

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ № 9

ТЕМА: ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ ЗАГАЛЬНОГО БІЛКА У ПЛАЗМІ КРОВІ ЗА ДОПОМОГОЮ ФОТОКОЛОРИМЕТРА

Мета: за допомогою фотоколориметра навчитися визначати кількість загального білка у плазмі крові.

Значення теми:

Плазма крові є водним розчином електролітів, поживних речовин, метаболітів, білків, вітамінів, слідів елементів і сигнальних речовин. Біохімічний аналіз крові кращий спосіб виявлення всіляких захворювань або порушень в організмі людини.

Знати:

- речовини крові;
- обладнання для проведення біохімічного аналізу крові.

Вміти:

- працювати на фотоколориметрі;
- визначати за допомогою фотоколориметру вміст речовин;

□ **Запитання для обговорення:**

1. Загальна характеристика речовин крові
2. Білки крові, їх функції, патологічні стани.
3. Ферменти крові.
4. Глюкоза в крові: норма, патологічні стани.

Короткий зміст теми

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 використовуються: автоматичні біохімічні аналізатори, фотоколориметри, спектрофотометри, рефрактометри.

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



Дослід. Кількісне визначення білків за допомогою біуретового реактиву

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 калібрувальною 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 лишають 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.

В кінці роботи зробити **висновок**.

ЛАБОРАТОРНЕ ЗАНЯТТЯ № 10

ТЕМА: ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ ЗАГАЛЬНОГО БІЛКА У СИРОВАТЦІ КРОВІ ЗА ДОПОМОГОЮ РЕФРАКТОМЕТРА

Мета: за допомогою рефрактометра навчитися визначати кількість загального білка у сироватці крові

Значення теми:

Рефрактометр призначений для вимірювання показника заломлення і середньої дисперсії неагресивних рідин і твердих тіл.

Знати:

- речовини крові;
- обладнання для проведення біохімічного аналізу крові.

Вміти:

- працювати на рефрактометрі;
- визначати за допомогою рефрактометру вміст речовин.

□ Запитання для обговорення:

1. Білірубін крові і. Фізіологічна і патологічна жовтяниця.
2. Низькомолекулярні азотисті речовини
3. Показники ліпідного обміну: холестерин, тригліцериди, ЛПНЩ, ЛПВЩ
4. Мінеральні складові частини крові

Короткий зміст теми

Рефрактометри

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 ° С; вбудований термометр дозволяє контролювати температуру з точністю до 1.0 ° С. 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:

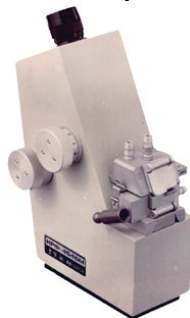
- для контролю якості пива, вин, коньяків, горілок і лікерів;
- для визначення масової частки розчинних сухих речовин у продуктах переробки плодів і овочів, у напоях, сиропах, консервах;
- для вимірювання відсоткового вмісту жиру у твердих продуктах харчування;
- при визначенні вологості меду, тощо.

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.



Дослід. Визначення кількості загального білка у сироватці крові за допомогою рефрактометру

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 ІРФ-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 призм при установці приладу на нуль і дослідженні зразка сироватки крові повинна бути чистою і сухою, від цього багато в чому залежить результат аналізу.

Окуляр шкали коефіцієнтів заломлення ставлять в крайнє положення на себе. Опускають нижню половину камери, на призму наносять 1-2 краплі дистильованої води. Камеру закривають, окуляр шкали і окуляр зорової труби встановлюють на різкість. Дисперсію в окулярі зорової труби усувають обертанням гвинта лімба дисперсії.

Лінію окуляра шкали встановлюють на цифру 1,3330 (показник заломлення води) і в зоровій трубі спостерігають межу світлотіні по відношенню до точки перетину двох взаємно перпендикулярних ліній. Якщо межа світлотіні проходить через точку перетину ліній, то прилад встановлений на нуль. Якщо цього немає, то за допомогою ключа і маленького гвинта на корпусі зорової труби ставлять кордон світлотіні на точку перетину ліній. Поверхню призм насухо витирають м'якою марлевою серветкою і ватним тампоном.

Пристають 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. Через окуляр за шкалою відліку показника заломлення двічі відраховують показник заломлення. Обчислюють середнє показання. Марлевою серветкою видаляють з поверхні призм 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.

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	Білок,г/л	Показник	Білок,г/л	Показник	Білок,г/л
----------	-----------	----------	-----------	----------	-----------

заломлення		заломлення		заломлення	
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, білірубіну, а також цукру і сечовини. Недостатнє промивання лінз між аналізами призводить до контамінації останніх і завищення результатів.

В кінці роботи зробити **висновок**.