

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСФСР

**МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ,
ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ПРИ ДИСПАНСЕРИЗАЦИИ РАБОЧИХ
С ВРЕДНЫМИ УСЛОВИЯМИ ТРУДА**

Методические рекомендации

**ЛЕНИНГРАД
1980**

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РСФСР

ЛЕНИНГРАДСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ГИГИЕНЫ ТРУДА И ПРОФЕССИОНАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

«СОГЛАСОВАНО»

Начальник Главного управления
НИИ и координации научных ис-
следований

Б. Т. Величковский

14 сентября 1979 г.

«УТВЕРЖДАЮ»

Заместитель министра здравоохранения РСФСР

Н. Т. Трубилин

20 февраля 1980 г.

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ,
ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ
ПРИ ДИСПАНСЕРИЗАЦИИ РАБОЧИХ
С ВРЕДНЫМИ УСЛОВИЯМИ ТРУДА

Методические рекомендации

ЛЕНИНГРАД
1980

В рекомендациях собраны хорошо зарекомендовавшие себя в практике методы гематологического и биохимического исследования с данными для оценки их результатов, необходимые при проведении предварительных, при поступлении на работу и периодических медицинских осмотров рабочих с вредными условиями труда.

Методические рекомендации разработаны
Н. В. Ревновой и Л. Э. Горном

ВВЕДЕНИЕ

Описание методов лабораторных исследований лиц, подлежащих периодическим медицинским осмотрам и наблюдению профпатологов, рассеяны по ряду руководств, монографий, журналов и поэтому пользование ими в практике лабораторных работников периферических поликлиник и медсанчастей затруднено. Вместе с тем, нужда хотя бы в краткой сводке таких методов велика. В методических рекомендациях приводится описание наиболее употребительных, опробованных методик, часть из которых разработаны или модифицированы в лаборатории Ленинградского НИИ гигиены труда и профессиональных заболеваний, другие заимствованы из различных источников и хорошо зарекомендовали себя в практике нашей и других лабораторий. Опыт показал, что чувствительность, точность, и воспроизводимость рекомендуемых методов достаточна для решения большинства вопросов, возникающих в повседневной практике профпатологов.

* *
*

При решении вопросов диагностики профессиональных болезней, помимо общих, применяется ряд специальных гематологических и биохимических анализов.

Поскольку признаки поражения системы крови встречаются в практике весьма часто, а при хронических отравлениях бензолом, веществами бензольного ряда, свинцом, гемическими ядами и при воздействии ряда факторов физической природы могут являться ведущими симптомами заболевания, гематологическое исследование имеет важное значение.

Проявления токсических поражений системы крови имеют ряд особенностей, связанных с характером, структурой и степенью воздействия этиологического фактора. Однако в ряде случаев можно наблюдать однотипные изменения при воздействии различных токсических веществ и, наоборот, значи-

тельную вариабельность их при действии одного и того же фактора.

В связи с большой лабильностью и реактивностью системы крови при проведении исследований необходимо учитывать условия, которые могут повлиять на результаты. Рекомендуется проводить все исследования утром натощак, т. к. известно, что в течение суток возможны колебания показателей морфологического и биохимического состава крови, часть из которых связана с приемами пищи.

При оценке результатов исследования крови следует использовать сопоставление с «нормой», выработанной на основании обследования контингентов здоровых людей. Оценку степени отклонений показателей отдельных лиц проводят в сопоставлении с величинами, ограниченными интервалом $\bar{x} \pm 1,5$ сигмы контрольной группы («Нормы»). Для выяснения общей направленности изменений крови в группе обследуемых рабочих следует сопоставлять средние величины изучаемых показателей обследуемой и контрольной группы.

Важным условием совершенствования практики лабораторных исследований, обеспечивающими возможность сопоставления результатов повторных осмотров и данных, полученных разными лабораториями, является использование унифицированных методик.

Обследование больших контингентов рабочих требует повышения производительности труда работников лабораторий за счет внедрения автоматических и полуавтоматических приборов и устройств. Для ускорения подсчета форменных элементов крови хорошо зарекомендовали себя ФЭК-М или ФЭКН-57, целлоскопы и другие счетчики. При систематической торировке (не реже 1 раза в 2—3 месяца) хорошо воспроизводимые результаты дают и эритрогемометры. Пробирочный метод счета форменных элементов крови, по Н.М. Николаеву, также значительно сокращает затраты времени на исследования.

ТРОМБОЦИТЫ

Тромбоциты принимают непосредственное участие во всех звеньях процесса свертывания крови от механической защиты и образования первичного тромба на месте повреждения сосудистой стенки до выделения при их распаде прокоагулянтов, ретрактивных веществ и участия в процессах регулирования тонуса и проницаемости сосудов. Значительное

снижение количества тромбоцитов имеет самостоятельное значение в происхождении некоторых форм геморрагических диатезов. Однако, явления кровоточивости могут возникать и при нормальном или повышенном количестве тромбоцитов, вследствие нарушения их функционального состояния.

Среди известных методов подсчета тромбоцитов принципиально различаются две группы: подсчет в мазках (метод Фонио) и подсчет в камере Горяева. В связи с распространением автоматических счетчиков форменных элементов крови определенное значение приобрел метод подсчета тромбоцитов при помощи приборов типа «Целлоскоп» и других. Величина погрешности при использовании большинства общепринятых методов велика и составляет 20—30% (О. Н. Пиксанов и В. П. Щенникова). Более точными и воспроизводимыми являются «камерные» методы; при автоматическом подсчете эритроцитов более удобным является метод Фонио.

Подсчет тромбоцитов по Фонио

Реактивы. Стерильный раствор сульфата магния 14%. Фиксаторы Лейшмана или Май-Грюнвальд; краситель Романовского-Гимза.

Приготовление препарата. На проколотую и насухо вытертую кожу пальца наносят каплю раствора сульфата магния, смешивают с ней каплю крови из пальца, из смеси готовят мазки, высушивают и окрашивают по Паппенгейму.

Подсчет тромбоцитов. В окрашенной мазке сосчитывают 1000 эритроцитов и все встретившиеся при этом тромбоциты. Таким образом получают относительное число, выражаемое ‰ (промилле). Для вычисления абсолютного количества тромбоцитов эту величину следует умножить на количество эритроцитов в 1 мкл и разделить на 1000. Пример: в мазках найдено 64‰ тромбоцитов; количество эритроцитов у пациента составляет $3,5 \cdot 10^6$ в 1 мкл; отсюда число тромбоцитов в 1 мкл будет равно $\frac{64 \times 3,5 \cdot 10^6}{1000} = 224 \cdot 10^3$ в 1 мкл.

Подсчет тромбоцитов в камере (модификация И. И. Данилина)

Реактивы. 3,5% раствор цитрата натрия. Фурациллин. Разводящая жидкость готовится из расчета 0,025 г фурацил-

лина на 100 мл 3,5% раствора цитрата натрия. Введение фурациллина позволяет готовить разводящую жидкость на длительный время: 1—2 месяца, при условии хранения в холодильнике.

Подсчет тромбоцитов. Кровь из пальца набирают в эритроцитарный меланжер до метки 0,5, разводящую жидкость — цитратно-фурациллиновую смесь — до метки 101. Подсчет ведется в 5 или 10 средних квадратах камеры Горяева, аналогично подсчету эритроцитов. Результат в абсолютных цифрах получают умножением числа тромбоцитов, найденных в камере, на 10 000 или 5000.

Норма. Количество тромбоцитов у здоровых людей колеблется от $180 \cdot 10^3$ до $320 \cdot 10^3$ в 1 мкл.

РЕТИКУЛОЦИТЫ

Ретикулоциты, молодые эритроциты, в которых при су-правитальной окраске выявляется базофильное сетчато-нитчатое вещество. Повышенное количество ретикулоцитов свидетельствует, как правило, о повышенной активности эритропоэза и ускорении его темпов. Ретикулоцитоз является симптомом большинства анемий (железодефицитной, острой постгеморрагической, гемолитической). Снижение числа ретикулоцитов может указывать на недостаточную регенераторную способность кровотока. Это относится к гипо-апластическим состояниям различного, в том числе, профессионального происхождения (бензолная интоксикация, хроническая лучевая болезнь), а также к анемиям, связанным с дефицитом фактора «В₁₂ — фолиевая кислота», до начала патогенетического лечения. Клиническая оценка количества ретикулоцитов должна быть сугубо индивидуальной. В случаях, когда переходящий ретикулоцитоз предшествует повышению количества эритроцитов, он является положительным прогностическим признаком. Нарастание числа ретикулоцитов при гемолитической анемии свидетельствует об усилении гемолиза и тем самым отражает нарастание тяжести основного заболевания.

Ретикулоцитоз является одним из постоянных признаков хронической интоксикации свинцом.

Подсчет ретикулоцитов

Реактивы. Насыщенный раствор красителя блестящего крезилового синего или Азур-II на 0,9% растворе хлорида

натрия (1 г красителя на 100 мл раствора NaCl). Растворение идет медленно, в тепле; к употреблению краситель готов не ранее, чем через сутки после приготовления.

Приготовление препарата. Капилляром Панченкова в небольшую пробирку вносят 15 мм красителя и 20—25 мм крови из пальца, перемешивают и оставляют на 30 мин при комнатной температуре (время инкубации можно увеличить до 2-х часов). Из смеси готовят мазки на обезжиренных предметных стеклах.

Подсчет ретикулоцитов. Рекомендуется использовать суженное поле зрения, для чего в окуляр микроскопа вкладывают диафрагму из черной бумаги с окном 4×4 мм. Дополнительной окраски препараты не требуют. После обнаружения первого ретикулоцита в мазке сосчитывают 1000 эритроцитов и все встретившиеся при этом ретикулоциты. Результат выражает в процентах или промилле.

Норма. У здоровых людей количество ретикулоцитов колеблется от 4 до 12‰.

ЭРИТРОЦИТЫ С БАЗОФИЛЬНОЙ ЗЕРНИСТОСТЬЮ

В отличие от включений, окрашиваемых суправитально в ретикулоцитах, в отдельных эритроцитах может обнаруживаться зернистость, выявляемая после фиксации мазка крови. Считают, что эта зернистость так же свойственна молодым эритроцитам, но в условиях патологии, поскольку она встречается при различных формах анемии. Большое количество базофильно-зернистых эритроцитов находят при хронической интоксикации свинцом и его неорганическими соединениями. При этом профессиональном заболевании оценка количественная базофильно-зернистых эритроцитов имеет диагностическое значение. Однако и при некоторых других интоксикациях (гемические яды, бензол, сероуглерод) базофильно-зернистые эритроциты могут обнаруживаться, хотя и реже, чем при са-турнизме.

Окраска эритроцитов с базофильной зернистостью

Реактивы. Этанол 96°. Основной раствор красителя: 1% водный раствор метиленового синего. Рабочий раствор готовят перед употреблением из основного (2 капли на 1 мл воды с нейтральной реакцией).

Подсчет эритроцитов с базофильной зернистостью в «темном поле»

Подсчет эритроцитов с базофильной зернистостью в проходящем свете (обычная микроскопия), широко используемый в практике, имеет ряд существенных недостатков, главные из которых его трудоемкость и связанная с ней низкая воспроизводимость и сходимость результатов. Значительные преимущества метода темного поля позволяют рекомендовать последний для использования в лабораториях, проводящих исследование крови у лиц, контактирующих со свинцом. Эффект темного поля достигается путем замены обычного конденсора на «темнопольный» (выпускается ЛОМО, ОИ-13); при этом необходимо иметь осветитель с ирисной диафрагмой (типа ОИ-19 или ОИ-31) и отдельный микроскоп. В иммерсионный объектив вкладывают конусную диафрагму, имеющуюся в комплекте ОИ-13. При работе с современными микроскопами (МБИ, БИОЛАМ) для достижения эффекта темного поля следует удалить винт-ограничитель, расположенный на кремальере конденсора (под предметным столиком). Необходимы тонкие предметные стекла для мазков (не более 1 мм в толщину).

Установку освещения следует производить по методу Келлера, который сводится к следующему:

1. Выбирают окуляр $7\times$ или $10\times$ и наименьший объектив $8\times$.
2. На верхнюю линзу конденсора (или на оборотную сторону предметного стекла с мазком) наносят каплю иммерсионного масла. Устанавливают предметное стекло на столик микроскопа.
3. Поднимают конденсор (ОИ-13) до соприкосновения с каплей масла.
4. При закрытой диафрагме осветителя, поставленного на 15—20 см от микроскопа, направляют пучок света на плоскую сторону зеркала так, чтобы на нем появилось изображение нити накала лампы осветителя. Передвигая патрон лампы по продольной оси, добиваются максимальной резкости этого изображения. Для контроля можно положить на зеркало белую или папиросную бумагу.
5. Под визуальным контролем движениями зеркала направляют изображение нити лампы на нижнее отверстие конденсора (наблюдать при помощи простого зеркала, положенного на подставку микроскопа).

6. Приоткрывают диафрагму осветителя. При этом в поле зрения появляется светлое кольцо.

7. Фокусируют тубус микроскопа на препарат; устанавливают освещенное кольцо в центр поля зрения (при помощи центрировочных винтов конденсора); движениями конденсора вверх — вниз добиваются появления в центре поля зрения светящегося пятна на месте кольца.

8. Наносят каплю иммерсионного масла на лицевую сторону препарата и переходят к наблюдению с иммерсионным объективом. При этом в поле зрения должны быть хорошо видны светящиеся контуры эритроцитов. Базофильная зернистость выглядит в виде светящихся зерен, покрывающих весь эритроцит и не выходящих за его пределы. Характер зерен от пылевидных до грубых оскольчатых.

Подсчет. После того как найден первый базофильно-зернистый эритроцит, просматривают 40 полей зрения и подсчитывают все встретившиеся эритроциты с базофильной зернистостью (считать все эритроциты не нужно). Ответ дается в количестве базофильно-зернистых эритроцитов на 10 000 (40 полей зрения по 250 эритроцитов в среднем) или в пересчете на миллион эритроцитов, для чего полученную цифру следует умножить на 100.

Норма и оценка результатов. У здоровых людей, не подвергающихся воздействию свинца и других токсических веществ, количество базофильно-зернистых эритроцитов не превышает 1000 на миллион. Для интоксикации свинцом характерны цифры 2000 и выше. При обнаружении базофильно-зернистых эритроцитов в количестве от 1000 до 1900 рекомендуется привлекать результаты повторных исследований и данные других лабораторных и клинических исследований.

ТЕЛЬЦА ГЕЙНЦА

Тельца Гейнца — округлые глыбкообразные образования в эритроцитах, расположенные обычно по краю и обнаруживаемые при суправитальной окраске интактных клеток или мазков крови метиловым фиолетовым, сульфатом нильского синего или блестящим крезильным синим. Образование телец Гейнца связано с глубокими дегенеративными изменениями в цитоплазме эритроцитов, повреждением молекулы гемоглобина и, в частности, денатурацией отщепившегося от них глобина; их наличие свидетельствует о глубоких функциональных нарушениях этих клеток. Обнаруживаются

тельца Гейнца при воздействии ряда веществ — метгемоглобинообразователей. Исчезновение этих телец, вместе с содержащими их эритроцитами, происходит через несколько дней после прекращения контакта с токсическим агентом.

Окраска телец Гейнца

Реактивы. 1 г метилового фиолетового (или другого из перечисленных выше красителей) растворяют в 100 мл 0,6% раствора натрия хлорида.

Приготовление препарата. К нанесенной на предметное стекло капле крови из пальца добавляют каплю красителя. Соединенные капли перемешивают, покрывают покровным стеклом и помещают во влажную камеру на 1—3 часа при комнатной температуре. Микроскопируют с иммерсионным объективом.

Норма и оценка результатов. В эритроцитах здоровых людей тельца Гейнца не встречаются. При интоксикациях метгемоглобинообразователями почти в каждом поле зрения и в каждом эритроците обнаруживается 1—3 тельца диаметром от 0,5 до 1,5 мкм.

ГЕМОГЛОБИН И ЕГО ПРОИЗВОДНЫЕ

Гемоглобин (Hb) — заключенный в эритроцитах дыхательный пигмент, обеспечивающий транспорт кислорода из легких в ткани и участвующий в переносе углекислоты из тканей в легкие. Hb является белком из группы хромопротеидов (металлопротеидов). Непременным условием нормального функционирования Hb является пребывание в его молекуле железа в двухвалентной форме (Fe^{++}). Все производные Hb обладают характерными спектрами поглощения, измерение которых лежит в основе количественного определения их соотношений.

Основной особенностью Hb является способность образовывать рыхлое, легко диссоциирующее соединение с кислородом, т. е. переходить в оксигенированное состояние — оксигемоглобин (HbO_2).

Карбоксигемоглобин ($COHb$). Помимо кислорода, гемоглобин способен связывать ряд других газов и соединений, из которых в клинической токсикологии наибольшее значение имеет окись углерода (угарный газ, CO). Образующееся при этом соединение — карбоксигемоглобин — подчиняется тем же закономерностям образования и диссоциации,

что и оксигемоглобин. Различие состоит в скоростях указанных процессов и, в первую очередь, в скорости диссоциации. Результатом этого различия является более высокое сродство гемоглобина к окиси углерода, чем к кислороду (в 200—300 раз). Связанный с СО гемоглобин не может присоединять и транспортировать кислород, поэтому количество переносимого кровью кислорода уменьшается пропорционально карбоксигемоглобинемии. Развивается гипоксия. В присутствии СОHb затрудняется диссоциация и молекул оксигемоглобина. Этим свойством СОHb в значительной степени объясняется токсичность окиси углерода и эффективность кислородной терапии при отравлениях ею.

Определение содержания карбоксигемоглобина в крови (Л. Э. Горн)

Метод основан на фотометрическом определении разницы светопоглощения растворов HbO₂ и СОHb после денатурации их щелочью.

Оборудование и реактивы. Универсальный фотометр ФМ (или горизонтальный). Раствор аммиака 0,04%. Растворы едкого калия и натрия 0,2 н.

Определение. В две пробирки наливают по 4,9 и 5,9 мл 0,04% раствора аммиака, после чего в каждую из них вносят по 0,1 мл крови. В первую пробирку, предназначенную для определения светопоглощения исходной денатурированной крови, содержащей искомое количество СОHb и HbO₂, быстро добавляют 5 мл раствора щелочи, быстро перемешивают пробу двукратным опрокидыванием на пробку и фотометрируют через минуту после внесения щелочи (50—70 сек, не более!) при светофильтре № 5 (M-55 или M-52, эффективная длина волны пропускаемого света 550 или 520 мкм). Содержимое второй пробирки, в которой определяют общее количество гемоглобина, прямо фотометрируют при светофильтре № 6 (M-50, 496 мкм). Фотометрирование ведется по общепринятым правилам в кюветках 10 мм против дистиллированной воды.

При использовании светофильтра № 5 (M-55) содержание СОHb вычисляют по формуле:

$$\% \text{ СОHb} = 132 \frac{E_{\text{денатурированного HbO}_2 + \text{СОHb}}}{E_{\text{общего Hb}}} - 81;$$

Если светофильтр имеет марку M-52, а не M-55, то коэффициент 132 заменяется на 123.

Пример расчета. Среднее из пяти отсчетов значение величины E денатурированного $\text{HbO}_2 + \text{COHb}$ равно 0,46: E общего $\text{Hb} = 0,70$; $\% \text{COHb} = \frac{132 \times 0,46}{0,70} - 81 = 132 \times 0,66 - 81 = 6\%$.

Методические замечания. Предлагаемый метод сравнительно прост, быстр и не нуждается в использовании дефицитных приборов. При хранении проб в темноте, в закрытых пробирках, фотометрирование без ущерба для точности результата может быть проведено через несколько часов после взятия крови. Приведенная формула применима только при фотометрировании на указанных приборах. Использование фотоэлектроколориметров из-за широкополосности находящихся в них светофильтров, не рекомендуется, т. к. чувствительность метода при этом падает в 2—3 раза, а ошибка определения соответственно возрастает. Определение COHb может проводиться так же по одному из вариантов спектрофотометрического метода.

Норма и оценка результатов. В крови лиц, профессионально не соприкасающихся с окисью углерода, некоторое количество COHb в крови присутствует и обусловлено практически постоянным загрязнением атмосферы продуктами неполного сгорания всех видов топлива. По данным ЛНИИ гигиены труда и профессиональных заболеваний, угородских жителей, не связанных с воздействием CO на производстве, в крови содержится 2—15%, а по указаниям П. А. Розенберг и Н. П. Бялко — 0—12% COHb . Средняя концентрация COHb в крови колеблется, по различным данным, от 2—4 до 6—8%. Источником для образования COHb является не только экзогенная окись углерода, но и, в какой-то степени, окись углерода, образующаяся в результате неполного окисления ряда продуктов обмена в организме, в частности, самого гемоглобина.

Установлено, что легкой форме острой интоксикации окисью углерода соответствует в среднем 20%, средней — 30% и тяжелой — 35—50% COHb . Отравление, при котором содержание COHb превышает 50%, заканчивается обычно смертью.

При вынесении пострадавшего в чистую атмосферу и при вдыхании кислорода диссоциация COHb протекает сравнительно быстро (за первый час концентрация COHb уменьшается вдвое), поэтому результаты лабораторного исследования крови, взятой после оказания пострадавшему первой

помощи, могут дать искаженное представление о начальной максимальной концентрации СОНЬ, и тем самым — клинической тяжести интоксикации. В связи с этим необходимо максимально сокращать интервал между оказанием первой помощи и взятием крови для определения СОНЬ.

При хронической интоксикации окисью углерода скорость диссоциации СОНЬ в крови значительно уменьшается.

Метгемоглобин (гемиглобин, МтНЬ). При воздействии на организм окислителей как неорганических (перекиси, нитриты, марганцевокислый калий, бертолетова соль и др.), так и некоторых органических веществ (нитро- и аминопроизводные бензола, анилин и его производные и др.) происходит истинное окисление входящих в молекулу гемоглобина атомов железа ($Fe^{++} \rightarrow Fe^{+++}$). В результате образуется метгемоглобин, неспособный легко отщеплять кислород, т. е. участвовать в его транспорте. Помимо прямого выключения части гемоглобина из функционирования, метгемоглобин ведет к ухудшению отдачи кислорода остальной, заблокированной частью гемоглобина. Следствием этого процесса является гипоксия, пропорциональная содержанию метгемоглобина. Тяжесть интоксикации тем выше, чем меньше исходное содержание общего гемоглобина в крови.

При отравлениях метгемоглобинообразователями, в связи с наличием в организме ряда ферментных и неферментных систем, происходит спонтанное восстановление гемоглобина. Оно осуществляется в присутствии глюкозы, глутатиона, молочной пировиноградной и аскорбиновой кислот, ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, метгемоглобинредуктазы и др. Непрерывное функционирование этой системы объясняется тем, что из кишечника и тканей в кровотоки постоянно поступают различные продукты обмена, способные вызывать образование МтНЬ. Не менее существенно прямое окисляющее действие самого кислорода. При выпадении какого-либо из звеньев восстанавливающей системы (эссенциальная метгемоглобинемия) в крови в остальном вполне здоровых людей может присутствовать МтНЬ в количестве до 40%. Другой, так же редко встречающейся причиной метгемоглобинемии является наличие в крови гемоглобина М.

Определение в крови содержания метгемоглобина (Л. Э. Горн)

Метод основан на фотометрическом определении разницы светопоглощения растворов окси- и метгемоглобина.

Оборудование и реактивы. Универсальный фотометр ФМ или горизонтальный фотометр. Раствор аммиака 0,04%. Свежеприготовленный насыщенный раствор красной кровяной соли.

Определение. В две пробирки наливают по 3,5 и 7,3 мл раствора аммиака и в каждую из них вносят по 0,2 мл крови. Во вторую пробирку, предназначенную для определения общего гемоглобина, добавляют одну каплю раствора красной кровяной соли (перевод всего гемоглобина в метгемоглобин), и оставляют пробу на 1 час для завершения реакции. Через час фотометрируют обе пробы в кюветах 10 мм против дистиллированной воды при светофильтре № 3 (М-61, эффективная длина волны 619 мкм). Содержание метгемоглобина вычисляют по формуле:

$$\% \text{ МНв} = 59 \frac{E \text{ исследуемого НвО}_2 + \text{МтНв}}{E \text{ общего Нв}} - 18;$$

Пример расчета: среднее из пяти отсчетов значение E исследуемой пробы ($\text{НвО}_2 + \text{МтНв}$) равно 0,30; E общего Нв = 0,70; отсюда $\% \text{ МНв} = 59 \frac{0,30}{0,70} - 18 = 7\%$.

Методические замечания. Предлагаемый метод прост, быстр, не требует дефицитных приборов и реактивов. Численные коэффициенты в расчетной формуле требуют периодической проверки и коррекции. Остальные указания см. «Карбоксигемоглобин».

Норма и оценка результатов. У здоровых людей содержание МтНв в крови не превышает 1—3%. Легкая форма острого отравления метгемоглобинообразователями сопровождается повышением содержания МтНв в крови до 20%; средняя — до 30—35%; тяжелая — до 50%. Перевод 50—60% общего гемоглобина в метгемоглобин ведет, как правило, к смертельному исходу.

УРОБИЛИН

Уробилин — продукт самоокисления бесцветного пигмента уробилиногена, содержащегося в свежевыпущенной моче, является вторично всосавшимся в кровоток билирубином. Уробилин обладает специфическим спектром поглощения и характерной зеленой флуоресценцией в ультрафиолетовом свете. Последнее лежит в основе методов его определения.

Оборудование. «Люминесцентная установка для определения витаминов в моче» или ЛЮМ-1, ЛЮМ-2, «Ультра-свет», или любой другой источник ультрафиолетового излучения.

Определение. Пробирку, содержащую 5—6 мл профильтрованной мочи, облучают ультрафиолетом в затемненном помещении. При нормальном содержании уробилина свечение мочи голубое (реакция отрицательная). При повышенном содержании уробилина появляется зеленая флуоресценция различной интенсивности. Различают слаболожительную реакцию при бледно-зеленой флуоресценции (+); положительную реакцию при хорошо выраженной флуоресценции (++) и резкоположительную реакцию при интенсивной флуоресценции зеленого цвета (+++).

Методические замечания. Предлагаемый полуколичественный метод прост и быстр. Как правило, другие компоненты мочи не мешают определению. Для ориентировочной оценки результаты полуколичественного определения вполне достаточны. Для точного количественного определения может быть использован спектрофотометрический метод.

Норма и оценка результатов. За сутки здоровый человек выводит с мочой 3—6 мг уробилина (уробилиногена). Выведение больших количеств свидетельствует о недостаточности печени (частичной потере способности печеночных клеток извлекать этот пигмент из крови воротной вены). При некоторых интоксикациях (ртутью, марганцем, мышьяком, фосфором, кадмием, фтором, галогенозамещенными углеводородами жирного ряда — нафталинами, фенолом, хлоропреном) содержание уробилина в моче повышается, что при сопоставлении с результатами других функциональных проб печени позволяет судить о характере и степени ее поражения.

ГЕМАТОПОРФИРИН

Гематопорфирин — смесь пигментов, не содержащих железа предшественников гемоглобина в процессе его синтеза. Основным компонентом гематопорфирина является копропорфирин II. Растворы гематопорфирина обладают специфическим спектром поглощения и характерной красной флуоресценцией в ультрафиолетовом свете, что лежит в основе методов его определения.

Полуколичественное определение гематопорфирина в моче (Г. Ф. Океанова, Г. М. Федоров)

Определение основано на визуальной оценке цвета и интенсивности флуоресценции при облучении гематопорфирина, содержащегося в моче, ультрафиолетовым светом.

Оборудование и реактивы. Любой источник ультрафиолетового излучения (см. «Уробилин»), снабженный фильтром Вуда (светофильтры УФС-2 или УФС-3). Уксусная кислота, 6 н. раствор; перекись водорода, 3% раствор (не стоек); эфир наркотный.

Определение. К 10 мл свежесобранной мочи (или хранившейся в темноте не более 8—10 часов) в обычной пробирке добавляют 0,5 мл уксусной кислоты, 1—2 капли перекиси водорода и 1,5 мл эфира. Пробирку закрывают пробкой и встряхивают. Образовавшуюся пену освещают 2—3 минуты ультрафиолетовым светом. При отсутствии гематопорфирина пена бесцветна или окрашена в голубой цвет. В присутствии гематопорфирина пена приобретает различной интенсивности красную окраску.

Методические замечания. Предлагаемый метод прост и быстр. Для ориентировочной оценки получаемые результаты вполне достаточны. Для точного количественного определения содержания копропорфирина в моче может быть рекомендован спектрофотометрический метод (П. А. Розенберг, Н. К. Бялко).

Норма и оценка результатов. В норме за сутки с мочой выводится около 120 мкг гематопорфирина. Оценка его количества по цвету флуоресценции производится следующим образом: бледное розовое или фиолетово-розовое окрашивание пены говорит об отсутствии гематопорфирина или содержании его в пределах нормы. Развитие розовой, ярко-розовой, бледно-красной или ярко-красной флуоресценции свидетельствует о повышенном выведении гематопорфирина и выражается в системе баллов (соответственно: —, +, ++, +++, +++++) или словесно (реакция отрицательная, слабо положительная, положительная, резкоположительная).

При некоторых интоксикациях (ртутью, мышьяком, сульфаниламидами и, главным образом, свинцом) гематопорфирин выводится мочой в значительных количествах. Ценность определения гематопорфирина при диагностике сатурнизма и носительстве свинца весьма велика, так как повышение его количества встречается чаще, чем увеличение цир-

куляции свинца в крови и экскреции его с мочой. Однако прямого параллелизма между уровнем экскреции порфиринов и тяжестью интоксикации свинцом нет. При дифференциальной диагностике сатурнизма необходимо учитывать, что повышение количества порфиринов в моче может наблюдаться при тяжелых анемиях различной этиологии, при некоторых заболеваниях печени, авитаминозах и, в особенности, при эссенциальной порфирии — врожденном или приобретенном хроническом заболевании, одним из ведущих симптомов которого является нарушение синтеза гема.

ДЕЛЬТА-АМИНОЛЕВУЛИНОВАЯ КИСЛОТА

Дельта-аминолевулиновая кислота (АЛК) — один из промежуточных продуктов синтеза гема в эритроцитах, в норме практически не экскретируется с мочой. Особенностью токсического воздействия свинца является специфическое торможение образования гема на стадии АЛК, накопление и усиленное выведение ее с мочой.

Определение АЛК в моче

Метод основан на хроматографическом выделении АЛК из мочи на ионообменной смоле, последующей элюции и колориметрии образовавшегося после прибавления ацетил-ацетона и парадиметиламинобензальдегида окрашенного соединения.

Оборудование и реактивы. Хроматографические стеклянные колонки диаметром 7 и высотой 300 мм. Ионообменная смола ДАУЭКС 50×8 или КУ-2 (240—400 меш). Ацетат натрия, 0,5 М раствор. Едкий натр, 2 н. раствор. Соляная кислота 4,2 н. и 1 н. растворы. Уксусная кислота ледяная. Хлорная кислота 70% раствор. Ацетил-ацетон. Ацетатный буфер с рН 4,6: в литровую колбу вносят 136 мл натрия ацетата — $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 57 мл ледяной уксусной кислоты и доводят объем дистиллированной водой до метки. Реактив Эрлиха II: 0,3 г парадиметиламинобензальдегида растворяют в 9 мл ледяной уксусной кислоты, добавляют 2,4 мл 70% хлорной кислоты и доводят объем ледяной уксусной кислотой до 15 мл. Реактив неустойчив и годен к употреблению в течение 6 часов.

Подготовка хроматографической колонки. На дно колонок помещают небольшие ватные пробки. Зали-

вают в колонки взвесь ионообменной смолы через слой воды так, чтобы над ватной пробкой образовался слой смолы высотой 2—3 см. Поверхность смолы накрывают кружком фильтровальной бумаги и промывают колонку 25 мл дистиллированной воды.

Подготовка смолы. Смолу многократно взмучивают в дистиллированной воде. После осаждения крупных частиц надсадочную жидкость отсасывают или декантируют. Затем смолу заливают на 20 ч двойным объемом 2 н. раствора едкого натра, периодически встряхивая. Далее, смолу промывают дистиллированной водой до нейтральной реакции и обрабатывают последовательно одним объемом 4 н. и шестью объемами 2 н. раствора соляной кислоты. Хранят смолу в закрытом сосуде в 1 н. растворе соляной кислоты, при комнатной температуре.

Определение. Рекомендуется анализировать свежесобранную мочу. 1 мл мочи с рН 4—7 вносят в хроматографическую колонку и пропускают через нее со скоростью 5—6 капель в мин. Затем колонку отмывают от мочевины, пропуская через нее 40 мл дистиллированной воды и 3 мл 0,5 М раствора ацетата натрия с той же скоростью. Промывную жидкость выбрасывают. Далее под колонку подставляют центрифужную пробирку емкостью 10 мл и пропускают через колонку еще 7 мл раствора ацетата натрия и 1 мл ацетатного буфера с рН 4,6. В полученный элюат вносят 0,2 мл ацетил-ацетона и доводят объем до 10 мл ацетатным буфером. Параллельно готовят контрольную пробу, для чего в такую же пробирку вносят 7 мл ацетата натрия, 0,2 мл ацетил-ацетона и доводят объем смеси до 10 мл ацетатным буфером. Обе пробирки закрывают притертыми пробками, кипятят в водяной бане 10 мин и охлаждают под струей воды до комнатной температуры. По 2 мл жидкости из обеих пробирок переносят в другие пробирки и в каждую из них добавляют по 2 мл реактива Эрлиха II. В зависимости от концентрации АЛК в пробе раствор в пробирке, содержащей исследуемую мочу (элюат), приобретает желтую, желтовато-розовую, красную или темно-красную окраску.

Норма и оценка результатов. Наиболее простой способ оценки концентрации АЛК — визуальный. Два первых оттенка указывают на отсутствие АЛК в исследуемой моче или наличие ее в количествах, не превышающих норму. Наличие других окрасок указывает на повышенное выведение АЛК. Результат может быть выражен в системе баллов (0,

1, 2, 3 и 4) или словесно (содержание АЛК: «в пределах нормы», «незначительно повышено», «повышено», «значительно повышено»). Для точного количественного определения может быть рекомендован спектрофотометрический метод.

Повышенная экскреция АЛК является одним из наиболее ранних и достоверных лабораторных признаков сатурнизма. Частота обнаружения этого признака при токсическом воздействии свинца выше, чем частота повышенной экскреции гематопорфирина, свинца, циркуляции свинца в крови, а также базофильной зернистости эритроцитов. Особенно ценно определение АЛК в качестве экспозиционного теста при массовых медицинских осмотрах рабочих и при гигиенических исследованиях.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВИНЦА В МОЧЕ (Л. Э. Горн)

Метод основан на концентрировании свинца в результате его соосаждения с образующимся в анализируемой пробе мочи углекислым кальцием и нефело-колориметрическом определении в форме окрашенной коллоидной мути сульфида свинца.

Оборудование и реактивы. Вытяжной шкаф. Центрифуга на 3000 об/мин. Водоструйный насос. Песчаная баня. Электроплитки. Соляная кислота, разведенная 1:1. Азотная кислота концентрированная. Едкий натр, 30% раствор. Бумага лакмусовая. Хлорида кальция 1 н. раствор, очищенный частичным соосаждением (219 г $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ или 111 г CaCl_2 растворяют в 700 мл воды; отдельно растворяют 143 г $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ или 53 г Na_2CO_3 в 300 мл воды; оба раствора сливают при постоянном помешивании и после отстаивания декантируют прозрачный надосадочный слой жидкости в специальную бутылку). Карбоната натрия 0,5 н. раствор, очищенный частичным соосаждением (143 г $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ или 53 г Na_2CO_3 растворяют в 700 мл воды; отдельно растворяют 30 г $\text{CaCl}_2 \cdot 76\text{H}_2\text{O}$ или 15 г CaCl_2 в 300 мл воды; оба раствора сливают при постоянном помешивании и после отстаивания декантируют прозрачный надосадочный слой жидкости в специальную бутылку). Пергидроль (30% раствор перекиси водорода). Цитрата натрия трехзамещенного 50% раствор Лимонной кислоты х.ч. 60% раствор. Тиосульфата натрия 40% раствор. Раствор Селена (смесь равных количеств насыщенных растворов буры и борной кислоты). Глицерин-

сульфидный реактив (5 г сульфида натрия $N_2S \cdot 9H_2O$ растворяют в смеси 30 мл глицерина и 10 мл воды; оставляют на сутки и при необходимости фильтруют, хранят в темноте в плотно закрытой склянке). Основной стандартный раствор свинца (1,6 г $Pb(NO_3)_2$ растворяют в 1 л 0,01 н. HCl ; раствор стоек). Из основного стандартного раствора свинца, каждый раз заново, готовят рабочие растворы путем разведения в 100 или 10 раз (соответственно содержащие 10 или 100 мкг свинца в 1 мл).

Определение неорганических соединений свинца. Не менее 500 мл безбелковой или предварительно освобожденной от белка мочи из суточного количества с помощью 1 н. раствора соляной кислоты или едкого натра доводят по лакмусу до нейтральной реакции. Несвежая моча для исследования не пригодна. Присутствующие иногда в моче кристаллы мочевой кислоты в большом количестве, следует растворить реактивом Селена. Нейтрализованную мочу переносят в высокую узкую склянку, приливают 4 мл раствора хлорида кальция и при постоянном помешивании, в несколько приемов, на протяжении 5 мин прибавляют по каплям раствор карбоната натрия до появления легкой мути. Резкого помутнения следует избегать, так как в присутствии избытка карбоната натрия выпадает осадок карбоната цинка, который мешает дальнейшему определению. Исследуемую пробу оставляют для отстаивания осадка карбоната кальция и увлекаемого с ним карбоната свинца до следующего дня. Затем отсасывают водоструйным насосом или декантируют прозрачную надосадочную жидкость. Осадок количественно переносят в центрифужные пробирки, смывая со стенок посуды остатком мочи, центрифугируют 10 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают. Соединенные осадки растворяют в 2—3 мл концентрированной азотной кислоты, количественно, с помощью нескольких мл воды переносят в маленькую колбу Кьельдаля и выпаривают досуха на песчаной бане или электроплитке. К остывшему осадку добавляют 1—2 мл концентрированной азотной кислоты и несколько капель пергидроля, и вторично минерализуют пробу при нагревании до образования белого остатка нитрата кальция. Охлажденный сухой остаток растворяют в 5 мл соляной кислоты 1:1, количественно с помощью 5 мл цитрата натрия переносят в колориметрическую пробирку с плоским дном и притертой пробкой диаметром 15 и длиной 250 мм, подщелачивают 30% раствором едкого натра до отчетливо щелочной реакции, но

не более, чем необходимо для появления легкой муты; в последнем случае осторожно, при перемешивании, добавляют несколько капель раствора лимонной кислоты до растворения муты. В пробу вносят 1,25 мл раствора тиосульфата натрия и 0,2 мл сульфидного реактива. Затем берут три одинаковых по цвету и диаметру пробирки; в две из них — 1 и 2 — поровну разливают содержимое колориметрической пробирки. Пробирку 2 центрифугируют 10 мин при 2000 об/мин. Если на дне образуется плотный черный осадок — в пробе свинец имеется. В этом случае прозрачную надосадочную жидкость быстро сливают в третью пробирку и в ней подтитровывают рабочим раствором свинца при постоянном перемешивании из пипетки до уравнивания окраски содержимого пробирок 3 и 1. Сравнение ведут путем просматривания сверху вниз на белом фоне.

Отсутствие осадка после центрифугирования пробирки 2 свидетельствует о том, что свинца в пробе не содержится. В этом случае дальнейшая процедура не нужна и дается отрицательный ответ.

Расчет. Для пересчета полученного результата титрования в величину концентрации свинца в 1 л мочи необходимо количество мл рабочего раствора (содержащего 10 мкг в 1 мл), пошедшее на титрование, разделить на объем исследуемой пробы мочи в мл; умножить на 1000 для приведения к объему в 1 л; умножить на 10 для перевода мл рабочего раствора свинца в его содержание в мкг; разделить на 100 для перевода мкг в мг; умножить на 2, т. к. перед титрованием пробу делили пополам.

Пример: на титрование пробы в пробирке 3 пошло 0,2 мл рабочего раствора свинца, содержащего 10 мкг/мл. Для анализа использовано 500 мл мочи. Отсюда:

$$\frac{0,2 \times 1000 \times 10 \times 2}{500 \times 1000} = 0,008 \text{ мг/л} \sim 0,01 \text{ мг/л.}$$

Определение общего количества свинца. При лечении сатурнизма комплексонами, в ожидании в исследуемой моче больших количеств свинца, связанного в основном в виде органических соединений, помимо определения неорганического свинца, рекомендуется определять его общее количество. Предварительно необходимо разрушить все органические компоненты мочи с помощью мокрой минерализации. Для этого 5; 50 или 100 мл мочи (в зависимости от ожидаемого содержания свинца) вносят в колбу Кьельдаля

и сжигают в вытяжном шкафу на электроплитке в присутствии необходимого количества концентрированной азотной кислоты и пергидроля до образования сухого белого остатка. Остаток растворяют при нагревании в 50 мл воды, нейтрализуют по лакмусу несколькими каплями 30% раствора едкого натрия, прибавляют 4 мл раствора хлорида кальция и, как описано выше, раствора соды до появления легкой мути. Далее, не нуждающийся уже в минерализации осадок растворяют в 5 мл раствора соляной кислоты 1:1, количественно, с помощью 5 мл раствора цитрата натрия, переносят в колбу и нагревают до 80° для удаления углекислоты. Остывшую пробу подщелачивают по лакмусу и обрабатывают далее, как указано выше.

Обращаем внимание на то, что иногда при титровании, во избежание значительного увеличения объема пробы, следует использовать рабочий раствор свинца, содержащий 100 мкг/мл.

Пример: на титрование содержимого пробирки 3 пошло 3,15 мл рабочего раствора свинца, содержащего 100 мкг/мл. Для анализа было использовано 50 мл мочи. Отсюда:

$$\frac{3,15 \times 1000 \times 100 \times 2}{50 \times 100} = 12,6 \text{ мг/л.}$$

Количество свинца, связанного в виде органических соединений, определяется по разности между содержанием общего и неорганического свинца.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВИНЦА В КРОВИ

В колбу со 190 мл дистиллированной воды вносят 10 мл крови и после окончания гемолиза приливают 40 мл 5% раствора уксусной кислоты в насыщенном растворе хлорида натрия. Подкисленный гемолизат медленно нагревают до кипения, в результате чего свинец отщепляется от белков и белки осаждаются. Охлажденный гемолизат фильтруют через вату, измеряют объем фильтрата и нейтрализуют его 30% раствором едкого натра. Приливают 4 мл раствора CaCl_2 , раствор соды, и далее обрабатывают пробу, как при определении неорганических соединений свинца в моче. При расчете учитывают, что для исследования используются не все 240 мл гемолизата (из 10 мл крови), а только объем фильтрата.

Методические замечания. Вся используемая посуда после обычного мытья должна споласкиваться 5% раст-

вором азотной кислоты, а затем вторично дистиллированной водой.

Норма и оценка результатов. Отсутствие неорганического свинца или обнаружение его в пределах указанных концентраций не исключает, однако, токсического воздействия свинца. Лишь величины, лежащие выше приведенной границы нормы, позволяют подозревать интоксикацию и должны рассматриваться в комплексе с клиническими данными и результатами других лабораторных исследований больного. При отравлении свинцом и, особенно, при лечении его комплексами, концентрация свинца в моче возрастает и может достигать 1—10 мг/л. Верхней границей концентрации свинца в крови у здоровых людей является 1,9—2,4 мкмоль/л или 0,4—0,5 мг/л.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ РТУТИ В МОЧЕ

(С. Л. Гинзбург)

Метод основан на осаждении ртути из мочи в виде протеината, колориметрическом определении после извлечения раствором Люголя в форме двойной ртутно-медной йодистой соли.

Оборудование и реактивы. Центрифуга на 3000 об/мин. Водяная баня. Водоструйный насос. Уксусная кислота, 10% раствор. Натрия хлорид х.ч. Лакмусовая бумага. Физиологический раствор. Белок яичный или сывороточный: разведенные в 8 раз белок куриного яйца или человеческая сыворотка (остатки от других анализов). Хранить в закупоренном сосуде на холоду и в темноте. Для продления срока хранения белка добавляют по 5 мг сухого пенициллина или стрептомицина на 50 мл раствора. Раствор Люголя № 1: в литровую колбу наливают немного воды, растворяют в ней 30 г йодида калия, затем 2,5 г йода и доводят водой объем до метки. Раствор Люголя № 2: в литровую колбу наливают немного воды, растворяют в ней 30 г йодида калия, затем 8 г йода и доводят водой до метки. Меди сульфата 10% раствор. Сульфит натрия, насыщенный при комнатной температуре раствор. Двойной раствор: в колбу наливают небольшое количество раствора меди сульфата, затем понемногу при помешивании добавляют раствор сульфита натрия до тех пор, пока образующийся вначале осадок начнет частично растворяться и жидкость приобретет зеленоватый цвет. Раствор

нестоек, его готовят каждый раз заново. Стандартный раствор ртути. Основной раствор, содержащий в 1 мл 0,1 мг ртути, приготавливают растворением 0,1341 г сулемы, 0,1243 г ртути сульфата или 0,2265 йодида ртути в 1 л раствора Люголя № 1. Рабочий раствор, содержащий в 1 мл 0,01 мг ртути, готовят разведением основного раствором Люголя № 1 в 10 раз.

Определение. 500 мл мочи из суточного количества подкисляют по лакмусу уксусной кислотой до отчетливо кислой реакции; приливают к ней 5 мл раствора белка и растворяют при перемешивании 5 г сухого хлорида натрия. Подготовленную таким образом мочу погружают на 30—40 мин в кипящую водяную баню. После свертывания и выпадения белка в виде хлопьев пробу оставляют до следующего дня для отстаивания осадка протеината ртути. На следующий день надосадочную жидкость сливают или отсасывают водоструйным насосом, осадок количественно с помощью остатка мочи переносят в широкие центрифужные пробирки и центрифугируют 20 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают; к соединенным осадкам в широкой пробирке, постоянно перемешивая, добавляют 10 мл раствора Люголя № 2; пробирку закрывают пробкой. Через 2 ч пробу повторно центрифугируют в течение 20 мин. 5 мл надосадочной жидкости, содержащей раствор ртути в растворе Люголя, сливают в обычную пробирку, приливают к ней 3 мл двойного раствора и пробирку встряхивают. Одновременно готовят контрольную пробу (смешивают 5 мл раствора Люголя № 1 и 3 мл двойного раствора).

Если содержащая исследуемую пробу пробирка отличается по цвету от контрольной (молочно-белой) и появляется в ней розовато-оранжевое окрашивание муты, исследуемая проба содержит ртуть. В этом случае приступают к количественному определению. Для этого в ряд пробирок вносят возрастающие количества рабочего раствора ртути (0,2; 0,4; 0,6 мл и т. д.); в каждую пробирку добавляют раствор Люголя № 1 в количестве, дополняющем объем до 5 мл (4,8; 4,6; 4,4 и т. д.). В приготовленный ряд разведений ртути добавляют по 3 мл двойного раствора и встряхивают пробирки. Пробирку с исследуемой пробой сравнивают с рядом разведений ртути. Количество ртути в ней соответствует содержанию ртути в пробирке стандартного ряда с совпадающей окраской. Полученный результат для пересчета на 1 л мочи умножают на 4.

Пример расчета: цвет пробирки с исследуемой мочой совпал с цветом пробирки, содержащей 0,4 мл рабочего раствора. Следовательно, в 500 мл мочи содержится 0,008 мг (для анализа использовано 5 из 10 мл раствора Люголя № 1), а в 1 л — 0,016 мг ртути.

Норма: у людей, профессионально не соприкасающихся со ртутью, ее содержание в моче не превышает 0,01 мг/л.

ФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РТУТИ В МОЧЕ

(модификация И. С. Климец)

Метод основан на экстракции бензолом и фотометрировании сине-фиолетового ассоциата, образованного анионным йодидным комплексом ртути с катионом кристаллического фиолетового.

Оборудование и реактивы. Делительные воронки на 300 мл. Центрифуга на 3000 об/мин. Фотоэлектроколориметр. Серная кислота, выдерживающая пробу Савая, 1,8 н. раствор (4,76 мл H_2SO_4 , дистиллированной воды до 1 л). Калия йодида 0,1 М раствор (16,6 г КJ на 1 л воды). Кристаллический фиолетовый, 0,001 М раствор (0,407 г на 1 л воды), перекристаллизованный из метилового спирта. Основной стандартный раствор ртути, содержащий 0,1 мг Hg в 1 мл; готовят растворением 0,1341 г сулемы, 0,1243 г ртути сульфата или 0,2265 г йодида ртути в 1 л раствора Люголя (30 г йодида калия и 2,5 г йода в 1 л воды). Бензол.

Определение. В делительную воронку наливают 100 мл мочи из суточного количества, подкисляют 10-ю мл серной кислоты 1,8 н, добавляют 2 мл 0,1 М йодида калия, 1 мл 0,001 М раствора кристаллического фиолетового, 87 мл дистиллированной воды и 6 мл бензола. Содержимое воронки встряхивают 1 мин. Водную фазу (нижний слой) отбрасывают через 2—3 мин. Органическую фазу сливают в пробирку с пробкой, центрифугируют 10 мин при 2000 об/мин, фотометрируют на ФЭК-56 при светофильтре № 8 в кювете толщиной 0,5 см против бензола. Результат отсчитывают по калибровочному графику.

Построение калибровочного графика. Используются моча, из которой предварительно удалена ртуть (см. осаждение ртути в виде протеината — С. Л. Гинзбург). Декантируют надосадочную жидкость и в ней проводят определение ртути по вышеприведенной методике в 4-х пробах после добавления в каждую соответственно 0,2; 0,4; 0,6 и

0,8 мл рабочего стандартного раствора ртути (концентрация 10 мкг на 1 мл). По результатам определения строят график. В диапазоне концентраций от 2 до 10 мкг/мл график представляет собой прямую линию, т. е. отражает прямую зависимость между оптической плотностью исследуемого раствора и концентрацией ртути в пробе.

Пример расчета: найденное по калибровочному графику количество ртути в пробе разделить на 1000 для перевода мкг в мг, умножить на 10 для пересчета на 1 л мочи.

$E=0,05$; количество ртути в пробе = 1 мкг. Отсюда:

$$\frac{1,0 \times 10}{1000} = 0,01 \text{ мг/л.}$$

МОДИФИЦИРОВАННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАРГАНЦА В МОЧЕ (С. Я. Михлин)

Метод основан на соосаждении марганца из мочи совместно с фосфатами при резком подщелачивании среды, окислении бесцветного двувалентного марганца в окрашенную соль марганцевой кислоты и последующем фотометрировании раствора.

Оборудование и реактивы. Вытяжной шкаф, муфельная печь. Центрифуга на 3000 об/мин. Водоструйный насос. Водяная баня. Аммиак, 25% раствор. Серная кислота, 5 н. раствор. Фосфорная кислота, 85% раствор. Серебра нитрата, 3,4% раствор. Персульфат аммония х.ч. Стандартный раствор марганца: 1 л основного раствора содержит 5,04 $MnO_4 \cdot 7H_2O$ или 2,74 безводного MnO_4 (концентрация марганца 1 мг/мл). Рабочий раствор готовят десяти-стократным разведением основного серной кислотой 5 н. (содержание марганца 0,1 или 0,01 мг/мл).

Определение. В 500 мл мочи из суточного количества осаждают фосфаты с помощью 50 мл 25% раствора аммиака. После перемешивания пробу оставляют до следующего дня для отстаивания осадка. Надосадочную жидкость декантируют или отсасывают водоструйным насосом. Осадок количественно переносят с помощью остатка мочи в широкую центрифужную пробирку и центрифугируют 20 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок взмучивают в дистиллированной воде и снова центрифугируют. Промывание осадка повторяют до исчезновения запаха аммиака, затем растворяют его в 5 мл горячей 5 н. серной кислоты. через 30 мин пропускают через фильтр Шотта и собирают

в фарфоровую чашку для выпаривания. Фильтр дополнительно промывают в 2 мл той же кислоты, и соединенные растворы выпаривают на электроплитке досуха, а затем сжигают в муфельной печи при 500° С. Остывший белый полностью минерализованный осадок растворяют в течение 30 мин в 4 мл горячей серной кислоты, раствор сливают в градуированную центрифужную пробирку. Фарфоровую чашку ополаскивают 1 мл 85% раствора фосфорной кислоты и переносят в ту же пробирку. Доводят объем пробы серной кислотой до 5 мл. В другую, контрольную, градуированную пробирку вносят 3,9 мл 5 н. серной кислоты и 0,1 мл рабочего раствора марганца (концентрация 0,01 мг/мл) и 0,1 мл 85% фосфорной кислоты. В обе пробирки вносят по 3 капли 3,4% серебра нитрата, по 0,3 сухого персульфата аммония и погружают на 30 мин в кипящую водяную баню. Пробу остужают и определяют, содержится ли в ней марганец, по появлению розового окрашивания (просматривают пробу сверху вниз). Отсутствие окраски указывает на отсутствие марганца. В контрольной пробирке появляется характерное розовато-фиолетовое окрашивание; при окраске исследуемой пробы в более интенсивный, чем в контроле, цвет, готовят шкалу из ряда разведений раствора марганца (аналогично приготовлению шкалы для определения ртути). Общий объем рабочего раствора марганца и серной кислоты должен быть при этом всегда равен 4 мл. Для пересчета содержания марганца в 1 л мочи полученный результат удваивают.

Норма. У здоровых людей, профессионально не соприкасающихся с марганцем, его концентрация в моче не должна превышать 0,01 мг/л.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФТОРА В МОЧЕ (модификация Е. А. Рык)

Метод основан на потенциометрическом измерении ЭДС, зависящей от концентрации ионов фтора в моче, с помощью ионоселективного фторидного электрода. Обязательным условием является предварительная хроматографическая обработка мочи на ионообменной смоле для удаления всех органических компонентов, «отравляющих» электрод и снижающих его чувствительность.

Оборудование и реактивы. Фторидный ионоселективный электрод ЭФ У-1 (индикаторный). Хлорсеребряный или каломельный электрод сравнения. Солевой мостик (стеклянная трубка диаметром 10 мм, заполненная 1% раствором

агар-агара на насыщенном растворе аммония нитрата). Регистрирующее устройство (рН-метр ЛПУ-1, соединенный с потенциометром, как «О»-индикатор, или цифровой вольтметр постоянного тока Щ-1413). Схема установки для потенциометрического измерения собирается по общеизвестным правилам. Хроматографические колонки диаметром 10 мм и высотой 500 мм. 2% раствор азотной кислоты. Ионообменная смола АВ-17×6. Основной стандартный раствор фтора (100 мг/мл : 222,22 мг NaF х.ч. в 1 л дистиллированной воды, в полиэтиленовой посуде).

Подготовка смолы и хроматографической колонки. Один объем смолы заливают тремя объемами дистиллированной воды на 48 ч, меняя воду не реже двух раз в сутки. После последнего слива воды смолу заливают 2% раствором азотной кислоты и выдерживают в ней сутки. Смолу переносят в предварительно ополоснутую азотной кислотой хроматографическую колонку, на дно которой положен слой стеклянной ваты высотой 10 мм. Уровень загрузки колонки смолой — около 250 мм. При всех процедурах необходимо следить, чтобы над поверхностью смолы был слой жидкости не менее 10 мм. Загруженную колонку промывают 30 мл 2% раствора азотной кислоты со скоростью 25 капель в мин, затем с той же скоростью — дистиллированной водой до рН 4,4. Для загрузки одной колонки требуется около 15 г сухой смолы.

Определение. Рекомендуются анализировать свежесобранную мочу. При необходимости мочу собирают и хранят в полиэтиленовой посуде с добавлением нескольких капель фенольной воды.

10 мл мочи разводят дистиллированной водой в 5 раз, доводят рН до 5,0 добавлением 0,1 н. раствора соляной кислоты, пропускают через подготовленную колонку со скоростью около 25 капель в мин. Затем колонку промывают 50 мл дистиллированной воды и элюируют фтор пропуская 30 мл 3% раствора нитрата кальция с той же скоростью. Первые 25 мл элюата собирают в полиэтиленовый стаканчик емкостью 30—50 мл. После окончания элюции колонку промывают 30 мл дистиллированной воды, 30 мл 2% раствора азотной кислоты и повторно дистиллированной водой до рН 4,4. После этого колонка пригодна для повторного использования.

В полиэтиленовый стаканчик с элюатом опускают фторидный электрод и один конец солевого мостика. Другой его ко-

нец и электрод сравнения погружают в стеклянный стаканчик, заполненный насыщенным раствором нитрата аммония. В этом растворе следует хранить электрод в нерабочем состоянии. Через 10 мин после подключения электродов к регистрирующему устройству и помешивания стаканчика проводят отсчет показаний прибора в вольтах. Содержание фтора определяют по калибровочному графику. Найденную концентрацию умножают на 2,5 (разведение пробы при элюции).

Построение калибровочного графика. Из основного стандартного раствора фторида натрия, разбавляя его 3% раствором нитрата кальция, готовят ряд разведений с концентрацией 0,1, 0,5, 1,0, 2,0, 5,0, 10,0, 25,0, 50,0 и 100,0 мг/л фтора. На основании данных потенциометрического исследования этих растворов строят полулогарифмический график, на котором по оси ординат откладывают показания измерительного прибора (в), а по логарифмической оси абсцисс — концентрацию фтора (мг/л). Зависимость между величиной ЭДС и логарифмом концентрации фтора прямолинейная.

Норма и оценка результатов. Концентрация фтора в моче здоровых людей, профессионально не соприкасающихся с его соединениями, полученная данным методом, колеблется от 0,33 до 1,5 мг/л. Среднее содержание фтора при этом составляет $0,80 \pm 0,07$ мг/л. Диагностическое значение имеют лишь величины, превышающие 1,5 мг/л (79 мкмоль/л).

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОЛА В МОЧЕ (Тайсингер и соавт.)

Метод основан на отгонке фенола с паром из гидролизованной с помощью серной кислоты мочи, который при взаимодействии с реактивом Джиббса образует окрашенное соединение синего цвета. Количественное определение фенола проводится колориметрически.

Оборудование и реактивы. Стеклянная перегонная установка на шлифах с внешним парообразователем. Фотоколориметр ФЭК-Н-57. Серная кислота х. ч., концентрированная. Боратно-карбонатный буфер с рН 10,5 (10,5 г $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ и 2,8 г безводной буры $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ растворяют в 0,5 л воды. Фенольный реактив Джиббса (основной спиртовой раствор, содержащий 15 мг 2,6-дибромхинонхлоримида в 10 мл 96° спирта). Этот раствор сохраняется на холоду и в темноте двое суток. Рабочий раствор готовят десятикрат-

ным разведением основного бидистиллированной водой (раствор нестойк, его следует готовить перед употреблением). Основной стандартный раствор фенола: свежеприготовленный раствор перегнанного фенола, 500 мг/л; рабочий раствор готовят из основного с содержанием фенола 10 мг/л.

О п р е д е л е н и е. 5 мл мочи, подкисленной 0,5 мл концентрированной серной кислоты, помещают в среднюю колбу перегонной установки и перегоняют ее содержимое с водяным паром, получаемым в парообразователе, со скоростью 5—10 мл/мин. Из собранных в мерный цилиндр 50 мл дистиллята 10 мл переносят в мерную колбу на 25 мл, добавляют 2,5 мл буферного раствора, 1 мл фенольного реактива Джиббса и доводят объем бидистиллированной водой до метки. Через час пробу фотометрируют при оранжево-красном светофильтре № 7 против холостой пробы, содержащей все компоненты, кроме мочи. Предварительную калибровку проводят исходя из рабочего раствора фенола, по шкале, содержащей в 25 мл 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 и т. д. мл этого раствора, 2,5 мл буферного раствора и 1 мл фенольного реактива.

Норма и оценка результатов. Фенол является нормальным продуктом обмена в организме ряда белков, поэтому в небольших количествах он всегда присутствует в крови и моче. Поскольку бензол, попавший в организм извне, в значительной мере окисляется до фенола, его экскреция с мочой возрастает. У людей, профессионально не соприкасающихся с бензолом, за сутки выводится в среднем 8,2 мг фенола. Средняя концентрация его в моче здоровых людей равна $11,3 \pm 1,0$ мг/л (120 ± 11 мкмоль/л).

Определение фенола в моче может служить в качестве коллективного экспозиционного теста, повышенные результаты которого указывают на недопустимое загрязнение воздуха рабочей зоны производственных помещений парами бензола или фенола.

ПРИЛОЖЕНИЕ
К Положению о порядке
внедрения достижений
медицинской науки в
практику здравоохранения

**ОТРЫВНОЙ ЛИСТ
УЧЕТА ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДОВ
ПРОФИЛАКТИКИ, ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ**

Направить по подчиненности

1. Методические рекомендации «Методы лабораторных исследований, используемые при диспансеризации рабочих с вредными условиями труда».
2. Утверждены заместителем министра здравоохранения РСФСР

Трубилиным Н. Т. 20 февраля 1980 г. _____

3. _____
(кем и когда получены)

4. Количество лечебно-профилактических учреждений, которые внедрили методы профилактики, диагностики и лечения, предложенные данным документом _____

5. Формы внедрения (семинары, подготовка и переподготовка специалистов, сообщения и пр.) и результаты применения метода (количество наблюдений за 1 год и эффективность) _____

6. Замечания и пожелания (текст) _____

Подпись _____
(должность, ф. и. о. лица, заполнявшего карту)

Заполняется учреждением, применившим метод

СО Д Е Р Ж А Н И Е

Введение	3
Тромбоциты	4
Ретикулоциты	6
Эритроциты с базофильной зернистостью	7
Тельца Гейнца	9
Гемоглобин и его производные	10
Уробилин	14
Гематопорфирин	15
Дельта-аминолевулиновая кислота	17
Определение свинца в моче	19
Определение свинца в крови	22
Определение ртути в моче	23
Фотометрическое определение ртути в моче	25
Модифицированное определение марганца в моче	26
Определение фтора в моче	27
Определение фенола в моче	29

М-41042. Сдано в набор 20.03.80. Подписано к печати 22.09.80.
Формат бумаги 60×84¹/₁₆. Бумага типографская № 1. Печать высокая.
Гарнитура литературная. Объем 2 печ. л. Уч.-изд. л. 1,85
Тираж 1000 экз. Заказ 923. Бесплатно.

Ленинградский научно-исследовательский институт гигиены труда
и профессиональных заболеваний
193036, Ленинград, С-36, 2-я Советская ул., д. 4.

Типография № 2 Ленунприздата. 191104, Ленинград, Литейный пр., 55.