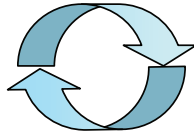


Betrieb[Ausbildungsrahmenplan
Nr. 11.1](#)**Berufsschule**[Rahmenlehrplan
Lernfeld 8](#)

Standardarbeitsanweisung (SOP) Bestimmung des Hämoglobingehaltes im Blut	„Firmenlogo“
Seite: 1 von 5 Verfasser: „Name“, Ausbilder/in	Dok.-Nr.: TBG/06/0009.1/03 Gültig ab: 01.12.2003

1 Change Control

Grund der Erstellung dieser Fassung:

- Überarbeitung des Layouts

Ersetzt SOP TB/05/0009/01

2 Gegenstand, Zweck, Ziel

Die Standard-Arbeitsanweisung beschreibt das Prinzip und die Vorgehensweise der Bestimmung des Hämoglobingehaltes im Blut mittels photometrischer Bestimmung.

Das Verfahren der Wahl ist heute die Bestimmung von Hämoglobin als Hämiglobin-cyanid. (Hinweis: Hämoglobin wird auch Methämoglobin genannt!)

Im hämolysierten Blut oxidiert Kaliumhexacyanoferrat(III) Hämoglobin zu Hämiglobin, das mit Kaliumcyanid einen stabilen Hämiglobincyanidkomplex bildet.

3 Geltungsbereich

Die SOP findet bei „Firma“ Anwendung. Sie dient ausschließlich didaktischen Zwecken.

4 Verantwortlichkeiten

Der/die betreuende Ausbilder/in ist für die korrekte Durchführung des Versuchs verantwortlich. Er/sie kann jedoch die Durchführung, Dokumentation als Auftrag an Auszubildende delegieren. Er/sie muss sich jedoch von der korrekten Durchführung und Dokumentation (Protokolle) überzeugen.

5 Arbeitssicherheit / Umweltschutz / Tierschutz

- Die R- und S-Sätze der verwendeten Gefahrstoffe sind zu beachten und im Protokoll zu dokumentieren
- Blut kann infektiös sein (Schutzbrillentragepflicht)
- Bei Arbeiten mit Versuchstieren Einmalhandschuhe und Schutzbrille tragen
- Kontaminiertes Material wird gemäß Abfallentsorgungsrichtlinie „Firma“ entsorgt
- Hände desinfizieren, anschließend mit Seife waschen und eincremen
- Materialien und Tische desinfizieren
- Tierschutzbestimmungen beachten
- Tierversuche sind unter Aufsicht eines Ausbilders durchzuführen
- Empfehlungen der TVT beachten
- Das Hämoglobinreagenz enthält das hochgiftige Kaliumcyanid! Die Lösungen werden nach Gebrauch in die Chemikalienabfallflasche "KCN-haltig" geschüttet

6 Material

Photometer, Einmalküvetten 1 cm Schichtdicke, Hämoglobin-Reagenz, Reagenzgläser, 5 mL Pipette, Howorka- oder Peleusball, E-H₂O, Sahlpipette, Micro-Pipettierhilfe, Zellstofftupfer, Impflanzette, Gefäße mit HCL c(HCL) = 0,01 mol/L, E-H₂O, Aceton.

7 Durchführung

Vorbereitung

Hämoglobin-Reagenz enthält:

- Kaliumhexacyanoferrat (III)
- Kaliumcyanid
- Natriumhydrogencarbonat (Pufferfunktion)

Es werden jeweils 5 mL Hämoglobin-Reagenz in Reagenzgläser vorgelegt. Der Tierart entsprechend wird Blut abgenommen. Für jede Hb-Bestimmung werden zwei Ansätze ausgeführt. Mit der Sahlpipette werden 0,02 mL Blut blasenfrei aufgezogen. Blutreste außen an der Sahlpipette werden sorgfältig mittels Zellstofftupfer abgewischt. Der Inhalt der Sahlpipette wird in 5 mL des vorgelegten Hämoglobin-Reagenz durch wiederholtes Ausblasen und Aufziehen der Pipette entleert. Anschließend gut durchmischen und den Reaktionsablauf abwarten (mindestens 3 Minuten). Die photometrische Messung der Extinktion erfolgt bei 546 nm gegen Hämoglobin-Reagenz (**besser E-H₂O, zur Vermeidung von Umweltbelastungen**).

Schema

	Probe	Leerwert
Reaktionslösung	5 mL	5 mL
Probantenblut	0,02 mL	-

Kommentar [r1]: Probanden?

Probe gut mischen und mindestens 3 Minuten bei Raumtemperatur reagieren lassen! Vor Sonne geschützt bleibt die Farbe 24 Stunden stabil. Messung bei 546 nm.

Reinigen der Sahlpipette

Durch nachfolgendes Durchziehen von:

1. HCL c(HCL) = 0,1mol/L
2. E-H₂O
3. Aceton

wird die Pipette sofort nach Gebrauch mittels Wasserstrahlpumpe gereinigt. Die Pipette bleibt so lange an die Wasserstrahlpumpe angeschlossen, bis das Aceton verdampft ist.

Vorbereitung der Messung am Perkin-Elmer-Fotometer

Vor der erstmaligen Inbetriebnahme sollte sich der Benutzer vergewissern, dass der Hauptschalter auf "OFF" steht. Es sollte keine Küvette eingelegt sein. Das Fotometer muss vor der ersten Messung mindestens 15 Minuten lang eingeschaltet sein, damit die Elektronik auf Betriebstemperatur kommt und die Lampe einbrennt. Vor dem Einschalten kontrollieren, ob sich die eingestellte Wellenlänge (Abszissa) zwischen 400-700 nm befindet. Die Wellenlänge wird manuell mit dem Handrad an der linken Geräteseite eingestellt. Zum Einschalten "VIS"- Wippschalter auf Stellung "ON" und danach Hauptschalter (POWER) auf "ON". Das Ordinatenfeld leuchtet nach kurzer Zeit (ca. 5 Sekunden) auf und zeigt die Extinktion von 0,000 an.

Wichtig: Vor der erstmaligen Inbetriebnahme muss das Fotometer kalibriert werden. Die Anleitung zur Kalibrierung liegt am Fotometer bzw. im Labor aus.

Messung

- Die Wellenlänge auf 546 nm einstellen.
- Mit Hämoglobin-Reagenz (E-H₂O) gefüllte Küvetten in beide Küvettenhalter stellen. Dabei zeigen die optischen Flächen der Küvetten zur Seite. Die geriffelten Flächen der Küvetten dienen zum Anfassen. Es versteht sich von selbst, dass die optischen Flächen der Küvetten peinlichst sauber sein sollten.
- Taste "Auto-Zero" drücken und Nullabgleich abwarten. Ordinatenfeld wird dunkel und leuchtet nach kurzer Zeit wieder auf und zeigt die Extinktion von 0,000 an.
- In den vordersten Küvettenhalter eine mit der Probelösung gefüllte Küvette stellen.
- Extinktion der Probelösung ablesen.
- Bei mehreren Proben Schritte 4 und 5 wiederholen. Nullabgleich entfällt.

Auswertung

Die Berechnung der Hämoglobinkonzentration erfolgt über vorgegebene Faktoren. Da 0,02 mL Blut mit 5 mL Hämoglobin-Reagenz verdünnt worden sind, ergibt sich ein Verdünnungsverhältnis von 1:251 (0,02 mL + 5 mL = 1mL + 250 mL = 1:251). Die vorgegebenen Faktoren zur Berechnung der Hämoglobinkonzentration enthalten schon diesen Verdünnungsfaktor, d.h. sie sind schon mit 251 multipliziert.

		Mmol / L	
g / 100 mL	g / L	Monomer	Tetramer
E x 36,8	E x 368	E x 22,8	E x 5,7

E = Extinktionswert

Einheiten

Konventionell in g/100 mL, nach "SI" in g/L bzw. mmol/L.

Fehlererkennung

Ursache:	Folge:
Fehlerhafte oder beschädigte Sahlpipette (abgestoßene Spitze)	Schlechte Richtigkeit
Blut nicht luftblasenfrei in Sahlpipette aufgezogen	Falsch, zu niedrige Ergebnisse
Beim Abmessen der Blutprobe in der Sahlpipette Blut zuerst bis über die Ringmarke aufgezogen und erst nachträglich durch Abtupfen an der Pipettenspitze Volumen justiert. Beim Auswaschen der Pipette mit Reaktionslösung diese wiederum über die Marke hinaus aufgezogen und aufgeblasen. Blutreste von der Kapillarwand mit in den Ansatz genommen	Falsch, zu hohe Ergebnisse
Sahlpipette vor Einspülen der Probe in Reaktionslösung nicht abgewischt	Falsch, zu hohe Ergebnisse
Sahlpipette nach Einblasen der Blutprobe in Reaktionslösung nicht mit Reaktionslösung durchgespült	Falsch, zu tiefe Ergebnisse

Generelle Fehler beim Fotometrieren

Ursache:	Folge:
Falsche Wellenlänge eingestellt. Zu kurze Einbrenndauer der Lampe. Vor der ersten Messung Nullpunkt des Photometers nicht eingestellt	Abweichung in der Richtigkeit, die durch mitgeführte Standardlösung nicht immer ausgeglichen werden.
Innen und/oder außen verschmutzte Küvetten	Falsch, zu hohe Ergebnisse
Außen an der Küvetten herunter laufender Tropfen	Bei wiederholter Ablesung sehr unterschiedliche Ergebnisse
Nichterkennen von Trübungen im Ansatz	Falsch, zu hohe Ergebnisse
Nichtbeachten der Reaktionszeit	Falsch, zu niedrige Ergebnisse

8 Verwaltung der vorliegenden SOP

Diese SOP wird von „**Abteilung und Firma**“ aufbewahrt und aktualisiert. Sie ist Bestandteil des QS-Handbuches. Das Original wird an dem in der Kopfleiste erwähnten Standorte aufbewahrt. Kopien werden an die jeweiligen Laboratorien des Bereiches der „**Abteilung**“ ausgegeben. Nur Kopien mit blauem Aufdruck „Biologie“ sind auf Übereinstimmung mit dem Original überprüft.

Überprüft und genehmigt:

.....
Datum

.....
„**Name**“
(Ausbilderin)

.....
Datum

.....
„**Name**“
(Ausbilder)