

УДК 543.422.3

Студ. М. А. Козляк

Науч. рук. доц. Т. Н. Зинькова

(кафедра аналитической химии, БГТУ)

## **ВЛИЯНИЕ pH НА СВОЙСТВА НЕКОТОРЫХ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ КРАСИТЕЛЕЙ**

В гематологических и гистологических исследованиях широко применяются различные виды красителей. Одним из способов окрашивания мазков крови является окрашивание по Романовскому. Классический способ окраски по Романовскому заключается в обработке предварительно подготовленных мазков водным раствором смеси анионного красителя эозина и катионного красителя азура В, являющегося смесью метиленового синего и продуктов его окисления.

На сегодняшний день существует много вариантов этого метода окрашивания (окраска по Нохту, окраска по Гимза, окраска по Лейшману, окраска по Май-Грюнвальду и др.) Однако при практическом использовании всех этих способов возникают сложности, потому что у одинаковых красителей окрашивающая способность оказывается разной, причем не только у красителей разных производителей, но и даже у красителей из разных партий одного и того же производителя. Поэтому лабораториям приходится опытным путем подстраиваться под каждую партию краски.

Анализ литературных данных показал, что одной из возможных причин изменения качества окрашивания мазков крови является то, что соотношение между производными метиленового синего не является постоянной величиной для каждой партии красителя, и более того, способно изменяться при длительном хранении.

Были изучены образцы красителя «Краска Романовского» одного производителя, но разных партий. Для этого в одинаковых условиях готовились красящие растворы краски Романовского (разбавление 1:500) и сняты спектры поглощения. Установлено, что краски разных партий действительно имеют небольшие спектральные различия. Но т.к. на производстве осуществляется контроль качества продукции, а проанализированные образцы соответствуют требованиям, значит, эти небольшие спектральные различия не оказывают существенного влияния на качество окрашивания.

Более сильно на качество окрашивания может влиять pH красящих растворов. Поэтому производители красок обычно рекомендуют поддерживать строго нейтральную среду при окрашивании – pH=7. Для этого в комплекте с краской часто предлагают соответствующие буферные смеси для приготовления красящего раствора. Однако в ре-

альных лабораторных исследованиях концентраты красок иногда разбавляют просто дистиллированной или даже водопроводной водой. А пределы колебаний рН дистиллированной воды обычно от 5 до 6, а водопроводной воды – от 6 до 9, чаще всего около 7,2-7,6 – т.е. не соответствуют рекомендуемому значению.

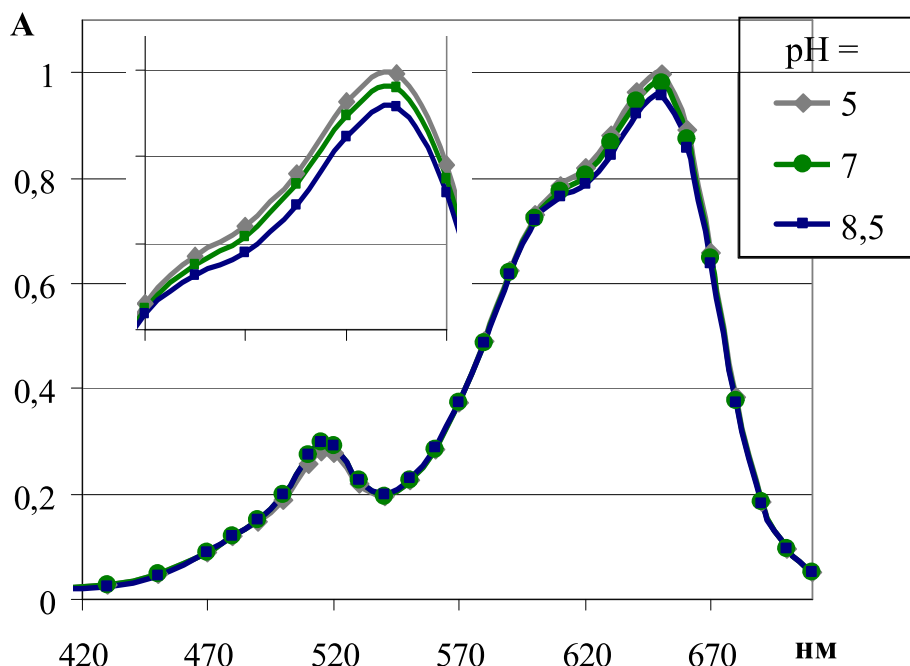
Цель работы заключалась в том, чтобы выяснить, каким именно образом значение рН влияет на окрашивающую способность красителей типа «Краска Романовского».

Сначала предположили, что одной из возможных причин является воздействие рН на компоненты самих красителей. Согласно литературным данным, при хорошем качестве окраски мазков крови ядра клеток имеют фиолетово-красный цвет; цитоплазма лимфоцитов – голубой, моноцитов – голубовато-серый, эритроциты – красновато-розовый, нейтрофильная зернистость – розовато-фиолетовый; эозинофильная зернистость – розовый или красно-розовый цвет и т.д. Однако в более кислой среде окраска многих элементов получается бледной, а в более щелочной среде мазки получаются слишком синими.

Чтобы установить, связано ли это с изменениями компонентов красителей, были приготовлены растворы краски Романовского с разными значениями рН: 5, 7 и 8,5. Для достижения нужных значений рН предварительно были приготовлены соответствующие фосфатные буферные растворы с различными соотношениями компонентов (гидрофосфата и дигидрофосфата натрия). Контроль рН осуществлялся потенциометрическим методом с использованием стеклянного индикаторного электрода и иономера рН-150-МП. Разбавление концентрата краски буферными растворами проводилось в соотношении 1:500.

Проведены измерения светопоглощения приготовленных растворов в диапазоне длин волн от 430 до 700 нм. Измерения проводили на спектрофотометре ПЭ-5400ВИ в стеклянных кюветах  $l=1$  см. При сопоставлении спектров поглощения установлено, что в более щелочной среде (рН=8,5) интенсивность синей компоненты краски (в диапазоне длин волн 600-660 нм) несколько уменьшилась по сравнению со значениями в нейтральной среде, а интенсивность красной компоненты (510-520 нм) немного увеличилась. В слабокислой среде (рН=5) изменения менее заметны, хотя интенсивность синей компоненты краски немного увеличилась, а интенсивность красной компоненты уменьшилась. При повторных опытах результаты воспроизводились.

Полученные данные не подтвердили предположение о влиянии рН на качество окрашивания за счет воздействия на компоненты краски.



Поэтому предположили, что причиной является механизм взаимодействия красителей с клетками крови при различных значениях pH. Были приготовлены мазки крови, зафиксированы в метаноле в течение 5 минут и высушены. Приготовлены рабочие растворы краски Романовского так же, как в медицинских лабораториях (разбавление 1:20) теми же буферными растворами с pH=5, 7 и 8,5. Этими красящими растворами заливали мазки и окрашивали в течение 20 минут, затем промывали и высушивали.

В результате различие в окраске мазков наблюдалось даже невооруженным глазом: мазок, окрашенный при pH=5, был красного цвета; мазок, окрашенный при pH=8,5 – темно-синий; а мазок, окрашенный при pH=7 – светло-фиолетовый. При рассмотрении в микроскоп даже при небольшом 100-кратном увеличении было видно, что клетки в слабокислой среде в основном все розовые, в слабощелочной – синие, причем структура клеток не просматривалась. А в нейтральной среде было уже заметно различие в окраске клеток, причем были видны некоторые структурные элементы клеток. Вероятной причиной различий в окраске можно предположить, что при изменении pH белки форменных элементов крови изменяют свой заряд и по-разному связываются с красителями.

Таким образом, в результате выполнения данной работы установлено, что значение pH влияет преимущественно на механизм взаимодействия красителей с клетками крови, а не на спектральные свойства самих красителей.