Поверхню призми насухо витирають м'якою марлевою серветкою і ватним тампоном.



Приступають до дослідження зразків крові. Автоматичною або звичайною піпеткою наносять на нижню призму 0,1 мл (2 краплі) сироватки крові і щільно закривають камеру. Дзеркалом направляють світло в вікно камери і повертають гвинт до тих пір, поки межа світлотіні не досягне перетину двох візорних ліній. За шкалою в нижньому віконце окуляра виробляють відлік коефіцієнта заломлення розчину. Відлік за шкалою виробляють до тисячних часток, десятитисячні оцінюють на око.

Через окуляр за шкалою відліку показника заломлення двічі відраховують показник заломлення. Обчислюють середнє показання. Марлевою серветкою видаляють з поверхні призми сироватку, протирають по черзі ватними тампонами, сухим і змоченим спиртом до чистого сухого стану. У разі використання скляної палички її після кожного зразка сироватки крові промивають і висушують марлею. Досліджують наступну пробу.

Показник заломлення прозорих середовищ необхідно вимірювати в світлі, коли воно проходить через відкрите вікно освітлювальної призми, при цьому вікно вимірювальної призми закрито дзеркалом.

Показник заломлення забарвлених і каламутних проб слід вимірювати в відбитому світлі. Для цього слід закрити заслінку на вимірювальній призмі і відкрити дзеркало на освітлювальній, завдяки чому світло буде в напрямку вимірювальної призми. При цьому темне і світле поля міняються місцями.

При рефрактометричних ізметреніях відзначають температуру. Якщо вона відрізняється від 20 ° С, то в подальшому при розрахунку концентрація досліджуваного розчину необхідно буде внести температурну поправку.

Після кожного визначення необхідно обидві камери промити водою і витерти насухо фільтрувальним папером або серветкою, між камерами закласти прокладку з тонкого шару марлі чи вати.

Розрахунок. Вміст білка (г / л) визначають за таблицею з урахуванням величини показника заломлення рефрактометра. Якщо температура в камері під час дослідження не відповідає 20 ° С, то вводять поправку 0,0001 на кожен градус: в разі низької температури поправку віднімають, при більш високій - додають.

Таблиця. Обчислення загального білка в сироватці крові за показником заломлення

Показник заломлення	Білок,г/л	Показник заломлення	Білок,г/л	Показник заломлення	Білок,г/л
1,3431	41,6	1,3492	76,8	1,3532	99,9
1,3435	43,8	1,3493	77,3	1,3533	100,5
1,3439	46,0	1,3494	77,9	1,3534	101,0
1,3443	48,1	1,3495	78,3	1,3535	101,7
1,3446	50,3	1,3496	79,1	1,3536	102,3
1,3450	52,5	1,3497	79,6	1,3537	102,8
1,3454	54,7	1,3498	80,2	1,3538	103,3
1,3458	56,8	1,3499	80,8	1,3539	103,9
1,3460	59,2	1,3500	81,4	1,3540	104,4
1,3461	59,7	1,3501	82,0	1,3541	104,9
1,3462	60,2	1,3502	82,6	1,3542	105,4
1,3463	60,7	1,3503	83,3	1,3543	106,0
1,3464	61,2	1,3504	83,8	1,3544	106,4

1,3465	61,8	1,3505	84,4	1,3545	107,8
1,3466	62,3	1,3506	84,9	1,3546	107,5
1,3467	62,9	1,3507	85,5	1,3547	108,0
1,3468	63,4	1,3508	86,1	1,3548	108,6
1,3469	64,0	1,3509	86,7	1,3549	109,2
1,3470	64,5	1,3510	87,3	1,3550	109,8
1,3471	65,0	1,3511	88,0	1,3551	110,4
1,3472	65,5	1,3512	88,6	1,3552	110,9
1,3473	66,0	1,3513	89,2	1,3553	111,5
1,3474	66,5	1,3514	89,7	1,3554	112,1
1,3475	67,1	1,3515	90,3	1,3555	112,6
1,3476	67,7	1,3516	90,8	1,3556	113,2
1,3477	68,2	1,3517	91,4	1,3557	113,7
1,3478	68,8	1,3518	92,0	1,3558	114,2
1,3479	69,3	1,3519	92,6	1,3559	114,7
1,3480	70,4	1,3520	93,2	1,3560	115,2
1,3481	71,0	1,3521	94,0	1,3561	115,7
1,3482	71,5	1,3522	94,6	1,3562	116,2
1,3483	72,0	1,3523	95,1	1,3563	116,7
1,3484	72,5	1,3524	95,7	1,3564	117,1
1,3485	73,1	1,3525	96,3	1,3565	117,7
1,3486	73,6	1,3526	96,8	1,3566	118,2

1,3487	74,2	1,3527	97,3	1,3567	118,7
1,3488	74,8	1,3528	97,8	1,3568	119,3
1,3489	75,4	1,3529	98,4	1,3569	119,8
1,3490	75,9	1,3530	98,9	1,3570	120,4
1,3491	76,3	1,3531	99,4	1,3571	121,0

Примітка.

Рефрактометричний метод дає помилку у випадках використання сироватки зі слідами гемолізу, що містить багато ліпідів, білірубину, а також цукру і сечовини. Недостатнє промивання лінз між аналізами призводить до контамінації останніх і завищення результатів.

Рефрактометричний і біуретовий методи за точністю можна порівняти між собою. Біуретова реакція добре відтворюється, проте необхідно використовувати реактиви ч. д. А. або х. ч. Суворо дотримуватися правил їх приготування і зберігання, пред'являти суворі вимоги до наборів реактивів заводського виготовлення, використовувати кип'ячену дистильовану воду.

Показник заломлення у трьох пробах досліджуваних осіб склав: **1,3553, 1,3439 та 1,3497**. Обчислити загальний білка в сироватці крові за показником заломлення.

В кінці роботи зробити **висновок**.

Ознайомитися з відеоматеріалом:

1. <https://www.youtube.com/watch?v=TxJuUNLJMJ4>
2. <https://www.youtube.com/watch?v=Yw7Crr6FxXI>