

Определение метгемоглобина в крови

Принцип метода определения метгемоглобина по Эвелин и Мэллой заключается в том, что в кислой среде при длине волны 630 нм метгемоглобин даёт характерную полосу поглощения света, а легко образуемый после добавления к нему цианида, гемоглобин цианид не имеет полосы поглощения в этом спектре, поэтому уменьшение оптической плотности пропорционально количеству метгемоглобина в исследуемом растворе.

Необходимы реактивы:

- **основной 2,0 М раствор фосфатного буфера с pH 6,8** (34,6 г KH_2PO_4 и 45,25 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ растворить в 200,0 мл дистиллированной воде, подогретой до 60°C и после его охлаждения довести дистиллированной водой до метки в 250,0 мл. *Иногда раствор приходится фильтровать от муты*);
 - рабочий 0,1 М раствор фосфатного буфера готовят из основного, разводя его в 20 раз;
- **5,0% раствор красной кровяной соли** (к 500,0 мг $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ добавить 9,5 мл 0,25% раствор соды);
- **5,0% раствор цианида калия или натрия** (к 500,0 мг KCN или NaCN добавить 9,5 мл дистиллированной воды).

Все выше перечисленные растворы могут долго храниться в холодильнике.

Необходимая аппаратура:

- спектрофотометр;
- центрифуга.

Ход определения

I. К 3,0 мл дистиллированной воды в центрифужной пробирке внести 0,1 мл крови, перемешать и оставить на 30 минут, а затем добавить 2,0 мл рабочего раствора фосфатного буфера и центрифугировать при 6000 оборотов в течение 15 минут (*или при 3000 оборотов в течение 30 минут*). Из полученного раствора отобрать по 2,0 мл в две пробирки (A_1 и B_1). Содержимое первой пробирки **сразу же** фотометрируют при длине волны 630 нм против контрольной пробы из дистиллированной воды и определяют общее содержание метгемоглобина в крови (A_1).

II. Во вторую пробирку (B_1) внести 20 мкл (*одна капля*) раствора красной кровяной соли (*или 5 мг*) и через 20 минут определить оптическую плотность при той же длине волны. В присутствии гексацианоферрата калия (III) весь гемоглобин окисляется в метгемоглобин.

III. Затем в каждую пробирку исследуемой пробы внести 20,0 мкл раствора цианида, перемешать и через 10 минут опять определить оптическую плотность, то есть A_2 и B_2 (*если первое и второе измерение оптической плотности A_1 и A_2 даёт одинаковую величину, то это означает, что метгемоглобина в крови нет*).

Расчёт Содержание метгемоглобина рассчитывают по формуле:
$$\frac{A_1 - A_2}{B_1 - B_2} \times 100\%$$