

Томчук В. А., Грищенко В. А., Цвіліховський В. І.

ВЕТЕРИНАРНА БІОХІМІЯ

Підручник

Київ
2022

УДК 577.1:619(072)

ББК 28.0

Т-56

*Рекомендовано до видання рішенням вченої ради
Національного університету біоресурсів і природокористування України
(Протокол № 3 від «26» листопада 2022 року)*

Рецензенти:

Ткачук С. А., доктор ветеринарних наук, професор, академік академії наук вищої освіти України, Національний університет біоресурсів і природокористування України;

Чумаченко В. В., доктор ветеринарних наук, старший науковий співробітник, Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ) Державної служби України з питань безпечності харчових продуктів та захисту споживачів;

Савчук О. М., доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри біохімії, Київський національний університет імені Тараса Шевченка.

Т-56 Ветеринарна біохімія: підручник / Томчук В. А., Грищенко В. А., Цвіліховський В. І. – К.: НУБіП України, 2022. – 376 с.

ISBN 978-617-8102-52-4

Зміст підручника відповідає робочій програмі з дисципліни «Ветеринарна біохімія» у розрізі навчальної програми з підготовки фахівців III освітньо-наукового рівня «Доктор філософії» зі спеціальності 211 «Ветеринарна медицина». У підручнику описано особливості змін метаболізму в організмі тварин за патології органів серцево-судинної, респіраторної, травної та сечової систем та відповідні біохімічні констеляції; способи діагностики імунодефіцитного стану в новонароджених тварин і прогнозування його розвитку; проаналізовано принципи роботи сучасних біохімічних аналізаторів біологічних рідин та біохімічні методи дослідження у діагностичних ветеринарних лабораторіях (об'ємно-аналітичні, електрохімічні, оптичні, хроматографічні, електрофоретичні), а також забезпечення якості їх діяльності.

Рекомендується для аспірантів, докторантів і молодих спеціалістів, які навчаються та працюють у ветеринарній галузі з питань біохімічних досліджень у лабораторній діагностиці хвороб тварин.

ISBN 978-617-8102-52-4

УДК 577.1:619(072)

ББК 28.0

© В. А. Томчук, В. А. Грищенко

В. І. Цвіліховський

© НУБіП України, 2022

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

ТОМЧУК ВІКТОР АНАТОЛІЙОВИЧ



Доктор ветеринарних наук, професор, завідувач кафедри біохімії і фізіології тварин ім. акад. М.Ф. Гулого Національного університету біоресурсів і природокористування України. Викладає дисципліну «Ветеринарна клінічна біохімія». Наукові інтереси пов'язані з вивчення молекулярних механізмів регуляції метаболічних процесів в організмі тварин. Автор понад 350 наукових та навчально-методичних праць, з яких 6 монографій, 10 підручників і навчальних посібників, 2 термінологічних словники, 10

патентів і 9 авторських свідоцтв.

Електронна адреса: tomchuk_viktor@ukr.net

ГРИЩЕНКО ВІКТОРІЯ АНАТОЛІЇВНА



Доктор ветеринарних наук, професор, лауреат Державної премії України в галузі науки і техніки та премії ім. С. З. Гжицького, професор кафедри біохімії і фізіології тварин ім. акад. М.Ф. Гулого Національного університету біоресурсів і природокористування України. Викладає дисципліни: «Ветеринарна клінічна біохімія», «Клінічна лабораторна діагностика», «Ветеринарна біохімія», «Біохімія тварин з основами фізичної та колоїдної хімії». Наукові інтереси пов'язані з дослідженням порушень метаболізму та його регуляції на тлі внутрішньоклітинної

деструкції за умов дії на організм екопатогенних чинників довкілля та розвитку хвороб тварин. Автор понад 580 наукових та навчально-методичних праць, із яких 18 монографій, 16 підручників і навчальних посібників, 5 довідників, 52 патентів і авторських свідоцтв. Електронна адреса: viktoriya_004@ukr.net

ЦВІЛІХОВСЬКИЙ ВАЛЕРІЙ ІВАНОВИЧ



Кандидат біологічних наук, доцент кафедри біохімії і фізіології тварин ім. акад. М.Ф. Гулого Національного університету біоресурсів і природокористування України. Викладає дисципліни «Біохімія тварин з основами фізичної і колоїдної хімії», «Ветеринарна клінічна біохімія», «Клінічна лабораторна діагностика», «Ветеринарна біохімія», «Біохімія медична» та ін. Наукові інтереси пов'язані з вивчення антиоксидантного захисту та обміну ліпідів в організмі тварин за впливу природних і штучних

чинників. Автор понад 180 навчально-методичних та наукових публікацій: 3 монографії, 1 підручник, 7 навчальних посібників, 4 авторських свідоцтва. Електронна адреса: vtsvilihovskyy@nubip.edu.ua

ЗМІСТ

	Передмова	7
Розділ 1.	БІОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ У ВЕТЕРИНАРІЇ	9
Тема 1.1.	Об'ємно-аналітичні методи дослідження	9
1.1.1.	Способи вираження концентрації розчинів	9
1.1.2.	Визначення густини розчинів	12
1.1.3.	Види титриметричного аналізу	13
Тема 1.2.	Електрохімічні методи аналізу	18
1.2.1.	Вольтамперометрія	18
1.2.2.	Кондуктометрія	19
1.2.3.	Потенціометрія	21
Тема 1.3.	Оптичні методи аналізу	26
1.3.1.	Спектрофотометричні методи аналізу	29
1.3.2.	Атомна спектроскопія	33
1.3.3.	Рефрактометричний метод аналізу	39
Тема 1.4.	Хроматографічні методи аналізу	41
1.4.1.	Класифікації хроматографічних методів	42
1.4.2.	Тонкошарова хроматографія	43
1.4.3.	Іонообмінна хроматографія	44
1.4.4.	Газова хроматографія	45
1.4.5.	Рідинна хроматографія	49
1.4.6.	Хроматомас-спектрометрія	51
Тема 1.5.	Електрофоретичні методи аналізу	51
1.5.1.	Теоретичні основи та методичні аспекти електрофорезу	53
1.5.2.	Фактори, що впливають на рухливість електрозарядже- них молекул при електрофорезі	56
1.5.3.	Загальні принципи проведення електрофорезу	60
1.5.4.	Спеціальні методи електрофорезу	63
	<i>Питання для обговорення та самоперевірки</i>	125
	Список використаної літератури	131
Розділ 2.	ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ПОРУШЕНЬ МЕТАБОЛІЗМУ ЗА ПАТОЛОГІЇ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ	133
Тема 2.1.	Структурна організація клітинної мембрани та її модифікація під дією патологічних чинників	133
Тема 2.2.	Вплив фізіологічного стану тварин на біохімічні показники крові	137
Тема 2.3.	Ензимодіагностика хвороб тварин	147
Тема 2.4.	Лабораторна діагностика порушень біохімічних процесів у легенях і міокарді при хворобах респіраторної та серцево-судинної систем	162

Тема 2.5.	Біохімічні процеси в організмі тварин при хворобах органів системи травлення, лабораторна діагностика їх порушень	180
Тема 2.6.	Лабораторна діагностика порушень метаболізму в нефроцитах при нефропатіях і функціональних розладах органів сечовиділення	207
Тема 2.7.	Порушення водно-електролітного обміну і кислотно-лужного стану організму тварин та їх лабораторна діагностика	221
Тема 2.8.	Біохімічні механізми імунної відповіді організму. Експрес-діагностика імунодефіциту в новонароджених тварин	237
Тема 2.9.	Біохімічні аналізатори в лабораторній діагностиці	259
2.9.1.	Біохімічні аналізатори: принципи роботи та сфери використання	259
2.9.2.	Модернізація спектроскопічних методів дослідження і лабораторної діагностики хвороб тварин	266
	Тести контролю знань	270
	Список використаної літератури	276
Розділ 3.	ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ЯКОСТІ ДІЯЛЬНОСТІ БІОХІМІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ	279
Тема 3.1.	Стандарти для лабораторій, їх загальні положення (ISO 9001, ISO/IEC17025, ISO 15189, GLP)	279
3.1.1.	Введення в забезпечення якості	279
3.1.2.	Система менеджменту якості, забезпечення якості і контролю якості	280
3.1.3.	Стандарти та їхні основні положення	281
3.1.4.	Загальні положення стандартів ISO 9001, ISO/IEC 17025 та ISO 15189	282
3.1.5.	Положення стандарту ISO 9001	283
3.1.6.	Положення стандарту ISO/IEC 17025	284
3.1.7.	Положення стандарту ISO 15189	284
Тема 3.2.	Відбір проб та підготовка до аналізу	285
3.2.1.	Важливість відбору проб	285
3.2.2.	Ідентифікація видів проб	287
3.2.3.	Суть і значення планів відбору проб	290
3.2.4.	Нормативні і юридичні вимоги	291
3.2.5.	Види відбору проб	292
3.2.6.	Кількість проб і розмір проби	293
3.2.7.	Невизначеність відбору проби	294
3.2.8.	Кількість первинних проб	295
Тема 3.3.	Валідації аналітичних методик та правильність проведення вимірювань	295
3.3.1.	Селективність	299
3.3.2.	Діапазон вимірювань	299

3.3.3.	Звіт валідації та документація	303
3.3.4.	Організація лабораторного процесу	304
Тема 3.4.	Правила проведення контролю якості та обробка даних	317
3.4.1.	Контроль якості	317
3.4.2.	Лабораторне середовище	319
3.4.3.	Планування лабораторії	320
3.4.4.	Обладнання, скляний посуд і пристосування	321
3.4.5.	Хімічні реактиви та витратні матеріали	326
3.4.6.	Технічне обслуговування та калібрування обладнання ..	328
3.4.7.	Основи статистики	330
	<i>Питання для обговорення та самоперевірки</i>	336
	Список використаної літератури	338
	Додатки	340
	Умовні скорочення	365
	Предметний покажчик	367

ПЕРЕДМОВА

Ветеринарна біохімія – наука, яка вивчає класичні питання біологічної хімії та їх застосування у прикладній ветеринарії. Мета навчальної дисципліни – надати необхідні теоретичні знання та напрацювати практичні навички з питань методології проведення різноманітних біохімічних досліджень, що дозволяє здійснювати комплексну оцінку індикаторних показників різноманітного біологічного матеріалу, отриманого від хворих тварин. Зазначена дисципліна важлива для визначення функціонального стану організму тварин і лабораторної діагностики їх хвороб, правильної інтерпретації одержаних результатів, а також забезпечення якості функціонування біохімічних лабораторій.

Практичне використання біохімічних методів у діагностичних лабораторіях потребує підготовки висококваліфікованих спеціалістів у ветеринарії та суміжних областях біології, аналітичної хімії, медицині тощо. Біохімічні методи відрізняє висока чутливість і точність. Все це обумовлює необхідність підготовки відповідної сучасної навчальної літератури.

Нині існує ряд підручників і навчальних посібників, методичних вказівок, де описані біохімічні методи, що використовуються для аналізу речовин у лабораторній діагностиці хвороб тварин. Але в багатьох із них наведені розрізнені та несистематизовані відомості, часто перенавантажені теоретичними викладаками.

Автори цього підручника представили не лише огляд відповідної навчально-методичної літератури з біохімії, але й підготували практичні рекомендації щодо використання найважливіших модифікацій методів лабораторного аналізу. Певні етапи застосування цих методів викладені детально, що дозволяє відносно легко їх відтворити в експериментальних дослідженнях.

Підручник складається з трьох частин. У першій з них наведено матеріал стосовно загальної характеристики, теоретичних основ щодо застосування методів біохімічних досліджень (підготували В. А. Томчук, В. І. Цвіліховський). Зазначена частина складається з розділів, в яких узагальнені теоретичні питання та загальні принципи розглянутих методів, їх класифікація та використання в сучасних біохімічних лабораторіях. Зокрема, представлено теоретичні та практичні аспекти об'ємно-аналітичних, електрохімічних, оптичних, хроматографічних та електрофоретичних методів аналізу речовин у різному біологічному матеріалі.

У другій частині підручника наведено тематичний матеріал стосовно лабораторної діагностики порушень метаболізму в організмі тварин за найпоширенішої патології внутрішніх органів із використанням біохімічних методів його аналізу (підготувала В. А. Грищенко). Важливе місце посідають концептуальні, теоретичні та методологічні основи ветеринарної біохімії; описано специфіку отримання нових результатів біохімічних досліджень за допомогою найсучасніших методів та приладів у лабораторній діагностиці на

національному та міжнародному рівнях; зазначаються молекулярні механізми патогенезу найпоширеніших хвороб тварин; особливості впливу фізіологічних, вікових, породних, сезонних та інших факторів на біохімічні процеси в організмі здорових тварин та обумовлені ними зміни біохімічних показників; правила забору проб біоматеріалу, належні умови його зберігання і транспортування до лабораторії; діагностичне значення результатів біохімічного дослідження біологічного матеріалу та його залежності від ступеня зв'язку досліджуваного параметра з патологічним процесом; індикаторні біохімічні показники (біохімічні констеляції) поширених патологічних процесів та хвороб тварин; методологія штучного моделювання окремих видів патології з використанням лабораторних тварин; принцип роботи біохімічних аналізаторів біологічних рідин організму; доаналітичний, аналітичний та постаналітичний етапи контролю діагностичною лабораторією якості процесу отримання біохімічних показників; чинні державні та Міжнародні стандарти у лабораторній справі.

У третій частині підручника представлено теоретичний матеріал, який присвячено питанням забезпечення якості діяльності біохімічних лабораторій (підготував В. І. Цвіліховський). Насамперед, це: стандарти для лабораторій, їх загальні положення (ISO 9001, ISO/IEC17025, ISO 15189, GLP); відбір проб та їх підготовка до аналізу, валідації аналітичних методик і правильність проведення вимірювань, а також правила проведення контролю якості та способи обробки даних.

Підручник містить також «Контрольні питання» і «Тести контролю знань» для самоперевірки, список «Рекомендованої літератури» до кожної із змістовних частин, в якому наводяться літературні першоджерела. Водночас теоретичний матеріал доповнено додатками і списком умовних позначень, що поліпшує засвоєння представлених питань. Підручник містить оновлену термінологію назв хімічних елементів та простих речовин згідно з ДСТУ 2439:2018 (Національний стандарт України, 2019).

За змістом, стилем, формою текстового та ілюстративного оформлення підручник орієнтований на аспірантів і молодих спеціалістів в області ветеринарії та її суміжних спеціальностей, які будуть працювати або вже працюють в діагностичних лабораторіях із використанням біохімічних методів аналізу речовин.

Автори висловлюють щиру вдячність усім, хто сприяв підготовці цього підручника, висловив критичні зауваження і побажання для його покращення. Вони будуть також вдячні всім, хто надасть будь-які пропозиції стосовно доповнення його змісту, що буде враховано у роботі над наступними виданнями.

РОЗДІЛ 1. БІОХІМІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ У ВЕТЕРИНАРІЇ

Основні питання: 1. Основні біохімічні методи дослідження – об'ємно-аналітичні, електрохімічні, оптичні, хроматографічні та електрофоретичні. 2. Принципи роботи спеціалізованого обладнання, необхідні матеріали та аксесуари.

Тема 1.1. Об'ємно-аналітичні методи дослідження

В основі кількісного хімічного аналізу лежить проведення хімічних реакцій між зразком, який досліджується, та підібраними й приготовленими реактивами. За кількістю витрачених реактивів або здобутих продуктів реакції розраховують склад аналізованого зразка.

Хімічний аналіз поділяють на *ваговий та об'ємний*. Ваговий (*гравіметричний*) аналіз базується на повному (кількісному) виділенні будь-якого компонента з аналізованого зразка у вигляді певної речовини з наступним точним зважуванням.

Об'ємний (*титриметричний*) аналіз ґрунтується на точному визначенні об'єму розчину речовини (відомої концентрації), який необхідний для повного перебігу реакції з даним об'ємом досліджуваного розчину. Кількість речовини у розчині визначають титруванням – до розчину з аналізованою речовиною поступово приливають розчин з точно відомою концентрацією речовин. Кінцеву точку титрування (*точку еквівалентності*) визначають за використання індикаторів чи фізико-хімічними методами (за електропровідністю, світлопропусканням тощо). За кількістю робочого розчину, що пішов на титрування, розраховують результати аналізу.

Типи титрування:

- *Пряме титрування* – розчин досліджуваної речовини безпосередньо титрують стандартним розчином (титрант).

- *Зворотне титрування* застосовують тоді, коли речовина, яка визначається, не реагує з титрантом. У цьому випадку до досліджуваного розчину додають надлишок (певний об'єм) розчину третьої речовини відомої концентрації, яка реагує з досліджуваною речовиною в еквівалентній кількості. Надлишок третьої речовини відтитровують стандартним розчином.

- *Замісне титрування* застосовують, якщо речовина, яка визначається, не взаємодіє з титрантом або реагує з ним не в стехіометричному відношенні. У цьому випадку до досліджуваного розчину додають спочатку явний надлишок реагенту, а потім титрують один з продуктів реакції титрантом.

1.1.1. Способи вираження концентрації розчинів

Розчини готуються з розрахункових кількостей окремих компонентів. При цьому тверді речовини беруться за масою, а рідкі – за об'ємом. Залежно від точності роботи речовини відважують на техніко-хімічних чи аналітичних

вагах, а рідину відмірюють мірними циліндрами чи скляними або автоматичними піпетками. Для розчинення наважки використовують колби чи хімічні стакани, або циліндри.

Для приготування розчину з певною концентрацією придатні лише ті речовини, які можуть бути отримані у чистому вигляді, мають постійний склад, не змінюються на повітрі та при зберіганні. До таких речовин належать багато солей (калію біхромат, натрію хлорид та ін.), кислот (щавлева, бурштинова). Речовини, які задовільняють перелічені вимоги, називаються *вихідними* або *стандартними*.

Кожний розчин має якісну та кількісну характеристику. Кількісний склад розчину визначається кількісним співвідношенням розчинника та розчиненої речовини і виражається кількістю або концентрацією розчинених речовин в одиниці об'єму.

Концентрація розчинів виражається найчастіше у відсотках – вагових, об'ємно-вагових або об'ємних, у грам-молях на 1 дм³ розчину, грам-еквівалентах на 1 дм³ розчину та титром.

Відсоткові розчини – це розчини, в яких концентрація визначається кількістю речовини в грамах у 100 г розчину (вагова відсоткова концентрація, m_b/m_a), кількістю речовини в грамах у 100 см³ розчину (об'ємно-вагова концентрація, m_b/V), кількістю мілілітрів розчиненої речовини у 100 см³ розчину (об'ємна концентрація, V/V):

$$C\% = \frac{m_b}{m_a + m_b} \cdot 100\%,$$

де m_b – маса розчиненої речовини; m_a – маса розчинника.

Молярні розчини (C_m або M) – це розчини, в 1 дм³ яких міститься певне число грам-молекул розчиненої речовини:

$$C_m = m/(V \cdot M),$$

де m – маса розчиненої речовини, г;

V – об'єм розчину, л;

M – молекулярна маса речовини.

Грам-молекула – це кількість речовини в грамах, яка чисельно дорівнює відносній молекулярній масі цієї речовини. Наприклад, молекулярна маса NaCl становить 58,45, тому грам-молекула NaCl дорівнює 58,45.

Користуватися молярними розчинами зручно в тому розумінні, що за однакової молярної концентрації рівні об'єми розчинів різних речовин містять однакове число молекул.

Нормальні розчини – це розчини, в 1 дм³ яких міститься грам-еквівалент розчиненої речовини (позначаються – n , або N):

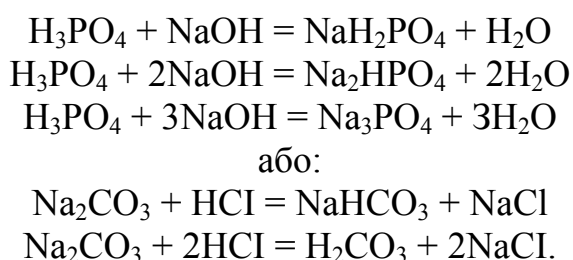
$$C_N = m/(V \cdot E).$$

Грам-еквівалент (г·екв.) – це кількість грамів речовини, еквівалентна (хімічно рівноцінна) грам-атому або грам-іону водню (1,008 г) у цій реакції. При визначенні еквівалента елемента необов'язково виходити з його сполуки з воднем. Еквівалент можна розрахувати за складом сполуки даного елемента з будь-яким іншим, еквівалент якого відомий.

Грам-еквівалент розраховується шляхом ділення молекулярної маси речовини (М) на число зарядів або електронів (n), які беруть участь у відповідній реакції:

$$E = M/n.$$

З цього випливає, що грам-еквівалент однієї і тієї ж речовини, яка вступає в різні реакції, може бути різним. Наприклад:



Грам-еквівалент речовини, яка бере участь в окисно-відновних реакціях, дорівнює молекулярній масі, поділеній на число відданих або прийнятих молекулою речовини електронів.

Через те, що хімічні речовини взаємодіють в еквівалентних кількостях, розчини однакової нормальності реагують у рівних об'ємах. У загальному випадку об'єми розчинів речовин, що прореагували, обернено пропорційні їхнім нормальностям:

$$V_1/V_2 = N_2/N_1 \quad \text{або} \quad N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2.$$

Титровані розчини. *Титр* – це кількість грамів розчиненої речовини в 1 см³ розчину; він розраховується шляхом поділу маси на об'єм (г/см³):

$$T = m/V.$$

Титр розчину за його нормальністю розраховують за формулою:

$$T = N \cdot E / 1000,$$

де N – нормальність розчину, E – еквівалент розчиненої речовини.

Титр розчину за його відсотковою концентрацією розраховують за формулою:

$$T = C_{\%} \cdot \rho / 100,$$

де $C\%$ – концентрація у відсотках; ρ – густина розчину, г/см^3 .

За точністю вираження концентрації розчини поділяють на *точні* й *наближені*. Точними розчинами вважаються молярні, нормальні і титровані; вони використовуються переважно для аналітичних досліджень. До наближених належать розчини, концентрація яких виражена у вагових або об'ємних відсотках.

1.1.2. Визначення густини розчинів

При виконанні тих чи інших біохімічних досліджень часто доводиться визначати густину деяких рідин – розчинів, кислот, спиртів, твердих та газоподібних речовин, а також біологічних речовин – сечі, молока тощо.

Густина (питома маса) – це відношення маси речовини до її об'єму; вона показує, у скільки разів маса аналізованої рідини більша або менша, ніж маса води, взятої в такому ж об'ємі:

$$\rho = \frac{m}{V},$$

де ρ – густина речовини, г/см^3 ;

m – маса речовини, г;

V – об'єм тіла, см^3 .

Розрізняють абсолютну та відносну густину. *Абсолютна густина* виражається в кілограмах на кубічний метр (кг/м^3). *Відносна густина* – це відношення густини досліджуваної речовини до густини дистильованої води при $t = 4^\circ \text{C}$ (іноді – іншої сполуки):

$$d = \frac{\rho_{\text{речовини}}}{\rho_{\text{води}}}.$$

У повсякденній практиці звичайно користуються відотною густиною. Визначати відносну густину рідин можна за допомогою ареометрів (рис. 1.1).

Ці вимірювальні прилади являють собою скляну трубку, яка розширюється донизу і заповнена свинцевим дробом, ртуттю або іншим важким матеріалом. У верхній, тоншій частині є шкала з поділками, яка показує густину рідини. При визначенні густини ареометр занурюється в розчин тим глибше, чим менша густина розчину. Іноді ареометри оснащені термометрами, що дозволяє одночасно вимірювати і температуру.

Густина розчину залежить і від температури: при її зниженні відносна густина збільшується, а при підвищенні – зменшується. Тому всі виміри густини розчинів слід проводити при постійній температурі. Густина розчину, як правило, залежить від концентрації: вона збільшується зі збільшенням концентрації розчиненої речовини.



Рис. 1.1. Ареометри різних типів

1.1.3. Види титриметричного аналізу

В основі титриметричного аналізу покладено такі типи хімічних реакцій:

- **нейтралізації** (*кисотно-лужне титрування*) – нейтралізація – реакції зі зміною рН розчинів.

- **окиснення-відновлення** (*перманганатометрія, йодометрія, хроматометрія*) – реакції, які протікають зі зміною окиснювально-відновних потенціалів в системі титрування.

- **осадження** (*аргентометрія, роданідометрія, меркуриметрія*) – реакції, які протікають з утворенням малорозчинної сполуки, при цьому змінюються концентрації осаджуваних іонів в розчині.

- **комплексоутворення** (*комплексонометрія*) – реакції, які засновані на утворенні комплексних сполук іонів металів (всіх, окрім одновалентних) з комплексоном. При цьому змінюються концентрації іонів металів в розчині, який титрується.

1. Метод нейтралізації. Основною реакцією в методі нейтралізації є реакція взаємодії іонів водню H^+ і гідроксид-іонів OH^- . Тому суть реакції нейтралізації полягає в перенесенні іонів водню (протонів) від кислоти до лугу. Кисотно-лужні реакції супроводжуються зміною концентрації іонів водню, які визначаються у методах кисотно-лужного титрування.

Використовуючи розчин будь-якої кислоти (органічної або неорганічної), можна визначати кількість лугу (*ацидиметрія*), а використовуючи титровані розчини лугів – кислоти (*алкаліметрія*). За допомогою цього методу визначають також деякі солі, що мають сильнолужну реакцію внаслідок гідролізу і тому титруються кислотами (наприклад Na_2CO_3 , $Na_2B_4O_7$).

При титруванні за методом нейтралізації, по-перше, слід зафіксувати момент, коли кислотність або лужність розчину досягне потрібного значення, а по-друге, визначити, за якого рівня кислотності або лужності розчину титрування слід закінчувати.

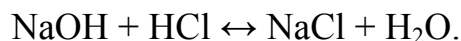
Момент закінчення реакції титрування, тобто *точку еквівалентності*, як правило, визначають за зміною кольору індикатора – речовини, яка змінює своє забарвлення залежно від значення рН розчину. Очевидно, що відповідно до того, в кислому або лужному середовищі знаходиться індикатор, його власна дисоціація буде зменшуватись або зростати, про що і свідчити колір розчину (табл. 1.1).

Таблиця 1.1. Залежність кольору індикатора від рН розчину

Індикатор	Колір розчину		рН розчину
	у кислому середовищі	у лужному середовищі	
Метиловий оранжевий	Рожевий	Жовтий	3,1–4,4
Метиловий червоний	Червоний	Жовтий	4,2–6,2
Лакмус	Червоний	Синій	5,0–8,0
Нейтральний червоний	Червоний	Жовтий	6,8–8,0
Фенолфталеїн	Безбарвний	Червоно-фіолетовий	8,2–10

Титрування закінчують у різних середовищах залежно від сили кислот і лугів, що нейтралізуються.

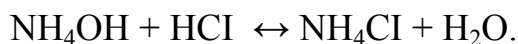
1. Титрування сильного лугу сильною кислотою, або навпаки. Наприклад, розчин NaOH титрують розчином HCl:



Утворений NaCl є сіллю сильного лугу і сильної кислоти, яка не піддається гідролізу, і тому в точці еквівалентності рН розчину не змінюється і дорівнює 7.

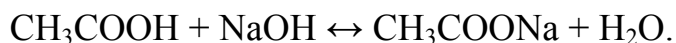
Найбільш придатним індикатором у цьому разі є лакмус або нейтральний червоний, але, якщо в розчині присутній CO₂, застосовують метиловий оранжевий; за відсутності CO₂ можна титрувати з фенолфталеїном.

2. Титрування слабкого лугу сильною кислотою, або навпаки. Наприклад, розчин NH₄OH титрують розчином HCl:



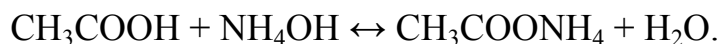
Унаслідок гідролізу утвореної солі слабкого лугу і сильної кислоти NH₄Cl у точці еквівалентності розчин має слабо кислу реакцію (рН = 5,2). Тому при титруванні слід застосовувати індикатор з інтервалом переходу забарвлення за рН 4,4–6,2, тобто метиловий червоний.

3. Титрування слабкої кислоти сильним лугом, або навпаки. Наприклад, розчин CH₃COOH титрують розчином NaOH:



У точці еквівалентності внаслідок гідролізу утвореної солі слабкої кислоти і сильного лугу CH_3COONa реакція розчину слабко лужна ($\text{pH} \approx 8,9$). Тому при титруванні слід застосовувати індикатор з інтервалом переходу забарвлення за $\text{pH} 8,2\text{--}10,0$, тобто фенолфталеїн.

4. Титрування слабкої кислоти слабким лугом, або навпаки. Наприклад, розчин CH_3COOH титрують розчином NH_4OH :



У точці еквівалентності реакція середовища нейтральна. Теоретично таке титрування треба проводити, застосовуючи індикатор з інтервалом переходу забарвлення за $\text{pH} 7,0$, але практично таке титрування неможливе, тому що в точці еквівалентності не відбувається різкої зміни pH розчину, внаслідок чого забарвлення індикатора також не змінюється. Пояснюється це тим, що слабко-дисоційовані кислоти й луги не здатні спричинити різкої зміни дисоціацій індикатора.

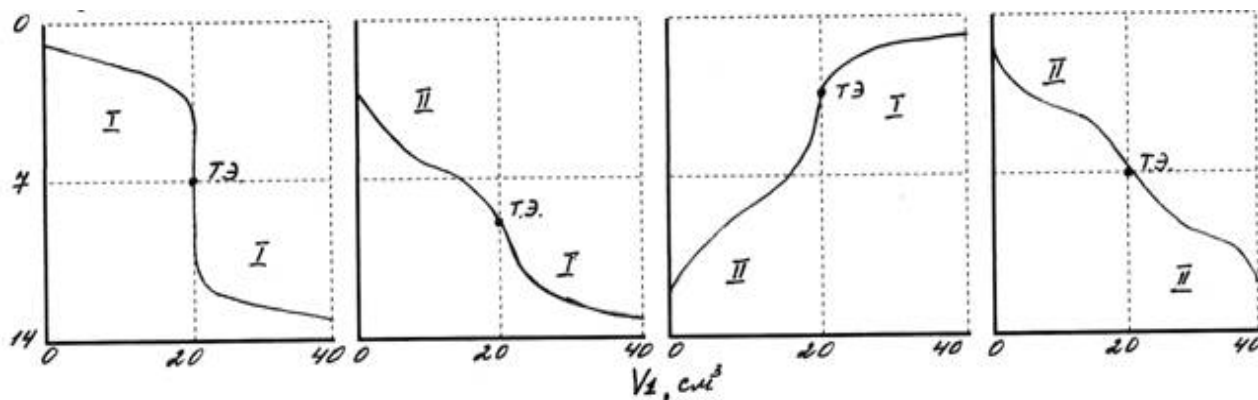
Залежність pH титрованого розчину від об'єму прилитого розчину лугу і його концентрації зручно виражати графічно, відкладаючи по осі ординат значення pH , а по осі абсцис – об'єми лугу.

Крива, яка виражає зміну значення pH титрованого розчину в залежності від об'єму прилитого робочого розчину називається кривою титрування. Горизонтальну лінію, яка проходить через точку, що відповідає $\text{pH} = 7$, називають лінією нейтральності, а вертикальну, яка проходить через точку еквівалентності, – лінією еквівалентності. Форма кривої титрування буде визначатися характером взаємодії титруемого і робочого розчину, тобто силою кислоти і лугу (рис. 1.2).

Момент закінчення титрування встановлюють за зміною кольору кислотно-основного індикатора. Індикатор слід вибирати у відповідності з кривою титрування таким чином, щоб стрибок титрування відповідав інтервалу переходу індикатора в точці еквівалентності. Точку еквівалентності можна також встановлювати за допомогою спеціальних приладів, наприклад pH -метрів.

2. Методи оксидиметрії. При оксидиметричному титруванні використовуються реакції окиснення-відновлення, які супроводжуються переходом електронів від одних молекул, атомів, іонів (відновників) до інших (окисників). Унаслідок цього змінюються ступені окиснення атомів, що входять до складу реагуючих речовин. *Окиснення* – це процес віддачі електронів, а *відновлення* – процес їх приєднання. Тому ступінь окиснення атома зростає при окисненні і зменшується при відновленні.

Робочими розчинами в оксидиметрії є розчин окисників (KMnO_4 , I_2 , $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, KBrO_3 та ін.) і відновників ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, SnCl_2 , NaAsO_2 та ін.).



**Сильної
кислоти
сильною
основою**

**Слабкої
кислоти
сильною
основою**

**Слабкої основи
сильною
кислотою**

**Слабкої
кислоти
слабкою
основою**

Рис. 1.2. Криві титрування

Усі методи оксидиметрії класифікують залежно від окисника або відновника, які використовуються в робочому розчині. Наприклад, якщо метод базується на окисненні перманганатом, його називають *перманганатометрією*, на окисненні йодом – *йодометрією*, на окисненні хроматом – *хроматометрією* та ін.

Йодометрія. Вільний йод здатен забирати електрони від речовин, які легко їх віддають (відновники), і тому є окисником. Іони I^- під впливом речовин, які здатні приєднувати електрони – окисників, легко віддають їх і виступають таким чином як відновники.

Виходячи з цього, можна констатувати, що метод йодометрії ґрунтується на окисно-відновних процесах, які пов'язані з перетворенням елементарного йоду на іони I^- , або навпаки. Речовини, які окиснюються, можна визначати за кількістю вільного йоду, який вступає в реакцію з ними. Відновлюючі речовини визначаються за кількістю виділеного при реакції з ними вільного йоду. Таким чином, визначаючи кількість йоду до і після реакції можна обчислити кількість окисненої або відновленої речовини.

В якості робочого розчину застосовують розчин натрію тіосульфату $Na_2S_2O_3$ та йоду, а індикатором виступає крохмаль.

3. Методи осадження. Методами осадження називають методи об'ємного аналізу, які ґрунтуються на використанні реакцій, що супроводжуються випадінням осаду.

Реакції осадження належать до оборотних іонообмінних реакцій. Вони відбуваються в тому випадку, коли протилежно заряджені іони двох розчинних речовин-електролітів утворюють малорозчинну речовину.

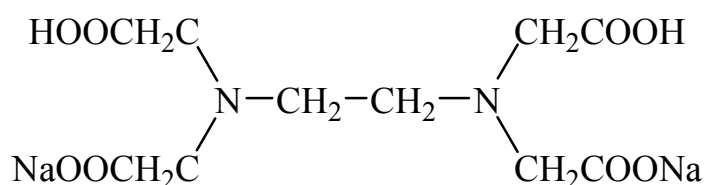
Але як відомо, випадінням осаду супроводжується досить велика кількість хімічних реакцій, проте далеко не всі з них можуть бути використані для об'ємно-аналітичних визначень. Багато подібних реакцій не відповідають

певним вимогам щодо характеру осаду, повноти осадження, можливості підбору відповідного індикатора.

Необхідною умовою придатності реакцій осадження для об'ємних визначень, як і у випадку інших об'ємно-аналітичних методів, є можливість точного спостереження моменту закінчення реакції (точки еквівалентності).

Найпоширенішими методами осадження є аргентометрія, роданідометрія та меркуриметрія.

4. Метод комплексометрії. Комплексонометричний метод аналізу ґрунтується на використанні реакцій, які супроводжуються утворенням комплексних сполук катіонів з комплексонами – органічними речовинами, які відносяться до класу амінополікарбонових кислот. У комплексонометрії використовують такі комплексоутворювачі – нітрилотриоцтова кислота (комплексон I) $N(CH_2COOH)_3$, етилендіамінтетраоцтова кислота (комплексон II, ЕДТА) $(HOOCCH_2)_2N(CH_2)_2N(CH_2COOH)_2$, динатрієва сіль етилендіамінтетраоцтової кислоти (комплексон III, трилон Б, ЕДТА-Na). У біохімічній практиці найбільш використовується останній комплексон – трилон Б, структурна формула якого має такий вигляд:



Ця сполука містить як карбокисльні групи (-COOH), так і амінний азот (N^+), тому вона водночас проявляє властивості кислоти, яка здатна утворювати солі з різними катіонами, і властивості комплексоутворюючої речовини.

ЕДТА-Na (ЕДТА) утворює комплексні сполуки (внутрішньо комплексні солі) практично з усіма іонами металів, включаючи лужноземельні та лужні метали. Подібні внутрішньо комплексні солі утворюються, з одного боку, за рахунок заміщення іонами металу-комплексоутворювача активних атомів Гідрогену карбоксильних груп, з якими він сполучається за допомогою головних валентностей, а з іншого – взаємодії з атомами азоту, які здатні поєднуватися з даним іоном металу-комплексоутворювача за допомогою побічної (координаційної валентності).

Робочими розчинами в комплексонометрії є розчини комплексонів. До аналізованого розчину при титруванні додається буферний розчин для створення потрібного значення рН та індикатор. Для встановлення точки еквівалентності застосовують спеціальні металоіндикатори органічної природи – мурексид, еріохром чорний Т (хромоген спеціальний ЕТОО), кислотний хром темно-синій та деякі інші. Їхній колір різко відрізняється від кольору розчину самого індикатора. Поблизу точки еквівалентності, коли майже всі катіони, що визначаються, зв'язуються з комплексонами в комплекс, тобто концентрація іонів, що визначаються, різко зменшується, забарвлення розчину змінюється.

Методично комплексонометричні визначення можна проводити прямим або зворотнім титруванням. При прямому визначенні титрування проводять за певного значення рН стандартним (робочим) розчином ЕДТА. Точку еквівалентності встановлюють за допомогою металоіндикаторів, де початковий колір комплексної сполуки, яка утворена індикатором з катіоном, що визначається, зникає і з'являється забарвлення, яке властиве вільному індикатору. При зворотному титруванні до аналізованого розчину додають вимірний об'єм стандартного розчину ЕДТА, надлишок якого відтитровують стандартним розчином солі цинку. Користуючись методами комплексоутворення можна кількісно визначати катіони (Ag^+ , Hg^{2+} , Al^{3+} та ін.) та аніони (CN^- , F^- , Cl^- та ін.), які здатні вступати в реакцію комплексоутворення.

Тема 1.2. Електрохімічні методи аналізу

Електрохімічні методи аналізу (ЕХМА) – група методів кількісного хімічного аналізу, в основі яких лежать електрохімічні процеси. Для них характерні висока чутливість і селективність, швидкість відгуку на зміну складу аналізованого об'єкта, легкість автоматизації та можливість дистанційного управління. І, нарешті, вони не вимагають дорогого аналітичного устаткування і можуть застосовуватися в лабораторних і виробничих умовах.

Електрохімічні методи аналізу засновані на дослідженні процесів, що протікають на поверхні електрода або в навколоелектродному просторі. Аналітичним сигналом служить електричний параметр (електричний потенціал, сила струму, опір та ін.), який піддається вимірюванню. За вимірюваним електричним параметром системи, ЕХМА поділяють на *потенціометрію* (вимірюють E , B при $I = 0$ А), *вольтамперометрію* (вимірюють I , А як функцію від накладеного ззовні E , B), *кулонометрію* (вимірюють Q , Кл при $I = \text{const}$ або $E = \text{const}$), *кондуктометрію* (вимірюють W , См або Ом^{-1}). Деякі електрохімічні методи використовуються для визначення кінцевої точки титрування (*амперметричне титрування*, *кондуктометричне титрування*, *кулонометричне титрування*).

1.2.1. Вольтамперометрія

Вольтамперометрія – це електрохімічний метод якісного та кількісного аналізу, який ґрунтується на реєстрації вольт-амперних кривих (вольтамперограм) – залежності між силою електричного струму I у ланцюзі і напругою E при електролізі розчину досліджуваної речовини. У розчин занурюють індикаторний мікроелектрод, на якому досліджувана електрохімічно активна (електроактивна) речовина – деполяризатор відновлюється чи окиснюється, і неполяризований допоміжний електрод порівняння, потенціал якого залишається практично незмінним при електролізі.

Залежно від типу індикаторного електрода розрізняють *полярографію* (ртутний капаючий мікроелектрод, а спеціальний прилад – *полярограф*) та

вольтамперометрію (будь-який мікроелектрод, крім капаючого ртутного). Вольтамперометричні методи, залежно від способу проведення аналізу, поділяють на прямі та непрямі (амперметричне титрування). Зміна електричного потенціалу мікроелектрода під дією прикладеної напруги спричиняє виникнення струму у ланцюзі. Вольтамперометрію застосовують: для кількісного аналізу неорганічних і органічних речовин у дуже широкому інтервалі – від 10^{-10} до десятків %.

З метою зменшення електричного опору розчину до нього додають надлишок індиферентного електроліту (фоновому), іони якого не відновлюються і не окиснюються в умовах електролізу. Фоновий електроліт також дозволяє усунути міграційний струм, який виникає за рахунок міграції частинок деполяризатора під дією електричного поля.

1.2.2. Кондуктометрія

Кондуктометричні методи аналізу засновані на вимірюванні електропровідності досліджуваних розчинів і застосовуються для визначення концентрації солей, кислот, лугів і т. д. *Електропровідність* – здатність речовини проводити електричний струм. Обернена їй величина називається *електричним опором*. Електропровідність (іонна провідність) розчину (W) обернена величині опору (R):

$$W=1/R.$$

Одиниця виміру електропровідності – сіменс (См) або Ом^{-1} .

Більшість рідин не мають вільних носіїв заряду і є діелектриками. Виняток становлять електроліти, наприклад вода чи розчини солей у воді. В електролітах частина нейтральних молекул дисоціює, утворюючи негативно та позитивно заряджені іони. Електропровідність електролітів зумовлена рухом цих іонів до аноду і катоду, відповідно. Електропровідність електроліта є адитивною величиною, тобто визначається властивостями всіх іонів, які присутні в розчині. Електропровідність залежить від кількості носіїв заряду в одиниці об'єму розчину (концентрації), їх складу та рухомості. Отже, електропровідність розчину є показником концентрації розчиненої речовини, а вимірювання електропровідності розчинів може бути використане для кількісного визначення хімічного складу розчину (кондуктометрія).

В аналітичній хімії користуються *питомою електропровідністю* (χ) – здатністю розчину електроліту проводити електричний струм – величина, яка обернена *питомому опору* розчину (ρ).

$$\chi = 1/\rho.$$

У Міжнародній системі одиниць СІ питома електропровідність вимірюється в сименсах на метр ($\text{См} \cdot \text{м}^{-1}$) чи в $\text{Ом}^{-1} \cdot \text{м}^{-1}$.

Величина питомої електропровідності електроліту залежить від ряду факторів: природи електроліту, температури, концентрації розчину.

Для виключення впливу концентрації на величину електропровідності введено поняття молярної електропровідності:

$$\Lambda = \chi / C.$$

Молярна електропровідність (Λ) – це електропровідність молярного розчину вміщеного між двома електродами площею 1 м^2 , які знаходяться на відстані 1 м один від одного. Одиницею виміру Λ в системі одиниць СІ є $\text{Ом}^{-1} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{моль}^{-1}$. Якщо кількість речовини виражають в моль-екв, то величину Λ називають *еквівалентною електропровідністю* і виражають в $\text{Ом}^{-1} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{моль-екв}^{-1}$. Молярна електропровідність збільшується зі зменшенням концентрації електроліту і, за нескінченного розбавлення, коли взаємний вплив іонів майже відсутній, вона досягає максимального (граничного) значення:

$$\Lambda = \Lambda^0 + B \cdot \sqrt{C},$$

де Λ^0 – гранична молярна електропровідність, $\text{Ом}^{-1} \cdot \text{м}^2 \cdot \text{моль}^{-1}$; B – емпіричний коефіцієнт.

Залежність електропровідності розчинів електролітів від концентрації та природи заряджених частинок, що їх складають покладено в основу кондуктометричних методів аналізу.

Пряма кондуктометрія – метод, що дозволяє безпосередньо визначати концентрацію електроліту шляхом вимірювання електропровідності розчину з відомим якісним складом.

Враховуючи лінійний характер залежності питомої електропровідності розчинів від концентрації електролітів для практичного використання рекомендується цілий ряд експрес методів, заснованих на даному електрохімічному ефекті. Наприклад, на основі кондуктометрії розроблена методика визначення масової частки кухонної солі в сичужним сирі. При цьому в якості аналізованого об'єкта використовувалася водна витяжка сичужного сиру.

Кондуктометричне титрування – метод аналізу, заснований на визначенні вмісту речовини в процесі титрування аналізованого розчину порціями відомого реагенту до перегину кривої титрування. Криву будують за вимірюваннями питомої електропровідності аналізованого розчину, яка змінюється в результаті хімічних реакцій в процесі титрування.

Точність кондуктометричного титрування становить 1% , але якщо взяти заходів щодо термостатування аналізованого розчину, то точність визначення можна в кілька разів збільшити. Точка еквівалентності на графіку обумовлюється перетином двох прямих. Одна пряма (до точки еквівалентності) відображає зміну концентрації аналізованого іона та іонів титранту, а інша (після точки еквівалентності) є наслідком збільшення концентрації іонів титранту.

Хронокондуктометричне титрування – засноване на визначенні вмісту речовини за витраченим на титрування часу, яке автоматично фіксується на діаграмній стрічці реєстратора кривої титрування.

Прилад, який використовується для вимірювання електропровідності електrolітів (розчинів, колоїдних систем, розплавів), називається **кондуктометр** (рис. 1.3).

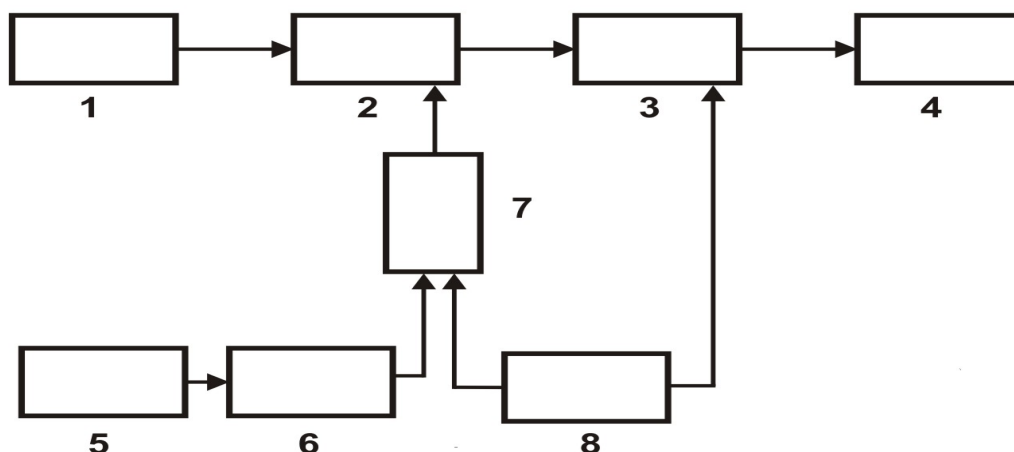


Рис. 1.3. Блок-схема кондуктометра АК-215: 1 – датчик електропровідності; 2 – перетворювач; 3 – синхронний детектор; 4 – нормуючий перетворювач 0–5 мА; 5 – датчик температур; 6 – нормуючий посилювач; 7 – електронний комутатор; 8 – генератор

Особливості кондуктометричних методів аналізу:

1. Можливість проводити визначення не тільки у прозорих, але і в забарвлених і каламутних розчинах, а також у присутності окислювачів, відновників органічних речовин.

2. Висока чутливість методу, що дозволяє працювати з розведеними розчинами.

3. Аналіз водних та органічних розчинів.

4. Можливість автоматизації процесу (хронокондуктометрія).

5. У багатьох випадках відсутність необхідності проводити попередню пробопідготовки.

6. Простота визначення кінцевої точки титрування.

7. Можливість проведення диференційованого титрування сумішей електrolітів, що неможливо при титруванні з візуальною індикацією кінцевої точки титрування.

1.2.3. Потенціометрія

Потенціометричний метод – базується на залежності рівноважного потенціалу електрода від активності (концентрації) досліджуваного іона. Для реєстрації потенціалу необхідно скласти *гальванічний елемент* (ГЕ) з

індикаторного електрода та електрода порівняння (потенціал якого не залежить від складу досліджуваного розчину) (рис. 1.4).

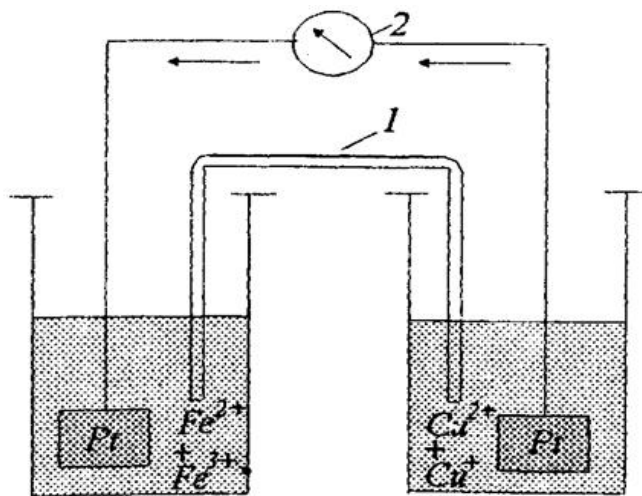


Рис. 1.4. Схема гальванічного елементу: 1 – соляний місток; 2 – мілівольтметр

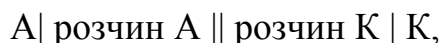
Електрорушійна сила (ЕРС) гальванічного елемента визначається рівнянням:

$$ЕРС = E_k - E_a,$$

де E_k – потенціал катода (позитивний електрод ГЕ, на якому відбуваються процеси відновлення);

E_a – потенціал анода (негативний електрод ГЕ, на якому відбуваються процеси окиснення).

Схематично ГЕ, як і будь-яку електрохімічну комірку, записують наступним чином:



де А та К – матеріал, з якого виготовлено анод та катод, відповідно; розчин А – склад розчину, в який занурено відповідний електрод; знак || застосовують якщо катодний і анодний простори розділені повністю (дифузійний потенціал елімінований за допомогою сольового містка), знак | застосовують у випадку розділення катодного і анодного просторів напівпроникною мембраною.

Виміряти потенціал одного електрода не можливо, але можна виміряти різницю потенціалів індикаторного електрода та електрода порівняння – ЕРС редокс-пари.

При постійній величині потенціалу одного електрода за значенням електрорушійної сили можна визначити потенціал другого електрода редокс-пари. Електрод, потенціал якого порівнюється з другим електродом у гальванічному елементі і умовно приймається рівним нулю називається

електрод порівняння (стандартний електрод). У якості електродів порівняння використовують каломельні та хлор-срібні електроди.

Каломельний електрод складається з металевої ртуті і розчину калію хлориду, насиченому відносно ртуті хлористої (каломелі).

Хлор-срібний електрод складається із срібного дроту, вкритого рівномірним шаром срібла хлориду в розчині, що містить калію хлорид до насичення. Потенціал цих електродів характеризується стійкістю під час проведення потенціометричного вимірювання, а зміна електрорушійної сили електродної пари буде залежати від потенціалу другого електроду пари.

Індикаторний електрод – це електрод, потенціал якого змінюється в залежності від концентрації іонів. Електроди поділяються наступним чином:

- електроди на основі рідких катіонів, наприклад, калій-, натрій-, кальцій-селективні електроди;
- електроди на основі рідких аніонів, наприклад, нітрат-, фосфат-, карбонат-селективні електроди;
- електроди з твердими мембранами, наприклад, фторидів лантану, берилію, бору, сульфідно- та галогенідо-селективні електроди;
- скляні електроди;
- газові електроди, що містять мембрану, яка проникна для газів, наприклад, O_2 , CO_2 , H_2S ;
- ензимні (ферментні);
- напівпровідникові.

Взагалі для кожної реакції, як правило підбирається відповідний індикаторний електрод. Цей вибір залежить від типу реакції, інтервалу змін рН, часу вимірювання тощо, наприклад: хінгідриновий, скляний – для реакцій нейтралізації; срібний і ртутний – для реакцій осадження і комплексоутворення; індиферентні метали (платина, паладій, золото) – для окисно-відновного титрування.

Рівновісний потенціал індикаторного електроду зв'язаний з активністю (у наближенні концентрації) іонів, які приймають участь в електродному процесі за рівнянням *Нернста*:

$$E = E^\circ + R \cdot T / (n \cdot F) \ln (a_{\text{окис}} / a_{\text{віднов}}),$$

де R – універсальна газова стала (8,31 Дж/(моль·К));

T – абсолютна температура;

F – постійна Фарадея (96500 Кл/моль);

n – число електронів, які беруть участь в реакції; $a_{\text{окис}}$, $a_{\text{віднов}}$ – активності відповідно окисненої та відновленої форм редокс-системи;

E° – стандартний потенціал редокс-системи.

Потенціометричний метод використовують для визначення концентрації іонів в розчині (*пряма потенціометрія*) та *потенціометричного титрування*, коли еквівалентну точку визначають за різкою зміною потенціалу.

Пряма потенціометрія. Методом прямої потенціометрії визначають концентрацію іонів водню (рН-метрія) і деяких інших іонів: K^+ , Na^+ , Cl^- , F^- , NH_4^+ (іонометрія).

Для визначення рН частіше всього використовують скляні електроди. Вони являють собою трубку, до кінця якої припаяна кулька. Всередині електроду знаходиться хлористоводнева кислота (HCl), насичений розчин AgCl та срібний дріт, тому розчин має постійну активність (концентрацію) іонів водню. При вимірюванні рН розчину між внутрішньою та зовнішньою поверхнями скляної мембрани виникає різниця потенціалів. При цьому потенціал внутрішньої поверхні залишається практично постійним, а потенціал зовнішньої поверхні залежить від рН розчину, який аналізується. Перевагами скляного електроду є простота роботи, швидке встановлення рівноваги та можливість визначення рН в окисню-вально-відновних системах.

У прямій потенціометрії градування електрохімічної комірки полягає в тому, що її по черзі заповнюють стандартними розчинами іону (X), занурюють в неї іонселективний електрод та вимірюють $E_{ст}$. Із залежності $E_{ст}$ від $lgc(X)$ знаходять параметри E^0 та θ , а потім досліджуваному розчині вимірюють E_x та визначають:

$$lgc(X) = \frac{E_x - E^0}{\theta}$$

де θ – стала величина для конкретної електрохімічної комірки, яка близька до теоретичного значення, що підраховується як $R \cdot T / (n \cdot F)$.

Потенціометричне титрування. Потенціометричне титрування засноване на визначенні точки еквівалентності за результатами потенціометричних вимірів. Поблизу точки еквівалентності відбувається різка зміна (стрибок) потенціалу індикаторного електроду. Так само, як і в інших титрометричних методах, реакції титрування потенціометра повинні протікати строго стехіометрично, мати високу швидкість і йти до кінця.

Для потенціометричного титрування збирають ланцюг з індикаторного електроду в аналізованому розчині і електроду порівняння. В якості електродів порівняння найчастіше використовують каломельний або хлор-срібний електроди. Тип індикаторного електроду залежить від властивостей розчину, що піддається титруванню, та його взаємодії з електродом.

Для знаходження точки еквівалентності часто будують диференціальну криву в координатах ($\Delta E / \Delta V - V$). На точку еквівалентності вказує максимум отриманої кривої, а відлік по осі абсцис, відповідний цьому максимуму, дає об'єм титранта (V), який витрачений на титрування до точки еквівалентності.

Основними перевагами методу потенціометричного титрування є висока точність і можливість проводити визначення в розбавлених розчинах, в каламутних і забарвлених середовищах, а також визначати декілька речовин в одному розчині без попереднього розділення. Значно розширюється сфера практичного застосування потенціометричного титрування при використанні

неводних розчинників. Воно дозволяє аналізувати багатокомпонентні системи, які у водному розчині визначити не можливе, провести аналіз речовин, що нерозчинні або розкладаються у воді. Потенціометричне титрування легко може бути автоматизоване.

Серед недоліків методу можна відмітити не завжди швидке встановлення потенціалу після додавання титранту та необхідність у багатьох випадках проводити при титруванні велику кількість відліків.

У потенціометричному аналізі основними вимірювальними приладами є потенціометри різних типів. Вони призначені для виміру ЕРС електродної системи. Оскільки ЕРС залежить від концентрації (активності) відповідних іонів в розчині, багато потенціометрів дозволяють безпосередньо вимірювати також величину pX – від’ємний десятичний логарифм концентрації іона X . Такий потенціометр в комплекті з відповідним іон-селективним електродом носить назву *іономер*. Якщо потенціометр і електродна система призначена для вимірювання лише іонів водню, прилад називається *pH-метром* (рис. 1.5).

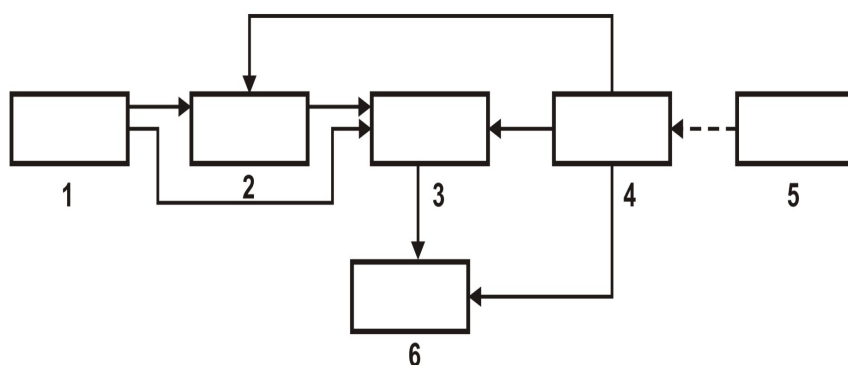


Рис. 1.5. Блок-схема pH-метра: 1 – гніздо для підключення електродної системи; 2 – вхідний посилювач; 3 – блок вимірювання; 4 – блок живлення; 5 – блок мережевого живлення; 6 – аналого-цифровий перетворювач і індикатор.

PH-МЕТР PH-1014

Оснащується електродом для вимірюванням pH м'яса. Можливе використання приладу для ветеринарно-санітарної експертизи.

Особливості:

- автоматична температурна компенсація показань;
- в пам'яті приладу зберігаються значення pH стандартних буферних розчинів;
- три незалежних режими роботи – pH-метр, термометр, мВ-метр;
- простота калібровки;
- корекція не лінійності електродної характеристики;
- зберігання результатів калібровки;
- можливість підключення електродів різних типів.



Тема 1.3. Оптичні методи аналізу

Електромагнітне випромінювання оптичного діапазону – оптичне (світлове) випромінювання – термін поєднує видиме світло, інфрачервоне та ультрафіолетове випромінювання.

До оптичного діапазону відносяться електромагнітні хвилі з довжиною від 100 до 10000 нм, яке розділяють на три області :

- ультрафіолетову (УФ) 100–380 нм;
- видиму 380–760 нм;
- інфрачервону (ІЧ) 760–10000 нм.

Світло, як і інші електромагнітні хвилі характеризується *частотою, довжиною хвилі, поляризацією та інтенсивністю (визначається амплітудою хвилі)*. У вакуумі світло розповсюджується зі сталою швидкістю (~300000 км/с). Швидкість поширення світла в речовині залежить від властивостей речовини і загалом менша від швидкості світла у вакуумі.

Світло, як електромагнітне випромінювання, має природу частки та хвилі одночасно. Випромінювання і поглинання світла відбувається квантами чи фотонами, енергія яких залежить від частоти:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda,$$

де E – енергія кванта, ν – частота випромінювання, c – швидкість поширення електромагнітної хвилі у вакуумі, h – стала Планка ($6,62 \cdot 10^{-34}$ Дж/с), λ – довжина хвилі.

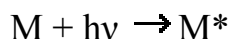
Випромінювання, яке має тільки одну довжину хвилі називається *монохроматичним*, а яке охоплює більший інтервал – *поліхроматичним*. Властивості світла, від яких залежить сприйняття кольору, обумовлені довжиною хвилі чи частотою. Кожний колір в однорідному середовищі відповідає певній довжині хвилі та частоті. При переході в інше середовище довжина хвилі може змінюватись, а частота – ні. Відповідність між характеристиками монохроматичного світла та кольорами подано в табл. 1.2.

Таблиця 1.2. Відповідність частот електромагнітного випромінювання та кольорів

Колір	Діапазон довжин хвиль, нм	Діапазон частот, ТГц	Діапазон енергії фотонів, еВ
Фіолетовий	380–440	790–680	2,82–3,26
Синій	440–485	680–620	2,56–2,82
Блакитний	485–500	620–600	2,48–2,56
Зелений	500–565	600–530	2,19–2,48
Жовтий	565–590	530–510	2,10–2,19
Помаранчевий	590–625	510–480	1,98–2,10
Червоний	625–740	480–405	1,68–1,98

Потік світлової енергії, потрапляючи на речовину, частково відбивається та проходить через шар поглинаючої речовини. При проходженні випромінювання через речовину відбувається селективне його поглинання із певними частотами.

Поглинання електромагнітного випромінювання речовиною (М) можна представити наступним чином:

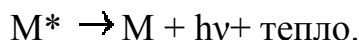


M^* - атом чи молекула у збудженому стані.

Час перебування в цьому стані дуже малий (10^{-9} – 10^{-10} с), а повернення до основного стану частіше всього супроводжується виділенням тепла:



Можливий розпад M^* з утворенням нових речовин – фотохімічна реакція. Крім того, повернення до основного стану супроводжується виділенням фотона – флуоресценція.



Оскільки час життя M^* дуже малий то концентрація цих часток в будь-який момент часу при нормальних умовах незначна, а кількість тепла, що виділяється, невідчутна. Тому опромінення системи в процесі випромінювання супроводжується мінімальними її пошкодженнями, що є перевагою абсорбційних методів.

При переході світла із одного середовища в інше змінюється швидкість його розповсюдження, що призводить до *заломлення*. Поряд із заломленням на межі двох середовищ світло може також *відбиватись*. Заломлення та відбиття світла використовуються в різноманітних оптичних приладах: призмах, лінзах, дзеркалах.

Закон Бугера-Ламберта-Бера. Потік світлової енергії, проходячи крізь речовину, послаблюється. При цьому інтенсивність початкового випромінювання I_0 зменшується до значення I . Відношення цих інтенсивностей називають *пропусканням* або *коефіцієнтом пропускання*.

$$T = I/I_0,$$

де I_0 інтенсивність падаючого світлового потоку, I – інтенсивність потоку світла, яке пройшло через речовину.

Пропускання виражають, як правило, у відсотках. Для абсолютно прозорих розчинів $T = 100\%$, для абсолютно непрозорих $T = 0$. Коефіцієнт пропускання пов'язаний із оптичною густиною співвідношенням:

$$T = 10^{-A} \quad \text{або} \quad A = -\lg T = -\lg I/I_0$$

Зниження інтенсивності залежить від концентрації речовини, що поглинає, та довжини шляху, який цей потік проходить. Зниження інтенсивності випромінювання при його проходженні через розчин підчиняється *закону Бугера-Ламберта-Бера*.

Згідно із цим законом:

$$\frac{I}{I_0} = 10^{-\epsilon \cdot l \cdot c}$$

або

$$-\lg T = A = \epsilon \cdot l \cdot c,$$

де A – оптична густина світопоглинання (екстинція);

l – оптичний шлях (см), який дорівнює товщині зразка (кювети, в якій поміщують розчин);

c – молярна концентрація розчину речовини (моль/дм³);

ϵ – молярний коефіцієнт поглинання речовини, що поглинає світло, при певній довжині хвилі падаючого світла.

Фізичний зміст молярного коефіцієнта поглинання дорівнює значенню A речовини з концентрацією 1 моль/дм³ при довжині оптичного шляху 1 см. Молярний коефіцієнт поглинання – індивідуальна характеристика речовини, він залежить від природи речовини та довжини хвилі і не залежить від концентрації та довжини кювети. Максимально можливе значення ϵ складає $\sim 10^5$ дм³ см⁻¹ · моль⁻¹.

У науковій літературі часто зустрічаються різні назви та позначення одних і тих же величин (табл. 1.3).

Закон Бугера-Ламберта-Бера лежить в основі визначення концентрації речовини за величиною їх екстинції. Однак не завжди спостерігається лінійна залежність між екстинцією A і молярною концентрацією c .

Таблиця 1.3. Основні величини, які використовуються в абсорбційній спектроскопії

Величина і позначення	Визначення	Розмірність	Інша назва і позначення
Пропускання, T	I/I_0	безрозмірна	прозорість, T
Оптична густина, A	$\lg I_0/I$	безрозмірна	поглинання, D екстинкція, E
Молярний коефіцієнт поглинання, ϵ	$A/l \cdot c$	дм ³ /см · моль	молярний коефіцієнт екстинкції, k
Товщина шару (довжина кювети), l	-	см	b, d

Відхилення від основного закону світлопоглинання обумовлені двома причинами: немонохроматичністю потоку енергії і станом досліджуваної речовини.

Класифікація оптичних методів. До *оптичних методів* аналізу відносять фізико-хімічні методи, засновані на взаємодії електромагнітного випромінювання з речовиною. Ця взаємодія приводить до різних енергетичних переходів, які реєструються експериментально у вигляді поглинання випромінювання, віддзеркалення і розсіяння електромагнітного випромінювання.

У залежності від характеру взаємодії речовини з електромагнітним випромінюванням оптичні методи розділяють на:

- *абсорбційні* (засновані на вимірюванні поглинання речовиною світлового випромінювання). До них відносять колориметрію, фотоколориметрію, спектрофотометрію, атомно-адсорбційні методи;
- *емісійні* (засновані на вимірюванні інтенсивності світла, випромінюваного речовиною). До них відносяться флуориметрія, емісійний спектральний аналіз.

Методи, які пов'язані із взаємодією світлового випромінювання з суспензіями, поділяють на:

- *турбодиметрію* (заснована на вимірюванні інтенсивності світла, яке поглинається незабарвленою суспензією, вимірювання проводять прямо в пучку світла);
- *нефелометрію* (заснована на вимірюванні інтенсивності світла, яке відбивається або розсіюється забарвленою або незабарвленою суспензією, вимірювання проводять перпендикулярно до падаючого світла).

Методи, засновані на явищі поляризації молекул під дією світлового випромінювання ділять на:

- *рефрактометрію* (заснована на вимірюванні показника заломлення світла);
- *поляриметрію* (заснована на вимірюванні кута обертання площини поляризації поляризованого променя світла, що пройшов через оптично активне середовище).

Оптичні методи аналізу обумовлюють використання сучасних приладів різної складності, що дає ряд переваг у порівнянні з класичними хімічними методами: швидкість, простоту методики, використання невеликої кількості речовини для аналізу, можливість аналізувати сполуки будь-якої природи, проведення експрес аналізу багато компонентних сумішей. Крім того вони підвищують чутливість, точність і відтворюваність результатів.

1.3.1. Спектрофотометричні методи аналізу

До молекулярних абсорбційних методів відноситься фотометричний аналіз, який заснований на вимірюванні поглинання світла речовиною. Він включає саме *спектрофотометрію* (метод з використанням монохроматичного світла як у видимій, так і ультрафіолетовій та інфрачервоній частинах

оптичного спектру) та *фотоелектроколориметрію* (метод, заснований на вимірюванні інтенсивності вузької смуги поліхроматичного світла у видимій частині оптичного спектру, яку виділяють, зокрема, світлофільтрами.

Кожна речовина поглинає світло з певними (характерним лише для неї) довжинами хвиль, тобто довжина хвилі поглинутого світла індивідуальна для кожної речовини і на цьому заснований якісний аналіз. Максимум поглинання світла в певній спектральній області є важливою оптичною характеристикою речовини, а весь спектр поглинання характеризує його якісну індивідуальність.

У забарвлених речовинах максимум поглинання світла частіше знаходиться у видимій частині спектру, проте він може бути і в ультрафіолетовій та ближній інфрачервоної області.

Вимірювання поглинання світла, яке проходить крізь досліджуваний розчин унаслідок адсорбції його досліджуваною речовиною здійснюють на спеціальних спектральних апаратах, у яких пробу речовини вміщують між джерелом світла та фотоелементом, що реєструє світло.

Фотоколориметрія. При фотоколориметричних методах аналіз здійснюється за поглинанням поліхроматичного світла за допомогою фотоелементів. Прилади для фотоколориметрії – фотоколориметри або фотоелектроколориметри. В фотоколориметрах є можливість часткової монохроматизації спектру світлофільтрами (див. далі). За їх допомогою обирають ділянку оптичного спектру в тій області довжин хвиль, де поглинання світла для даного розчину мінімальна. Світлофільтри обирають так, щоб максимум поглинання розчину відповідав максимуму пропускання світлофільтра (табл. 1.4).

Таблиця 1.4. Колір розчину і відповідні їм світлофільтри

Колір розчину	Область максимального поглинання променів розчином, нм	Колір світлофільтра
Жовто-зелений	400–450	Фіолетовий
Жовтий	450–480	Синій
Оранжевий	480–490	Зелено-синій
Червоний	490–500	Синьо-зелений
Пурпурний	500–560	Зелений
Фіолетовий	560–575	Жовто-зелений
Синій	575–590	Жовтий
Зелено-синій	590–625	Оранжевий
Синьо-зелений	625–700	Червоний

Обчислення в фотометрії ґрунтуються на використанні формули:

$$C_x = \frac{C_{cm} \times D_x}{D_{cm}}$$

де C_x – вміст іону в розчині;

C_{cm} – вміст іону в стандартному розчині;

D_x – оптична густина аналізованого розчину;

D_{cm} – оптична густина стандартного розчину.

Спектрофотометрія. Блок-схема найпростішого однопроменевого спектрофотометра наведена на рис. 1.6. Розглянемо більш детально його будову.

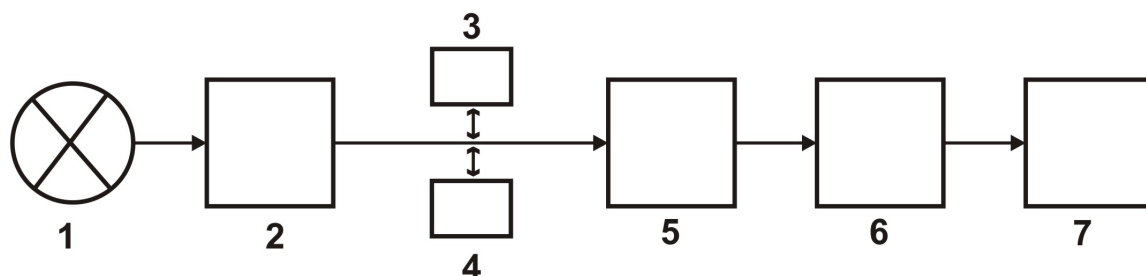


Рис. 1.6. Блок-схема однопроменевого спектрофотометра: 1 – джерело випромінювання; 2 – світлофільтр або монохроматор; 3, 4 – блок з експериментальною (вимірювальною) і порівняльною (контрольною) кюветами; 5 – приймач випромінювання (детектор); 6 – помножувач; 7 – реєструючий пристрій

У спектрофотометрах джерелом випромінювання, як правило, є газорозрядні джерела світла ультрафіолетового і видимого діапазонів. *Ртутні лампи* використовують для одержання лінійного спектра в ультрафіолетовій, видимій та ближній інфрачервоній областях. Для *лампи розжарювання* максимум спектра випромінювання лежить в ближній інфрачервоній області, але значна частина енергії випромінюється і у видимій та УФ-області оптичного спектра (до 300 нм). *Водневі лампи* мають спектральну область випромінювання в діапазоні 165–500 нм (з найбільшою енергією випромінювання при довжинах хвиль менше 300 нм). Недоліком цих ламп є їх мала потужність. Тому більш ефективними є *дейтерієві лампи*, особливо в області спектру 250–290 нм. *Газорозрядні лампи* надвисокого тиску заповнені інертним газом (як правило ксеноном) при електричному розряді дають майже рівномірний спектр.

До оптичних елементів спектральних приладів, зокрема спектрофотометрів, відносяться світлофільтри або монохроматори.

Світлофільтри – це оптичні пристрої, які змінюють спектральний склад світла або енергію світлових хвиль.

Типи світлофільтрів:

адсорбційні – послаблюють світло за рахунок поглинання світлового потоку речовиною фільтра;

дисперсійні – послаблюють світло за рахунок зміни показника заломлення речовини фільтра;

інтерференційні – дія яких заснована на явищі інтерференції паралельного променя, котрий відбивається двома дзеркалами, які розміщені на відстані довжини хвилі.

Монохроматори – оптичні системи, які виділяють вузькі ділянки частот чи довжин хвиль оптичного спектра. Монохроматори характеризує: *ширина смуги* – діапазон довжин хвиль, в якому інтенсивність світла, яке пройшло через монохроматор, більше половини інтенсивності світла при довжині хвилі максимального піка; *ширина щілини* – діапазон довжин хвиль, які потрапляють на монохроматор (вхідна щілина) і які виходять з нього і попадають на зразок (вихідна щілина).

Потрібно проводити дослідження при мінімально вузьких щілинах. У серійних спектрофотометрах використовують призматичні монохроматори та з дифракційною ґраткою або їх комбінацію. Для підвищення роздільної здатності спектрофотометра звичайно в монохроматорах спочатку виділяють певний діапазон спектра за допомогою призми, а потім його розкладають дифракційною ґраткою, що дозволяє отримати монохроматичне світло.

Роздільна здатність спектрофотометра суттєво підвищується при використанні подвійного монохроматора: тобто якщо в одному приладі розміщують два послідовно з'єднаних монохроматора, у яких вихідна щілина першого служить вхідною щілиною другого. Це дає змогу суттєво послабити розсіяне світло.

Кювети – посудини, які виготовляють з оптично прозорого матеріалу, і в які заливають розчин речовини. Для роботи у видимій ділянці спектра використовують скляні кювети, у ближній УФ-області – кварцові. Для безперервного аналізу розчинів використовують проточні кювети. Як правило, для роботи використовуються кювети з оптичним шляхом 1 см (поперечний переріз являє собою квадрат з довжиною боку 1 см). Існують і інші кювети з оптичним шляхом 100 мм, 20, 5, 2 і 1 мм.

Приймач випромінювання (детектор) – пристрій, який перетворює світлову енергію в електричні сигнали. Для подальшого перетворення та підсилення сигналу використовують помножувачі постійного та змінного струму. Після підсилення сигнал потрапляє на реєструючий пристрій.

У двопроменевих спектрофотометрах (рис. 1.7) промінь від джерела випромінювання за допомогою системи дзеркал спрямовується або у кювету із зразком, або у кювету порівняння. Різниця в світлових потоках розраховується автоматично і відповідає значенню поглинання досліджуваної речовини. Багатопроменеві реєструючі спектрофотометри фіксують зміни поглинання одночасно при двох (чи більше) довжинах хвиль.

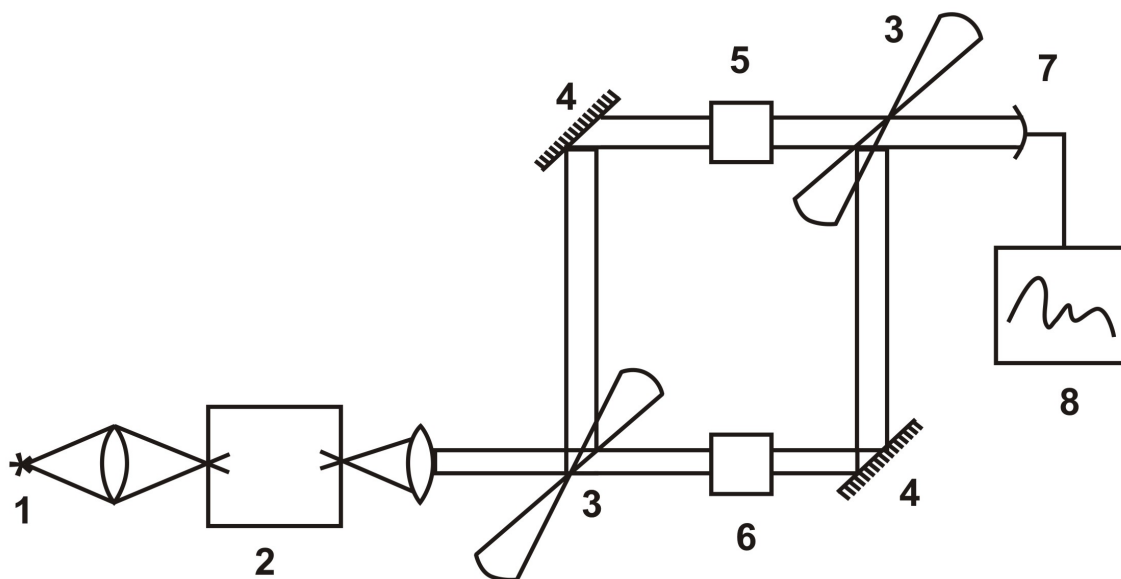


Рис. 1.7. Схема двопробеневого спектрофотометра

П р и м і т к а: світло від джерела випромінювання (1) проходить через монохроматор (2) і розділяється на два пучки обертовим секторним дзеркалом (3); отримані світлові пучки повертаються нерухомими дзеркалами (4), проходять через еталонний і робочий зразки (5 і 6) і, знову, об'єднавшись в один пучок іншим обертовим дзеркалом, потрапляють на фотоприймач (7). Струм фотоелемента підсилюється і отриманий електричний сигнал надходить на реєструючий пристрій (8), який реєструє залежність пропускання або оптичної густини від хвильового числа.

При проведенні вимірювань необхідно враховувати, що найменша похибка вимірювання оптичної густини спостерігається при числовому значенні оптичної густини близько 0,4. При оптичній густині більше 0,8 необхідно використовувати кювети з меншою довжиною поглинаючого шару або розводити досліджуваний розчин. При оптичній густині менше 0,1 – необхідно використовувати кювети з більшою довжиною.

При обчисленні в спектрофотометрії використовують метод *градуювального графіка*. Готують серію розведень стандартного розчину ($C_{ст}$), вимірюють їх оптичну густину ($A_{ст}$), будують графік в координатах $A_{ст} - C_{ст}$. Потім вимірюють оптичну густину аналізованого розчину і по графіку визначають його концентрацію.

1.3.2. Атомна спектроскопія

Атомно-спектроскопічні методи – це методи аналізу, які засновані на вимірюванні енергетичного стану атомів речовин. Вони відрізняються за способом отримання та реєстрації сигналу, а загальним є необхідність попередньої атомізації проб. Атоми речовин, які випаровуються в полум'ї,

випромінюють чи поглинають світло певної довжини хвилі. За інтенсивності смуг у спектрі можна визначити кількість окремих хімічних елементів у зразку.

Атомно-абсорбційна спектроскопія заснована на поглинанні атомами випромінювання від зовнішнього джерела.

Атомно-емісійна спектроскопія заснована на випусканні випромінювання атомами, збудженими за використання різних зовнішніх джерел (дуга, іскра, полум'я, плазма).

Атомно-флуоресцентна спектроскопія метод кількісного елементного аналізу по атомних спектрах флуоресценції. Пробу аналізованої речовини перетворюють на атомну пару і опромінюють для збудження флуоресценції таким випромінюванням, яку поглинає атоми лише елементу, що визначається (довжина хвилі випромінювання відповідає енергії електронних переходів цих атомів). Частина збуджених атомів випромінює світло (аналітичний сигнал), що реєструється спектрофотометрами. Зазвичай використовують резонансну флуоресценцію (довжини хвиль поглиненого і випромінюючого світла однакові). Для атомізації розчинів застосовують полум'я, індуктивнозв'язану плазму або електротермічні атомізатори (графітові трубки, нитки, стрижні, що нагріваються електричним струмом).

Атомно-абсорбційна (полум'яна) спектрометрія. Метод кількісного елементного аналізу по атомних спектрах поглинання (абсорбції) в полум'ї. Атомні пари проби опромінюють в діапазоні 190–850 нм. У результаті поглинання квантів світла атоми переходять у збуджені енергетичні стани. Цим переходам в атомних спектрах відповідають резонансні лінії, які характерні для даного елемента.

Відповідно до закону Бугера-Ламберта-Бера, мірою концентрації елемента служить оптична густина

$$A = \lg (I_0 / I),$$

де I_0 і I – інтенсивності випромінювання від джерела відповідно до і після проходження через поглинаючий шар.

Випромінювання потрапляє на вхідну щілину монохроматора, встановленого таким чином, що виділяється із спектру лише резонансна лінія визначуваного елемента, інтенсивність якої вимірюється фотоелектричним способом. Переведення аналізованого об'єкта в атомізований стан і формування поглинаючого шару пару зазвичай здійснюється в полум'ї. Найбільш часто використовують полум'я сумішей ацетилену з повітрям (2000 °C) і ацетилену з N_2O (2700 °C).

Блок-схема атомно-абсорбційного спектрометра представлена на рис. 1.8.

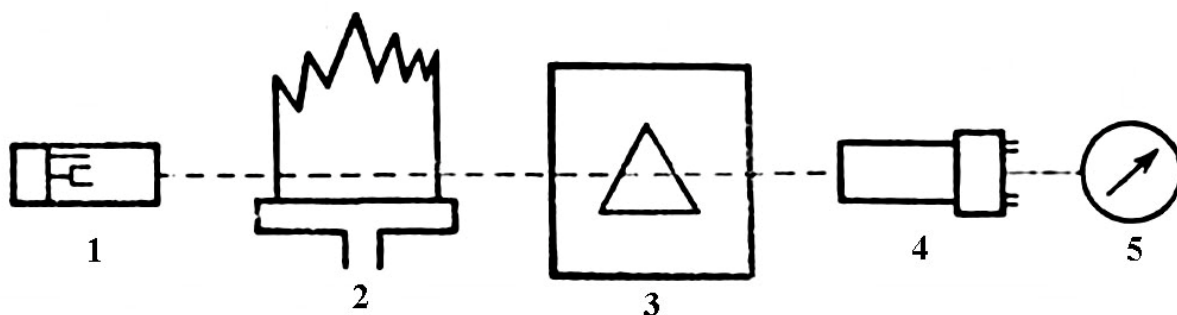


Рис. 1.8. Принципова схема полум'яного атомно-абсорбційного спектрометра. 1 – джерело випромінювання; 2 – полум'я; 3 – монохроматор; 4 – фотопомножувач; 5 – реєструючий прилад

Атомно-емісійна спектроскопія

Атомно-емісійний спектральний аналіз (АЕСА) – це метод елементного аналізу речовини, заснований на вивченні спектрів випускання вільних атомів та іонів у газовій фазі в області довжин хвиль 150–800 нм. Перехід у газову фазу здійснюється за використання різних джерел (дуга, іскра, полум'я, плазма).

Пробу досліджуваної речовини вводять в джерело випромінювання, де відбуваються її випаровування, дисоціація молекул і збудження атомів (іонів). Останні випускають характерне випромінювання, яке надходить в реєструючий пристрій спектрального приладу.

При якісному АЕСА спектри проб порівнюють зі спектрами відомих елементів, наведених у відповідних атласах і таблицях спектральних ліній, і таким чином встановлюють елементний склад аналізованого речовини. При кількісному аналізі визначають кількість (концентрацію) елементу в аналізованій речовині за залежністю величини аналітичного сигналу (щільність почорніння або оптичний щільність аналітичної лінії на фотопластинці; світловий потік на фотоелектричний приймач) цього елементу від його вмісту в пробі.

Збудження атомів відбувається при переході одного або кількох електронів на більш віддалений енергетичний рівень. У не збудженому стані атом має найменшу енергію E_0 . У збудженому (нестійкому) стані атом може перебувати дуже короткий час ($\approx 10^{-7}$ – 10^{-8} с) і завжди прагне зайняти нормальний стан. При цьому атом віддає надлишкову енергію у вигляді випромінювання фотона.

Спектральна лінія – випромінювання якоюсь однією довжини хвилі, що відповідає певному енергетичному переходу збудженого атома. Загальне число атомів прямо пропорційне концентрації (с) елемента в пробі. Таким чином, *інтенсивність емісійної спектральної лінії* може бути використана як аналітичний сигнал для визначення концентрації елемента:

$$I = a * c,$$

де a – коефіцієнт, що залежить від умов процесу.

Чутливість і точність АЕСА залежать головним чином від фізичних характеристик джерел збудження спектрів – температури, концентрації електронів, часу перебування атомів в зоні збудження спектрів, стабільності режиму джерела і т. д.

Атомно-емісійна спектроскопія з індуктивно-зв'язаною плазмою. Суть такого методу полягає в тому, що при збудженні та іонізації з подальшим переходом в стабільний стан елементи випускають квант світла з певною довжиною хвилі. Відповідно, визначаючи довжину хвилі, можна провести якісний аналіз, а визначаючи інтенсивність випускання – кількісний.

Основними вузлами приладу для проведення даного аналізу є: система подачі проби, розпилювач, вузол атомізації проби (кварцовий плазмовий пальник), оптична камера та детектор. Джерелом атомізації і збудження в цьому методі служить *індуктивнозв'язана плазма*.

Плазмовий пальник (рис. 1.9) складається з трьох концентричних кварцових трубок, які безперервно продуваються аргоном. Верхня частина пальники поміщена всередину котушки індуктивності високочастотного генератора (зазвичай 27,12 або 40,68 МГц). Високочастотна аргонна плазма ініціюється з допомогою іскрового розряду. При цьому аргон частково іонізується, в ньому виникають вільні носії заряду. Потім в газі ініціюється високочастотний струм, що викликає подальшу лавиноподібну іонізацію газу. Зважаючи на малий опір плазми вона швидко нагрівається. У центральний канал пальники у вигляді аерозолі надходить розчин проби. У плазмі відбувається висушування проби, дисоціація на атоми, іонізація і термічне збудження.

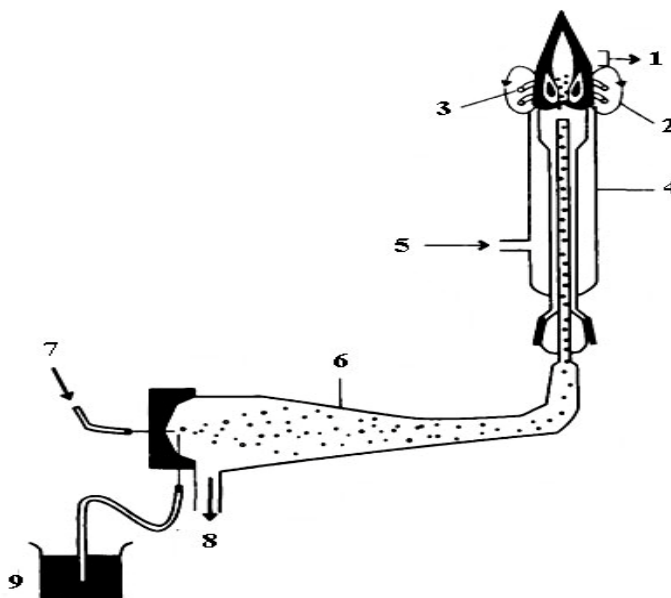


Рис. 1.9. Пристрій плазмового пальника

П р и м і т к а: 1 – зона спостереження плазми; 2 – магнітне поле; 3 – високочастотна котушка; 4 – плазмовий пальник; 5 – плазмоутворюючий газ (Ar); 6 – розпилювач; 7 – розпилюючий газ (Ar); 8 – конденсат; 9 – розчин проби.

Перевагою методу є можливість плавно регулювати умови атомізації і збудження, тобто можливо підібрати умови, що забезпечують одночасне визначення безлічі елементів. Недоліком методу є дуже велика витрата аргону. Також потрібно аргон чистотою не менше 99,99 %.

Подальша обробка пучка світла полягає в наступному: через вхідну щілину він надходить в оптичну камеру, де проходить фокусуючі дзеркала, потрапляє на монохроматор. Світло, потрапляючи на монохроматор, розкладається на монохроматичні пучки, які далі проходячи через спеціальну систему лінз потрапляють на детектор. Робочий діапазон – 170–800 нм.

Пробопідготовка та аналіз проб. Всі проби повинні бути переведені в розчин. Для цього наважку проби масою 0,1–0,5 г (залежно від природи проби, цільових елементів і їх передбачуваного змісту навішування може відрізнитися) розкладають азотною кислотою при нагріванні або в мікрохвильовій печі. Одержаний розчин при необхідності фільтрується, щоб видалити зважені частки, наявність яких негативно позначиться як на якості аналізу, так і на стані механізмів і деталей приладу.

Після описаних процедур проба розбавляється, щоб знизити концентрацію солей і залишки кислоти. По-перше, це необхідно для того, щоб не було зашкалювання, а також для того, щоб уникнути перекривання спектрів випромінювання елементів. По-друге – для того щоб не так швидко руйнувати систему подачі проби і пальник, оскільки нітратна кислота це досить агресивне середовище. Найчастіше рекомендується аналізувати розчини з концентрацією HNO_3 (10^{-2} М) і нижче.

Аналіз однієї проби зазвичай займає трохи більше хвилини, після чого аналітик отримує спектри всіх виявлених елементів. Витрата – 5–6 см³ проби на один аналіз.

Мас-спектрометрія. *Мас-спектрометрія* – метод визначення хімічного складу і молекулярної структури речовини, що базується на реєстрації у спектру мас іонів, утворених внаслідок іонізації атомів і (або) молекул проби. Іонізацію здійснюють пучком електронів або іонів, лазерним випромінюванням тощо. Іони розділяють після прискорення в магнітному полі за величиною відношення маси до заряду (m/e). Число хімічних елементів, що одночасно визначаються у природних об'єктах – до 40; одночасно з елементним складом (з точністю до 1 % при наявності стандартних зразків). Абсолютна границя виявлення: 10^{-10} – 10^{-19} г.

Істотна відмінність мас-спектрометрії від інших аналітичних фізико-хімічних методів полягає в тому, що оптичні чи деякі інші методи детектують випромінювання (поглинання) енергії молекулами або атомами, а мас-спектрометрія безпосередньо детектує самі частки речовини. Мас-спектрометрія належить до найінформативніших методів і відрізняється високими аналітичними характеристиками, дозволяє провести аналіз твердих, рідких і газоподібних речовин.

Іони бувають одностарядні та багаторядні. Більшість невеликих молекул при іонізації набувають лише один позитивного або негативного заряду. Атоми здатні набувати більш за один позитивний заряд і лише один негативний. Білки,

нуклеїнові кислоти і інші полімери здатні набувати множинних позитивних і негативних зарядів.

Перше, що треба зробити для того, щоб отримати маси-спектр – перетворити нейтральні молекули і атоми, складові будь-якої органічної або неорганічної речовини, в заряджені частки – іони. Цей процес називається іонізацією і по-різному здійснюється для органічних і неорганічних речовин. Другою необхідною умовою є переведення іонів в газову фазу у вакуумній частині мас-спектрометра. Глибокий вакуум забезпечує безперешкодний рух іонів усередині мас-спектрометра, а при його відсутності іони розсіюються і рекомбінують (перетворюються назад в незаряджені частки). Отримані при іонізації іони за допомогою електричного поля переносяться в мас-аналізатор. Там починається другий етап мас-спектрометричного аналізу – сортування іонів по масах (точніше у відношенні маси до заряду або m/e).

Мас-спектрометр – це вакуумний прилад, що використовує фізичні закони руху заряджених часток в електро-магнітних полях та необхідний для розділення іонів досліджуваної речовини по величинам m/e . Мас-спектральні прилади складаються з системи введення проби (система напуску), іонного джерела, розділюючого пристрою (мас-аналізатора), детектора (приймача іонів), вакуумних насосів, що забезпечують глибокий вакуум у всій вакуумній системі приладу, та системи управління і обробки даних (рис. 1.10).

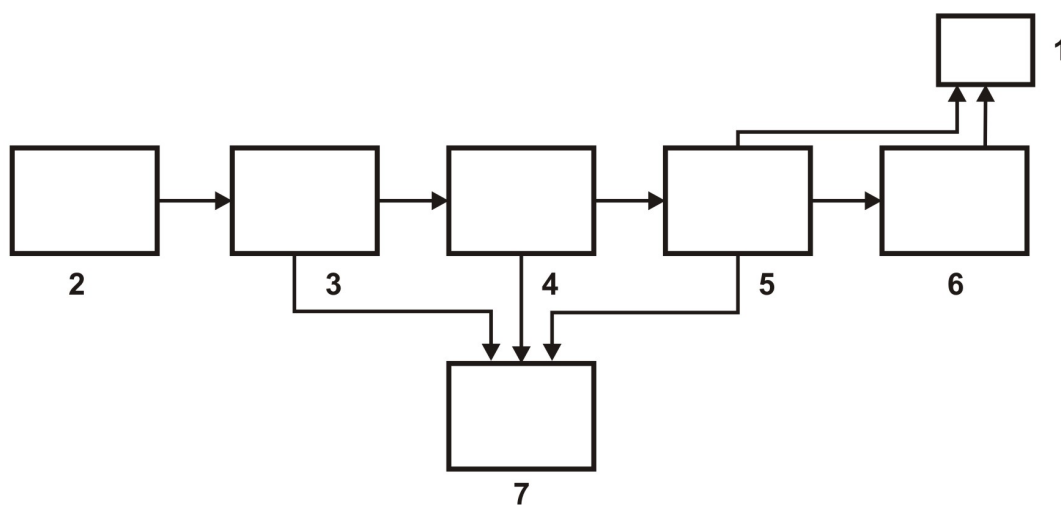


Рис. 1.10. Блок-схема мас-спектрометра

П р и м і т к а: 1 – система управління; 2 – введення проби; 3 – іонне джерело; 4 – мас-аналізатор; 5 – детектор; 6 – система обробки даних; 7 – система відкачки.

Інтенсивність (амплітуду піків) у мас-спектрі, яка відповідає кількості відповідного іону, виражають, як правило, у відсотках до інтенсивності основного піка (вісь ординат на мас-спектрі). При кількісному визначенні проводять відповідні перерахунки. Мас-спектри різних сполук зібрані в

каталоги. Сучасні мас-спектрометри налічують у своїх каталогах $5 \cdot 10^5$ і більше сполук.

Мас-спектр досліджуваної речовини порівнюється з даними каталогу і таким чином встановлюється її структура.

1.3.3. Рефрактометричний метод аналізу

Рефрактометрія – оптичний метод аналізу, заснований на вимірюванні показника заломлення світла (n) речовиною, яку визначають.

Середовище, в якому швидкість розповсюдження світла менша, є оптично щільнішим. При переході променя світла з середовища оптично менш щільного в середовище з більшою оптичною щільністю кут падіння променя більший за кут заломлення.

Абсолютний показник заломлення – відношення швидкості проходження світла у вакуумі до швидкості проходження світла в речовині, що досліджується.

Відносний показник заломлення – відношення швидкості проходження світла в повітрі до швидкості проходження світла в речовині або відношення синуса кута падіння до синуса кута заломлення:

$$n = v_1/v_2 = \sin \alpha / \sin \beta,$$

де v_1 – швидкість проходження світла в повітрі; v_2 – швидкість проходження світла в речовині; α – кут падіння; β – кут заломлення.

Показник заломлення залежить від довжини хвилі світла, температури, агрегатного стану, а також від концентрації речовини і природи розчинника.

Прилади, що використовують для визначення показника заломлення, називають рефрактометрами. Зазвичай вимірювання показника заломлення виконують на рефрактометрах типу Аббе (рис. 1.11, а), дія яких ґрунтується на визначенні кута повного внутрішнього відбиття при проходженні світлом межі між двома середовищами з різними показниками заломлення. Діапазон вимірювання від 1,3 до 1,7, а точність визначення $\pm 2 \cdot 10^{-4}$.

Менш поширені на практиці рефрактометри типу Пульфриха (рис. 1.11, б), дія яких побудована на вимірюванні кута заломлення монохроматичного світла, що забезпечує високу точність визначення показника заломлення $\pm 2 \cdot 10^{-5}$, але потребує значної кількості досліджуваного розчину і монохроматора світла.

Визначити концентрацію розчинів речовин рефрактометричним методом можна двома способами: *розрахунковим та графічним*. При розрахунковому способі використовують формулу, що відображає залежність між концентрацією розчину та його показником заломлення:

$$n = n_0 + FC \rightarrow C = (n - n_0)/F,$$

де n – показник заломлення розчину; n_0 – показник заломлення розчинника; F – рефрактометричний фактор; C – концентрація розчину (%).

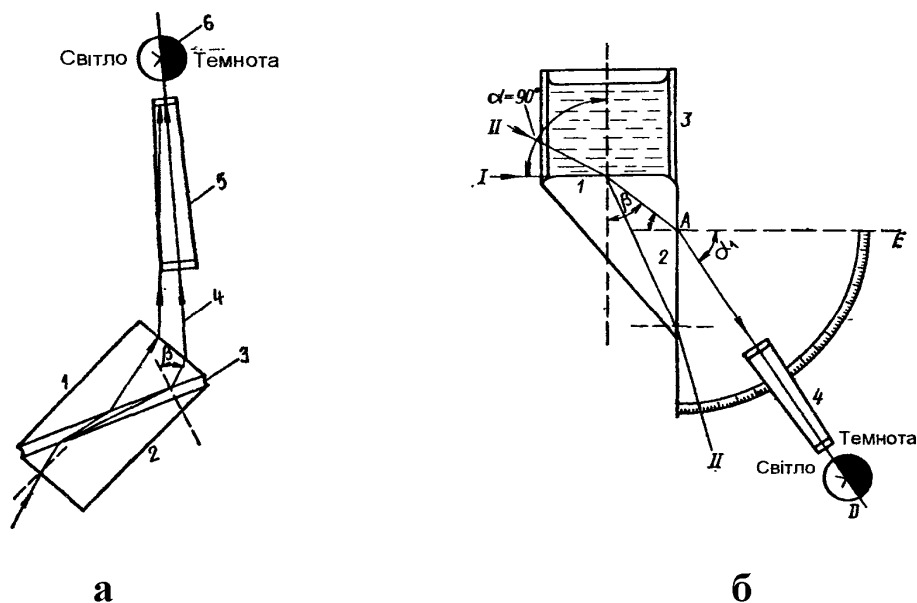


Рис. 1.11. **Схема рефрактометра типа Аббе (а):** 1 – вимірювальна призма; 2 – освітлювальна призма; 3 – шар рідини; 4 – межові промені; 5 – зорова труба; 6 – поле зору; **та схема рефрактометра типу Пульфриха (б):** 1,2 – вхідна і вихідна вимірювальна призма відповідно; 3 – кювета для досліджуваної рідини; 4 – зорова трубка

Рефрактометричний фактор (F) демонструє зміну показника заломлення при зміні концентрації розчину на 1 %. Його встановлюють експериментально шляхом визначення показника заломлення для стандартних зразків, склад яких відомий, або розраховують за таблицями показників заломлення.

Табличні значення показників заломлення наводять при довжині хвилі $\lambda_D = 589,3$ нм (жовта лінія в спектрі натрію) і температурі 20°C . При збереженні постійними довжини хвилі світла та умов проведення досліджень, від яких залежить показник заломлення, його значення будуть визначатись тільки природою середовища, які контактують.

При використанні графічного способу визначення концентрації розчину речовини будують калібрувальний графік у координатах n - C , вимірюють показник заломлення розчину і за графіком знаходять відповідну концентрацію.



Рефрактометричний метод використовують для ідентифікації речовини; для кількісного визначення одно-, дво- та багатокомпонентних сумішей.

Рефрактометр ИРФ 454 Б2М – найбільш зручний та перевірений на практиці у використанні прилад, який призначений для визначення показників заломлення неагресивних прозорих рідин та розчинів.

Тема 1.4. Хроматографічні методи аналізу

Хроматографія – процес, заснований на багаторазовому повторенні актів сорбції та десорбції речовини при її переміщенні в потоці рухомої фази вздовж нерухомого сорбенту. Розподіл складних сумішей хроматографічним методом засновано на різній сорбції компонентів суміші. При протіканні цього процесу так звана рухома фаза (елюент), що містить аналізовану пробу, переміщується через нерухому фазу. Зазвичай нерухома фаза являє собою речовину з розвиненою поверхнею, а рухлива – потік газу або рідини, що фільтрується через шар сорбенту. При цьому відбувається багаторазове повторення актів сорбції – десорбції, що є характерною особливістю хроматографічного процесу і зумовлює ефективність хроматографічного розділення.

Якісний хроматографічний аналіз, тобто ідентифікація речовини по його хроматограмі, може бути виконаний при порівнянні хроматографічних характеристик, найчастіше це *утримуваного об'єму* (тобто об'єму рухомої фази, пропущеної через колонку від початку введення суміші до появи даного компонента на виході з колонки), які знаходять при певних умовах для компонентів аналізованої суміші та для еталона.

Кількісний хроматографічний аналіз зазвичай проводять на хроматографі. Метод заснований на вимірюванні різних параметрів хроматографічного піка (висоти, ширини, площі і утримуваного об'єму), які залежать від концентрації речовин, що визначаються.

У кількісній газовій хроматографії застосовують методи *абсолютного градування і внутрішньої нормалізації, або нормування*. Використовується також метод *внутрішнього стандарту*. При абсолютному градуванні експериментально визначають залежність висоти або площі піка від концентрації речовини і будують градувальні графіки або розраховують відповідні коефіцієнти. Далі визначають ті ж характеристики піків в аналізованій суміші, і за градувальним графіком знаходять концентрацію аналізованого речовини. Цей простий і точний метод є основним при визначенні мікродомішок.

При використанні методу *внутрішньої нормалізації* беруть суму будь-яких параметрів піків, наприклад суму висот всіх піків або суму їх площ, за 100 %. Тоді відношення висоти окремого піка до суми висот або відношення площі одного піку до суми площ при множенні на 100 буде характеризувати масову частку (%) компонента в суміші. При такому підході необхідно, щоб залежність величини вимірюваного параметра від концентрації була однаковою для всіх компонентів суміші.

1.4.1. Класифікації хроматографічних методів

Існують різні види класифікації хроматографічних методів:

1. За агрегатним станом фаз (найголовніше в цій класифікації агрегатний стан рухомої фази):

- газОВО-рідинна хроматографія;
- газОВО-твердофазна (газоадсорбційна) хроматографія;
- рідинно-рідинна хроматографія;
- рідинна-твердофазна (рідинноадсорбційна) хроматографія;
- рідинно-гелева хроматографія;

2. За механізмами розділення (тобто характером взаємодії між сорбентом та сорбатом):

• *Адсорбційна хроматографія* – розділення основане на відмінності в адсорбційній здатності речовин, що розділяються, твердим адсорбентом;

• *Розподільна хроматографія* – розділення основане на відмінності в розчинності речовин, що розділяються, в нерухомій фазі (газова хроматографія) та на відмінності в розчинності речовин, що розділяються, в рухомій та нерухомій рідких фазах;

• *Іонообмінна хроматографія* – розділення основане на відмінності в здатності речовин, що розділяються, до іонного обміну;

• *Гель-фільтрація або ексклюзивна хроматографія* (гель-проникна, гель-фільтраційна хроматографія) – різновид хроматографії, в ході якої молекули речовин розділяються за розміром за рахунок їх різної здатності проникати в пори нерухомої фази. При цьому першими виходять з колонки найбільш великі молекули (більшої молекулярної маси), здатні проникати в мінімальне число пор стаціонарної фази. Останніми виходять речовини з малими розмірами молекул, які здатні вільно проникати в пори. На відміну від адсорбційної хроматографії, при гель-фільтрації стаціонарна фаза залишається хімічно інертною і не взаємодіє з речовинами, які розділяються;

• *Осадова хроматографія* – розділення засновано на утворенні різних по розчинності осадів речовин, які розділяються, із сорбентом;

• *Адсорбційно-комплексоутворююча хроматографія* – розділення засновано на утворенні координаційних сполук різної міцності у фазі чи на поверхні адсорбента;

• *Афінна хроматографія* (різновид лігандної). В основі останньої лежить реакція взаємодії речовин, що розділяються, з лігандом, який зв'язаний з інертним носієм. У разі афінної хроматографії розділяються біологічно активні речовини (білки, ферменти), що вступають з лігандом (теж, як правило, органічним) в специфічні біохімічні взаємодії. Наприклад: антитіло-антиген, гормон-рецептор тощо. Саме висока специфічність подібної взаємодії обумовлює високу ефективність афінної хроматографії і її широке поширення;

3. За метою проведення:

- *Аналітична хроматографія*;
- *Препаративна хроматографія*;

- *Промислова хроматографія*;

4. За характером техніки, що застосовується:

- *Хроматографія на колонці* – розділення речовин проводиться в спеціальних колонках;

- *Паперова хроматографія* – поділ речовин проводиться на спеціальному папері;

- *Тонкошарова хроматографія* – поділ речовин проводиться в тонкому шарі сорбенту.

У хроматографії на колонці та тонкошаровій хроматографії можна використовувати будь-який з наведених вище механізмів поділу, а паперовій хроматографії найчастіше застосовують розподільний і іонообмінний механізми.

5. За способом відносного переміщення фаз:

- *Елюентна хроматографія*. Суміш, що аналізується вводять в потік елюента у вигляді імпульсу. У колонці суміш розділяється на окремі компоненти, між якими знаходяться зони рухомої фази;

- *Фронтальна хроматографія* Суміш подають в колонку, при цьому в розчині на виході із колонки визначають концентрацію кожного компонента та будують графік в координатах концентрація речовини – об'єм розчину, який пройшов через колонку. Цю залежність називають хроматограмою чи вихідною кривою;

- *Витіснювальна хроматографія*. В колонку, після подачі суміші для розділення, вводять спеціальну речовину-витіснювач, яка утримується сильніше за будь-який із компонентів суміші. Утворюються зони речовин, які розділюються.

Розглянемо більш детально окремі хроматографічні методи.

1.4.2. Тонкошарова хроматографія

Метод *тонкошарової хроматографії (ТШХ)* розроблено Н.А. Ізмайловим і М.С. Шрайбер у 1938 р. У методі ТШХ нерухома тверда фаза тонким шаром наноситься на скляну, металеву або пластмасову пластинку. У 2–3 см від краю пластинки на стартову лінію наносять пробу речовини, яка аналізується, і край пластинки занурюють в розчинник, який діє як рухлива фаза. Під дією капілярних сил розчинник рухається упродовж шару сорбенту та з різною швидкістю переносить компоненти суміші, що приводить до їх розділення. Дифузія в тонкому шарі відбувається в поздовжньому та поперечному напрямках, тому процес необхідно розглядати як двовірний.

Сорбційні властивості системи в ТШХ характеризуються *хроматографічною рухливістю*, тобто величиною R_f , яка розраховується із результатів експерименту згідно із рівнянням:

$$R_f = X_i / X_f,$$

де X_i – відстань від стартової лінії до центра зони i -го компонента;

X_f – відстань від стартової лінії, яку пройшов розчинник.

Підкладки для сорбенту (пластинки) зазвичай виготовляють із скла, алюмінієвої фольги або поліетерної плівки. В якості сорбенту в ТШХ застосовують силікагелі, оксид алюмінію, крохмаль, целюлозу. Вибір розчинника залежить від природи сорбенту і властивостей речовин, які аналізуються. Часто застосовують суміші розчинників із двох або трьох компонентів. Після закінчення хроматографування непроточним методом зони на хроматограмі проявляють хімічним або фізичним способом. При хімічному способі пластинку обприскують розчином реактиву, що взаємодіє з компонентами суміші. При фізичних способах прояву використовується здатність деяких речовин до флуоресценції під дією ультрафіолетового випромінювання, часто при додаванні флуоресцентного індикатора, що взаємодіє з компонентами суміші. Після прояву хроматограми приступають до ідентифікації речовин і подальшого аналізу.

Якісний аналіз у ТШХ. Найбільш загальний підхід до якісного аналізу заснований на значеннях R_f . Хроматографічна рухливість є чутливою характеристикою речовини, проте вона істотно залежить від умов визначення. При дотриманні стандартних умов отримуються повторювані значення R_f , які можна використовувати в аналітичних цілях при порівнянні з табличними, якщо вони отримані за тих же умов досліду.

Найнадійнішим є метод свідків, коли на стартову лінію поряд із пробом наносяться індивідуальні речовини, які відповідають компонентам суміші. Вплив різних чинників на всі речовини будуть однаковими, тому збіг R_f компонента проби і одного зі свідків дає підставу для ототожнення речовин з врахуванням можливих відхілень. Розбіжність R_f інтерпретується однозначніше: воно вказує на відсутність в пробі відповідного компонента. На практиці стандартна речовина (свідок) у тому ж розчиннику наноситься на стартову лінію разом з аналізованою пробом та проводиться хроматографування за однакових умов.

Кількісний аналіз у ТШХ. Кількісні визначення можуть бути зроблені безпосередньо на пластинці, або після видалення речовини з пластинки. При безпосередньому визначенні на пластинці, вимірюють площу плями (наприклад, за допомогою міліметрової кальки) та по заздалегідь побудованому градууювальному графіку знаходять кількість речовини.

Найбільш точним вважається метод, в якому речовина після розділення віддаляється з пластинки і аналізується спектрофотометрично або іншим методом. Видалення речовини з пластинки зазвичай здійснюють механічним шляхом, хоча інколи застосовують вимивання відповідним розчинником.

1.4.3. Іонообмінна хроматографія

Іонообмінна хроматографія заснована на зворотному стехіометричному обміні іонів, що знаходяться в розчині, на іони, які входять до складу

іонообмінника. Синтетичні іонообмінники, які використовуються на даний час, володіють рядом важливих переваг: вони мають високу обмінну ємність, стійкі до дії кислот та лугів, не руйнуються у присутності багатьох окиснювачів і відновників тощо. Зазвичай синтетичним іонообмінником є високо полімерна сполука, наприклад поперечно-зшитий полістирол, що містить різні функціональні групи, які і визначають найбільш характерні властивості смол.

Типи іонообмінних смол. У залежності від знака функціональних груп іонообмінні смоли являються *катіонітами* чи *аніонітами*. Катіоніти містять функціональні кислотні групи ($-\text{SO}_3^-$; $-\text{COO}^-$; $-\text{PO}_3^-$; $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2^-)_2$). Функціональними групами аніонітів являються четвертинні $-\text{NR}_3^+$, третинні $-\text{NR}_2\text{H}^+$ чи первинні $-\text{NH}_3^+$ амонієві, пиридинові чи інші основи. Важливою характеристикою іонообмінника є його *обмінна ємність*. Обмінну ємність іоніту чисельно можна виразити кількістю молей еквіваленту протиіону на одиницю маси або об'єму смоли.

Методи іонообмінної хроматографії використовують переважно для розділення іонів. Проста методика іонообмінного розділення обумовлена поглинанням компонентів суміші іонітом і послідовному елююванні кожного компонента відповідним розчинником. Кількісні визначення компонентів після розділення можуть бути виконані будь-яким відповідним методом. Методами іонообмінної хроматографії визначають головним чином катіони лужних і лужноземельних металів.

1.4.4. Газова хроматографія

Газова хроматографія – це метод розділення летких компонентів, при якому рухливою фазою служить інертний газ (газ-носіє), що протікає через нерухому фазу з великою поверхнею. Типова схема газового хроматографа представлена на рис. 1.12. У якості рухомої фази використовують водень, гелій, азот, аргон, вуглекислий газ. Газ-носіє не реагує з нерухомою фазою і речовинами, що розділяються. Розрізняють газово-твердофазну та газорідинну хроматографію. У першому випадку нерухомою фазою є твердий носіє (силікагель, вугілля, оксид алюмінію), в другому – рідина, нанесена на поверхню інертного носія. Розділення засноване на відмінностях в летючості і розчинності (або адсорбованості) компонентів суміші, що розділяється.

Цей метод можна використовувати для аналізу газоподібних, рідких і твердих речовин з молекулярною масою менше 400, які повинні задовольняти певним вимогам, головні з яких – термостабільність, летючість, інертність, легкість отримання. Цим вимогам повною мірою задовольняють, як правило, органічні речовини, тому газову хроматографію широко використовують як серійний метод аналізу органічних сполук.

Джерело газу-носія – це балон із газом, який знаходиться під великим тиском (до 150 атм). Частіше всього використовують гелій, рідше азот, ще рідше водень та інші гази.

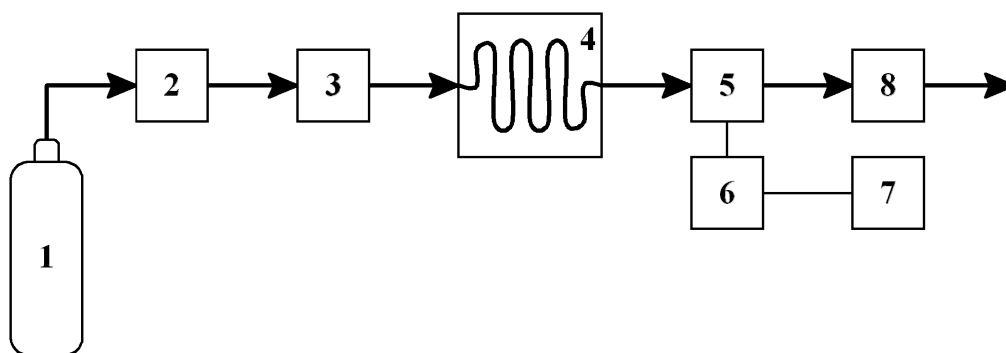


Рис. 1.12. Типова блок-схема газового хроматографу

П р и м і т к а: 1 – джерело газу-носія (рухомої фази); 2 – регулятор витрати газу-носія; 3 – пристрій введення приладу; 4 – хроматографічна колонка; 5 – детектор; 6 – електронний посилювач; 7 – реєструючий пристрій; 8 – прилад вимірювання витрат.

Призначення *регулятора витрати* – контроль витрати газу в системі, а також підтримка необхідного тиску газу на вході в систему. Зазвичай для цього використовуються редуктор або дросель.

Пристрій введення проби. Призначений для подачі проби аналізованої суміші в хроматографічну колонку. Проба вводиться за допомогою мікрошприца шляхом проколювання еластичної прокладки. Об'єм проби, що вводиться, декілька мікролітрів.

Хроматографічні колонки. Під колонкою мається на увазі посудина, довжина якої значно більше діаметру. Внутрішній діаметр колонок – 2–15 мм, а довжина – 1–20 м. Матеріалом для виготовлення колонок служить скло, неіржавіюча сталь, мідь, інколи фторопласт. Останнім часом найбільшого поширення набули капілярні колонки виготовлені з плавленого кварцу, з нанесеною усередині нерухомою фазою. Довжина подібних колонок може досягати сотень і навіть тисяч метрів, хоча частіше використовуються колонки завдовжки 30–50 м. Украй важливе щільне наповнення колонок нерухомою фазою, а також забезпечення постійної температури колонки протягом всього процесу.

Носії нерухомих рідинних фаз. Тверді носії для диспергування нерухомої рідкої фази у вигляді однорідної тонкої плівки мають бути механічно міцними з помірною питомою поверхнею (близько 20 м²/г), невеликим і однаковим розміром часток, а також бути досить інертними, щоб адсорбція на поверхні розділу твердої і газоподібної фаз була мінімальною. Найслабкіша адсорбція спостерігається на носіях з силанізованого хромосорбата, скляних гранул і флуоропака (фторвуглеводний полімер). Крім того, тверді носії не повинні реагувати на підвищення температури і повинні легко змочуватися рідкою фазою.

Детектор – це пристрій, призначений для виявлення в потоці газу-носія аналізованих речовин за якою-небудь фізико-хімічною властивістю. Відгук здійснюється за рахунок перетворення властивостей в електричний сигнал.

Детектори підрозділяються на інтегральні та диференціальні. Інтегральний детектор реєструє зміни в часі сумарної кількості компонентів, що виходять з колонки. Всі газохроматографічні детектори, що серійно випускаються, є диференціальними. Сигнал таких детекторів пропорційний миттєвій зміні значення якої-небудь властивості газового потоку, а її аналоговий запис має вигляд піку. Хроматограма, яка отримана з використанням такого детектору, представляє ряд піків, причому кількість кожного компонента пропорційна площі відповідного піку.

В процесі детектування хімічна природа молекули аналізованої речовини може змінюватися або ні. Якщо природа молекули змінюється (процес руйнування молекули), то вона може бути зареєстрована лише разово. Якщо ж природа молекули не змінюється, то така молекула може бути зареєстрована детектором багато разів. Детектори, в яких можлива багаторазова реєстрація молекул, називаються концентраційними, оскільки їх сигнал пропорційний концентрації речовини в газі-носієві. Прикладом концентраційного детектора є детектор по теплопровідності (ДТП), в якому процес відведення теплоти від чутливих елементів не руйнує молекул аналізованих речовин. Детектори, в яких можлива лише одноразова реєстрація молекул, називаються поточковими, оскільки їх сигнал пропорційний потоку речовини. Як типовий приклад поточкового детектора можна привести полум'яно-іонізаційний детектор (ПІД), в якому відбувається згорання органічних речовин.

Виходячи з мети аналізу і умов його проведення, слід вибирати такий детектор, характеристики якого відповідають їм найбільшою мірою. Критерії оцінки детекторів загальноприйняті для всіх систем детектування; до них відносяться: чутливість; концентрація, що мінімально детектується (межа виявлення); фоновий сигнал; рівень шуму; швидкість дрейфу нульової лінії; діапазон лінійності детектора; ефективний об'єм і час відгуку (швидкодія); селективність.

Характеристика деяких детекторів, які використовуються у газовій хроматографії, наведена нижче.

Детектор електронного захвату (ДЕЗ) застосовується для визначення сполук, що володіють великою спорідненістю до електронів. Ці речовини захоплюють вільні теплові електрони в камері з радіоактивним джерелом з утворенням стабільних іонів. Він успішно застосовується для визначення малих концентрацій галоген-, азот- та кисневмісних речовин. Система детектування по захвату електронів включає: іонізаційну камеру (комірка детектора) і джерело поляризованої напруги (блок живлення). У комірці детектора газ-носіє під дією β -випромінювання джерела ^{63}Ni іонізується з утворенням позитивних іонів і вільних електронів.

У основі роботи *полум'яно-іонізаційного детектора* (ПІД) покладена залежність електричної провідності іонізованого газу від його складу. Сигналом детектора є зміна іонного струму, яка викликана введенням в детектор аналізованої речовини. Газ-носіє в суміші з аналізованою сумішшю і воднем подається у форсунку пальника, де відбувається іонізація. Одночасно пальник виконує функцію одного з електродів, а неіржавіюча пластинка, згорнута в

циліндр та укріплена на невеликій відстані над полум'ям, утворює другий. Детектор використовується, в основному, для визначення в газовій суміші органічних сполук.

Термоіонний детектор (ТІД) – це один з найбільш чутливих і селективних детекторів до фосфорорганічних речовин. Крім того, набули поширення варіанти термоіонного детектора, які проявляють високу чутливість і селективність до азот- і галогенвмісних речовин. Конструкції детекторів розрізняються головним чином за способом розміщення і нагрівання солі лужного металу, а також геометрією детектора.

Полум'яно-фотометричний детектор (ПФД) є селективним у відношенні до фосфор- та сірковмісних речовин. Принцип дії заснований на вимірі свічення водневого полум'я при згоранні в ньому фосфор- і сірковмісних сполук. Конструктивно ПФД є поєднанням ПІД з оптичною схемою виміру світлового потоку. Світловий потік спочатку проходить інтерференційний фільтр, який поглинає фонове випромінювання полум'я, після чого поступає на чутливий елемент фотопомножувача. Отриманий таким чином фотострум прямує на електрометричний підсилювач і далі – на реєструючий прилад.

Принцип роботи *фотоіонізаційного детектору* (ДФІ) полягає в наступному: фотони від УФ-лампи потрапляють в іонізаційну камеру, через яку безперервно проходить газ-носіє, вибраний так, щоб його потенціал іонізації був значно вищий за енергію фотонів. В цьому випадку газ-носіє не іонізується, тоді як попадання в камеру аналізованої речовини викликає появу фотоіонізаційного струму, пропорційного концентрації цієї речовини. Детектуються всі сполуки, в тому числі і неорганічні, для яких потенціал іонізації менше енергії фотонів. Різні УФ-лампи можуть забезпечити різну селективність ДФІ до різних сполук.

В *атомно-емісійному детекторі* проба переводиться в атомарний стан, а атоми, що утворилися, переходять в збуджений стан. Для цього необхідна значна енергія, яка є в плазмі, що індукується мікрохвильовим випромінюванням. Перехід збуджених атомів в стан з нижчою енергією супроводжується випромінюванням світла. Довжина хвилі випромінювання вимірюється спектрофотометром.

Детектор по теплопровідності (ДТП) або *катарометр* є універсальним неструктурним детектором. У основу роботи ДТП покладено процес передачі тепла від нагрітого чутливого елементу до холоднішого корпусу детектора за рахунок теплопровідності газового потоку. Із зміною складу газового потоку змінюється його теплопровідність, тобто кількість тепла, що відводиться від чутливого елементу. Це, у свою чергу, приводить до зміни температури, а, отже, і електричного опору чутливого елементу. У вимірювальній схемі ДТП виникає сигнал у вигляді різниці потенціалів (напруги), величина якого пропорційна концентрації речовини, що аналізується в газі-носії.

Інфрачервоні детектори (ІЧД). Інфрачервона спектроскопія широко застосовується в хімічному аналізі і у поєднанні з газовою хроматографією. Методом ІК-спектроскопії з перетворенням Фур'є аналізують сполуки з

високою швидкістю і чутливістю. Отриманий при цьому ІК-спектр поглинання можна розглядати як індивідуальну характеристику сполуки і використовувати для її ідентифікації.

Газоворідинна хроматографія (ГРХ). Це один із найсучасніших хроматографічних методів багатокомпонентного аналізу. Його відмінні риси – експресивність, висока точність, чутливість, можливість автоматизації. Метод дозволяє вирішити багато аналітичних проблем. Кількісний аналіз ГРХ можна розглядати як самостійний аналітичний метод, ефективніший при розділенні речовин, що відносяться до одного класу.

1.4.5. Рідинна хроматографія

У загальному випадку до *рідинної хроматографії* відносять всі хроматографічні методи, в яких рухливою фазою є рідина. Сфера використання рідинної хроматографії охоплює вимірювання левової частки всіх відомих хімічних речовин і мікробіологічних субстанцій. Якщо методи газової хроматографії обмежуються молекулярними масами речовин, які при підвищеній температурі можна перевести в парову фазу і подати через випарник в колонку, то для вирішення конкретного хроматографічного завдання методами рідинної хроматографії необхідно лише ретельно підібрати склад рухливої фази, відповідний фізичним і хімічним властивостям сорбата, сорбента, можливостями детектуючого приладу та техніко-експлуатаційним властивостям хроматографічної системи.

Рідинно-рідинна хроматографія. Вона по суті близька до газорідинної. На твердий носій також наноситься плівка рідкої фази, і через колонку, наповнену таким сорбентом, пропускають рідкий розчин. Цей вигляд хроматографії називають рідинно-рідинною розподільною хроматографією. Рідину, яку нанесено на носій, називають *нерухомою рідкою фазою*, а розчинник, що пересувається через носій – *рухомою рідкою фазою*. Рідинно-рідинна хроматографія проводиться в колонці чи на папері.

Розділення суміші речовин в рідинно-рідинній хроматографії ґрунтуються на відмінності коефіцієнтів розподілу речовини між розчинниками, що не змішуються. Коефіцієнт розподілу речовини визначається як:

$$K_{п/н} = c_{п} / c_{н} ,$$

де $c_{п}$ та $c_{н}$ – концентрація речовини в рухомій та нерухомій фазах.

Пошук фаз, що не змішуються, забезпечують розділення, зазвичай виробляється емпірично на основі експериментальних даних.

Хоча в якості рухомої і нерухомої фази вибираються розчинники, що не змішуються між собою, все ж в багатьох системах спостерігається деяка взаємна розчинність. Щоб запобігти цьому рухому фазу заздалегідь насичують нерухомою. Для збереження незмінного складу фаз застосовують також метод хімічного закріплення нерухомої фази на сорбенті. При цьому використовують взаємодію розчинника з групами OH^- на поверхні носія. Носій нерухомої фази повинен володіти досить розвиненою поверхнею, бути хімічно інертним, міцно

утримувати на своїй поверхні рідку фазу і не розчинятися у розчинниках, які використовуються.

Рідинно-хроматографічні методи поєднують розділення компонентів суміші із прямим детектуванням речовин за допомогою оптичних детекторів, які працюють в ультрафіолетовій, видимій, інфрачервоній областях, рефрактометричними, емісійними, флуориметричними, електрохімічними та іншими детекторами. Обирати детектор необхідно виходячи з мети аналізу і умов його проведення.

Діодноматричний детектор – універсальний детектор спектрофотометрії. Він може працювати як в одно/багатохвильовому (висока чутливість – кількісний аналіз), так і в спектральному (ідентифікація за бібліотеками електронних спектрів – якісний аналіз) режимах. Програмне забезпечення сучасних хроматографів дозволяє аналізувати “чистоту” піків, тобто визначати чи відповідає хроматографічний пік чистій речовині або суміші декількох речовин, вибирати ширину оптичної щілини в діапазоні від 1 до 16 нм (аналіз тонкої структури спектру чи висока чутливість). Детектор сполучений з іншими блоками в локальну мережу. Нові спектрофотометричні детектори забезпечені знімними картами пам’яті, що унеможливорює втрати отримуваних даних.

Флуориметричний детектор. Принцип дії флуориметричного детектору заснований на вимірі флуоресцентного випромінювання поглиненого світла. Поглинання зазвичай проводять в УФ-області спектру при довжині хвилі максимального поглинання для даної групи речовин, а випромінювання вимірюють на виході фільтру, що не пропускає промені збудження.

У зв’язку з тим, що детектування ведеться від нульової інтенсивності флуоресценції, даний тип детектора чутливіший в порівнянні з детекторами поглинання. Для речовин, які сильно флуоресціюють, межа детектування досягає 10^{-12} г. Висока чутливість є одним з головних його переваг. За допомогою флуориметричного детектора з високою чутливістю можна детектувати амінокислоти, аміни, вітаміни та стероїди. Цей детектор можна також застосовувати для кількісного визначення мікродомішок речовин і якісного визначення ароматичних вуглеводнів, біологічно активних речовин, метаболітів тощо.

Значне збільшення чутливості флуориметричного детектору можливе при використанні монохроматичного лазера та гнучких оптичних світлодіодів для введення світла безпосередньо в проточну комірку малих розмірів.

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ, англ. HPLC, High performance liquid chromatography). Це один з ефективних методів розділення складних сумішей речовин. Основою хроматографічного розділення є участь компонентів суміші, що розділяється, в складній системі Ван-дер-Ваальсових взаємодій (переважно міжмолекулярних) на межі розділу фаз. ВЕРХ входить до групи методів, які, зважаючи на складність досліджуваних об’єктів, включають попереднє розділення вихідної складної суміші на відносно прості. Отримані прості суміші аналізуються потім звичайними фізико-хімічними методами або за використання рідинної хроматографії.

Використання флуориметричного детектору у ВЕЖХ дає можливість підвищити селективність детектування багатьох речовин. Флуоресцентне детектування з одночасною зміною рН рухливої фази після колонки дає можливість збільшити флуоресценцію деяких речовин і робить детектування більш специфічним. Селективність детектування може бути збільшена шляхом ретельного вибору довжини хвилі детектування. Одночасне сканування довжини хвиль збудження і емісії дозволяє встановити чистоту речовини, що реєструється одним піком, провести його ідентифікацію.

Особливістю ВЕРХ є використання високого тиску і дрібнозернистих сорбентів (зазвичай 3–5 мкм, навіть до 1,8 мкм). За механізмом розділення речовин, що аналізуються, ВЕРХ ділиться на адсорбційну, розподільну, іонообмінну, лігандообмінну тощо. Проте, в практичній роботі розділення часто протікає не за одним, а за декількома механізмами одночасно.

1.4.6. Хроматомас-спектрометрія

Органічні речовини в більшості випадків є багатокомпонентними сумішами індивідуальних компонентів. Наприклад, показано, що запах смаженої курки складають 400 компонентів (тобто, 400 індивідуальних органічних сполук). Завдання аналітики полягає в тому, щоб визначити ці компоненти (ідентифікувати їх та провести кількісний аналіз). Для цього ідеальним є поєднання хроматографії з мас-спектрометрією. Газова хроматографія підходить для поєднання з іонним джерелом мас-спектрометра та іонізації електронним ударом або хімічною іонізацією, оскільки в колонці хроматографа сполука вже знаходиться в газовій фазі. Прилади, в яких мас-спектрометричний детектор комбінується з газовим хроматографом, називаються *хроматомас-спектрометрами*.

Певну частину органічних сполук неможливо розділити на компоненти за допомогою газової хроматографії, але можливо за допомогою рідинної хроматографії. Для поєднання рідинної хроматографії з мас-спектрометрією сьогодні використовують джерела іонізації в електроспреї (ESI) та хімічної іонізації при атмосферному тиску (APCI), а комбінацію рідинних хроматографів із мас-спектрометрами називають РХ/МС (англ. LC/MS). Найпотужніші системи для органічного аналізу, побудовані на основі надпровідного магніту і працюють за принципом іонно-циклотронного резонансу.

Тема 1.5. Електрофоретичні методи аналізу

Електрофорез (грецьк. *elektron* – смола, бурштин; той, що має відношення до електрики, та *phoreo* – ношу, переносу) – це рух заряджених колоїдних частинок, спричинений дією зовнішнього електричного поля. В свою чергу, *колоїдні частинки* або *колоїди* (грецьк. *kolla* – клей та *eidos* – вид) становлять собою дисперсні системи, які проміжні між справжніми розчинами та грубодисперсними системами – *суспензіями* та *емульсіями*. Рідкі колоїдні системи – *золі*, а дриглісті – *гелі*. Колоїдами є, зокрема, амінокислоти, білки,

гліко- та ліпопротеїди, полісахариди, нуклеїнові кислоти та ряд інших органічних сполук. Такі речовини містять хімічні групи, які здатні до іонізації. Тому в розчинах вони можуть існувати в зарядженій формі – у вигляді катіонів (позитивно заряджені) або аніонів (негативно заряджені). Більшість біомолекул – *амфотерні* (грецьк. *amphoterios* – і той та інший), тобто це хімічні сполуки, які здатні проявляти кислотні або лужні властивості залежно від речовини, що реагує з ними: в реакціях із сильною кислотою виявляють лужні властивості, а з сильним лугом – кислотні. Це пояснюється присутністю в молекулах великої кількості рухомих протонів (H^+), які характеризуються різними значеннями *коефіцієнта активності* (pK_a), величина якого в розведених розчинах наближається до значень константи рівноваги. Зі значення індивідуальних pK_a можна визначити *ізоелектричну точку* (pI), тобто значення pH (значення від'ємного десяткового логарифму концентрації H^+), при якому в молекулі міститься рівне число позитивних і негативних електричних зарядів, і таким чином, вона є електронейтральною. При $pH < pI$ молекула має позитивний електричний заряд, а $pH > pI$ – від'ємний. Суттєвим є те, що при pH розчину, яке відрізняється від значення pI , молекула має електричний заряд. Ще одна можлива причина виникнення у молекул сумарного електричного заряду – це *адсорбція* (лат. *ad* – на, у, при та *sorbere* – поглинати, всмоктувати) поглинання ними іонів із розчину (утворення так званого *подвійного електричного шару*).

Молекули, які мають сумарний електричний заряд, рухаються в зовнішньому електричному полі, і таке явище, як вже відмічалось, називається електрофорезом.

Крім наявності сумарного електричного заряду, необхідно враховувати наступне: молекули, які мають близькі за величиною та знаком електричні заряди, але відмінні за величиною молекулярної маси (розмірами), різняться відношенням маси до заряду (m/e), а також можуть бути відмінними за просторовою конфігурацією (формою). На всіх цих відмінностях ґрунтується розділення іонів при русі їх в розчині (буфері) під дією зовнішнього електричного поля. В цьому і полягає принцип електрофорезу. Результат електрофорезу фіксується на *електрофореграмі*.

Один із найпоширеніших методів аналізу і документування результатів електрофоретичного розділення у твердому підтримувальному середовищі – це *денситометричне* (лат. *densus* – щільний, густий та грецьк. *metreo* – вимірюю) сканування електрофореграм. У денситометрах електрофореграма переміщується з постійною швидкістю і в певних точках освітлюється добре сфокусованим променем світла. Інтенсивність світла, яке проходить крізь прозору електрофореграму або відбитого від непрозорих електрофореграм вимірюється і реєструється самописцем. Одна вісь запису електрофореграми відповідає на ній вмісту речовини, яка аналізується, а інша – величині екстинкції (оптичної густини), яка вимірюється на заданій відстані від стартової лінії. Площа піку при цьому прямо пропорційна кількості речовини, яка знаходиться у відповідній смугі.

Інший поширений метод аналізу результатів електрофорезу – спектрофотометричне отримання електрофореграм і при їх аналізі ідентифікація та кількісне визначення аналізуємих речовин.

Крім виділення, ідентифікації та кількісного визначення речовин, електрофорез також використовується для встановлення молекулярної маси і змін у складі молекул при заміні заряджених хімічних груп на незаряджені та навпаки.

1.5.1. Теоретичні основи та методичні аспекти електрофорезу

В електричному полі напруженістю E частинки (молекули) зі загальним електричним зарядом q зазнають дії сил (згідно другого закону Ньютона):

$$m \frac{d^2 x}{d^2 t} = qE,$$

де m – маса частинки; $\frac{d^2 x}{d^2 t}$ – прискорення.

Коли частинка (молекула) вийде зі стану спокою і почне рухатися, виникає протилежно направлена *сила тертя* (T), яку інколи називають ще *силою в'язкості*:

$$T = f \frac{dx}{dt},$$

де f – коефіцієнт тертя; $\frac{dx}{dt}$ – швидкість руху частинки.

Результат дії двох сил (електричного поля і тертя) дорівнює:

$$m \frac{d^2 x}{d^2 t} = qE - f \frac{dx}{dt},$$

де знак $(-)$ означає, що сили діють в протилежному напрямі.

При дії електричного поля частинка прискорюється до досягнення максимальної швидкості, при якій сила тертя зрівноважується силою електричного поля. В результаті зрівноваження цих сил швидкість руху частинок стає постійною. При цьому виконуються умови:

$$qE = f \frac{dx}{dt}, \text{ або } \frac{dx}{dt} = \frac{qE}{f}.$$

Це означає, що при дії електричного поля швидкість руху частинки буде збільшуватися до тих пір, поки силу електричного поля не зрівноважить сила тертя. Потім частинка рухається з постійною швидкістю, яка і визначається вищенаведеним рівнянням.

Для сферичних частинок коефіцієнт тертя (f) дорівнює:

$$f = 6\pi\eta r,$$

де η – коефіцієнт в'язкості розчину; r – радіус (стоксовий) частинки.

У стаціонарному стані (сила електричного поля дорівнює силі тертя), як вже відмічалось:

$$qE = f = 6\pi\eta r$$

У цьому випадку *питома рухливість* (ρ), яка становить відношення швидкості руху частинок до напруженості електричного поля, з урахуванням наведених вище рівнянь, буде дорівнювати:

$$\rho = \frac{dx}{dt} \cdot \frac{1}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r}.$$

При заміні співвідношення q/r виразом $D\varphi_0$, де φ_0 – потенціал на поверхні сфери, який дорівнює Q/Dr ; D – діелектрична стала частинки, а Q – електричний заряд, отримаємо:

$$\rho = \frac{D\varphi_0}{6\pi\eta}.$$

Це співвідношення виведене для заряджених частинок (молекул), які рухаються в ідеальному діелектрику. В реальних умовах електрофорез проводять у розчинах *електролітів*, тобто в системах, де відбувається перенесення електричних зарядів іонами. Треба також враховувати те, що навколо зарядженої частинки існує «іонна атмосфера». У зв'язку з наявністю електростатичних сил між зарядженими групами частинки та іонами розчинника, частинка оточена дифузною хмаркою іонів зі зарядом, який протилежний її особистому (протиіонами). Наявність «іонної атмосфери» навколо частинки призводить до того, що її електрофоретична рухливість менша, ніж це можна було передбачити в ідеальному випадку (розрахунок в ідеальному випадку проводять за вищенаведеним рівнянням). Це обумовлено, в основному, двома причинами: 1) електричний потенціал на поверхні частинки знижується внаслідок зменшення ефективного електростатичного заряду; 2) електричне поле діє також і на іони, які оточують частинку; ті з них, які мають однаковий електричний знак з частинкою, віддаляються від неї, а з

протилежним знаком – наближаються, наслідком чого є порушення сферичної форми частинки, що веде до сповільнення її рухливості під дією електричного поля. Ще один момент – у розчині електроліту частинка оточена шаром міцно зв'язаної з нею води, яка не може переміщуватися незалежно від частинки, що викликає зменшення її рухливості.

Існує ряд підходів для врахування реальних умов проведення електрофорезу. Зокрема, це теорія міжклітинної взаємодії Дебая і Хюккеля, на основі якої виведено, зокрема, рівняння Генрі:

$$P = \frac{D}{4\pi\eta} \left[\xi + 5r^3 \int_{\infty}^r \frac{\varphi(a)}{a^3} da - 2r \frac{\varphi(a)}{a^4} da \right],$$

де $\varphi(a)$ – електричний потенціал в «іонній атмосфері»; ξ – електричний потенціал на межі зв'язаної і вільної рідини (електрокінетичний потенціал, дзета-потенціал).

Точне визначення електрофоретичної рухливості являє значну складність. На практиці визначають, як правило, відносну рухливість речовини, яка аналізується, порівняно з певною стандартною речовиною, для якої відома рухливість. Крім визначення відстані, яку пройшла досліджувана і стандартна речовини, необхідно визначити також відстань, яка відділяє від старту, так звану, *зону нульової рухливості*. Це обумовлено необхідністю внесення поправки на будь-яке зміщення речовин, яке викликається не електрофорезом, а іншими силами (наприклад, потоком розчинника із-за випаровування води, електроосмотичним потоком та ін., див. підрозділ 3.2). Експериментально переміщення зони нульової рухливості визначають при спостереженні за рухом якоїсь незарядженої речовини, наприклад, глюкози, ксилози та ін. Відносну електрофоретичну рухливість ($P_{від.}$) розраховують за формулою:

$$P_{від.} = \left(\frac{v - v_0}{v_{см.} - v_0} \right) P_{см.},$$

де $P_{см.}$ – електрофоретична рухливість стандартної речовини; v_0 , $v_{см.}$ і v – відстань, яку пройшли від стартової лінії, відповідно, зона нульової рухливості, стандартна і досліджувана речовина.

Електрофоретична рухливість, за даних умов, наближена до рухливості у вільному середовищі у тому випадку, коли рух стандарту і досліджуваної речовини не сповільнюється внаслідок ефекту молекулярного сита (при проходженні речовин, наприклад, крізь гелі) або абсорбції (див. підрозділ 3.2).

1.5.2. Фактори, що впливають на електрофоретичну рухливість електрозаряджених молекул при електрофорезі

Швидкість руху молекул (частинок) в електричному полі називається *електрофоретичною рухливістю*, знак якої співпадає зі знаком сумарного заряду. Різниця в рухливості молекул – це основа для розділення суміші речовин з аналітичною або препаративною метою. Визначення рухливості молекул використовують також для характеристики речовин, у тому числі їх ідентифікації.

Електрофоретична рухливість макромолекул (V) визначається наступним чином:

$$V = R \cdot E,$$

де R – коефіцієнт пропорційності, який називається коефіцієнтом електрофоретичної рухливості; E – напруженість електричного поля.

Чисельно R дорівнює, як правило, швидкості руху молекул при $E = 1$ В/см, тоді V має розмірність см/с·В.

Зразок, який підлягає електрофоретичному розділенню, розчиняють або *суспендують* (лат. *suspensio* – підвішування), тобто створюють дисперсну систему, яка складається з рідкої та твердої фаз, де дрібні тверді частинки зважені в рідині, в *буфері* (англ. *buffer* – той, що пом'якшує поштовхи). В методі електрофорезу цей же буфер використовують для створення і стабілізації рН носія, забезпечення проведення електричного струму (див. нижче). В розчині електричний струм обумовлений іонами буфера і зразка, а в іншій частині електричного ланцюга – електронами (в дротах, які підводять електричну напругу та в самому джерелі цієї напруги).

Основні чинники, які впливають на електрофоретичну рухливість заряджених макромолекул, – це природа і властивості зразка, характеристики зовнішнього електричного поля, буфери як стабілізатори рН, природа і властивості носія.

Зразки. Електрофоретична рухливість заряджених молекул залежить, в основному, від наступних чинників, які зв'язані з природою і властивостями зразка:

1. *Електричний заряд* звичайно залежить від рН середовища (буфера). Зі збільшенням сумарного заряду електрофоретична рухливість підвищується.

2. *Розміри (молекулярна маса) молекул* безпосередньо впливають на сили тертя і електростатичної взаємодії. Чим більша за розмірами молекула, тим менша її електрофоретична рухливість у порівнянні з молекулами менших розмірів.

3. *Форма молекул* зразка також впливає на сили тертя і електростатичної взаємодії. Молекули одного розміру, але різної форми (наприклад, глобулярні та фібрилярні білки) володіють різною електрофоретичною рухливістю.

Зовнішнє електричне поле. На електрофоретичну рухливість впливають всі три основні його фактори, а саме сила струму, напруга і електричний опір.

1. *Сила електричного струму* в розчині зі зразком обумовлена перенесенням іонів буфера і зразка. Їх переміщення в розчині прямо пропорційне силі струму. Довжина шляху, який проходять іони, буде пропорційна не тільки силі електричного струму, але і часу пропускання цього струму. Для максимальної відтворюваності результатів електрофоретичного аналізу електричний струм має бути постійним і його сила не повинна змінюватися.

2. *Електрична напруга* зв'язана з силою струму співвідношення, яке визначається законом Ома:

$$I = \frac{U}{R},$$

де I – сила струму (в амперах); U – напруга (в вольтах); R – опір (в омах).

Таким чином, електрофоретична рухливість пропорційна величині електричної напруги між електродами, які прикладені до середовища, або градієнту цієї напруги, який виражається, звичайно, в В/см (відношення напруги, яка прикладається, до довжини шару носія). Використовується як низька електрична напруга (200–500 В), так і висока (500–10 000 В) з градієнтами до 20 і 200 В/см, відповідно. Для забезпечення максимальної відтворюваності результатів використовують стабілізовані джерела електричної напруги (або сили струму), які автоматично підтримують напругу (або силу струму).

3. *Електричний опір*, згідно наведеного вище закону Ома, зворотно пропорційний силі електричного струму, а значить і електрофоретичній рухливості. Він, у свою, чергу, залежить від природи та властивостей зразка і носія, а також іонної сили буфера. Цей опір зі збільшенням кількості іонів в електрофоретичній системі та ширини носія зменшується.

У процесі електрофорезу виділяється тепло, кількість якого в одиницю часу дорівнює:

$$Q = I^2 R,$$

де Q – тепло (в ватах); I – сила електричного струму (в амперах); R – електричний опір (в омах).

Підвищення температури середовища веде до посилення випаровування буфера, взаємодій між молекулами зразка, наприклад, білок-білкових. Для зменшення цього ефекту прилади для електрофорезу обладнують непроникними для повітря кришками, а при необхідності – системою охолодження.

Буфери при електрофорезі, як вже відмічалось, використовують не тільки для розчинення або суспензії зразків, але і для створення і стабілізації рН носія.

Вони самим різним чином впливають на електрофоретичну рухливість. Основний вплив вони проявляють через свій склад, іонну силу (концентрацію) та значення рН.

1. *За складом* найчастіше використовують форміатний, ацетатний, цитратний, фосфатний, вероналовий, піридиновий, трис(гідроксиметил)амінометан, 2,4,6-триметилпіридин (2,4,6-колідин) та інші буфери. Для електрофоретичного розділення вуглеводів часто використовують боратні буфери, оскільки вони створюють з вуглеводами заряджені комплекси.

Для ефективного відведення тепла (див. вище) доцільно використовувати буфери з низькою електропровідністю (наприклад, трис-боратний, трис-морфолінопропансульфатний та ін.), хоча при цьому знижується величина електричного струму, а значить, і електрофоретична рухливість.

Оскільки буфери слугують для зразка розчинниками, то деяка дифузія нанесеного на носій зразка неминуча. Особливо це характерно для малих молекул, наприклад, амінокислот і моносахаридів. Дифузію можна зменшити, якщо наносити зразки у вигляді вузьких смужок і в помірній кількості, використовувати високу електричну напругу і як можна швидше проводити розділення компонентів суміші, яка аналізується, а також на його закінченні швидко виймати з приладу для електрофорезу і висушувати зразки при певних методах електрофоретичного аналізу.

2. *Іонна сила (концентрація) буферів* дорівнює $\sum_i^n C_i e_i^2$, де C_i – молярна концентрація i -го іона, а e_i – його електричний заряд; n – кількість іонів. Вона формує складову частину електричного струму, що обумовлена перенесенням іонів буфера. Іонна сила зростає, коли частка іонів зразка зменшується. Навпаки, при низькій іонній силі електричний струм, який обумовлений перенесенням іонів буфера, зменшується, а частка, що доводиться на струм за рахунок іонів зразка, зростає. Таким чином, електрофоретична рухливість зразка прискорюється. Слід мати на увазі й те, що в буфері з низькою іонною силою загальна сила електричного струму і виділення тепла зменшується, але дифузія зразка зростає, внаслідок чого роздільна здатність погіршується порівняно з такою при великій іонній силі.

Таким чином, при виборі іонної сили буфера доводиться визначатися між виділенням тепла і роздільною здатністю. Звичайно використовують буфери з іонною силою, яка лежить в інтервалі концентрацій 0,05–0,15 М, що дає можливість використовувати високу електричну напругу з мінімальним виділенням тепла.

Величина значення рН практично не впливає на повну дисоціацію неорганічних солей, але суттєво змінює ступінь іонізації органічних речовин. При підвищенні рН іонізація органічних кислот зростає, а лугів, навпаки, зменшується. Це впливає на електрофоретичну рухливість. На такі сполуки, як, наприклад, амінокислоти рН проявляє подвійну дію, оскільки вони *амфоліти*, тобто здатні виявляти як кислотні (в кислому середовищі), так і лужні (в лужному середовищі) властивості. Таким чином, швидкість і напрям руху

амфолітів залежить від рН. Для їх розділення методом електрофорезу можна використовувати буфери в широкому діапазоні рН – від 1 до 11.

Носії в методі електрофорезу – це однорідні і відносно інертні речовини, що насичуються відповідним буфером, і вибір яких залежить від природи і властивостей зразка. Існує велика кількість носіїв як природного, так і синтетичного походження. Це, зокрема, папір (використовується хроматографічний, а в деяких випадках фільтрувальний), агар, целюлоза та її ацетат, крохмаль, полі акриламід, агароза, агароза-акриламід, силікагель, скляний і целюлозний порошок та ін.

При використанні носіїв у методі електрофорезу виникає ряд проблем, зокрема це адсорбція і електроосмос у гель-електрофорезі – залежність електрофоретичної рухливості від розміру пор гелю.

1. *Адсорбція* – це утримування молекул зразка носієм (див. підрозділ 3.1). Це призводить до розмивання смуг (плям) на електрофореграмах, наслідком чого є те, що компоненти зразка рухаються не у вигляді чіткої смуги (плями), а мають вигляд «комети». Це спричинює зменшення роздільної здатності. Крім того, адсорбція зумовлює також зменшення електрофоретичної рухливості.

Найбільшою здатністю до адсорбції володіє папір, але цей небажаний ефект значно зменшується, якщо використовувати ацетат целюлози.

2. *Електроосмос* обумовлений виникненням електричного заряду між поверхнею носія і молекулами води буферного розчину. Іонізація хімічних груп носія та поверхнева адсорбція іонів буфера може призводити до утворення з молекул води іонів гідроксонію (H_3O^+). Вони заряджені позитивно і рухаються до катоду, при цьому здатні захоплювати розчинені нейтральні речовини і прискорювати рух катіонів. Як наслідок, електрофоретична рухливість аніонів знижується. Крім того, електроосмос спричинює розширення смуг на електрофореграмах, що зменшує роздільну здатність.

Звичайно цим ефектом можна знехтувати, якщо потік буфера не виноситься за межі носія компоненти зразка. Для цього, за необхідності, треба вжити спеціальних заходів. При визначенні ізоелектричної точки речовин, необхідно вводити відповідну поправку. Це роблять, як правило, при спостереженні за рухом електронейтральної сполуки, зокрема глюкози або сечовини. Електроосмос менше проявляється в носії з ацетату целюлози або в поліакриламідному гелі, ніж на папері чи крохмальному гелі.

3. *Молекулярні сита* створюють напівжорсткі гелі (дисперсні системи, які володіють певними властивостями твердих тіл, зокрема зберігати форму, пружність, міцність, звичайно гелі мають вигляд дриглястих тіл). Вони складаються з неупорядковано переплетених молекулярних ланцюгів, які розподілені у всьому об'ємі гелю і утворюють ситоподібну структуру. У відповідності з конкретними вимогами проведення розділення речовин, розміри пор гелів можуть варіювати в певних межах. Принцип дії молекулярного сита в агаровому, крохмальному і поліакриламідному гелі заключається в тому, що молекули великого розміру (молекулярної маси) рухаються крізь гель тим повільніше, чим менший розмір пор. При використанні гелів типу сефадекс

ситуація зворотна – у відповідності з природою і властивостями рух малих молекул сповільнюється сильніше, ніж великих.

Конкретні причини виникнення розглянутих вище проблем, які погіршують електрофоретичну рухливість речовин, що досліджуються, та прийоми їх подолання будуть освітлені при розгляді конкретних видів електрофореzu (див. підрозділ 3.4).

1.5.3. Загальні принципи проведення електрофореzu

Прилади для електрофореzu. Обладнання, яке необхідне для електрофореzu, складається з двох необхідних частин: джерела живлення і власне електрофоретичного блока.

Джерело живлення генерує стабілізований постійний електричний струм (напругу) і має системи встановлення контролю сили струму (напруги) на виході. Для роботи з низькою напругою використовують, як вже відмічалось, джерела напруги до 500 В і силою струму до 500 мА і градієнт напруги до 200 В/см. Ці джерела напруги за своєю конструкцією забезпечують постійну напругу або постійну силу струму.

Електрофоретичний блок складається з електродів, герметичних камер для буфера (за необхідності з прозорою ізолюючою кришкою). Цей блок необхідно закривати кришкою, щоб звести до мінімуму випаровування буферного розчину, особливо при високовольтному електрофорезі, а також для забезпечення електричної ізоляції.

Існує ще ряд пристроїв в електрофоретичному блоці в залежності від виду електрофореzu, що визначається метою і завданнями електрофоретичного аналізу.

Електроди, що використовуються при електрофорезі, можуть бути з нержавіючої сталі, але оскільки деякі буфери викликають їх корозію, то краще використовувати платинові електроди, а також у деяких випадках хлор-срібні, вугільні.

Обидві буферні камери звичайно розділені на два відсіки – електродне відділення і відділення гноту-містка при електрофорезі на папері та тонкому шарі (на пластинках), у блоках. В колоночному електрофорезі буфер подається безпосередньо в колонку.

Контакт між буферними розчинами в обох відділеннях здійснюють за рахунок маленьких отворів або щілин в перетинці між ними або за допомогою пористих гнотів.

Носій при електрофорезі попередньо насичують буфером, його контакт із буфером камер здійснюють, як правило, за допомогою гнотів-містків із декількох шарів фільтрувального паперу або марлі. Гноти, які випускають на підприємствах (фірмах), вкриті оболонкою, їх можна використовувати багаторазово. При низьковольтному електрофорезі на папері можна обійтися без гнотів-містків – контакт створюється за рахунок безпосереднього занурювання паперу в буферний розчин.

При *горизонтальному електрофорезі* насичений буфером носій (папір, ацетат целюлози, пластинки з гелем і тонким шаром) розміщують на плоскій поверхні ізолюючого матеріалу, наприклад, скла або плексигласу. При *вертикальному електрофорезі* папір або пластинки розміщують вертикально в спеціальних камерах. При електрофорезі в поліакриламідному гелі зразки розміщують на горизонтальних пластинках при препаративному електрофорезі, а з аналітичною метою використовують, як правило, циліндричні вертикальні стовпчики гелю в каліброваних скляних трубках.

Насичення носія буфером. Носії для забезпечення електропровідності до початку електрофорезу насичують буфером. Насичення носія буфером доцільно проводити до нанесення зразка, інакше це з самого початку призведе до розмивання зразка.

Хроматографічний папір, який використовується для електро-форетичного розділення, задля насичення буфером, як правило, занурюють у буфер, а потім промокають фільтрувальним папером для видалення надлишку вологи. Смушкам паперу з ацетату целюлози для насичення буфером дають можливість плавати на поверхні буфера в плоскій посудині, оскільки при швидкому занурюванні ацетат целюлози захоплює пухирці повітря, які важко видалити. Тонкі шари носіїв на пластинках насичують буфером, в основному, в приладах для горизонтального електрофорезу за рахунок дифузії буфера з камери через гноти-містки.

Нанесення зразка проводять мікропіпеткою або шприцом у вигляді маленької плями (приблизно діаметром 3 мм) або вузької смужки. Якщо окремі компоненти суміші, яка аналізується, мають протилежні електричні заряди, то вони в ході розділення будуть рухатися до різних електродів (катода і анода). Тому в цьому випадку зразок необхідно наносити посередині паперу або пластинки. У випадку, коли всі компоненти зразка мають один знак електричного заряду, то зразок необхідно наносити як можна далі від електрода, до якого будуть рухатися компоненти зразка. Це необхідно для того, щоб такі компоненти зразка проходили як можливо більшу відстань.

До складу зразків часто додають барвники (див. нижче), при спостереженні за рухом яких отримують відомості про поведінку системи в ході електрофорезу. Для солубілізації білків, які розділяються, в ході електрофорезу додають, зокрема, сечовину або натрію додецилсульфат.

Процес розділення компонентів зразка проводять після його нанесення. Вмикають джерело живлення і слідкують за підтриманням струму (напруги) протягом всього процесу розділення. Особлива увага приділяється при високовольтному електрофорезі можливому нагріванню системи, яке при використанні паперу як носія може викликати навіть обвуглювання паперу.

Низьковольтний електрофорез звичайно закінчується через 1,5–2 год, а високовольтний – через 1 год. Після закінчення електрофорезу, джерело живлення вимикають і тільки після цього вилучають носій.

Вилучення носія. Смушки паперу, ацетату целюлози і тонкошарові пластинки сушать прямо на повітрі при кімнатній температурі або в сушильній шафі при температурі 110 °С. Для вилучення циліндричних стовпчиків

поліакриламідного гелю з скляних трубок, їх обводять цівкою дистильованої води під тиском, використовуючи для цього шприц. При цьому гель відстає від стінок скляної трубки і його відштовхують із трубки.

Ідентифікація розділених речовин при електрофорезі. Після електрофоретичного розділення речовин, їх визначають на електрофореграмі та проводять (за необхідності) кількісний аналіз. Один із методів ідентифікації речовин – це їх забарвлення, оскільки більшість біологічних речовин безбарвні. Існує велика кількість барвників, які здатні вибірково забарвлювати конкретні речовини. В табл. 1.5 наведені приклади барвників біологічних речовин.

Таблиця 1.5. Деякі барвники біологічних речовин після електрофоретичного розділення

Речовина	Реактив-барвник
Білки	Нігрозин в оцтовій (триоцтовій) кислоті Бромфеноловий синій – $ZnSO_4$ – оцтова кислота Лісамін зелений в оцтовій кислоті Кумасі синій Ортофталевий альдегід Дансилхлорид Флюоресцамін
Глікопротеїди	Йодна кислота з наступною обробкою реактивом Шиффа
Ліпопротеїди	Судан чорний в 60 %-му етанолі
Полісахариди	Йод
Кислі мукополісахариди	Толуїдин синій в суміші метанол-вода
Нуклеїнові кислоти	Акридиновий оранжевий Бромистий етидій Гомзидин синій Метилловий зелений-піронін

Якщо барвник кількісно взаємодіє з розділеним компонентом суміші, яка аналізується, то можна визначити кількість забарвленої речовини рядом методів. Так, із відповідної ділянки електрофореграми можна вилучити носій з досліджуваною речовиною, а потім із неї екстрагувати речовину відповідним розчинником. У подальшому кількість цієї речовини можна визначити відповідним методом, наприклад, спектроскопічно. Інший метод – сканування забарвленої досліджуваної речовини за допомогою приладу, який називається *денситометром*. Цей прилад вимірює кількість світла, яка пройшла через носій, а також зв'язану з носієм забарвлену речовину, реєструється на денситограмі. Калібровку денситометра проводять із використанням таких же електрофореграм за показаннями денситометра (денситограм) для відомих кількостей цього компонента, який досліджується, що зв'язаний носієм і взаємодіє з барвником.

Локалізацію білків-ферментів можна визначити іншим шляхом. Для цього, наприклад, смужку ацетатцелюлози, тонкошарову пластинку тощо занурюють у розчин субстрату цього ферменту і, якщо продукт ферментативної реакції забарвлений, то визначають місце його розташування, а отже і місце розташування ферменту.

Місце знаходження радіоактивних речовин можна визначити за реєстрації іонізуючого випромінювання методом авторадіографії з використанням, наприклад, спеціальних ядерних емульсій або рентгенівської плівки. Їх спочатку приводять у контакт з електрофореграмою і після проявлення виявляють місце локалізації почорнінь, які викликані дією іонізуючого випромінювання, джерелом якого є речовина, яка аналізується.

Інший методичний підхід виявлення радіоактивних речовин-носіїв зі зв'язаною речовиною – це розрізання на шматочки носія, які потім поміщують у відповідну сцинтиляційну рідину і визначають їх рівень радіоактивності за допомогою сцинтиляційного лічильника радіоактивності.

1.5.4. Спеціальні методи електрофорезу

Існує значна кількість методів проведення електрофорезу, зокрема, це *препаративний електрофорез* (його застосовують для одержання відносно великої кількості препарату) або *аналітичний електрофорез* (для визначення компонентів суміші, яка аналізується, контролю їх чистоти та ін.).

Низьковольтний та високовольтний електрофорез

Розрізняють низько- і високовольтний електрофорез. *Низьковольтний електрофорез* (електрична напруга 200–500 В), схема електрофоретичного блоку якого з використанням як носія паперу наведена на рис. 1.13.

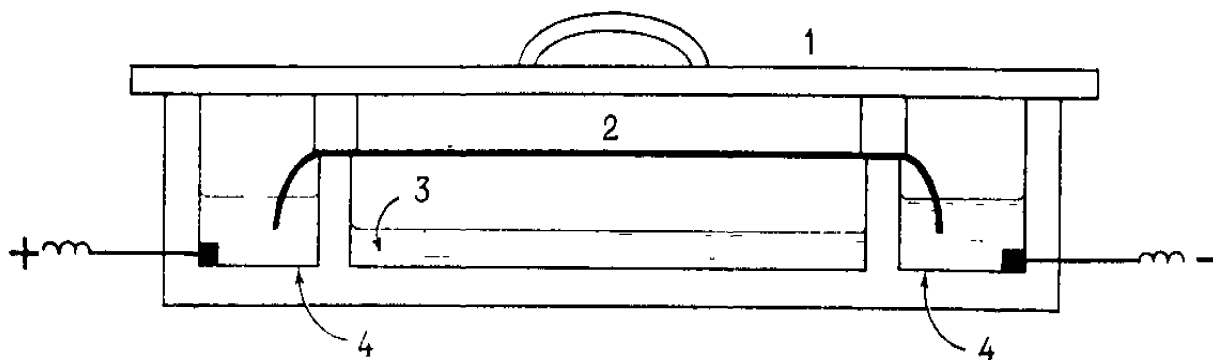


Рис. 1.13. Схема електрофоретичного блоку для низьковольтного електрофорезу на папері

П р и м і т к и: 1 – кришка з ручкою; 2 – папір (носій); 3 – вода для підтримання вологості; 4 – буфер.

Його використовують найчастіше для аналізу суміші білків, які погано розділяються, наприклад, методами хроматографії. В той же час він малоефективний для розділення невеликих за розмірами (молекулярною масою) молекул, які мають малий заряд і тому їх електрофоретична рухливість низька, а значить, вони розділяються повільно. Крім того, у цьому випадку має місце значне розмивання зон за рахунок дифузії таких молекул.

Зразок наносять у вигляді плями або вузьких смужок. Папір насичують буфером і два його краї занурюють в ємність із буфером для створення електричного контакту з електродами. Електрофоретичну систему закривають кришкою для попередження висихання паперу. Після попередньо визначеного часу процесу електрофорезу папір виймають, просушують і визначають локалізацію компонентів суміші, яка аналізується, зокрема при використанні барвників.

Небажані явища, які виникають при низьковольтному електрофорезі (мала електрофоретична рухливість, а значить великий час електрофоретичного дослідження, і дифузія речовин) можна значно зменшити або навіть виключити при використанні *високовольтного електрофорезу* (електрична напруга 500–10 000 В).

Висока електрична напруга обумовлює велику силу струму, що спричинює перегрівання електрофоретичної системи (наприклад, паперу). Це може привести як до руйнування речовин зразка, так і можливого обуглювання паперу, порушення його властивостей. Тому необхідна система охолодження. Охолодження проводять при використанні, наприклад, як носія, паперу двома способами – «*повним зануренням*» і за допомогою *охолоджувальних пластин*. У першому випадку (рис. 1.14А) папір занурюють у відносно великий об'єм рідини, яка не змішується з буфером і не проводить електричний струм (наприклад, толуол, вуглець чотирехлористий, варсол або різні масла). Звичайно в охолоджувальну рідину занурюється змійовик, за яким циркулює вода, що забезпечує додаткове охолодження.

Метод «повного занурення» достатньо ефективний і він технічно відносно легко здійснюється, але охолоджувальні рідини токсичні і в ряді випадків вогнебезпечні.

Система охолоджуючих пластин (рис. 1.14Б) безпечніша і ефективніша, ніж метод «повного занурення». В ньому дві пластинки (як правило, алюмінієві) щільно, під тиском притискають надувною прокладкою (заповнений повітрям мішечок підтримує охолоджувальні пластинки від вгинання) до ізольованого від них поліетиленом паперу (носія). В охолоджуючих пластинках можуть міститися канали для циркуляції води.

Високовольтний електрофорез, зокрема на папері, широко застосовується для розділення амінокислот, пептидів, нуклеотидів та ін. Оскільки повне розділення компонентів суміші, яка аналізується, не завжди можливе при використанні навіть високовольтного електрофорезу, то його часто використовують у сполученні з хроматографією в перпендикулярному напрямі. Цей метод отримав назву *двовимірне розділення* (рис. 1.15).

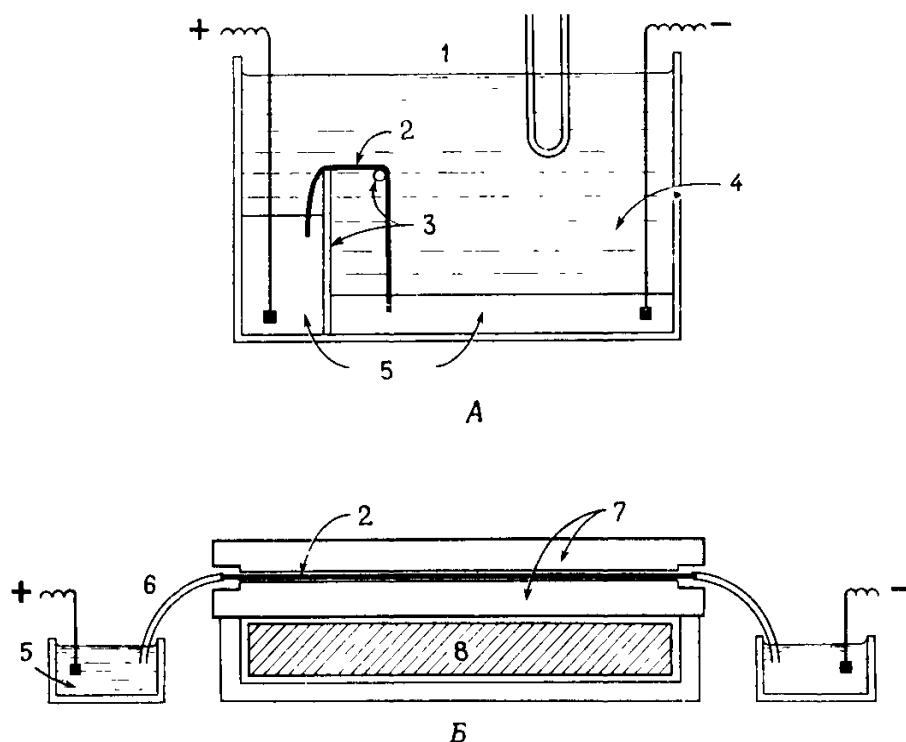


Рис. 1.14. Схема електрофоретичних блоків для високовольтного електрофорезу при використанні методу «повного занурення» (А) і з охолоджувальними пластинками (Б)

П р и м і т к и: 1 – охолоджувальний змійовик; 2 – папір (носіє); 3 – опора; 4 – охолоджувальна рідина; 5 – буфер; 6 – гніт; 7 – охолоджувальні пластинки; 8 – мішечок, який заповнений повітрям.

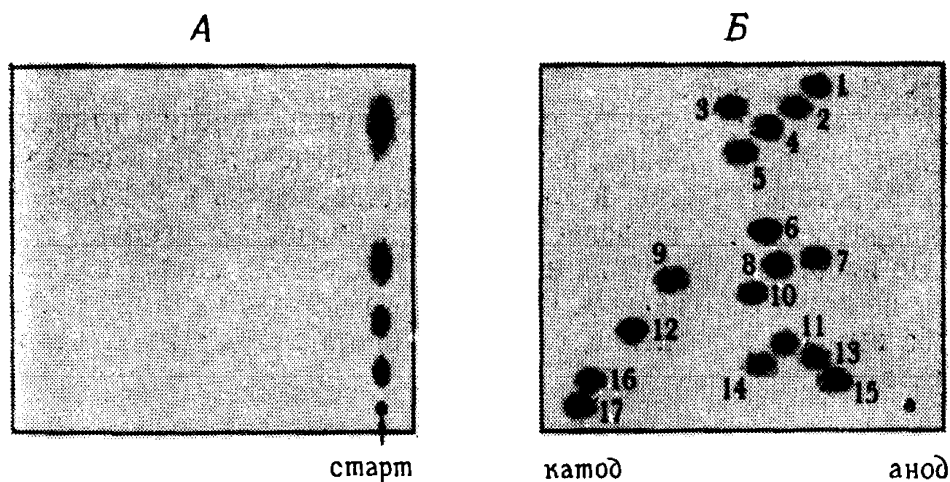


Рис. 1.15. Приклад хроматографії на папері в комбінації з електрофорезом для розділення амінокислот

П р и м і т к и: А – тільки хроматографія; Б – хроматографія з наступним електрофорезом; 1 – триптофан; 2 – тирозин; 3 – лейцин; 4 – фенілаланін; 5 – метіонін; 6 – треонін; 7 – оксипролін; 8 – пролін; 9 – аланін; 10 – серин; 11 – глутамін; 12 – гліцин; 13 – глутамінова кислота; 14 – аспарагін; 15 – аспарагінова кислота; 16 – аргінін; 17 – лізин.

Зразок спочатку, наприклад, піддають хроматографії, а потім електрофорезу в напрямі під прямим кутом, або навпаки.

Загальні уявлення про методи електрофорезу, що базуються на різних способах проведення

Існує три основні типи електрофоретичних систем за способом розділення компонентів суміші, яка аналізується: електрофорез з рухомою межею (метод рухомої межі, фронтальний електрофорез), зональний (на носії) і стаціонарний (витискання) електрофорез.

В електрофорезі з рухомою межею електричне поле прикладають до вихідної різкої межі між розчином молекул, що аналізується, і буфером. Швидкість руху заряджених молекул визначають шляхом спостереження за переміщенням цієї межі. Якщо досліджуваний розчин містить гетерогенну суміш іонізованих молекул, то можна спостерігати значну кількість меж, які рухаються.

У випадку зонального електрофорезу отримують стабільні зони компонентів суміші, яка аналізується. Зразок у вигляді плями або смужки наносять на інертний носій (фільтрувальний папір, блоки гранульованого матеріалу або різні гелі), який насичений розчинником (буфером). Як середовище для зонального електрофорезу можуть бути використані градієнти густини на колонці.

У розчині при зональному електрофорезі зони можуть бути стабілізовані за допомогою обертання електрофоретичної трубки або неперервного ламінарного (лат. *lamina* – пластинка) потоку тонкого шару буферного розчину, тобто такого, при якому такі шари рідини переміщуються паралельно (див. нижче).

Стаціонарний (витискання) електрофорез характеризується тим, що через певний час після початку розділення речовин встановлюється стан рівноваги, при якому ширина зон у подальшому не змінюється (див. нижче ізоелектричне фокусування та ізотахофорез).

У наступних пунктах описані різні методи електрофорезу.

Електрофорез із рухомою межею (фронтальний електрофорез)

Існує ряд модифікацій електрофорезу з рухомою межею. *Звичайний електрофорез із рухомою межею* проводять у приладі, основою якого (електрофоретичний блок) є U-подібна трубка з прямокутним поперечним перерізом, що входить до складу комірки (кювети) Тизеліуса (рис. 1.16).

У U-подібну трубку під буферний розчин нашаровують розчин зразка таким чином, щоб між буфером і цим розчином утворилася межа розділу. В обидва коліна трубки вставляють електроди, які з'єднані з джерелом живлення. При проходженні електричного струму іонізовані молекули речовини, яка досліджується, починають рухатися єдиним фронтом.

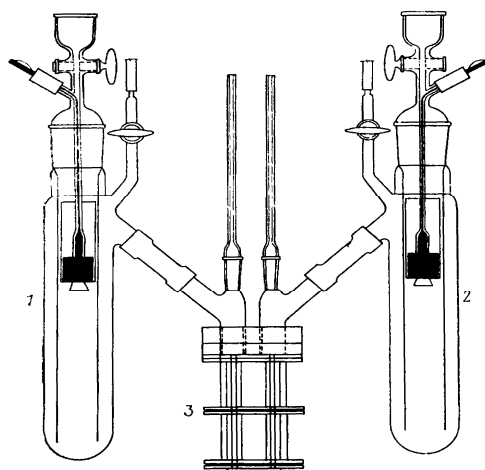


Рис. 1.16. Схема комірки Тизеліуса в поперечному розрізі

П р и м і т к и: 1, 2 – комірки з електродами; 3 – комірка Тизеліуса.

Розроблена Тизеліусом вимірювальна комірка складається з нижньої, двох середніх і двох верхніх секцій, котрі можуть зсуватися в горизонтальному напрямі. Розчин зразка заливають спочатку в нижню секцію, а потім її зсувають – роз'єднують із середніми секціями. Одну з них наповнюють буфером, а іншу – розчином зразка. Потім заповнюють буфером верхні секції. Всю U-подібну комірку розміщують у термостаті. Здебільшого використовують водяний термостат, в якому підтримують температуру 1 °С для відведення тепла.

Після встановлення температури нижню секцію з'єднують з середніми і спостерігають утворення двох чітких меж між буфером і розчином зразка. В одну з комірок електрода додають буферний розчин. При зменшенні його об'єму в другій електродній комірці, виводять обидві межі на певний рівень у середніх секціях. Потім вмикають джерело живлення і спостерігають за переміщенням межі з часом, як правило, за допомогою оптичних систем.

Внаслідок дифузії молекул межа розділу буфера і розчину зразка не може бути ідеально різкою (порівняти рис. 1.17, випадок В і Г).

Схема електрофорезу з рухомою межею двох білків наведена на рис. 1.17.

Способи спостереження за примежовими змінами концентрації речовин, які досліджуються, ґрунтуються, як правило, на оптичних методах, принцип роботи яких базується на різниці оптичних властивостей буфера і розчину зразка – різниці в світлорозсіюванні, спектрометрії у видимій і ультрафіолетовій областях, різниці в показниках заломлення (рефрактометрії). Саме останній метод набув найбільшого використання у спеціальній оптичній системі, яка називається *шлірен оптичною системою*, що дозволяє безпосередньо реєструвати градієнт показника заломлення світла вздовж електрофоретичної комірки (рис. 1.18).

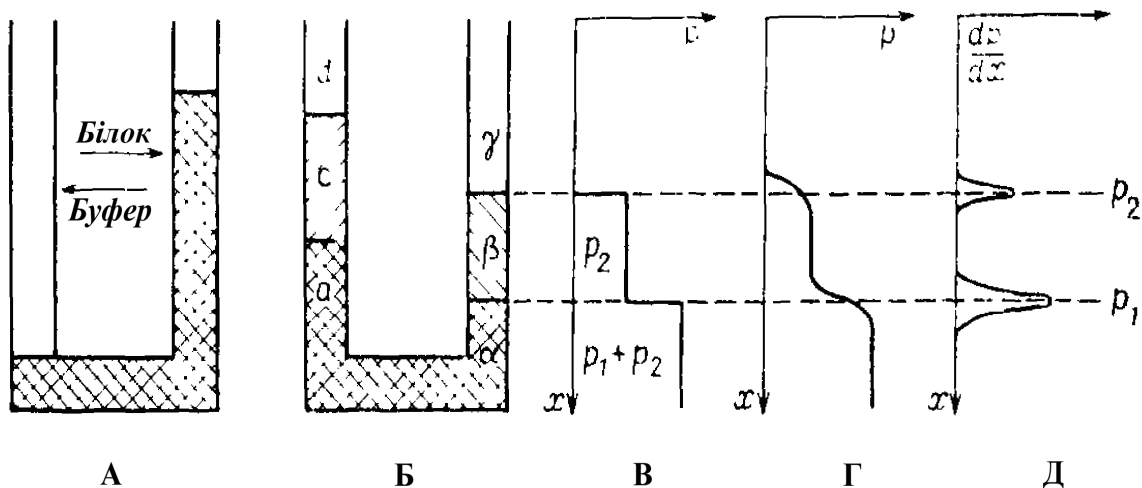


Рис. 1.17. Схема електрофорезу з рухомою межею двох білків

П р и м і т к и: А – до електрофорезу; Б – через час після початку електрофорезу; В – розділення білків у правому коліні після закінчення електрофорезу без урахування дифузії; Г – те ж, що і В, але з урахуванням дифузії; Д – перша похідна кривої, яка наведена на Г; P_1 і P_2 – концентрації білкових компонент; ліве коліно U-подібної трубки (вихідна міграція); а – суміш обох білків; с – більш швидкий компонент; d – буфер; праве коліно (низхідна міграція); α – суміш обох білків; β – більш швидкий компонент; γ – буфер.

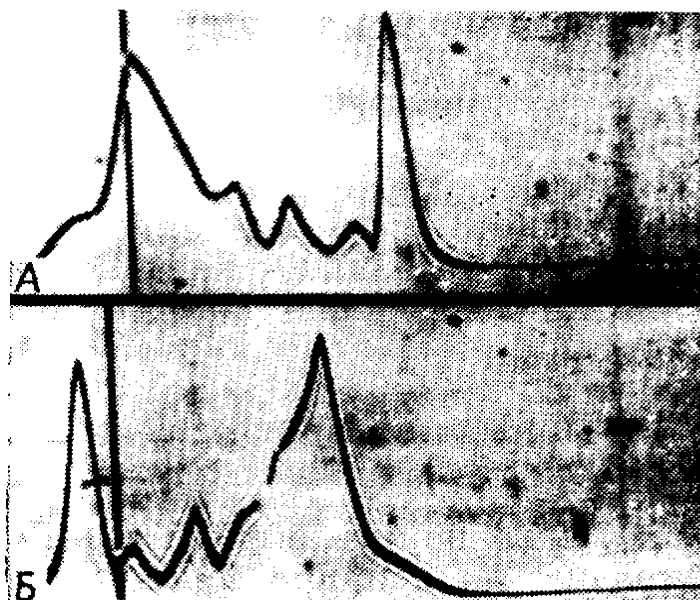


Рис. 1.18. Електрофореграма сироватки крові людини, яка одержана методом електрофорезу з рухомою межею (шлірен оптична система)

П р и м і т к и: А – ліве коліно U-подібної трубки (висхідна міграція); Б – праве коліно (низхідна міграція).

У приладі для методу електрофорезу з рухомою межею використовують, в основному, хлор-срібні електроди, але також платинові та вугільні.

При проведенні електрофорезу з рухомою фазою виникають аномалії двох типів. По-перше, концентрації речовин, які досліджуються, що вираховуються з площин під відповідними піками на електрофореграмі, не є справжніми концентраціями цих речовин (концентраційна аномалія). По-друге, швидкість руху висхідної та низхідної меж відмінні між собою (аномалія рухливості). В деяких випадках цими аномаліями можна знехтувати, але коли необхідна висока точність, їх необхідно враховувати спеціальними підходами, які описані в рекомендованій літературі, список якої наведений в кінці.

Виникнення аномалій при використанні методу електрофорезу з рухомою межею, труднощі щодо кількісного визначення речовин, які аналізуються, а також те, що цим методом можливо розділити тільки макромолекули (з великою молекулярною масою), причому, як правило, необхідно біля 10 см^3 від 0,5 %-ного розчину зразка (тобто 50 мг речовини), обмежує його широке застосування. Але все ж таки він, хоча і обмежено, використовується, особливо в модифікації з використанням градієнту густини буфера для розділення і аналізу макромолекул (зокрема, білків), для визначення їх ізoeлектричної точки.

Суть такої модифікації методу електрофорезу з рухомою межею полягає в тому, що використовується одна з різновидностей вертикального електрофорезу в трубках, в яких густина буфера підвищується з глибиною. Це так званий *електрофорез із рухомою межею в градієнті густини*. Створюється такий градієнт додаванням до буфера різної концентрації речовини, яка не дисоціює (не іонізується), наприклад, сахарози. На певному рівні стовпчика буфера вузькою смугою вводиться за допомогою мікропіпетки або шприца розчин зразка. Після закінчення електрофорезу стовпчик розділяють на фракції і аналізуються. Саме розробка методу електрофорезу з рухомою межею у градієнті густини поклала початок методу ізoeлектричного фокусування.

Цей метод використовується для діагностики ряду патологій, в яких змінюється склад і електрофоретичні властивості білків крові, сечі, слини, спинномозкової рідини, шлункового соку тощо. Також він застосовується для визначення асоціації та дисоціації речовин, утворення їх комплексів, а також ще в деяких випадках.

Зональний електрофорез

Зональний електрофорез широко використовується завдяки високій роздільній здатності, відносно великій швидкості, можливості розділення найрізноманітніших речовин – від білків, нуклеїнових кислот, вуглеводів, ліпідів, вітамінів до низькомолекулярних сполук, у тому числі неорганічних. Цей процес може відбуватися без підтримуючого середовища (зональний електрофорез у вільному середовищі), але поширенішим є використання пористих носіїв, які є механічно і хімічно стійкими, мають незначну адсорбційну та електроосмотичну здатність (зональний електрофорез у підтримуючому середовищі).

Зональний електрофорез без підтримуючого середовища

Вже відмічалось (див. вище), що електрофорез без підтримуючого середовища здійснюється, як правило, у вільному середовищі зі стабілізацією електрофоретичних зон обертанням електрофоретичної трубки, а також проточного електрофорезу у вільному середовищі.

Зональний електрофорез у вільному середовищі зі стабілізацією електрофоретичних зон обертанням

Необхідна умова для електрофоретичного розділення компонентів суміші, яка аналізується, на окремі зони є попередження *конвекції* (лат. *convectio* – принесення). Вона призводить до розмивання зон речовин, які аналізуються. Один із методів їх стабілізації – *обертання електрофоретичної трубки*. В процесі електрофорезу горизонтальна трубка з внутрішнім діаметром, як правило, 3 мм обертається навколо своєї поздовжньої вісі з швидкістю 40 об/хв. Таке обертання попереджує конвекційне збурювання. Це відбувається внаслідок того, що при обертанні трубки зразок, який знаходиться в ній, синхронно коливається відносно її поперечного перерізу, наслідком чого буде досягнута стабілізація.

Схема електрофоретичного блоку для зонального електрофорезу у вільному середовищі зі стабілізацією електрофоретичних зон обертанням наведена на рис. 1.19.

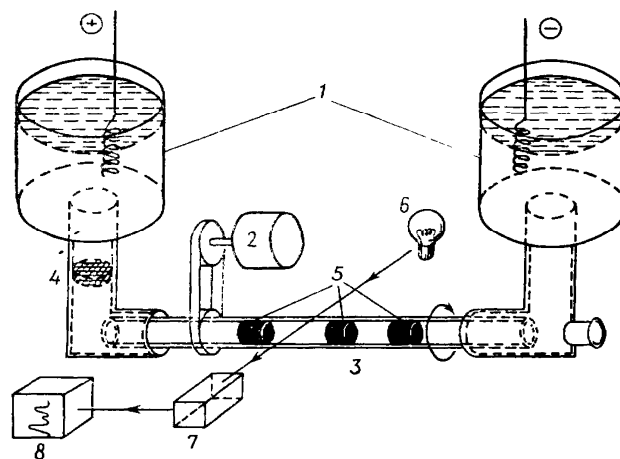


Рис. 1.19. Схема електрофоретичного блоку для зонального електрофорезу у вільному середовищі зі стабілізацією електрофоретичних зон обертанням

П р и м і т к и: 1 – комірки для електродів; 2 – двигун, який обертає електрофоретичну трубку; 3 – електрофоретична трубка; 4 – пробка з гелю; 5 – положення електрофоретичних зон; 6, 7 і 8 – ультрафіолетова оптична сканувальна система.

Локалізацію зон в електрофоретичній трубці визначають, як правило, шляхом її сканування в ультрафіолетовій області спектру світла.

Оскільки кількість матеріалу зразка, який вноситься в електрофоретичну трубку не перевищує 0,4 мг, то цей метод є мікрометодом для аналітичних цілей. Його доцільно використовувати у тих випадках, коли необхідно провести електрофоретичний аналіз за відсутності носіїв, а кількість матеріалу, що аналізується, недостатня для методу рухомої межі (для нього необхідно не менше 50 мг матеріалу).

Зональний проточний електрофорез у вільному середовищі зі стабілізацією зон у тонкому шарі рідини

Проточний (неперервний) електрофорез – це препаративний метод, який полягає в одночасному переміщенні речовин, які додаються безперервно в одному напрямі потоком буфера, а в іншому (перпендикулярному) – електричним полем. Схема електрофоретичного блоку для неперервного (проточного) електрофорезу наведена на рис. 1.20.

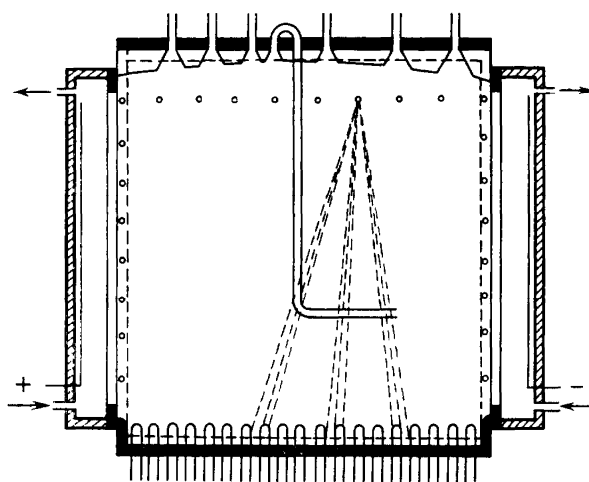


Рис. 1.20. Схема електрофоретичного блоку для неперервного електрофорезу в тонкому шарі рідини

Електрофоретичний блок складається з двох паралельних скляних пластинок, які розміщені на відстані 0,5 мм (або 1 мм) одна від одної. Потік буфера повинен бути рівномірним і ламінарним (шари перемішуються паралельно). Це досягається шляхом подання буфера багатоканальним перистальтичним насосом, причому компоненти суміші, яка аналізується, подаються в електрофоретичну комірку безперервно.

Точність температурного контролю і мала відстань між пластинками обумовлюють суттєве зниження конвекції.

Ряд конічних отворів у нижній частині електрофоретичної комірки дозволяє збирати фракції зразка, які розділилися. При цьому використовують

систему зв'язаних між собою посудин малого об'єму або теж застосовують для збирання фракцій багатоканальний перистальтичний насос.

З двох боків проточної комірки розміщують мембрани, через які виконується електричний контакт шару рідини з комірками для електродів. Використовують, як правило, іонообмінні мембрани, що мають відносно малий електричний опір, причому на катодній стороні використовується аніонообмінна мембрана, а на анодній – катіонообмінна. Прилад для неперервного (проточного) електрофорезу має високоефективну систему охолодження.

Описаний вище прилад, незважаючи на ряд переваг, дорогий і складний. Ймовірно, із-за цих причин він не знайшов ще широкого використання. Але цей метод дає дуже гарне розділення білків, а також клітин і субклітинних частинок, для яких інші методи електрофорезу практично не можна застосувати.

Зональний електрофорез у градієнті густини

Одним із шляхів стабілізації зон при електрофорезі – це використання колонок із *градієнтом густини*. Цей підхід використовується як у препаративному, так і в аналітичному електрофорезі. В цьому випадку середовище не є обмежувальним фактором у відношенні розміру молекул (молекулярної маси), які розділяються.

Густина розчинів, як правило, змінюється майже лінійно зі зміною концентрації речовини, яка розчиняється. Тому для створення градієнта густини можна використати градієнт концентрації речовини, яка електронеутральна, здатна добре розчинятися, не взаємодіє з речовинами, які аналізуються, та буфером.

Найчастіше для формування градієнту густини використовують, як вже відмічалось, сахарозу, яка за своїми властивостями відповідає всім необхідним наведеним вище умовам. Крім того, її розчин має певну в'язкість, що сприяє стабілізації електрофоретичних зон. В той же час ця в'язкість не настільки велика, щоби перешкоджати руху заряджених молекул і частинок. З цією метою можна використати інші речовини, зокрема гліцерин, етиленгліколь, в обмеженому діапазоні концентрацій етанол та ін.

Суттєве значення має також густина зразка. Вона повинна бути рівною або дуже близькою до густини середовища в місці введення зразка. Звичайно формування шару розчину зразка буде відповідати необхідним умовам, якщо у місці введення зразка створено стрімкий локальний градієнт густини, настільки, що відстань між цим місцем і шаром, який має однакову зі зразком густину, не перевищує декількох міліметрів. Це, так званий, методичний прийом «виступу густини», що дає можливість зразку майже ламінарно переміщуватися вверх чи вниз до рівня рівної їм густини і утворювати таку горизонтальну смужку.

Для стабілізації зразка після його внесення в колонку з градієнтом густини, доцільно вмикати електричну напругу через 15–20 хв, якщо товщина шару внесеного зразка складає біля 5 мм.

Ще одна проблема – це можливість утворення дрібних краплинок, які осідають все глибше в колонку і можуть порушувати зону старту. Причина цього явища – виникнення від’ємного градієнту густини із-за того, що сахароза дифундує в початкову зону електрофорезу швидше, ніж з неї речовини, які аналізуються. Для подолання цього запропоновано в зразку розчиняти додаткові речовини (гліцерин, декстрини, калій йодистий), які будуть дифундувати зі зразка швидше, ніж речовини, які аналізуються (зокрема, білки). Таким чином, виникає протидія зворотній дифузії сахарози.

Оскільки при формуванні градієнта густини виконується правило, що густина розчину зростає в колонці зверху вниз, то швидкість переміщення речовин, які аналізуються, буде прискорюватися при висхідному електрофорезі. Це необхідно враховувати, наприклад, за рахунок підвищення рухливості речовин зразка шляхом використання солі, яка створює градієнт електропровідності, або за рахунок градієнту рН. Використовують також молекулярні сита (гелі), що дозволяють розділяти речовини не тільки за зарядом, але і за розміром молекул.

Для проведення зонального електрофорезу в градієнті густини розроблені прилади різних типів. Так, наприклад, в одному з них такий градієнт проводять у вертикальній скляній колонці, яка має «кожух» для охолодження. Платинові електроди розміщують у бічних трубках, одна з яких за допомогою рідкого контакту з’єднана з нижньою, а інша – верхньою частиною колонки. Градієнт густини створюється за рахунок послідовного нашаровування рідини через капілярні трубки. Так же вводиться зразок.

На рис. 1.21 наведено схему електрофоретичного блоку для проведення зонального електрофорезу в градієнті густини. Основна його частина (електрофоретична комірка) – це J-подібна трубка, основа якої заповнена пробкою з поліакриламідного гелю. В короткому коліні трубки над пробкою гелю знаходиться насичений розчин натрію хлориду (NaCl), в який занурений один із електродів. У довгому коліні зверху трубки розміщують насичений розчин сахарози в буфері. Іншу частину цього коліна використовують як колонку.

Для заповнення і випорожнення колонки слугує поршень, який з’єднаний з градієнтним змішувачем (колектором) фракцій за допомогою гнучкого пластмасового шланга. В поршні просвердлені отвори, які заповнюються у поліакриламідному або агаровому гелі (в буфері) для забезпечення електричного контакту з верхнім (анодним) електродом. Для створення градієнту густини сахарози часто використовують спеціальний змішувач градієнта. Для внесення зразка використовують, як правило, шприц.

Після закінчення електрофоретичного розділення, поршень за допомогою скляного стрижня вдавлюють всередину колонки з кроком 0,5 або 1,0 см і збирають фракції розчину, який витікає через пластмасовий шланг.

Існує ще цілий ряд приладів для зонального електрофорезу в градієнті густини, в тому числі з поршневою системою для заповнення і вивільнення колонки, але вони мають певні відмінності в конструкції у порівнянні з J-подібною електрофоретичною трубкою.

Для ідентифікації та визначення вмісту речовин, які аналізуються, використовують, як правило, проточні оптичні системи (спектроскопія у видимій та ультрафіолетовій області тощо).

Використовують також прийом збору фракцій та їх аналіз. У випадку дослідження радіоактивних речовин вимірюють радіоактивність окремих фракцій. Усі процеси в сучасних зональних електрофоретичних приладах, у тому числі в градієнті густини, автоматизовані.

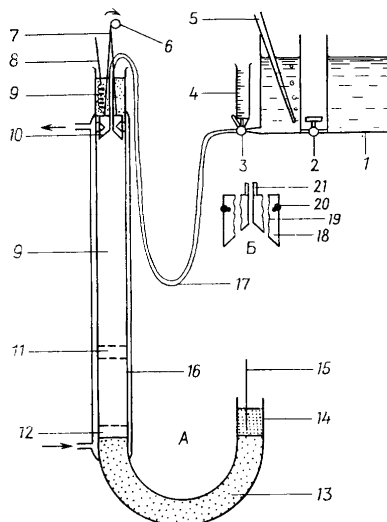


Рис. 1.21. Схема електрофоретичного блоку для зонального електрофорезу (початкова стадія) в градієнті густини:

П р и м і т к и: А – J-подібна трубка; Б – складова частина поршня; 1 – пристрій для створення градієнта густини; 2 – двоходовий кран; 3 – триходовий кран; 4 – шприц для введення проби; 5 – пристрій для пропускання повітря з метою перемішування розчину при формуванні градієнту; 6 – вісь редуктора; 7 – нитка; 8 – анодний платиновий електрод; 9 – колонка з створеним градієнтом густини сахарози; 10 – поршень; 11 – пробка у вибраному положенні; 12 – насичений розчин сахарози; 13 – пробка з поліакриламідного гелю; 14 – насичений розчин натрію хлориду; 15 – платиновий катод; 16 – водяний «кожух» для термостатування (охолодження); 17 – пластмасова трубка; 18 – зубчата насічка; 19 – пробка з поліакриламідом або агарозою; 20 – ущільнювальне кільце; 21 – наконечник для пластмасової трубки.

Зональний електрофорез у підтримуючому середовищі з дрібнопористою (капілярною) структурою

Найпростіший спосіб забезпечення стабільності електрофоретичних зон – це використання носіїв, які мають дрібнопористу (капілярну) структуру. Прояв конвекції в такій системі незначний, оскільки діаметр таких пор (капілярів) малий і це призводить до зниження швидкості потоку рідини.

Як підтримувальні носії використовують, в основному, хроматографічний папір (у деяких випадках навіть фільтрувальний папір, який містить 96 % α -целюлози), плівки з ацетату целюлози, тонкі шари целюлози, оксидів кремнію або алюмінію тощо, колонки чи блоки целюлозного порошку, гранули крохмалю і полівінілових полімерів, а також агаровий, агарозний, крохмальний або поліакриламідний гелі.

Зональний електрофорез у підтримуючому середовищі має низку переваг перед таким без підтримуючого середовища. Вдається досягнути високої роздільної здатності, особливо в середовищі, яке одночасно характеризується антиконвекційними властивостями і ефектом молекулярного сита. Крім того, метод легко пристосувати як для препаративного розділення і очищення речовин, так і аналітичних завдань. Процедура ідентифікації речовин та їх кількісне визначення може проводитися безпосередньо з використанням електрофореграм.

Зональний електрофорез на папері

Існує декілька модифікацій електрофорезу на папері. Одна з них – це, так званий, **звичайний електрофорез на папері**. Папір, який використовується для зонального електрофорезу у підтримуючому середовищі – це хроматографічний папір. Він просякається буферним розчином перед початком електрофорезу. Різні марки паперу мають неоднакову вбиральну здатність, і від неї, а саме об'єму буферу, який міститься у папері, залежить його електропровідність. Тонкий або середньої товщини папір із щільною текстурою дає при електрофорезі чіткий фронт розчинника, тоді як більшої товщини папір, що швидко «протікає», має відносно велику вбиральну здатність і характеризується нечітким фронтом. У цьому полягає одна з переваг хроматографічного паперу для електрофорезу порівняно з фільтрувальним.

Важливу роль при визначенні електрофоретичної рухливості речовин, які аналізуються, має випаровування розчинника (буфера) під дією тепла, яке утворюється при протіканні електричного струму. Воно призводить до підвищення концентрації електроліту в папері і, отже, до збільшення іонної сили. Ступінь випаровування рідини змінюється залежно від відстані між ділянкою паперу і коміркою з буфером, у результаті чого виникає струм буфера. Його можна мінімізувати, якщо використовувати буфери з достатньо низькою іонною силою. Випаровування можливо суттєво знизити при використанні приладів із охолодженням або створенням в електрофоретичній камері атмосфери насиченої пари. Випаровування також зменшується, якщо в розчин буфера додати 5–15 % гліцерину або пропіленгліколю.

Внесок у точність електрофоретичного розділення речовин на папері (як і при використанні інших носіїв) вносить електроосмос, тобто виникнення електричного заряду між поверхнею паперу і молекулами води розчину буфера, який можна врахувати, наприклад, при слідуванні за рухом електронеutralної сполуки, наприклад, глюкози.

Якщо рівень розчину буфера в обох комірках для електродів не однаковий, то виникає, так званий, сифонний ефект, який усувається встановленням однакового рівня буфера в комірках для електродів.

Безумовно, на електрофоретичну рухливість речовин, які визначаються, впливають природа і властивість буфера, паперу і зразка, характеристика зовнішнього електричного поля, температура, вологість та ін., тобто умови проведення аналізу.

Прилади для звичайного електрофорезу на папері складаються з двох комірок для електродів і пристрою для підтримування смужок або листків паперу в певному положенні між комірками для електродів. Як електроди звичайно використовують платиновий дріт. Можна також застосовувати хлор-срібні та вугільні електроди, але в останньому випадку їх необхідно розміщувати в целофанових трубках, щоби попередити потрапляння частинок вугілля в буфер.

У деяких випадках вологі смужки паперу розміщують між скляними пластинками і занурюють у комірку (кювету) з хлорбензолом для ефективного відводу тепла, яке утворюється при високовольтному електрофорезі. Разом із тим встановлено, що високовольтний електрофорез на папері не дає особливих переваг, тому у більшості досліджень використовують прилади з вологою камерою і низьковольтний електрофорез.

Електрофоретичні блоки бувають декількох типів. В одних із них паперові смужки вільно висять поверх підпірної планки (рис. 1.22).

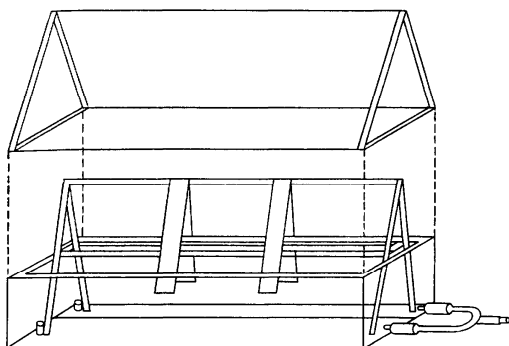


Рис. 1.22. Електрофоретичний блок для електрофорезу на папері зі смужками паперу, які вільно звисають

В іншій групі приладів для електрофорезу на папері (як і на пластинках) смужки або широкі листки паперу розміщують горизонтально між камерами для електродів.

Гніти-мостики використовують для створення контакту між насиченим буфером носієм і буфером, який знаходиться в камерах. При використанні паперового носія, папір можна безпосередньо занурити в буфер і тоді гніти-мостики не потрібні.

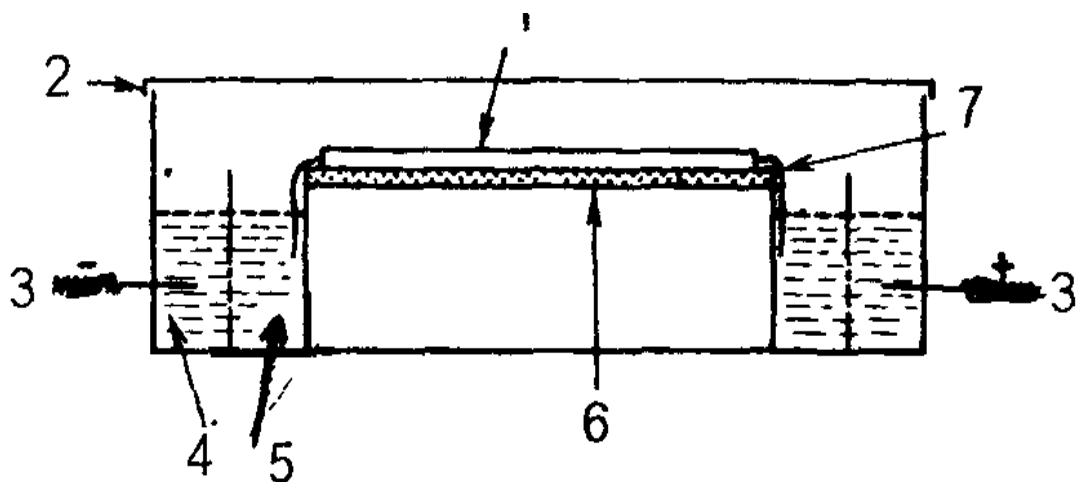


Рис. 1.23. Схема електрофоретичного блоку для горизонтального електрофорезу на папері

П р и м і т к и: 1 – папір; 2 – кришка; 3 – електроди; 4 – електродне відділення; 5 – відділення для буферу; 6 – ізолююча пластинка; 7 – гніт-мостик.

Ще один тип приладів для електрофорезу на папері (як і з пластинками) – це прилади для вертикального електрофорезу (рис. 1.24).

У приладах певної конструкції для вертикального електрофорезу смужки або листки паперу розміщують не під кутом, як це показано на рис. 1.24, а суворо вертикально.

При проведенні електрофорезу на папері, його занурюють у розчин буферу, потім промочують між листками фільтрувального паперу і поміщують на підставку, яка підтримує папір у відповідному положенні. Зразок наносять на лінію старту мікропіпеткою, шприцом або за допомогою спеціальних пристроїв.

Після нанесення зразка до камери підключають електричну напругу. Для спостереження за ходом електрофорезу, на папір (на лінію старту) наносять пляму забарвленої стандартної речовини.

На завершенні процесу електрофорезу папір висушують при кімнатній температурі на повітрі (декілька годин) або, що використовується частіше, – при температурі 105–110 °С протягом 20–30 хв у сушильній шафі. Речовини, які розділилися, виявляють у більшості випадків за допомогою, як правило, відповідного методу забарвлення певними реагентами-барвниками (див. табл. 1.5.).

Метод зонального електрофорезу на папері в свій час знайшов дуже широке застосування і фактично започаткував шлях для аналітичних досліджень. Нині його значення знизилось у зв'язку з використанням інших носіїв, які більше підходять для зонального електрофорезу.

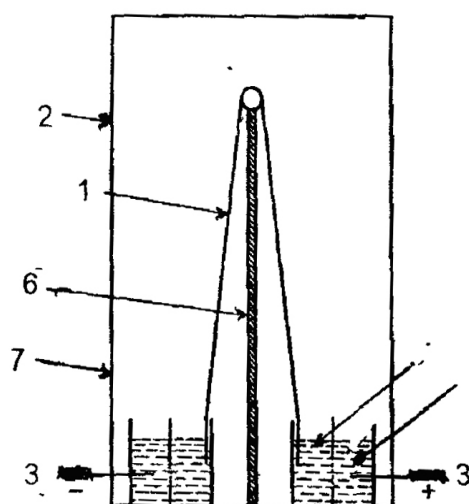


Рис. 1.24. Схема електрофоретичного блоку для вертикального електрофорезу під кутом на папері

П р и м і т к и: 1 – папір; 2 – кришка; 3 – електроди; 4 – електродне відділення; 5 – відділення для буфера; 6 – підпора; 7 – камера.

Неперервний (проточний) електрофорез на папері. В цьому методі, як і при зональному електрофорезі без підтримуючого середовища, електрофорез проводиться при одночасному переміщенні та безперервному додаванні речовини, яка аналізується, в одному напрямі потоком буфера, а в іншому – електричним полем. Як носій звичайно використовують хроматографічний (навіть фільтрувальний) папір. Схема методу наведена на рис. 1.25.

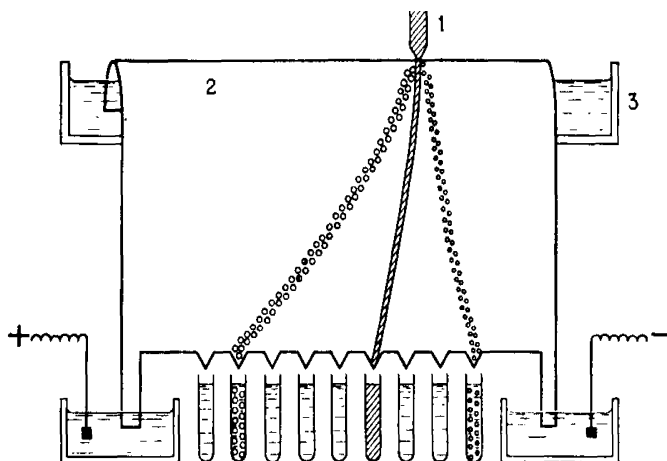


Рис. 1.25. Схема комірки (кювети) для неперервного (проточного) електрофорезу при використанні як носія паперу

П р и м і т к и: 1 – зразок; 2 – папір, який насичений буфером; 3 – комірки з буфером.

Листок паперу, який попередньо змочений буфером, поміщають у камеру (як правило, з плексигласу, але може бути і скляна). Верхній край паперу

занурюють у посудину (резервуар) із буфером. Поки вона повна, буфер безперервно рухається вздовж паперу вниз (вертикально) під дією капілярних сил та сили тяжіння і витікає із зубчиків на нижньому краї в пробірці. Вздовж лінії старту безперервно додаються речовини, які необхідно розділити, за допомогою гноту (можна і шприца). Електричне поле призводить до постійного горизонтального переміщення речовин, ступінь якого залежить від електрофоретичної рухливості. Розділення визначається цілою низкою чинників, зокрема, швидкістю потоку буфера і додавання розчину речовин, які аналізуються, величиною прикладеної електричної напруги, рН та іонним складом буфера, властивостями паперу та ін. Оптимальні умови проведення електрофорезу звичайно підбирають експериментальним шляхом.

Така система неперервного (проточного) електрофорезу використовується, як правило, для розділення білків, а також невеликих за розмірами молекул (низькомолекулярних) і навіть неорганічних іонів.

Зональний електрофорез на плівках ацетату

Електрофорез на плівках ацетату целюлози, який знайшов широке застосування для розділення малих кількостей речовин, а також з препаративною метою, як за принципом, який лежить в його основі, так і за технікою виконання подібний такому на папері. Різниця в тому, що використовується носій (підтримуюче середовище) з іншими властивостями.

Плівки з ацетату целюлози мають однорідну мікроскопічну структуру з середнім діаметром пор у кілька мікрометрів. У них електрофоретичні зони більше звужені, ніж на папері, для якого характерна неоднорідність розгалуженої структури.

Ще одна важлива відмінність плівок із ацетату целюлози від паперу – значно менша адсорбційна здатність, особливо для білків. Справа в тому, що на папері (тобто просто целюлозі) багато біологічних макромолекул адсорбуються за рахунок гідроксильних груп целюлози. Адсорбція перешкоджає руху речовин і тому викликає витягування (утворення «хвостів») плям або смужок, що погіршує розділення. В ацетаті целюлози більшість гідроксильних груп перетворено в ацетатні, які не проявляють адсорбувальних властивостей. Крім того, що в плівках ацетату целюлози розділення речовин, які аналізуються, покращується, воно також прискорюється і це дає можливість використовувати більш низьку електричну напругу. Це, в свою чергу, веде до зменшення виділення тепла (конвекції). Низька адсорбційна здатність ацетату целюлози призводить також до зменшення забарвлення фону (він майже не проявляється). В той час як при взаємодії речовин, які аналізуються, з відповідними реагентами-барвниками (табл. 1.5) ці речовини чітко проявляються на електрофореграмі. Це дозволяє використовувати для досліджень надзвичайно малу кількість зразка. До того ж, ацетат целюлози є середовищем, яке придатне для імунодифузії, і тому плівки з нього можна використовувати для імуноелектрофорезу.

Ще одна перевага ацетату целюлози перед папером – це його прозорість, що дає можливість визначати речовини, які аналізуються, спектрофотометрично (за визначення спектру поглинання світла у видимій або ультрафіолетовій областях). Крім того, він дозволяє легко елюювати речовини.

На рис. 1.26 наведена типова електрофореграма при електрофорезі в прозорій плівці ацетату целюлози білків сироватки крові та характерні зміни в ній при деяких патологічних станах. Завдяки прозорості плівки локалізацію білків визначають при вимірі поглинання світла (спектрофотометрично).

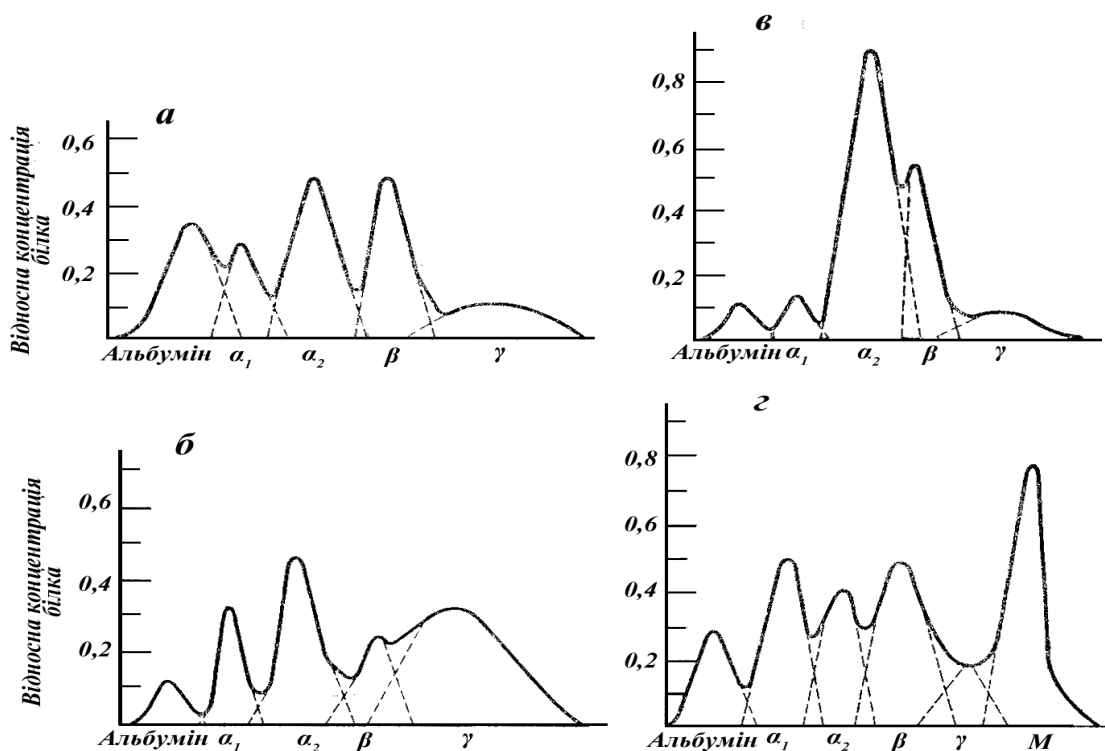


Рис. 1.26. Електрофореграми при електрофорезі білків сироватки крові в ацетаті целюлози нормальної сироватки крові (а), а також сироватки крові при інфекційному гепатиті (б), ліпідному нефрозі (в) і при γ -мієломі (г)

П р и м і т к и: α_1 – α_1 -глобуліни; α_2 – α_2 -глобуліни; β – β -глобуліни; γ – γ -глобуліни.

З діагностичною метою електрофорез в ацетаті целюлози використовується також при аналізі сечі і спинномозкової рідини. Поява білків крові у сечі є показником порушення функціонування нирок. Найхарактерніші зміни відносного вмісту білків у спинномозковій рідині виявляються при розсіяному склерозі, менінгіті та енцефаліті, а часткові – при дегенеративних захворюваннях або при інфільтрації новоутвореннями (злоякісними пухлинами).

Замість плівок ацетату целюлози у деяких випадках доцільно використовувати желатинізований ацетат целюлози, який називається *целогелем*, що дозволяє прискорити процес електрофорезу і поліпшити розділення високомолекулярних сполук.

З діагностичною метою електрофорез в ацетаті целюлози використовується також при аналізі сечі і спинномозкової рідини. Поява білків крові у сечі є показником порушення функціонування нирок. Найхарактерніші зміни відносного вмісту білків у спинномозковій рідині виявляються при розсіяному склерозі, менінгіті та енцефаліті, а часткові – при дегенеративних захворюваннях або при інфільтрації новоутвореннями (злоякісними пухлинами).

Замість плівок ацетату целюлози у деяких випадках доцільно використовувати желатинізований ацетат целюлози, який називається *целогелем*, що дозволяє прискорити процес електрофорезу і поліпшити розділення високомолекулярних сполук.

Прилади для проведення зонального електрофорезу на плівках ацетату целюлози аналогічні приладам для горизонтального електрофорезу на папері.

Методика проведення електрофорезу на плівках ацетату целюлози наступна. Сухі смужки або листи ацетату целюлози обережно кладуть на поверхню розчину буфера таким чином, щоб вони вбирали рідину тільки знизу за рахунок капілярних сил. Не можна зразу занурювати сухі плівки ацетату целюлози в розчин буфера, оскільки в їх порах може залишитися повітря. Не можна також допускати висихання плівок після їх вилучення з розчину буфера. Рекомендується мокрі плівки промокнути листками фільтрувального паперу. Потім смужки або листки ацетату целюлози розміщують у рамці для їх підтримування в горизонтальному положенні під час електрофорезу і на лінію старту наносять мікропіпеткою (шприцом або спеціальним аплікатором) обережно і акуратно зразок (або зразки) таким чином, щоби уникнути дифузії нанесеного розчину.

Оптимальне положення стартової лінії визначають експериментально. Це також робиться і для вибору електричних параметрів, хоча для них є певні рекомендації в залежності від природи і властивостей як самих плівок ацетату целюлози, так і розчину буфера, інших умов проведення електрофорезу.

Після проведення електрофорезу, плівки з ацетату целюлози висушують, як правило, при температурі 80–100 °С у сушильній шафі та забарвлюють відповідним реагентом. У деяких випадках речовини, які розділилися, додатково фіксують на плівці з ацетату целюлози. Так, наприклад, для фіксації білків одна з рекомендацій – це занурення плівки на 1–3 хв у 7–7,5 %-вий розчин трихлороцтової кислоти. Іноді закріплюючий реагент вводять до складу реагента-барвника.

Взагалі при проведенні електрофорезу на ацетаті целюлози, плівки якої виготовлені фірмами-виробниками, необхідно чітко дотримуватися їх рекомендацій. Це стосується також інших носіїв.

Зональний електрофорез у тонких шарах

Електрофорез у тонких шарах подібний тонкошаровій хроматографії (ТШХ), тільки, як і в інших методах електрофорезу, об'єктом дослідження є іони речовин, що аналізуються, розділення яких відбувається внаслідок руху з різною швидкістю в носії під дією електричних сил.

Особливість цього методу – це те, що підложка для носія повинна бути електроізолятором. Такими є, зокрема, скляні та полімерні пластинки.

Як носії, в залежності від конкретної мети і завдань, використовуються різноманітні речовини, зокрема оксиди алюмінію і кремнію, целюлози (зокрема, ДЕАЕ-целюлоза), силікагель, магію силікат та ін. Нині для електрофорезу в тонких шарах використовують, як правило, пластинки з тонкошаровим носієм, які виготовляються низкою фірм.

Електрофорез у тонких шарах носіїв проводять у приладах, які аналогічні таким для горизонтального або вертикального електрофорезу на папері. Висуваються також подібні умови з урахуванням специфіки такого електрофорезу.

Розчинники можуть бути різноманітні, головне, щоби вони сприяли розділенню речовин, які аналізуються.

Положення плям або смуг на електрофореграмі визначають, як правило, за світінням у видимій або ультрафіолетовій ділянках спектру світла; за флуоресценцією барвників, які містяться в речовинах, які аналізуються; за забарвленням при взаємодії з відпо-відними барвниками тощо. При розділенні радіоактивних речовин можна визначити їх локалізацію авторадіографічним методом при використанні рентгенівських плівок або більш чутливих ядерних емульсій. Тонкий шар носія з досліджуваною радіоактивною речовиною також можна обережно зіскребти з пластинки і безпосередньо прорахувати у відповідних лічильниках радіоактивності. В принципі можна зіскребти тонкий шар не тільки з радіоактивною речовиною, а будь-якою, а потім елюювати цю речовину відповідними розчинникам (вимити її) і проаналізувати певними методами (спектроскопічними, електрохімічними тощо). У певних випадках для врахування інших, ніж досліджувана речовина, компонентів шару носія проводять елюювання такої ж ділянки носія, як і при аналізі речовини та проводять аналіз з елюата за таких же умов. У подальших розрахунках враховують внесок носія у показник, який визначається.

Тонкошаровий електрофорез зручний для двомірних розділень, коли після хроматографії проводять електрофорез у перпендикулярному їй напрямі або навпаки.

Зональний електрофорез в агаровому і агарозному гелях

Агар виділяють із клітинних мембран деяких водоростей. Він містить два полісахариди, а саме агарозу і агаропектин, які вже в концентрації 1 % створюють стійкий гель. У свою чергу *агароза* (сефароза) – це полісахарид у полімерному ланцюзі якого чергуються β -D-галактопіраноза і 3,6-ангідро- α -галактопіраноза. Агарозні гелі утворюються при концентрації агарози в буфері більше 0,3 %. Звичайно для електрофорезу використовують 2 %-ві гелі.

Агар і агароза розчиняються у водних розчинах при нагріванні в киплячій водяній бані, причому розчин залишається рідким при зниженні температури приблизно до температури 40 °С, а потім їх в'язкість різко зростає і при

температурі 38 °С вони застигають. Після цього можна знову отримати рідкий стан при нагріванні в киплячій водяній бані.

При висушуванні агаровий і агарозний гелі перетворюються в прозору плівку, яку зручно фотометрувати оптичними методами, а також зберігати без ушкодження.

Типова електрофореграма при електрофорезі в агаровому гелі білків сироватки крові наведена на рис. 1.27.



Рис. 1.27. Електрофореграма при електрофорезі білків сироватки крові людини в агаровому гелі

П р и м і т к а: α – α_1 -глобуліни; α_2 – α_2 -глобуліни; β – β -глобуліни; γ – γ -глобуліни.

Існує декілька типів приладів для проведення аналітичного електрофорезу в агаровому (агарозному) гелі. Один із варіантів наведено на рис. 1.28.

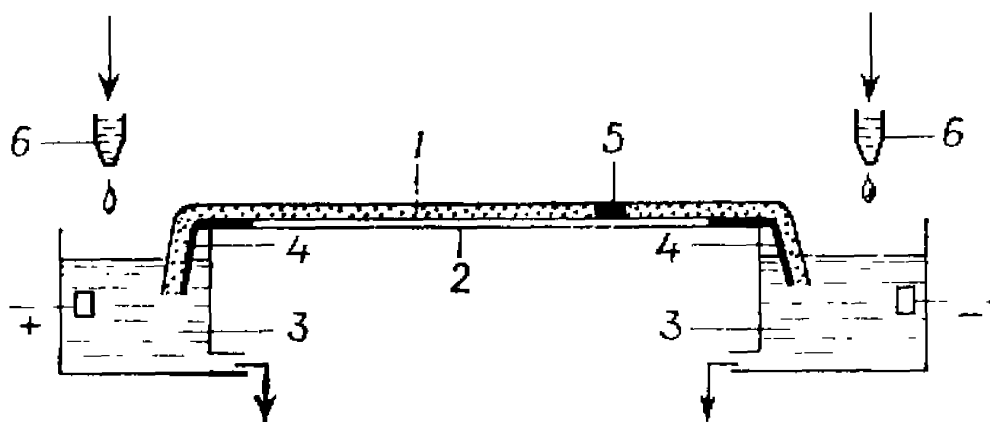


Рис. 1.28. Схема електрофоретичного блоку для електрофорезу в агаровому (агарозному) гелі

П р и м і т к и: 1 – гель; 2 – скляна пластинка для розміщення гелю; 3 – комірки для електродного буфера; 4 – паперові смужки для підтримування агарового (агарозного) мостика; 5 – щілина для вводу зразка; 6 – пристрій для забезпечення циркуляції буфера.

Електрофорез в агаровому (агарозному) гелі з препаративною метою проводять, як правило, в колонках які такі ж, як і для електрофорезу в поліакриламідному гелі. На завершенні електрофорезу колонку розбирають і після візуального визначення зон вирізають ділянки (сегменти) гелю, які містять досліджувані речовини, зокрема, білки.

Препаративне електрофоретичне розділення речовин можна проводити і на пластинках гелю.

Вилучення з гелю розділених речовин можна проводити декількома способами: агаровий (агарозний) гель піддають елююванню буферним розчином, заморожують і розморожують, обробляють ферментом агаразою і центрифугуванням.

Найкращі результати отримують при використанні елюювання. Місце розміщення розділених електрофоретичних зон виявляють за допомогою *репліки* (лат. *replicare* – відбивати, повертати назад) на фільтрувальному папері або плівці з ацетату целюлози. Її отримують наступним чином: обережно притискують до поверхні гелю тонкий фільтрувальний папір або плівку з ацетату целюлози і потім швидко їх забарвлюють.

Вилучення фракцій (електрофоретичних зон) можна проводити наступним чином: по ширині гелю безпосередньо перед конкретною фракцією вирізають канавку, заповнюють її розчином буфера і після цього продовжують електрофорез. Наслідком цього є перехід із гелю розділеної речовини в розчин буфера, який кожні 2–4 хв збирають і замінюють новим.

Розділені речовини в отриманому елюаті визначають відповідними методами, серед яких найпоширеніші – сканування або фотографування в світлі ультрафіолетового діапазону хвиль чи забарвлення певними реагентами – барвниками.

Особливим видом електрофорезу в агаровому (агарозному) гелі (як і в інших типах гель-електрофорезу) є *бар'єрний електрофорез*, схема електрофоретичного блоку якого наведена на рис. 1.29.

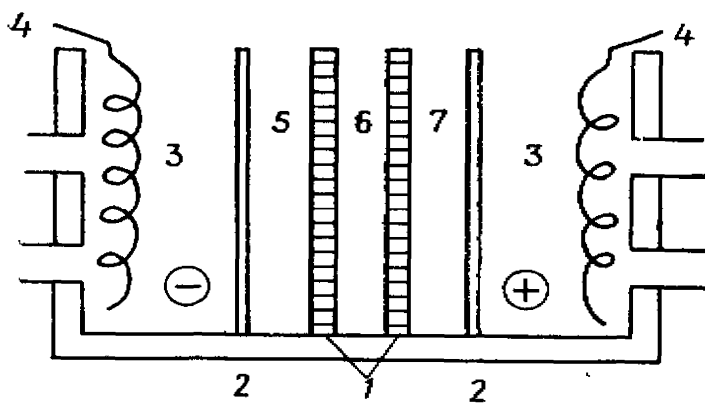


Рис. 1.29. Схема електрофоретичного блоку для бар'єрного електрофорезу

П р и м і т к и: 1 – стовпчик гелю; 2 – мембрана; 3 – комірочки для електродів; 4 – електроди; 5 і 7 – відсіки для збирання речовин, які не досліджуються; 6 – комірочка, в якій концентрується досліджувана речовина.

Досліджуваний зразок заливають у відсік, де передбачена концентрація речовини, яка аналізується (зокрема певного білка), між двома стовпчиками гелю і проводять електрофорез. При введенні в гель додаткових електричних зарядів (заряджених іонів) регулюють електроосмос так, щоб він повністю компенсував міграцію досліджуваної речовини. Тоді вона буде залишатися у

відсіку, куди добавили зразок, що містить цю речовину. В той же час інші компоненти зразка переміщуються крізь гель у відсіки, які розміщені поза гелем.

Зональний електрофорез у крохмальному гелі

Електрофорез в крохмальному гелі історично був першим електрофоретичним методом, в якому для покращення розділення речовин, які аналізуються, було використано середовище, що має властивості молекулярного сита.

Крохмаль – це нерозчинний у воді полісахарид. Він здатний зв'язувати певну кількість води і набрякати, але не може набувати рідкого стану навіть при нагріванні. Шляхом часткового кислотного гідролізу, який відбувається, наприклад, при обробці крохмалю ацетоном, що містить HCl, при температурі 37 °C, протягом 12 год, крохмаль можна перевести у форму, яка при її значенні більше 70 °C набуває властивостей рідкого золю, а при кімнатній температурі (25 °C) – твердого гелю. Для електрофорезу звичайно використовують високоочищений картопляний крохмаль, але можна також і рисовий.

Високопористі крохмальні гелі утворюються при додаванні до розчину буфера менше 2 % (за масою) частково гідролізованого крохмалю, а малопористі – від 8 до 15 %. Як правило, крохмальні гелі наносять на скляні або плексигласові пластинки як для горизонтального чи вертикального електрофорезу на папері. Проте є певні відмінності в конструкції електрофоретичних блоків і техніці внесення зразка, який аналізується. На рис. 1.30 наведена схема звичайного електрофоретичного блоку для проведення *горизонтального електрофорезу в крохмальному гелі*.

Гель становить собою пасту з крохмалю, зерна якого зручновані нагріванням у буфері. При горизонтальному розміщенні гелю, як було показано на рис. 1.28, зразок (у вигляді розчину або суміші з крохмалем) наносять у щілину, яку потім заливають воском або жиром, і тільки після цього прикладають електричну напругу від блоку живлення. Після закінчення електрофорезу напівтвердий гель відділяють і нарізають уздовж на 2–3 шари, кожний з яких забарвлюють відповідним реагентом-барвником для виявлення речовин, які аналізуються. Для забарвлення білків найчастіше використовують амідовий чорний 10В або нігрозин. Розділені речовини проявляються в гелі після забарвлення у вигляді, як правило, серії смужок.

Розрізання гелю проводять у спеціальному лотку за допомогою лез (дорматом) або тонкого сталюого дроту. Цю операцію проводять з тією метою, щоб реагенти-барвники проникали у всі шари гелю. Крім того, це дає можливість одночасно визначати в одному досліді різні речовини при використанні різних реагентів-барвників. Якщо електрофорез проводять у дуже тонкому шарі гелю, то його можна не розрізати.

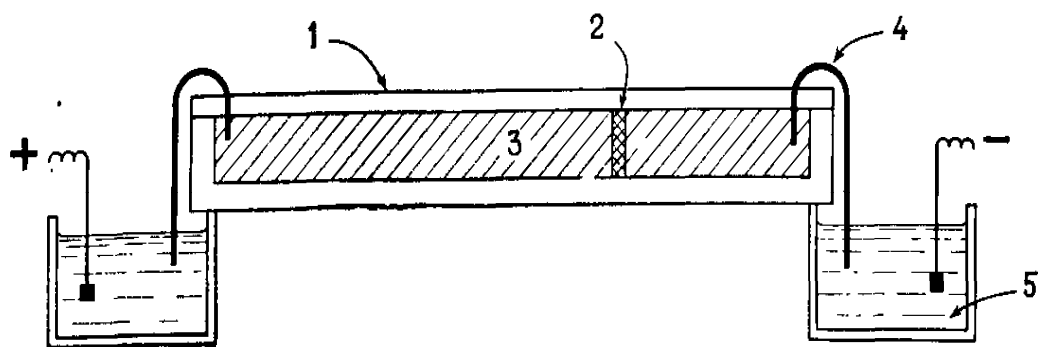


Рис. 1.30. Схема електрофоретичного блоку для горизонтального електрофорезу в крохмальному гелі

П р и м і т к и: 1 – шар воску; 2 – зразок; 3 – крохмальний гель; 4 – гніт-мостик із паперу; 5 – буфер.

Вертикальний електрофорез у крохмальному гелі більш трудомісткий, ніж горизонтальний, але має ряд переваг. У його випадку не можлива *електродекантація* (фр. *decanter* – змивання) розчину речовин, які аналізуються, що застосовується при горизонтальному електрофорезі. Це явище може призвести до викривлення форми електрофоретичних зон. Крім того, при використанні вертикального електрофореу тепловіддача йде з однаковою швидкістю з обох поверхонь гелю. Це дозволяє використовувати вищу напругу, наслідком чого є покращення розділення.

Схема електрофоретичного блоку для вертикального електрофореу в крохмальному гелі наведена на рис. 1.31.

Гель готують у скляному або пластмасовому (плексигласовому) лотку. Кришка лотка того ж матеріалу зроблена таким чином, що в неї можна вставляти пристрій для формування щілин. Коли лоток заповнений нагрітим (до температури 70 °C) зом крохмалю, кришку швидко встановлюють на її місце. Рекомендується її попередньо нагрівати до температури 70 °C, щоби попереджувати утворення пухирців повітря в гелі. Кришку залишають у такому положенні до тих пір, поки гель не застигне. Знімати кришку необхідно обережно, щоби не ушкодити щілини. Зразки через щілини вносять мікропіпеткою або шприцом. Їх закривають, як правило, шляхом нанесення поверх них нагрітого приблизно до температури 45 °C вазеліну. Потім розплавленим вазеліном покривають всю вільну поверхню гелю. З лотка вилучають передню і задню стінки та встановлюють його у вертикальному положенні (рис. 1.31).

При вертикальному розміщенні електрофоретичного блоку компоненти зразка можуть переміщуватися, в залежності від полярності прикладеної електричної напруги, наверх або донизу. Проте переміщення вниз має перевагу, в першу чергу із-за зменшення тривалості електрофореу, оскільки крім електричних і капілярних сил, діє також сила тяжіння.

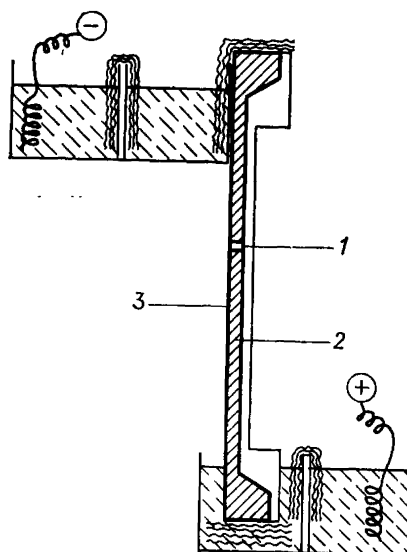


Рис. 1.31. Схема електрофоретичного блоку для вертикального електрофорезу в крохмальному гелі

П р и м і т к и: 1 – положення щілини для внесення зразка; 2 – крохмальний гель; 3 – шар вазеліну.

Зональний електрофорез у поліакриламідному гелі (звичайний та його модифікації)

Електрофорез у поліакриламідному гелі є одним із най розповсюджених серед гель-електрофорезів. Його висока роздільна здатність дозволяє не тільки розділяти компоненти суміші, яка аналізується, але й характеризувати їх за зарядом, молекулярною масою та формою (конформацією).

Поліакриламід має перед іншими гелями ряд переваг, зокрема:

- 1) розмір у цих гелях можна змінювати в широких межах;
- 2) їх можна використовувати з найрізноманітнішими буферами;
- 3) вони характеризуються дуже низькою адсорбційною здатністю і електроосмосом;
- 4) розподіл речовин відбувається швидко і з високим розділенням.

Поліакриламід, як інертне підтримуюче середовище, часто використовують у методах ізоелектричного фокусування та ізотахофореzu.

Поліакриламідні гелі отримують при полімеризації акриламідру ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) з N, N'-метилендіакриламідом $[\text{CH}_3(\text{NHCOOH}=\text{CH}_2)_2]$, який скорочено називається *біс*-акриламідом. Реакцію проводять у присутності каталізаторів. Найчастіше використовують наступні каталізатори: 1) амонію персульфат – N,N,N',N'-тетраметилетилендіамін (ТЕМЕД); 2) амонію персульфат – 3-диметиламінопропіонітрил (ДМАПН); 3) гідрогену пероксид – заліза сульфат – аскорбінову кислоту.

Амонію персульфат нестійкий у водному розчині, тому його можна замінити на калію персульфат.

Поліакриламідні гелі готують зі загальним вмістом акриламіду від 3 % (діаметр пор 0,5 нм) до 30 % (діаметр пор 0,2 нм).

У загальному випадку розрізняють поліакриламідні гелі, які мають певний ступень поперечної зшивки (поперечнозшиті гелі), що складаються з двох мономерів, і гелі, які складаються з одного мономера (лінійні гелі) (рис. 1.32А). Останні сплетені тільки з лінійних полімерних ланцюгів і їх зв'язки ґрунтовані тільки на фізичній взаємодії (фізичні гелі). Поперечнозшиті гелі (рис. 1.32 Б) складаються з поперечнозв'язаних один із одним мономерів і, тим самим, мають більш жорстку структуру (хімічні гелі), оскільки між волокнами існують ковалентні зв'язки. До того ж, ці гелі містять у достатній кількості пори певного розміру, що забезпечує їх високу роздільну здатність.



Рис. 1.32. Схема структури лінійного (А) і поперечнозшитого (Б) поліакриламіду

Процес полімеризації поліакриламідного гелю потребує наявності вільних радикалів мономера, які утворюються при каталізі під дією вільних радикалів кисню, що виділяються персульфатом. Молекулярний кисень (O_2) сповільнює або у певних випадках зовсім попереджує полімеризацію, тому його необхідно видаляти. Наявність домішок у реактивах, а також температура, при якій проводять реакцію, також впливають на швидкість полімеризації.

Один із способів ініціації полімеризації поліакриламідного гелю – це фотополімеризація (природним світлом). Її проводять у присутності ТЕМЕД і рибофлавіну. Останній містить рибозний залишок, який діє як внутрішній відновлюючий агент. Крім того, полімеризацію можна ініціювати γ -опроміненням або ультразвуком.

Для характеристики поліакриламідного гелю вказують, як правило, відсотковий вміст мономерів (T = акриламід + мономер, який утворює поперечні зшивки):

$$T = \frac{a + b}{m} \cdot 100\%,$$

зшиваючого агента від загальної кількості; а також мономерів (С):

$$C = \frac{b}{a + b} \cdot 100\%,$$

де a – кількість акриламідну, г; b – кількість мономера, який утворює поперечні зшивки, г; m – об'єм буфера, см³.

Для розрахунку оптимальної кількості акриламідну запропоновано декілька емпіричних формул, одна з них для гелів 5–20 % T :

$$C = 0,5 - 0,3 T.$$

Встановлено, що чим вища концентрація акриламідну, тим менше середній розмір пор у гелі. За одним із припущень середній розмір пор у гелі ($\bar{P}$) зворотно пропорційний квадратному кореню з об'ємної концентрації (C) полімеру з діаметром d :

$$\bar{P} = \frac{kd}{\sqrt{C}},$$

звідки:

$$C = k^2 d^2 / \bar{P}^2,$$

де k – коефіцієнт (фактор), який залежить від геометрії гелю; $\bar{P}$ і d вимірюються в ангстремах (1 нм = 10 Å).

Це одна формула, за допомогою якої можна зв'язати $\bar{P}$, d і C має вигляд:

$$\bar{P} + d = \frac{\sqrt{3\pi 5d}}{\sqrt{C}}.$$

Електрофоретична рухливість речовини (P) в гелі при даній концентрації мономера (T) зв'язані наступним чином:

$$\lg P = \lg P_0 + K_r T,$$

де P_0 – рухливість цієї речовини у вільному розчині; K_r – коефіцієнт затримки.

При аналізі руху речовин під час електрофорезу в двох поліакриламідних гелях із різними середніми розмірами пор при рівності всіх інших умов (гель 1 і гель 2), встановлено, що величина рухливості речовин дорівнює:

$$P_1 = QX / f_1 \text{ (при концентрації геля } T_1)$$

$$P_2 = QX / f_2 \text{ (при концентрації гелю } T_2 \text{)},$$

де Q – сумарний заряд речовини; X – іонна сила гелю; P_1 і P_2 – електрофоретична рухливість речовини, а f_1 і f_2 – коефіцієнти тертя при концентраціях гелю T_1 і T_2 , відповідно. З наведених вище рівнянь:

$$\frac{P_1}{P_2} = \frac{f_2}{f_1}$$

Константа дифузії (D) і коефіцієнт тертя (f) зв'язані між собою співвідношенням:

$$D = kT / f ,$$

де k – константа Больцмана; T – абсолютна температура.

Таким чином, константу дифузії D можна визначити при проведенні з використанням поліакриламідних гелів різних концентрацій, але зі збереженням усіх останніх умов дослідження однаковими. При відомій константі дифузії однієї речовини, другу можна знайти з відношення їх рухливостей:

$$\frac{D_1}{D_2} = \frac{P_2}{P_1} = \frac{f_1}{f_2} .$$

Розміри пор у гелі підпорядковуються розподілу Муавра-Гауса-Лапласа, яке називають ще нормальним розподілом із стандартним відхиленням σ , величина якого не залежить від концентрації гелю. Для конкретної речовини існує лімітуючий розмір пор P_{lim} , через які вона вже не може проникнути. Тоді рухливість речовини повинна бути пропорційна числу пор із розмірами, які більші, ніж P_{lim} , і може бути розрахована з рівняння:

$$\frac{P}{P_0} = J \frac{P_{lim.} - \bar{P}}{\sigma} ,$$

де J – стандартний інтеграл вірогідності, який дорівнює:

$$J(x) = \int_x^{\infty} \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-1/2 p^2} dp .$$

Завжди існує така концентрація гелю, при якій $\bar{P} = P_{lim}$. У цьому випадку рухливість речовини буде дорівнювати половині її рухливості у вільному розчині:

$$P = 0,5P_0.$$

Якщо відоме значення $P_{lim.}$, то можна зробити висновок відносно розмірів, форми, і, з певним припущенням, молекулярної маси речовини, яка аналізується.

Зональний електрофорез у поліакриламідному гелі проводять у колонках із гелем (рис. 1.33) або на пластинках (рис. 1.34), які такі ж, як і для інших типів гель-електрофорезу.

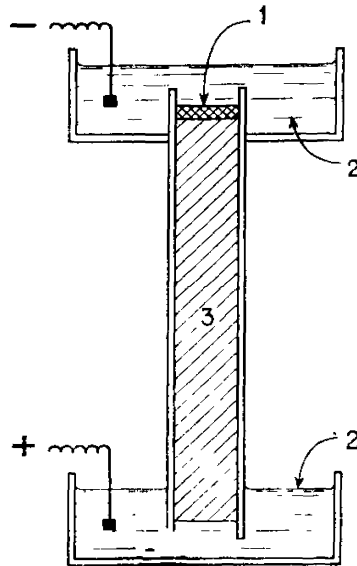


Рис. 1.33. Електрофоретичний блок для електрофорезу в поліакриламідному гелі в колонці

П р и м і т к и: 1 – зразок; 2 – буфер; 3 – гель.

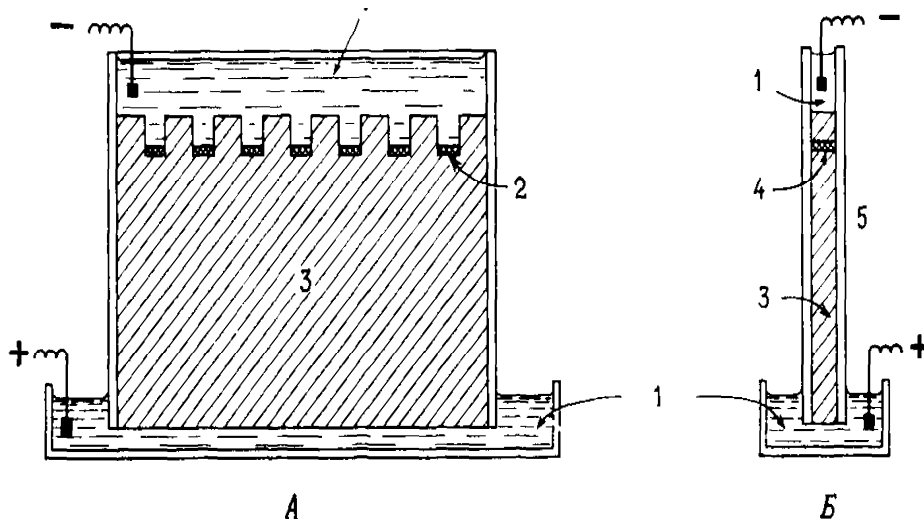


Рис. 1.34. Електрофоретичний блок для електрофорезу на пластинках в поліакриламідному гелі, який дозволяє проводити аналіз, зокрема, 7 зразків

П р и м і т к и: А – вигляд спереду; Б – вигляд збоку; 1 – буфер; 2 – зразки; 3 – гель; 4 – один зразок; 5 – пластмасова (плексигласова) рамка.

Гель полімеризується безпосередньо у колонці, яку потім з'єднують із посудинами (камерами) з буфером. Зразок у концентрованому розчині сахарози наносять на поверхню гелю у вигляді тонкого шару за допомогою мікропіпетки або шприца.

Після закінчення електрофорезу, гель вилучають із колонки. Потім його забарвлюють для визначення електрофоретичних зон або, при використанні радіоактивних речовин, вимірюють радіоактивність методом авторадіографії чи в розрізаних поверхневих ділянках за допомогою відповідного лічильника.

Гель полімеризується безпосередньо в електрофоретичному блоці. Звичайно при полімеризації гелю у верхньому його краї формуються заглиблення для нанесення зразків. Після електрофорезу пластинку забарвлюють реагентом-барвником або при додаванні барвника у верхній буфер.

За використання електрофорезу в поліакриламідному гелі все більше використовуються пластинки гелю, які дозволяють одночасно на одній пластинці аналізувати велику кількість зразків.

На рис. 1.35 для порівняння роздільної здатності різних видів зонального електрофорезу в підтримуючому середовищі з дрібно-пориною структурою наведено результати електрофорезу одного і того ж зразка сироватки крові людини: на папері – 100 мм^3 зразка, в крохмальному гелі – 80 мм^3 , у поліакриламідному гелі – 5 мм^3 .

При вертикальному електрофорезі в поліакриламідному гелі зразки розділяють на компоненти тільки при препаративному електрофорезі. З аналітичною метою використовують, як правило, циліндричні стовпчики гелю, які розміщують у каліброваних (точного діаметру) скляних (іноді плексигласових) трубках. Вони (12–18 штук) мають, звичайно, діаметр 5 мм, довжину – 10 см. В деяких випадках трубки мають інші розміри (діаметр 2,0–14,6 мм, довжину 7,5–30 см).

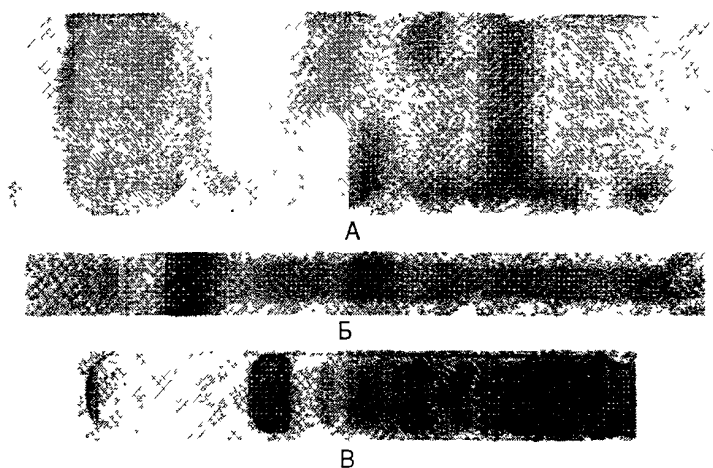


Рис. 1.35. Порівняння роздільної здатності зонального електрофорезу на папері (А), в крохмальному (Б) і поліакриламідному (В) гелі

Загальний вигляд електрофоретичного блоку для гель-електрофорезу у вертикально розміщених трубках наведений на рис. 1.36.

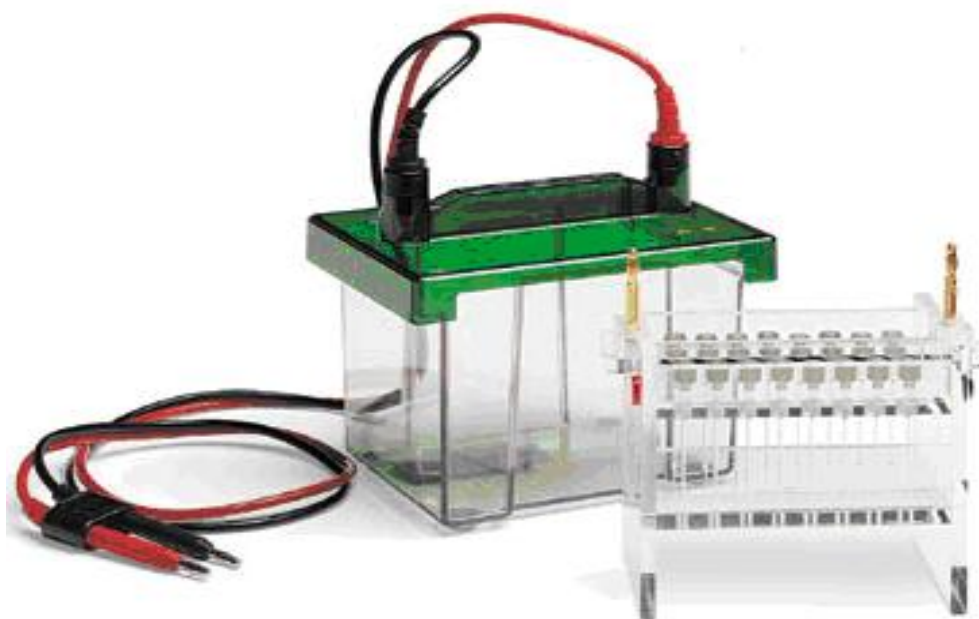


Рис. 1.36. Електрофоретичний блок для вертикального електрофорезу в трубках із поліакриламідним гелем

Розчин зі зразком вносять мікропіпеткою або шприцом у вигляді малої плями або вузької смуги. При електрофорезі в поліакриламідному гелі, як вже відмічалось, компоненти зразка, який аналізується, розділяються одночасно за електричним зарядом і розміром. Навіть у випадку, коли досліджувана речовина виявляє в поліакриламідному гелі одну електрофоретичну зону, то це не виключає можливість того, що у цій зоні міститься більше одного компонента.

Так, наприклад, велика за розмірами молекула зі значним електричним зарядом буде рухатися з такою ж швидкістю, як слабо заряджена молекула малого розміру. Тому для перевірки чистоти зразка, який розділяється при електрофорезі в поліакриламідному гелі, його необхідно аналізувати при декількох концентраціях гелю і в різних умовах дослідження (зокрема, різних значеннях рН).

Для спеціальних цілей розроблено ряд варіантів електрофорезу в поліакриламідному гелі. Один із них – це Na-ДДС-гель-електрофорез, який використовується для визначення молекулярної маси білків за допомогою виміру їх електрофоретичної рухливості.

Натрію додецилсульфат (Na-ДДС) – це детергент, поверхневоактивна речовина, що зменшує поверхневий натяг рідин, а також викликає солюбілізацію, зокрема білків. Він у концентрації більше $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л зв'язує виниклі ланцюжки поліпептидів незалежно від їх розмірів. Вони ведуть себе як «жорсткі палички» постійного діаметру, довжина яких прямо пропорційна молекулярній масі поліпептидного ланцюга. Встановлено, що після обробки

Na-ДДС (або іншим детергентом, наприклад, гуанідинхлоридом) електрофоретична рухливість добре корелює з молекулярною масою поліпептидного ланцюга.

При нейтральному рН (рН 7,0) в 1 %-вому Na-ДДС і 0,1 М меркаптоетанолі більшість багатоланцюгових білків зв'язує перший і дисоціює. Дисульфідні зв'язки (-S-S- зв'язки) розриваються меркаптоетанолом, а вторинна і тим більше третинна структура зникає. Наслідок цього – комплекси, які складаються з субодиниць білка і Na-ДДС, набувають однієї форми і однакового відношення електричний заряд/маса. Це пов'язано з тим, що кількість Na-ДДС, яка зв'язана на одиницю маси білка, завжди постійна і дорівнює 1,4 г Na-ДДС на 1 г білка. Таким чином, заряд, в основному, визначається ДДС-Na, ніж амінокислотними залишками білка. Досягається залежність електрофоретичної рухливості тільки від молекулярної маси. Графік залежності електрофоретичної рухливості (відстані, яку пройшли білки) від логарифма молекулярної маси – це пряма лінія (рис. 1.37).

При дослідженні невідомого білка, який попередньо оброблений детергентом, необхідно внести зразок, який містить цей білок, а також декілька стандартних білків із відомими молекулярними масами в поліакриламідний гель і провести електрофорез. Після цього шляхом екстраполяції знайти молекулярну масу білка, який досліджується. Цей метод широко використовується для оцінки молекулярної маси білків із точністю, як встановлено експериментально, 5–10 %. Найбільша точність досягається, коли білок, який досліджується, знаходиться між відомими білками.

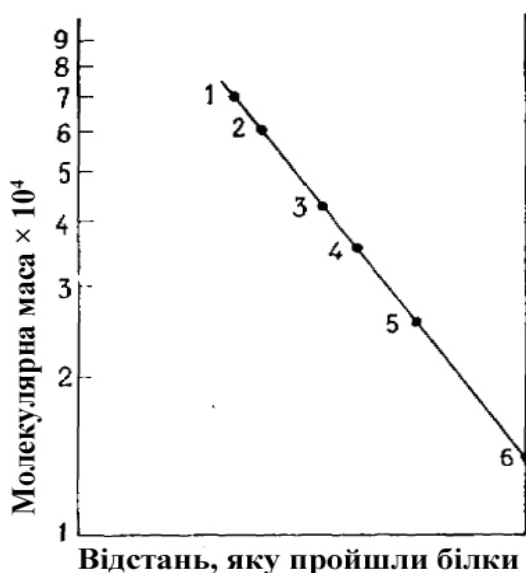


Рис. 1.37. Типова напівлогарифмічна залежність молекулярної маси білків від значення спектрофотометричної рухливості для визначення молекулярної маси білків методом електрофорезу в Na-ДДС-поліакриламідному гелі

П р и м і т к и: 1 – альбумін сироватки бугая; 2 – каталаза; 3 – альбумін курячого яйця; 4 – карбоксипептидаза А; 5 – хімотрипсин; 6 – лізоцим.

Слід відмітити, що в початкових роботах із визначення молекулярної маси білків методом електрофорезу в поліакриламідному гелі, для порушення вторинної і третинної їх структури (денатурації), використовували розчини сечовини з концентрацією від 7,0 до 12 М. Нині таку обробку проводять, як правило, Na-ДДС.

Існує цілий ряд модифікацій звичайного електрофорезу в поліакриламідному гелі з метою покращення роздільної здатності. Серед них поширені електрофорез у градієнті концентрації гелю, диск-електрофорез та в поліакриламідно-агарозному гелі.

Електрофорез у градієнті концентрації поліакриламідного гелю. Перевага цього методу полягає в тому, що такий електрофорез призводить до концентрування компонентів зразка, зокрема білків, оскільки в замикаючій частині кожної окремої зони електрофоретична рухливість вище, ніж в ділянці її переднього фронту.

Завдяки цьому в процесі розділення компонентів зразка смужки звужуються і в кінці електрофорезу стають дуже тонкими (рис. 1.38).

Цей ефект самоконцентрування особливо важливий при дослідженні розведених зразків.

У градієнті концентрації гелю швидкість переміщення макромолекул визначається їх електричним зарядом в області низької концентрації гелю, а також їх розмірами (молекулярною масою) в області високих концентрацій гелю, оскільки ефект молекулярного сита суттєво збільшується у ході макромолекул у більш концентрованому гелі.

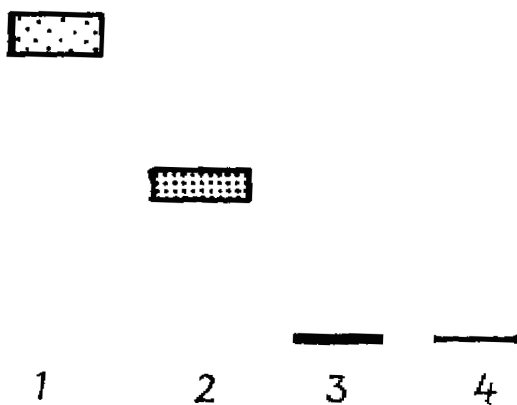


Рис. 1.38. Самоконцентрування компонентів зразка при електрофорезі в градієнті концентрації поліакриламідного гелю

П р и м і т к и: 1 – початкова зона; 2 – звуження зони в процесі електрофорезу; 3 – зона стає дуже вузькою в кінці розділення; 4 – швидкість руху зони наблизилася до нуля.

Форму градієнта концентрації поліакриламідного гелю (лінійну або опуклу), його довжину, крутизну, діапазон концентрацій змінюють у широких

межах, що дозволяє підібрати відповідну систему градієнта гелю для розділення будь-якої суміші речовин, яка аналізується.

Градієнт концентрації гелю отримують шляхом змішування розведеного і концентрованого розчинів гелю в спеціальному градієнтному змішувачі. Трубки для гелю заповнюють розчином зонду.

Нині існують у продажі вже готові градієнтні поліакриламідні гелі, які призначені, в основному, для розділення білків сироватки крові.

На рис. 1.39 наведені результати розділення білків сироватки крові в поліакриламідному гелі з лінійним градієнтом в межах 4–30 % (порівняйте з рис. 1.35).

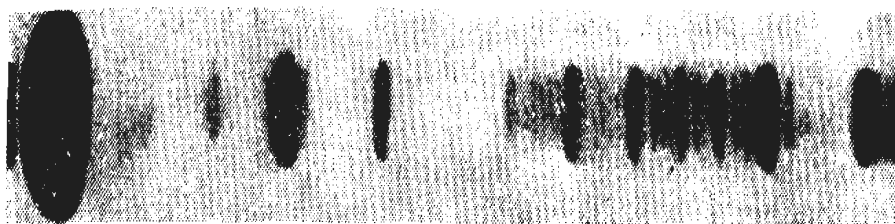


Рис. 1.39. Розділення білків сироватки крові в поліакриламідному гелі з лінійним градієнтом концентрації в межах 4–30 %

Диск-електрофорез у поліакриламідному гелі. Для досягнення максимального розділення в поліакриламідному гелі використовують, так званий, *диск-електрофорез*. Його застосовують, в основному, для визначення чистоти білків, які вже попередньо очищували іншими методами електрофорезу, а також для аналізу сумішей, коли необхідно отримати дуже високе розділення (у випадку присутності в суміші великої кількості компонентів). Як вже відмічалось, саме електрофоретичний аналіз при декількох концентраціях гелю і різних значеннях рН дає можливість отримати високе розділення речовин, які досліджуються.

Це реалізується в методі диск-електрофорезу, для якого характерні стрибкоподібні зміни концентрації гелю, значення рН і напруги. Назва цього методу походить від двох англійських слів – *discontinuity*, яке у даному випадку означає однорідність електрофоретичного середовища, і *discoid* – дископодібний. Термін «диск» відноситься до того, що в електрофоретичній системі неоднорідні значення рН буферів, середовища (гелів) і електричної напруги. Диск-електрофорез тому ще і називають «перервним».

Схема електрофоретичного блоку для диск-електрофорезу наведена на рис. 1.40.

У принципі всі типи приладів для диск-електрофорезу побудовані за однією схемою, хоча і мають певні конструктивні відмінності, основна з яких – це кількість трубок з гелем.

Одна з поширених конструкцій приладу для диск-електрофорезу в гелі наведена на рис. 1.41.

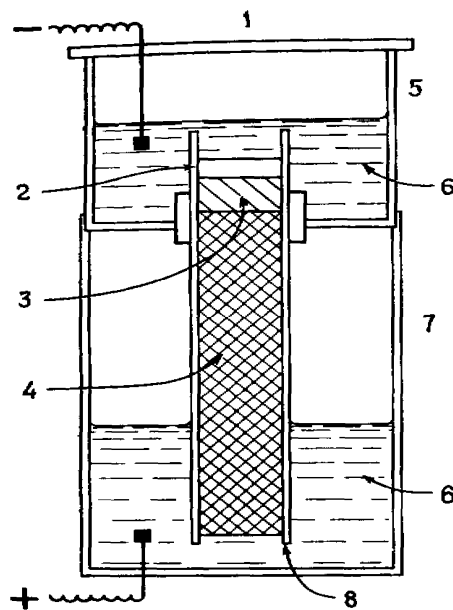


Рис. 1.40. Схема електрофоретичного блоку для диск-електрофореzu

П р и м і т к и: 1 – кришка; 2 – гель для внесення зразка (стартовий); 3 – концентруючий гель (прокладка з гелю); 4 – розділя-ючий (робочий) гель; 5 – верхня комірка для буфера; 6 – буфер; 7 – нижня комірка для буфера; 8 – скляна трубка.

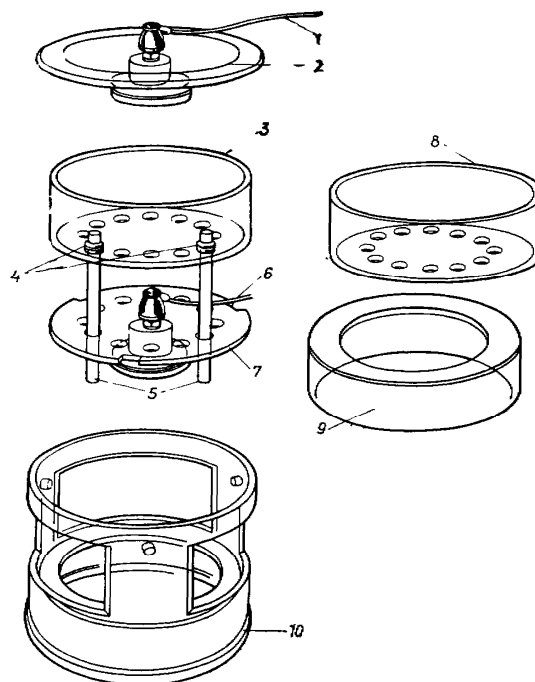


Рис. 1.41. Схема приладу для диск-електрофореzu в поліакриламідному гелі

П р и м і т к и: 1 – електричний дріт (до катоду); 2 – кришка з електродом (платиновим) у зборі; 3 – верхня комірка з буфером, куди вставляється електрод; 4 – гумове кільце (вкладиш) для трубок з гелем; 5 – калібровані трубки для гелю; 6 – електричний дріт (до аноду); 7 – блок з нижнім електродом (платиновим); 8 – верхня комірка комплекту для концентрування зразка; 9 – вкладиш для концентрування проби; 10 – нижня комірка з буфером.

Цей прилад складається з двох комірок, заповнених буфером, в які встановлені електроди, а саме верхньої і нижньої, що з'єднані між собою рядом вертикальних циліндричних скляних трубок. Ці трубки містять гель. Зразки наносять на поверхню стовпчиків гелю при заповненій буфером нижній комірці. Потім буфером заповнюють верхню комірку, ставлять на місце кришку і включають електричну напругу.

Буфери підбирають таким чином (див. нижче), щоби речовини зразка, які розділяються, були електронегативними. В ході їх руху через гель вниз (до аноду) відбувається розділення речовин, яке обумовлене різницею відношення заряд/маса.

Зразок у цьому приладі попередньо концентрується ізоелектричним фокусуванням.

Як показано на рис. 1.41, гель складається з трьох областей (зверху вниз): *стартової*, в яку вводиться зразок і, як правило, барвник, що використовується як свідок; *концентруючої*, яка відділяє стартову область від третьої – *розділяючої*, в якій відбувається саме розділення компонентів зразка.

Стартовий і концентруючий гелі мають однаковий склад і відносно великі пори, які зменшують дифузію, але не знижують швидкість руху речовин, які аналізуються, під дією електричного поля. Розділяючий гель має більш менші за розміром пори, що сповільнює рух речовин відповідно їх молекулярній масі і покращує розділення цих речовин, яке обумовлене їх різною електрофоретичною рухливістю.

Буфер, що заповнює комірки, в які введені електроди, містить іон, електрофоретична рухливість якого при тих значеннях рН, які мають стартовий і концентруючий гелі, повинна мати найменше значення, а в розділяючому гелі – вище, ніж електрофоретична рухливість будь-якого компонента зразка. При виконанні таких умов компоненти зразка, який аналізується, потрапляють в неоднорідне середовище, що і сприяє їх розділенню у відповідності з їх зарядом і розмірами (молекулярною масою).

Роль концентруючого гелю полягає в концентрації зразка під час проходження через гель, наслідком чого повинно бути те, що зразок підходить до розділяючого гелю у вигляді дуже вузької смуги. Крім того, одна з функцій концентруючого гелю – це запобігання розмиванню межі розділу рН при формуванні стартового гелю безпосередньо перед початком електрофорезу. Розділяючий гель діє за принципом молекулярного сита. Буфер у верхній комірці має менше значення рН, ніж буфер, який насичує гель. Завдяки цій різниці зразок у ході проходження через концентруючий гель саме і концентрується.

За ефектом концентрування зразка зручно спостерігати при використанні відповідного барвника, який, як вже відмічалось, вносять у зразок. Якщо він у складі зразка сконцентрувався у вузьку смужку, але вона залишається такою ж вузькою на протязі всього розділення. Спотворення значень рН можна виявити при їх виміру в частинах гелю після його розрізання. Використовуються також хімічні методи аналізу. Наприклад, за допомогою 0,1 М барію хлориду виявляють сульфат, а лантану ацетатом (1 %-вий розчин в 7 %-вій оцтовій

кислоті) – фосфат. Флуорескаміном можна виявити первинні аміни. Використовується також метод виміру іонізуючим випромінюванням у випадку застосування радіоактивних речовин. При диск-електрофорезі білків, їх положення визначають, як правило, забарвленням відповідним реагентом-барвником (див. табл. 1.5).

Розроблено цілий ряд неоднорідних за наведеним вище принципом систем для диск-електрофорезу. Серед них є як аніонні, так і катіонні, в яких на початковій стадії електрофорезу у верхньому буфері містяться аніони (найрозповсюдженим є Cl^-).

Наочно принцип, який лежить в основі диск-електрофорезу, проілюстровано на рис. 1.42 для розділення білків.

Основа буферних систем при диск-електрофорезі білків – гідроксиметил, який має скорочену назву Трис. Ця сполука здатна утворювати буферну систему з хлористоводневою кислотою (HCl) – Трис- HCl (концентруючий гель), а також із амінооцтовою кислотою ($\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOH}$), яка має широковживану назву гліцин (верхній і нижній буфери).

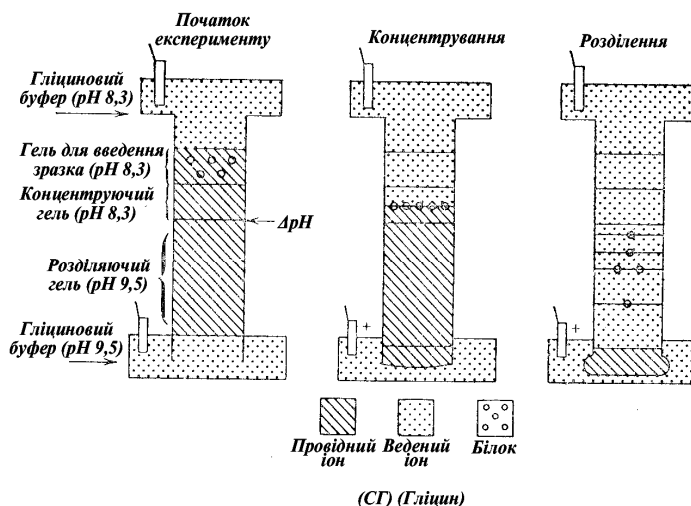


Рис. 1.42. Схема проведення диск-електрофорезу білків при використанні гліцинового буфера і як ведучого іона Cl^- (пояснення див. текст).

При $\text{pH } 8,3$ (стартовий і концентруючий гелі) гліцин складається на 95 % з електронейтральної форми $\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ і тільки 5 % припадає на частку гліцинового аніону $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$. Отже, електрофоретична рухливість гліцину при $\text{pH } 8,3$ дуже мала, навіть менша, ніж у білка, який розділяється.

$$R_{\text{Cl}^-} > R_{\text{білка}} > R_{\text{гліцин}} (\text{pH } 8,3).$$

При $\text{pH } 9,5$ (розділюючий гель) гліцин складається приблизно в рівних кількостях з $\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ (електронейтральна сполука) і $\text{H}_2\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$ (електронегативна сполука). Таким чином, середній електричний заряд молекули гліцину при $\text{pH } 9,5$ негативний і вона володіє, відповідно, відносно великою електрофоретичною рухливістю:

$$P_{Cl^-} \approx P_{\text{гліцин}} (\text{pH } 9,5) \gg P_{\text{білка}}.$$

Білок, який аналізується, після його попереднього концентрування методом ізотахофореzu або за ступінчатого градієнту напруги, вноситься в стартовий гель при рН цього гелю. Зазначений білок має невеликий сумарний електронегативний заряд (аніон) і буде рухатися в електричному полі з меншою швидкістю, ніж Cl^- , але більшою у порівнянні з гліцином. Гліцин, таким чином, у цьому випадку є «замикаючим» іоном. Іони хлору, які знаходяться у верхньому буфері, навпаки, в стартовому гелі рухаються швидко («ведучі» іони).

Оскільки іони хлору і гліцинові становлять собою частину однієї і тієї електричної системи, то в області локалізації менш рухомих гліцинових іонів електрична напруга збільшується, а в області більш рухомих іонів хлору – зменшується.

Білкові аніони, які займають проміжне положення між «ведучими» і «замикаючими» іонами за електрофоретичною рухливістю, будуть розміщуватися між першими і другими іонами. Наслідком цього є концентрування білкових аніонів позаду «ведучих» іонів і утворення дуже вузької білкової смужки, яка підходить до розділяючого гелю слідом за іонами хлору.

Коли «замикаючі» гліцинові іони доходять до розділяючого гелю, їх число і рухомість збільшується. Настає момент, коли електрофоретична рухливість гліцинових іонів стає більшою, ніж у білкових аніонів. Гліцинові іони «підтягуються», при цьому утворюється більш різка межа між ними та іонами хлору. Як тільки останній іон хлору покидає розділяючий гель, рН підвищується, тому що іони хлору замінюються більш лужними гліциновими і, таким чином, замість вихідної системи трис- HCl утворюється трис-гліциновий буфер. Наслідком підвищення рН є збільшення негативного заряду білкових аніонів, рух яких в електричному полі відбувається у відповідності з відношенням заряд/маса.

На рис. 1.43А (зверху, праворуч) наведені результати звичайного електрофореzu в поліакриламідному гелі сироватки крові людини. Після розрізання гелю на шматочки (відповідають заштрихованим зонам), проведений диск-електрофореz білків з кожного таких шматочків.

При диск-електрофорезі кожна група білків розділилася на компоненти, як показано на рис. 1.43Б. Група γ -глобулінів не розділяється за цим методом. Для цього найкраще підходить імуно-електрофореz.

Особливістю методу диск-електрофореzu є необхідність концентрувати досліджуваний зразок. Традиційним є використання методу ізотахофореzu. В той же час, існує інший широкоживаний метод концентрування зразка для дослідження методом диск-електрофореzu в поліакриламідному гелі, який базується на *ступінчатому градієнті електричної напруги*.

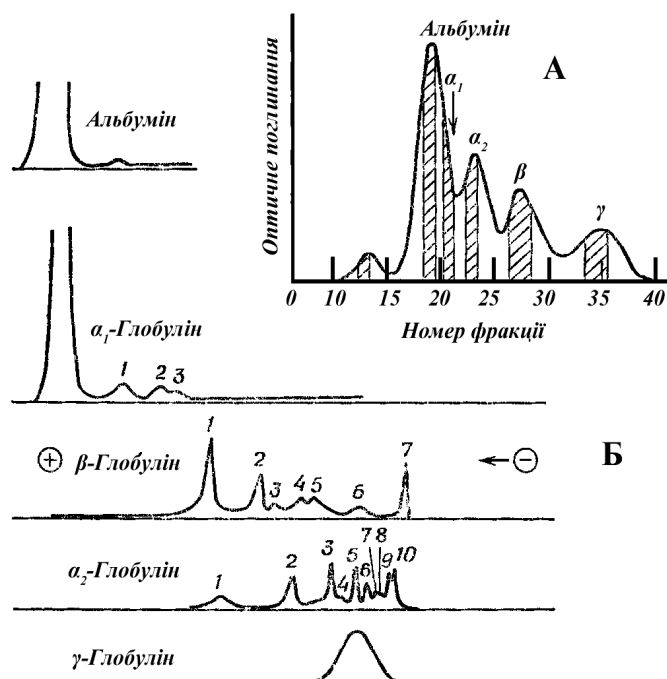


Рис. 1.43. Розділення та ідентифікація за допомогою диск-електрофорезу фракцій білків сироватки крові людини, які отримані звичайним електрофорезом у поліакриламідному гелі (пояснення див. текст)

В одному з варіантів цього методу зразок діалізують, тобто звільнюють від розчинених солей і низькомолекулярних речовин за допомогою напівпроникних мембран (зокрема, колодію, пергаменту та ін.) проти розведеного буфера. Потім зразок нашаровують поверх розділяючого гелю, який містить той же буфер, але у вищій концентрації. При дії електричного поля в зоні нанесення зразка зростає градієнт електричної напруги порівняно з іншими ділянками гелю. В результаті цього компоненти зразка, зокрема білки, починають рухатися з відносно великою швидкістю. Біля поверхні розділяючого гелю рух компонентів зразка сповільнюється.

Це виникає внаслідок зниження у розділяючому гелі градієнта електричної напруги, а також через те, що в ньому починає проявлятися ефект молекулярного сита.

У цьому методичному підході при низькій іонній силі окремі білки можуть утворювати агрегати, що є його недоліком.

Для концентрування зразка перед його розділенням використовують також наступний підхід: рН всюди однаковий і лише в гелі, який містить зразок, знижена концентрація іонів буфера. Замикаючий іон, який спочатку знаходиться у верхньому буфері, має більш високу електрофоретичну рухливість, ніж будь-який з компонентів зразка. Спочатку ці компоненти концентруються під дією високого градієнта електричної напруги і входять в розділяючий гель. Після того, як «замикаючий» іон перегонить компоненти зразка (зокрема, білки), виникає вторинний ефект концентрування, який обумовлений стрибком електричної провідності (рис. 1.44).

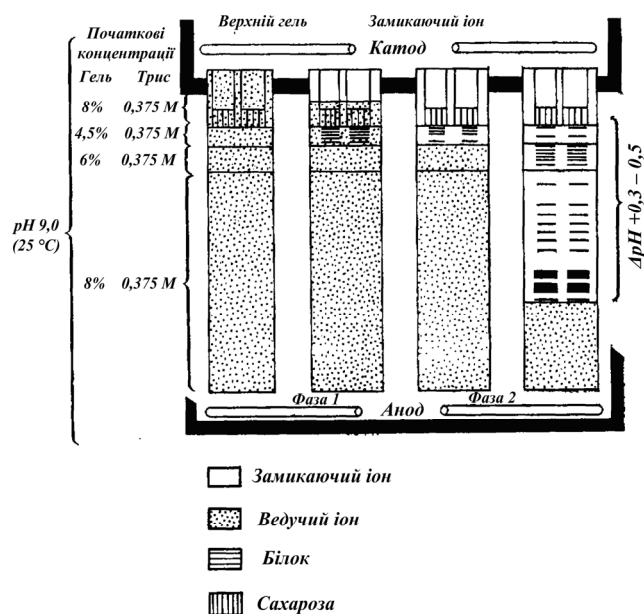


Рис. 1.44. Схема електрофорезу в поліакриламідному гелі з ступінчастим градієнтом електричної напруги

Слід відмітити, що розроблені прилади для диск-електрофорезу, в яких немає потреби у попередньому концентруванні компонентів зразка. В таких приладах відсутні стартовий і концентруючий гелі, а зразок, який звичайно міститься в розчині сахарози більш високої густини, ніж буфер, нашаровують безпосередньо на поверхню розділяючого гелю.

Електрофорез у полакриламідно-агарозному складовому гелі. Цей гель використовується, в основному, як підтримуюче середовище для розділення полімерів з дуже високою молекулярною масою, зокрема нуклеїнових кислот. Розділення в цих гелях також залежить від електричного заряду і молекулярної маси макромолекул. При цьому агароза лише покращує механічні властивості розбавленого поліакриламідного гелю і суттєво не впливає на властивий йому ефект молекулярного сита.

Очищену агарозу розчиняють у воді при нагріванні. Отримують розчин, в якому концентрація агарози повинна бути в два рази більшою за кінцеву в гелі. Розчин акриламідного гелю нагрівають до тієї ж температури і змішують у рівних об'ємах із розчином агарози. Отриману гарячу суміш за допомогою попередньо нагрітого шприца вносять у скляні трубки, зверху нашаровують воду і залишають для полімеризації на 40–60 хв. Щоби гель не вислизнув із трубочки, її дно закривають мембраною (поліетиленовою, колодісною або іншою плівкою).

Рекомендується використовувати наступні концентрації компонентів поліакриламідно-агарозного геля: акриламід – 1,5–9 %; біс-акриламід – 0,08–0,24 %; агароза – 0,5 %; ТЕМЕД – 0,6 %; амонію персульфат – 0,01–0,06 %.

Ізоелектричне фокусування

Ізоелектричне фокусування (ІЕФ, або ізоелектричне фракціонування, ізоелектричне розділення, ізоелектрична конденсація, стаціонарний електрофорез) – це метод електрофорезу, в якому компоненти суміші, що аналізуються, розділяються під дією електричного поля, подібно тому, як при електрофорезі з рухомою межею, а також додатково ще в градієнті рН. Таким чином, у методі ІЕФ між електродами (анодом і катодом) створюється градієнт рН.

Загальні уявлення про метод ізоелектричного фокусування

Заряджені частинки, які спочатку розподілені в середовищі або нанесені у вигляді однієї смужки, в електричному полі рухаються у відповідності з їх електричним зарядом. При переміщенні в градієнті рН електрично амфотерних молекул їхній електричний заряд буде змінюватися до тих пір, поки вони не досягнуть положення, де він стане рівним нулю (молекула стає електро-нейтральною). Це відбудеться в тому місці градієнта рН, в якому рН буде рівним *ізоелектричній точці* (грецьк. *isos* – рівний, однаковий та *elektron* – смола, бурштин, той, що має відношення до електрики). За значенням ізоелектричної точки (pI), а саме значенням рН, за якого молекула перебуває в електронейтральному стані і не мігрує в електричному полі, і відбувається концентрування компонентів зразка, зокрема білків (рис. 1.45).

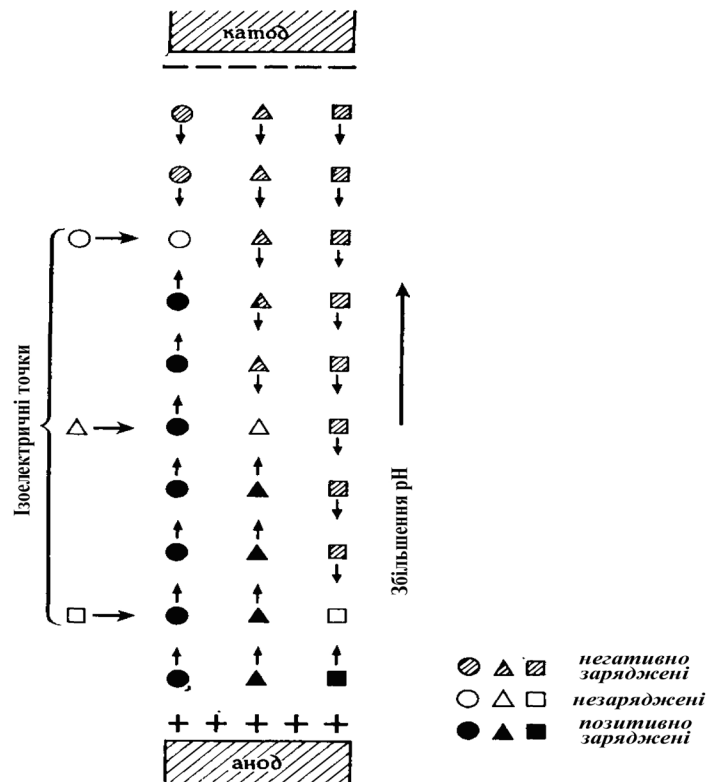


Рис. 1.45. Схема процесу міграції речовин при ізоелектричному фокусуванні

Таким чином, молекули, які мають однакову ізоелектричну точку, сконцентруються у вузькій зоні. Ця зона, якщо градієнт рН стабільний, буде зберігатися доти, поки діє електричне поле, оскільки дифузії молекул буде перешкоджати це електричне поле.

Метод ІЕФ використовується, в основному, для аналізу білків, оскільки вони є яскраво вираженими амфотерними речовинами. Вони, як і всі амфотери, при низьких рН мають позитивний, а при високих рН – негативний електричний заряд. Цим методом проводиться не тільки розділення білків, але і визначення їх ізоелектричних точок. Для цього необхідно виміряти значення рН в тій точці градієнта, де знаходиться білок, що аналізується, після завершення ІЕФ.

Приклад електрофореграми при ІЕФ наведено на рис. 1.46.

Після хроматографічного очищення ферменту «УФ-ендо» до гомогенного стану при перевірці методом ІЕФ виявлено, що він складається з двох білків, кожний з яких володіє ферментативною активністю.

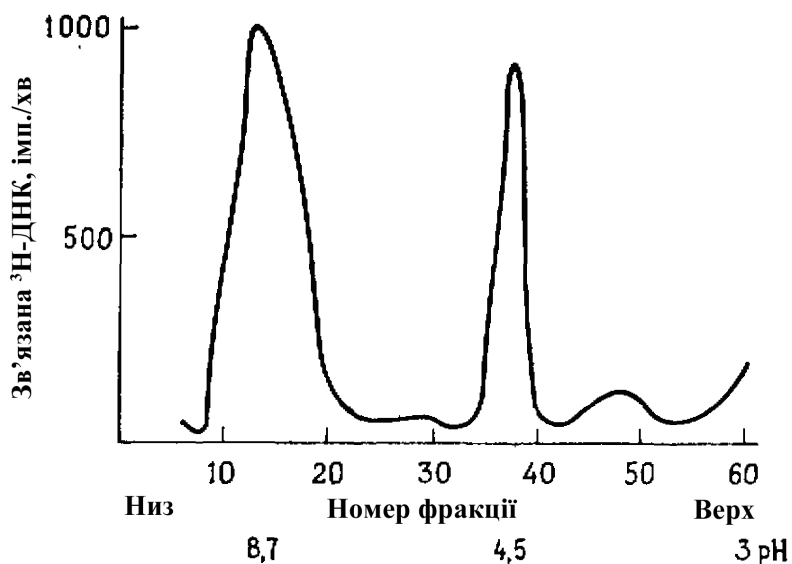


Рис. 1.46. Ізоелектричне фокусування ферменту «УФ-ендо»

Створення градієнту рН при ізоелектричному фокусуванні

Градієнт рН в ІЕФ створюють одним із трьох способів:

1. За допомогою амфотерів-носіїв, тобто речовин, які здатні створювати в розчинах певне значення рН;
2. Шляхом формування температурного градієнту;
3. За допомогою допоміжного градієнту концентрацій органічних речовин.

Найпоширенішим є метод використання *амфотерів-носіїв*. Ці речовини повинні відповідати наступним вимогам:

1. Амфотери-носії повинні мати високу буферну ємність при значеннях рН, які близькі до їх ізоелектричної точки;
2. Для досягнення високого розділення речовин, які мало розрізняються за ізоелектричними точками, необхідно використовувати велику кількість амфотерів-носіїв, ізоелектричні точки яких різняться менше, ніж на 0,05 одиниці рН;

3. Оскільки ізоелектрична точка більшості білків в межах рН 3–10, то необхідно, щоби ізоелектричні точки амфотерів-носіїв охоплювали виниклий діапазон рН, бажано від 2,5 до 11;

4. Амфотери-носії повинні мати високу розчинність у воді;

5. Оскільки для виявлення білків найбільш простим способом є визначення поглинання в ультрафіолетовій області світла (зокрема, при λ 280 нм), то амфотери-носії повинні мати малу оптичну густину в ультрафіолетовій області;

6. Амфотери-носії повинні, за можливості, бути гідрофобними речовинами, які не зв'язуються міцно з білками;

7. Необхідно використовувати амфотери-носії з малою молекулярною масою, щоби їх можна було відносно легко видалити з розчину після завершення ІЕФ, перед ідентифікацією білків;

8. Амфотери-носії повинні забезпечувати рівномірну провідність розчину, в якому відбувається ІЕФ, щоби виключити можливість виникнення місцевого перегріву при локальному зниженні електропровідності.

Створення градієнта рН за використання амфотерів-носіїв. Як правило, амфотери-носії – це синтетичні низькомолекулярні (молекулярна маса 300–600 Да) поліамфотери (багатозарядні структури), які здатні перекривати широкий діапазон ізоелектричних точок. Ці речовини звичайно становлять собою змішані полімери амфотерних аміно- і карбонових кислот.

Створено велику кількість амфотерів-носіїв. Так, наприклад, розроблено способи стабілізації градієнтів рН в інтервалі рН 3–9,5 за допомогою сполук, які утворюються при сополімеризації акрилової кислоти і пентаетилентетраміну, а також при реакції акрилової кислоти з гексаметилентетраміном, триетилентетраміном і тетраметиленпентаміном або пентаетиленгексаміном.

Синтезовано новий тип амфотерів-носіїв під торговою назвою *серваліти*. Вони утворюються в ході реакції, в яку вступає суміш пропансульфону, хлорметилфосфонові кислоти та акрилової кислоти з деякими поліамінами, які містять на молекулу по 5–6 атомів Нітрогену і по 2–3 метиленові групи між сусідніми атомами нітрогену, а також із деякими їх похідними, що мають в своєму складі гуанідинові групи. При зміні складу вихідних реагентів, можна отримати суміш амфотерних речовин з ізоелектричними точками в межах рН 2–11.

Під різними фірмовими назвами випускаються амфотери-носії амфоліни, фармаліти, біоліти.

Створення градієнта рН при зміні температури в ІЕФ. У цьому методі при створенні градієнта рН трубку для електрофорезу заповнюють звичайним буферним розчином, але верхню її частину термостатують при значно вищій температурі, ніж нижню. Оскільки ступінь дисоціації слабкої кислоти або луку залежить від температури, то одночасно з градієнтом температури формується і градієнт рН. Для стабілізації електрофоретичних зон проти конвекції використовують градієнт густини або обертання трубки, в якій проводять електрофорез.

Цей метод використовується в тих випадках, коли ізоелектричні точки близькі одна до одної. Цим шляхом можна створити градієнт рН. В той же час

можливість використання ІЕФ у градієнті рН, який сформований під дією температури, обмежена із-за високої чутливості, зокрема, білків до нагрівання.

Створення градієнта рН під дією допоміжного градієнта концентрації органічних речовин. У цьому методі використовують звичайні розчини буферів у градієнті концентрації органічних розчинників, таких, зокрема, як етанол, діоксан, етиленгліколь, фікол, гліцерин, сахароза, сорбіт, маніт та ін. У присутності цих речовин змінюється дисоціація компонентів розчину буфера. Таким чином, за допомогою додаткового градієнту концентрацій таких речовин вдається створити градієнт рН у діапазоні, приблизно 1,5 одиниці рН. Так, зокрема, в боратному буфері в змішаному градієнті концентрацій гліцину (0–5 %) і сахарози (0–30 %) вдалося створити градієнт рН у діапазоні між рН 7,0 і рН 8,6, а в ацетатному буфері при зміні в ньому вмісту гліцерину від 0 до 90 % був сформований градієнт рН у межах 4,5–5,8.

Для стабілізації електрофоретичних зон проти конвекції використовують ІЕФ у колонках із стійким градієнтом густини нейтральних та інертних речовин, гелі (звичайно, поліакриламідні) та гранульоване підтримуюче середовище, а також вже наведені вище амфотери.

Основні види методу ізоелектричного фокусування

Існує декілька видів ІЕФ. Найпоширенішими є в градієнті густини, в гелях, гранульованому підтримуючому середовищі та в розчинах тільки з амфотерами-носіями.

ІЕФ у градієнті густини в колонках. На рис. 1.47 наведена схема електрофоретичного блоку для проведення ІЕФ у колонці з градієнтом сахарози.

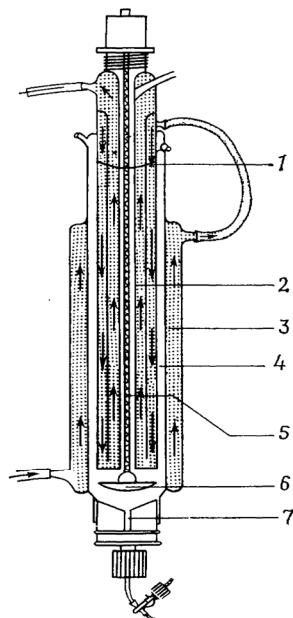


Рис. 1.47. Електрофоретичний блок для ІЕФ у колонці з градієнтом густини сахарози

П р и м і т к и: 1 – верхній електрод; 2 – внутрішній «кожух» охолодження; 3 – зовнішній «кожух» охолодження; 4 – кільце подібна камера для розділення; 5 – нижній електрод; 6 – замикаючий клапан; 7 – вивідний капіляр.

Розділення білків проводять у скляній вертикальній колонці, яка має зовнішній та внутрішній «кожух» охолодження для забезпечення термостатування. Один із електродів знаходиться в електродній трубці, яка на нижньому кінці має замикаючий клапан. Інший електрод у вигляді кільця закріплений у верхній частині роздільної електрофоретичної трубки. Нижній кінець колонки, який має вигляд конуса, з'єднаний з вивідним капіляром.

Перед початком ІЕФ амфотери-носії з вибраним діапазоном рН змішуються з розчинами для створення градієнта густини, зокрема в нижню частину колонки наливають 50 % (маса/об'єм) сахарозу, а у верхню – 1 %-ву або, як правило, 1 %-вий розчин амфотеру-носія. Це робиться за допомогою спеціального градієнтного змішувача або ж нашаровуванням один на одного шарів розчину сахарози з густиною, яка поступово зменшується. Зразок, який досліджується, змішують з одним із таких шарів (легким або важким). У катодну комірку наливають, наприклад, розбавлений розчин етаноламіну або іншого лугу, а в анодну камеру – розбавлену сульфатну або фосфорну кислоту.

У подальшому за допомогою спеціального пристрою відкривають клапан на нижньому кінці електрофоретичної колонки, що створює рідинний контакт між електродами. Потім вмикають термостатуючий пристрій і до електродів прикладають електричну напругу (200–1200 В, сила струму не більше 10 мА).

Після завершення електрофорезу (24–72 год), замикаючий клапан закривають і вміст колонки, не змішуючи електрофоретичні зони, фракціонують через вивідний капіляр. Положення сконцентрованих білків можна реєструвати, наприклад, шляхом вимірювання спектрофотометром поглинання ними світла при проходженні через проточну комірку (кювету), причому спектрофотометр з'єднаний з самописцем та комп'ютером (для обробки отриманих електрофореграм). Величину рН окремих електрофоретичних зон, яка відповідає ізоелектричній точці окремих розділених білків, визначають високочутливим рН-метром і за значенням визначених ізоелектричних точок ідентифікують розділені білки.

Існує ще ряд інших конструкцій електрофоретичних блоків для ІЕФ у градієнті густини органічних речовин. Так, наприклад, J-подібні трубки поміщають у стандартний прилад для диск-електрофорезу. Верхню частину трубки, в якій створено градієнт густини сахарози, приєднано до верхньої електродної комірки, а боковий відросток, який заповнений етилендіаміном і 50 %-вим розчином сахарози, занурюють у нижню електродну комірку.

Після завершення ІЕФ, у J-подібну колонку знизу накачують перистальтичним насосом розчин із великою густиною, внаслідок чого весь вміст колонки з градієнтом густини піднімається вгору і витискується спочатку в кювету спектрофотометра (вимірюється поглинання світла у видимій або ультрафіолетовій областях), а потім у колектор фракцій (збираються окремі фракції). Такий пристрій дозволяє розділити 0,1–1 мг білків у градієнті об'ємом 10 см³, причому одночасно можна проводити ІЕФ у декількох J-подібних колонках при однакових умовах.

Набув розповсюдження метод ІЕФ, в якому за процесом розділення спостерігають шляхом сканування речовин, які ізоелектрично фокусуються.

Гradient густини органічної речовини створюють у кварцовій трубці (колонці), яка переміщується у вертикальному напрямі зі заданою швидкістю за допомогою синхронного електродвигуна. З однією сторони колонки на неї спрямовують світловий промінь з встановленого на певному рівні монохроматора (пристрою, який є джерелом світла певної довжини хвилі), а з протилежної – вимірюють і реєструють інтенсивність світла, яке пройшло через колонку. Такий пристрій дає можливість багаторазово сканувати цю колонку через різні інтервали часу в процесі ІЕФ. Після завершення ІЕФ уміст колонки можна фракціонувати.

Розроблені також методи ІЕФ у gradientі густини органічних речовин, які пристосовані для елюції gradientу густини в електричному полі. Швидкі мікрометоди, які дозволяють розділити лише 100 мкг білка в стандартних кварцових кюветах, що містять 1,5 см³ розчину з gradientом густини тощо.

ІЕФ у гелях. У гелях фіксація речовин, зокрема білків, відбувається значно швидше, ніж у розчині з gradientом густини. За цей час електрофоретичні зони не встигають розширитися, що сприяє високому розділенню. Практично ІЕФ у гелі можна провести в будь-якому приладі, який призначений для електрофорезу в стовпчиках гелю або на пластинках.

У більшості випадків ІЕФ у гелі проводять із використанням поліакриламідного гелю. Оскільки інші гелетвірні речовини, як правило, містять електрзаряджені групи і при їх використанні виникає електроосмос, який впливає на результати розділення речовин.

При формуванні гелю у вигляді стовпчиків, зразки наносять на різні гелі або гелі розщеплюють, а при використанні пластинки гелю одночасно проводять дослідження декількох зразків.

У залежності від способу виявлення речовин при ІЕФ в гелі, достатньо внести декілька мікрограм, зокрема білків, або навіть менше.

Тривалість самого розділення речовин при ІЕФ в гелі звичайно менша, ніж у розчині з gradientом густини, але відносно багато часу займають інші процедури, а саме фіксація і забарвлення, зокрема білків, вимір gradientу рН тощо.

Поліакриламідний гель готують, як правило, звичайним шляхом полімеризації.

При проведенні ІЕФ у стовпчиках поліакриламідного гелю (8 %-вий поліакриламід і 1 %-вий амфотер-носій) методика подібна до диск-електрофорезу. Для гелів діаметром 5 мм і довжиною 65 мм рекомендується застосовувати силу електричного струму не більше 2 мА на кожний стовпчик гелю. У ході зниження електропровідності в процесі утворення gradientа рН, величину електричної напруги можна знизити до 300–400 В.

Існує велика кількість пластинок із гелем для проведення ІЕФ. Так, наприклад, одні з них (скляні) мають розмір 245×110×1 мм, які вкриті шаром 5 %-вого поліакриламідного гелю, що містить 2,4 %-вий амфотер-носій в інтервалі рН 3,5–9,5. Кожна така пластинка призначена для одночасного фракціонування 24 зразків. Можна вводити пробу в об'ємі 10 мкдм³, яка містить декілька мікрограмів білка.

Білки при ІЕФ в поліакриламідному гелі виявляють, як правило, тими ж методами, які використовуються після звичайного гель-електрофорезу, а саме: забарвленням електрофореграм спеціальними барвниками, скануванням у видимій або ультрафіолетовій областях спектру, преципітацією білків специфічними антигенами, визначенням радіоактивності у випадку дослідження мічених радіоізотопами білків, виміром ферментативної активності у випадку дослідження білків-ферментів та ін. Один із способів візуалізації білків – це їх осадження трихлороцтовою кислотою (ТХО). У цьому випадку електрофоретичні зони виявляються у вигляді напівпроникного осаду, які можна сфотографувати.

Визначення ізоелектричної точки білків, які розділені методом ІЕФ у гелі, проводять різними методами, зокрема при використанні мікроелектродів і рН-метра, в елюаті, який отриманий із шматочків гелю при використанні амфотерних барвників або комплексів тощо.

ІЕФ у гранульованому підтримуючому середовищі. В цьому методі використовуються шари гранульованого середовища підтримки (порошки з скла, целюлози і полівінілхлориду, суспензії декстринів (сефадексів) і агарози (сефарози) та ін.), тобто такі, які й при зональному електрофорезі в блоках і колонках із гранульованим підтримуючим середовищем.

Покриті гранульованим підтримуючим середовищем скляні (у деяких випадках пластмасові) пластинки розміщують у термостатованому блоці. Після проведення ІЕФ, білки виявляють забарвленням відповідним барвником, скануванням у видимій або ультрафіолетовій області спектра, отриманням репліки на папері (накладають листок фільтрувального паперу на пластинку і після дифузії частини білка в цей папір, його знімають, висушують і забарвлюють).

Набув широкого розповсюдження *метод неперервного ІЕФ у гранульованому підтримуючому середовищі*. Електрофоретичний блок в одному з варіантів цього методу має розділяючу комірку, яка виготовлена з двох скляних (можна плексигласових) пластинок розміром 23х30 см, які знаходяться на відстані 3 мм одна від одної. Простір між ними заповнюють сефадексом, наприклад G100, який урівноважений проти амфотера-носія з вибраним діапазоном рН. Бокові поверхні шару сефадексу відділяють від електродних буферів пористою поліетиленовою плівкою, яка просякнута гелетвірним розчином акриламідів. Досліджувані зразок і амфотер-носії подають у верхню частину комірки. В нижній частині розміщено ряд (до 54) вивідних трубок, через які за допомогою перистальтичного насоса рідина подається в пробірки для збору фракцій.

ІЕФ у розчинах, які містять тільки амфотери-носії. Один із варіантів електрофоретичного блока для проведення цього методу складається з U-подібних трубок, які розміщені між двома складовими частинами (верхньою і нижньою) вимірювальної комірки (кювети). З боків цієї комірки розміщені платинові електроди, які відділені від розчину амфотерів-носіїв і білків зразка фільтрами з пористого скла. Після завершення ІЕФ, верхню частину електрофоретичного білка знімають і з U-подібних трубок вилучають розчин,

який містить розділені компоненти зразка (білки). Цей метод носить ще назву *зональне конвекційне ізоелектричне фокусування*.

Існує цілий ряд модифікацій цього методу. Так, зокрема, можна стабілізувати електрофоретичні зони обертанням розділяючої колонки (швидкість 40 об/хв).

Ізотахофорез

Ізотахофорез (грецьк. *isos* – рівний, подібний, однаковий та *tachos* – швидкість) – це метод електрофорезу, в якому електророзаряджені компоненти зразка, які розділяються, рухаються з однаковими швидкостями. Він об'єднує принципи електрофорезу з рухомою межею і неперервного.

Загальні уявлення про ізотахофорез

У залежності від обладнання, яке використовується, розділення при ізотахофорезі проводять у горизонтальному або вертикальному напрямі. Розчин, в якому відбувається розділення, звичайно становить собою водне середовище, що містить, як правило, сахарозу для забезпечення більш високої густини. До зразка додають один вид іонів із високою і низькою електрофоретичною рухливістю (наприклад, іони хлору і гліцину, відповідно). Ці іони мають такий же електричний заряд, що і зразка, які розділяються.

Речовини зразка в електричному полі рухаються між *ведучими іонами* (з більшою рухливістю, ніж у іонів зразка) і *замикаючими* (з меншою рухливістю, ніж у іонів зразка). Всі заряджені іони спочатку рухаються з швидкістю, яка визначається напруженістю електричного поля, величиною заряду і електрофоретичною рухливістю. Ведучі іони, які мають високу рухливість, рухаються з більшою швидкістю і накопичуються в зоні відповідного електрода (анода, якщо вони електронегативні). Ця зона характеризується підвищеною концентрацією цих іонів і, відповідно до цього, має найменший електричний опір, що спричинює низьку напруженість електричного поля. Зона ведучих іонів має також низьке значення рН і меншу температуру.

При ізотахофорезі розділення іонів, як вже відмічалось, відбувається у відповідності з їх рухливостями, а концентрація іонів у кожній електрофоретичній зоні залежить від концентрації іонів в електрофоретичних зонах, що визначається першим, тобто ведучим, іоном. Іони розміщуються у такій послідовності – ті, що мають більшу рухливість будуть рухатися попереду іонів з меншою рухливістю. Поскілки в умовах ізотахофорезу швидкості всіх іонів (а вони мають рівний електричний заряд), як і сила струму, у всіх зонах однакові, то згідно закону Ома ($I = U/R$, де I – сила струму, U – напругу, R – опір) градієнт напруги в кожній зоні буде інший. Чим менша рухливість іона, тим більший перепад напруги в цій зоні. Тому всі іони набувають однакову швидкість, незважаючи на різницю в їх рухливості (рис. 1.48).

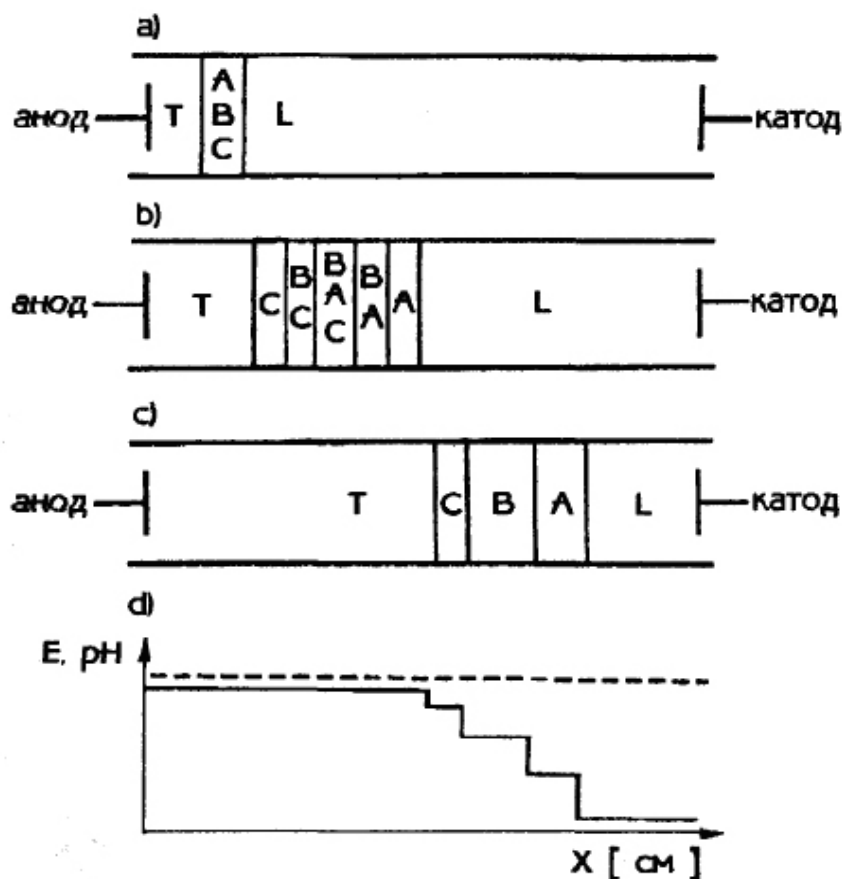


Рис. 1.48. Схема ізотахофореzu

П р и м і т к и: Т і L – замикаючий і ведучий іони; А, В і С – іони зразка; а, б і в – стадії розділення іонів А, В і С при ізотахофореzі; д – ступінчата зміна напруженості електричного поля (Е).

Ізотахофореграма відрізняється від інших видів електрофореграм тим, що на ній висота ступенів напруженості електричного поля є характеристикою кожного виду іонів, а відстань між ними дає інформацію про число іонів. При ізотахофореzі поряд із ефектом концентрування іонів, спостерігається також автоматична стабілізація межі між електрофоретичними зонами. Це відбувається з наступної причини. Так, наприклад, коли певна частина іонів зразка все ж таки потрапляє у зону ведучих іонів, яка характеризується, як відмічалось, низькою напруженістю електричного поля внаслідок підвищеної концентрації іонів із високою рухливістю, швидкість іонів зразка різко зменшується, і вони знову потрапляють у свою зону. У випадку, коли ведучі іони надходять у зону іонів зразка, то через високу напруженість електричного поля в цій зоні, швидкість їх руху різко збільшується, і вони опиняються в зоні, яка характерна для них. Таким чином, відбувається автоматичне підвищення різкості меж між зонами.

Слід відмітити, що рухливість іонів в електричному полі залежить від ряду чинників, зокрема електричного заряду, в'язкості розчинника, діелектричної сталої, радіуса та ін. Її можна змінювати, зокрема, при варіюванні розчинника або рН, який визначає співвідношення між дисоційованими і недисоційованими

молекулами, які досліджуються. Так, наприклад, K^+ і NH_4^+ у воді мають майже однакову електрофоретичну рухливість, але вони добре розділяються в метанолі.

Рухливість, зокрема, білків сильно залежить від рН. Всі зони мають різні значення величини рН. В електронегативній системі рН звичайно зростає в напрямі від ведучого іона до замикаючого. При значеннях рН нижче 3 і більше 10 умови ізотахофореzu порушуються, оскільки H^+ і OH^- самі забезпечують електропровідність. Присутність карбонату при високих рН також проявляє негативну дію при ізотахофореzі.

Для розділення за допомогою ізотахофореzu двох іонів необхідно, щоб їх електрофоретична рухливість була різною принаймні на 10 %. Якщо ж рухливість іонів дуже близька, то розділення можна покращити шляхом внесення в зразок амфотерів-носіїв, які називаються *іонами-прокладками*. Ці іони у порівнянні з іонами зразка мають проміжну рухливість і, при розміщенні між ними, сприяють розділенню останніх. Іони-прокладки створюють градієнт рН між ведучими і замикаючими іонами і, тим самим, сприяють додатковому розділенню іонів зразка за принципом електрофокусування.

Після розділення іонів зразка і досягнення стану рівноваги в електрофоретичній системі, виникає градієнт рН, напруженості електричного поля і температури (рис. 1.49).

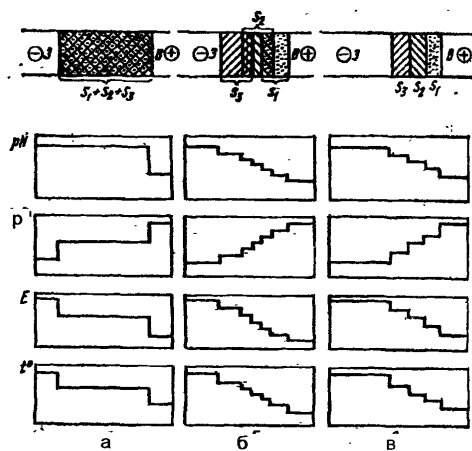


Рис. 1.49. Схематичне зображення зміни рН, електрофоретичної рухливості (р), напруженості електричного поля (Е) і температури (t°) в електронегативній ізотахофоретичній системі

П р и м і т к и: а — початкові значення досліджуваних чинників; б — через певний час після часткового розділення компонентів зразка; в — після досягнення стабільного стану, коли відбулося повне розділення компонентів зразка;

S_1 , S_2 і S_3 — компоненти зразка; В — зона ведучих іонів; З — зона замикаючих іонів.

Особливості проведення ізотахофорезу

Ізотахофореуз проводять, як правило, в скляних або пластмасових трубках із внутрішнім діаметром 0,4–0,6 мм і довжиною 50–100 см. Трубки повинні мати однаковий по всій довжині внутрішній діаметр. Крім того, повинен бути постійний внесок ведучого розчину, необхідно відповідним чином попереджувати появи електроосмосу, а також забезпечувати рівномірне охолодження електрофоретичної трубки. Буферна ємність ведучого розчину повинна бути достатньо великою, щоби перешкоджати змішуванню зон рН у напрямі, протилежному руху зон компонентів зразка.

Для регулювання температури в електрофоретичній трубці, використовують термостат. Розроблений прилад для ізотахофорезу, який складається з єдиного термостатованого блоку з комірками для електродів, пристрою для вводу зразка, капілярних електрофоретичних трубок із поперечним перерізом 0,2 x 1,0 мм і довжиною 25 см, а також детектора.

Існує декілька видів детекторів. Зокрема, це використання термістрів і термопар для виміру кількості тепла, яке виділяється в різних зонах внаслідок різного градієнту електричної напруги. Використовують також детектори з мікроелектродами для виміру електропровідності і градієнта електричного потенціалу зон, які дозволяють реєструвати як інтегральні, так і диференціальні криві (рис. 1.50).

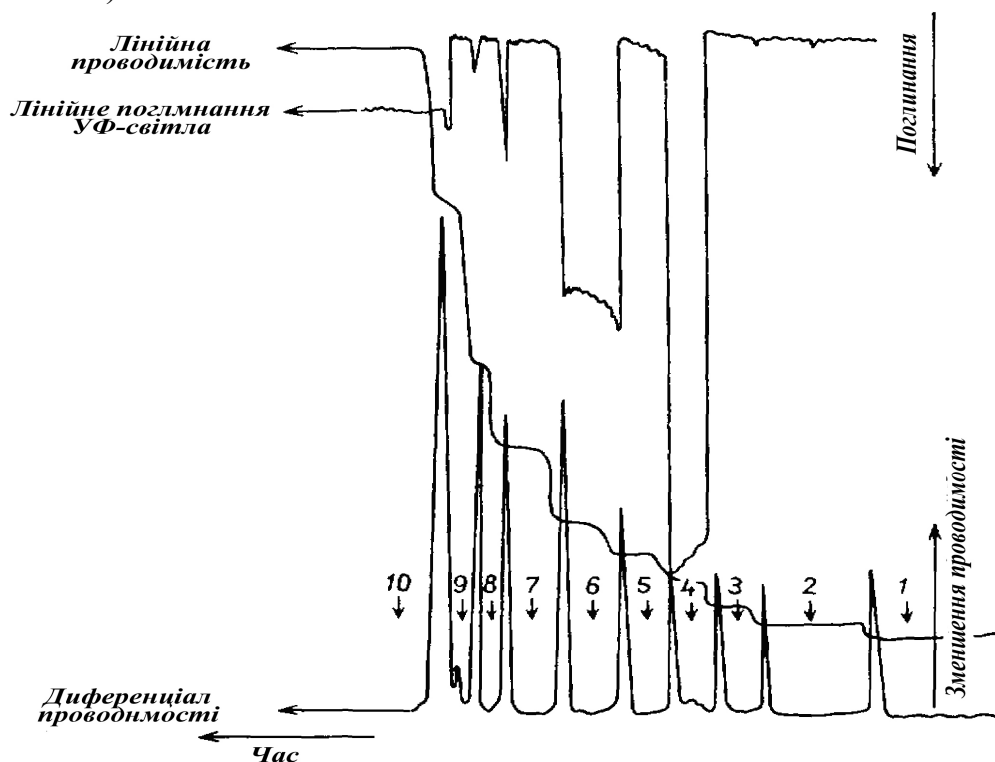


Рис. 1.50. Ізотахофореграма деяких аніонів: 1 – хлорид (ведучий іон); 2 – сульфат; 3 – хлорат; 4 – хромат (поглинає в ультрафіолетовій області спектра); 5 – малонат; 6 – піразол-3,5-дикарбоксилат; 7 – ацетат; 9 – β -хлорпропіонат; 10 – фенілацетат (поглинає в ультрафіолетовій області)

Ізотахофоре́з можна проводити не тільки в трубках, але і на смужках із ацетату целюлози і поєднувати з іншими видами електрофоре́зу.

Для розділення білків широко розповсюдженим є ізотахофоре́з у поліакриламідному гелі. В процесі такого ізотахофоре́зу білки можуть досягати високих концентрацій, часто 5–10 %, оскільки вони збираються в дуже вузькі зони. Для розділення білкових зон рекомендується використовувати амфотеріносії, які мають проміжну рухливість між рухливістю досліджуваних білків. На рис. 1.51 наведено приклад розділення сироватки крові людини ізотахофоре́зом у поліакриламідному гелі.

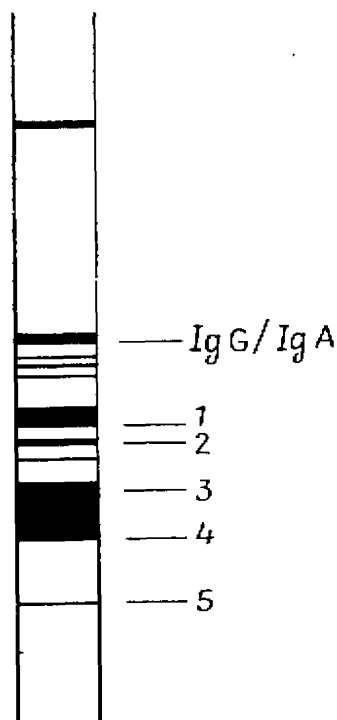


Рис. 1.51. Розділення ізотахофоре́зом у поліакриламідному гелі сироватки крові людини з використанням 40 %-вого (маса/об'єм) розчину амфотеріносіїв, які створюють градієнт рН 5–6; рух білків у напрямі зверху донизу:

П р и м і т к и: 1 – трансферин; 2 – гаптоглобін; 3 – альбумін + церулоплазмін; 4 – альбумін + α_1 -антитрипсин; 5 – орозомукоїд.

Білки сироватки крові розділяються краще, якщо вони попередньо зазнавали фракціонування сульфатом.

Імуноелектрофоре́з

У методі *імуноелектрофоре́зу* проводять, як правило, звичайний електрофоре́з речовин, які аналізуються (білків, деяких полісахаридів та ін.), в агаровому або агарозному гелі, а потім виявляють ці речовини за допомогою імунодифузії.

Загальні принципи проведення імуноелектрофорезу

Імуноелектрофорез звичайно проводять на горизонтальних пластинках гелю, як показано на рис. 1.52

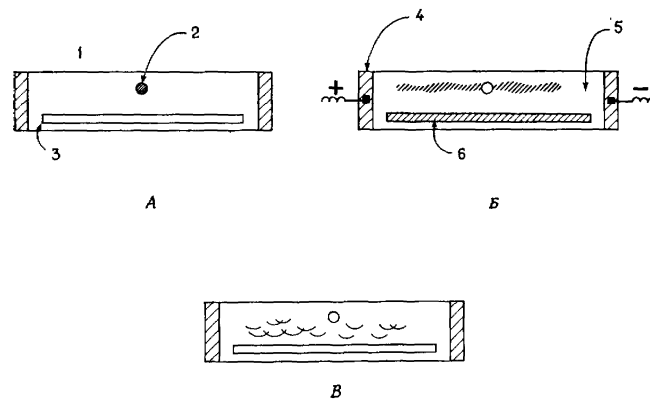


Рис. 1.52. Схема проведення горизонтального імуноелектрофорезу білків у гелі

П р и м і т к и: А – лунка в гелі з білком (антигеном); Б – електрофорез приводить до руху білків, після його закінчення в рівчачок гелю додають антисироватку (антитіла); В – імунодифузії приводить до утворення преципітованих ліній;

1 – предметне скло мікроскопа; 2 – лунка, яка заповнена білком; 3 – жолобок для суміші антитіл; 4 – смужка фільтрувального паперу, яка насичена буфером; 5 – агаровий гель; 6 – антисироватка.

З обох боків шару гелю паралельно вісі руху речовин (зокрема, білків) прорізають рівчачки і заповнюють їх розчином антитіл, які специфічні до певних білків (антигенів), що розділяються при електрофорезі. Наслідком кожної реакції антигену з антитілом є утворення смужки *преципітації* (лат. *precipitatio* – скидування) – осадження комплексу антигену з антитілом. *Антигени* – це чужорідні речовини, які в організмі викликають специфічну імунологічну реакцію – синтез *антитіл* (імуноглобулінів).

На рис. 1.53 наведені результати імуноелектрофоретичного розділення білків крові людини.

Саме завдяки імуноелектрофорезу при використанні поліфункціональної антисироватки (містить багато антитіл) група α_2 -глобулінів розділяється на декілька компонентів білкової природи.

Використання специфічних барвників (наприклад, для білків амідиний чорний В, лісаміновий зелений або азокармін В), які реагують із досліджуваними речовинами зразка, робить дуги преципітації більш помітними.

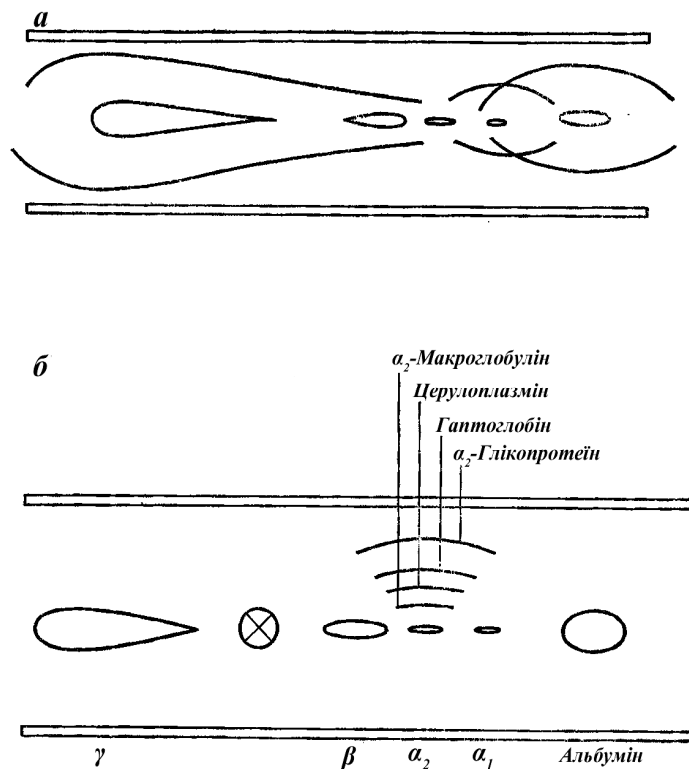


Рис. 1.53. Імуноелектрофоретичне розділення білків сироватки крові людини

П р и м і т к и: а – антитіло специфічне до γ -глобуліну, α_1 -глобуліну і альбуміну; б – розділення групи α_1 -глобулінів на декілька компонентів білкової природи; α_1 – α_1 -глобуліни; α_2 – α_2 -глобуліни; β – β -глобуліни; γ – γ -глобуліни.

Основні види імуноелектрофорезу

Існує декілька видів імуноелектрофорезу. Крім наведеного вище звичайного горизонтального імуноелектрофорезу в гелі, існують його модифікації. Так, наприклад, у **методі електрофорезу в гелі, який містить антитіла («ракетний» електрофорез, електрофорез за Лореллом)**. При виготовленні гелю його компоненти змішують із специфічною антисироваткою і рівномірно наносять на скляну пластинку. В отриманому шарі гелю вирізають лунки, в які вносять суміш антигенів (зокрема, білків). Під дією електричного поля антигени переходять в гель, де взаємодіють з антитілами. Внаслідок такої реакції вздовж країв рухомої зони, яка містить антигени, з'являються преципітати. В процесі руху антигену його молекули поступово зв'язуються з антитілами, наслідком чого є утворення витягнутого в довжину гострокінцевого преципітату – «ракети». В стандартних умовах (постійна концентрація гелю та його товщина, вміст антигену, електрична напруга, температура тощо) довжина смуги такого преципітату пропорційна концентрації антигену.

У **методі двовимірного імуноелектрофорезу (перехресного імуноелектрофорезу за Лореллом)** на першому етапі проводять електрофоретичне

розділення компонентів суміші антигенів (наприклад, білків) у гелі, який містить антитіла. Потім відокремлені антигени знову розділяють шляхом електрофорезу в другому (перпендикулярному) напрямі.

При взаємодії антигенів з антитілами, утворюються преципітати у формі піків, площа яких пропорційна концентрації відповідного антигену в зразку, який аналізується, а також концентрації антитіл у гелі.

При **простій лінійній імунізації** гель, який містить антитіла і знаходиться в пробірці, склянці занурюють у розчин, що містить антигени. При використанні трубок із гелем, в якому містяться антитіла, антигени нашаровують на його поверхню. Антигени дифундують у гель і при взаємодії їх з антитілами утворюються преципітати. Відстань, яку проходить фронт преципітатів за певний проміжок часу при стандартних умовах (сталі концентрація гелю та його товщина, вміст антигенів, електрична напруга, температура тощо), пропорційна концентрації антигену.

У методі **простої радіальної імунодифузії** антитіла вводять рівномірно в гель. При їх реакції з антигенами, які вносять у вирізані в гелі лунки і які радіально дифундують, утворюється кільце преципітатів. Діаметр цього кільця збільшується доти, поки в лунці є антиген.

При **подвійній радіальній імунодифузії** в шарі гелю рівномірної товщини на певній відстані (4–10 мм) одна від одної вирізаються лунки для суміші антигенів і антитіл. Після цього антигени і антитіла дифундують в гель і утворюють преципітати.

В одному з видів імуноелектрофорезу використовують *чисті антигени-стандарти*, які порівнюються з антигенами, які аналізуються. Це дає можливість ідентифікувати антигени, преципітати яких співпадають з антигенами-стандартами.

Ще в одному методі імуноелектрофорезу використовують видоспецифічні антитіла-стандарти.

У цьому методі дуга преципітації, яка утворена поліспецифічним антитілом, може злитися з іншою дугою преципітації, яка утворена моноспецифічним антитілом. Це свідчить про ідентичність цього компоненту суміші антигенів із тим антигеном, до якого використано моноспецифічне антитіло.

Електрофорез у капілярах

У випадках, коли, наприклад, в результаті очищення (зокрема, хроматографічними методами) вдається отримати лише дуже малу кількість досліджуваного матеріалу, або при необхідності аналізувати компоненти, наприклад, окремих клітин, необхідно використовувати *метод мікроелектрофорезу в капілярах (капілярний електрофорез, КЕ)*. В той же час КЕ має ряд переваг перед іншими методами електрофорезу. Це, насамперед, малий час самого електрофорезу, що робить доцільним використання КЕ навіть тоді, коли матеріалу достатньо для аналізу.

У порівнянні з методами класичного електрофорезу, КЕ має наступні переваги:

1. Дуже висока ефективність розділення;
2. Просте детектування в режимі реального часу;
3. Короткий час аналізу;
4. Можливість високого ступеня автоматизації;
5. Невеликі витрати реактивів.

Загальні уявлення про електрофорез у капілярах

Схема приладу для КЕ наведена на рис. 1.54.

В основному використовують кварцові капіляри діаметром 25–100 мкм і довжиною 20–100 см. Кварцові капіляри застосовуються тому, що за їх використання можливе детектування в ультрафіолетовій області світлового спектру (див. нижче). Капіляр з'єднує дві комірки (посудини), між якими прикладена електрична напруга 30 кВ. Відносно мала кількість зразка ($2\text{--}20\text{ нм}^3$) вводиться на анодному кінці капіляра. Це досягається підніманням або опусканням відповідної буферної комірки, творенням тиску в комірці для зразка в капілярі.

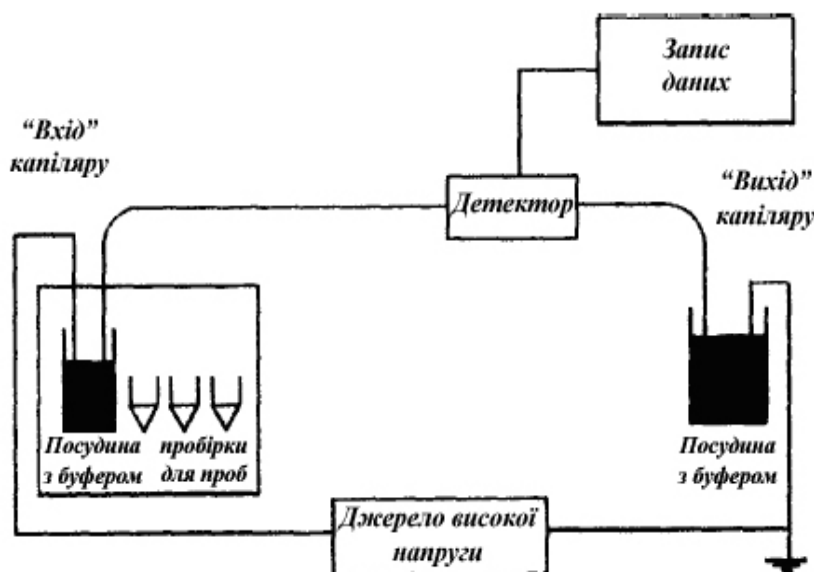


Рис. 1.54. Схема приладу для капілярного електрофорезу (пояснення див. текст). Запис даних

Розділення компонентів зразка досягається прикладанням електричної напруги до буферних комірок і їх міграцією під дією електричного поля. Пасивному руху зразка сприяє електроосмотичний потік. Цей електроосмотичний потік (ЕОП) залежить від розподілення електричних зарядів поблизу поверхні капіляра. У випадку кварцових капілярів – це негативні заряди, які обумовлені дисоціацією силанольних груп. Цей поверхневий заряд локалізується в рідині проти відповідних протиіонів із протилежним знаком.

Якщо паралельно поверхні капіляра прикласти електричне поле, то воно притягує протиіони з рухливого шару вздовж вісі та засмоктує рідину в капіляр.

Тому у випадку кварцових капілярів ЕОП направлений до катоду. Утворюється дуже плоский профіль потоку. Це призводить до значного зменшення розширювання піків, ніж при гідродинамічному потоці.

Електроосмотичний потік допомагає переносити речовини до детектора. Аніони самі переносяться до катоду, причому швидкість їх електрофоретичного переміщення нижча, ніж швидкість ЕОП. Таким чином, ЕОП дозволяє проводити розділення катіонів і аніонів в одному аналізі.

Приклад розділення катіонних, аніонних і електронейтральних речовин при капілярному зональному електрофорезі (КЗЕ) наведено на рис. 1.55. За цих умов усі незаряджені молекули переміщуються з однаковою швидкістю, яка дорівнює швидкості ЕОП, і не можуть бути розділені. В той же час розділення заряджених іонів можливе завдяки їх різній електрофоретичній рухливості.

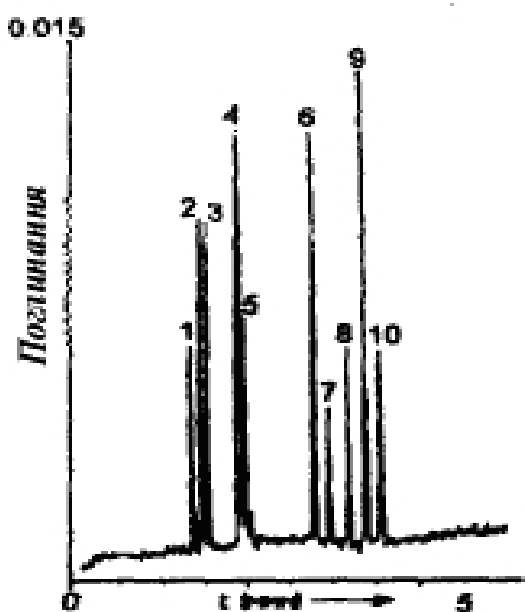


Рис. 1.55. Розділення нейтральних позитивно і негативнозаряджених речовин в одному досліді

Умови досліду: довжина капіляра – 30 см; внутрішній діаметр – 75 мкм; електрична напруга – 350 В/см; буфер – 33 мМ борат, рН 9,5; детектування – ультрафіолет, 214 нм

П р и м і т к и: 1 – триметилфеніламоній бромід; 2 – гістамін; 3 – 4-амінопіридин; 4 – бензиновий спирт; 5 – фенол; 6 – серин-альдегід; 7 – 2-(парагідроксифеніл)-оцтова кислота; 8 – бензойна кислота; 9 – ванілінова кислота; 10 – парагідроксибензойна кислота.

Додаванням довголанцюгових катіонних детергентів, таких, наприклад, як цетилметиламонієвих солей, що адсорбуються на силанольних групах поверхні кварцових капілярів, можна навіть здійснити обернення ЕОП. При цьому утворюється подвійний шар детергенту, який обернений позитивним зарядом

до буфера в капілярі. Це дозволяє здійснити розділення неорганічних іонів, які швидко переміщуються.

Детектування при капілярному електрофорезі

У КЕ компоненти зразка проходять через пластину капіляра. Їх детектування відбувається в режимі реального часу або в режимі розділення часу при детектуванні зразків на кінці капіляру.

Ультрафіолетове детектування. Це відбувається безпосередньо прямо в капілярі. Вже відмічалось, що використання саме кварцових капілярів (кварц починає поглинати світло з довжиною хвилі менше 190 нм) дозволяє проводити спектрофотометричні виміри в ближній ультрафіолетовій області (200–400 нм).

При детектуванні в капілярах поглинання ультрафіолетового світла відбувається в шарі дуже малої товщини (середня величина внутрішнього діаметра капіляру). Тому для ультрафіолетових детекторів виставляються високі вимоги щодо чутливості, впливу світлорозсіювання, внутрішнього відбиття, циліндричної форми капіляра, шумів та ін.

Типова ширина електрофоретичної зони в капілярі діаметром 50 мкм знаходиться в межах 5 мм, що відповідає об'єму 10 ндм³. Існує ряд прийомів покращення чутливості при ультрафіолетовому детектуванні в КЕ за рахунок збільшення товщини шару детектування. Це, зокрема, використання капілярів прямокутної форми та, так званих, Z-комірок (широко використовуються у високоефективній рідинній хроматографії). Їх застосування дозволяє покращити детектування в 10–12 разів у порівнянні з циліндричним капіляром.

Розроблено ряд пристроїв для оптимізації ультрафіолетового детектування за рахунок підвищення кількості світла, яке випромінюється його джерелом. Так, наприклад, кількість ультрафіолетового світла, яке випромінюється ртутними (довжина хвилі 185 і 254 нм) або цинковими (214 нм) лампами приблизно в 50 разів більша, ніж дейтерієвими лампами. Проте ртутні і цинкові лампи вдається використовувати тільки в однохвильових детекторах. Використання ж багатохвильових дейтерієвих детекторів із дифракційною решіткою значно розширює застосування КЕ, особливо при використанні швидкосканувальних детекторів із решітчастим монохроматором.

Для ідентифікації компонентів зразка, які не здатні поглинати в ультрафіолетовій області спектру світла, широко застосовується *метод непрямого ультрафіолетового детектування*. Для цього до буфера додають електроліт (хімічну систему, що містить іони), якому притаманне ультрафіолетове поглинання, причому його електрофоретична рухливість близька до рухливості компонентів зразка. Кількість доданого електроліту замість зразка повинна бути надзвичайно малою із-за додержування умов необхідної електронейтральності.

Крім ультрафіолетових детекторів, використовуються також інші. Так, зокрема, набули розповсюдження *методи прямого і непрямого флуоресцентного детектування* за умов існування відповідних флуорофорів (речовин, які здатні світитися після опромінення світлом).

Для реєстрації ультрафіолетнеактивних та нефлуоресціюючих речовин можна використати відповідні мітки-реагенти, які зв'язуються з цими речовинами.

В *електрохімічних детекторах*, зокрема, в яких вимірюється електропровідність, використовують мікроелектроди, що безпосередньо вводяться в капіляр.

Низькі швидкості потоку при КЕ (приблизно $100 \text{ ндм}^3/\text{хв}$) дають можливість сполучати КЕ з *мас-спектрометрами*, реєстрація речовин в яких базується на розділенні іонів після прискорення в магнітному полі за величиною відношення маси до заряду (m/e).

Існують також інші методи детектування речовин, які аналізуються методом КЕ, зокрема *спектроскопія комбінаційного розсіювання, рефрактометрія, поляриметрія, кондуктометрія, вимір радіоактивності мічених радіоізотопами речовин* та ін.

Один із ефективних і простих методів впливу на ЕОП – це зміна концентрації буфера. Для зменшення часу аналізу або дослідження багатозарядних іонів необхідно обирати буфери низької концентрації (іонної сили) і при лужних значеннях рН.

Капілярний зональний електрофорез у гелях

У зональному електрофорезі компоненти зразка розділяються за рахунок різниці їх електрофоретичної рухливості.

Найкраще розділення *методом капілярного зонального електрофорезу* (КЗЕ) отримують, коли заряджені молекули, які аналізуються, рухаються проти ЕОП. На рис. 1.56 показано розділення деяких нуклеотидів КЗЕ.

У цьому випадку електрофоретична рухливість моно- і дифосфатів менша, ніж ЕОП. Вони переносяться до детектора, якого досягають через різний час. За таких умов внеску ЕОП недостатньо для перенесення трифосфату, який рухається до аноду. Якщо поміняти полярність підключення джерела живлення, то можна розділити трифосфати, в той час як моно- і дифосфати разом із ЕОП рухаються в одному напрямі.

Розділення заряджених молекул із відносно великими гідрофобними залишками можна покращити додаванням Na-ДДС.

Найрозповсюдженим методом КЗЕ є *капілярний гель-електрофорез* (КГЕ), зокрема, в поліакриламідному гелі, як звичайний, так і за його модифікації, зокрема в градієнті поліакриламідного гелю.

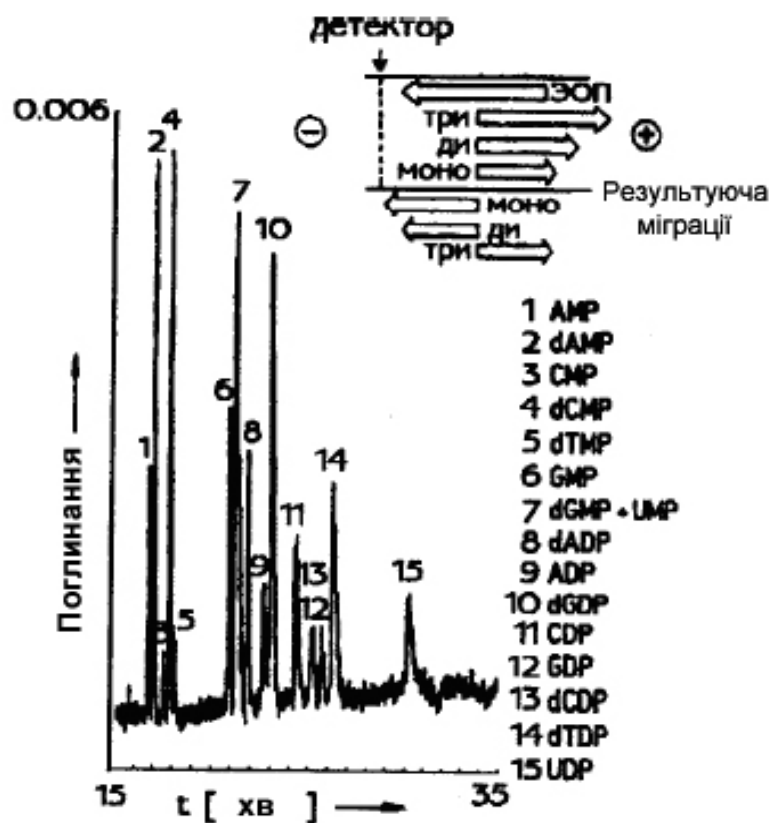


Рис. 1.56. Розділення деяких нуклеотидів за допомогою капілярного зонального електрофорезу

Основна область використання КГЕ в поліакриламідному гелі – це розділення молекул ДНК, оскільки високочутливе розділення білків неможливе із-за поглинання самого поліакриламідного гелю в області відносно коротких ультрафіолетових променів (довжина хвилі менше 250 нм). Нині розроблені методи КГЕ білків, які денатуровані Na-ДДС. Білки здатні повністю денатуватися в Na-ДДС і 2-меркаптоетанолі (руйнуються дисульфідні містки). Як вже відмічалось, виниклі поліпептидні ланцюжки зв'язують незалежно від своїх розмірів і структури постійну кількість Na-ДДС (1,4 г Na-ДДС на 1 г білка). Оскільки Na-ДДС гасить заряди білково-детергентних комплексів, то всі білки, оброблені цим детергентом, будуть мати однакове співвідношення зарядів на одиницю маси. Таким чином, електрофоретична рухливість комплексів білок-Na-ДДС визначається молекулярною масою білка. На рис. 1.57 наведена електрофореграма білків, яка отримана методом КГЕ з використанням Na-ДДС.

У КГЕ як розділяюче середовище поряд із поліакриламідними гелями використовують також інші водорозчинні полімери, зокрема агарозні і целюлозні гелі. Основна їх перевага – що вони не поглинають ультрафіолетові промені з довжиною хвилі нижче 250 нм, як це відбувається з використанням поліакриламідного гелю. Для розділення ДНК (їх фрагментів) ці гелі мають меншу роздільну здатність, ніж поліакриламідні, але їх вигідно використовувати для розділення білків, особливо Na-ДДС-білкових комплексів, оскільки

у такому випадку їх можна детектувати з високою чутливістю при відносно коротких довжинах хвиль (214 нм).

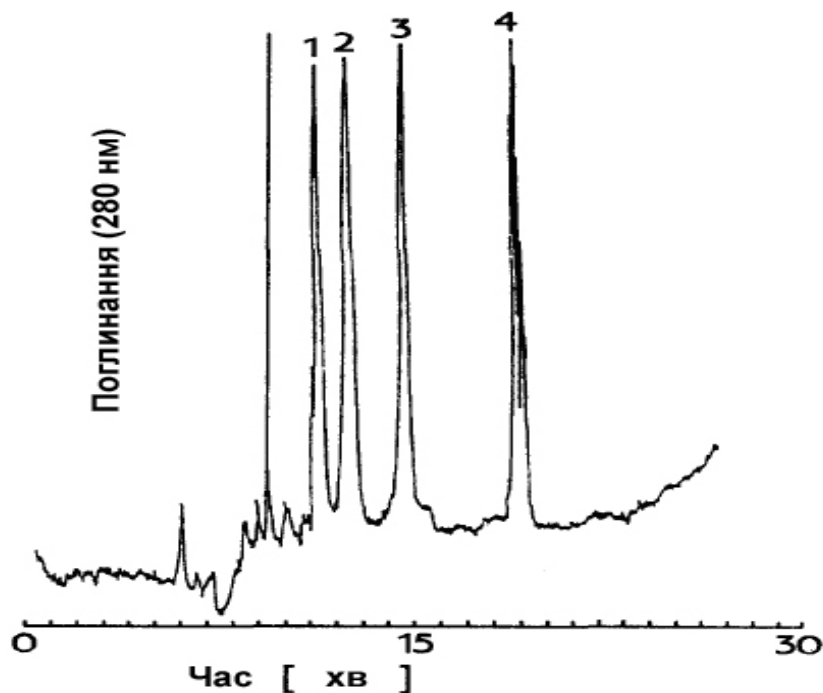


Рис. 1.57. Розділення деяких білків методом КГЕ в поліакриламідному гелі

П р и м і т к и: 1 – овальбумін; 2 – альбумін великої рогатої худоби; 3 – β -галактозидаза; 4 – міозин.

Ізоелектричне фокусування в капілярах

У методі ізоелектричного фокусування в капілярах (ІЕФК) розділення речовин відбувається за участі як електричного поля, так і градієнта рН. Цей метод використовується, в основному, для розділення білків, які різняться за значеннями ізоелектричної точки, тобто величиною рН, при якому молекула стає електронейтральною і не рухається в електричному полі.

При використанні ІЕФК необхідно повністю загальмувати ЕОП для того, щоби зробити можливим утворення градієнта рН, інакше ЕОП швидко винесе розчин амфотера-носія, за допомогою якого створюється градієнт рН, із капіляра, що робить неможливим проведення ізоелектричного електрофокусування. Знижувати ЕОП можна декількома способами, зокрема модифікацією поверхні капіляра, додаванням високов'язкого полімеру, наприклад, метилцелюлози для підвищення буферного розчину.

У методі ІЕФК створення градієнта рН і електрофокусування речовин, зокрема білків, відбувається в одну стадію. Капіляр заповнюють розчином амфотераносія, який вже містить зразок, і катодний кінчик капіляра занурюють у розбавлений розчин NaOH, а анодний – в розбавлений розчин фосфорної кислоти. При поданні в електрофоретичний блок електричної напруги спочатку виникає відносно великий потік, оскільки амфотериносії ще рухаються до своєї

ізоелектричної точки і, тим самим, беруть участь у створенні загального потоку. Закінчення ізоелектричного фокусування характеризується падінням потоку до постійної невеликої величини.

Після того, як компоненти зразка будуть сфокусовані та розділені в капілярі, вони повинні бути детектовані. Для цього в капілярі вони приводяться в рух у напрямі до детектора шляхом створення різниці тиску або проводять сканування капіляра з розділеним зразком (див. вище). Як приклад розділення білків ІЕФК наведено на рис. 1.58.

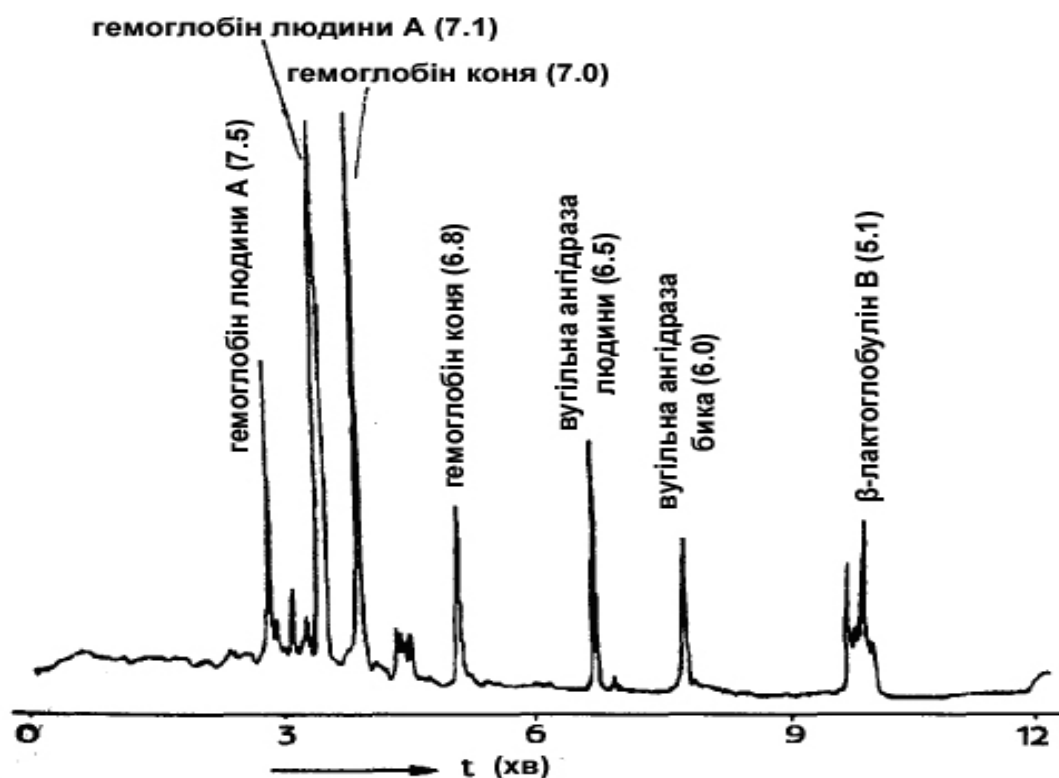


Рис. 1.58. Розділення деяких білків методом ІЕФ у капілярі

П р и м і т к и: 1 – гемоглобін С людини (ізоелектрична точка 7,5); 2 – гемоглобін А людини (7,1); 3 – міоглобін людини (7,0); 4 – міоглобін коня (6,8); 5 – ангідраза людини (6,5); 6 – ангідраза бика (6,0); 7 – β -лактоглобулін В (5,1).

Ізоахофоре́з у капіля́рах

У *методі ізоахофоре́зу в капіля́рах* (ІТФК) зразок вводиться між двома іонами з більшою і меншою електро-рухливістю (ведучим і замикаючим, відповідно), наслідком чого є створення зон із різною напруженістю електричного поля на їх межі, що спричинює концентрування іонів зразка.

У методі ІТФК концентрування іонів зразка відбувається безпосередньо в капілярі. В нього, який заповнений розділяючим розчином, вводиться коротка зона несучого розчину (електроліту), слідом за якою вводиться зразок, об'єм декілька мікролітрів). Концентрування проводиться в напрямі ведучого (з

найбільшою електрофоретичною рухливістю) іона, при цьому збагачення розведених компонентів зразка можливе до 100 разів.

Метод ІТФК, як і звичайний метод ІТФ, використовується, в основному, для концентрування розбавлених зразків, тому його застосовують, як правило, на стадії попереднього збагачення перед розділенням іншими методами капілярного електрофорезу.

Існує ще ряд капілярних електрофоретичних методів, зокрема, так звана, *електрохроматографія*, в якій поєднані методи високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з капілярним електрофорезом (КЕ). Теоретичні передрікання цього методу та деяких інших поки що не набули достатнього експериментального підтвердження.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Які основні правила роботи з кислотами та лугами, токсичними органічними речовинами?
2. Що необхідно враховувати при роботі з легкозаймистими речовинами?
3. Що являє собою перша допомога при травмах та отруєннях?
4. Охарактеризуйте основні типи титрування.
5. Що таке «відносна густина» та як вона визначається?
6. Які існують способи вираження концентрації розчинів?
7. Що таке «молярні розчини»?
8. Як розраховується титр розчину за його нормальністю?
9. Які хімічні реакції покладено в основу титриметричного аналізу?
10. У чому полягає суть реакції нейтралізації?
11. Яку масу сухого натрію гідроксиду необхідно зважити для приготування 150 см³ 2 н. розчину лугу?
12. На титрування 10 см³ розчину натрію гідроксиду пішло 15 см³ 0,1 н. розчину сульфатної кислоти. Чому дорівнює концентрація розчину NaOH?
13. Який індикатор можна використовувати при титруванні NaOH розчином HCl за відсутності розчиненого CO₂?
14. Назвіть робочі розчини в оксидиметрії.
15. Дайте характеристику методам осадження.
16. На чому ґрунтується комплексонометричний метод аналізу?
17. Вкажіть переваги та недоліки електрохімічних методів аналізу.
18. На чому засновані потенціометричні методи аналізу?
19. Яка залежність виражається рівнянням Нернста?
20. Які функції виконують індикаторні електроди, а які – електроди порівняння? Вкажіть вимоги, які до них пред'являються.
21. У чому суть потенціометричного визначення рН розчину? Які індикаторні електроди можуть бути використані для визначення рН?
22. Як влаштований скляний електрод? Вкажіть переваги та недоліки скляного електроду.

23. Які основні типи іоноселективних електродів? Як вони влаштовані? Які мають характеристики?
24. Вкажіть переваги, недоліки і сфери застосування методу прямої потенціометрії.
25. Які закономірності лежить в основі кондуктометричного аналізу?
26. Які одиниці використовуються в кондуктометричному аналізі?
27. Як практично визначають концентрацію методом прямої кондуктометрії? Чому використовується графічний метод?
28. Які види кондуктометрії використовуються в хімічному аналізі?
29. Який метод кількісного аналізу називається полярографією?
30. Який індикаторний електрод використовують в полярографії, охарактеризуйте його?
31. Які можливості полярографії при аналізі окремих речовин та їх сумішей?
32. Які оптичні методи відносяться до молекулярних абсорбційних методів?
33. Який закон зв'язує кількісне значення світлопоглинання із концентрацією поглинаючої речовини?
34. Назвіть основні вузли спектрофотометра.
35. Дайте визначення терміну «екстинція».
36. Вкажіть діапазон довжин хвиль для УФ та видимої областей спектра.
37. В яких координатах будують градувальник графік у фотометричних методах аналізу?
38. На яких явищах базується полум'яна спектрометрія?
39. Яка природа і походження атомних емісійних спектрів? Чому атомні спектри мають лінійчатий характер?
40. Які властивості атомів і іонів лежить в основі методу полум'яної спектрофотометрії?
41. На якому явищі базується рефрактометричний метод аналізу речовин?
42. На чому заснований атомно-абсорбційний аналіз: а) на реєстрації поглинення світла атомами речовини; б) на реєстрації світла, яке поглинули молекули речовини; в) на реєстрації світла, яке випромінюють збуджені молекули?
43. Які показники вимірюють за використання методу атомної абсорбції?
44. Які джерела збудження атомів використовують для атомно-абсорбційного визначення речовин?
45. Які горючі суміші використовуються для отримання полум'я в атомно-абсорбційному аналізі?
46. Перерахуйте основні вузли атомно-абсорбційного спектрофотометру.
47. На яких явищах базується емісійний спектрофотометричний аналіз?
48. У чому полягає істотна відмінність мас-спектрометрії від інших оптичних методів?
49. В чому суть хроматографічного розділення за методом: а) іонообмінної хроматографії; б) газорідинної хроматографії; в) розподільної рідинно-рідинної хроматографії; г) тонкошарової хроматографії?

50. Дайте визначення терміну «хроматографія».
51. Наведіть загальні принципи хроматографічного аналізу речовин.
52. Дайте визначення термінам «елюент», «елюювання», «елюат».
53. Що являє собою хроматограма? Основні її характеристики.
54. Дайте визначення понять «фактор ємності», «коефіцієнт розділення», «ефективний коефіцієнт розділення» в хроматографії, їх практичне використання.
55. Принцип ідентифікації речовин за стандартами (реперами).
56. В чому суть аналітичної і препаративної хроматографії?
57. Класифікація методів хроматографії за методикою дослідження і механізмом розділення.
58. Суть елюентного, фронтального і витискувального методів хроматографії.
59. Основні принципи і застосування газової і газорідинної хроматографії.
60. Схема будови аналітичних газового і газорідинного хроматографів (основні пристрої).
61. Тверді носії та нерухома фаза в газорідинних хроматографах.
62. Колонки в газових і газорідинних хроматографах.
63. Які сфери застосування, переваги і недоліки адсорбційної хроматографії?
64. Які вимоги пред'являються до адсорбентів і розчинників?
65. Які способи застосовують для визначення ефективності хроматографічних розділень?
66. Які сфери застосування, переваги і недоліки методів газової хроматографії?
67. Які вимоги пред'являються до рідкої фази в газорідинній хроматографії? Які речовини використовують як рідку фазу, як твердий носій?
68. Дайте визначення наступних понять: а) висота хроматографічного піку; б) ширина хроматографічного піку; в) утримуваний об'єм.
69. У чому суть методів кількісного аналізу: а) абсолютного калібрування; б) внутрішньої нормалізації (нормування); в) внутрішнього стандарту?
70. У чому суть іонообмінної хроматографії?
71. Які сфери застосування, переваги і недоліки а) тонкошарової хроматографії; б) осадової хроматографії; в) іонообмінної хроматографії?
72. Що покладено в основу хроматографічного розділення методом вискоефективної рідинної хроматографії?
73. Основні принципи і застосування типової рідинної хроматографії.
74. Схема будови типового рідинного хроматографа (основні пристрої).
75. Особливості будови і використання детекторів у рідинних хроматографах:
 - а) спектрометричний детектор;
 - б) рефрактометричний детектор.
76. Основний принцип і застосування рідинної хроматографії під високим тиском.

77. Схема будови рідинного хроматографа, де використовується високий тиск (основні пристрої).
78. Адсорбційна хроматографія: основні принципи і застосування.
79. Особливості тонкошарової адсорбційної хроматографії.
80. Визначення та використання фактора R_f у тонкошаровій хроматографії.
81. Роздільна хроматографія: основні принципи і застосування.
82. Особливості роздільної хроматографії на колонці.
83. Особливості розподільної хроматографії на папері (висхідна, низхідна і кругова).
84. Іонообмінна хроматографія: основні принципи і застосування.
85. Дайте визначення терміну «ізоелектрична точка».
86. За яких умов дія електричного поля урівноважується силою тертя молекул при їх русі в середовищі?
87. Як визначають відносну електрофоретичну рухливість молекул?
88. Фактори, які впливають на електрофоретичну рухливість електрозаряджених молекул при електрофорезі, визначте їх дію:
 - а) електричний заряд;
 - б) розміри молекул (молекулярна маса);
 - в) форма молекул;
 - г) сила електричного струму;
 - д) електрична напруга;
 - е) електричний опір.
92. Дайте характеристику буферам, які використовуються при електрофорезі:
 - а) за складом;
 - б) за іонною силою;
 - в) за величиною рН.
93. Як впливають на результати електрофорезу:
 - а) адсорбція;
 - б) електроосмос;
 - в) характер молекулярного сита при гель-електрофорезі.
94. Дайте загальну характеристику будови приладів для електрофорезу:
 - а) блоки живлення;
 - б) електрофоретичний блок;
95. Охарактеризуйте основний принцип горизонтального і вертикального електрофорезу на папері та пластинках, їх використання.
96. Охарактеризуйте основні етапи проведення електрофорезу:
 - а) насичення носія;
 - б) нанесення зразка;
 - в) процес розділення компонентів зразка;
 - г) вилучення носія;
 - д) ідентифікація розділених речовин при електрофорезі.
97. Особливості низько- і високовольтного електрофорезу.

98. Охарактеризуйте метод електрофорезу з рухомою межею (фронтальний електрофорез), його використання:
- а) звичайний електрофорез із рухомою межею;
 - б) електрофорез із рухомою межею в градієнті густини.
99. Дайте загальну характеристику методам зонального електрофорезу, їх використання.
100. Охарактеризуйте зональний електрофорез без підтримуючого середовища, його використання:
- а) із стабілізацією електрофоретичних зон обертання;
 - б) із стабілізацією електрофоретичних зон у тонкому шарі рідини (проточний електрофорез).
101. Дайте загальну характеристику зонального електрофорезу в градієнті густини, його використання.
102. Охарактеризуйте методи зонального електрофорезу в підтримуючому середовищі з дрібнопористою (капілярною структурою), їх використання.
103. Дайте загальну характеристику методу зонального електрофорезу на папері, його використання:
- а) звичайний електрофорез на папері;
 - б) неперервний (проточний) електрофорез на папері.
104. Дайте загальну характеристику методу зонального електрофорезу на плівках ацетату целюлози, його використання.
105. Дайте загальну характеристику методу зонального електрофорезу в тонких шарах, його використання.
106. Дайте загальну характеристику методу зонального електрофорезу в гранульованому підтримуючому середовищі, його використання:
- а) в блоках;
 - б) у колонках.
107. Дайте загальну характеристику методу зонального електрофорезу в агаровому і агарозному гелях, його використання.
108. Дайте загальну характеристику методу зонального електрофорезу в крохмальному гелі, його використання.
109. Дайте загальну характеристику методам зонального електрофорезу в поліакриламідному гелі, їх використання:
- а) приготування поліакриламідного гелю, його основні характеристики;
 - б) додецилсульфат-гель-електрофорез, його мета і особливості проведення;
 - в) електрофорез у градієнті концентрації поліакриламідного гелю;
 - г) диск-електрофорез у поліакриламідному гелі;
 - д) електрофорез у поліакриламідно-агарозному складовому гелі.
110. Дайте загальну характеристику методу ізоелектричного фокусування, його використання.
111. Методи створення градієнта рН при ізоелектричному фокусуванні:

- а) використання амфотерів-носіїв;
 - б) температурний градієнт;
 - в) допоміжний градієнт концентрації органічних речовин.
112. Основні види методу електрофоретичного фокусування:
- а) в градієнті густини у колонках;
 - б) у гелі;
 - в) у гранульованому середовищі;
 - г) у розчинах, які містять тільки амфотери-носії.
113. Дайте загальну характеристику методу ізотахофореzu, його використання.
114. Дайте загальну характеристику методу імунофореzu, його використання.
115. Охарактеризуйте основні види імунофореzu:
- а) електрофореz у гелі, який містить антитіла («ракетний» електрофореz);
 - б) двовимірний електрофореz;
 - в) радіальний і подвійно радіальний імунофореz;
 - г) використання антигенів-стандартів.
116. Дайте загальну характеристику методам електрофореzu в капілярах, їх використання.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Агасян П. К., Николаева Е. Р. Основы электрохимических методов анализа. Потенциометрический метод. М., 1986. 176 с.
2. Аналітичні методи досліджень. Спектроскопічні методи аналізу: теоретичні основи і методики: навч. посіб. / Д. О. Мельничук та ін.; за ред. Д. О. Мельничука. К.: ЦП «Компринт», 2016. 289 с.
3. Аналітичні методи досліджень. Хроматографічні та електрофоретичні методи аналізу: теоретичні основи і методики: навч. посіб. / В. М. Войцицький та ін. К.: ЦП «Компринт», 2017. 268 с.
4. Аналітична хімія / О. М. Гайдукевич та ін. Х.: «Основа», 2000. 358–368.
5. Біохімія тварин з основами фізичної і колоїдної хімії: підруч. / Томчук В. А. та ін. К.: НУБіП України, 2020. 447 с.
6. Ветеринарна клінічна біохімія: підруч. 2-ге вид., перероб. та доповн. / Левченко В. І. та ін. Біла Церква, 2019. 416 с.
7. Виноградова Р. П., Цудзевич Б. А., Храпунов С. Н. Физико-химические методы в биохимии. К.: Вища школа, 1983.
8. Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Электрофорез в разделении биологических макромолекул. М.: Мир, 1982.
9. Голицын В. М. Неденатурирующий электрофорез. Фракционирование фотосинтетических пигмент-белковых комплексов и белков плазмы крови. *Биохимия*. 1999. Т. 64. С. 64–70.
10. Дубініна А. А. Токсичні речовини у харчових продуктах та методи їх визначення / А. А. Дубініна, Л. П. Малюк, Г. А. Селютина та ін. – К.: Видавничий дім «Професіонал», 2007.
11. Кучеренко Н. Е., Бабенюк Ю. Д., Войцицкий В. М. Современные методы биохимических исследований. К.: Фитосоциоцентр, 2001. 424 с.
12. Лабораторна діагностика порушень обміну електролітів і кислотно-лужного стану: методичні вказівки для підготовки фахівців спеціальності «Ветеринарна медицина», ОКР «Магістр» з дисципліни «Клінічна біохімія» / Д. О. Мельничук та ін. К.: Вид. центр НАУ, 2008. 17 с.
13. Методи дослідження функціонального стану печінки та біліарної системи: навч. посібник для підготовки студентів вищих навчальних закладів: навч. посібник / Д. О. Мельничук та ін.; за ред. Д. О. Мельничука. К.: НУБіП України, 2015. 414 с.
14. Спеціальна біохімія: навч. посібник / С. Д. Мельничук та ін.; за ред. С. Д. Мельничука. К.: НУБіП України, 2014. 374 с.
15. Спеціальна біохімія: навч. посібник / С. Д. Мельничук та ін.; за ред. С. Д. Мельничука. К.: НУБіП України, 2015. 649 с.
16. Токсичні речовини у харчових продуктах та методи їх визначення: підруч. / А. А. Дубініна та ін. К.: «Видавничий дім «Професіонал», 2007. – 384 с.

17. Томчук В. А. Ветеринарна біохімія: навчальний посібник / В. А. Томчук, В. А. Грищенко, В. І. Цвіліховський. – К.: Прінтеко, 2021. 2-ге вид. – 552 с.
18. Чмиленко Ф. О., Деркач Т. М. Методи атомної спектроскопії: атомно-абсорбційний спектральний аналіз. Дн-ск: РВВ ДНУ, 2002. 120 с.
19. Tomchuk V. A. , Gryshchenko V. A., Tsvilikhovskyi V. I. Veterinary clinical biochemistry: textbook, Part 1. К.: ЦП «Компринт», 2016. 268 с.
20. Tomchuk V. A., Gryshchenko V. A., Tsvilikhovskyi V. I. Veterinary clinical biochemistry: textbook, Part 2. К.: НУБіП України, 2017. 390 с.

РОЗДІЛ 2. ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА ПОРУШЕНЬ МЕТАБОЛІЗМУ ПРИ ПАТОЛОГІЇ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ

Основні питання: 1. Вплив патологічних чинників на структурну організацію клітинних мембран; 2. Біохімічний профіль крові за різних фізіологічних станів; 3. Ензимодіагностика; 4. Лабораторна діагностика порушень біохімічних процесів за патології внутрішніх органів та їхніх систем; 5. Біохімічні механізми імунної відповіді, діагностика імунodefіциту в новонароджених тварин; 6. Біохімічні аналізатори в лабораторній діагностиці; 7. Експериментальне моделювання патологій внутрішніх органів.

Тема 2.1. Структурна організація клітинної мембрани та її модифікація під дією патологічних чинників

Мембранні структури клітин живого організму піддаються впливу патологічних чинників зовнішнього і внутрішнього середовищ. Взаємодія уражаючого агента з поверхнею плазмолемі клітин запускає каскад взаємопов'язаних біохімічних процесів, які протікають як на мембрані, так і всередині клітин.

Інтенсивність відновлення внутрішньоклітинного гомеостазу при розвитку патології суттєво залежить від тривалості дії патогенного чинника й адаптаційних можливостей організму, що в значній мірі визначається ступенем ураження клітинних мембран. Результати клінічних і експериментальних досліджень доводять ключову роль ліпідного бішару мембран у розвитку тяжких захворювань печінки, їхніх рецидивів та ускладнень. Основними структурно-функціональними компонентами ліпідного бішару клітин, як відомо, є фосфоліпіди. Репаративна, мембрано стабілізуюча та протекторна дії фосфоліпідів досягаються завдяки мітогенстимулювальній активності цих сполук, безпосереднього їхнього вбудовування у фосфоліпідну структуру мембран пошкоджених клітин, заміщення дефектів і відновлення бар'єрної функції їх ліпідного бішару. Отже, функціонування зовнішніх клітинних мембранних систем залежить від цілісності їхніх фосфоліпідних структур. Водночас повноцінність метаболічних процесів у клітинах та їхнє порушення при розвитку патології визначається структурно-функціональним станом мембранних систем.

Біологічні мембрани – надмолекулярні інтегруючі системи, які формують клітини та їхнє внутрішньоклітинне середовище, а також забезпечують вияв усіх найважливіших функцій клітини: 1) *бар'єрної* – селективний і регулюючий обмін речовин із навколишнім середовищем; 2) *міжклітинних контактів* – морфогенез тканинних систем, спрямована міграція клітин у процесі росту й розвитку, забезпечення інтеграції між зовнішньо- та внутрішньо-клітинним середовищем; 3) *матричної* – взаєморозташування та орієнтація мембранних білків, їхня оптимальна взаємодія; 4) *ферментативної* – певні мембранні білки є ферментами; 5) *рецепторної* – сприйняття хімічних і фізичних чинників; 6)

енергетичної – синтез аденозинтрифосфорної кислоти (АТФ) при участі внутрішньої мембрани мітохондрій; 7) *генерації та проведення біопотенціалів*; 8) *механічної* – міцність та автономність клітин, внутрішньоклітинних структур.

Біологічні мембрани побудовані за єдиним принципом: вони складаються з ліпідного бішару, в якому інтегрально й фіксовано до їх поверхні розташовані білкові молекули (рис. 2.1).

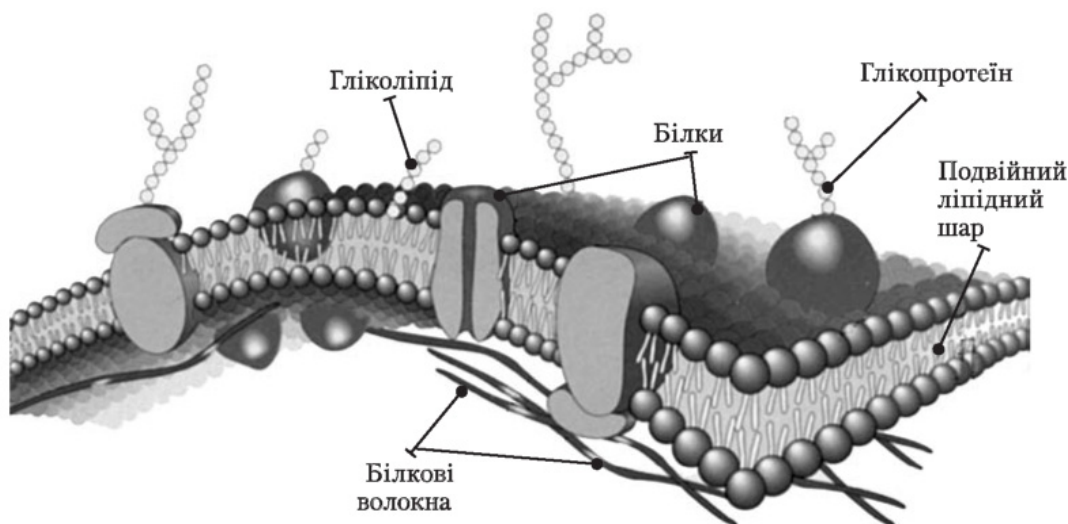


Рис. 2.1. Молекулярна організація біомембран

Особливістю структурної організації молекул ліпідів, які входять до складу плазматичних мембран – фосфоліпідів (ФЛ) і гліколіпідів, є наявність у них гідрофільної “голівки”, утвореної залишками фосфату, естерифікованого полярними або зарядженими групами, та гідрофобних “хвостів”, які є ацилами насичених і ненасичених жирних кислот (ЖК). У структурі біомембран молекули ФЛ звернені одна до одної гідрофобними жирнокислотними “хвостами”, а з оточуючим водним середовищем контактують полярними гідрофільними “голівками” (рис. 2.2).

Життєво важливими компонентами усіх клітинних і субклітинних мембран є ФЛ, які забезпечують нормальну структуру мембран і численні функції клітини. Так, наприклад, мембрани клітин печінки на 65 % складаються з ФЛ, серед яких 80–90 % припадає на фосфатидилхолін (ФХ), фосфатидилетаноламін (ФЕ), фосфатидилсерин (ФС) та сфінгомієлін (СМ).

До складу біомембран також входить холестерол (ХС), який виконує важливу функцію модифікатора фізико-хімічних властивостей ліпідного бішару, стабілізуючи його шляхом обмеження рухомості внутрішньомембранних компонентів, тобто зменшуючи плинність і збільшуючи в'язкість мембранних ліпідів. При цьому зовнішня плазматична мембрана характеризується значним вмістом вільного ХС і його естерів, а також наявністю гліколіпідів, які відсутні в інших мембранних структурах.

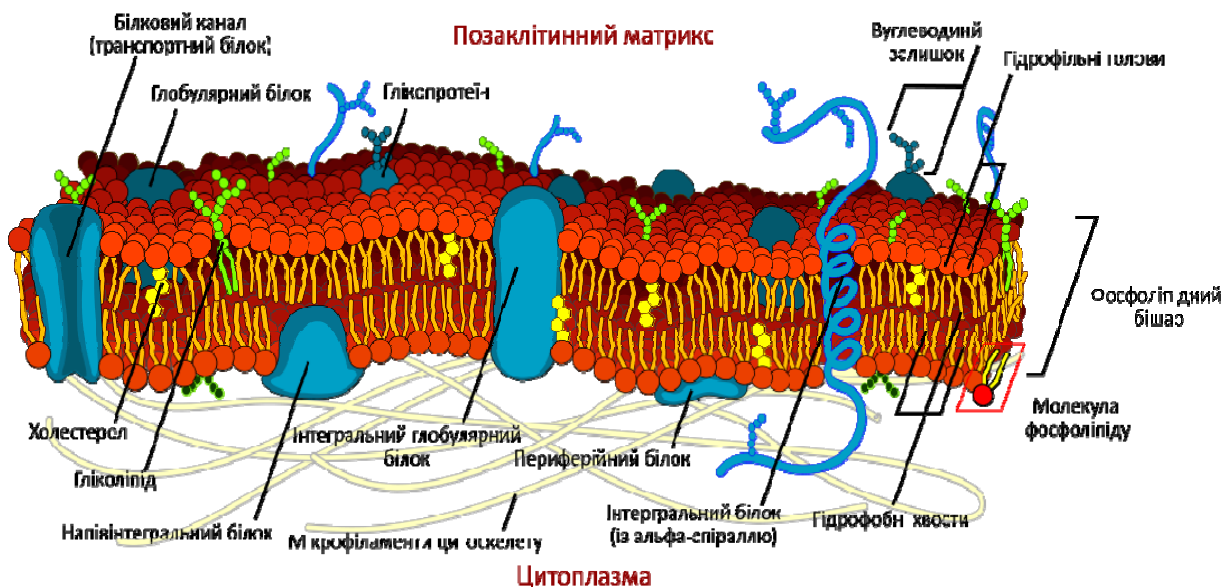


Рис. 2.2. Схема молекулярної організації плазматичної мембрани

До головних компонентів біологічних мембран належать білки (понад 50 %). Серед них розрізняють поверхневі й внутрішні. Поверхневі білки (приблизно 30 % від усіх білків мембран) розміщені на зовнішній або внутрішній поверхні мембран і зв'язані з її матриксом електростатично – безпосередньо або через двовалентні метали, в основному Mg^{2+} і Ca^{2+} . Внутрішні (інтегральні) білки (приблизно 70 % від усіх білків мембран) на різну глибину занурені в подвійний ліпідний шар, іноді “прошивають” його наскрізь, з'єднуючи обидві поверхні мембрани.

Поверхневі (зовнішні) білки функціонують як рецептори для значної кількості біологічно активних субстратів, таких як нейромедіатори, пептиди, гормони, антигени та антитіла. До інтегральних (трансмембранних) білків належать білки іонних каналів і рецепторні. Частина мембранних білків здатна вільно переміщуватися у фосфоліпідному бішарі, але здебільшого вони фіксовані в певних місцях у площині мембрани. Для мембран різних органел характерний неоднаковий білковий склад. Чим більше функцій виконує мембрана, тим більше “специфічних” білків входить до її складу. Більшість білків мембран набувають біологічної активності завдяки контакту з ФЛ. Життєва необхідність у ФЛ для активації мембранних білків доведена експериментально.

Таким чином, ліпідний бішар визначає основні структурні особливості біологічних мембран, тоді як білки відповідальні за більшість мембранних функцій.

Після видалення зв'язаних ФЛ методом екстракції ацетоном або під дією фосфоліпаз активність мембранних білків можливо знову повністю відновити введенням ФЛ.

Отже, основна структура мембран клітин складається з фосфоліпід-білкових комплексів. Функціонування зовнішніх (клітинних) і внутрішніх (субклітинних) мембранних систем залежить від цілісності їхніх фосфоліпідних

структур. Усі метаболічні процеси в клітинах мають відбуватися за участю цих мембранних систем.

Ліпідний бішар практично непроникний для більшості полярних водорозчинних молекул, оскільки внутрішня частина його гідрофобна. Завдяки такому бар'єру запобігається втрата водорозчинного вмісту клітини. Різні речовини мають неоднакову здатність проникати через цей бар'єр. Транспорт речовин крізь мембрани відбувається згідно з правилами пасивної та полегшеної дифузії з проміжним переносником, активного транспорту і шляхом екзо- чи ендоцитозу.

Ліпідний бішар – незмінний структурний і функціональний елемент будь-якої мембрани. Він виконує такі основні функції, як бар'єрну та структурну (матричну).

Функції фосфоліпідів мембран:

1. *Фосфоліпіди* необхідні для диференціації, проліферації та регенерації біологічних мембран. Цілісність мембранних систем є важливою умовою для нормального здійснення численних клітинних функцій. Пошкодження тканини завжди пов'язано з ураженням мембран;

2. *Фосфоліпіди* забезпечують біологічну активність більшості зв'язаних з мембранами білків і рецепторів;

3. *Фосфоліпіди* мають вирішальну роль в активації багатьох ферментів, зв'язаних з мембранами;

4. *Фосфоліпіди* регулюють численні метаболічні процеси між внутрішньоклітинним і міжклітинним простором;

5. *Фосфоліпіди* мембран важливі для синтезу ейкозаноїдів: основні простагландини утворюються з таких попередників, як ейкозатриєнова або ейкозатетраєнова і арахідонова кислоти. Ці попередники наявні у клітині як компоненти ліпідів мембран. Всі вони утворюються з есенційної лінолевої кислоти. Деякі простагландини розглядаються як цитопротектори;

6. *Фосфоліпіди* необхідні для забезпечення нормального жовчного току;

7. *Фосфоліпіди* є структурними та функціональними елементами ліпопротеїнів;

8. *Фосфоліпіди* визначають агрегацію еритроцитів і тромбоцитів;

9. *Фосфоліпіди* впливають на імунні реакції на клітинному рівні.

В основі необоротного ураження клітин лежить порушення функцій плазматичної та внутрішньоклітинних мембран. Реакція клітин на пошкоджуючий вплив несприятливих факторів майже стереотипна: різко збільшується проникність мембран, знижується потенціал спокою на мембрані, у клітину надходять іони кальцію, а виходять іони Натрію, збільшується об'єм мітохондрій і вони втрачають здатність синтезувати основний носій енергії – аденозинтрифосфору кислоту (АТФ).

Зміна бар'єрних властивостей мембран, тобто різке підвищення їхньої проникності, разом зі зміною в'язкості та властивостей поверхні ліпідного прошарку (зміна матричних властивостей білків), безперечно порушує роботу мембранних структур, дезорганізує життєдіяльність клітини і сприяє розвитку захворювань організму.

Тема 2.2. Вплив фізіологічного стану тварин на біохімічні показники крові

Основними об'єктами клініко-біохімічних досліджень є *біологічні рідини організму*: кров, плазма, сироватка, лімфа, рідше – інші рідини внутрішніх середовищ організму (спинномозкова рідина, внутрішньосуглобна рідина та ін.); використовуються також *екскрети*, такі як сеча, жовч, слина, шлунковий та кишковий сік, кал, піт, молоко; шматочки тканин та органів (*біоптати*), взяті прижиттєво під час хірургічних операцій або за допомогою спеціальних пристосувань. Найчастіше матеріалом для клініко-лабораторних досліджень є кров і сеча, інші біологічні рідини.

Для правильного тлумачення результатів біохімічних досліджень слід враховувати такі принципи:

1. При дослідженні біохімічних показників у біологічних рідинах необхідно зважати на те, що кожний показник, який окремо визначається, відображає діяльність багатьох органів і тканин, а також функцію, що притаманна відповідній рідині, – транспортну, метаболічну, гомеостатичну (кров, сеча), екскреторну (сеча, жовч) тощо.

2. Усі процеси життєдіяльності можуть змінюватися під впливом зовнішніх чинників (корму, зміни часу доби, пори року або сонячної активності). Деякі параметри характеризуються значним діапазоном коливань, що необхідно враховувати при трактуванні результатів і порівнянні даних, отриманих у різні періоди відповідного ритму. Ці чинники набувають певного значення останнім часом завдяки розвиткові нового напрямку в лікуванні захворювань – *хронотерапії*.

3. Біохімічний склад біорідин та його зміни під впливом чинників довкілля зазнають індивідуальних коливань у різних тварин, відображаючи вплив генетичних особливостей, статі, віку, типу нервової діяльності, характеру годівлі, умов утримання тощо.

Ці фактори необхідно обов'язково враховувати при трактуванні результатів біохімічних досліджень для запобігання помилковим діагностичним рішенням.

4. При вирішенні питання про *відхилення біохімічного параметру від норми*, коли виконується індивідуальне обстеження тварини, правильніше орієнтуватися не на *середні показники*, одержані шляхом обстеження певної кількості умовно здорових особин, а на *референтні (довідкові) показники*, отримані з урахуванням вищезгаданих факторів. При проведенні наукових досліджень, визначені впливу лікувальних заходів, фармакологічних препаратів та ін., доцільно створювати контрольну групу із умовно здорових тварин і спиратися на показники, одержані при їх обстеженні та оброблені за допомогою методів статистичного аналізу. Але при цьому слід пам'ятати, що значення цих показників не повинні виходити за межі референтної норми.

5. Для отримання результатів біохімічного аналізу, які б достовірно відображали зміни в організмі, необхідно забезпечувати суворе дотримання правил забору проб біоматеріалу, належні умови його зберігання і

транспортування до лабораторії. Виконання цих правил повністю залежить від клінічного персоналу і має перебувати під постійним контролем лікаря.

6. Трактуючи результати біохімічних досліджень, необхідно враховувати: умови, в яких перебуває тварина перед взяттям проби біоматеріалу, зокрема ступінь фізичної активності, положення тіла (стоячи, лежачи); інші діагностичні дослідження (введення контрастних матеріалів; проведення навантажуючих проб, деякі види пальпації, накладання джгута і т. п.); лікувальні заходи (лікарське, фізіотерапевтичне, хірургічне лікування).

Діагностичне значення результату біохімічного дослідження залежить від ступеня зв'язку досліджуваного параметра з патологічним процесом. Оскільки більшість біохімічних параметрів відображає вплив не одного, а декількох чинників, більшу частину змінених показників при біохімічних дослідженнях треба розглядати з позицій імовірного, багатофакторного підходу, а діагностичну цінність цих відхилень від норми для кожного виду патології розраховувати на підставі математичного аналізу значної кількості підтверджених випадків захворювання. При цьому слід враховувати величини діагностичної чутливості, специфічності, ефективності лабораторних тестів.

7. Результати біохімічних досліджень є лише часткою відомостей про стан тварини, яка обстежується. Зважаючи на високу варіабельність фізіологічних і патологічних процесів, у *клінічній діагностиці* здебільшого *не можна спиратися тільки на дані біохімічного дослідження*. Проте тісний зв'язок біохімічних параметрів з найбільш важливими процесами метаболізму дозволяє в ряді випадків виявляти біохімічними методами ранні та приховані форми патології, що може істотно розширити можливості ранньої діагностики діабету, порушень обміну ліпідів, подагри, гіперпаратиреоїдизму і особливо спадкової патології.

Слід пам'ятати: не можна ставити діагноз лише на підставі даних лабораторних досліджень. Необхідно враховувати дані анамнезу та результати попереднього обстеження хворої тварини, тобто дотримуватися клініко-біохімічних паралелей.

Важливе значення в одержанні правильних результатів має здійснення діагностичною лабораторією контролю якості процесу їх отримання. Він має три етапи:

- 1) доаналітичний;
- 2) аналітичний;
- 3) постаналітичний.

Доаналітичний етап включає правильний забір матеріалу, транспортування, реєстрування, зберігання і т. ін.

Різноманітність біохімічних досліджень вимагає раціональної тактики їх проведення і виконання другого, **аналітичного** етапу контролю якості процесу отримання результатів, до якого входять контроль відтворюваності та контроль правильності. Вони виконуються з використанням спеціальних контрольних сироваток.

Контроль відтворюваності дозволяє оцінити точність виконання, а контроль правильності – уникати систематичних помилок і контролювати правильність одержаних результатів.

Третій, **постаналітичний** етап контролю якості передбачає дотримання правил реєстрування даних досліджень у спеціальному журналі, оформлення аналізів, наведення в ньому показників референтної норми тощо.

Правила забору проб біорідин

Час. З огляду на циркадний ритм змінюваності вмісту в крові багатьох речовин доцільно брати пробу біорідини в один і той же час – вранці й натще. Кров рекомендовано відбирати вранці (між 7- і 8-ою год), до фізичного навантаження й діагностичних процедур. Для виконання більшості тестів взяття крові проводять після 8–12 год голодування, а визначення триацилгліцеролів – витримати 10–12-год інтервал після вживання корму.



Голка для взяття крові повинна мати кінчик з коротким скосом, щоб запобігти пораненню протилежної стінки вени.

Венозний стаз. Час утворення стазу у венах має бути мінімальним. Вена має скоріше прощупуватись, ніж бути видимою. При заборі крові шляхом венепункції час здавлювання судин джгутом по можливості має бути мінімальним, оскільки стискування судини спричиняє місцевий стаз і гіпоксію, а також зсув у розподілі деяких речовин (холестеролу, калію, натрію, кальцію та ін.) між форменими елементами крові та її рідкою частиною. Довгий стаз підвищує вміст загального білка та його фракцій, Кальцію, Калію, лактату, пірувату й інших компонентів.

Антикоагулянти. Кількість взятої крові має відповідати кількості антикоагулянту, з яким кров необхідно обережно змішати. Антикоагулянт не повинен містити речовину, яка досліджується, та компонентів реагенту, які будуть використані в наступному дослідженні. При заборі крові для визначення Кальцію слід користуватися не оксалатом і етилендіамінтетраацетатом (ЕДТА), які утворюють нерозчинні або неіонізуючі солі кальцію, а солями Літію або гепарином (проте останні не можна використовувати, наприклад, при визначенні кількості гетерополісахаридів у сироватці крові). Для запобігання гемолізу, кров необхідно брати сухим шприцем, сухою голкою (одноразового використання), у хімічно чисту і суху пробірку. Якщо набрана шприцем кров

переноситься в пробірку, то цю процедуру здійснюють повільно (для запобігання спінювання крові).

Вид біоматеріалу. Більшість біохімічних аналізів можна виконувати з використанням як плазми, так і сироватки, але в деяких випадках тип біоматеріалу має значення. Наприклад, для електрофорезу білків необхідна сироватка, а для визначення активності реніну – плазма. При заборі крові слід запобігати гемолізу, і якщо хворій тварині проводиться внутрішньовенна терапія, то кров для аналізу слід брати далі від місця вливання, щоб запобігти контамінації лікарським засобом.

Кров для аналізу збирають як у скляні, так і в пластикові ємкості, але іноді переважним або навіть необхідним є тільки один із цих матеріалів.

Цілісна кров з антикоагулянтом використовується для дослідження речовин, що рівномірно розподілені між еритроцитами й плазмою (сечовина, глюкоза та ін.). У разі лізису еритроцитів, зосереджених у згустку, до сироватки крові потрапляють ензими, які в них локалізовані. Цим пояснюється, наприклад, більш висока активність ензимів (лактатдегідрогенази, аланін- і аспартатамінотрансферази, фруктозодифосфатальдолази, кислої та лужної фосфатази, аргінази, фосфогексоізомерази та інших ензимів, які містяться в значних кількостях у тромбоцитах та еритроцитах і вивільняються з них при згортанні крові) у сироватці, ніж у плазмі крові. Тому для оцінки активності перелічених ферментів рекомендується користуватися плазмою. Крім того, наслідком гемолізу може бути активація процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) сироватки, що також впливатиме на біохімічні показники. Плазму отримують після додавання до крові відповідних антикоагулянтів, але необхідно враховувати їхній вплив на окремі показники (табл. 2.1).

Пробірки з кров'ю дозволяється витримувати при кімнатній температурі (20–26 °C) упродовж 1,0–1,5 год після взяття. Згусток відділяють від стінки пробірки пластиковою паличкою.

Об'єм отриманої сироватки становить приблизно 1/3 взятого об'єму крові (при деяких патологічних станах сироватки може бути значно менше). Сироватку бажано використовувати для лабораторних досліджень у день взяття крові. Для зберігання до наступного дня, пробірку закривають пробкою і ставлять у холодильник, при температурі 4 °C (якщо це дозволяє відповідний метод).

Гемолізовані сироватку і плазму не рекомендується використовувати для аналізу, за винятком деяких випадків.

Консервація і зберігання. Зниження вмісту глюкози в крові, яке відбувається дуже швидко (не довше 2 год) унаслідок гліколізу, можна запобігти додаванням фториду; сироватку для визначення ферментів слід відділяти від згустка не пізніше як через 1–2 год і зберігати при глибокому охолодженні. Тривале зберігання крові без відділення від еритроцитів може спричинити підвищення вмісту калію, креатинфосфату (КФ), активності амінотрансфераз, лактатдегідрогенази (ЛДГ), сорбітолдегідрогенази (СД) та інших ензимів.

Таблиця 2.1. Розчини антикоагулянтів і протипоказання до їх застосування у лабораторній практиці

Антикоагулянт	Приготування розчинів та їх використання	Лабораторні тести, визначенню яких заважає антикоагулянт
Натрію оксалат $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$	300 мг натрію оксалату розчиняють у 20 cm^3 дистильованої води. Використовують 0,1 cm^3 розчину на 2 cm^3 крові. Для стабілізації крові при приготуванні плазми без фактора згортання I і для приготування баріевосульфатної плазми використовують 0,1 М/дм ³ розчину (13,4 г/дм ³) натрію оксалату. Додають із розрахунку 0,1 cm^3 на 1 cm^3 крові.	Електроліти (К, Na, Са), лужна фосфатаза, α -амілаза, рН крові
Амонію оксалат $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Розчин (10 г/дм ³) готують на дистильованій воді, кип'ятять, фільтрують, зберігають при t 4 °С.	Аміак, лужна фосфатаза, α -амілаза, рН крові
Тринатрію цитрат $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Зазвичай використовують водний розчин концентрації 38 г/дм ³ (з урахуванням наважки кристалізаційної води). Зберігають у скляній пляшці з притертим корком, краще в холодильнику при t 4 °С. Поновлюють кожні 10–14 діб. 1 об'єм розчину натрію цитрату додають до 9 об'ємів крові.	α -Амілаза крові
Цитратно-глюкозна суміш (для дослідження процесів в еритроцитах та активності кислої фосфатази)	4,7 г цитринової кислоти, 16 г тризаміщеного натрію цитрату, 25 г глюкози розчиняють у 1000 cm^3 (бі)дистильованої води. Беруть 1 частину розчину на 4 частини крові. (Співвідношення можуть бути зменшені відповідно в 10 або іншу кількість разів.	Електроліти, глюкоза

Етилендіамін-тетраацетат або його динатрієва сіль: ЕДТА-натрій (селектон Б, хелатон, версен, трилон Б)	300 мг натрію етилендіамінтетраацетату (динатрієва сіль, дигідрат) розчиняють у 20 см ³ (бі) дистильованої води. Якщо ЕДТА розчиняється повільно можна додати луги (рН = 8,4...8,6), а потім шляхом внесення кислоти відновити попередню нейтральну реакцію розчину. На 2 см ³ крові беруть 0,1 см ³ розчину, що містить 1,5 мг антикоагулянту. Припускається всипати ЕДТА в пробірку з розрахунку 1 мг порошку на 1 см ³ крові. ЕДТА-натрій на відміну від інших антикоагулянтів не порушує морфологічну структуру еритроцитів. Зв'язуючи іони металів змінної валентності, ЕДТА запобігає ПОЛ	Електроліти (К, Na, Ca), залишковий нітроген
Гепарин (з активністю 1000 од. в 1 см ³)	0,01 см ³ беруть на 5 см ³ крові або краплю гепарину – на весь об'єм пробірки	-
Натрію гепаринат або калію гепаринат	60 мг гепаринату розчиняють у 20 см ³ (бі)дистильованої води. Беруть 0,1 см ³ розчину на 2 см ³ крові	Електроліти (К, Na)
Літію гепаринат	Так само	Лужна фосфатаза
Амонію гепаринат	– // –	Аміак

П р и м і т к а. Натрію або калію оксалат іноді вносять у пробірку на кінчику скальпеля (приблизно 0,01 г).

Вплив різних лікувальних маніпуляцій з хворими та лікарських препаратів на результати біохімічних досліджень. Накладання джгута, дія ліків та інші чинники обумовлюють зміни біохімічних показників, тому що впливають на функції певних органів і систем. Наприклад, холінергічні засоби змінюють концентрацію білірубину в крові. Відзначається також взаємодія метаболітів з реактивами в процесі лабораторного дослідження. Так, хлоралгідрат збільшує вміст нітрогену сечовини, реагуючи з реактивом Несслера.

Вплив інших діагностичних процедур. На результати біохімічних досліджень впливає більшість діагностичних процедур, що також необхідно

враховувати, трактуючи результати того чи іншого аналізу. Так, введення контрастних засобів для рентгенологічних досліджень змінює результати таких аналізів, як ниркові проби, білірубін крові, бромсульфалеїнова проба, білок крові, електрофореграма білкових фракцій та ін.

Загальні тактичні принципи клінічної біохімії

1. Лабораторні тести, призначені тварині, яка обстежується, мають бути відповідними до основної клінічної мети обстеження:

а) виявлення відхилення від норми, яке раніше не спостерігалось (профілактичне обстеження);

б) постановка діагнозу, тобто розпізнавання захворювання (діагностичне, здебільшого диференційно-діагностичне обстеження);

в) оцінка ефективності лікувальних заходів (контроль за лікуванням);

г) оцінка ступеня одужання та відновлення порушених хворобою функцій (прогностичне обстеження, диспансерне спостереження). Визначається набір, комбінація і частота тестів.

2. Пошук патології, яка раніше не спостерігалася, можна проводити як «всліпу», за широким колом тестів, так і спрямовано, за вузьким набором тестів. Найбільш раціональним є цілеспрямований пошук. Набув поширення недетермінований, так званий «вступний скринінг», тобто проведення кожному пацієнтові стандартного набору біохімічних тестів.

3. Перевага віддається виконанню особливого діагностичного комплексу, так званим *біохімічним констеляціям*. До складу констеляцій слід добирати тести, які відповідають завданням діагностики певного захворювання і його диференціації від інших форм патології відповідно до найвищих значень діагностичної чутливості, специфічності та ефективності лабораторних тестів стосовно даного захворювання.

4. Ще вищою формою раціоналізації лабораторної діагностики є диференційні діагностичні програми, до яких включають декілька констеляцій, застосовуючи їх поетапно. Констеляція першого етапу має орієнтовний характер; залежно від її результатів надалі включається одна з альтернативних констеляцій другого (якщо потрібно, і третього) етапу, яка дозволяє отримувати найповнішу діагностичну інформацію про форму патології.

5. Лабораторне тестування треба призначати з урахуванням їхньої діагностичної цінності на різних стадіях хвороби (прихований перебіг, гостра фаза, криз) і можливостей спостереження за станом хворого.

6. Тести з навантаженням (функціональні та фармакологічні проби) дають більшу можливість виявляти приховані чи явні зміни біохімічних параметрів, резервні можливості систем, ніж дослідження в стані спокою. Призначати ці тести необхідно з урахуванням стану хворого й можливих негативних ефектів проби.

7. При біохімічному контролі за результатами певного виду лікування слід передбачати можливі впливи інших лікувальних дій або діагностичних заходів.

8. Найбільш інформативними вважаються констеляції, що дозволяють здійснювати синдромну оцінку стану тієї чи іншої системи або органу, робити

«біопсію без біопсії», тобто визначати зміни структури й функцій системи або органу.

Наприклад, діагностуючи хвороби печінки, виділяють синдроми: цитолітичний, паренхімально-запальний, холестатичний, печінкової недостатності та ін. Кожному з цих синдромів відповідає специфічна біохімічна констеляція, тобто добір біохімічних тестів.

Метаболічний профіль показників крові за різного фізіологічного стану тварин

На сучасному рівні ветеринарної медицини уявлення про клінічні, фізіологічні і патологічні показники при захворюваннях недостатні. Необхідні результати біохімічних досліджень, що може допомогти в розробці тестів ранньої діагностики і перевірки ефективності терапії.

Дослідження вмісту біохімічних компонентів у крові, інших біологічних рідинах, тканинах здорових тварин і їх змін при захворюваннях, дозволяє за допомогою лабораторних досліджень проводити своєчасну діагностику (при відсутності клінічного прояву) хвороби та контролювати повноцінність раціону. При зміні біохімічних показників на ранніх стадіях порушень, їх вдається повернути до норми за допомогою збалансованої годівлі.

Хімічний склад крові тварин

Кров складається з плазми і формених елементів. Як правило, визначають концентрацію конкретного компоненту в плазмі або сироватці, а не в цілісній крові.

Протеїни плазми крові тварин займають найбільший відсоток (60–80 г/дм³). Концентрація інших речовин у багато разів менша. Визначення загального вмісту протеїнових фракцій в плазмі, сироватці крові *має діагностичне, терапевтичне і прогностичне значення*. Такі білки, як альбуміни, глобуліни і фібриноген у плазмі знаходяться в максимальних кількостях. За допомогою електрофорезу білки сироватки крові розділяються на фракції: альбуміни, альфа-, бета- і гамма-глобуліни.

Альбуміни створюють колоїдно-осмотичний тиск крові, забезпечуючи рівновагу води і електролітів між плазмою і тканинами, зберігають необхідний об'єм крові для нормальної циркуляції. Альбуміни забезпечують транспортування аніонів, переносять розчинні проміжні продукти обміну від однієї тканини до іншої. *Глобуліни* транспортують ліпіди, естрогени, каротиноїди, стероїди, жиророзчинні вітаміни, естерази, неполярні жирні кислоти, йод, цинк, мідь, залізо, лікарські речовини. В крові присутні антитіла у вигляді гамма-глобулінів. Кількість гамма-глобулінів у сироватці крові збільшується при імунізації тварин та при інфекціях. У плазмі є протіни, які містять метали (гемокупреїн, трансферин, глобулін зв'язаний з йодом), а також ензими – фосфатаза, холінестераза, амілаза, оксидази, дегідрази, протромбін та інші. *Протромбін* – специфічний ензим плазми, який є показником згортання крові. За допомогою сироваткової *холінестерази* визначають функціональний стан печінки. При захворюваннях паренхіми печінки порушується синтез

холінестерази і зменшується її активність. Важливе значення має визначення активності лужної фосфатази. Її активність у сироватці (плазмі) підвищується при захворюваннях кісток, що супроводжуються проліферацією остеобластів, у молодняка тварин – при рахіті. Підвищення активності лужної фосфатази виявляється задовго до прояву клінічних ознак захворювання.

При дослідженні хімічного складу крові широко застосовують визначення залишкового азоту. Він складається з азоту сечовини, сечової кислоти, алантоїну, креатиніну, аміаку, амінокислот і деяких інших речовин. Цей показник характеризує функціональний стан нирок, серця і серцево-судинної системи, а також інтенсивність катаболічних процесів у тканинах.

До складу плазми (сироватки) входять *вуглеводи*: глюкоза, фруктоза, гексозаміни, пентози, глікоген. У крові присутні *продукти проміжного обміну вуглеводів*: лактат, піруват, ацетат, цитрат та інші кислоти. Глюкоза – основна енергетична речовина в організмі, що має важливе значення для характеристики обміну вуглеводів. У плазмі крові протеїни утворюють комплекси з такими речовинами, як холестерол, жирні кислоти, фосфатази, аденокортикостероїди, каротини, а також із вітамінами А, Д і Е.

В плазмі знаходяться *мінеральні сполуки*: NaCl, KCl, MgCl₂, NaHCO₃, CaCO₃, K₂HPO₄, NaH₂PO₄, Na₂SO₄, Cu₃(PO₄)₂ та інші. Лужні солі і лужноземельні метали створюють сприятливу для організму величину осмотичного тиску. *Мікроелементи*: (залізо, йод, мідь, цинк, кобальт) містяться в плазмі в дуже малих кількостях, але значення мають велике. Вони входять до складу ензимів, складних протеїнів, забезпечуючи їх активність і специфічну роль в обміні речовин. *Пігменти* (білівердин, білірубін, ліпохром, лютеїн) також входять до складу плазми крові. Білівердин і білірубін є продуктами розпаду гемоглобіну, тому збільшення їх концентрації в крові свідчить про патологію печінки і крові. *Концентрація хімічних компонентів в крові змінюється в залежності від фізіологічного стану тварин, їх годівлі, утриманні та віку.*

Фактори, що впливають на показники крові

Продуктивність. У високопродуктивних корів в сироватці крові рівень загального протеїну і залишкового азоту вище, ніж у менш продуктивних. Так, у корів з середньорічним надоєм 8000 кг рівень білка в середньому складає 8,27 г%, тоді як у корів з надоєм 4000 кг – 7,58 г%; у високопродуктивних корів рівень залишкового азоту в сироватці крові у перший період лактації досягає в середньому 54,04 мг%, у середньопродуктивних 43,48 мг%. Причиною цього є активація обміну протеїнів у високопродуктивних тварин. В крові високопродуктивних курей міститься більше фосфоліпідів і холестеролу, зв'язаного з глобулінами, вище активність лужної фосфатази.

Фізіологічний стан тварини. У корів у процесі лактації змінюється в сироватці крові вміст альбумінів і глобулінів. Максимальний рівень глобулінів спостерігається у перший період лактації. З глобулінових фракцій найбільш

виражена залежність між величиною надоїв і динамікою фракції альфа-глобулінів.

Кожний лактаційний період у корів характеризується різними рівнями глюкози і глікогену в крові. Так, глюкоза в крові корів у перший період лактації складає 71,10–75,35 %, а в третій період 66,20–67,37 %. Є зворотна залежність між вмістом глікогену в печінці корів і їх молочною продуктивністю: чим вище молочна продуктивність, тим менше запас глікогену. В період тільності у лактуючих корів глікогенні запаси печінки збільшуються: чим вище термін тільності, тим більше в ній відкладається глікогену.

В процесі лактації змінюється активність ензимів. Активність каталази крові високопродуктивних корів найбільша у період лактації. В протилежність каталазної активності, пероксидазна активність крові найбільш низька у перший період лактації, а в другий і третій – вона поступово підвищується.

Рівень протеолітичних ензимів і ліполітична активність крові лактуючих корів найбільш високі в перший період лактації. Найбільша активність ліпази і протеази визначена у період сухостою. Активність аспартатамінотрансферази найнижча у сухостійних корів у стійловий період, а найвища – у лактуючих корів у пасовищний період. У великої рогатої худоби в процесі лактації вміст у крові кальцій-білкових комплексів зменшується. Після нового отелу корів у сироватці крові знижується рівень загального протеїну, головним чином за рахунок гамма-глобулінової фракції, в результаті чого можуть знижуватися захисні функції організму.

Годівля і утримання. Довгочасне згодовування великій рогатій худобі концентратів викликає помітні зміни протеїнового спектра сироватки крові. Вміст кальцію, неорганічного фосфору і каротину зменшується при неповноцінній годівлі. Встановлено що у телят (до місячного віку), яких утримують на підсосі, рівень загального протеїну, глобулінів і, особливо гамма-глобулінів, у сироватці крові вище, ніж у телят, яким молоко випоюють. При випоюванні новонародженим телятам молока кальцій, фосфор і магній засвоюються краще, ніж у період їх годівлі рослинними кормами.

Умови утримання. Наприклад, вигульне утримання птиці, порівняно з клітковим, стимулює накопичення в організмі кальцію. У сироватці крові курей кліткового утримання виявлена вища активність лужної фосфатази, внаслідок напруженого стану фосфорно-кальцієвого обміну. Це є ранньою діагностичною ознакою порушення мінерального обміну.

Віковий фактор. З віком у тварин змінюється вміст низки біохімічних компонентів крові і тканин. Особливо значні зміни в обміні речовин і вмісті біохімічних сполук у крові доводиться на період інтенсивного росту – перші шість місяців життя тварин. Новонароджені тварини значно відрізняються за параметрами більшості біохімічних показників від молодняка старшого віку і дорослих тварин. У багатьох новонароджених телят до отримання перших порцій молозива, в сироватці крові методом електрофорезу не виявляється гамма-глобулінова фракція. У телят першого місяця життя вміст гамма-глобулінів збільшується майже вдвічі порівняно з їх вмістом у перші доби життя.

Породність. Низка біохімічних показників у крові змінюється в залежності від породи тварин. У шведських корів (молочно-м'ясних порід) показник вуглеводів зв'язаних із сироватковими білками вище, ніж у тварин холмогорської і чорно-рябої породи.

Свині, у яких в сироватці крові міститься глобулінів більше, ніж альбумінів, є більш скороспілими.

Сезонність. Весною у крові корів знижений рівень протеїну, цукру, Кальцію, каротину, вітаміну А, та резервна лужність, тоді як активність лужної фосфатази і концентрація сечовини підвищені. Сезонні зміни обміну речовин, особливо зимою і весною, найбільш виражені при незадовільній годівлі. Влітку, при пасовищному утриманні, у сироватці крові тварин збільшується вміст каротину, кальцію, глютаміну, гексоз, зв'язаних із протеїном та резервна лужність, знижується концентрація сечовини, кетонів тіл і активність лужної фосфатази.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Дати визначення ветеринарної біохімії
2. Основні об'єкти клініко-біохімічних досліджень?
3. Рекомендації щодо забору крові.
4. Які умови для зберігання крові?
5. Назвати основні принципи біохімічних досліджень.
6. Для яких біохімічних досліджень використовують нативну кров?
7. Назвати антикоагулянти, які використовують у лабораторній практиці?

Тема 2.3. Ензимодіагностика хвороб тварин

Ензими – це специфічні протеїни, що виконують в організмі роль біологічних каталізаторів. Загальна кількість відомих видів ензимів наближається до 10000. До цього числа входять не тільки ензими, які каталізують 2000–3000 реакцій обміну, але також й ензими, залучені в процеси дихання, м'язового скорочення, згортання крові, транспортування речовин, знешкодження токсичних і чужорідних сполук, нейротрансмісії.

Майже всі ензими функціонують усередині тих клітин, в яких відбувається їх біосинтез. Винятком є ензими травного тракту, а також деякі ензими плазми крові, зокрема ті, які беруть участь у процесі згортання крові. У табл. 2.2 підсумовано дані про локалізацію деяких найважливіших ензимів та їх участь в окремих стадіях метаболічних шляхів у різних субклітинних структурах. Наявність визначених ензимів у внутрішньоклітинних ділянках (компартаментах) обумовлює функціонування в них метаболічних шляхів – перетворення одних метаболітів на інші. Знання локалізації ензимів в органелах клітини дуже важливе для діагностики багатьох захворювань, оскільки дозволяє з великою точністю визначити осередок ушкодження і в ряді випадків його розміри.

Таблиця 2.2. Внутрішньоклітинна топографія розміщення ензимів

Цитозоль	Мітохондрії	Лізосоми
Ензими гліколізу Ензими пентозофосфатного шунта Ензими активації амінокислот Мультиензимний комплекс синтезу жирних кислот Ензими катаболізму пуринових і піримідинових основ Пептидази Амінотрансферази Малатдегідрогеназа Ізоцитратдегідрогеназа (НАД-залежна) Глікогенфосфорилаза Глікогенсинтетаза	Піруватдегідрогеназний комплекс Цитратсинтетаза Ізоцитратдегідрогеназа (НАД-залежна) Малатдегідрогеназа та ін. ензими циклу Кребса Ацил-КоА-дегідрогеназа та інші ферменти окиснення жирних кислот Ензими дихального ланцюга та окиснювального фосфорилювання	Кисла фосфатаза β-глюкуронідаза α-глюкозидаза β-глюкозидаза Катепсини Кисла рибонуклеаза α-галактозидаза Лізоцим Гіалуронідаза Арилсульфатаза Колагеназа
Мікросомна фракція	Плазматична мембрана	Ядро
НАДН- і НАДФН- цитохром С-редуктази, цитохром P₄₅₀- і цитохром b₅-оксидази, глюкозо-6-фосфатази, естерази, нуклеозиддифосфатази, глюкуронілтрансферази, фосфогліцерид- і тріацилгліцеридсинтетази, - глюкуронідазиβ Глюкозо-6-фосфатаза	Аденілатциклаза Лужна фосфатаза Na⁺-K⁺-залежна АТФаза	Ензими, які беруть участь у процесі реплікації ДНК РНК-полімераза НАД-синтетаза

Рибосомні ензими синтезу білка		
Ензими, які беруть участь у реакціях гідроксилування		
Ензими синтезу фосфоліпідів, тригліцеридів, а також деякі ензими синтезу холестеролу		
Ендоплазматичний ретикулум	Комплекс Гольджі	
Глюкозо-6-фосфатаза	Галактозилтрансфераза	

Відповідно, ферментний склад різних клітин різний. Більшість ензимів зустрічається в багатьох органах і тканинах (лактатдегідрогеназа (ЛДГ), амінотрансферази та ін.) – *неспецифічні*. Однак існують ензими, які активні лише в одній або кількох тканинах і практично відсутні в інших органах і тканинах. Так, ензим аргіназа який бере участь в утворенні сечовини, знаходиться лише в клітинах печінки, а кисла фосфатаза, що бере участь у гідролізі моно естерів ортофосфорної кислоти – у клітинах передміхурової залози. Це так звана *органоспецифічність* ензимів. Якщо говорити про вузькоспеціалізовані клітини, то ензими, які забезпечують їх функціонування, знаходиться в цих клітинах більше порівняно з іншими. Наприклад, у клітинах міокарда підвищена кількість креатинфосфокінази (КФК) і аспартатаміно-трансферази (АсАТ), у гепатоцитах – аланінамінотрансферази (АлАТ), в остеобластах – лужної фосфатази (ЛФ) тощо.

Нині методи визначення активності ензимів широко практикують у клініці з діагностичними, прогностичними й лікувальними цілями. Ці дослідження мають особливе значення при розпізнаванні інтоксикацій, інфарктів міокарда, діагностиці захворювань печінки, нирок, підшлункової залози, деяких видів злоякісних пухлин тощо.

Зміни ензимних реакцій, що відбуваються в організмі хворої тварини, є часто настільки характерними, що можуть слугувати підтвердженням клінічного діагнозу, а вивчення динаміки цих змін дає можливість стежити за ефективністю методів лікування і робити прогностичні висновки.

При багатьох патологічних станах спостерігаються істотні зміни не лише активності ензимів, але й співвідношення їх форм.

Ізоензими. Під множинними молекулярними формами ензимів розуміють низку форм одного і того ж ензиму, які каталізують одну і ту ж реакцію, але відрізняються за місцем локалізації в організмі, складом, а отже, і за деякими властивостями: швидкістю переміщення в електричному полі, оптимумом рН, імунологічними характеристиками тощо.

Група споріднених ензимів, які мають кілька форм одного і того ж ензиму з четвертинною структурною організацією і відмінних один від одного якісним і кількісним складом субодиниць, отримала назву ізоензимів. У залежності від кількості наявних поліпептидних субодиниць, а також від будови ензиму (димер, тетрамер, полімер) можлива різна кількість комбінацій поліпептидних ланцюгів або різна кількість ізоензимів. Властивості ізоензимів обумовлені властивостями субодиниць, які входять до їх складу.

Зазвичай органи характеризуються різним кількісним складом того чи іншого ізоензиму. Відмінності в будові поліпептидних ланцюгів та особливості поєднання цих ланцюгів у молекулі ізоензиму обумовлюють відмінності в його загальному електричному заряді що, у свою чергу, забезпечує різну електрофоретичну рухливість. Це дозволяє фракціонувати ізоензими за допомогою методу електрофорезу (рис. 2.3).

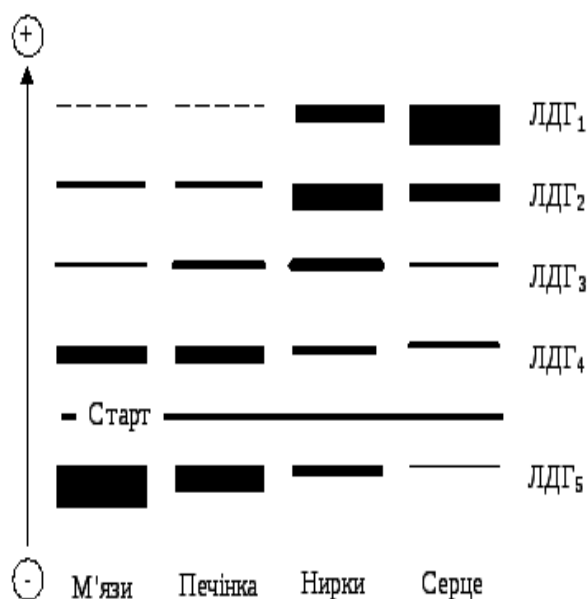


Рис. 2.3. Електрофореграма множинних форм ЛДГ

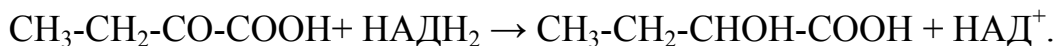
Нині ізоензими виявлені у понад 100 ензимів. Прикладом ізоензимів може слугувати ЛДГ – ензим, що каталізує утворення й окиснення молочної кислоти. За допомогою електрофореграми виявлено 5 його ізоформ (див. рис. 2.3).

Кожна ізоформа містить 4 субодиниці двох типів – «Н» (від англ. heart – серце) та «М» (від англ. muscle – м'яз) і складається з таких протомерів: ЛДГ₁ = Н₄; ЛДГ₂ = НН₃; ЛДГ₃ = М₂Н₂; ЛДГ₄ = М₃Н₁; ЛДГ₅ = М₄.

Для кожної тканини характерне своє співвідношення ізоформ. Так, ЛДГ₁ та ЛДГ₂ переважають в органах, які характеризуються аеробним метаболізмом – серці, мозку, нирках, підшлунковій залозі та еритроцитах; ЛДГ₃ – у легенях, селезінці, лімфатичних вузлах; ЛДГ₄ та ЛДГ₅ – в органах з активним анаеробним обміном – печінці та скелетних м'язах.

Субодиниці ЛДГ відрізняються за спорідненістю до субстратів. Субодиниця „М” краще каталізує перетворення піровиноградної кислоти до

молочної. Субодинаця „Н” є менш специфічною за своєю дією та каталізує взаємоперетворення α -кето- та α -гідроксимаєляної кислоти в реакції:



Це дозволяє відрізнити ізоензими, які складаються, переважно, з субодинаць „Н” (ЛДГ₁, ЛДГ₂) від ізоензиму, побудованого з „М”-субодинаць (ЛДГ₅) на підставі дослідження їх активності в реакції, яка визначається як реакція дегідрогенази α -гідроксимаєляної кислоти та відбувається за участю ЛДГ₁.

Вивчення ізоензимного спектра широко використовується в клініці для діагностики органічних і функціональних уражень органів і тканин, встановлення чіткої локалізації патологічного процесу. Так, розподіл ізоензимів ЛДГ у сироватці крові за умов норми має наступний вигляд: ЛДГ₂ > ЛДГ₁ > ЛДГ₃ > ЛДГ₄ > ЛДГ₅. При інфаркті міокарда ЛДГ₁ > ЛДГ₂ > ЛДГ₃ > ЛДГ₄ > ЛДГ₅ - помітна характерна зміна „розташування” ЛДГ₁ та ЛДГ₂: активність ЛДГ₁ переважає над активністю ЛДГ₂. При гемолітичній анемії ЛДГ₂ + ЛДГ₁ > ЛДГ₃ + ЛДГ₄ + ЛДГ₅, загальна активність ЛДГ при цьому в 2–5 разів перевищує норму. При мегалобластних анеміях активність перевищує норму в 10–50 разів. Для захворювань м’язів, печінки, утворення пухлин розподіл ізоформ має наступний вигляд: ЛДГ₄ = ЛДГ₅ > ЛДГ₂ > ЛДГ₁ > ЛДГ₃.

Крім ізоензимів лактатдегідрогенази важливе клінічне значення мають ізоензими креатинфосфокінази (КФК). Цей ензим є димером і побудований з двох основних субодинаць – В та М, із них утворюються три комбінації цих субодинаць і, як наслідок, три ізоензими КФК. У мозку переважає ізоформа ВВ, у скелетних м’язах – ММ, а у серцевому м’язі – ВМ.

Визначення активності ізоензиму МВ найчастіше використовують для підтвердження діагнозу інфаркту міокарда. Підвищену активність цієї ізоформи виявляють вже на 4–6 год після відчуття болю, пов’язаного з інфарктом, тоді як загальна активність КФК може значно зростати при будь-якому пошкодженні скелетних м’язів (метаболичні порушення, запалення, ішемія тощо). Зростання активності ВВ-ізоформи супроводжує пошкодження мозку (крововилив у мозок, церебральний емболізм), деякі ракові захворювання. Проте, воно не має великого діагностичного значення.

Участь ензимів у метаболізмі препаратів. Встановлено, що лікарські речовини, потрапляючи в організм, зазнають різномунітних метаболічних перетворень, що відбуваються в печінці, легенях, плаценті, слизовій оболонці кишечника та в інших органах. Проте основна роль у біотрансформації лікарських препаратів відводиться ензімам ендоплазматичного ретикулуму клітин печінки.

На активність ензимів, що беруть участь у метаболізмі лікарських препаратів і тим самим змінюють їх ефективність і токсичність, впливають багато зовнішніх факторів: світловий режим, температура середовища, радіація, режим годівлі або голодування, недостатність у кормах протеїнів, вітамінів та їх похідних, лікарські речовини.

Так, збільшення тривалості світлового дня знижує активність ензимів мітросомального окиснення в печінці, а вночі їхня активність зростає. Вплив на організм іонізуючого випромінювання знижує знешкоджувальну здатність монооксигеназного ланцюга окиснення лікарських препаратів у печінці. Такий же ефект викликає голодування і нестача в раціоні кормових протеїнів. При гіповітамінозах В₁ і В₂ також знижується гідроксильовання ксено-біотиків. Крім того, встановлено, що на ферментативні процеси метаболізму препаратів впливають інші лікарські засоби. Відомо понад 200 препаратів, що можуть індукувати ензими метаболізму лікарських речовин, насамперед мітросомальних. До них належать бутадіон (протизапальний), амідопирин (боле-заспокійливий), новокаїн (локально болезаспокійливий), етиловий спирт та ін.

Індуктором синтезу ензимів мітросомального окиснення в печінці є фенобарбітал. Він різко збільшує синтез цих ензимів, впливаючи на генетичний апарат гепатоцитів, що спричиняє активацію метаболізму природних сполук і ксенобіотиків. Крім того, фенобарбітал індукує синтез УДФ-глюкуронозил-трансфери – ензиму, який каталізує фазу кон'югації в метаболізмі різних речовин. Фенобарбітал у клінічній практиці застосовують при отруєннях для посилення метаболізму ендогенних речовин (наприклад, білірубину при фізіологічній жовтяниці новонароджених і при уроджених гіпербілірубінеміях).

Ензими плазми крові. Ензимний склад крові відносно сталий і має різноманітне походження. У сироватці крові виділяють три групи ензимів: клітинні, секреторні та екскреторні.

Клітинні ензими залежно від локалізації у тканинах поділяють на дві групи: одні каталізують неспецифічні (універсальні) реакції обміну речовин і містяться в більшості органів та тканин; інші – органоспецифічні, їх ще називають індикаторними або маркерними (наприклад, аргіназа в паренхімі печінки, КФК у м'язовій тканині). За умов норми їх концентрація в плазмі незначна, але ця група ензимів має суттєве клініко-діагностичне значення при патологічних процесах. Підвищення концентрації цих ензимів у плазмі пояснюється їх виходом із ушкоджених органів чи тканин на тлі продовження їх синтезу в цих тканинах, а також одночасним зростанням каталітичної активності деяких ензимів крові внаслідок припинення дії відповідних регуляторів (активаторів чи інгібіторів) ензиматичних процесів.

Секреторні ензими, іноді їх називають власне ензимами крові, синтезуються в печінці і звідти вивільняються в плазму, де виконують певні специфічні функції. Типовими представниками цієї групи є ензими, що беруть участь у зсіданні крові, церулоплазмін, який забезпечує транспорт купруму, сироваткова холінестераза тощо.

Інкреторні ферменти виділяються органами травної системи (шлунком, підшлунковою залозою, слизовою оболонкою кишок, ендотелієм жовчних шляхів). Появу цих ензимів (ЛФ, амілази, трипсину тощо) у сироватці крові пояснюють природним руйнуванням клітинних структур, а також підвищенням проникності мембран секреторних клітин.

Різниця активності певних ензимів у плазмі та клітинах тканин може бути значною і залежить від швидкості, з якою вони виходять з клітин, а також від

швидкості їх виведення з кровоплину. Так, активність амінотрансфераз в еритроцитах у кілька десятків разів перевищує активність цих ензимів у плазмі крові. Активність ЛДГ у клітинах скелетних м'язів у 1000 разів, а активність КФК – майже в 1000000 разів перевищує активність у плазмі крові. Виведення клітинних ензимів з кровоплину здійснюється шляхом їх поглинання та метаболізму, головним чином, у паренхіматозних органах. Ензимами як і білками, причому переважно високомолекулярні, підлягають клубочковій фільтрації в нирках і не виділяються з сечею, проте існують і певні винятки. Наприклад, амілаза, маючи малу молекулярну масу (менше 50000 Да) надходить у сечу в нативному стані. Порушення функціонування нирок і погіршення їх видільної функції може призвести до підвищення активності цього ензиму в плазмі крові.

Клініко-діагностичне значення дослідження ензимів

Майже всі ензими організму, за невеликим винятком, функціонують внутрішньоклітинно. Незначна їх кількість присутня в крові внаслідок нормального клітинного відновлення. При ушкодженні клітин, пов'язаному з різними захворюваннями, вивільняється велика кількість ензимів, їх концентрація в крові спочатку зростає, а потім поступово зменшується в результаті кліренсу (очищення).

Однак підвищення концентрації не завжди є результатом ушкодження тканин, можливі інші причини: посилене відновлення клітин; клітинна проліферація (наприклад, неоплазія); посилений синтез ензимів (індукція ензимів); знижений кліренс.

Про механізми видалення ензимів із кровообігу відомо небагато. Дрібні молекули (напр., амілаза) фільтруються в ниркових клубочках, але більшість ензимів, імовірно, виділяється клітинами ретикулоендотеліальної системи.

Визначення в сироватці крові активності ензимів з різною внутрішньоклітинною і органельною локалізацією (цитоплазматичних, мітохондріальних, лізосомальних, мембранних та ін.) дозволяє встановити ступінь ушкодження конкретного органа.

У сучасних клінічних лабораторіях проводять дослідження активності в крові переважно таких ензимів, як аспартатамінотрансфераза (АсАТ; ЕС 2.6.1.1), аланінамінотрансфераза (АлАТ; ЕС 2.6.1.2), глутаматдегідрогеназа (ГДГ; ЕС 1.4.1.2), лактатдегідрогеназа (ЛДГ; ЕС 1.1.1.27), креатинфосфокіназа (КФК; ЕС 2.7.3.2), лужна фосфатаза (ЛФ; ЕС 3.1.3.1), кисла фосфатаза (КФ; ЕС 3.1.3.2), альдолаза (АЛД; ЕС 4.1.2.13), холінестераза (ХЕ; ЕС 3.1.1.8), α -амілаза (АМ, ЕС 3.2.1.1), ліпаза (ЛП; ЕС 3.1.1.3), аланінамінопептидаза (ААП; ЕС 3.4.11.2), глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (Г-6-ФДГ, ЕС 1.1.1.49), γ -глутамілтранспептидаза (γ -ГТП; ЕС 2.3.2.2), аргіназа (Ар; ЕС 3.5.3.1), сорбітолдегідрогеназа (СД; ЕС 1.1.1.14), алкогольдегідрогеназа (АДГ; ЕС 1.1.1.1) та ін.

Для ензимодіагностики захворювань нирок досліджують активність таких ензимів: трансамідази (ТА; ЕС 2.1.4.1), лізоциму (ЛІЦ; ЕС 3.2.1.17), аланінамінопептидази (ААП; ЕС 3.4.11.2), лактатдегідрогенази (ЛДГ; ЕС 1.1.1.27), сукцинатдегідрогенази (СДГ; ЕС 1.3.5.1), ізоцитратдегідрогенази

(ІДГ; ЕС 1.1.1.42), лужної і кислій фосфатаз (ЛФ і КФ; відповідно ЕС 3.1.3.1 і 3.1.3.2), карбоангідрази (КА, ЕС 4.2.1.1), альдолази (АЛД; ЕС 4.1.2.13), глутамінази (ГЛА; ЕС 3.5.1.2), аргінази (Ар; ЕС 3.5.3.1), піруваткінази (ПК; ЕС 2.7.1.4), γ -глутамілтранспептидази (γ -ГТП; ЕС 2.3.2.2).

α -Амілаза. Для діагностики гострого панкреатиту, кісти підшлункової залози, закупорки її протоку пухлиною, каменем або спайками спостерігається підвищення активності α -амілази, яку визначають у сироватці крові й частіше у свіжій сечі. Крім того, у деяких випадках підвищення рівня α -амілази може бути наслідком ниркової недостатності, діабетичного ацидозу, запалення підшлункової залози на фоні перфорації пептичної виразки.

Зниження активності ензиму спостерігається з віком, гострому та хронічному гепатиті, недостатності підшлункової залози. При некрозі підшлункової залози спостерігається різке падіння активності ензиму.

Активність α -амілази в плазмі крові тварини піддається коливанням у залежності від вживання корму та часу доби. Через 2–3 год після вживання корму виявляється виражений підйом активності ензиму в крові та сечі. Найбільш низькі показники α -амілази спостерігаються вночі та натще.

Окреме місце серед ензимів, які використовуються для діагностики різних захворювань, відводиться аланінамінопептидазі (ААП).

Аланінамінопептидаза каталізує розриви пептидних зв'язків з $-\text{NH}_2$ вільного кінця, яким є аланін.

ААП присутня у всіх внутрішніх органах, однак у високих концентраціях вона міститься в корковій речовині нирок. ААП в організмі людини представлена п'ятьма ізоензимами: у печінці – ААП₁, підшлунковій залозі – ААП₂, нирках – ААП₃; ізоформи ААП₄ і ААП₅ є у різних відділах кишечника. Вони відрізняються електрофоретичною рухомістю.

Амінотрансферази. Широко практикується дослідження активності амінотрансфераз – ензимів, які каталізують міжмолекулярне перенесення аміногрупи з амінокислоти на α -кетокислоту і навпаки.

Переамінування відбувається з участю коферменту – фосфопіридоксалу (похідна вітаміну В₆). Важливе клініко-діагностичне значення має активність двох амінотрансфераз: аспартатамінотрансферази (АсАТ) і аланінамінотрансферази (АлАТ). Розходження в найменуванні амінотрансфераз обумовлені назвою тієї амінокислоти, від якої відокремлюється аміногрупа.

Цей ензим поширений в органах і тканинах тварини. Найбільший вміст АсАТ виявлено в серцевому м'язі, потім послідовно в зменшуваній кількості у печінці, скелетній мускулатурі, головному мозку, нирках і сім'яних залозах. Активність АсАТ у серцевому м'язі майже в 10000 разів вища, ніж у сироватці крові. В еритроцитах АсАТ у 10 разів більше, ніж у сироватці. Тому при визначенні активності амінотрансфераз остання не повинна мати навіть слідів гемолізу.

Ензим, що каталізує зворотне перенесення аміногрупи з аланіну на α -кетоглутарову кислоту, одержав назву аланінамінотрансфераза (АлАТ).

Найвища активність АлАТ виявляється в печінці, підшлунковій залозі, серці та скелетній мускулатурі. У печінці активність АлАТ у кілька тисяч разів вища, ніж у сироватці крові.

Активність амінотрансфераз у сироватці крові можна визначати за допомогою хроматографічних, спектрофотометричних і колориметричних методів.

Підвищення активності амінотрансфераз у сироватці крові відзначено при цілому ряді захворювань, особливо при ураженні органів і тканин, багатих на ензими, – печінки та міокарда.

Нерідко підвищення активності АсАТ передуює появі типових ознак інфаркту на електрокардіограмі. Вважають, що існує тісна кореляція між розмірами осередків некрозу й показниками активності АсАТ у сироватці крові.

Деякі дослідники наголошують на прогностичній цінності визначення активності АсАТ: якщо після 3–4-ої доби захворювання активність АсАТ у сироватці крові не знижується, то прогноз несприятливий.

При стенокардії активність АсАТ, як правило, залишається в межах норми. Тому диференційно-діагностичне значення мають і негативні результати проби, що дозволяють у сумнівних випадках з більшою впевненістю виключити інфаркт міокарда.

При захворюваннях печінки в першу чергу і значно порівняно з АсАТ змінюється активність АлАТ.

Підвищення активності АлАТ. Особливо різко зростає активність АлАТ у сироватці крові при інфекційному гепатиті. Вона фіксується вже в інкубаційному періоді захворювання, що має велике діагностичне значення. Підвищення активності АлАТ при гострому інфаркті міокарда не настільки різке порівняно зі зміною активності АсАТ. Тому одночасне визначення активності обох сироваткових амінотрансфераз є дуже цінним діагностичним тестом. У нормі співвідношення активностей АсАТ/АлАТ (коефіцієнт де Рітіса) дорівнює $1,33 \pm 0,42$. У хворих на інфекційний гепатит відбувається зниження величини коефіцієнта, а при гострому інфаркті міокарда вона, навпаки, різко зростає.

Активність АлАТ і АсАТ зростає у хворих, що отримували препарати із вмістом піридоксальфосфату.

Фосфатази. Одним із тестів, найбільш узвичаєних у біохімічних дослідженнях крові, є визначення активності лужної та кислої фосфатаз. Фосфатазами називають ензими, що каталізують відщеплення фосфорної кислоти від її органічних сполук. Фосфатази розділяють на фосфодіестерази I (лужна фосфатаза (ЛФ), оптимум рН = 8,6–10,1) і фосфомоноестерази II (кисла фосфатаза (КФ), оптимум рН = 4,6–6,2),

Лужна фосфатаза (ЛФ) міститься практично у всіх тканинах організму, крім немінералізованого шару суглобового хряща, насамперед у кістковій тканині, паренхімі та стінках жовчних проток печінки, проксимальних відділах звитих каналців нирок, передміхуровій залозі, лактуючій молочній залозі, клітинах слизової оболонки кишечника, плаценті. Особливо багато її в кістках, які ростуть (ензим міститься в мембранах остеобластів), жовчі та плаценті.

Локалізуючись у клітинній мембрані, ензим підключається до процесу транспортування біологічно важливих сполук.

Активність ЛФ виявлено в більшості біологічних рідин, включаючи сечу, екскременти, жовч, слину, молоко й лімфу. У плазмі крові новонароджених вона в 1,5–3,0 рази вища, ніж у крові дорослих, за рахунок кісткового ізоензиму.

ЛФ – гетерогенний ензим, що включає окремі ізоензими, кожен із яких зосереджений у певному органі.

В організмі тварини три гени кодують біосинтез ізоензимів: один – печінковий, кістковий і нирковий ізоензими, другий – кишковий ізоензим і третій – плацентарну ЛФ.

Вважають, що існує ще й четвертий ген, який кодує синтез зародкової ЛФ і локалізується в тонкій кишці плоду. Ще один ізоензим ЛФ визначено в жировій тканині.

У дорослих тварин у плазмі (сироватці) крові виявляється лише ЛФ печінкового походження. У новонароджених тварин у сироватці крові міститься значна кількість кісткової ЛФ; у невеликій кількості вона може зустрічатися до 6 місячного віку. Після закінчення формування скелету присутність цього ізоензиму в сироватці крові в значній кількості свідчить про наявність в організмі доброякісних чи злоякісних пухлин, а в невеликій – про наявність деструктивних змін у тканинах кістково-суглобової системи.

Відразу після годівлі тварин у сироватці крові виявляється кишкова ЛФ, кількість якої значно зростає при вживанні значної кількості жирів. У другій половині вагітності в сироватці крові з'являється ЛФ плацентарного походження. Останнім часом особливу увагу онкологів привертають ізоензими ЛФ, що використовуються як маркери онкологічних захворювань: плацентарний, плацентарноподібний. Їх можна знайти як у злоякісних пухлинах, так і в сироватці крові.

Отже, в діагностиці розрізняють печінкову, кісткову, кишкову, плацентарну, плацентарноподібну, холестатичну, ниркову ЛФ, ізоензим «Реган» (виявляється в 1/6 онкологічних хворих та 1/3 хворих з підвищенням активності ЛФ). Особливості ізоензимного складу ЛФ полягають у тому, що окремі її ізформи знаходяться в окремому, цілком визначеному органі (тоді як усі ізоензими лактатдегідрогенази можуть бути зосереджені в будь-якому органі, хоча й у різних співвідношеннях).

Підвищення активності ЛФ у сироватці крові не завжди дозволяє з достатнім ступенем вірогідності скласти уявлення про органотипову патологію. Активність ЛФ сироватки крові часто зростає при обструктивних захворюваннях печінки, холестазі, гепатиті, явищах гепатотоксичності, остеомалії, новоутвореннях печінки та кісток.

Кисла фосфатаза (КФ) представлена трьома різновидами ізоензимів — II, III і IV. КФ II виявляє оптимальну дію при $\text{pH} = 4,6$. Найбагатшим джерелом цього лізосомального ензиму є передміхурова залоза, фосфатазна активність якої приблизно в 1000 разів перевищує активність цього ензиму в кістковій тканині, печінці, селезінці, нирках і еритроцитах.

КФ III (оптимум активності при рН = 3,4–4,4) знаходиться в печінці та інших паренхіматозних органах, КФ IV (оптимум активності при рН = 5,2–6,2) – в еритроцитах і тромбоцитах.

Оскільки еритроцити містять помітні кількості КФ, гемолізовані зразки крові зовсім не придатні для діагностичного визначення

γ-Глутамілтранспептидаза (γ-ГТП). Значне підвищення активності спостерігається при захворюваннях печінки та внутрішньопечінкових жовчовивідних шляхів з явищами обтурації (обтураційна жовтяниця різного генезу, гепатити, пухлини печінки й метастази в печінку).

Помірне підвищення – при алкогольній інтоксикації та хронічній інтоксикації, гострому панкреатиті, ураженнях паренхіми нирок, отруєннях гепатотропними отрутами.

Креатинфосфокіназа. Фізіологічне підвищення активності креатинкінази (КФК) виявлено в сироватці крові: у новонароджених (невелике), у перші дні після родів, при фізичному навантаженні.

Значне підвищення – при інфаркті міокарда, дистрофії м'язів, травматичних ушкодженнях м'язів (роздробленнях), шоку й недостатності кровообігу.

Помірне підвищення – при інфаркті міокарда (дрібноосередковий), обмеженому ушкодженні скелетних м'язів, судомах, гіпотиреозі, розладах мозкового кровообігу, травмах мозку, гострому стресовому стані.

Диференційно-діагностичне значення визначення активності КФК можна підсилити розділенням ізоензимів. Так, виявлення МВ-ізоензиму свідчить про ураження міокарда, ВВ – головного мозку, а також гладеньких м'язів травного каналу і сечовидільного тракту. Ізофермент ВВ може помірно зростати при злоякісних новоутвореннях бронхів й молочної залози. Враховуючи більш широкий діапазон змін КФК–ВВ, можна сказати, що специфічність цього ензиму не така значна, як КФК–МВ.

Певне значення має визначення ізоензимного спектра при розмежуванні інсульту та інфаркту міокарда, інфаркту легені.

Лактатдегідрогеназа. Значне підвищення активності в сироватці крові встановлено при інфаркті міокарда, гострому вірусному гепатиті, анемії, лейкозах, гемолітичному стані, нефропатії, гострих масивних ураженнях скелетних м'язів.

Помірне підвищення – при хронічних ураженнях печінки, цирозах у стадії загострення, панкреатиті, пневмонії, інфаркті міокарда, інфаркті нирки, легень, мозку, злоякісних новоутвореннях, прогресуючій м'язовій дистрофії.

Будь-яка тканинна деструкція супроводжується збільшенням активності ЛДГ в сироватці, при цьому ступінь гіперензимемії залежить від глибини й поширеності процесу. Органна специфічність цього ензимного тесту значно зростає при визначенні ізоформ. Збільшення вмісту ЛДГ₁ має велике значення при діагностиці інфаркту міокарда, ЛДГ₂ та ЛДГ₃ – гострого лейкозу. ЛДГ₄ і ЛДГ₅ – паренхіматозного ураження печінки, ЛДГ₃ – ізоензим, активність якого зростає при багатьох злоякісних захворюваннях. Чітка й закономірна зміна ЛДГ₁ при інфаркті міокарда та ЛДГ₅ – при гепатитах забезпечує високу органну

специфічність цих ізоформ. Значної діагностичної цінності набуває визначення ізоензимного спектра ЛДГ при хронічних захворюваннях печінки – як критерій активності процесу. Так, вимірювання активності ЛДГ₄ і ЛДГ₅ виявилось надійнішим та інформативнішим показником у цих випадках, ніж визначення активності амінотрансфераз та інших ензимів.

Заслуговує на увагу дослідження ізоформ ЛДГ для оцінки вираженості структурних ушкоджень серцевого м'яза і печінки в групі захворювань з ураженням цих органів. Так, підвищення ЛДГ₄ і ЛДГ₅ у сироватці крові хворих на інфаркт міокарда, хронічну коронарну недостатність, міокардит свідчить про ступінь ураженості печінки («шокова» або «застійна» печінка), а збільшення ЛДГ₁ і ЛДГ₂ при гепатитах – про вираженість дистрофічних змін у міокарді.

Ліпаза. Значне підвищення її активності виникає при гострому панкреатиті (майже в 200 разів порівняно з нормою). Рекомендується визначати активність ліпази паралельно з амілазою при ураженнях підшлункової залози. Гіперліпаземія триває довше, ніж амілаземія, тому може вважатися більш інформативним критерієм ступеня одужання. Широко застосовується для оцінки функції підшлункової залози.

Помірне підвищення можливе при перфорації виразки шлунка, перитонітах, ентеритах, пухлинному процесі, отруєннях сильнодіючими препаратами.

Сорбітолдегідрогеназа. Значне підвищення СД спостерігається при гострому інфекційному гепатиті (у 5–10 разів порівняно з нормою).

Помірне підвищення – при токсичному гепатиті (лікарські гепатити, отруєння гепатотропними отрутами), загостреннях хронічного гепатиту, цирозі.

Визначення її активності має важливе діагностичне значення при розмежуванні паренхіматозної та механічної жовтяниць.

Низькі значення активності СД у сироватці крові трапляються в нормі і при неускладненій запальним процесом механічній жовтяниці. Різке збільшення активності ензиму при гострому гепатиті забезпечує цьому показникові високу надійність та інформативність порівняно з іншими ензимами, які при цьому застосовують (лужна фосфатаза, 5-нуклеотидаза).

Важливим є ще й той факт, що при інфаркті міокарда, захворюваннях нирок і скелетних м'язів рівень активності СД у сироватці крові практично не змінюється. Тому підвищення активності ензиму характерне переважно для ураження паренхіми печінки. Як ранній діагностичний критерій СД поступається АлАТ. СД найчастіше використовується з диференційно-діагностичною метою при захворюваннях гепатобіліарної системи.

Трансамідиназа. Значне підвищення активності викликають хронічний пієлонефрит у фазі порушення азотовидільної функції, хронічний нефрит у термінальній фазі, нефротичний синдром, зумовлений амілоїдозом нирок і тромбозом ниркових вен. Помірне підвищення – хронічний нефрит без порушення азотовидільної функції, залишкові явища гострого нефриту, панкреатит.

Одиниці активності ензимів. У біологічних об'єктах ензими знаходяться в дуже мізерних концентраціях, тому для оцінки ензимних процесів визначають

не їх вміст, що пов'язано з великими труднощами, а швидкість каталізованої реакції. Швидкість таких реакцій залежить як від активності, так і від кількості ензиму.

Дослідження проводять в умовах оптимальної температури (25 °C), pH середовища і повного насичення ензиму субстратом. Швидкість реакції оцінюють за кількістю розщепленого субстрату або за кількістю утвореного продукту реакції.

За міжнародну одиницю активності ензиму приймається та його кількість, що перетворює один мікромоль субстрату (мкмоль) за одну хвилину в стандартних умовах: при t 25 °C, атмосферному тиску 1013 гПа (МО = мкм/хв).

Новою міжнародною одиницею активності ензиму є катал (кат). Він відповідає кількості ензиму, що перетворює 1 моль субстрату в продукт за 1 с (кат = М/с). Відношення міжнародної одиниці (МО) до каталу виражається таким чином: $1 \text{ кат} = 1 \text{ М} \cdot \text{с}^{-1} = 60 \text{ М} \cdot \text{хв}^{-1} = 60 \cdot 10^6 \text{ мкм} \cdot \text{хв}^{-1} = 6 \cdot 10^7 \text{ МО}$; або $\text{МО} = 1 \text{ мкм} \cdot \text{хв}^{-1} = 1/60 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1} = 1/60 \text{ мкат} = 16,67 \text{ нкат}$.

Активність ензимів виражають також через питому і молекулярну активність. Питома активність ензиму виражається числом одиниць ензимної активності, що припадає на 1 мг білка. Чим вища питома активність, тим чистіший виділений ензим. Кількість молекул субстрату, що перетворюється однією молекулою ензиму за хвилину, називають сукупністю обертів, або молекулярною активністю ензиму. Наприклад, одна молекула каталази еритроцитів здатна розщепити за 1 хв $5 \cdot 10^6$ молекул перексиду гідрогену.

Ензимопатії

Загальні тактичні принципи діагностики ензимопатій:

- склад ензимів та їх тканинний розподіл у дорослої тварини зазвичай постійні і можуть змінюватися при хворобах;
- для кожної тканини (органа) характерний свій якісний та кількісний склад білків, що обумовлює функціональні особливості кожної тканини;
- метаболічні шляхи в різних тканинах дуже схожі, тому існує небагато тканинспецифічних ензимів (наприклад, орнітинкарбамоїл-трансфераза й гістидаза печінки);
- більш специфічним для тканин є співвідношення різних ензимів та ізоензимів.

Ензимопатії поділяють на *первинні* та *вторинні*. До першої групи належать спадкові захворювання обміну речовин, у патогенезі яких основну роль відіграє відсутність, нестача або аномальна структура ензиму. Краще вивчені та описані у гуманній медицині. Первинні, або спадкові, ензимопатії виникають унаслідок змін у генетичному коді синтезу ензимів. Причинами ензиматичних дефектів можуть бути: аномальна структура ДНК, порушення перенесення генетичного коду від ДНК до РНК, змінена структура РНК і порушення в передачі інформації від РНК до рибосом. Крім цього, причиною метаболічних розладів можуть бути генетично зумовлені порушення співвідношення природних активаторів та інгібіторів ензимів.

Причиною спадкових ензимопатій є мутації, що проявляються характерними змінами в активності відповідних ензимів. При цьому ензиматична активність відсутня або знижена, або (дуже рідко) підвищена. Можуть з'являтися патологічні ензими, які в нормі не трапляються.

Ензиматичні дефекти при спадкових ензимопатіях спричинюють порушення обміну речовин (метаболічний блок), що є причиною нагромадження невикористаного субстрату та його попередників, які, у випадку їх токсичності, призводять до патологічних змін і можуть викликати вторинний метаболічний блок. Так, при *галактоземії* (дефіцит галактозо-1-фосфатуридилтрансферази або галактокінази) відбувається накопичення в крові й тканинах галактозо-1-фосфату, вільної галактози та спирту дульциту – продукту відновлення галактози. Високий їх вміст діє токсично, у новонароджених після споживання молока спостерігають блювання та пронос, збільшується печінка, розвивається катаракта.

Друга група – це захворювання, при яких ензиматичні порушення виникають вторинно. вони розвиваються внаслідок пошкодження тканин різними агентами (вірусами, бактеріями, найпростішими, отрутами тощо). Розвиток набутих ензимопатій можна представити так: етіологічний фактор викликає порушення (пригнічення або стимуляцію) діяльності однієї або декількох ензиматичних систем і порушення відповідних обмінних процесів, у результаті чого виникає захворювання з характерними для нього симптомами. Так, інфекційні хвороби (вірусні, бактеріальні, паразитарні) супроводжуються тяжкими розладами функцій ензиматичних систем, насамперед, у результаті дії на них екзо- й ендотоксинів мікроорганізмів, які блокують синтез низки важливих ензимів або гальмують їх активність. Описаний патогенез характерний також для більшості отруєнь.

Прикладом вторинних ензимопатій є ендокринні захворювання. Гіпо- або гіперфункція певної ендокринної залози пов'язана зі зниженням або підвищенням синтезу відповідних гормонів, отже, з порушенням роботи ензиматичних систем, які ними регулюються. Так, при цукровому діабеті дефіцит інсуліну викликає пригнічення або стимулювання активності низки ензимів: блокується активність ензимів, які забезпечують окиснення глюкози й активуються ензими глюконеогенезу, ліполізу, метаболізму білків тощо.

Алергійні захворювання вважають індивідуальною вразливістю ензиматичних систем різними кормовими, лікарськими та іншими алергенами. Дія лікарських препаратів викликає ураження лізосомальних ензимів.

Механічне пошкодження тканин (хірургічні втручання, травми) також є типовою ензимопатією. Механічна травма порушує кровопостачання в пошкодженій ділянці, блокує надходження субстратів і коферментів, порушує оптимальні умови їх дії.

Порушення водно-мінерального обміну, кислотно-лужного стану, терморегуляції – це також ензимопатії, оскільки нормальний електролітний склад, рН і температура організму забезпечують оптимальні умови для функціонування всіх ензимів.

Гіпо- й авітамінози, нестача незамінних амінокислот, есенційних жирних кислот, макро- і мікроелементів у кормовому раціоні викликають порушення синтезу великої кількості ензимів, сприяючи цим самим розвитку езімопатій.

У патогенезі деяких захворювань відбувається не тільки гальмування ензиматичних систем, але й їх гіперактивація. Так, наприклад, для гострого панкреатиту характерні гіперпродукція та гіперактивація протеолітичних ензимів, що викликає тяжкі метаболічні розлади. Тому штучне блокування протеїназ їх інгібіторами (трасилолом, контрикалом) забезпечує при цій патології виражений терапевтичний ефект. При травмах легенів із легеневої тканини в кров'яне русло викидається значна кількість фібринокіназ, які викликають гострий фібриноліз.

Таким чином, ензімопатії лежать в основі всіх патологій ссавців. Тому тяжко уявити захворювання, яке б не супроводжувалося ензиматичними порушеннями.

Ензими як аналітичні реагенти. Ензими, які застосовують для діагностики, отримують із різних джерел: рослин, тварин, мікроорганізмів (здебільшого бактерій). Їх широко використовують у клінічних лабораторіях як аналітичні реагенти для визначення кількості субстрату, ідентифікації медпрепаратів, визначення активності інших ензимів. Ці можливості пов'язані з каталітичними властивостями ензимів та високою специфічністю до субстратів ка-талізованих ними реакцій (табл. 2.3).

Таблиця 2.3. Приклади використання ензимів в якості хімічних реактивів

Функція ензиму	Ензим	Досліджувана речовина
Визначення субстрату	Гексокіназа	Глюкоза
Визначення коензимів	Аспартатамінотрансфераза	Піридоксальфосфат
Визначення активаторів	Ізоцитратдегідрогеназа	Магній
Визначення інгібіторів	Лужна фосфатаза	Теофілін
Зменшення впливу інших речовин	Оксидаза аскорбінова	Креатинін
Спряжені реакції	Яблучна дегідрогеназа	Аспартатаміно-трансфераза
Посилення діючого сигналу	Луцифераза	НАДН
Імунологічні визначення	Лужна фосфатаза Пероксидаза хрому Дегідрогеназа глюкозо-6-фосфату	Тироксин Пролактин Фенитоїн

Перевагою цих методів є те, що відповідний субстрат для його визначення не потребує попереднього виділення та очищення, він може бути ідентифікований у сироватці крові або іншій біологічній рідині.

Питання для самоконтролю:

1. Яке значення ензимів для прикладної ветеринарії?
2. Локалізація ензимів у різних органелах клітини.
3. Особливості складу й розподілу ензимів в організмі тварини.
4. Застосування ензимів для діагностики та лікування захворювань.

Навести приклади.

5. Використання ензимів в якості аналітичних реактивів.
6. Міжнародні одиниці визначення активності ензимів.
7. Роль ізоензимів у діагностиці захворювань нирок.
8. Використання ізоензимів у діагностиці захворювань серцево-судинної системи.
9. Клініко-діагностичне значення ізоензимів при патології печінки.
10. Клініко-діагностичне значення визначення активності: α -амілази, амінотрансфераз, аланінамінопептидази, лужної та кислої фосфатаз.
11. Первинні та вторинні ензимопатії.
12. Ензими як аналітичні реагенти.

2.4. Лабораторна діагностика порушень біохімічних процесів у легенях і міокарді при хворобах респіраторної та серцево-судинної систем

Клініко-біохімічна характеристика патологічних процесів у легенях.

Структурна організація легень забезпечує основні газообмінні функції. Враховуючи анатомічні особливості легень, що мають значну площу поверхні дихальних шляхів і сполучаються із зовнішнім середовищем, важливо знати метаболічні процеси, що відбуваються в їхніх клітинах. Легені синтезують і секретують поверхнево-активні речовини (сурфактанти), які беруть участь у регуляції згортальної та протизгортальної систем, в обміні біологічно активних речовин та інших механізмах підтримання гомеостазу організму.

Енергетичні процеси в легеневій тканині. Для підтримання структурної й функціональної системи в легенях потрібна енергія, яка утворюється під час метаболізму речовин. Основним місцем її синтезу є мітохондрії, де, крім цього, відбувається й біосинтез нових сполук: лецитину, фосфогліцеролу, кардіоліпіну. Мітохондрії легень відрізняються від мітохондрій інших тканин ферментативною активністю та розподілом ферментів. Так, піруватфосфат-трансфераза (ЕС 2.7.1.40) у легенях знаходиться в мітохондріях (90 %), тоді як у печінці – в розчинній фракції цитоплазми (90–96 %).

У мітохондріях легень 60 % піридинових нуклеотидів представлені у формі НАДН, причому НАД відновлюється у 6–8 разів повільніше порівняно з печінкою, а α -гліцерофосфат і малат окиснюються у 5–10 разів швидше.

Енергетична система мітохондрій легень реагує на швидкість кровоплину в легеневій тканині та її наповнення повітрям. У разі повнішого заповнення повітрям легенів інтенсивніше відбувається гліколіз і утворюється більше АТФ. У разі низької швидкості кровоплину знижується енергозабезпечення клітин, а також синтез аденілових нуклеотидів. У випадку вираженої гіпоксії в легенях спостерігають зниження активності мітохондріальної супероксиддисмутази.

Мірою метаболічної активності може слугувати ступінь використання Оксигену, концентрація АТФ у легеневій тканині така сама, як і в інших тканинах. Легені синтезують від 57 до 174 мМ АТФ на 1 г тканини за 1 год.

Одним з основних чинників, що зумовлюють порушення біохімічних процесів у легеневій тканині у разі бронхолегеневих захворювань, є гіпоксія. Порушення кровоплину та лімфотоку до ушкоджених ділянок легенів спричинюють кисневе голодування та розвиток дихальної недостатності. Збільшення продукування легеневою тканиною лактату в разі нестачі Оксигену є результатом не тільки розщеплення глюкози, а й катаболізму амінокислот.

У разі виникнення гіпоксії в ізоферментному спектрі ЛДГ збільшується фракція ЛДГ₅. В ізоферментному спектрі МДГ (ЕС 1.1.1.37) також відбуваються значні зміни. У ЦТК посилюється окиснення яблучної кислоти, а також катаболізм амінокислот. Хронічна гіпоксія зумовлює ще більшу активність гліколізу та глікогенолізу; при цьому знижується концентрація АТФ. У відповідь генетичний апарат збільшує кількість мітохондрій для відновлення продукування АТФ.

Гіпоксичні стани спричинюють зміни не лише в легеневій тканині, а й в еритроцитах. Гіпоксія зумовлює дихальну недостатність I і II ступенів у хворих на пневмонію. Підвищення 2,3-ДФГ знижує активність глюкозо-6-фосфат-дегідрогенази (Г-6-ФДГ, ЕС 1.1.1.49), водночас збільшується активність карбонатгідратази (ЕС 4.2.1.1), що призводить до порушення транспорту O₂ еритроцитами. Подальша перебудова обмінних процесів у еритроцитах спричинює виникнення компенсаторних механізмів транспорту O₂.

Отже, у разі зміни або порушення газообміну, зумовленого патологічними процесами в легеневій тканині, відбувається перебудова окисно-відновних реакцій, активуються компенсаторно-приспосувальні механізми, спрямовані на відновлення синтезу макроергічних сполук, які необхідні для реакцій синтезу жирних кислот, фосфоліпідів – поверхнево-активних компонентів сурфактанту, а також інших глікопротеїдів і протеїнів – компонентів бронхіального секрету легенів.

Особливості метаболізму протеїнів у легенях. Легені перебувають в умовах постійного навантаження, що пов'язане як із силами протидії їх спаданню, так із чергуванням фаз вдиху та видиху. Виконання легеньми їхньої функції забезпечується завдяки значному вмісту в їхній структурі протеїнів – колагену та еластину. Порівняно з іншими паренхіматозними органами, кількість колагену в легенях найбільша. Ці протеїни забезпечують сталість форми легень і полегшують виконання ними газообмінної функції. При деяких хворобах – емфіземі й фіброзі легень – спостерігають зміну структури та властивостей цих протеїнів. Важливу роль у фізіологічних процесах легень відіграють протеїни, що входять до складу сурфактанту та бронхіального секрету.

Колаген – фібрилярний протеїн, локалізований на рибосомах, який утворює триспиральну молекулу – мономер з молекулярною масою 270000 Да, завдовжки 290 нм. Сполучення 5–8 мономерів утворює фібрилярну нитку.

Протеоглікани сприяють утворенню пучків колагенових фібрил і колагенових ниток. Виділено 5 типів легеневого колагену.

Еластин – фібрилярний протеїн стромы легень, який має два структурні компоненти – власний еластин і структурний глікопротеїн. Еластин характеризується наявністю значної кількості неполярних амінокислотних залишків таких як гліцин (близько 30 %), аланін (24 %), валін, фенілаланін, ізолейцин і лейцин. Структурний глікопротеїн містить у своєму складі багато вуглеводів і цистину, у ньому відсутні десмозини і оксипролін.

Концентрація еластину в легенях при емфіземі зменшується і перебуває в межах 9,0–9,9 %, тоді як у здорових тварин – 30–35 %, у молодняка в середньому 7,3 %. Підвищений розпад еластину спостерігають у разі порушення балансу в системі ензимів протеолізу та інгібування. Інгібітором протеаз є α_1 -антитрипсин. Особи, в яких відсутній ген, відповідальний за синтез α_1 -антитрипсину, належать до групи ризику захворювань легень з подальшим розвитком емфіземи.

Наступним протеїном – інгібітором протеїназ є α_2 -макроглобулін, який належить до α_2 -глобулінової фракції й інгібує активність усіх чотирьох каталітичних класів: серинових, тіолових, карбокси- та металопротеїназ. Біологічна роль α_2 -макроглобуліну полягає в регуляції функціонування системи комплементу, регуляції судинного тонуусу та реакцій запалення.

Зниження концентрації α_2 -макроглобуліну спостерігають при захворюваннях легень. α_2 -Макроглобулін із сироватки крові потрапляє в мокротиння внаслідок підвищеної проникності клітинної стінки. Отже, в розвитку легеневої патології має значення співвідношення протеаз та інгібіторів.

Роль протеогліканів і глікопротеїнів у легенях. Міжклітинна речовина сполучної тканини має гелеву консистенцію завдяки високому вмісту протеогліканів. Типова молекула протеоглікану складається з серцевинного поліпептидного ланцюга – кору, до якого з боків приєднуються глікозаміноглікани. Вуглеводна частина протеогліканів має негативний заряд, що визначає головну їх роль у регуляції водно-сольового обміну, а також має можливість вступати в комплекси з колагеновим протеїном та іонами Кальцію.

Гепарин – глікозаміноглікан, який синтезується базофілами сполучної тканини, виявляє антикоагулявальну дію, пригнічує згортання крові завдяки своїй властивості утворювати комплекси з багатьма протеїнами системи згортання крові. Концентрація гепарину в легенях досить висока, а його дія виявляється в основному в клітині.

Кератансульфат бере участь у формуванні каркасу легень, його кількість з віком збільшується, що призводить до зниження еластичності. До складу міжклітинної рідини входять і глікопротеїни, які містять до 15 % вуглеводних залишків. Вони малорозчинні, але мають високі антигенні властивості. До них належить фібронектин, який знаходиться в позаклітинній рідині на поверхні багатьох клітин. Розрізняють дві його форми – розчинну, яка циркулює в крові та інших біологічних рідин, і зв'язану з поверхнею клітин.

Ліпіди при легеневій патології. Дослідження ліпідів при захворюваннях органів дихання в основному спрямоване на вивчення ліпідів сурфактанту,

тканин легень, бронхоальвеолярних змивів і сироватки крові. Дослідження ліпідів сурфактанту має велике значення для встановлення ступеня зрілості цієї системи. Досліджено, що співвідношення фосфатидилхолін/сфінгомієлін дорівнює 2, концентрація фосфатидилхоліну становить 10 мкМ, а концентрація поверхнево-активних ліпідів 20 мкМ.

Легені містять набір ензимів для синтезу жирних кислот, триацилгліцеролів і холестеролу, у них також є ліполітичні ферменти: фосфоліпази, ліпопротеїдліпази, діацилгліцерол- і триацилгліцеролліпази. Ліпопротеїдліпаза в легенях перебуває у двох формах: розчинній і мембранозв'язаній. Вони різняться між собою оптимумом рН (7,5 і 9) й інгібуються протамінсульфатом. Фосфоліпазна активність у тканинах легень вища порівняно з печінкою. Фосфоліпаза A₂ перебуває в основному в розчинній і неактивній формі.

У легенях завдяки наявності ліпопротеїназ, триацилгліцероліпаз розщеплюються хіломікрони, а їх продукти використовуються в обмінних процесах. Таким чином, легені виконують роль буфера, який регулює вміст ліпідів у крові. Крім того, ліпіди необхідні для синтезу сурфактанту, який складається з холестеролу (8 %), моно-, ди-, і триацилгліцеролів (4 %), фосфатидилхоліну (66 %), фосфатидилетаноламіну (5 %), фосфатидилсерину (4 %), сфінгомієліну (1 %), вуглеводів (1 %), протеїну (9 %). Особливістю синтезу ліпідів у легеневій тканині є утворення ліпідів сурфактанту, особливо фосфоліпідів. Метаболізм інших ліпідів відбувається так само, як у інших органах.

У разі гіпоксії в легеневій тканині зменшується утилізація вільних жирних кислот, фосфатидилхоліну та фосфатидилетаноламіну, що призводить до накопичення жирних кислот у гіпоксичній легені та до зниження поверхневої активності сурфактанту. Низький парціальний тиск Оксигену зумовлює гіпоксію в легеневій тканині, що зумовлює зниження інтенсивності процесів трансметилування й ацетилювання та порушення синтезу фосфоліпідів.

Підвищення концентрації жирних кислот зумовлене зменшенням інтенсивності окисних процесів у циклі Кребса, накопиченням ацетил-КоА, інгібуванням β-окиснення в мітохондріях і активацією фосфоліпаз, що призводить до збільшення концентрації вільних жирних кислот і лізофосфатидів. Отже, в разі гіпоксії не тільки інгібуються обмінні процеси, продукування АТФ, а й відбувається ушкодження мембран та порушується функція клітин.

Обмін біологічно активних речовин. Основу недихальних функцій легень становлять специфічні метаболічні процеси, які дістали назву «ендогенного легеневого фільтра», або «легеневого бар'єра». Вони пов'язані з вибірковою інактивацією деяких біологічно активних речовин (БАР), до яких належать серотонін, катехоламіни, ацетилхолін, гістамін і вазоактивні пептиди, що відіграють важливу роль у біохімічних процесах легень.

Дослідження метаболічної функції легень при їх різноманітній патології дає змогу відокремити три типи метаболічних зсувів: перший пов'язаний з підвищенням концентрації БАР у тканинах, що супроводжується збільшенням активності ферментів, їх катаболізму. Цей тип виникає у разі гострих стресових

ситуацій; другий – зі збільшенням концентрації БАР, що супроводжується зниженням активності катаболічних процесів. Трапляється цей тип у разі тривалої гіпоксії та хронічних бронхолегеневих процесів. Третій тип характеризується дефіцитом БАР у легеневій тканині, що супроводжується пригніченням активності катаболічних ензимів. Його спостерігають у разі тривалого перебігу бронхоектатичної хвороби.

Фазовість змін метаболізму моноамінів та ацетилхоліну спостерігають при деяких патологічних станах. Гіпоксія супроводжується посиленням активності моноамінооксидази (МАО). Короткочасна ішемія органа зумовлює підвищення активності ензиму, й тривала – зменшення. Пригнічення окисного дезамінування зареєстровано у хворих на бронхоектатичну хворобу.

Отже, зниження активності МАО є однією з причин порушення метаболічної функції легень до серотоніну та норадреналіну і призводить до зростання їх концентрації в крові. Активність ацетилхолінестерази також змінюється при деяких патологічних станах, що істотно впливає на метаболізм ацетилхоліну. До таких станів належать ішемія легень, хронічний запальний бронхолегеневий процес, за якого активність цього ензиму різко знижується.

Вазоактивні пептиди. До них належать найбільш вивчені кініни: брадикінін, калідин, метіоніллізилбрадикінін. Усі вони утворюються з попередників кініногенів, які представлені глікопротеїдами α_2 -глобулінової фракції. За походженням кініногеніни поділяють на плазмові й тканинні. Легені мають досить високу кініногенову активність і містять достатню їх кількість. Широкий спектр біологічної дії вазоактивних пептидів забезпечує процеси скорочення та розслаблення непосмугованих м'язів бронхів, розширення артерій, впливає на мікроциркуляцію, місцевий кровообіг в органах, моторику бронхів.

Кініни не лише впливають на мікроциркуляцію, вони, розширюючи артеріоли та капіляри й зумовлюючи спазм артеріовенозних шунтів і венул одночасно підвищують проникність судинних стінок. Так, брадикінін може впливати на непосмуговані м'язи бронхів не лише безпосередньо, а й через подразнення адренорецепторів, які розміщені в непосмугованих м'язах.

Кініни в організмі дуже швидко інактивуються. Потужна ферментна система, що руйнує брадикінін, знаходиться в легенях. Легенева ферментна система може руйнувати брадикініни або брати участь у перетворенні ангіотензину I на ангіотензин II. У цьому процесі бере участь дипептидилдипептидаза, яка може інгібуватись синтетичним препаратом каптоприлом, що є похідною N-ацилпроліну й містить SH-групи. Цей ензим досить часто називають кініназою II, або ангіотензинконвертувальним ензимом.

Гістамін (β -імідазолдіетиламін) належить до групи біогенних амінів і утворюється з гістидину. Місцем синтезу гістаміну є шкіра, слизова оболонка травного каналу та легені, а міститься він у тканинних базофілах.

Гістамін, на відміну від серотоніну, норадреналіну, ацетилхоліну, брадикініну, які циркулюють у крові, не зникає під час проходження через легені. У легенях містяться ензими, які можуть окиснювати й метилювати цей амін. Можливо, інактивація гістаміну частково відбувається в легенях, оскільки

активність гістидинметилтрансферази досить висока порівняно з іншими органами. Гістамін є нестійкою сполукою і швидко руйнується. Він підвищує тонус легеневих вен і, меншою мірою легеневих артерій. Гістамін відіграє значну роль у розвитку бронхіальної астми. Він може підвищувати тонус бронхіальних м'язів, збуджуючи H_1 -рецептори або аферентні вагусні волокна. Крім того, може підсилювати холінергічний і α -адренергічний бронхоспастичний ефект або погіршувати розслаблення непосмугованих м'язів, яке виникає у разі збудження β -адренорецепторів.

Простагландини (ПГ) – це ненасичені сполуки, які містять ланцюг із 20 атомів Карбону, частина яких включена в циклопентанове ядро. Їх поділяють на 4 основні групи – А, В, Е, F. Утворюються під впливом мультиферментного мембранозв'язаного ензиму простагландинсинтетази, яку виявлено в легенях. Синтез ПГ відбувається в ендотеліальних клітинах легенів. Інгібіторами синтезу є глюкокортикостероїди, які блокують активацію фосфоліпази A_2 , що розщеплює фосфоліпіди з утворенням вільних жирних кислот. Таким шляхом вивільнюється арахідонова кислота, яка є основним попередником ПГ. Вони беруть участь у формуванні тонуусу непосмугованих м'язів бронхів. ПГЕ виявляє бронхорозширювальну дію, ПГЕ₁ – розширює капіляри легенів і зменшує тиск у легеневій артерії, ПГF₂ зумовлює гіповентиляцію, ПГЕ₂ – гіпервентиляцію. Остання призводить до посиленого синтезу ПГЕ, що супроводжується розширенням судин і збільшенням співвідношення вентиляція/перфузія

Легені є основним місцем інактивації ПГ. Так, за одну циркуляцію знешкоджується 90–95 % ПГ груп Е і F при введенні їх у кров у концентрації 0,5–1 мг/дм³. Знешкодження первинних простагландинів полягає в окисненні гідроксильної групи в 15-му положенні. Вони перетворюються на неактивні метаболіти й швидко вимиваються з легенів у печінку, де відбувається їх подальше перетворення. ПГ можуть кон'югувати з глутатіоном.

Деякі ПГ метаболізуються легеньми повністю, інші частково, а ПГА, ПГВ і простагландин ПГI₂ не усуваються з циркуляції зовсім. Слід зазначити, що легені інактивують не тільки ПГ, що циркулюють у крові, а й ті, які синтезують. Цей факт потрібно розглядати як захисну реакцію організму.

Отже, однією з ланок системи нейрогуморальної регуляції фізіологічних функцій організму є легені, які беруть участь у підтриманні гомеостазу багатьох БАР. Ця ланка забезпечує можливість інактивації в легенях надлишку циркулюючих у крові біогенних амінів, пептидів, ацетилхоліну, простагландинів, що визначає бар'єрну функцію легенів, яка пов'язана з катаболічними процесами, що в них відбуваються.

Система імунного захисту бронхолегеневого апарату. Система імунного захисту бронхолегеневого апарату є неоднорідною і складається з лімфатичних вузлів, вузликів та скупчення лімфоїдних клітин. Лімфоїдна тканина розміщена вздовж усього дихального тракту, від носової частини глотки до альвеол. У легенях знайдено своєрідну структурну одиницю імунокомпетентної системи – бронхоасоційовану лімфоїдну тканину, подібну до групових лімфатичних фолікулів кишки. Лімфатичні вузлики розміщені вздовж слизової оболонки,

багато їх у місцях розгалуження бронхів. Вони є резервуаром імунокомпетентних клітин, які можуть мігрувати через епітелій у просвіт бронхів. Особливо багато лімфоїдної тканини в дрібних бронхах, де вона відокремлена від просвіту тонким шаром безвійчастого епітелію. Такий розподіл лімфоїдної тканини пов'язаний з тим, що у верхніх дихальних шляхах захист здебільшого забезпечують неспецифічні механізми – *повітряний фільтр, шар слизу, діяльність війок, активність ензимів та інші складові бронхіального секрету*. У каудальних відділах ці механізми майже не функціонують і тому стає можливим контакт поверхні дихальних шляхів із антигенними субстанціями, що й пояснює збільшення кількості лімфоїдної тканини в повітроносних шляхах.

У місці переходу війчастих клітин, що вистилають альвеолу, епітелій має назву лімфоепітелію і є аферентною ланкою імунної відповіді. Структура лімфоїдної тканини бронхів забезпечує швидкий і щільний контакт у системі макрофагів – Т- і В-лімфоцитів, а імунна відповідь реалізується продукуванням антитіл і виділенням лімфокінів. Клітини цієї системи обмінюються інформацією завдяки лімфокінам, які інгібують міграцію макрофагів. У разі проникнення антигену в лімфатичні вузли, відбувається специфічна активація клітин. Це зумовлює міграцію в лімфоїдну тканину бронхів і бронхоальвеолярного секрету клітин, які утворюють антитіла.

Залежно від особливостей антигену та функціональної активності місцевих захисних систем імунна реакція може здійснюватись у лімфоепітеліальних структурах слизової оболонки бронхів (*тканинний рівень*) або в регіонарних трахеобронхіальних і прикореневих лімфатичних вузлах (*органний рівень*), а також у лімфоїдних органах загальної системи імунітету (*системний рівень*).

Функціональна роль бронхолегеневого секрету. Сурфактантна система представлена клітинними та неклітинними компонентами. Клітинний компонент складається з альвеолярних макрофагів і альвеоцитів (I–III типів). Неклітинний компонент включає сурфактантний альвеолярний комплекс: сурфактант альвеолярних ходів і бронхіол 1–3-го порядку. Сурфактантний альвеолярний комплекс складається з *сурфактанту, гіпофази та глікокаліксу*.

Сурфактант – це поверхнево-активна мономолекулярна плівка, яка розміщена на межі поділу фаз повітря–рідина в альвеолах, альвеолярних каналах і респіраторних бронхіолах 1–3-го порядку. Встановлено, що *субодиницею сурфактанту є біліпідна мембрана*, в яку вбудовані ліпідні шари гліко- та ліпопротеїнових комплексів.

Гіпофаза є рідкою фазою, яка розміщена під сурфактантом. Вона заповнює нерівності клітинної альвеолярної вистилки й містить макрофаги, резервний зрілий сурфактант, осмофільні пластинчасті тільця та їх фрагменти – продукти секреції альвеоцитів II типу (АЦ-II).

У легенях товщина шару *глікокаліксу* на апікальній поверхні АЦ-I становить 10 нм, а на апікальній поверхні АЦ-II – 40 нм. Сурфактант містить 90 % ліпідів, із них 75 % складають фосfolіпіди, 10 % – триацилгліцероли, близько 5 % – холестерол і жирні кислоти.

У регуляції сурфактантної системи легенів беруть участь глюкокортикоїдні гормони надниркових залоз. Сурфактантна система легенів виконує кілька важливих функцій. Поверхнево-активні речовини зменшують поверхневий натяг і, як наслідок, роботу, необхідну для вентиляції легенів, стабілізують альвеоли та запобігають їх ателектазу. При цьому поверхневий натяг зростає під час вдиху й зменшується під час видиху, отже, практично дорівнює нулю. Сурфактантна система бере участь в адаптації організму до різних екстремальних впливів зовні-нього середовища. Гіповентиляція легенів призводить до руйнування плівки сурфактанту, а при відновленні вентиляції плівка сурфактанту повністю не відновлюється. Властивості сурфактанту змінюються і при гіпоксії.

Запальний процес у легенях зумовлює порушення властивостей сурфактанту. Ступінь цих порушень залежить від активності запалення.

Порушення в системі сурфактанту спостерігають при гострій та хронічній пневмонії, набряку легень, емфіземі. У разі запальних процесів у бронхолегеневій системі на стан сурфактанту впливають порушення кровообігу, об'єм повітря, що надходить, БАР і метаболіти.

Трахеобронхіальний секрет є результатом діяльності келихоподібних клітин, залоз бронхів і трахеї. До складу секрету входять: сурфактант альвеол, компоненти плазми крові, які потрапляють туди шляхом ексудації або трансудації, локально синтезовані білки, а також продукти дегенерації та розпаду власної тканини. Він є гетерогенною речовиною, що складається з легкорозчинної у воді фази та нерозчинного гелеподібного слизу, який має волокнисту структуру. Об'єм води становить 89–95 %, у ній містяться натрій, хлор, фосфор і кальцій. Органічні речовини – протеїни, вуглеводи, нуклеїнові кислоти та ліпіди знаходяться в слизу. Під час інфекційних запальних процесів у бронхах змінюється хімічний склад і підвищується в'язкість гнійного секрету. Розвиток запального процесу призводить до зростання вмісту лізоциму, цАТФ, збільшення активності лужної й кислої фосфатаз.

Муцини відіграють важливу роль у механізмах захисту бронхів, здійснюючи регуляцію концентрації води та іонів і створюють оптимальні умови для знешкодження мікроорганізмів. Бронхіальні муцини становлять 60–70 % сухої речовини слизу.

За хімічною структурою їх поділяють на три класи: *сіаломуцини* (містять залишки N-ацетилнейрамінової кислоти), *сульфомуцини* (містять сульфатну кислоту) і *нейтральні фукомуцини* (містять залишок фукози). У слизових клітинах виявлено ензим сіалілтрансферазу, яка бере участь у синтезі сіаломуцинів.

Під час запальних процесів концентрація імуноглобулінів А, G і трансферину у вмісті бронхів порівняно з сироваткою крові вища. Вміст трипсину в сироватці крові та бронхіальному вмісті приблизно однаковий, а концентрація α_2 -макроглобуліну в рідині незначна.

Патохімія та клінічна біохімія при запальному процесі в легенях. Сучасні уявлення про біохімічні порушення ґрунтуються на результатах вивчення метаболічної активності легенів, яка тісно пов'язана з їх основною

фізіологічною функцією – газообміном. Під час запалення, яке спричинюють інфекційні агенти (пневмонія, гострий і хронічний бронхіт, бронхоектази тощо) поряд зі змінами метаболічної активності легенів виникають неспецифічні біохімічні порушення окремих параметрів крові. У розвитку запальних процесів значну роль відіграють медіатори запалення (гістамін, простагландини, лейкотрієни, цитокіни). Виявлення змін деяких із них істотно доповнює інформацію, яку отримують під час традиційних клінічних досліджень крові: вміст загального протеїну, альбумінів, глобулінів (α_1 , α_2), сіалових кислот, С-реактивного протеїну, гаптоглобіну, серомукоїдів, фібриногену. Ступінь інтенсивності місцевої запальної реакції в бронхах можна оцінити біохімічним дослідженням мокротиння (табл. 2.4).

Концентрація загального протеїну змінюється переважно при гнійних процесах у легенях. Гострі абсцеси легенів супроводжуються тенденцією до збільшення вмісту загального протеїну (впродовж перших двох місяців), при хронічних нагноєннях (бронхоектазії, хронічний абсцес, емпієма плеври) зафіксовано його зниження (75–60 %) відносно норми. У багатьох тварин, хворих на неспецифічні захворювання легенів, слід звертати увагу на фракцію α_1 -глобулінів: її низькі показники можуть свідчити про дефіцит інгібітора α_1 -АТ. Підвищення вмісту β -глобулінів спостерігають при частих загостреннях і довготривалих процесах. При нагноєннях зростає концентрація γ -глобулінів. Достатньо інформативним тестом є визначення величини відношення вмісту альбуміну (А) до суми фракцій α -глобулінів $A/(\alpha_1+\alpha_2)$. Виражений запальний процес характеризується різким його зниженням.

Визначення С-реактивного протеїну дає відносне уявлення про активність запального процесу в легенях. У фазу загострення при гострій пневмонії та гнійних процесах спостерігають зростання концентрації сіалових кислот у 1,5–2,0 рази порівняно з нормою. Одночасно з сіаловими кислотами зростає концентрація гаптоглобіну, яка в гостру фазу збільшується у 1,5–2,0 рази. Концентрація серомукоїдів значно підвищується при хронічних бронхітах у фазу загострення.

Для багатьох гострих запальних процесів у респіраторних відділах легенів характерне накопичення ексудату, чому значною мірою сприяє пухка структура органа. Виділяючись із розширених капілярів міжальвеолярних перегородок, ексудат потрапляє в просвіт альвеол, витісняє повітря і поширюється повітряними шляхами. Склад ексудату змінюється в динаміці розвитку запального процесу, причому в більш пізню фазу зазвичай збільшується кількість альвеолярних макрофагів, які беруть участь у процесах розсмоктування. Знищення мікроорганізмів відбувається за участю нейтрофільних лейкоцитів і макрофагів шляхом виділення ензимів, поглинання твердих часточок і рідких речовин.

У тканині легенів знаходяться основні антиоксидантні ензими, церулоплазмін, вітамін Е, що беруть участь у різних адаптаційних процесах. Передусім це стосується газового складу повітря, яке вдихається. Так, у процесі гіпероксичної дії у пневмоцитах і альвеолярних макрофагах значно підвищується активність супероксиддисмутази. Гіпоксія призводить також до

Таблиця 2.4. Характеристика мокротиння при патології легень

№ з/п	Нозологічна форма	Макроскопічне дослідження			Мікроскопічне дослідження
		кількість	характер патологічних елементів	включення	
1.	Гострий бронхіт	незначна	слизисте, слизисто-гнійне	–	циліарний епітелій, лейкоцити (помірна кількість), за затяжного перебігу – макрофаги
2.	Хронічний бронхіт	різна	слизисто-гнійне, слизисто-гнійно-кров'янисте	–	велика кількість лейкоцитів, еритроцити, макрофаги, численна флора
3.	Бронхоекта-тична хвороба	значна	гнійно-слизисте, тришарове	–	велика кількість лейкоцитів, кристали жирних кислот, гематоїдин, холестерол, різноманітна флора
4.	Крупозна пневмонія	спочатку незначна, пізніше значна	спочатку клейке, рідке, пізніше слизисто-гнійне	згустки фібрину, змінена кров	макрофаги, лейкоцити, еритроцити, кристали гематоїдину, пневмококи, зерна гемосидерину
5.	Абсцес легенів	значна в разі прориву абсцесу	гнійне з неприємним запахом	часточки тканини	велика кількість лейкоцитів, еластичні волокна, кристали жирних кислот, гематоїдину, холестеролу, різноманітна флора

Продовження табл. 2.4

6.	Бронхо-легеневий рак	різна	слизисто-кров'янисте, слизисто-гнійно-кров'янисте	уривки тканини	атипові клітини
7.	Туберкульоз легенів	різна	слизисто-гнійне, іноді з домішками крові	за наявності каверн – рисові тільця	мікобактерії туберкульозу, еластичні волокна, різні кристали

підвищення продукування супероксидного радикалу внаслідок інгібування активності цитохромоксидази, а активність каталази та глутатіонпероксидази зростають.

Активні радикали ушкоджують ліпідні структури, що входять до складу сурфактанту легенів.

Бронхіальний секрет має складні реологічні властивості. Реологічні властивості мокротиння (еластичність) залежать від умісту муцину та секреторного IgA. Найбільшу в'язкість спостерігають у хворих на хронічний обструктивний бронхіт, а її зниження при необструктивній формі хронічного бронхіту. В'язкість мокротиння в добовій порції зазвичай є нижчою порівняно з ранньою. Існує кореляція між концентрацією сіалових кислот, рівнем протеїну та в'язкістю мокротиння. Бронхи й легені, які постійно контактують із зовнішнім середовищем, утворюють кілька захисних бар'єрів. Першим бар'єром є трахеобронхіальний слиз, який містить 70–80 % глікопротеїдів, що можуть забезпечувати детоксикаційні процеси.

Наступним важливим бар'єром на шляху вільних радикалів є легеневий сурфактант, який містить антиоксидантні ензими.

Лабораторна діагностика кардіопатій. Серед захворювань серцево-судинної системи (ССС) розрізняють ішемічну хворобу серця (ІХС) – гостре та хронічне ураження серця, спричинене зменшенням або припиненням постачання кров'ю міокарда.

В умовах дефіциту кисню в клітинах міокарда метаболізм переорієнтовується з аеробного на анаеробний, тобто активізуються гліколіз та глікогеноліз, продуктом яких є молочна кислота. Це лімітує функціонування кінцевого ферментного комплексу дихального ланцюга – цитохромоксидази, яка передає електрони на молекулярний кисень. Тим самим транспортування електронів дихальним ланцюгом у цілому та поєднаний з диханням ресинтез АТФ пригнічуються. Як наслідок, значно зростає вміст відновлених переносників дихального ланцюга, зменшується вміст АТФ і креатинфосфату, який регенерує АТФ під час витрачання, зростає кількість продуктів їх розпаду.

Уже на ранніх стадіях ішемії внаслідок підвищення внутрішньоклітинної концентрації катехоламінів та цАМФ стимулюється утворення активної фосфорилази α й активація фосфофруктокінази – ключових ензимів анаеробних шляхів вуглеводного катаболізму. Проте навіть максимально посилений анаеробний метаболізм не спроможний адекватно й тривалий час забезпечувати ушкоджений гіпоксичний міокард енергією. До того ж накопичення лактату і формування стану метаболічного ацидозу, у свою чергу, впливає на структуру та функції мембран. Зменшується мембранний потенціал, унаслідок дефіциту АТФ пригнічується активність іонного транспортування.

Так, інактивація Na^+ , K^+ -АТФ-ази проявляється збільшенням у кардіоміоцитах вмісту Na^+ і зменшенням K^+ (рис. 2.4).

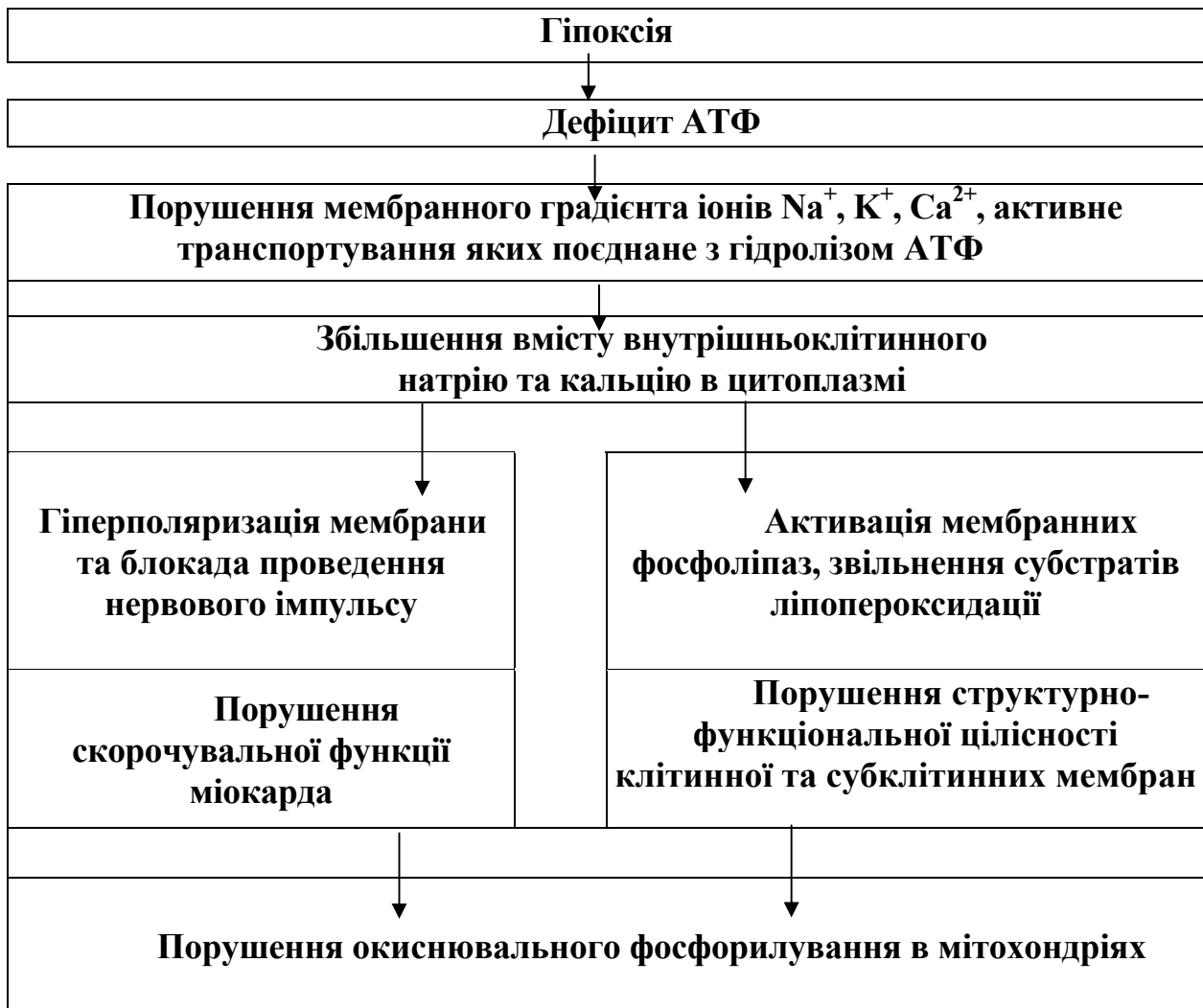


Рис. 2.4. Патохімічні зрушення в серцевому м'язі при гіпоксії

Зміна проникності мембранних систем Са-насосу сарколеми й саркоплазматичного ретикулуму призводить до зниження їхньої Са-акumuлюючої здатності й накопичення Ca^{2+} у саркоплазмі кардіоміоцитів.

Стан клітинних мембран за таких умов залежить від активізації мембранних фосфоліпаз, утворення лізофосфатидів, а також активації механізмів ліпопероксидації.

Ушкодження лізосомальних мембран спричиняє вивільнення гідролаз, які, активізуючись у кислому середовищі, каталізують гідролітичне руйнування протеїнів – ліпопротеїнів (вторинна альтерація). Означені некротичні зміни в клітині супроводжуються виходом у кровоток внутрішньоклітинних ензимів – трансаміназ, фосфатаз, лактатдегідрогеназ, креатинфосфокіназ тощо. У цей же період виявляються зміни фракційного складу протеїнів міокарда – різке зниження міофібрилярних протеїнів та накопичення протеїнів строми. Порушення обміну вуглеводів, протеїнів та ліпідів можуть виражатися в жировій інфільтрації серцевого м'яза. Накопичення НАД-ФН(H^+) прискорює синтез ліпідів, первинним субстратом

яких є як неокиснені вільні жирні кислоти, так і лактат/піруват (через ацетил-КоА).

Отже, дефіцит енергетичних ресурсів і порушення іонного складу, насамперед підвищення рівня внутрішньоклітинного кальцію, зумовлюють гальмування функціональної активності м'язових клітин та їх поступову загибель. Саме накопичення іонів кальцію в саркоплазмі кардіоміоцитів становить, за сучасними даними, основну ланку патогенезу різноманітних форм ушкодження серцевого м'яза – від спадкових кардіопатій до недостатності гіпертрофованого серця.

Лабораторна діагностика ішемічної хвороби серця. У переважній більшості випадків біохімічні дослідження є важливим допоміжним методом розпізнавання тих нозологій ІХС, екстрена діагностика яких дозволяє відвернути смерть хворих. Насамперед це стосується лабораторної діагностики інфаркту міокарда (ІМ) – ішемічного некрозу міокарда.

Лабораторні дані в гострому періоді ІМ (ГІМ) відображають резорбційно-некротичний синдром, який розвивається внаслідок резорбції некротичних мас, асептичного запалення та виходу ферментів з міофібрил міокарда.

Найчастіше для діагностики ГІМ визначають активність ензимів АсАТ, ЛДГ, КФК, а також концентрацію міоглобіну в сироватці крові. Перелічені тести характеризуються невисокою специфічністю, тому для уточнення діагнозу в деяких випадках необхідно визначати активність водночас декількох ферментів. Ще важливішим є дослідження ізоензимів. Так, МВ-фракція креатинфосфокінази визначається лише в серці й не міститься в інших органах. Гіперензенемія МВ-КФК є абсолютним доказом ушкодження міокарда. За допомогою дослідження КФК можна визначити величину некрозу міокарда в грам-еквівалентах КФК. Один грам-еквівалент креатинфосфокінази – це така кількість тканини, в якій вміст ензиму відповідає вмісту в 1 г повністю некротизованого міокарда.

Іншим важливим ензимологічним показником є активність ЛДГ₁, зокрема серцевого ізоферменту ЛДГ₁. При гострому ІМ у сироватці крові в першу чергу зростає активність ЛДГ₁, і лише пізніше – загальної ЛДГ. Гіперензенемія ЛДГ₁ є не тільки раннім, специфічним, але й чутливим тестом ГІМ. Вторинне підвищення активності органоспецифічних ензимів у крові після періоду нормалізації є свідченням розширення зони інфаркту або ознакою формування серцевої недостатності.

До неферментативних маркерів ІМ належать протеїни гострої фази (С-реактивний протеїн (С-РП), α_1 -глікопротеїд, α_1 -антитрипсин) і міоглобін. За допомогою доступних методів дослідження міоглобін у нормі не виявляється, тому його наявність розцінюється як ознака деструкції міокарда. Ступінь приросту міоглобіну може служити критерієм поширеності некротичного процесу в міокарді, характеризувати динаміку процесу та ефективність терапії.

При ІМ відбуваються зміни в крові, які відображають порушення обміну вуглеводів, протеїнів, ліпідів, кислотно-лужного стану,

електролітного балансу, гормонального профілю. Так, у гострій фазі ІМ імовірна гіперглікемія, іноді навіть глюкозурія. У крові зменшується вміст альбумінів, підвищується (удвічі й більше) вміст α_2 -глобулінів, а також γ -глобулінів, фібриногену. На 2–3-тю добу виявляється позитивна реакція на С-РП, зростає вміст серомукоїду. Наведені зміни неспецифічні й не мають принципового значення для діагностики ІМ.

Лабораторна біохімічна діагностика стенокардії – іншої поширеної нозологічної форми ІХС – здійснюється за допомогою біохімічних констеляцій. Необхідно зазначити, що ензимологічні дослідження (АсАТ, ЛДГ, КФК та їх ізоензими) не виявляють будь-яких змін при стенокардії як у момент нападів, так і між ними, що дозволяє диференціювати ІМ зі стенокардією.

Імовірність правильної діагностики інфаркту міокарда зростає, якщо, крім підвищення активності окремих ензимів крові, зважати на зміни їх співвідношення МВ – КФК (загальна КФК зростає від 3 до 40 %, КФК/АсАТ – від 2 до 9,6 %, КФК/ЛДГ – від 0,27 до 1,6 %. Відношення показників активності КФК/АсАТ має високе діагностичне значення при диференційній діагностиці інфаркту міокарда та ураженні скелетних м'язів: відношення КФК/АсАТ близько 27 (13–56) свідчить про ураження скелетної мускулатури, близько 5 (2–9) – про патологію кардіоміоцитів.

При емболії легень, що супроводжується вираженим підвищенням активності АсАТ і АлАТ, активність КФК не збільшується, що може бути використано як диференційно-діагностичний критерій уражень в окремих органах (серці, легенях), що складають кардіореспіраторну систему. Комплекс додаткових біохімічних досліджень при ІХС охоплює насамперед дослідження стану ліпідного обміну. Саме зрушення ліпідного профілю крові (дисліпопротеїнемія), перш за все – підвищення вмісту холестеролу, зумовлює атеросклеротичне ушкодження судин серця та розвиток ішемії.

Важливість гіперліпопротеїнемії як одного з провідних факторів ризику серцево-судинних захворювань сьогодні не викликає сумнівів. За прийнятою нині теорією атерогенезу відоме висловлювання Н. Н. Анічкова «Без холестеролу немає атеросклерозу» набуває нового звучання: «Без атерогенних ліпопротеїнів немає атеросклерозу». Атерогенні ліпопротеїни (ліпопротеїни низької щільності – ЛПНЩ й ліпопротеїни дуже низької щільності – ЛПДНЩ), багаті на холестерол, є тими первинними субстратами, які, надходячи до стінок судин у підвищеній кількості, дають поштовх атеросклеротичним змінам.

Крім холестеролу-інфільтраційної гіпотези атеросклерозу, не менш доведеною є гіпотеза передуючого ушкодження ендотелію, хоча обидві теорії закономірно пов'язані між собою. Саме на ушкоджених ділянках ендотелій стає більш проникним для ЛПНЩ, які відзначаються малим розміром частинок. Важливою особливістю катаболізму атерогенних ЛП, який має місце при атеросклерозі, є їх попередня хімічна модифікація (глікозилювання, пероксидне окиснення, утворення комплексів ЛПНЩ-антитіло, ЛПНЩ-ГАГ тощо). Напружуються всі механізми поглинання

ЛПНЩ, які існують в ендотеліальних клітинах: за допомогою апо-В, Е-рецепторів, сквенджер-рецепторів макрофагів та шляхом низькоафінного адсорбційного ендцитозу. Надходження ЛП до інтими артеріальної стінки відбувається одночасно з міграцією плазмених моноцитів (макрофагів). Саме макрофаги, які за допомогою сквенджер-рецепторів захоплюють і поглинають ЛПНЩ і в такий спосіб збагачуються естерами холестеролу, надалі перетворюються на «піністі» клітини – які є попередниками атеросклеротичних бляшок. Переважна частина «піністих» клітин руйнується, ендотеліальні клітини судин перевантажуються холестерином, етери холестеролу надходять до міжклітинного простору. Ушкодження ендотелію супроводжується міграцією гладком'язових клітин (ГМК) з медії до інтими та їх проліферацією під впливом факторів росту і цитокінів. Джерелами означених біологічно активних речовин є як ендотелій судин, так і моноцити-макрофаги, лімфоцити та тромбоцити. Секреція моноцитами-макрофагами власних цитокінів сприяє переходу через ендотелій модифікованих ЛП. З іншого боку, накопичення в інтимі модифікованих ЛП прискорює міграцію моноцитів. Створюється хибне коло, яке сприяє прогресуванню атеросклеротичного ураження.

Зрушення ліпідного профілю крові вважаються лише одним із вирішальних чинників атерогенезу. Оскільки ендотелій судин є як основним захисним механізмом, так і первинною мішенню при атеросклерозі, існує припущення про безпосередню залежність ендотеліальної дисфункції від гіперхолестеролемії. Насамперед, це стосується зменшення утворення нітрогену оксиду (NO) – ендотеліального фактору релаксації. NO утворюється в ендотелії судин з амінокислоти L-аргініну під впливом ферменту NO-синтази, кофактором якої виступає тетрагідробіоптерин. Оксид азоту має короткий час напіврозпаду – менше 5 с, що є свідченням його локальної дії. Після утворення в ендотеліальних клітинах молекули NO дифундують до судинних гладком'язових клітин, активізують гуанілатциклазу, що, у свою чергу, посилює утворення цГМФ. Накопичення монопуклеотиду забезпечує релаксацію ГМК судинної стінки. Оксид азоту справляє також антиадгезивний та антиагрегаційний вплив на тромбоцити. При атеросклеротичному ушкодженні клітин судинної стінки продукування NO зменшується, що спричиняє явища вазоконстрикції, підвищення адгезії тромбоцитів, лейкоцитів, посилення міграції та проліферації судинних ГМК.

Проліферація ГМК, зумовлена впливом різноманітних клітинних факторів, вважається найбільш показовим проявом розвитку *атеросклеротичної бляшки* (атероми), а потім і фіброатероми. Зріла фіброзна бляшка – фіброатерома – складається з покритишки, яка включає ГМК, та фіброзної тканини з ділянками кальцифікації. Ядро такої бляшки складається з «піністих» клітин та кристалів позаклітинного холестеролу. Вміст етерів холестеролу у фіброзній бляшці в 20–26 разів, а вміст неестерифікованого холестеролу – у 6–7 разів перевищує кількість стеринів неуразе-них ділянок артерій. Унаслідок випинання бляшки у фатальних

випадках спостерігається звуження просвіту однієї з головних коронарних артерій, а частіше двох або всіх трьох до 25 % від початкового діаметра.

При обстеженні хворих з підозрою на атеросклероз характерними є зміни окремих показників: у плазмі крові підвищення загального рівня ліпідів (>7 г/дм³), концентрації вільного ($>2,3$ мМ), естерифікованого ($>3,38$ мМ) і загального холестеролу ($>6,5$ мМ), вмісту триацилгліцеролів (>2 мМ), співвідношення фосфоліпіди/холестерол ($<1,5$). Повторне виявлення зазначених відхилень є свідченням високої вірогідності доклінічного (прихованого) періоду атеросклерозу.

Найбільш інформативними показниками лабораторної оцінки вираженості атеросклеротичного процесу вважають ЛПНЩ, загальний холестерол (ЗХС), триацилгліцероли (ТАГ) та ЛПВЩ. У клінічних лабораторіях кількість ЛПНЩ найчастіше визначають розрахунковим шляхом за прийнятими формулами.

Незалежним фактором ризику появи атеросклерозу та ІХС є зниження концентрації ЛПВЩ, які виконують функцію зворотного транспортування холестеролу від органів і тканин до печінки, де відбувається його остаточна утилізація. Дослідження, проведені в багатьох країнах світу, показали, що у хворих на ІХС вміст ХС ЛПВЩ нижчий, ніж при відсутності ознак ІХС. Підвищення вмісту ЛПВЩ, навпаки, виконує роль антиризик-фактора. Маркером, який опосередковано визначає ймовірність розвитку атеросклерозу, є так званий *коефіцієнт (індекс) атерогенності* – ІА:

У клініці дуже зручно розраховувати цей коефіцієнт за результатами визначення загального холестеролу і холестеролу ЛПВЩ:

Чим вище значення ІА ($N < 3$), тим вище ризик розвитку ІХС ($ІА = 4-6$).

Закономірно поєднуються з гіперліпідемією (підвищенням у крові рівня атерогенних ЛП) відхилення від норми показників гемокоагуляції.

Найінформативнішими ознаками є збільшення адгезії тромбоцитів, активності факторів VIII, XI, XII, XIII, толерантності плазми до гепарину, зниження фібринолітичної активності крові.

До неспецифічних ранніх змін при атеросклерозі належать зниження активності окисно-відновлювальних ензимів – каталази, пероксидази, підвищення в крові вмісту сечової кислоти.

Виходячи з наявності запального компонента в патогенезі атеросклерозу визначається підвищення вмісту С-реактивного протеїну, моніторингу якого при означеному захворюванні присвячено зараз багато публікацій.

У лабораторній діагностиці інших поширених захворювань серцево-судинної системи найчастіше використовують комплекси біохімічних тестів (біохімічні констеляції), наведені в табл. 2.5. Результати проведених біохімічних досліджень допомагають лікареві правильно визначитися, насамперед, у диференційній діагностиці захворювань міокарда різноманітної етіології та патогенезу з ІХС та первинним ревмокардитом.

Таблиця 2.5. Біохімічні констеляції у лабораторній діагностиці захворювань серцево-судинної системи

Хвороба	Біохімічний тест
Міокардит	Активність ензимів АсАТ, ЛДГ (ЛДГ ₁ і ЛДГ ₂), КФК (МВ-КФК) С-РП Глікопротеїди та їх компоненти (серомукоїд, сіалові кислоти) Загальний протеїн і протеїнові фракції Імунологічні дослідження (IgA та IgG, циркулюючі імунні комплекси, серологічні реакції)
Міокардіо-дистрофія	Загальний протеїн і протеїнові фракції Глікопротеїди (сіалові кислоти, серомукоїд, фібрин) Активність ензимів АсАТ, альдолази, КФК, ЛДГ _{1,2} Відповідний комплекс досліджень залежно від етіотропного фактора
Недостатність кровообігу	Загальний протеїн і протеїнові фракції Показники обміну ліпідів (холестерол, триацилгліцероли, ЛПНГ та ЛПДНГ) Глікопротеїди (сіалові кислоти, серомукоїд, фібрин) Активність АсАТ, альдолази Концентрація натрію, калію, хлоридів у крові та сечі
Перикардит	Загальний протеїн і протеїнові фракції Глікопротеїди (сіалові кислоти, серомукоїд, фібрин) С-реактивний протеїн Активність АсАТ, альдолази, КФК, ЛДГ, ЛФ Білірубін

Питання для самоперевірки:

- 1. Енергетичні процеси у легеневій тканині.*
- 2. Особливості метаболізму протеїнів у легенях.*
- 3. Ліпіди при легеневій патології.*
- 4. Система імунного захисту бронхолегеневого апарату.*
- 5. Патохімія та клінічна біохімія при запальному процесі у легенях.*
- 6. Зрушення окисного метаболізму в серцевому м'язі при ішемії.*
- 7. Значення ензимодіагностики у клінічній кардіології.*
- 8. Значення зрушень обміну ліпідів в атерогенезі.*

Тема 2.5. Біохімічні процеси в організмі тварин при хворобах органів системи травлення, лабораторна діагностика їх порушень

Порушення метаболічних процесів при хворобах шлунково-кишкового тракту та їх діагностика. Використання необхідних для організму поживних речовин та перетворення їх на форму, доступну для засвоєння тканинами, здійснюється травною системою. Завдяки її діяльності компоненти корму підлягають перетравлюванню, тобто таким фізичним, фізико-хімічним та хімічним змінам, які забезпечують перетворення високомолекулярних сполук на низькомолекулярні, що всмоктуються в кров або лімфу. Ці процеси потребують тісної взаємодії ензимів, кофакторів та субстратів і підтримання оптимального рівня рН. Захворювання шлунка, підшлункової залози, печінки та кишечника можуть призвести до порушень травлення і засвоєння поживних речовин.

До складу системи травлення входять травний канал, підшлункова залоза та печінка.

Порушення процесів травлення і всмоктування може відбуватись, принаймні, з трьох причин:

- 1) у зв'язку з гальмуванням або відсутністю дії ензимів;
- 2) через запальні процеси шлунка й кишечника;
- 3) з виникненням новоутворень тощо.

Основні процеси *перетравлювання складних вуглеводів* відбуваються в тонкому відділі кишечника, де діють амілаза (на крохмаль і глікоген), мальтаза (на мальтозу), сахараза (на сахарозу) і лактаза (на лактозу). Під дією згаданих ензимів складні вуглеводи гідролізуються до глюкози, фруктози та галактози, які всмоктуються в кров, потрапляють у печінку й метаболізуються до глюкози. Тому процес перетравлювання вуглеводів можна відстежувати за концентрацією глюкози в крові.

При запальних процесах органів травлення (гастрити, гастроентерити, ентерити) або підшлункової залози (панкреатити) порушуються процеси гідролізу полісахаридів внаслідок нестачі або порушення біосинтезу амілази й дисахараз. Це призводить до неповного розщеплення в кишечнику полісахаридів і дисахаридів. Негідролізовані дисахариди потрапляють у товстий кишечник, де зазнають впливу бактеріальної мікрофлори і зброджуються до молочної кислоти. У цих випадках реакція калу стає кислою. Сахароза, крім цього, здатна зв'язувати значну кількість води й утримувати її в кишечнику, посилюючи діарею. Зміни адсорбційних властивостей слизової оболонки тонкого кишечника, які виникають при його запаленнях, призводять до порушення всмоктування моносахаридів у кров. Усе це спричиняє розвиток гіпоглікемії та пов'язане з нею недостатнє забезпечення тканин організму глюкозою.

Порушення обміну протеїнів спостерігається також на етапі їх гідролізу і всмоктування амінокислот. Відомо, що дія ензимів, що гідролізують протеїни, є кооперативною. Це означає, що кожний ензим руйнує пептидні зв'язки між певними амінокис-лотами поліпептидного ланцюга протеїну.

Так, у шлунку пепсин гідролізує пептидні зв'язки, утворені аміногрупами ароматичних амінокислот (фенілаланін, тирозин), а також лейцину й глутамінової кислоти. Унаслідок цього утворюються поліпептиди, які мають у своєму складі від 4 до 8 залишків амінокислот. Подальший їх гідроліз здійснюється трипсином і хімотрипсином у тонкому кишечнику. Дія трипсину спрямована на пептидні зв'язки, утворені карбоксильними групами лужних амінокислот (аргінін, лізин) та аміногрупами інших амінокислот. Хімотрипсин переважно гідролізує пептидні зв'язки, які утворені карбоксильними групами ароматичних амінокислот (тирозин, фенілаланін, триптофан) та аміногрупами інших амінокислот. У перетравлюванні протеїнів у тонкому кишечнику важлива роль належить екзопептидазам (аміно- та карбоксипептидазам) і дипептидазам, які завершують гідролітичне розщеплення протеїнів до амінокислот. Таким чином, білки розпадаються до амінокислот, які всмоктуються в кров.

Якщо дія пепсину гальмується (наприклад, при анацидному гастриті та зменшенні рН), протеїни в шлунку не розщеплюються, а потрапляють у тонкий кишечник і там зазнають неповного гідролізу. Нерозщеплені фрагменти протеїнових молекул посилюють перистальтику кишечника й спричиняють пронос.

Порушення процесів ферментативного гідролізу протеїнів і всмоктування амінокислот у травному каналі призводять до посиленого їх перетворення гнильними мікроорганізмами в товстому кишечнику. У процесі гниття протеїнів утворюються *протеїногенні аміни* (путресцин, кадаверин, тирамін, гістамін) та *отруйні ароматичні сполуки* (фенол, крезол, індол, скатол). У нормі цих сполук в організмі утворюється мало, і вони знешкоджуються в печінці. При надмірному їх утворенні розвивається загальне отруєння організму, що негативно впливає на обмінні процеси.

Порушення обміну ліпідів може спричинитися розладом процесів гідролізу та всмоктування їх у травному тракті. Однією з передумов нормального розщеплення ліпідів і всмоктування продуктів гідролізу є емульгування їх жовчними кислотами, які вкривають жирові краплі, зменшуючи їхній поверхневий натяг. Унаслідок цього великі краплі жиру розпадаються до найдрібніших краплинок. У такий спосіб поверхня контактування жиру з ліпазою значно збільшується. Оскільки ліпаза діє тільки на межі розподілу фаз вода–жир (ліпаза є протеїном, який розчиняється у воді, а жир у ній не розчиняється), гідроліз жирів буде ефективнішим, якщо шар емульсії буде тоншим. Жовчні кислоти виконують також інші функції. Зокрема, вони активізують ліпазу й утворюють розчинні комплекси із жирними кислотами, що забезпечує гідроліз жирів та всмоктування вищих жирних кислот. Захворювання підшлункової залози і тонкого кишечника можуть спричинити недостатню кількість або зниження активності ліпази, а патологія печінки та жовчного міхура – недостатню кількість жовчних кислот.

При недостатній концентрації жовчних кислот і ліпази гідроліз та всмоктування жирів значно знижуються. При цьому кількість жиру в калі

різко зростає (*стеаторея*). Стеаторея досить часто супроводжується сильною діареєю, а організм, окрім поживних речовин, втрачає воду й електроліти.

Значення біохімічних досліджень для діагностики функціо-нальних розладів шлунка неістотне. Біохімічні тести застосовують у тих випадках, коли секреція хлористоводневої кислоти в шлунку завелика або недостатня. Надлишкова секреція соляної кислоти в шлунку є важливим фактором у патогенезі виразки дванадця-типалої кишки (але не шлунка). Визначення секреції кислоти шлунком тепер виконується рідко. Воно може бути корисним, коли треба виключити ахлоргідрію як причину гіпергастри-ксинемії, якщо останню виявлено у хворих з виразкою дванадцятипалої кишки.

Підшлункова залоза – це залоза змішаної секреції. Вона є важливим ендокринним органом, який синтезує інсулін, глюкагон, панкреатичний поліпептид та інші гормони. Екзокринний секрет підшлункової залози – це лужний, збагачений бікарбонатами сік з набором різних ензимів, які необхідні для нормального травлення: проензимів протеаз (трипсину, хімотрипсину та карбоксипептидази), ліполітичного ферменту ліпази, коліпази та амілази.

До захворювань, які супроводжують порушення екзокринної функції підшлункової залози, відносять гострий та хронічний панкреатит, карциному підшлункової залози.

Гострий панкреатит – це гостре запальне захворювання, в основі якого лежить набряк підшлункової залози, а при тяжких формах – її некроз, порушення структури. Існує також зв'язок між панкреатитами й запальними захворюваннями печінки.

Обов'язковими дослідженнями при захворюваннях підшлункової залози є: визначення активності α -амілази, ліпази, трипсину та його інгібіторів, АсАТ, ЛДГ₄, вмісту білірубіну, глюкози в крові та активності α -амілази в сечі.

Додаткові дослідження: загальний протеїн та його фракції, С-реактивний протеїн, лужна фосфатаза, електроліти К, Na, Са, інсулін, глюкагон, секретин, активність ДНК-ази. Визначається також присутність протеїну та глюкози в сечі.

α -Амілаза секретується підшлунковою та слинними залозами, тому ензим складається з двох фракцій – панкреатичної та слинної. У сироватці крові вищою є активність слинного ізоензиму, а в сечі – панкреатичного. Активність α -амілази в сироватці крові новонароджених дуже низька. Упродовж першого місяця життя вона зростає до рівня, який характерний для дорослих. Встановлено, що визначення ізоензимів α -амілази (слинного та панкреатичного) є більш інформативним тестом, ніж визначення загальної активності α -амілази. Співвідношення активності слинного та панкреатичного ізоензимів α -амілази в сечі здорової тварини становить 1 : 2. Підвищення активності амілази в сироватці крові та сечі спостерігається при ушкодженнях слинних та підшлункової залоз. Значна або швидка гіперамілаземія та гіперамілазурія розвиваються при гострому паротиті й гострому панкреатиті. Меншою мірою зростання активності α -амілази реєструється при виразках шлунка, хімоостазі, дистрофії печінки, гепатиті, жовчнокам'яній хворобі.

Підвищення активності панкреатичної амілази в сироватці крові відзначається при панкреатитах будь-якого походження, особливо при гострому панкреатиті.

Гіперамілаземію викликають деякі гормони й ряд фармакологічних препаратів: адреналін, гістамін, секретин, фуросемід, саліцилати, антикоагулянти, морфін, пантопон, опій, кодеїн, тетрациклін. Це пояснюється впливом на відтік секрету із залози та стимуляцію його продукції. Введення кортизону або кортикостерону підвищує активність ензиму в декілька разів.

Панкреатична *ліпаза* секретується підшлунковою залозою і у великій кількості виявляється в дуоденальному вмісті. У сироватці крові активність ензиму низька. При гострому панкреатиті активність ліпази зростає в сотні разів і утримується на цьому рівні довше, ніж амілаза. У сечі активність ліпази відсутня.

Важливим тестом для оцінки стану підшлункової залози є фекальний тест – визначення панкреатичної *еластази*. При панкреатитах її рівень зростає, а чутливість цього методу перевищує 90 %.

Зміни метаболічного статусу організму новонароджених телят при гострих розладах травлення та після клінічного одужання. Новонароджені тварини часто хворіють на шлунково-кишкову патологію як незаразної (диспепсія), так і інфекційної етіології, що значно порушує становлення обмінних процесів в їхньому організмі та зумовлює виникнення розладів структурно-функціонального стану більшості органів і тканин, особливо травної системи. Внаслідок цього функціональна діяльність шлунка, кишечника, печінки та нирок залишається недостатньою впродовж тривалого часу після клінічного одужання тварин, що провокує розвиток рецидивів захворювання на тлі імунодефіцитного стану організму.

Крім того, у тварин з ранньою постнатальною ентеропатологією відмічають суттєві розлади у становленні таких генетично детермінованих природних процесів, як нормалізація кислотно-лужного стану організму, формування колострального імунітету, заміна фетального типу білків крові на дорослий, що негативно відображається на здатності їх організму підтримувати гомеостаз внутрішнього середовища під впливом різних екзо- та ендогенних патологічних чинників.

Природні адаптаційно-приспосувальні механізми (нейро-гуморальні, метаболічна система кислотно-лужного гомеостазу та інші) захищають тварин, які перехворіли на ентеропатологію, від подальшого ускладнення функціонального стану уражених тканин і органів, що забезпечує їх поступову нормалізацію в період реабілітації. Швидкість і якість відновлення порушених функцій органів травлення, печінки та нирок прямо залежить від тривалості дії патогенного фактору, тяжкості перебігу захворювання, умов утри-мання тварин та ефективності лікувально-профілактичних схем. Поряд із цим, не зважаючи на значний арсенал лікувальних засобів, які призначаються при захворюванні телят на ентеропатологію, терапевтичні схеми виявляються мало ефективними, що призводить до значної загибелі

тварин у перші доби життя. Це свідчить про необхідність удосконалення традиційних терапевтичних схем з включенням до них засобів.

У телят з традиційною схемою лікування диспепсії тривалість перебігу захворювання в середньому становить 6–8 діб (до 10 діб). У період видужування відмічаються рецидиви захворювання у 45 % телят. Такі тварини значно відстають за своїм розвитком та продуктивністю (Грищенко В. А., 2006).

Результати лабораторного дослідження біохімічних показників, що характеризують різні види обміну речовин і структурно-функціональний стан уражених органів та тканин за розвитку диспепсії, доповнюють описану клінічну картину (Грищенко В. А., 2006). Так, рівень загального протеїну в плазмі крові телят на 5–8 добу життя відрізняється тенденцією до підвищення у тварин з традиційною схемою лікування на 39 %, залишаючись високим і на 30-ту добу їх життя. Встановлена гіперпротеїнемія має відносний характер і є результатом дегідратації.

Уміст альбуміну знаходився в межах норми. Однак, високе значення гематокритної величини ($55\text{--}58 \text{ дм}^3/\text{дм}^3$) у телят за традиційного лікування на 5–8 добу їх життя свідчать про ймовірність прихованих змін вмісту альбуміну у плазмі крові телят після зникнення клінічних ознак захворювання у зв'язку з розвитком дегідратації.

Після зникнення клінічних ознак захворювання (5–8-ма доба життя) у телят залишається високою активність гепатоспецифічних ензимів: γ -ГТП у 2,8 раза, ЛФ в 1,8 раза. Це підтверджує наявність порушень жовчовидільної функції печінки (*холестази*) та запального процесу в ендотелії жовчних проток і паренхімі печінки. При цьому активність аспартат- і аланінамінотрансфераз у перехворівших телят фактично залишається в межах норми. Тільки у телят при традиційному лікуванні після зникнення клінічних ознак захворювання, активність аспартатамінотрансферази вірогідно вища (в 1,4 раза) за контрольний рівень, що доводить виникнення глибоких структурних змін гепатоцитів (на рівні мітохондрій) під час клінічного прояву захворювання.

Гіпербілірубінемія і вірогідно високий, порівняно з контрольним, рівень прямого білірубіну (в 3 рази) у телят, хворих на диспепсію, на 5–8-му добу життя, підтверджує факт порушення жовчовидільної функції печінки в період зникнення клінічних ознак розладів травлення.

Розлади функціонального стану печінки, можливо, є наслідком анатомічно близького розташування та наявності нервових і гуморальних зв'язків між кишечником та печінкою. За шлунково-кишкової патології часто відмічається ураження структури печінки і її функціональні зміни, оскільки, при гострих і хронічних розладах травлення в тканині печінки визначаються дистрофічні зміни гепатоцитів, а у важких випадках – дрібно-, середньо- і великокрапельне жирове переродження.

Водночас, вірогідно високий рівень сечовини (у 2,7 раза) і креатиніну (на 22 %) у тварин при традиційному лікуванні на 5–8-му добу життя, свідчить про деяке напруження в азотовому обміні (азотемію) і можливі розлади структурно-функціонального стану нирок у перехворівших телят. Проте, в

телят, які перехворіли на диспепсію, у 25–30-добовому віці за традиційної схеми лікування відсутні істотні зміни у плазмі крові концентрації сечовини та креатиніну порівняно з відповідним контролем.

Патологія органів травного тракту негативно впливає на обмін гемоглобіну. Досліджено, що у телят за традиційного лікування в усі досліджувані періоди життя відмічається вірогідне зниження рівня гемоглобіну, що характеризує стан анемії, яку, згідно даних літератури, класифікують як залізодефіцитну. Це особливо актуально для раннього постнатального періоду життя тварин, на який припадає розвиток природної гемолітичної анемії, що виникає внаслідок інтенсивної заміни фетального типу гемоглобіну (HbF) на дорослий (HbA). Дисфункція ентероцитів у цих телят порушує транспортування і всмоктування поживних речовин корму, у тому числі й тих, що є факторами гемопоезу (незамінні амінокислоти, залізо, мідь, кобальт, цинк, вітаміни групи В). Слід зазначити, що іони заліза входять до складу залізопорфіринових сполук, представниками яких є ензими антиоксидантної системи захисту (каталаза, пероксидаза). Тому дефіцит заліза, який відмічається за цієї патології, сприяє мембранопатологічним змінам за рахунок активації пероксидного окиснення ліпідів, що викликає дезорганізацію метаболічних процесів, які перебігають на мембранах клітин.

Вірогідно високий рівень глюкози (у 2,1 раза) у плазмі крові телят з традиційною схемою лікування на 5–8-му добу життя, може свідчити про адаптаційно-компенсаторні зміни нейро-ендокринної регуляції процесів синтезу та утилізації глюкози в організмі тяжко перехворівших тварин і, можливо, посилення процесів глікогенолізу і глюконеогенезу в їх тканинах. Крім того, концентрація глюкози вірогідно зростає у плазмі крові телят на 25–30-ту добу життя порівняно з 5–8-мою добою життя.

Отже, у телят реабілітаційного періоду за традиційної схеми лікування диспепсії встановлено (Грищенко В. А., 2006) розвиток гіперферментемії гепатоспецифічних ензимів (АсАТ, АлАТ, γ -ГТП, ЛФ), гіпербілірубінемію, залізодефіцитну анемію та азотемію, що узгоджується з результатами клінічного обстеження цих тварин і проявляється більш тривалим та важким перебігом захворювання (до 10 діб) з повторними рецидивами (45 % тварин). Показники клінічного статусу організму перехворівших на ентеропатологію телят, значна напруженість метаболічних процесів у тканинах та повільний характер їх відновлення, поряд з наявною дисфункцією ентероцитів, гепатоцитів та інших клітин організму, свідчать про необхідність застосування таким тваринам засобів репаративної терапії, у тому числі в період реабілітації. Це може значно прискорити відновлення ушкоджених клітинних мембран і, в цілому, функціонального стану клітин, задіяних у патологічний процес органів та тканин.

Питання для самоперевірки:

- 1. Лабораторні тести для визначення порушень метаболічних процесів при хворобах шлунково-кишкового тракту.*

2. *Особливості метаболічної адаптації тварин на ранніх етапах постнатального розвитку в поєднанні з функціональною адаптацією в системі органів травлення.*
3. *Особливості метаболічного гомеостазу в організмі новонароджених телят під час захворювання на гострі розлади травлення та після клінічного одужання (у відновлювальний період).*
4. *Описати біохімічні механізми секреції води й електролітів в епітелії тонкого кишечника при гострих розладах травлення в новонароджених телят.*

Біохімічні констеляції у лабораторній діагностиці хвороб печінки

Печінка – найбільший орган в організмі людини і тварин. Клітини печінки займають центральне місце в реакціях проміжного метаболізму.

Основна функціонально-структурна одиниця печінки – печінкова часточка. Гепатоцити в ній досягають 80 % клітинного складу (приблизно 300 блн. екземплярів). У гепатоциті відбувається проміжний обмін речовин, синтез жовчних кислот, знешкодження шкідливих речовин тощо, тобто забезпечується виконання основних біохімічних функцій, притаманних цьому органу. Між шарами гепатоцитів розташовані жовчні каналці.

Жовчні каналці переходять у дрібні жовчні протоки, а по-тім у головну жовчну протоку.

Крім гепатоцитів, печінка містить ретикулоендотеліальні клітини. Вони представлені трьома типами:

1) Купферівськими клітинами. Їхньою функцією є фагоцитоз еритроцитів, часток емульгованого жиру, барвників, колоїдальних часток, холестеролу;

2) ендотеліальними клітинами, що оточують стінки синусоїдів. За певних умов вони можуть підключатися до процесів фагоцитозу шляхом перетворення на Купферівські клітини;

3) клітинами, які накопичують жир. Вони знаходяться в проміжках між гепатоцитами. Їх відмінна особливість – наявність крапельок жиру в цитоплазмі.

Найважливішими функціями печінки є метаболічна, депонуюча, бар'єрна, екскреторна й гомеостатична.

Метаболічна функція. Продукти розщеплення поживних речовин надходять до печінки з травного тракту через ворітну вену. У печінці відбуваються складні процеси обміну протеїнів, амінокислот, ліпідів, вуглеводів, біологічно активних речовин (гормонів, біогенних амінів, вітамінів) та мікроелементів, регуляція водного обміну. Тут відбувається синтез ліпідів, фосфоліпідів, холестеролу, вуглеводів (синтез глюкози, наприклад, – переважно в цьому органі) та протеїнів. У печінці відбувається також катаболізм багатьох органічних речовин, енергія цього процесу запасється у вигляді макроергічних молекул.

Депонуюча функція. Печінка є місцем депонування енергетичних резервів організму (вміст глікогену може досягати 20 % маси печінки) та сполук-попередників; тут також депонується багато мінеральних сполук, макроелементів, серед них Ферум (майже 15 % від сумарного заліза, який є в організмі), мікроелементи, вітаміни А, D, К, В₁₂ та фолієва кислота.

Екскреторна функція. Зовнішньосекреторна функція печінки пов'язана з тим, що вона є травною залозою. У печінці відбувається синтез жовчних кислот та утворення жовчі. З печінки різні речовини ендо- та екзогенного походження або надходять у жовчні протоки й виводяться в складі жовчі (близько 40 сполук), або потрапляють у кров, а потім виводяться нирками. Деякі хімічні елементи, наприклад, плутоній, виводяться з організму лише печінкою.

Жовч – це рідкий секрет клітин печінки, необхідний як для надходження в дванадцятипалу кишку поверхнево активних сполук (жовчних кислот, фосфоліпідів), що є учасниками перетравлення та всмоктування нейтральних жирів, так і для екскреції з організму кінцевих продуктів катаболізму, біомолекул і ксенобіотиків. У жовчі – 98 % води, 2 % сухого залишку. У міхуровій жовчі всіх компонентів у 5–10 разів більше, ніж у печінковій (табл. 2.6). Разом із жовчю з організму виводиться багато сполук, які утворюються в печінці або циркулюють в крові.

Таблиця 2.6. Вміст основних біоорганічних сполук у печінковій та міхуровій жовчі, г/дм³

Компонент жовчі	Печінкова жовч	Міхурова жовч
Протеїни	1,5–2,5	4,5–5,0
Жовчні кислоти	7–14	90–120
Фосфоліпіди	1,0–5,8	30–40
Жирні кислоти	1,6–3,4	20–25
Холестерол	1–2	3–10
Жовчні пігменти (білірубін, білівердин)	0,3–0,6	1,2–1,5

Передусім це жовчні кислоти, а також холестерол, сечовина, сечова кислота, протеїни, ензими, пігменти, муцин, мінеральні речовини, іони Na, K, Ca, Cl, HCO₃⁺.

Найважливіші органічні компоненти жовчі – *жовчні кислоти*. Вони синтезуються в печінці з холестеролу. Нині відомі близько 20 жовчних кислот. Основними серед них вважають холеву, дезоксихолеву та хенодезоксихолеву кислоти. Залежно від місця утворення їх поділять на первинні та вторинні.

Первинні – холева та хенодезоксихолева – утворюються в печінці, *вторинні* – дезоксихолева та літохолева – синтезуються в кишках за участю

ензимів бактеріальної мікрофлори і є похідними від первинних жовчних кислот.

Утворення й виділення жовчі має життєво важливе значення для організму.

Сучасні уявлення про молекулярні механізми жовчоутворення. Жовчоутворення є складним і поліетапним процесом, який здійснюється в паренхімі печінки на основі мембранних і внутрішньоклітинних механізмів транслокації, біосинтезу та енергетичного забезпечення.

Утворення каналцевої (первинної) жовчі розглядають як секреторний осмотичний процес, що відбувається за рахунок активного транспорту через апікальні мембрани гепатоцитів та жовчні каналці органічних речовин (насамперед, жовчних кислот) і неорганічних іонів. З часу першого формулювання гіпотези осмотичної фільтрації отримано значну інформацію стосовно механізмів цих процесів, в останнє десятиріччя – на клітинному та молекулярному рівнях. Участь окремих компонентів жовчі в розвитку осмотичного градієнта, рушійної сили для надходження води в каналці обговорюється з позиції даних про наявність у плазматичних мембранах гепатоцитів систем транспорту відповідних речовин. Транспортери плазматичних мембран гепатоцитів переносять також метаболіти токсичних екзогенних та ендогенних речовин.

Утворення жовчі є результатом секреції і екскреції її органічних та неорганічних компонентів гепатоцитами (первинна жовч), фільтрації і реабсорбції води та електролітів холангіоцитами, і проникнення води та електролітів через міжклітинні щільні сполучення. Злагодженою роботою різних транспортних систем синусоїдальних та каналікулярних мембран обумовлюються певні етапи формування жовчі. Внутрішньоклітинні метаболічні процеси забезпечують біосинтез, кон'югацію, гідроксилювання та активний спрямований транспорт основних компонентів жовчі, а також енергетичне забезпечення жовчоутворювальної функції.

Слід зауважити, що при використанні транспортних, особливо Na^+ -залежних систем, є певний елемент конкуренції як між жовчними кислотами, так і з вільними амінокислотами зовнішнього середовища, бо зазначені системи відіграють значну роль у транслокації окремих груп останніх всередину клітини.

Певний внесок в надходження жовчних кислот до клітин печінки роблять мікрофіламенти та мікротубулярна система.

Надходження неорганічних катіонів та аніонів до гепатоцитах забезпечують іонні канали та транспортери: Na^+ -, K^+ -АТФаза, Na^+ -, H^+ -обмінник, Na^+ -, HCO_3^- -котранспортер, HCO_3^- Na^+ -незалежний транспортер SO_4^{2-} , Na^+ -/ K^+ -/ 2Cl^- -котранспортер та інші.

Впливи жовчних кислот як амфіфільних речовин, призводять до зміни фізико-хімічного стану мембран і функції мембранних транспортерів в гепатоцитах, а при підвищенні їх внутрішньо-клітинного вмісту можуть бути причиною некротичного чи апоптичного пошкодження, що спричинює холестатичне ураження печінки. Цей патофізіологічний процес супроводжує

різні захворювання печінки, є комплексним, зумовленим порушеннями регуляції та експресії мембранних транспортерів, сигнальних шляхів, зміною функції білків цитоскелета, щільних контактів. Хронічний, довготривалий холестаз призводить до розвитку біліарного цирозу через некроз та апоптоз клітин печінки та наступний фіброз. Експериментальні дані та клінічні спостереження свідчать про ефективність при холестатичних ураженнях гідрофільної дигідроксижовчної кислоти – урсодезоксихолевої та її тауринового кон'югата, які значною мірою поліпшують секреторну функцію та структуру печінки, виявляють антиапоптозний ефект.

Органічні сполуки, завдяки різноманітним механізмам активного і пасивного транспорту, проникають крізь каналікулярну мембрану і створюють осмотичний градієнт, що сприяє виходу води та електролітів, по типу пасивної осмотичної фільтрації, з перенхіматозних клітин печінки у каналікулярну жовч. Домінуюча роль у цьому процесі належить жовчним кислотам, а головними рушійними силами, котрі забезпечують їх транслокацію через каналікулярну мембрану є негативний електрохімічний потенціал та АТФ-залежні транспортні механізми.

Жовчні кислоти можуть змінювати секрецію жовчі через сигнальні механізми, які посттранскрипційно модулюють процеси їх транспорту в гепатоцитах: Ca^{2+} , протеїнкіназу С (ПКС), циклічний аденозинмонофосфат (цАМФ), а також мітогенактивовані протеїнкінази. Серед можливих механізмів таких впливів припускають фосфорилювання/дефосфорилювання транспортних білків, зміни їх вмісту в плазматичних мембранах гепатоцитів через поповнення з інтрацелюлярних пулів, активацію їх везикулярного транспорту та вбудовування в мембрану [179, 195].

У перенесенні через каналікулярну мембрану неорганічних катіонів та аніонів беруть участь АТФ-азні комплекси, обмінники типу АЕ-2 та інші транспортні системи. З обміном неорганічних і органічних катіонів і аніонів тісно пов'язаний рух води, котрий має важливе значення в утворенні жовчі.

У складному процесі жовчоутворення задіяні мембранні, внутрішньоклітинні поліферментні комплекси та мікротубулярна система різних клітин печінки тварин та людини. У регуляції діяльності цих систем нейрогуморальні чинники беруть активну участь як безпосередньо впливаючи на активність ключових ферментів у цих ланках, так і через активацію певних функціональних регуляторних блоків, змінюючи діяльний стан клітини в цілому. Ряд гормонів, взаємодіючи з функціональними елементами ядра клітини, індукують біосинтез певних білків-ензимів, у тому числі і причетних до жовчоутворення. Отже, в залежності від нейрогуморального статусу організму буде змінюватись функціональний стан печінки і перебіг процесів, пов'язаних із жовчоутворенням та визначаючих якісні і кількісні характеристики жовчі.

Підсумовуючи множинні ефекти безпосередньо жовчних кислот в гепатоцитах, механізми яких лишаються значною мірою гіпотетичними, свідчать, що жовчним кислотам відводиться значна регуляторна роль у процесах утворення канальцевої жовчі. Жовчні кислоти регулюють

транспортні процеси в гепатоцитах на рівні транскрипції мембранних транспортних білків, взаємодіючи з ядерними гормональними рецепторами, а також на посттранскрипційному рівні – через активацію клітинних сигнальних шляхів та, як виявилось, безпосередньо при взаємодії з ліпідним матриксом мембран. Нові аспекти регуляції процесів утворення первинної жовчі жовчними кислотами важливі для розробки адекватних підходів при корекції жовчосекреторної функції за умов холестатичних уражень печінки. В зв'язку з вищезгаданим, дослідження рівня та співвідношення жовчних кислот у жовчі тварин при певних відхиленнях у роботі шлунково-кишкового тракту є необхідним для оцінки функціонального стану печінки.

Співвідношення органічних компонентів жовчі як критерій зовніньосекреторної функції печінки. Жовч тварин та людини є продуктом зовніньосекреторної діяльності печінки. Вона є хімічно складною забарвленою біорідиною, котра містить широкий спектр органічних і неорганічних сполук. Органічні речовини жовчі представлені метаболітами білкового, нуклеотидного, пігментного, ліпідного та вуглеводного обмінів, низкою специфічних і не специфічних ферментів і цілим рядом гормонів, медіаторів та їх похідних.

Зупиняючись на конкретних складових, необхідно відмітити, що основними компонентами жовчі, котрі значною мірою визначають якісну характеристику цієї біологічної рідини, є жовчні кислоти, пігменти, білки, фосфоліпіди та холестерол. Роль жовчних кислот в організмі розглядають у двох аспектах – як компоненти жовчі і як поверхневоактивні речовини, що постійно циркулюють в крові, знаходяться в лімфі та тканинах.

При досягненні певної концентрації жовчні кислоти утворюють агрегати – міцели. За рахунок утворення ковалентного та іонного і водневих зв'язків з підключенням гідрофобних взаємодій жовчні кислоти утворюють комплекси, які сприяють розчинності важко розчинних речовин (ХС, ЖК, ТАГ, солі кальцію). Завдяки таким властивостям жовчні кислоти відіграють вирішальну роль в забезпеченні колоїдостійкості жовчі і протидіють утворенню в жовчних шляхах і міхурі конкрементів.

Жовчні кислоти поряд із іншими поверхневоактивними компонентами жовчі, в т. ч. ФЛ, забезпечують емульгування та солюбілізацію ХС і жирів у кишечнику та полегшують їх всмоктування. Утворення комплексних сполук ЖК та жовчних кислот сприяє всмоктуванню іонів кальцію. За відсутності жовчних кислот порушується всмоктування жиророзчинних вітамінів – А, Д, Е, К. Жовчні кислоти беруть участь в регуляції моторно-евакуаторної функції шлунково-кишкового тракту.

Для фізіологічних процесів є важливою взаємодія жовчних кислот із молекулами білків та ліпідів – основними компонентами мембран клітин. Під впливом цих сполук змінюється активність ферментів як на поверхні слизової оболонки, так і в порожнині кишечника. Встановлено, що жовчні кислоти є інгібіторами пепсину. Вони активують ензими панкреатичного соку (трипсин, амілаза, ліпаза) та стимулюють секреторну функцію підшлункової залози.

Жовчні кислоти змінюють процеси мембранного транспорту, стан клітинного метаболізму та активність мембранних ферментів. Виявлено вплив цих сполук на процеси кровотворення, дихання, на діяльність залоз внутрішньої секреції, а також на функціональний стан збудливих структур ЦНС. Слід зауважити, що в організмі тварин та людини жовчні кислоти переважно (95–98 %) зосереджені в органах системи травлення, циркулюючи в гепатоентеральному кругообороті. Вміст жовчних кислот у жовчі тварин та людини коливається в широкому інтервалі від 600 до 6500 мг%.

Для формування стабілізуючих колоїдних комплексів жовчі, забезпечення процесів всмоктування ліпідних компонентів із кишечника та здійснення ентерогепатичного круговороту речовин необхідна тісна взаємодія жовчних кислот, ХС і ФЛ. Жовчні кислоти активують синтез лецитину, котрий становить 90 % всіх ФЛ жовчі у людей та 95,8 % у собак.

У жовчі тварин та людини в значних кількостях присутні ВЖК. Так, у жовчі із жовчного міхура людини загальний їх вміст становить 70–451 мг%, тоді як у печінковій – лише 25–146 мг%. Найбільшою часткою в жовчі людей представлені пальмітинова, олеїнова та ліноленова кислоти.

Вміст білків у печінковій жовчі людей становить біля 0,7 г/дм³, а в міхуровій – 2,6 г/дм³. У жовчі собак найбільший вміст муцину (3–4 мг/см³), ніж інших білків.

У жовчі тварин та людини виявляється ціла низка білків-ензимів різного походження. Із ензимів плазматичних мембран гепатоцитів у жовчі присутні: 5-нуклеотидаза, лужна фосфатаза, лужна фосфодиестераза, альфа-лейцин-бета-нафтиламіназа, Mg-АТФаза. До лізосомальних ензимів у жовчі відносять бета-глюкуронідазу, бета-галактозидазу, N-ацетил-бета-глюкуронідазу, кислу фосфатазу та арилсульфатазу. В жовчі ссавців є деякі ензими, котрі синтезуються в клітинах інших органів. До таких відноситься панкреатична амілаза, котра виявлена в жовчі собак і щурів. Фізіологічна роль більшості білків жовчі дотепер залишається нез'ясованою.

Щодо походження вільних амінокислот жовчі думки різних авторів явно протилежні. Одні вважають їх похідними з плазми крові та експериментальні дані інших авторів свідчать про суттєві відмінності у співвідношенні цих метаболітів у зазначених біорідинах. Специфічність співвідношення амінокислот у жовчі пов'язана частково з сечовиноутворювальною функцією печінки.

Недавно на канілікулярних мембранах гепатоцитів виявлена транспортна система, котра забезпечує вихід компонентів аденілової системи з клітини в позаклітинний простір, у т. ч. і у жовч. Концентрації АТФ, АДФ, АМФ у жовчі людей значні і у відношенні до рівня їх в плазмі крові становлять 40–60 %.

Дані наукової літератури свідчать, що жовч ссавців дуже багата на органічні речовини, котрі одночасно є метаболітами різних ланок обміну речовин в організмі тварин та людини. Їх призначення в цій біологічній рідині недостатньо з'ясоване. Значна увага приділялася жовчним кислотам і менша – іншим органічним складовим жовчі. Сучасні дослідження

показують, що для нормального жовчоутворення в печінці тварин та людини необхідне певне співвідношення не лише жовчних кислот, а й обов'язкова присутність, іноді в невеликій кількості, певних спеціалізованих білків, пігментів, окремих фракцій ліпідів та інших складових жовчі.

Детоксикаційна та бар'єрна функції. У печінці відбувається знешкодження (біохімічна трансформація) чужорідних і токсичних сполук, які потрапили з кормом або утворилися в кишечнику, а також токсичних сполук екзогенного походження й токсичних продуктів метаболізму:

- знешкодження нормальних метаболітів (білірубину та аміаку);
- інактивація гормонів;
- знешкодження чужорідних сполук (ксенобіотиків);
- знешкодження продуктів гниття амінокислот;
- метаболізм лікарських речовин.

Детоксикація реалізується шляхом хімічної модифікації сполук, яка включає дві групи перетворень:

1. Окиснення, відновлення або гідроліз з утворенням чи звільненням груп -ОН, -COOH, -SH, -NH₂ та ін.;

2. Приєднання до цих груп глюкуронової або сульфатної кислоти, гліцину, глутаміну або ацетильного залишку (*кон'югація*).

Реакції першої групи забезпечуються гідроксилазами (моно-оксигеназами) мікросом. З реакцій кон'югації переважає приєднання глюкуронової кислоти. Процес каталізує *глюкуронілтрансфераза* – інтегральний білок ендоплазматичного ретикулуму; постачальником глюкуронату є УДФ-глюкуронат. У реакціях кон'югації з сульфатною кислотою постачальником є 3-фосфоаденозин-3-фосфосульфат (ФАФС). Постачальник ацетилю в реакціях кон'югації – ацетил-КоА. Глутамін та гліцин утворюють кон'югати зі сполуками, активованими ацетил-КоА шляхом його заміщення. Усі розглянуті перетворення зводяться до підвищення гідрофільності знешкоджуваного продукту, що полегшує його виведення з організму.

Гомеостатична функція. Печінка виконує важливі функції підтримання сталого складу крові (гомеостазу), вона поглинає, трансформує та екскретує багато компонентів плазми крові.

Біохімічна трансформація. Стероїдні гормони та білірубін, а також лікарські сполуки, етанол та інші ксенобіотики потрапляють до печінки, де вони інактивуються і перетворюються на високополярні сполуки.

Обмін речовин у печінці та клініко-біохімічні показники, що характеризують його порушення. Печінка бере участь у метаболізмі майже всіх класів речовин.

Метаболізм вуглеводів. Відомо, що вуглеводи корму, що потрапили в кишечник, перетравлюються там під дією амілолітичних ензимів до моносахаридів. Глюкоза, фруктоза й галактоза надходять у печінку з плазмою крові і перетворюються на глюкозо-6-фосфат, який є активованою формою глюкози. Напрямок його використання залежить від активності ензиматичних систем клітини: розпад за гліколітичним шляхом дає енергію, за пентозофосфатним шунтом – субстрати для анаболічних реакцій. За участю

ензиму глюкозо-6-фосфатази утворюється вільна глюкоза, що надходить у кров. Глюкозо-6-фосфатаза найбільш активна в печінці, клітинах епітелію ниркових каналців і тонкого кишечника. Із глюкозо-6-фосфату синтезується резервний полісахарид глікоген. Надлишок глюкозо-6-фосфату, який не був використаний для утворення глюкози крові та глікогену печінки, розщеплюється шляхом гліколізу до піровиноградної кислоти й далі – до ацетил-КоА і CO_2 , які необхідні для синтезу жирних кислот.

Печінка також забезпечує сталий рівень глюкози в крові. Якщо рівень глюкози знижується, то вона починає постачати глюкозу за рахунок мобілізації глікогену. Якщо запас глікогену вичерпується, глюкоза може синтезуватися в процесі глюконеогенезу з таких попередників, як лактат, піруват, гліцерол чи амінокислоти. Тільки в печінці відбувається перетворення галактози, фруктози та лактату на глюкозу.

Дослідження концентрації глюкози в крові не має суттєвого значення для діагностики патології печінки, тому що цей орган має значні функціональні резерви для підтримання рівня глюкози в крові. Існують так звані «печінкові проби», зокрема проби з навантаженням фруктозою, галактозою і лактозою. За їх допомогою з невеликим ступенем імовірності можна судити про функціональний стан органу, їх застосовують для діагностики гепатитів, пухлин печінки, прогресуючих цирозів. Підвищення рівнів глікозаміногліканів, сіаловмісних глікопротеїдів, вільного оксипроліну в крові та сечі (як показників активності сполучної тканини) супроводжує хронічні ушкодження печінки. Виявлення порушень у системі синтезу та розпаду колагену має значення в діагностуванні хронічного вірусного гепатиту і цирозу. Визначення у крові концентрації лактату й пірувату має значення для оцінки гіпоксичного стану, який супроводжує захворювання печінки.

Метаболізм ліпідів. У печінці зосереджені майже всі шляхи метаболізму ліпідів. Важливим біосинтетичним шляхом є утворення жирних кислот і жирів (ліпогенез). Жирні кислоти синтезуються в ній з ацетатних блоків, джерелом яких можуть бути глюкоза і амінокислоти, не використані для інших цілей. Водночас жирні кислоти надходять у печінку з крові. Тут жирні кислоти включаються до складу жирів, фосфоліпідів, які потрапляють у кров у формі ліпопротеїнів дуже низької щільності (ЛПДНЩ). У печінці може зберігатися тільки обмежена кількість жирів (менше 1 % маси органа), а їх надлишок виводиться в кров у складі ЛПДНЩ. Швидкість секреції печінкою ЛПДНЩ відповідає швидкості їх споживання периферійними тканинами. За добу печінка виділяє в кров близько 20–50 г жиру. Порушення виведення жирів із печінки в складі ліпопротеїнів є однією з причин жирового переродження печінки.

Для енергозабезпечення організму велике значення має здатність печінки перетворювати жирні кислоти в кетоніві тіла, які потім знов повертаються в кров. Кетоніві тіла в мозку та периферійних тканинах потрібні як джерела енергії, але печінка не використовує їх для власних потреб, як енергетичний матеріал.

У печінці відбувається синтез холестеролу з ацетатних блоків, синтезується близько 80 % холестеролу організму. Потім холестерол у складі ЛПДНЩ транспортується кров'ю. Надлишок холестеролу перетворюється на жовчні кислоти або виводиться з організму із жовчю. Виведення жовчних кислот із жовчю – це основний шлях виведення холестеролу з організму. З холестеролу також синтезуються статеві гормони, гормони надниркової залози та деяка кількість вітаміну D.

Показники ліпідного обміну для оцінки стану печінки також мало інформативні. Рівень холестеролу в крові змінюється незакономірно. Зростання його вмісту може спостерігатися при обтураційній жовтяниці та холестазі, а зниження – при гемолітичній жовтяниці, гострому гепатиті, особливо тяжких формах, при гострій печінковій недостатності та цирозі. Зменшення вмісту ліпопротеїнів високої щільності (ЛПВЩ) спостерігається при гострих гепатитах, цирозах печінки та застійних жовтяницях. В останньому випадку воно настільки різке, що може спричинити повне зникнення фракції ЛПВЩ. Підвищення рівня ЛПВЩ трапляється при хронічному гепатиті.

Збільшення рівня ЛПДНЩ та ЛПНЩ характерне при інтрагепатичному застої жовчі, механічній жовтяниці, гострих гепатитах. Визначення вмісту ЛПДНЩ та ЛПНЩ (проба Бурштейна) має значення не лише при гіперліпідемічних станах, але і як функціональна печінкова проба. При зіставленні з тимоловою пробю цей показник особливо важливий, незважаючи на його не специфічність. *Тимолова проба* (див. нижче про метаболізм протеїнів) чутливіша до ушкоджень паренхіми печінки на початковій стадії, а *проба Бурштейна* – на кінцевій стадії гострого гепатиту. Особливе значення має *ліпопротеїнова проба* для оцінки стану печінки. У сполученні з тимоловою пробю вона має велике значення для диференціювання механічної жовтяниці та паренхіматозної. При паренхіматозній жовтяниці обидві проби позитивні (або тимолова проба позитивна, а проба на ліпопротеїни негативна), при механічній жовтяниці тимолова проба негативна (якщо немає вторинного гепатиту), а проба Бурштейна – різко позитивна. Визначення вмісту загальних ліпідів, триацигліцеридів, фосфоліпідів дає мало інформації.

Метаболізм амінокислот та протеїнів. У клітинах печінки на відміну від інших органів є повний спектр ензимів – учасників амінокислотного обміну. Рівень амінокислот у плазмі крові регулюється печінкою. Надлишок амінокислот розщеплюється, аміак зв'язується в циклі сечовини, сечовина переноситься до нирок. Ензим аргіназа, який каталізує заключну реакцію циклу утворення сечовини, знаходиться тільки в цитоплазмі гепатоцитів. Амінокислоти включаються в проміжний метаболізм як основа для синтезу глюкози (глюконеогенез) або як джерело енергії. Крім цього, у печінці відбуваються синтез та розщеплення багатьох білків плазми. Печінка – єдине місце, де відбувається синтез альбумінів, фібриногену, протромбіну, аглобулінів, більшої частини β -глобулінів, гепарину та ензимів. Тільки γ -глобуліни продукуються не гепатоцитами, а системою макрофагів (клітини

Купфера). Проте більшість γ -глобулінів утворюється в клітинах імунної системи. У печінці утворюються комплекси протеїнів з ліпідами та вуглеводами. У ній також синтезується холін – структурний компонент фосфоліпідів, один із ланцюгів, який зв'язує обмін протеїнів та ліпідів; завершується синтез креатину – амінокислоти, яка за безпечує енергією процес скорочення м'язів. Протеїни печінки відновлюються упродовж 7 діб, а у всьому організмі – 17 діб, що демонструє активність метаболізму в гепатоцитах. Визначення загального протеїну не дуже інформативне. Але цей показник потрібен для визначення кількісного складу протеїнових фракцій. Розрізняють кілька видів протеїнограм, що характерні для різних захворювань печінки.

1. Протеїнограма характерна для гепатитів і наслідків токсичного ушкодження печінки. Це помірне зменшення вмісту альбумінів (через зниження протеосинтетичної функції гепатоцитів), збільшення рівня γ -глобулінів (завдяки «подразненню» системи фагоцитуючих мононуклеарів та посиленому продукуванню IgG, IgA, IgM) і збільшення вмісту β -глобулінів.

2. Протеїнограма характерна для цирозу печінки. Відрізняється значним зниженням вмісту альбумінів, α_2 -глобулінів (через глибокі дистрофічні зміни гепатоцитів, які призводять до порушення біосинтезу протеїнів цієї фракції) при значному підвищенні (компенсаторному) рівня γ -глобулінової фракції (за рахунок IgG). Пляма γ -глобулінів, яка є на матеріалі носія – хроматографічному папері тощо, – нерідко зливається зі смужкою β -глобулінів, особливо при атрофічному цирозі; рівень α_1 -глобулінів звичайно не змінюється.

3. Протеїнограма характерна для обтураційної жовтяниці. Показує зменшення рівня альбумінів та помірне збільшення вмісту α_2 -, β - й γ -глобулінів, коли жовтяниця виникає через наявність каменя в жовчній протоці, закупорення його раковою пухлиною, злоякісним новоутворенням у головці підшлункової залози (що створює механічну перешкоду відтокові жовчі при синдромі холестази). Досить інформативними є осадові проби (проби колоїдостійкості): проба або стрічка Вельтмана, тимолова та цинк-сульфатна проби.

Зсув стрічки Вельтмана вправо спостерігається при вірусному гепатиті, цирозі, гострій атрофії печінки, а вліво – при гострому запаленні, ревматоїдному артриті, злоякісних новоутвореннях. Тимолова проба привертає увагу як один з надійних тестів для оцінки функціонального стану печінки. Завдяки їй удається діагностувати «синдром запалення», який супроводжує багато уражень паренхіми печінки. Вона позитивна в 90–100 % випадків токсичного, інфекційного гепатиту, що дуже важливо ще в переджовтяничній стадії захворювання та безжовтяничній його формі. При механічній (обтураційній, застійній, холестатичній) жовтяниці ця проба негативна (близько 75 %). На цьому базується використання тесту для диференційної діагностики жовтяниць. Важливо зазначити, що у хворих, які перенесли інфекційний гепатит, показники тимолової проби залишаються

підвищеними протягом 6 місяців. Клініко-діагностичне значення *цинк-сульфатної проби* загалом співпадає з характеристикою тимолової проби.

Сечовина визначається для виявлення дуже високого ступеня ураження печінки, коли концентрація цього метаболіту знижується. Визначення *аміаку* також має значення лише при тяжких ураженнях паренхіми печінки.

Метаболізм пігментів. *Білірубін* – важливий пігмент організму, що утворюється з гемоглобіну. Утворення, виділення та кон'югація білірубину з глюкуроноювою кислотою є специфічними функціями печінки. Утворення білірубину відбувається як у печінці, так і поза нею, у клітинах ретикулоендотеліальної системи. Спочатку утворюється так званий *вільний білірубін*, що погано розчиняється у воді та циркулює в комплексі з білками. Тому він не дає прямої реакції Ван-ден-Берга з реактивом Ерліха. Для визначення вільного білірубину сироватку спочатку треба обробити кофеїновим реактивом або спиртом (тому виникла назва «*непрямий*» *білірубін*). Вільний білірубін не проходить крізь нирковий фільтр. Ця сполука дуже токсична, особливо для мозку. Печінка – центральний орган, який її знешкоджує. Детоксикація вільного білірубину здійснюється в клітинах печінки шляхом кон'югації з глюкуроноювою кислотою та утворенням *білірубін-глюкуроніду*. У нормі вільний білірубін із печінкових капілярів легко проникає в гепатоцити, де за участі ензиму глюкуронілтрансферази при взаємодії з активованою глюкуроноювою кислотою (УДФГК) перетворюється на білірубінглюкуроніди. *Глюкуронід білірубину* (*зв'язаний білірубін*) добре розчиняється у воді, нетоксичний, виділяється з жовчю в кишечник. З реактивом Ерліха він дає пряму реакцію без попередньої обробки кофеїновим реактивом або спиртом і називається «*прямим*» *білірубіном*.

У крові визначається передусім «непрямий» (вільний) білірубін (75 % загального білірубину). Загальний вміст білірубину коливається від 8,55 до 20 мкМ; вміст «непрямого» білірубину сягає 17 мкМ, «прямого» (білірубінглюкуроніду) – 2,5 мкМ. У складі жовчі білірубін (переважно у вигляді глюкуронідів) потрапляє до кишечника, де відновлюється до *стеркобіліногену*, частина якого в товстому кишечнику перетворюється на *стеркобілін* – пігмент калу. За добу з організму виводиться 50–300 мг стеркобіліну. Значна частина стеркобіліну з кишечника всмоктується в кров і потрапляє в нирки, де перетворюється на інший пігмент – *уробіліноген*. З останнього утворюється *уробілін* – пігмент сечі. За добу з організму виводиться із сечею майже 4 мг уробіліну. Деякі дослідники вважають, що в сечу потрапляє стеркобіліноген. Виходить, що метаболізм пігментів крові, жовчі, сечі та калу взаємозв'язаний. У здорової тварини безупинно працює система перетворення «непрямого» білірубину на «прямий», що потрапляє в жовч. Як результат – «прямий» білірубін практично не визначається в межах чутливості методу, а вміст «непрямого» білірубину не перевищує нормальної величини.

Патологія пігментного обміну, яка безпосередньо пов'язана з порушеннями функцій печінкових клітин, може бути обумовлена трьома причинами:

1) порушенням надходження «вільного» білірубіну з кровоносних капілярів до гепатоцитів;

2) порушенням утворення білірубінглюкуроніду з «вільного» білірубіну (порушення кон'югації внаслідок зниження активності глюкуроніл-трансфери);

3) порушення екскреції «прямого» білірубіну (глюкуронідів білірубіну) з гепатоцитів у жовчні капіляри.

Якщо жовчних пігментів надлишок у крові та інших рідинах організму внаслідок їх надмірного утворення чи недостатнього виведення з організму, вони інтенсивно забарвлюють шкіру. Такий стан називається *жовтяницею*.

Жовтяниця – то не окрема хвороба, а синдром різних патологічних станів, здебільшого печінки. Жовтяниця з'являється, коли концентрація білірубіну в крові сягає 35–50 мкМ і вище (за різними джерелами). Якщо вміст білірубіну перевищує 340 мкМ, надходження його до головного мозку може спричинити значне ураження (*білірубінову енцефалопатію*), що проявляється неадекватною поведінкою, поступовою втратою свідомості, явищами гострої інтоксикації. Це так звана *печінкова кома*. Визначення концентрації жовчних пігментів у крові й сечі має важливе значення для диференційної діагностики жовтяниць різного походження (табл. 2.7).

Таблиця 2.7. Клініко-біохімічна характеристика жовтяниць

Показник	Вид жовтяниці		
	механічна	паренхіматозна	гемолітична
Вільний білірубін крові	немає змін	незначно підвищений	різко підвищений
Зв'язаний білірубін крові	різко підвищений	значно підвищений	незначно підвищений
Білірубін сечі	значно підвищений	незначно підвищений	не змінюється
Уробілін сечі	не змінюється або знижений	значно підвищений	різко підвищений
Стеркобілін калу	знижений	знижений або не змінюється	різко підвищений

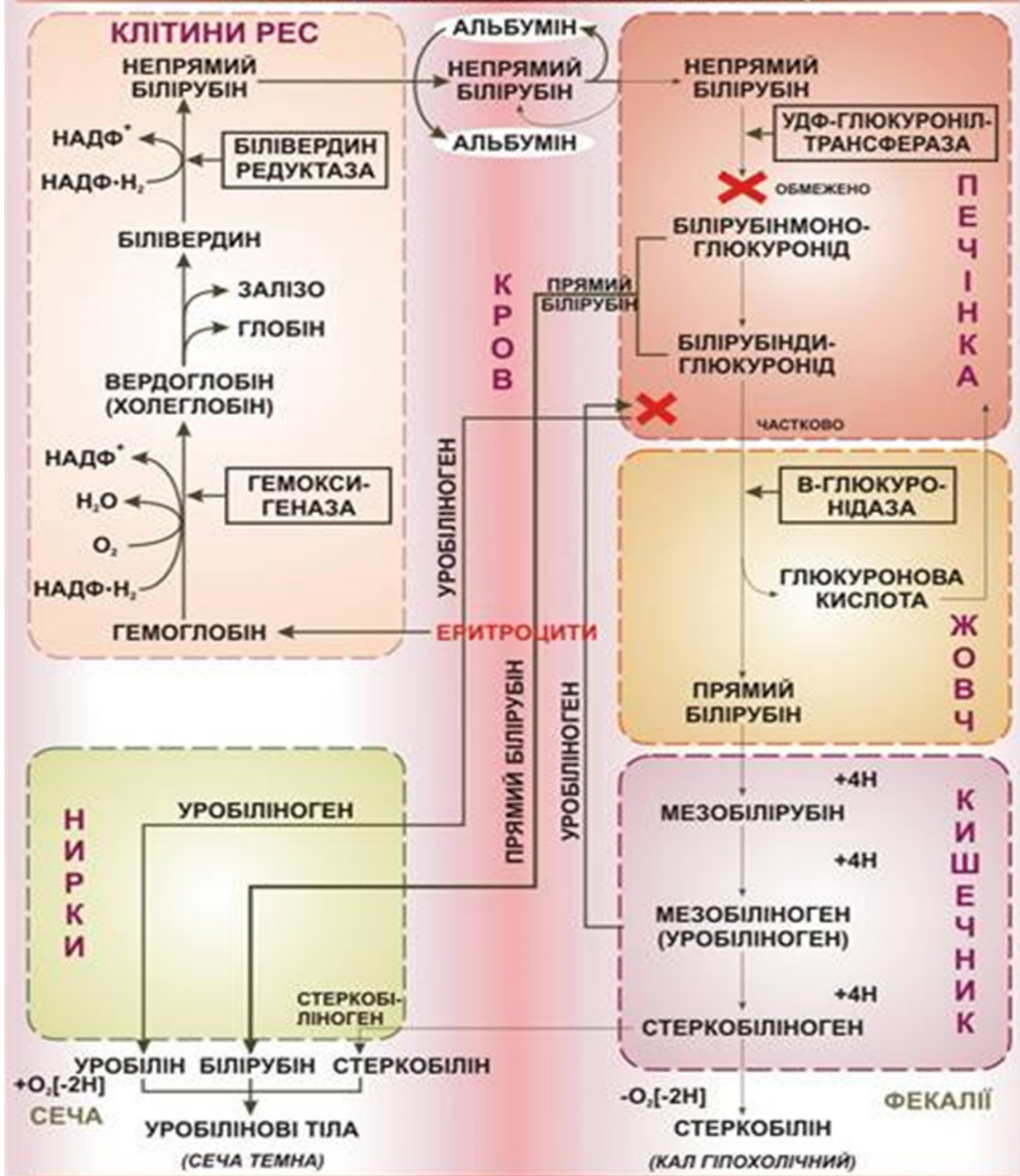
Розрізняють такі форми жовтяниць:

1. Гемолітична жовтяниця, або посилений розпад еритроцитів (гемоліз). При гемолізі утворюється й потрапляє до печінкових клітин багато «непрямого», вільного білірубіну, який не встигає повністю перетворитися на «прямий» (глюкуроніди білірубіну). Надлишок білірубіну залишається в крові, гіпербілірубінемія розвивається за рахунок «непрямого» (вільного)

2. Паренхіматозна (печінково-клітинна) жовтяниця розвивається при ушкодженні гепатоцитів (вірусна та ін. форми гепатитів, цирози). Унаслідок підвищеної проникності плазматичних мембран у кров потрапляють «прямий» та «непрямий» білірубін, тому розвивається *змішана гіпербілірубінемія*.

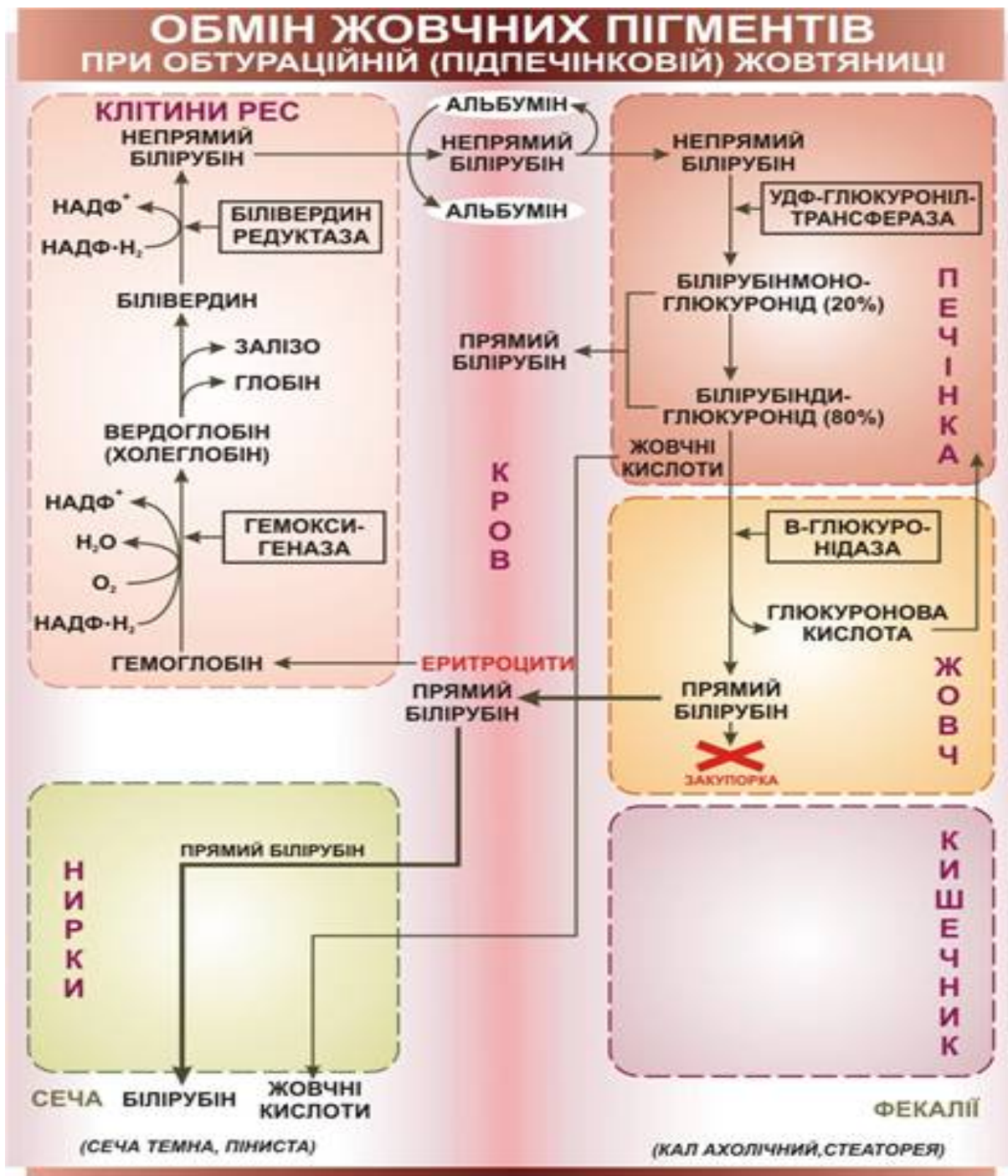


ОБМІН ЖОВЧНИХ ПІГМЕНТІВ ПРИ ПЕЧІНКОВІЙ ЖОВТЯНИЦІ



У сечі відзначається значний вміст білірубину, у тяжких випадках відсутній уробілін. Вміст стеркобіліну в калі різко зменшується, і він знебарвлюється.

3. Механічна жовтяниця (підпечінкова)



Розвивається в результаті застою жовчі, коли відбувається розтягнення жовчних капілярів і зростає їх проникність. «Прямий» білірубін, який не має відтоку в жовч, потрапляє в кров, гіпербілірубінемія розвивається за рахунок саме глюкуронидів білірубіну.

У тяжких випадках унаслідок переповнення гепатоцитів білірубіном, кон'югація його з глюкуроновою кислотою може порушуватися, у крові з'являється і «вільний» білірубін. Падає вміст стеркобіліну в калі, він знебарвлюється (*ахолічний кал*).

Порушення процесу жовчоутворення. Жовчнокам'яна хвороба

Жовчні кислоти забезпечують колоїдну стабільність холестеролу в жовчі. Секреція жовчі та її фізико-хімічні властивості часто порушуються через патологічні зсуви в гормональній регуляції холестерол-фосфоліпідного механізму. Як відомо, холестерол виділяється в жовч разом із жовчними кислотами, жовчними пігментами та фосфоліпідами у вигляді макромолекулярного комплексу, або *жовчної міцели*. Співвідношення цих чотирьох компонентів міцели в нормі досить стає і забезпечує розчинність важкорозчинних компонентів.

Порушення балансу концентрації компонентів у міцелі призводить до зниження колоїдної стабільності жовчі та формування каменів, які складаються на 80 % з холестеролу і на 20 % з кальцію білірубінату. Запальні й дистрофічні зміни паренхіми печінки при багатьох гострих та хронічних захворюваннях також можуть спричиняти значні порушення секреції жовчі, що посилюються ураженням дрібних жовчних ходів, холестазом і утворенням жовчних тромбів. Якщо формування каменів обумовлене холестазом, вони містять 90–95 % холестеролу, а якщо вони утворюються внаслідок інфекції, то переважно складаються з білірубінату кальцію. Панує думка, що при кишкових інфекціях активізується β -глюкуронідаза мікрофлори, яка розщеплює білірубін-глюкуронідний комплекс, унаслідок чого відновлюється «вільний» білірубін, який стає основою утворення каменів у вигляді білірубінату кальцію.

При розвитку холестазу, закупорюванні та ураженні позапечінкових жовчних протоків у сироватці крові зростає активність лужної фосфатази (ЛФ), 5-нуклеотидази, а внутрішньопечінкових – γ -глутамілтранспептидази (γ -ГТП).

У клінічній біохімії печінковий ізоензим ЛФ є маркером холестазу. Це пов'язано з підвищеним синтезом ЛФ клітинами жовчних проток і порушенням виділення ензиму в жовч.

Особливо високою стає гіперензимемія при розвитку патологічного процесу і стазу жовчі в позапечінкових жовчних протоках. При такій патології активність ензиму в сироватці крові зростає в десятки разів, а при ушкодженні внутрішньопечінкових жовчних шляхів та інтрагепатитному холестазі активність ЛФ у крові зростає лише в 2–3 рази. γ -ГТП має найвищу активність у клітинах, які формують жовчні протоки. Гіперензимемія є раннім надійним тестом інтрагепатитного стазу жовчі, ушкодження канікулярних мембран гепатоцитів навколо біліарного полюса та епітеліальних клітин, які покривають просвіти жовчних проток.

Отже, γ -ГТП є найчутливішим тестом порушення жовчовиділення в печінці, який не лише діагностує, а й попереджає про початок ураження, прогнозує його глибину. Отже, якщо розвивається механічна жовтяниця, то розглянутий комплекс ензимів може давати більшу інформацію про патологічний процес, ніж кон'югований білірубін, оскільки перший вказує на локалізацію ураження.

Ензими печінки та їх роль у діагностиці захворювань

У цитоплазмі та органелах печінкових клітин знаходиться понад тисяча різних ензимів. Розміщення їх у субклітинних утвореннях допомагає визначити ступінь деструкції органа без застосування морфологічних досліджень тканин. Так, у цитоплазмі паренхіматозних клітин (гепатоцитів) локалізується *аланінамінотрансфераза (АлАТ)*, в мітохондріях – *сукцинатдегідрогеназа (СДГ)*, ізоензим *аспартатамінотрансферази (АсАТ)*, у рибосомах – *холінестераза (ХЕ)*. Визначення активності ензимів у сироватці (плазмі) крові набуває дедалі більшого значення при патології печінки ще й тому, що зміна їх активності, частіше у вигляді гіперензимемії, настає швидше за інші лабораторні показники (білірубін, альбумін, колоїдо-осадових проб).

Тому передумовою своєчасного та успішного лікування і профілактики хвороб печінки є рання ензимодіагностика. Вихід (елімінація) ензимів із печінки в кров є ознакою цитолізу – руйнування клітин або порушення проникності їхніх мембран.

При гострих запальних процесах у печінці активність ензимів швидко зростає, а при переході в хронічну стадію підвищення дещо уповільнюється, однак до фізіологічних меж не повертається.

З гепатоспецифічних (органоспецифічних) ензимів для діагностики хвороб печінки в сироватці крові визначають активність *СДГ*, *аргінази*, *орнітинкарбамоїлтрансферази (ОКТ)*, *печінкового ізоензиму ЛДГ (ЛДГ₅)*.

До *відносно специфічних* для печінки ензимів відносять *глутаматдегідрогеназу (ГДГ)*, *малатдегідрогеназу (МДГ)*, *ізоцитратдегідрогеназу (ЩДГ)*, *лейцинамінопептидазу (ЛАП)*, *урокініназу* та інші. Окрім клітин печінки вони можуть локалізуватися в іншому органі.

У печінці знаходиться велика кількість неспецифічних ензимів (АсАТ, АлАТ, альдолаза, ЛДГ, ХЕ та ін.), які можна виявити також у клітинах інших тканин організму. Тому зважати на них у діагностиці хвороб печінки слід одночасно із гепатоспецифічними ензимами чи іншими показниками, при цьому необхідно обов'язково враховувати симптоми, отримані при клінічному обстеженні хворої тварини.

Серед неспецифічних ензимів привертають найбільшу увагу і мають найважливіше значення для лабораторної діагностики хвороб печінки АсАТ і АлАТ, а для діагностики холестази – ЛФ, тому їх часто, як і специфічні та відносноспецифічні, називають індикаторними.

Амінотрансферази є досить чутливими та інформативними показниками ураження печінки. Найвища ефективність амінотрансфераз у крові спостерігається при розвитку некрозу печінки й гострому паренхіматозному гепатиті, дещо нижча – при хронічному гепатиті та дистрофії. Зростання активності АсАТ і АлАТ у сироватці крові починається за 3–8 діб до появи клінічних ознак захворювання і досягає максимуму в перші дні патологічного процесу.

У діагностиці захворювань печінки запропоновано визначати коефіцієнт де Рітіса, що показує співвідношення активності АсАТ до АлАТ

(у нормі коефіцієнт де Рітіса дорівнює 1,33). Зростання величини коефіцієнта свідчить про тяжкі ураження гепатоцитів, оскільки це є ознакою підвищення активності мітохондріальної фракції АсАТ.

Глутаматдегідрогеназа (ГДГ) локалізується звичайно в мітохондріях клітин печінки. Активність ензиму в сироватці крові незначна. Зростання активності ГДГ у крові свідчить про порушення структури та лізис мітохондрій гепатоцитів. Гіперферментемія може спостерігатися також при гострій закупорці загальної жовчної протоки, коли виникає жовчна гіпертензія.

Холінестераза (ХЕ) синтезується на рибосомах ендоплазматичної сітки гепатоцитів і виділяється з печінки в плазму крові для участі в метаболічних реакціях. На відміну від багатьох інших ензимів діагностичне значення має не підвищення, а зниження її активності. Зниження активності холінестерази в сироватці крові відбувається при тяжких захворюваннях печінки (зокрема цирозі та некрозі), отруєнні фосфорорганічними сполуками (інсектицидами). Гіперхолінестераземія трапляється при патологічних станах, що характеризуються посиленням синтезом дрібнодисперсних глобулінів через подразнення клітин печінки ендо- чи екзотоксинами.

Незначне зростання активності індикаторних цитолітичних ензимів або відсутність гіперензимемії разом із глибоким порушенням функцій печінки є наслідком заміни паренхіматозних клітин сполучною тканиною, що вказує на цироз аж до несприятливого прогнозу. Такі зміни показників можуть спостерігатися при обширному некрозі печінки, оскільки відмерлі клітини не продукують ензимів.

Синдромна класифікація функціональних проб

1. Індикатори цитолізу: підвищення активності аланінаміно-трансферази, аспартатамінотрансферази, γ -глутамілтранспептидази, глутаматдегідрогенази, сорбітолдегідрогенази, ізоензимів лактат дегідрогенази (ЛДГ₄ та ЛДГ₅).

2. Індикатори гепато-депресивного синдрому:

- **бромсульфалеїнова проба.** Це проба на поглинально-видільну функцію печінки. Внутрішньовенно вводиться бромсульфалеїн, який швидко поглинається печінкою і потім поступово виділяється в жовч. У нормі дуже невелика кількість барвника (не більше 10 %) виділяється через нирки із сечею. При порушеннях поглинання фарби печінкою кількість її в сечі різко зростає;

- **проба на знешкоджувальну функцію (кофеїнова проба).** Кофеїн вводять у кров і через певний час визначають кліренс кофеїну. Зниження кліренсу кофеїну свідчить про пригнічення біотрансформаційної функції печінки;

- **з біохімічних показників:** загальний білок та його фракції; активність холестеролестерази, антитрипсину, вміст церулоплазміну, холестеролу, фібриногену, протромбіновий індекс, фібринолітична активність.

3. Індикатори мезенхімально-запального синдрому: γ -глобуліни сироватки крові, осадові проби, оксипролін (протеїн вільний та зв'язаний).

4. Індикатори холестази: підвищення активності лужної фосфатази, 5-нуклеотидази, γ -глутамілтранспептидази, вільні та кон'юговані жовчні кислоти, холестерол, β -ліпопротеїни, загальний та зв'язаний білірубін, білірубін сечі та калу.

5. Індикатори шунтування печінки: аміак, феноли, амінокислоти (тирозин, фенілаланін, триптофан, метіонін), жирні кислоти з коротким ланцюгом.

6. Індикатори регенерації та пухлинного росту: α -фетопротеїн сироватки крові.

Алгоритм досліджень функцій печінки

Діагностика захворювань печінки в клінічній практиці здійснюється на комплексній основі, яка складається із загальноклінічних, функціональних та інструментальних методів дослідження.

Біохімічні констеляції деяких захворювань ШКТ і печінки наведені в табл. 2.8.

Таблиця 2.8. Біохімічні констеляції в діагностиці захворювань печінки

Вид патології	Біохімічний тест
Вірусний гепатит	Лактатдегідрогеназа в крові Аланінамінотрансфераза в крові Аспартатамінотрансфераза в крові Коефіцієнт АсАТ/АлАТ Сорбітолдегідрогеназа в крові Білірубін («прямий» та «непрямий») Уробіліноген та білірубін у сечі Тимолова проба Електрофореграма: альбумін, α_2 - та β -глобуліни, γ -глобуліни
Цироз печінки	Альбуміни в крові γ -Глобуліни в крові Лужна фосфатаза в крові Лейцинамінопептидаза в крові Фібриноген у крові Протромбіновий час у крові Білірубін у крові Аміак у крові та сечі Тимолова проба

Механічна жовтяниця	Білірубін («прямий») у крові та сечі Лужна фосфатаза в крові Лейцинамінопептидаза в крові Глутаматдегідрогеназа в крові Жовчні пігменти в калі Уробіліноген у сечі Холестерол у крові Загальні ліпіди в крові Церулоплазмін у крові
Холецистит	Печінкові проби в крові Білірубін у крові Білірубін у сечі Уробіліноген у сечі
Хронічний персистуючий гепатит	Альбумін в крові γ-Глобуліни в крові Аланінамінотрансфераза в крові Глутаматдегідрогеназа в крові Тимолова проба в крові Білірубін у крові Лужна фосфатаза в крові Холестерол у крові
Печінкова кома	Альбумін в крові γ-Глобуліни в крові Білірубін у крові Активність «печінкових» ензимів у крові Аміак у крові та сечі Протеїн у сечі Кристали тирозину та лейцину в сечі Аміноацидурия Холестерол у крові Калій, хлориди, кальцій у крові

Діагностичний процес при захворюваннях печінки можна умовно поділити на три етапи:

Перший етап – встановлення факту ушкодження печінки. Лабораторні методи, які застосовують на першому етапі діагностики, відіграють роль відсіваючих факторів. Вони включають біохімічні та інструментальні методи дослідження.

Загальноприйнятий мінімум біохімічних показників передбачає визнання таких параметрів: білірубін сироватки крові, аланін- та аспартатамінотрансферази, лужна фосфатаза, загальний протеїн та його фракції, тимолова проба, холестерол, протромбіновий час, білірубін та

уробілін сечі. Програма-мінімум має бути розширена, якщо результати перелічених тестів нормальні або ненадійні.

На **другому етапі** діагностики головним завданням є уточнення характеру локального або дифузного ушкодження печінки, тобто постановка діагнозу. Методи, які застосовують на цьому етапі, називаються селективними.

Вони передбачають як біохімічні, так і інструментальні дослідження. При наявності гіпербілірубінемії необхідно насамперед провести диференційну діагностику жовтяниць, встановити генезис жовтяниці в конкретному випадку, особливо при нез'ясованій симптоматиці.

Третім етапом діагностики є деталізація діагнозу, тобто уточнення активності процесу, стадії захворювання, наявності ускладнень.

Оцінюють характер та глибину порушень функцій печінки, ступінь печінково-клітинної недостатності, поширеність процесу, ступінь холестазу з використанням синдромної моделі біохімічних зсувів. Цей етап лабораторних досліджень являє собою програму-максимум, що дозволяє як найповніше встановити функціональні порушення та резерви печінки. Біохімічні дослідження, виконані своєчасно (по можливості в початковий період жовтяниці), найбільш ефективні.

Питання для самоперевірки:

1. *Порушення процесів перетравлювання та всмоктування поживних речовин при запальних процесах органів травлення.*

2. *Значення біохімічних аналізів для діагностики захворювань підшлункової залози.*

3. *Найважливіші функції печінки та їх характеристика.*

4. *Основні процеси обміну вуглеводів у печінці.*

5. *Біохімічні показники та функціональні проби, які характеризують обмін вуглеводів у печінці.*

6. *Біохімічні показники, які характеризують порушення обміну ліпідів при захворюваннях печінки.*

7. *Біохімічні показники, які відображають обмін протеїнів у печінці, протеїнограми, осадові проби. Значення цих показників у діагностиці захворювань печінки.*

8. *Ензими, що є індикаторними для характеристики функціонального стану печінки. Роль визначення цих ензимів у діагностиці захворювань печінки.*

9. *Ензими, що є специфічними для обміну клітин печінки.*

10. *Основні біохімічні показники, які необхідно досліджувати при запальних захворюваннях печінки.*

11. *Основні біохімічні показники, які слід досліджувати при порушеннях відтоку жовчі.*

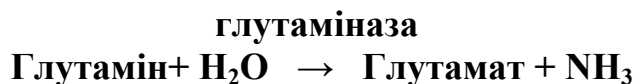
Тема 2.6. Лабораторна діагностика порушень метаболізму в нефроцитах при нефропатіях і функціональних розладах органів сечовиділення

Нирки – це парний орган, призначений для підтримання сталості внутрішнього середовища організму та виділення кінцевих продуктів обміну.

Зупинка функції нирок несумісна з життям: якщо це трапляється, тварина вмирає на 4–6-ту добу. У структурі нирок розрізняють зовнішній (корковий) шар та внутрішній (мозковий). Кожна нирка складається приблизно з мільйона функціональних одиниць – нефронів.

Тканина нирки містить багато води (близько 84 %), що вказує на високий рівень метаболічних процесів. Про високу інтенсивність окиснювальних процесів у нирках свідчить значна їх здатність поглинати Оксиген (до 10 % необхідного організму). Основним енергетичним матеріалом для роботи нирок є вуглеводи, хоча глікогену в тканині нирок незначна кількість. У них інтенсивно відбуваються гліколіз, кетоліз, аеробне окиснення і фосфорилування, що зумовлює найефективніше використання енергії та утворення найбільшої кількості АТФ. У корковій речовині нирок домінує аеробний тип обміну речовин, а в мозковій – анаеробний.

У нирках відбувається інтенсивний обмін протеїнів. Активні також процеси трансамінування й дезамінування, що супроводжуються вивільненням аміаку. Головним джерелом для його утворення є розщеплення глютаміну, який надходить у нирки з різних тканин.



Аміак дифундує крізь клітинні мембрани в просвіт канальця (в сечу), де з'єднується з протонами, утворюючи іон аміаку.

Цей механізм є одним із шляхів знешкодження аміаку. У такій формі він вже не може реабсорбуватися мембранами клітин ниркових трубочок і тому екскретується в складі сечі (NH_4Cl).

У результаті взаємодії аргініну та гліцину під впливом трансамідази в нирках утворюється гуанідинацетат, який транспортується через кров до печінки, де перетворюється на креатин. Далі креатин фосфорилується й трансформується на макроергічну сполуку – креатинфосфат, з якого при дефосфорилуванні утворюється креатинін. У сечі здорових дорослих тварин креатину в нормі немає, а є креатинін – кінцевий продукт, що екскретується із сечею.

Важлива роль у нирках належить ізоформам аланінамінопептидази (ААП). Для тканини нирок характерна ААП₃ ізоформа. ААП₃ розщеплює ди- і трипептиди, відщеплюючи N-кінцевий залишок. Поява в крові та сечі ізоензиму ААП₃ вказує на ушкодження тканини нирок. При гострих запальних процесах у нирках, насамперед, підвищується проникність

мембран клубочків, що спричиняє появу в сечі протеїну, зокрема з'являються деякі ензими або зростає вміст інших.

Нирки виконують такі функції:

- екскреторну;
- регулюють водно-сольовий баланс;
- регулюють кислотно-основну рівновагу;
- регулюють осмотичний тиск рідин організму;
- регулюють артеріальний тиск організму;
- стимулюють еритроцитопоез.

Процес утворення сечі включає: фільтрацію, реабсорбція та секрецію (рис. 2.5).

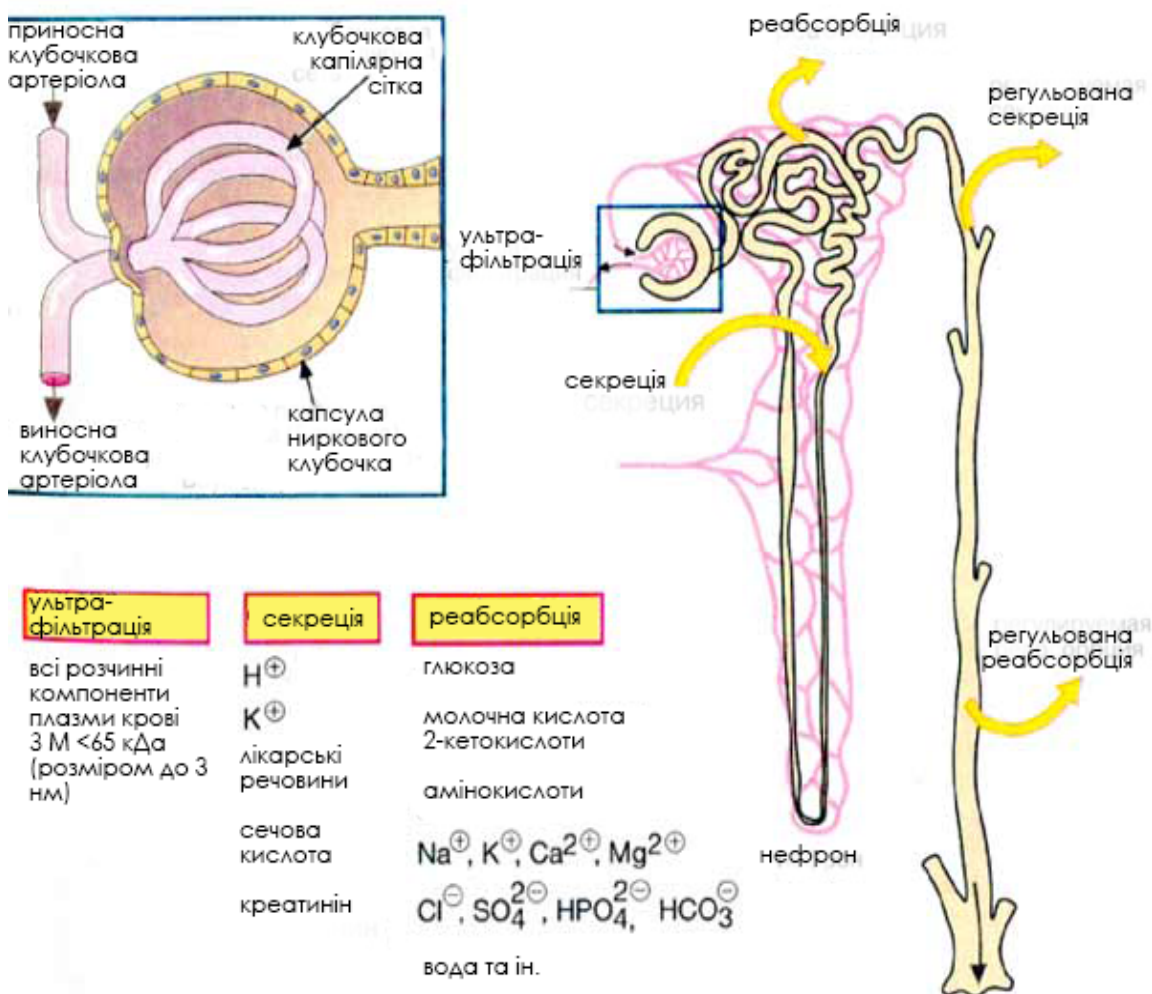


Рис. 2.5. Етапи утворення сечі в нирках

Клубочкова фільтрація води та низькомолекулярних компонентів плазми обумовлена різницею між гідростатичним тиском крові в капілярах клубочків, онкотичним тиском протеїнів плазми крові та гідростатичним тиском ультрафільтрату плазми крові в капсулі клубочка (пасивний процес).

Клубочковий фільтрат являє собою ультрафільтрат плазми (первинна сеча), тобто практично однаковий з плазмою за складом, за винятком майже повної відсутності протеїнів. Це пов'язано з тим, що ендотелій утворює бар'єр для лейкоцитів та еритроцитів крові, а базальна мембрана, яка

проникна для води й низькомолекулярних речовин, непроникна для більшості макромолекул. Протеїни з молекулярною масою меншою, ніж в альбуміну (68000 Да), проходять крізь мембрану.

Швидкість клубочкової (гломерулярної) фільтрації в нормі становить приблизно 120 мг/хв, що еквівалентно 180 дм³/добу. Однак при цьому за добу утворюється лише 1–2 дм³ сечі (залежно від кількості вжитої рідини); основна кількість фільтрату реабсорбується в нефроні.

За добу епітелій канальців зворотно всмоктує (*реабсорбує*) значну кількість речовин: 179 дм³ води, 1 кг NaCl, 500 г NaHCO₃, 250 г глюкози, 100 г вільних амінокислот.

Зворотного всмоктування не зазнають сечовина, сечова кислота, креатинін, парні сполуки та інші кінцеві продукти обміну, які не потрібні організму. Отже, другим етапом сечоутворення є *реабсорбція*

Крім реабсорбції, у канальцях відбувається ще й *додаткова секреція* лугів, кислот, деяких пігментів, лікарських речовин тощо. Унаслідок цих процесів, тобто зворотного надходження речовин, а також додаткової секреції, первинна сеча поступово перетворюється на вторинну. Ця сеча вже істотно відрізняється за своїм складом від плазми крові. До складу вторинної сечі входить понад 200 речовин (азотистих та безазотистих), зокрема: сечовина, сечова кислота, креатинін, ензими, вітаміни, гормони, пігменти (урохром, урехромоген, уроеритран, уробілін); амінокислоти (глутамінова, аспарагінова кислоти, глутамін, гістидин); кон'югати (гіпурова, фенацетурова, індоксил-сульфатна кислоти, індикан); солі амонію, натрію, калію, кальцію, магнію; неорганічні (хлороводнева, фосфатна, сірчана) та органічні (щавлева, глюкуронова, янтарна) кислоти; солі органічних кислот (оксалати, урати); мікроелементи (йод, кобальт, цинк, залізо, мідь), феноли та їх етери; нейтральна сірка та ін.

Для оцінки стану очищення організму від цих речовин існує показник клубочкової фільтрації, так званий *кліренс* (очищення).

Кліренс будь-якої речовини виражають кількістю (см³) плазми крові, яка очищується від речовин (зокрема продуктів обміну) за 1 хв при проходженні через нирки.

Речовинами, за якими визначають клубочкову фільтрацію, є сечовина, креатинін, інулін (полімер фруктози), манітол.

Кліренс визначають за формулою:

$$C = K_c / K_{пл} \cdot V, \text{ де}$$

C – кліренс; *K_c* – концентрація речовини в сечі, мг%; *K_{пл}* – концентрація речовини в плазмі, мг%; *V* – кількість сечі, см³ за 1 хв.

Чітке зниження клубочкової фільтрації при запальних захворюваннях нирок (нефритах) супроводжується зменшенням виділення з організму кінцевих продуктів обміну речовин, зокрема сечовини, сечової кислоти, креатиніну та інше, що призводить до так званої азотемії (підвищення концентрації цих компонентів у сироватці крові).

Нирки також виконують внутрішньосекреторні функції. Вони здійснюють контроль рівня артеріального кров'яного тиску (рис. 2.6).

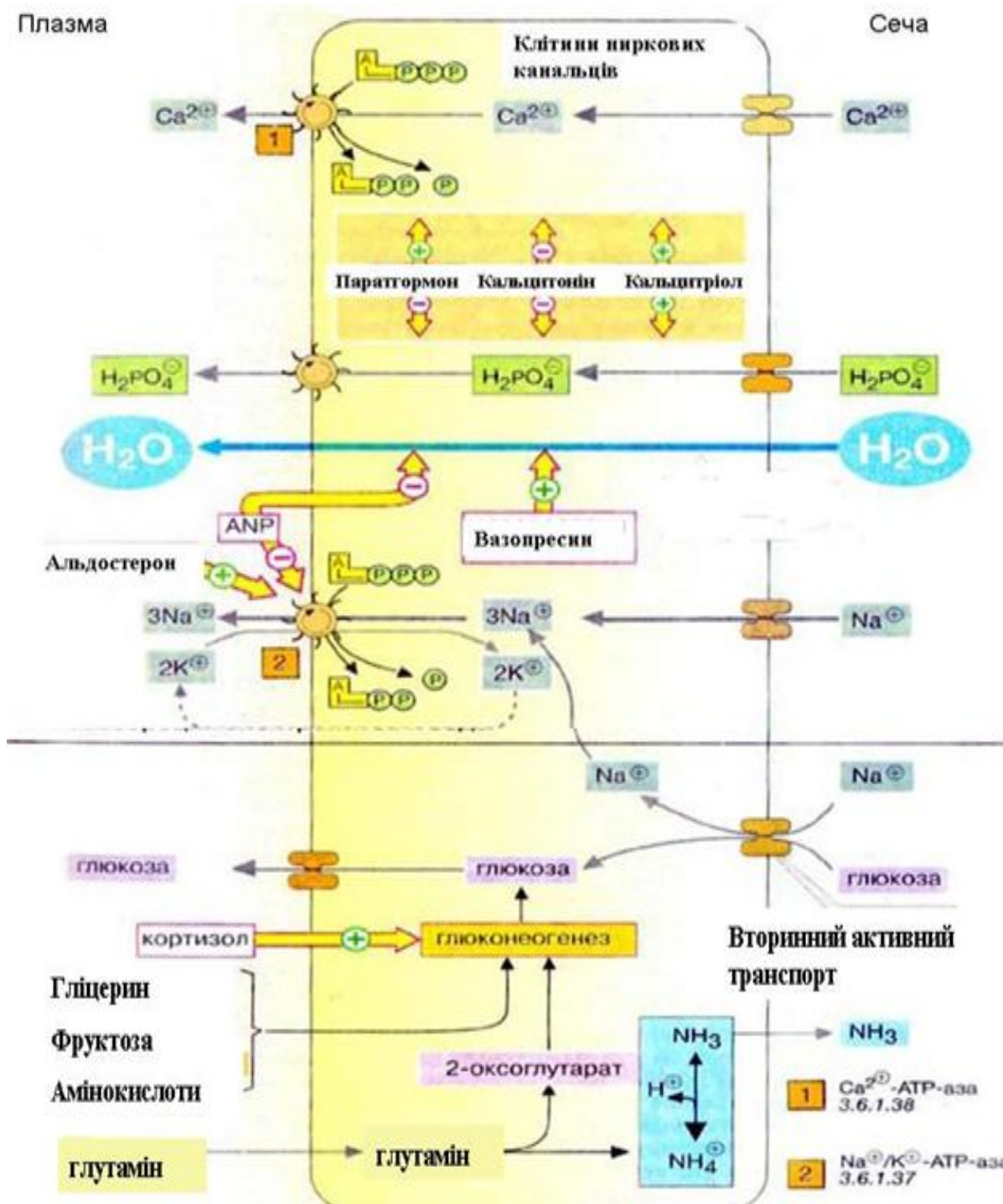


Рис. 2.6. Регуляція процесу сечоутворення в нирках

Порушення водно-сольового обміну призводять до змін функціонування ренін-ангіотензинової системи. Синтезовані в нирках простагландини змінюють чутливість ниркових клітин до дії певних гормонів.

У нирках синтезується також еритропоєтин, який стимулює кісткомозковий еритроцитопоез. Синтез еритропоєтину зумовлюється крововтратами, шоком, гіпоксією тощо.

Значення компонентів системи залишкового азоту для оцінки стану та функціонування нирок

Залишковий азот – небілковий азот, який залишається у центрифугаті сироватки крові (або в іншій біологічній рідині) після осадження протеїнів під дією трихлороцтової кислоти або інших осадників.

До складу залишкового азоту, вміст якого в нормі становить 0,20–0,40 г/дм³ (14–28 мМ), входять азот сечовини, амінокислот, креатину, креатиніну, сечової кислоти та інших продуктів обміну протеїнів.

До низькомолекулярних азотовмісних компонентів плазми відносять і оксид азоту (N₀), який розглядається як «*ендотеліальний фактор релаксації*».

Визначення компонентів залишкового азоту широко застосовується для діагностики патології сечовидільної системи, для оцінки характеру і ступеня вираженості азотемії.

У порівнянні з іншими фракціями залишкового азоту концентрація сечовини при патологіях нирок зростає швидше, ніж креатиніну.

Ниркова недостатність діагностується лише тоді, коли концентрація сечовини в сироватці крові тривалий час стабільно перевищує верхні межі норми (8,3 мМ).

При ураженні м'язів (міозити, міопатії) можливі низькі показники концентрації сечовини на фоні значно підвищеної концентрації креатиніну. Якщо кількісні характеристики сечовини й креатиніну нерівнозначні, необхідно визначати концентрацію сечової кислоти, підвищення якої вказує на порушення функції нирок.

Розрізняють два види азотемії – абсолютну та відносну. *Абсолютна азотемія* є наслідком накопичення в крові азотистих шлаків.

Абсолютна азотемія буває *ретенційна*, коли із сечею виділяється недостатньо секретованих в кров азотовмісних речовин.

Іншим видом є *продукційна азотемія*, що виникає внаслідок надлишкового надходження продуктів розпаду протеїнів будь-яких тканин. При цьому концентрація сечовини в сироватці крові не перевищує 8–10 мМ, а збільшення її концентрації уповільнюється порівняно з іншими азотовмісними метаболітами (нітрогеном амінокислот, аміаком, сечовою кислотою, креатином, креатиніном, пептидами).

Азотемії бувають *ниркові* та *позаниркові*. При ниркових азотеміях концентрація сечовини в сироватці крові більш підвищена (>13–14 мМ). Її вміст прямо пропорційний ступеню патології.

Ниркова азотемія спостерігається при «шоковій», «токсичній», «гострій інфекційній» нирці, ураженні капілярів нирок (гострий гломерулонефрит, гострий пієлонефрит), обтурації сечових шляхів.

Хронічний пієлонефрит, хронічний гломерулонефрит, амілоїдоз нирок, нефроангіосклероз характеризуються повільним розвитком азотемії. Важливе значення в таких випадках має прогресуюча азотемія (підвищення концентрації сечовини в 5–10 разів).

Позаниркові азотемії розвиваються при декомпенсації серцево-

судинної системи, зневодненні, блюванні, непрохідності, кровотечах, інфекційному гепатиті, діабеті, шоку, опіках. Проте азотемія при цьому не перевищує 13 мМ.

Характерною рисою ретенційної азотемії є різке підвищення рівня сечовини в складі залишкового азоту. У здорової тварини цей рівень не перевищує 50 %, а при ретенційній азотемії зростає до 90 %.

Відносна азотемія спостерігається при зневодненні організму та згущенні крові внаслідок блювання, проносів, обширних опіків тощо. Істотного діагностичного значення відносна азотемія не має.

Концентрація сечовини в сироватці крові може бути нижчою за норму тільки при важких ушкодженнях печінки (гострому некрозі, комі, цирозі, інтоксикації солями важких металів) та коли гіпоазотемія настає після гіперазотемії за рахунок сечовини. Це означає, що виникає гепаторенальний синдром, тобто до патології нирок приєднується патологія печінки.

Патологічні стани нирок. Захворювання нирок – дуже поширена патологія, яка спостерігається в 7–10 % дорослих тварин. Ураження нирок може бути самостійним або виникає на фоні будь-якого іншого захворювання.

Необхідно зазначити, що при нефрологічних захворюваннях лабораторна діагностика має винятково важливе значення (табл. 2.9).

Найбільш поширені захворювання нирокта їх біохімічні констеляції

Гострий гломерулонефрит – гостре імунозапальне захворювання, при якому насамперед уражений клубочковий апарат обох нирок.

Біохімічні зміни схематично відображають так:

у сироватці – ↑ креатинін, сечовина; холестерол (незначно),

↓ загальний протеїн;

у сечі – ↑ протеїн.

Хронічний гломерулонефрит – запальне захворювання обох нирок, яке виникає внаслідок перенесеного гострого стрептококового нефриту та інших системних захворювань.

Біохімічні зміни:

у сироватці – без суттєвих змін, а в сечі з'являється протеїн.

Хронічний пієлонефрит – інфекційно-запальне захворювання, при якому в запальний процес включаються не тільки миски, а й сама ниркова тканина.

Такі захворювання проявляються у фазах загострення або ремісії.

Умовні позначення:

↑ – підвищення концентрації (активності);

↓ – зниження концентрації (активності);

«+» – поява в плазмі (сечі);

Таблиця 2.9. Біохімічні тести функцій нирок

№ з/п	Показник	Зміни концентрації (активності) показника при патології	
		у плазмі крові	у сечі
1.	Креатинін [*]	↑ патологія нирок, гостра та хронічна ниркова недостатність, обтурація сечових шляхів, діабетичне ураження нирок; ↓ зменшення м'язової маси	↑ ретенційна азотемія, недостатність функції нирок; ↓ дегенерація нирок, амілоїдоз нирок, міопатії, міозити, міоглобінурія, кахексія
2.	Сечовина ^{**}	↑ патологія нирок, гостра та хронічна ниркова недостатність, ниркова гіпертонія, обтурація сечових шляхів; ↓ порушення всмоктування протеїну	↓ гостра та хронічна ниркова недостатність, уремія, нефрит у період новонародженості, вагітність
3.	Сечова кислота	↑ подагра, ниркова недостатність, полікістоз нирок, хронічна свинцева нефропатія; ↓ гепатоцеребральна дистрофія, деякі злоякісні новоутворення	↑ лейкоз, подагра, цистиноз; ↓ ксантинурія, свинцева інтоксикація
4.	Трансамінідаза	«+» ураження нирок (хронічний пієлонефрит, хронічний нефрит, нефротичний синдром)	-
5.	Аланінамінопептидаза (ААП ₃)	«+» ураження ниркової тканини (гломерулонефрит, інфаркт нирки)	
6.	Лактатдегідрогеназа (ЛДГ _{1,2})	↑ гостра ниркова недостатність	-
7.	Лужна фосфатаза	↑ хронічний гломерулонефрит і хронічний пієлонефрит	-
8.	γ-Глутаміл-транспептидаза	↑ хронічний гломерулонефрит і хронічний пієлонефрит	-

Примітки:

*1) креатинін не є чутливим показником захворювання нирок на ранній стадії їх ушкодження;

2) на концентрацію креатиніну в плазмі крові не впливає характер корму;

3) збільшення концентрації креатиніну спостерігається пізніше і стабільніше порівняно з концентрацією сечовини;

4) підвищення величини співвідношення піруват/креатинін спостерігається при порушенні функції нирок

**1) концентрація сечовини збільшується з віком та залежить від вмісту протеїну в кормі;

2) ниркова недостатність діагностується тоді, коли вміст сечовини перебуває тривалий час на стабільному рівні, який перевищує 8 мМ;

3) при ураженнях м'язів (міозити, міопатії) може спостерігатися зменшена концентрація сечовини на тлі значного підвищення – креатиніну.

Біохімічні зміни:

у сироватці – ↑ креатинін, потім ↑ сечовина; залишковий азот, сечова кислота, глюкоза, ↓ натрій, хлор;

у сечі – ↓ сечова кислота.

Гостра ниркова недостатність – гостре порушення основних функцій нирок (фільтраційної, екскреторної, секреторної), що виникає внаслідок патологічного впливу на її паренхіму зовнішніх та внутрішніх факторів.

Біохімічні зміни:

у сироватці – ↑ калій, магній, аміак; сечова кислота та індикан (незначно);

у сечі – ↑ протеїн.

Хронічна ниркова недостатність – прогресуюче захворювання, яке обумовлене погіршенням функції клубочків та каналців до стану, при якому нирки не підтримують гомеостаз (сталість внутрішнього середовища організму).

Біохімічні зміни:

у сироватці – ↑ креатинін, сечовина, сечова кислота; ↑ калій, хлор, фосфати, магній; ↓ кальцій, рН;

у сечі – ↓ сечовина.

Нефротичний синдром – стан, який характеризується комплексом клініко-лабораторних змін, що спостерігаються як при первинних захворюваннях (гломерулонефриті, піелонефриті), так і при вторинних ураженнях нирок (колагенозах, цукровому діабеті та ін.).

Біохімічні зміни:

у сироватці – ↓ α-глобуліни; ↑ γ-глобуліни, ліпіди;

у сечі – ↑ протеїн.

Нефроз – захворювання нирок з дегенеративними змінами епітелію ниркових каналців та базальної мембрани капілярних петель клубочків і порушенням обмінних процесів – водно-сольового, протеїнового, холестеринового та ін.

Біохімічні зміни:

у сироватці – ↓ загальний протеїн, альбуміни, α-глобуліни, ↑ γ-глобуліни, ліпіди; ↑ гіалуронідаза;
у сечі – ↑ протеїн.

Нефросклероз – патологічний процес у нирках, обумовлений склеротичними ураженнями ниркових артеріол, розростанням сполучної тканини, атрофією паренхіми.

Біохімічні зміни:

у сироватці – ↑ ренін, ангіотензин II, ↑ залишковий азот, хлориди;
у сечі – ↑ протеїн (незначно).

Амілоїдоз нирок – захворювання, при якому в усіх структурах нирок відбувається відкладення амілоїду (патологічного протеїну), що викликає порушення їх функцій та розвиток хронічної ниркової недостатності.

Біохімічні зміни:

у сироватці – ↓ загальний протеїн, альбуміни; ↑ холестерол, β-ліпопротеїни, триацилгліцероли;
у сечі – ↑ протеїн, γ-глобуліни, фібриноген, потім глюкозурія; ↑ амінокислоти, калій.

Лабораторна діагностика при захворюваннях сечовидільної системи є одним із найскладніших видів діагностики і базується на використанні різних методичних заходів, спрямованих на встановлення складових сечі та оцінку загального біохімічного статусу хворого (рис. 2.6).



Рис. 2.6. Моделі автоматичних біохімічних аналізаторів сечі

Патологічні компоненти сечі

До основних патологічних складових сечі належать протеїни, вуглеводи, кетонові тіла, жовчні та кров'яні пігменти.

Протеїни. Здорова тварина за добу виділяє із сечею до 30 мг протеїну, який звичайними лабораторними методами не виявляється. Як правило, із сечею виділяються низькомолекулярні протеїни плазми крові або інших тканин і органів. Підвищення вмісту протеїну в сечі дозволяє визначати їх звичайними лабораторними методами і свідчить про патологічний стан. При цьому вміст протеїну в сечі зростає переважно за рахунок протеїнів плазми крові або клітин сечовивідних шляхів, тобто виникає протеїнурія.

Протеїнурія може бути *ниркова (ренальна)*, яка виникає при органічному ураженні нефрона, та *позаниркова (постренальна)*, яка є результатом ураження сечовивідних і статевих шляхів (поява домішок запального ексудату).

Запальні процеси нирок (гломерулонефрити) супроводжуються підвищенням проникності базальних мембран клубочків нейрона. При нефрозах порушується реабсорбція низькомолекулярних протеїнів (мієлома або макроглобулінемія), що зумовлює вихід протеїнів у сечу.

Незважаючи на впровадження кліренсових, інструментальних та морфологічних методів, лабораторне дослідження сечі відіграє важливу роль у діагностиці й лікуванні ренальної та екстраренальної патології. Одним з найчастіших симптомів захворювання нирок є протеїнурія (поява протеїну в сечі).

Концентрація протеїну в сечі, його якісні характеристики визначаються функціональним станом гломерулярного бар'єру та каналцевого апарату, особливостями геодинаміки, концентрацією та якісним складом протеїнів плазми.

Глюкоза. Сеча здорової тварини містить незначну кількість глюкози, яку звичайними лабораторними методами не виявляють.

Підвищення кількості глюкози в сечі (глюкозурія) може спостерігатися тоді, коли вміст її в крові перевищує 8–9 мМ (нирковий поріг глюкози). Але в деяких випадках глюкозурія може виникати при нормальній концентрації глюкози в крові. Це так звана ниркова глюкозурія, яка є наслідком порушення зворотного всмоктування глюкози в ниркових каналцях.

Розрізняють кілька видів глюкозурії:

- **фізіологічну** (при надходженні з кормом великої кількості вуглеводів, після емоційного напруження);
- **позаниркову** (цукровий діабет, цироз печінки, панкреатит, рак підшлункової залози, тиреотоксикоз, синдром, отруєння чадним газом, морфіном, хлороформом);
- **ниркову** (хронічні нефрити, нефрози, амілоїдоз, гостра ниркова недостатність, отруєння фосфором).

Глюкозурія відзначається при цукровому і стероїдному діабеті, гіперфункції щитовидної залози. У хворих на цукровий діабет вміст глюкози в сечі може зрости до 5–10 %.

Кетонові тіла (ацетон, ацетооцтова та β -оксимасляна кислота). У нормі в сечі ці сполуки зустрічаються в дуже малій кількості (не більше 0,01 г за добу) і не виявляються звичайними якісними пробами.

При виведенні великої кількості кетонових тіл якісні проби позитивні – це явище патологічне, бо свідчить про кетонурію.

Кетонурія можлива при цукровому діабеті, голодуванні, надмірному вживанні жирів тощо.

Окрім біохімічних показників, які характеризують стан ниркової тканини, важливе клініко-діагностичне значення має також хімічний показник рН сечі.

Норма рН сечі знаходиться в інтервалі 5,0–7,0 і залежить від виду тварин.

Кисла реакція сечі (рН < 5,0) спостерігається:

- за фізіологічних умов (у м'ясоїдних тварин);
- при респіраторному і метаболічному ацидозі (діабетичній комі, серцевій недостатності);
- гострому нефриті;
- подагрі;
- туберкульозі нирки.

Лужна реакція сечі (рН > 7,0) спостерігається:

- за фізіологічних умов (у трав'яїдних тварин);
- метаболічному й респіраторному алкалозі (після частого блювання, при розсмоктуванні набряків);
- активних запальних процесах у сечових шляхах;
- хронічній нирковій недостатності.

Лужна реакція сечі спостерігається під час запальних процесів у сечовивідних шляхах. Зміна реакції сечі від слабокислої до слаболужної є сигналом для детального обстеження стану нирок та сечовидільної системи. Слід пам'ятати про те, що лужна сеча може виділятися під впливом лікарських препаратів.

Кислотність сечі визначають за допомогою тест-смужок, наприклад, «рН-тест». Показники глюкозурії, кетонурії, рН сечі легко визначати з використанням тест-смужок «Глюкотест», «Ацетон-тест», «рН-тест».





Сечокам'яна хвороба – захворювання нирок та сечовивідних шляхів, пов'язане з утворенням у нирковій паренхімі, мисці, сечовому міхурі каменів, які формуються із складових елементів сечі.

Спричиняють сечокам'яну хворобу порушення обмінних процесів, вади анатомічного розвитку сечовивідних шляхів, спадкові нефрозо- та нефритоподібні синдроми.

До зовнішніх чинників відносять кліматичні й геохімічні умови, особливості раціону, які впливають на склад сечі та її рН. Існують ензоотичні спалахи, за яких сечокам'яна хвороба зустрічається особливо часто, певне значення має гіперфункція паращитоподібних залоз, які викликають порушення фосфорно-кальцієвого обміну.

Причини виникнення сечових каменів вивчені недостатньо, але кілька факторів, що сприяють їх утворенню, відомі: це вплив мікроорганізмів, застій сечі, наслідок травм нирок або сечовивідних шляхів, результати природжених аномалій, які сприяють затриманню сечі, створюючи тим самим умови для кристалізації солей. Сприяють виникненню каменів висока концентрація в сечі одного або кількох компонентів клубочкового фільтрату, яка обумовлена зменшенням діурезу, високою швидкістю екскреції речовин, що утворюють камінь, або порушенням нормальної реабсорбції речовин із фільтрату; зміни величини рН сечі. Важливе значення у формуванні сечових каменів мають утворення органічної основи та кристалізація солей на ній. Такою основою можуть бути уромукоїди, виділені клітинами каналців, гліко- та мукопротеїни, які мають лужну реакцію, тому спричиняють розвиток уроциститу. Останні з'єднуються з кальцієм, утворюючи матрикс, на який потім осідають солі. Утворенню органічної основи ниркових каменів сприяють запальні процеси в нирках.

Кристалізація солей на органічному матриксі виникає внаслідок порушення співвідношення між кристалами мінеральних речовин і захисними колоїдами, що містяться в сечі. До останніх належать високосульфатовані глікозаміноглікани, зокрема гепаран-сульфати і хондроїтинсульфати, муцини й сироватковий альбумін. При патологічних процесах концентрація в сечі

речовин, які виконують роль захисних колоїдів, зменшується, що є однією з причин кристалізації солей на органічній матриці.

Спільною в структурі сечових каменів є наявність так званого ядра, навколо якого розташована оболонка, або тіло каменя. Більшість ниркових каменів (у тварин приблизно 70–90 %) є кальцієвими солями фосфатної та щавлевої кислот відповідно. Частина каменів (10–15 %) представлена магнієвими та амонійними солями фосфатної кислоти – струвітами. Приблизно така ж частка натрієвих солей сечової кислоти (уратів).

Уратні камені складаються найчастіше з сечової кислоти, рідше – з її амонієвої або натрієвої солі. Вирішальне значення в їх утворенні має величина рН сечі, оскільки при її зниженні до 5,0 зменшується розчинність сечової кислоти – вона становить лише 60 мг/дм³, а при рН = 7,0–1600 мг/дм³. Уратні камені часто утворюються при лейкопенії та поліцитемії, коли різко зростає ендогенне утворення сечової кислоти в результаті розпаду нуклеопротейнів.

Утворенню каменів з кальцію, магнію і амонію фосфатів (фосфатні камені), а також кальцію карбонату сприяє зміна величини рН сечі в сечовому міхурі та ниркових мисках у лужний бік, що є наслідком розкладання сечовини до аміаку уреазою деяких мікроорганізмів (синьогнійна паличка, стафілокок).

Дуже важливо досліджувати рН сечі: при уратах реакція – кисла, оксалатах – слабокисла, фосфатурії – лужна. Визначення кристалів у сечі характеризує хімічний склад каменів.

При захворюваннях нирок і сечовивідних шляхів застосовують багато препаратів, які впливають на функцію цієї системи. Особливу увагу слід приділяти дії нефротоксичних речовин, які впливають на структуру й функції нирок (табл. 2.10).

Таблиця 2.10. Вплив ксенобіотиків на функцію нирок

Ксенобіотик	Дія (ефект)
Лікарські препарати	
Адіурекрин	Антидіуретична
Дезокискортикостерону ацетат	Затримує рідину, Na ⁺ , СГ, сприяє виведенню K ⁺
Гіпотіазид (ті азидний діуретик) Фуросемід («петльовий» діуретик)	Пригнічують реабсорбцію Na* та води в каналцях нефрона
Верошпірон (діуретик)	Зменшує проникність мембран дистальних каналців, виводить Na ⁺ , затримує K ⁺
Фітолізин (рослинний препарат)	Посилює кровообіг у нирках
Теофілін, еуфілін	Посилюють нирковий кровообіг та процеси клубочкової фільтрації

Кофеїн	Розширює судини нирок, посилює клубочкову фільтрацію, що призводить до помірного діуретичного ефекту
Карбамід (сечовина)	Знижує реабсорбцію води
Інтерферон	Призводить до протеїнурії, зрідка підвищує рівень сечовини та сечової кислоти в плазмі крові
Антибактеріальні препарати (тетрацикліни, стрептоміцин, гентаміцин, бісептол, оксацилін, поліміксини, цефалоспорини, еритроміцин та ін.)	Нефротоксична
Анальгетики (амідопірин, бутадіон, індометацин, саліцилати, фенацетин)	Нефротоксична
Амінокапронова кислота Декстрин Манніт Хінін Рентгеноконтрастні засоби	Нефротоксична
Токсичні речовини	
Важкі метали (залізо, золото, кадмій, кадмій, миш'як, олово, срібло, талій, уран, ртуть)	Викликають некроз ниркової тканини внаслідок денатурації протеїнів базальної мембрани (наприклад, «сулемова нирка»)
Побутова хімія (галогенопохідні інгібітори сполуки – дихлофос, хлорофос, інсектициди, ДДТ (дуст); органічні розчинники – бензол, вуглецю тетрахлорид, тетрафторетилен, етиленгліколь).	Інактивують ензимні системи нирок; виявляють нефротоксичність

Питання для самоперевірки:

1. Структурно-функціональні особливості нирок.
2. Особливості обміну речовин у нирках.
3. Механізм сечоутворення.
4. Кліренс: поняття і практичне значення.
5. Патологічні стани, викликані порушенням функції нирок.
6. Характеристика компонентів залишкового азоту.

7. *Ниркова регуляція тиску крові.*
8. *Біохімічні тести при ниркових патологіях.*
9. *Властивості й склад сечі.*
10. *Протеїнурія: визначення, форми, механізм виникнення.*
11. *Патологічні складові сечі.*
12. *Глюкозурія: визначення й форми.*
13. *Значення рН сечі.*
14. *Клініко-діагностична характеристика сечокам'яної хвороби.*
15. *Ксенобіотики, що впливають на ниркову функцію.*

Тема 2.7. Порушення водно-електролітного обміну і кислотно-лужного стану організму тварин та їх лабораторна діагностика

Для нормальної життєдіяльності організму, крім органічних речовин, необхідні також неорганічні компоненти. До останніх відносять воду і мінеральні елементи.

Вода – найзначніша щодо кількості складова частина організму. На її частку припадає близько 60 % маси тіла у самців і 55 % – у самок.

Уся вода, що є в організмі, поділяється на внутрішньоклітинну й позаклітинну, кожна з яких існує у вигляді двох фракцій:

- а) фракція води, здатна до обміну;
- б) фракція води, зв'язана в колоїдних системах із молекулами органічних речовин (білків, жирів, вуглеводів).

Близько 66 % усієї води організму входить до складу внутрішньоклітинної рідини і 34 % знаходиться позаклітинами. Позаклітинна вода є основою внутрішньосудинних рідин (лімфи, плазми крові) та міжклітинної рідини.

Вода бере участь:

- у формуванні внутрішньоклітинних структур;
- формуванні просторових конформацій молекул протеїнів (вторинної, третинної);
- багатьох біохімічних реакціях гідролізу, гідратації, окиснення, відновлення та ін.;
- здійснює транспортну функцію за рахунок високої розчиної здатності та текучості;
- бере участь у виведенні з організму продуктів розпаду;
- є середовищем для здійснення майже всіх хімічних реакцій в організмі;
- бере участь у теплорегуляції шляхом випаровування з легень і з поверхні шкіри;
- здійснює механічну функцію – є компонентом змащування тертьових поверхонь у суглобах, додає пружності хрящам і міжхребцевим дискам;
- є компонентом секретів організму: поту, сечі, слини, молока тощо.

Уміст води в різних секретах і тканинах організму дорівнює: у потовій рідині – 99 %, сечі – 97, еритроцитах – 65, крові – 80; м'які тканини містять 75–84, жирова тканина – 40, кісткова – 20–30, зубна емаль – 2–3 %.

Тканини й клітини використовують два види води: екзо- та ендогенну.

Потреба організму у воді залежить від віку, інтенсивності обмінних процесів, м'язової діяльності, функціонального стану нирок, температури навколишнього середовища, складу корму. У дорослих вона складає в середньому 40 г на 1 кг маси тіла, для новонароджених та молодняка тварин ця величина приблизно втричі вища – від 70 до 150 г на 1 кг маси тіла. За добу до організму в нормальних умовах надходить близько 2,5 дм³ води, включаючи екзо- й ендогенну. Остання засвоюється в організмі при розпаді протеїнів, вуглеводів і особливо жирів. При окисненні 100 г жиру утворюється 107 см³ води, 100 г протеїну – 41 см³ води, 100 г вуглеводів – 55 см³ води.

Усмоктування води, що надходить з кормом, відбувається по всьому шлунково-кишковому тракту: невелика кількість води всмоктується в ротовій порожнині й стравоході, частина – у шлунку, частина – у товстому кишечнику, основна маса – у тонкому кишечнику.

Вода з поживними речовинами шляхом дифузії та осмосу, а частково піноцитозу й активного транспорту, проникає всередину епітелію слизових оболонок кишечника. Ендоплазматичною мережею вона переміщується в клітинах і надходить у міжклітинний простір, потім у міжклітинну рідину, капіляри, венули, підепітеліальну і підслизову венозні сітки кишкової ворсинки, ворітну вену, печінку й велике коло кровообігу. Частина води надходить через лімфатичну систему.

Виведення води з організму здійснюється із сечею, калом, потом і видихуванням повітрям.

Нирки є основним органом виведення води й електролітів з організму.

У звичайних умовах за добу виділяється через шкіру та нирки майже 500 см³ води, через легені – до 400 см³ і через кишечник – приблизно 100 см³. Уся вода організму оновлюється приблизно за 4 тижні. За 1 хв вода крові встигає оновитися на 73 %.

Регуляція водно-мінерального обміну. Забезпечується вона ЦНС, ендокринною системою і нирками, однак провідну роль відіграє ЦНС. Дія гормонів полягає в тому, що вони змінюють проникність клітинних мембран для води, викликаючи її виділення чи реабсорбцію.

Вазопресин – антидіуретичний гормон гіпоталамуса, що депонується в задній частці гіпофіза, а клітинами-мішенями цього гормону є стінки дистальних каналців нирок, де він активізує вироблення гіалуронідази, яка деполімерізує гіалуронову кислоту, підвищуючи таким чином проникність каналців.

Вазопресин зменшує виведення води з організму завдяки реабсорбції її з первинної сечі в ниркових каналцях. Вода, затримуючись, знижує осмотичний тиск, при цьому припиняється секреція вазопресину. Гіперпродукування гормону призводить до накопичення рідини в організмі та

набряку, а гіпопродукування викликає посилене виділення рідини з організму, аж до сечовиснаження (нецукровий діабет), коли кількість сечі може досягати 20 дм³ за добу.

На обмін води впливає також гормон альдостерон, що секретується клубочковим шаром кори надниркових залоз. Його дія пов'язана з впливом на рівень Натрію в плазмі крові. Зниження концентрації натрію спричиняє падіння осмотичного тиску плазми й посилення втрати води з організму. Гіпонатріємія стимулює секрецію альдостерону; він підсилює зворотне всмоктування натрію в нирках і, отже, сприяє утримуванню води в організмі. Гіпернатріємія гальмує виділення альдостерону.

Нирки беруть участь у регуляції кількості води в організмі своїми фізіологічними функціями – процесами фільтрації та реабсорбції води й мінеральних солей, синтезом і секрецією ряду речовин.

У нирках продукується ензим ренін. Його секреція підсилюється при зменшенні кількості внутрішньосудинної рідини та зниженні артеріального тиску. Ренін сприяє мобілізації в судинне русло тканинної рідини й нормалізації артеріального тиску, необхідного для фізіологічного проходження процесів фільтрації сечі в нефроні.

Тиск, необхідний для врівноваження осмотичного руху рідини через мембрану, що володіє вибірковою проникністю, носить назву осмотичного тиску. Його величина непрямо відображає вміст води і концентрацію розчинених у ній речовин. Осмотичний тиск прямо пропорційний концентрації осмотично активних частинок у розчині. Осмотичний ефект однієї молекули натрію хлориду вдвічі перевищує такий же ефект молекули альбуміну. Підвищення осмотичного тиску вказує на збільшення концентрації розчинених речовин і зниження концентрації води в розчині. Осмоляльна концентрація розчину називається осмоляльністю і виражається числом осмолей на кілограм води. При визначенні осмоляльності біологічних рідин (плазма, сеча) зазвичай як одиницю використовують міліосмоль (мосм), рівний 1/1000 осмоля. Осмоляльність, що виражається числом осмолей на літр розчину, в разі біологічних рідин повністю відповідає осмоляльності, і обидва терміни взаємозамінні. Осмоляльність визначають для виявлення клінічно важливих змін водного балансу організму в цілому. Осмотичний тиск розчину пропорційний його осмоляльності за рахунок концентрації розчинених речовин. Більш ніж 90 % з них у позаклітинній рідині представлені натрієм і хлоридом. Концентрація циркулюючого в крові натрію в цілому є показником осмоляльності плазми. Для розрахунку осмоляльності може бути використане визначення концентрації натрію в кровотоці разом з визначенням двох головних неелектролітів, що впливають на осмоляльність – глюкози і сечовини. Розраховану осмоляльність (мосм/кг) складають: натрій (подвоєна концентрація, ммоль/л) плюс глюкоза (ммоль/л) плюс сечовина (ммоль/100 см³). Концентрацію натрію (у ммоль/л) визначають шляхом ділення вмісту натрію (виражене в мекв/л) на 1, глюкози (мг/100 см³) на 18 і сечовини (мг/100 см³) на 2,8. Відмінність між виміряною осмоляльністю і розрахованою осмоляльністю відображає присутність невеликої кількості

циркулюючих речовин, визначених при прямому вимірюванні, але, які не включаються в розрахунок. Ця відмінність, або дефіцит осмоляльності, відносно стала величина. Відмінність, що перевищує 10 мосм/кг, вказує на присутність чужорідних речовин, з яких заслуговують на увагу етиленгліколь, етанол і метанол.

Розподіл рідини між внутрішніми і позаклітинними компартментами насамперед визначається осмотичним ефектом електролітів, особливо натрію і хлориду (рис. 2.7). Клітинні мембрани непроникні для цих невеликих іонів, які впливають на переміщення води через мембрани, підтримуючи ізотонічність.

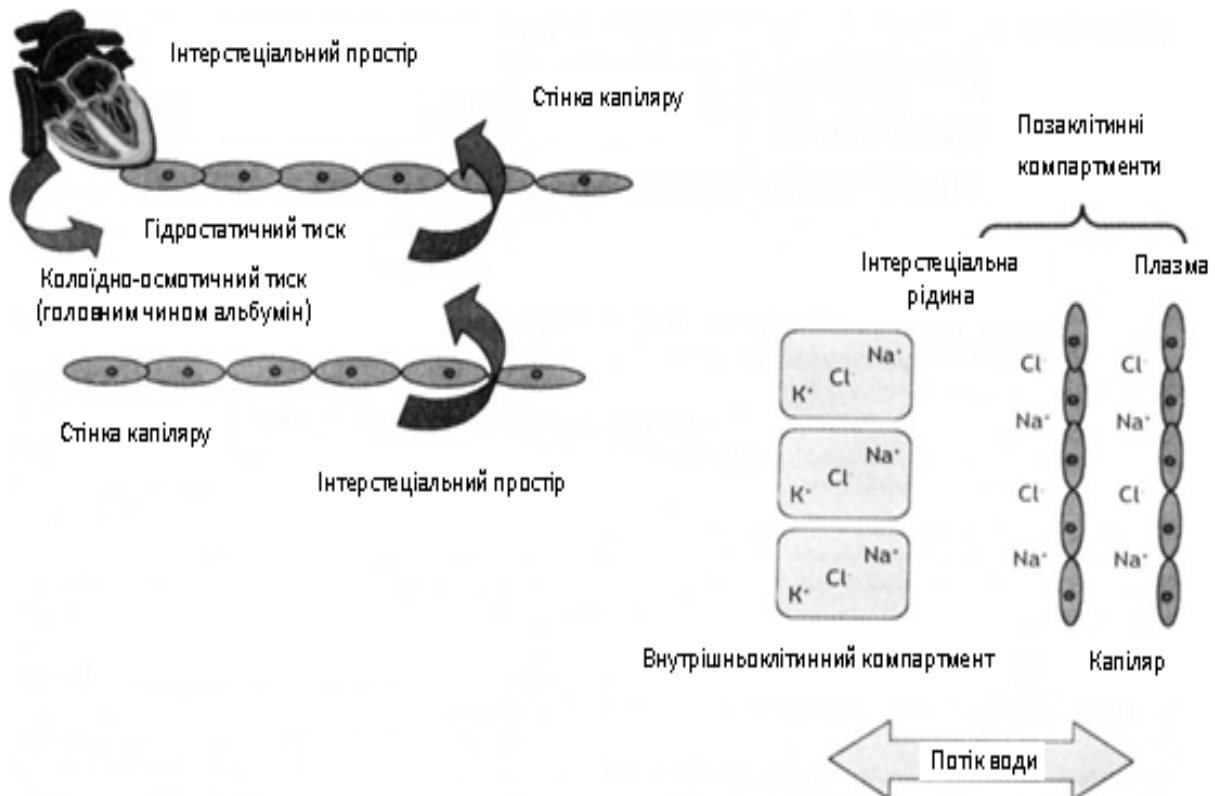


Рис. 2.7. Баланс гідростатичного і колоїдно-осмотичного тиску є головним чинником, що підтримує нормальний розподіл позаклітинної рідини між плазмою та інтерстиціальним простором. Основне значення в створенні колоїдно-осмотичного тиску у кровотоці належить концентрації альбуміну, оскільки молекули цього білка невеликі за розміром і містяться в крові у великій кількості. При збалансованому харчуванні синтез альбуміну в печінці контролюється колоїдно-осмотичним тиском. При зміні гідростатичного тиску, важкій гіпоальбумінемії або порушенні цілісності капілярної мембрани можуть з'явитися набряки

Введення гіпотонічних рідин викликає набухання клітин, тоді як гіпертонічні розчини призводять до їх зморщення. Втрата натрію, блювання або надмірне вживання діуретиків можуть спровокувати зниження об'єму позаклітинної рідини, гіпоосмотичну дегідратацію. Неадекватна секреція антидіуретичного гормону (АДГ) призводить до затримки води і гіпонатріємії – гіпоосмотичної гіпергідратації. При втраті води, порушенні секреції АДГ

(нецукровий діабет) або відсутності реакції нирок на АДГ (нефрогенний нецукровий діабет) може виникнути стан гіперосмолярності внаслідок підвищення концентрації іонів натрію в крові – гіперосмотична дегідратація.

Зміни гідростатичного тиску і колоїдно-осмотичний ефект є головними чинниками, що визначають відносну кількість позаклітинної рідини, розподіленої між плазмою і інтерстиціальним простором. Розподіл рідини між внутрішніми і позаклітинними компартментами залежить головним чином від осмотичного ефекту електролітів, особливо натрію та хлориду. Клітинні мембрани відносно непроникні для цих іонів, але вода легко просочується крізь мембрани, що обумовлює ізотонічність рідини всередині і за межами клітин. Швидкість дифузії води визначається осмотичним ефектом і може змінюватися при захворюваннях, а також у результаті введення рідин. Відносно невеликі зміни концентрації речовини в позаклітинній рідині, для яких мембрана непроникна, можуть викликати помітні зміни об'єму інтерстиціальної рідини. Набряком є накопичення надмірної кількості води в тканинах. Внутрішньоклітинний набряк у тканинах спостерігається при запаленні або уповільненні кровотоку. Іони натрію, що в нормі надходять до клітин під час метаболічної активності, в результаті зміни функції мембрани або її проникності не можуть ефективно виходити за її межі. Надлишок натрію викликає осмотичне надходження води, що призводить до набрякання тканин. Якщо навколишнє середовище клітини гіпертонічне, вона зморщується, тоді як гіпотонічність позаклітинної рідини створює умови для їх набухання і набрякlostі тканин. Головний мозок розміщений в черепній коробці і тому, навіть при невеликих змінах об'єму клітин з'являються неврологічні ознаки як перший показник зміни гомеостазу води і натрію.

Підвищений вихід рідкої частини плазми в інтерстиціальний простір через капіляри або ускладнений відтік рідини вздовж лімфатичних судин у кров можуть сприяти розвитку позаклітинного набряку тканин. Прискорений вихід води через капілярну стінку, як правило, обумовлюється зміною проникності судин, зниженням колоїдно-осмотичного тиску або підвищенням гідростатичного тиску. Прикладами кожного з цих порушень можуть слугувати відповідно запалення або реакція гіперчутливості, важка гіпоальбуміємія і серцева недостатність. Іншою важливою причиною виникнення позаклітинного набряку є чинники, що перешкоджають відтоку лімфи. До них відносяться пухлини, що розвиваються в лімфатичних судинах або здавлюють їх зовні, а також природжена відсутність лімфатичних судин. Коли набрякла рідина скупчується в «потенційно» існуючих просторах тіла, наприклад, в плевральній, черевній, перикардіальній порожнинах або у середині суглобової сумки, це явище носить назву ефузії (утворення випоту). Мембрани, або оболонки, що утворюють ці порожнини, не чинять істотної перешкоди у проходженні через них рідини, електролітів або білків, які здатні проникати з «потенційних» порожнин в інтерстиціальний простір навколишніх тканин і повертатися назад. З іншого боку, відсутність вибіркової проникності мембран, що вкривають порожнини, дає можливість використо-

увати черевну порожнину для перитонеального діалізу з метою видалення шкідливих продуктів при уремії або введення ізотонічних рідин і ліків.

Гіпергідрія та дегідратація

Виражається вона в гіпер- та гіпогідратації. Переважання надходження води до організму над її виділенням веде до позитивного водного балансу, збільшення кількості води в організмі – гіпергідратації. Цей стан може спостерігатися при важкій серцево-судинній недостатності, при алергійних і запальних процесах, пухлинах, голодуванні. Проявляється набряками, виникненням трансудатів у порожнинах тіла. При деяких станах у тканинах і органах утруднюється циркуляція води і виникає позитивний водний баланс, особливо при паразитарному захворюванні фасціольозі, хворобах серця тощо.

Переважає виділення води над надходженням викликає негативний водний баланс, зменшення кількості води в організмі – гіпогідратацію або дегідратацію. Розвивається такий процес при захворюваннях, що протікають з невимримним блюванням і проносом, посиленому потовиділенні, недостатності надниркових залоз, поліурії.

При деяких хворобах тварин (правець, сказ, хвороба Ауескі) ускладнюється вживання води і виникає негативний водний баланс. Такі хвороби, як холера, чума, цукровий і нецукровий діабети, гастрити, ентерити, призводять до сечовиснаження та надмірної втрати води тканинами. Часто причиною порушення водно-іонного обміну є ураження (травми, пухлини) центрів нервової системи й залоз внутрішньої секреції, що причетні до його регуляції.

Для біохімічної діагностики станів дегідратації та гіпергідратації важливо зважати на те, що вони поділяються на інтра- і екстрацелюлярні (ІЦ і ЕЦ).

Інтрацелюлярна дегідратація пов'язана зі зменшенням кількості води, її називають первинною. Виникає при недостатності питної води, утрудненні надходження води до організму. Клінічно проявляється спрагою, підвищенням температури тіла; біохімічно – підвищенням умістом натрію й залишкового азоту в крові, зниженням кількості сечі, збільшенням її питомої ваги, зростанням умісту калію в сечі. ІЦ-дегідратація може перейти в ЕЦ-дегідратацію.

Екстрацелюлярна дегідратація проявляється втратою не тільки води, але й електролітів. Спостерігається при діареї, недостатньому надходженні NaCl з кормом, нефритах, рясному потовиділенні, фістулах, свищах шлунково-кишкового тракту, тому що солі й вода втрачаються при виділенні гною. При цьому зберігається внутрішньоклітинна вода. Почуття спраги клінічно відсутнє. Мають місце колапс судин, слабкість, падіння артеріального тиску, температура не підвищується. Біохімічні тести не доказові, тому що солі та вода виводяться в однаковій мірі. Тому при ІЦ-дегідратації лікування проводять введенням води, а при ЕЦ-дегідратації – розчину солей.

Інтрацелюлярна гіпергідратація має місце при надмірному введенні рідини, при інфекційних хворобах та захворюваннях головного мозку

(гіперпродукція антидіуретичного гормону вазопресину). Лікування проводиться розчинами солей, сечовини, глюкози.

Екстрацелюлярна гіпергідратація характеризується затриманням в організмі не лише води, а й солей, розширюється позаклітинний простір, виникають набряки.

Існує два механізми утворення набряків:

а) судинний. порушується гідростатичний тиск, особливо в капілярах, наприклад, при серцево-судинній недостатності, падінні кількості протеїну в тканинах. Усе це призводить до зниження онкотичного тиску;

б) нирковий. При зменшенні кровотоку через нирку зменшується фільтрація, підсилюється реабсорбція.

При судинному типі ЕЦ-гіпергідратації збільшується тільки кількість екстрацелюлярної води, а при нирковому – гіпергідратований міжклітинний простір, судини та інтерстицій.

Лікування ґрунтується на обмеженні споживання NaCl, поліпшенні ниркового кровотоку, застосуванні серцевих препаратів, діуретиків, інгібіторів альдостерону.

Клініко-біохімічне значення. Визначається об'єм циркулюючої крові (ОЦК) та об'єм циркулюючої плазми (ОЦП).

Під час діагностики згаданих станів оперують такими показниками: *осмотичний тиск крові, онкотичний тиск крові, кислотно-лужна рівновага і буферні властивості крові.*

Характеристикою концентрації водних розчинів живого організму можна вважати осмотичний тиск розчинів. Осмотичний тиск можна охарактеризувати також величиною осмолярності. *Осмолярність* – це сумарна осмотична концентрація розчинених кінетично активних речовин в 1 дм³ розчину. Кінетична активність характерна як для неорганічних, так і для органічних молекул. Осмолярність визначається на 95 % неорганічними складовими, переважно катіонами натрію та аніонами хлору. Внесок органічних речовин у загальну осмолярність не перевищує 5 %. Із них на протеїни припадає близько 0,5 %.

Тиск, утворений протеїнами, називається *онкотичним*. Незважаючи на низьку питому вагу в загальній осмолярності плазми крові, онкотичний тиск забезпечує значний фізіологічний ефект у підтриманні об'єму циркулюючої крові (ОЦК) і обмінних процесів крізь капілярні мембрани. Онкотичний тиск вищий у крові, ніж у тканинах, і саме тому між ними можливий обмін води.

Осмотичний тиск крові тварини дорівнює 780–820 кПа (7,7–8,1 атм; 1 атм – 760 мм рт. ст.), а онкотичний – 4 кПа (30 мм рт. ст.; 1 мм рт. ст. = 133,3 Па).

Зміни балансу електролітів. Гіпонатріємія, або падіння концентрації натрію в крові нижче за норму, може бути наслідком зменшення його вмісту в позаклітинній рідині або надлишку води (табл. 2.11). Втраті натрію сприяють тривале блювання, діарея, введення деяких діуретиків і недостатність альдостерону. При цьому виникає гіпоосмотична дегідратація.

Надмірна секреція АДГ може підсилити тиск води в нирках, що призведе до гіпергідратації і гіпонатріємії (гіпоосмотична гіпергідратація).

Таблиця 2.11. Причини гіпонатріємії

1.	Надмірне потовиділення
2.	Гіперглікемія (цукровий діабет)
3.	Хронічне захворювання нирок (нефропатія з втратою солей)
4.	Повторний дренаж плевральної порожнини
5.	Секвестрація рідини, або втрата «третього простору» (панкреатит, перитоніт, розрив сечового міхура)
6.	Застійна серцева недостатність (набряк)
7.	Недостатність альдостерону (гіпокортицизм)
8.	Надмірне застосування діуретиків
9.	Надмірна (неадекватна) секреція антидіуретичного гормону

Гіпернатріємія – аномально висока концентрація іонів натрію в циркулюючій крові може виникнути внаслідок надходження води з позаклітинної рідини (табл. 2.12).

Надмірне видалення води нирками відбувається при недостатній секреції АДГ, нецукровому діабеті або неадекватній реакції нирок на звичайний рівень гормону (нефрогенний нецукровий діабет). Гіпернатріємія, яка обумовлена втратою води, призводить до гіперосмотичної дегідратації.

Надходження всередину додаткової кількості солі без достатньої кількості води може викликати гіпернатріємію.

Концентрація позаклітинного калію регулюється, оскільки фізіологічні функції клітин надто чутливі до кількості змін вмісту цього електроліту.

Таблиця 2.12. Причини гіпернатріємії

1.	Втрата через шлунково-кишковий тракт (блювання, діарея)
2.	Недостатнє надходження в організм води
3.	Нецукровий діабет, «нефрогенний» нецукровий діабет
4.	Непомітна підвищена втрата води (гарячка, висока температура навколишнього середовища, прискорене дихання)
5.	Захворювання нирок, постобструкційний діурез
6.	Цукровий діабет (після лікування інсуліном)
7.	Осмотичний діурез
8.	Надлишковий прийом солі (сольове отруєння) або внутрішньовенне введення гіпертонічного розчину
9.	Гіперальдостеронізм

Підвищення його рівня, навіть мінімальне, може викликати серцеві аритмії, небезпечні для життя (табл. 2.13).

Таблиця 2.13. Причини гіперкаліємії

1.	Недостатність альдостерону (гіпокортицизм).
2.	Обструкція сечовивідного каналу.
3.	Розрив сечового міхура.
4.	Ниркове захворювання, що супроводжується анурією або олігурією.
5.	Дифузний некроз тканин.
6.	Гіперкаліємічний періодичний параліч (коні).
7.	Тривале стояння крові, що звернулася, при відокремленні сироватки від згустка; еритроцити, що відрізняються високим вмістом калію, вивільнення якого в сироватку обумовлює помилкову гіперкаліємію; це явище властиве свійським тваринам більшості видів, за винятком собак і котів (не враховуючи собак порід акіта і англійський спрінгер-спаніель).
8.	Використання в якості антикоагулянту калієвої солі гепарину.
9.	Метаболічний ацидоз.

Провідну роль у балансі калію відіграють нирки і альдостерон, що секретується наднирниками, тому ниркова недостатність і гіпокортицизм (гіпоальдостеронізм) можуть бути причинами виникнення гіперкаліємії, тобто збільшення концентрації іонів калію в циркулюючій крові вище за норму. Перерозподіл калію між чисельними внутрішньоклітинними компартментами і просторами, де присутня позаклітинна рідина, відбувається швидко як компенсаторна відповідь на захворювання. Інсулін є одним з найбільш важливих фізіологічних чинників, які підвищують надходження калію в клітини.

Порушення кислотно-лужної рівноваги змінює баланс внутрішньоклітинного калію. Метаболічний ацидоз підвищує відтік калію з клітин, а метаболічний алкалоз дає протилежний ефект.

Зміна осмоляльності позаклітинної рідини здатна викликати перерозподіл калію з його виходом із внутрішньоклітинного компартменту. Гіперглікемія при цукровому діабеті підвищує позаклітинну осмоляльність, обумовлюючи клітинну дегідратацію і супутній відтік калію з клітин в позаклітинну рідину.

Помилкова гіперкаліємія (псевдогіперкаліємія) виникає у тому випадку, коли при вираженому лейкоцитозі або тромбоцитозі сироватку відокремлюють від згустку крові із запізненням (лейкоцити і тромбоцити містять значну кількість калію). В еритроцитах собак породи акіта кількість калію більша, ніж у собак інших порід. Тому при тривалому стоянні крові, що згорнулася, вміст калію в її рідкій частині зростає. Еритроцити коней і великої рогатої худоби також багаті на калій і більш сприйнятливі до гемолізу. Зволікання із видаленням сироватки зі зразка крові може обумовити підвищення рівня в ній калію.

Зменшення концентрації іонів калію в циркулюючій крові (гіпокаліємія) виникає внаслідок недостатнього його надходження в організм, надмірної втрати, розведення або зрушення іонного балансу у бік підвищення внутрішньоклітинної концентрації калію (табл. 2.14).

Важливою причиною дефіциту калію є його втрата через шлунково-кишковий тракт, що посилюється при відсутності апетиту. Одночасна втрата хлоридів при частому блюванні або секвестрації у травний сік сичуга жуйних тварин здатні призвести до розвитку гіпокаліємічного, гіпохлоремічного метаболічного алкалозу

Таблиця 2.14. Причини гіпокаліємії

1.	Втрата калію через шлунково-кишковий тракт (блювання, діарея)
2.	Хронічне захворювання нирок або пов'язана з характером раціону нефропатія (кішки)
3.	Постобструкційний діурез
4.	Внутрішньовенне введення бідних на калій рідин
5.	Надмірне застосування діуретиків
6.	Гіпокаліємічний періодичний параліч
7.	Синдром гіпокаліємії у молочної худоби
8.	Парентеральне введення поживних розчинів
9.	Гіперальдостеронізм
10.	Нирковий ацидоз
11.	Цукровий діабет (у зв'язку з лікуванням інсуліном)

Надмірна втрата калію зустрічається при гіперальдостеронізмі (часто разом з гіпернатріємією), нирковому тубулярному ацидозі (нерідко у поєднанні з гіперхлоремічним ацидозом), а також у разі застосування деяких діуретиків.

Введення коням фуросеміду призводить до виснаження пулу катіонів в організмі в такій мірі, що утворюються ехіноцити. Інсулінотерапія при діабеті у тварин може викликати зниження рівня калію в крові, сприяючи його надходженню в клітини разом з глюкозою.

Псевдогіперхлоремією називають індуковане штучним шляхом підвищення рівня хлоридів у сироватці тварин, яким для усунення епілептичних судом у якості антиконвульсанта вводять калію бромід.

Різниця, або інтервал між концентраціями головного катіону (натрію) і основних аніонів (хлоридів і бікарбонатів) у циркулюючій крові характеризується відносною видовою сталістю. Вона відповідає кількості аніонів, що не враховуються в крові, головним чином за рахунок від'ємно заряджених білків, які за звичайних умов не виявляються традиційними методами. У розрахунок аніонного інтервалу включають калій, проте, це нічого не додає до інтерпретації знайдених величин. Якщо використовувати його концентрацію, стандартні величини для аніонного інтервалу трохи збільшуються (табл. 2.15).

Таблиця 2.15. Причини змін аніонного інтервал

Збільшення	
1.	Ацидоз: лактоацидоз, отруєння етиленгліколем, уремія, діабетичний кетоацидоз, надлишкове згодовування кормів, кетоз, посилене фізичне навантаження, отруєння саліцилатами
2.	Некротизуючий ентероколіт у коней
3.	Введення інгібітору карбоангідрази
4.	Нирковий тубулярний ацидоз
Зменшення	
1.	Гіпоальбумінемія
2.	Поліклональна гамапатія

Метаболічний ацидоз з гіперхлоремією при нормальному або пониженому аніонному інтервалі розвивається як результат втрати організмом. Визначення аніонного інтервалу може виявитися корисним при встановленні можливих причин порушення кислотно-лужної рівноваги. Збільшення аніонного інтервалу у поєднанні з метаболічним ацидозом внаслідок підвищення рівня метаболізуючих і неметаболізуючих кислот у крові. Зростання рівня молочної кислоти може бути обумовлене гіповолемічним шоком, значним фізичним навантаженням або надмірним згодовуванням зернових продуктів. Посилене утворення кетонів тіл, кетоацидоз є наслідком цукрового діабету або кетозу. Затримка сульфатів і фосфатів (неметаболізуючі кислоти) при нирковій недостатності сприяє розвитку уремічного ацидозу. Токсикоз, викликаний етиленгліколем, саліцилатами, метанолом (неметаболізуючі кислі речовини), призводить до ацидозу і збільшення аніонного інтервалу. Зменшення величини останнього і відсутність порушень кислотно-лужної рівноваги може бути зв'язано з гіпоальбумінемією (рис. 3.8). Крім того, при цих розладах виявляють понижений рівень калію. На відміну від зазначеного, збільшення вмісту калію часто зв'язане з гіперхлоремічним метаболічним ацидозом при нормальному або зменшеному аніонному інтервалі, що може спричинюватися недостатністю альдостерону (гіпокортицизм).

Рідина, що знаходиться в шлунку, складається з води, а також з високої концентрації іонів водню (H^+) і хлориду (Cl^-) і меншим умістом іонів натрію (Na^+) і калію (K^+). Тоді як рідина, що міститься в тонкому кишечнику, багата на іони калію і бікарбонату. Блювання або секвестрація рідини в сичузі жуйних можуть призвести до розвитку метаболічного алкалозу. Головними чинниками, що сприяють його підтримці, є зниження об'єму циркулюючої крові і втрата хлориду та калію. Нирки відповідають за реабсорбцію води в результаті прискорення секреції антидіуретичного гормону (АДГ) і, що найбільш важливе, реабсорбцію натрію. У нормальних умовах на рівні проксимальних каналців аніон хлориду обмінюється на іон натрію, проте у разі дефіциту останнього створюються умови, що сприяють реабсорбції

бікарбонатів. У дистальних каналцях натрій в нормі обмінюється на іони водню або калію. В результаті дефіциту калію обмін водню підвищується під

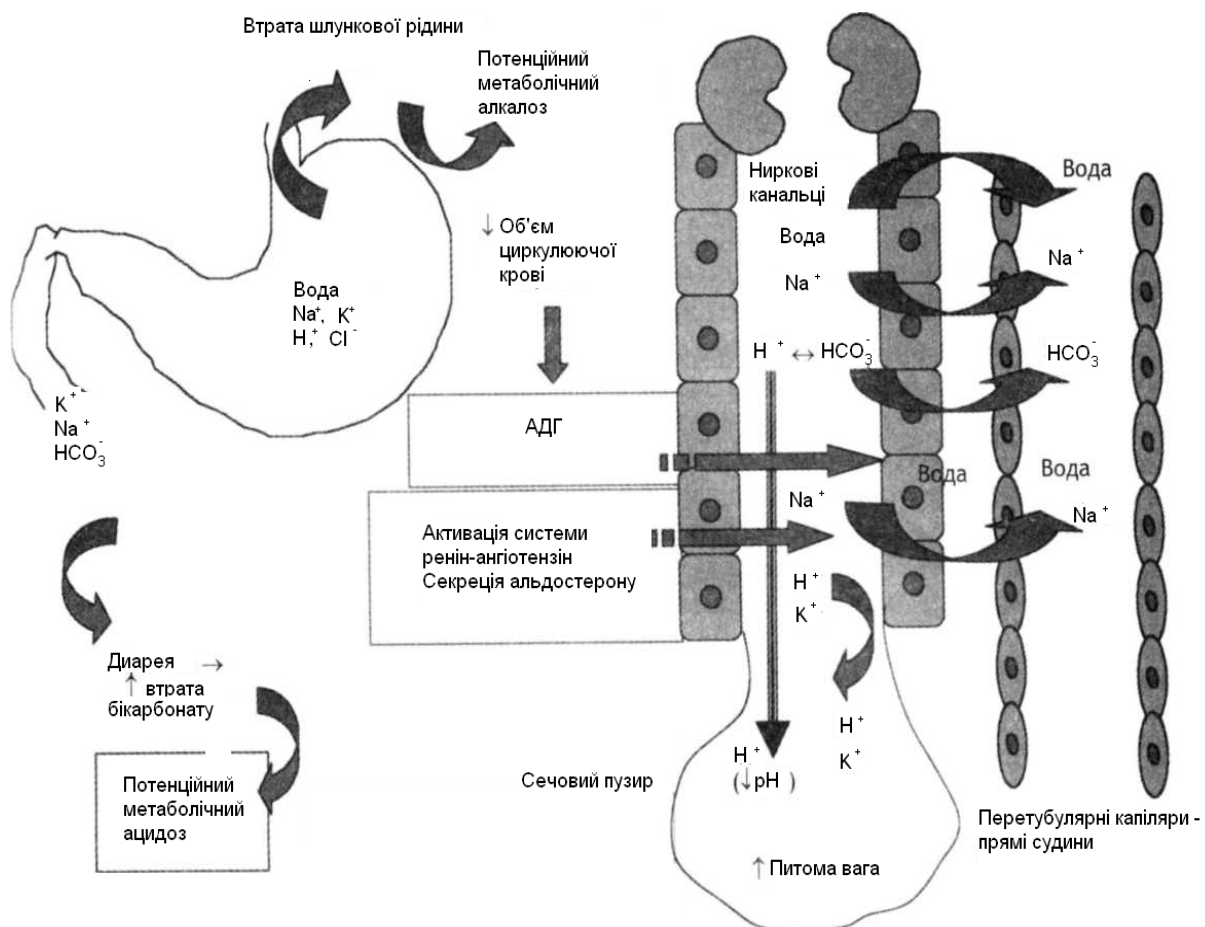


Рис. 2.8. Захворювання органів апарату травлення є частою причиною порушень балансу електролітів

впливом альдостерону. Затримка бікарбонатів у нирках і підвищений обмін іонів водню призводять до додаткової їх втрати з сечею. Наслідком є ацидурія, тобто кисло-лужний парадокс. На відміну від цього, тимчасове підвищення секреції кислоти, що обумовлено хімічним складом корму, призводить до появи надлишку бікарбонатів у крові, явище, що отримало назву *лужного підйому*. Фізіологічна відповідь нирок полягає в прискореній екскреції бікарбонатів (лужна сеча).

Електроліти в сечі визначають шляхом розрахунку величини їх парціальної екскреції (FE):

$$FE (\%) = \left[\frac{\text{електроліти в сечі (мекв/л)} : \text{електроліти в сироватці (мекв/л)}}{\text{креатинін в сироватці (мг/100 мл)} : \text{креатинін в сечі (мг/100 мл)}} \right] \times 100.$$

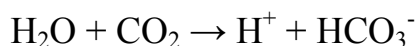
Кисотно-лужна рівновага (КЛР) – це співвідношення концентрацій водневих та гідроксильних іонів у біологічних рідинах. Активна реакція рідин організму характеризується концентрацією водневих іонів, вираженою в нМ, або водневим показником pH – від'ємним десятковим логарифмом цієї концентрації. У нормі він становить 7,35–7,45. Регуляторними системами, що забезпечують сталість pH крові, є буферні системи крові та тканин й видільні

системи організму. До останніх насамперед належать діяльність легень і видільна функція нирок.

Буферна властивість – це здатність протидіяти змінам рН при внесенні до системи лугів або кислот. Середня норма рН крові – 7,4, в еритроцитах – 7,19.

Найважливіші буферні системи крові: бікарбонатна, фосфатна, протеїнова й особливо гемоглобінова.

Бікарбонатна – потужна і найбільш керована система позаклітинної рідини. Їй належить 10 % усієї буферної ємності крові.



При нормальному рН концентрація іонів бікарбонату у плазмі крові перевищує концентрацію CO_2 майже в 20 разів.

Механізм буферної дії цієї системи полягає в тому, що при надходженні в кров великої кількості кислих продуктів водневі іони H^+ взаємодіють з іонами бікарбонату HCO_3^- це сприяє утворенню вугільної кислоти H_2CO_3 , яка дегідратується до вуглекислого газу, що виділяється через легені в результаті їх гіпервентиляції.

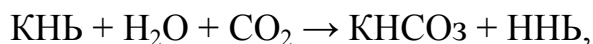
Якщо ж у крові зростає кількість лугів, то вони взаємодіють зі слабкою вугільною кислотою, утворюючи іони бікарбонату й воду. При цьому рН не зрушується. Відбувається затримання в плазмі деякої кількості CO_2 завдяки гіповентиляції легень.

Фосфатна буферна система має значення в тканинах нирок і таких біологічних рідинах, як сеча й соки травних залоз. На її частку припадає лише 1 % буферної ємності крові. Роль кислоти в цій системі виконує однозаміщений фосфат – NaH_2PO_4 , а роль солі – двозаміщений фосфат Na_2HPO_4 (гідрофосфат). У крові відношення NaH_2PO_4 : Na_2HPO_4 складає 1:4 (рН = 7,4). Ця буферна пара здатна впливати на зміни рН в інтервалі від 6,1 до 7,7.

Протеїнова буферна система утворюється завдяки наявності в молекулах протеїнів $-\text{COOH}$ і $-\text{NH}_2$. Ця система ефективна при рН крові – 7,2–7,4. Разом із бікарбонатною білкова буферна система є головною буферною системою організму.

Гемоглобінова буферна система – найпотужніша. Вона сягає 95 % буферної ємності крові. Гемоглобін бере участь у транспортуванні кисню й вуглекислого газу. При насиченні киснем гемоглобін стає сильнішою кислотою (HNBO_2), а коли віддає кисень, стає дуже слабкою органічною кислотою (HNB).

Гемоглобінова система складається з донора протонів HNB (слабка органічна кислота) і калієвої солі гемоглобіну KNB (акцепт-тор протонів).



тобто утворюється бікарбонат і слабка органічна кислота. Саме вони підтримують рН крові. Ця система і нейтралізує CO_2 , якого у венозну кров надходить дуже багато. Потрапляючи в капіляри легень, HNB перетворюється

на оксигемоглобін HbO_2 , що сприяє підкисленню крові і поступовому підвищенню *лужного резерву крові (ЛРК)*, здатності крові зв'язувати CO_2 . При порушенні ЛРК буває два стани:

- 1) ацидоз;
- 2) алкалоз.

Стани ацидозу й алкалозу не обов'язково проявляються змінами рН крові. Це залежить від ступеня виразності компенсаторних реакцій органів виділення. За зміною рН стоять зрушення в кількості вуглекислоти чи лугів, на які необхідно зважати для більш точної характеристики стану кислотно-лужної рівноваги.

Ацидоз і алкалоз бувають дихальний (респіраторний) та метаболічний (нереспіраторний).

Респіраторний ацидоз може спричинятися зменшенням хвилинного об'єму дихання, наприклад, при бронхіті, бронхіальній астмі, емфіземі легень, недостатності кровообігу, асфіксії (табл. 2.16).

Таблиця 2.16. Причини респіраторного ацидозу

1.	Серцево-легенева блокада
2.	Порушення функції легень: обструкція дихальних шляхів, хвороби паренхіми легень, пневмоторакс
3.	Анестезія, застосування агентів, що пригнічують центральну нервову систему

Респіраторний ацидоз може виникати також при захворюваннях, що супроводжуються порушенням дифузії газів через альвеолярну мембрану (хронічний дифузійний інтерстиційний фіброз, альвеолярний протеїноз, легеневий саркоїдоз тощо).

На ранніх стадіях цих захворювань газообмін може бути посилений через компенсаторну гіпервентиляцію, але потім pCO_2 поступово наростає. Ці патологічні стани ведуть до гіповентиляції легень та гіперкапнії (гіперкарбозу), тобто накопичення CO_2 в організмі. Це призводить, у свою чергу, до зменшення спорідненості гемоглобіну до кисню тканин, тобто до гіпоксії.

Розвиткові цього стану заважають буферні системи крові, зокрема бікарбонатний буфер. Легені компенсують стан ацидозу прискоренням дихальних рухів – задишкою. Гострий дихальний ацидоз при обмеженні легеневої вентиляції супроводжується збільшенням вмісту CO_2 , зниженням рН і підвищенням концентрації калію в плазмі крові. При хронічному дихальному ацидозі спостерігається гіперхлоремія, підвищення ЛРК; вміст натрію може бути зниженим, калію – нормальним, а рН плазми – на межі або нижче норми.

Нереспіраторний (метаболічний) ацидоз викликається збільшенням у крові вмісту органічних кислот унаслідок порушень проміжного обміну органічних речовин. Часто пов'язаний з первинним порушенням обміну

речовин при діабеті, голодуванні, пропасниці, при гіпоксії внаслідок порушення кровообігу (табл. 2.17).

Таблиця 2.17. Причини метаболічного ацидозу

1.	Лактоацидоз (шок, значне фізичне навантаження)
2.	Отруєння етиленгліколем
3.	Уремія
4.	Гіпокортицизм
5.	Діабетичний кетоацидоз
6.	Кетоз
7.	Надлишковий зерновий корм
8.	Некротизуючий ентероколіт у коней
9.	Отруєння саліцилатами
10.	Отруєння паральдегідом
11.	Діарея
12.	Надмірне вживання інгібіторів карбоангідрази
13.	Нирковий тубулярний ацидоз
14.	Пероральний прийом кислих агентів

Крім посиленого утворення органічних кислот, причиною нереспіраторного ацидозу може бути недостатнє виділення або нейтралізація цих метаболітів через ураження нирок або кишечника.

При нереспіраторному ацидозі значно знижена концентрація бікарбонату крові, зменшений вміст CO_2 в альвеолярному повітрі; легенева вентиляція прискорена, кислотність і концентрація аміаку в сечі збільшені.

Стан ацидозу нерідко вимагає термінового купірування за допомогою різних засобів, що викликають залуження крові, зокрема бікарбонату.

Респіраторний алкалоз може бути наслідком збільшення дихальних можливостей легень, наприклад, при вдиханні чистого кисню, при компенсаторній задишці, перебуванні в розрідженій атмосфері, при анемії, отруєнні CO тощо (табл. 2.18).

Таблиця 2.18. Причини респіраторного алкалозу

1.	Гіпоксемія: застійна серцева недостатність, анемія
2.	Гіпервентиляція: стимуляція центральної нервової системи – ліки (отруєння саліцилатами, ксантином), біль, сепсис, викликаний грамнегативними бактеріями
3.	Надмірна штучна вентиляція

При пухлинах мозку, при керованому диханні може мати місце гіпервентиляція, що призводить до гіпокапнії, і внаслідок зниження вмісту вугільної кислоти в крові відбуваються зрушення в бікарбонатній буферній системі, знижується лужний резерв крові.

При респіраторному (газовому) алкалозі концентрація бікарбонатів крові зменшується, $p\text{CO}_2$ падає, легенева вентиляція прискорюється, сеча має низьку кислотність, кількість аміаку в сечі зменшується, $p\text{H}$ – зростає.

Нереспіраторний (метаболічний) алкалоз виникає через втрату кислих метаболітів (невтримне блювання) і відносне збільшення лужних продуктів (табл. 2.19). Він може бути також наслідком надлишкового введення в організм натрію бікарбонату.

Таблиця 2.19. Причини метаболічного алкалозу

1.	Блювання
2.	Секвестрація рідини в першому або четвертому відділі шлунку (жуйні)
3.	Надмірне вживання діуретиків, тіазидів
4.	Надмірне введення бікарбонату натрію
5.	Підвищене потовиділення у коней
6.	Первинний гіперальдостеронізм

Нейтралізація лужних речовин здійснюється шляхом реакції з вуглекислою. При нирковому механізмі компенсації негазового алкалозу має місце виведення надлишку бікарбонатів та двозаміщених фосфатів.

Метаболічні зміни при негазовому алкалозі проявляються в збільшенні концентрації бікарбонатів і $p\text{CO}_2$. Легенева вентиляція уповільнена, кислотність сечі знижена.

Питання для самоперевірки:

1. Біологічна роль води в організмі.
2. Вміст води в різних органах і тканинах організму.
3. Потреба організму у воді.
4. Усмоктування і виділення води.
5. Регуляція водного обміну.
6. Патологія обміну води: гіпер- та гіпогідратація (дегідратація).
7. Позитивний та негативний водний баланс, причини його виникнення.
8. Інтра-, екстрацелюлярна дегідратація, їх характеристика.
9. Інтра-, екстрацелюлярна гіпергідратація, їх характеристика.
10. Осмотичний тиск, його визначення.
11. Причини змін перезполоділу електролітів між внутрішньо- і позаклітинною рідиною.
12. Поняття про КЛР.
13. Характеристика буферних систем крові: гідрокарбонатної, протеїнова, гемоглобінової, фосфатної.
14. Ацидоз та алкалоз, їх характеристика.

Тема 2.8. Біохімічні механізми імунної відповіді організму. Експрес-діагностика імунодефіциту в новонароджених тварин

Імунна система – анатомо-функціональна система організму вищих тварин і людини, яка виконує захисні функції щодо підтримання внутрішнього *антигенного гомеостазу*. Антигени – це високомолекулярні сполуки, які є генетично чужорідними для даного організму і викликають специфічну імунну реакцію, спрямовану на їх відторгнення та елімінацію. Антигенні властивості мають переважно біомакромолекули – білки, нуклеїнові кислоти, деякі полісахариди та, у низці випадків, синтетичні полімери. Імунна система за допомогою клітинних і гуморальних механізмів забезпечує розпізнавання, зв'язування та руйнування антигенів як інфекційного, так і неінфекційного походження.

Морфологічним синонімом імунної системи є *лімфоїдна система*. Вона складається з загруднинної залози (тимуса), селезніки, лімфатичних вузлів і фолікулів, лімфоцитів кісткового мозку та крові. Крім лімфоцитів, у реакціях імунітету беруть участь численні білки та пептиди, що є ефекторами імунних процесів, – імуноглобуліни, компоненти системи комплементу, гормони та медіатори імунітету.

Попередниками лімфоцитів є ембріональні стовбурові клітини кісткового мозку, що утворюються на ранніх етапах внутрішньоутробного розвитку. Вони поділяються на В- та Т-лімфоцити, останні включають *Т-кілери* (*Тк*), що зумовлюють процеси клітинного імунітету; *Т-хелпери*, що індукують проліферацію, трансформацію В-лімфоцитів; *Т-супресори* (*Тс*), що пригнічують розвиток реакцій гуморального та клітинного імунітету, сприяють формуванню стану імунологічної толерантності.

В-лімфоцити є ефекторами гуморального імунітету, попередниками антитілоутворюючих плазматичних клітин, – основних продуцентів антитіл (імуноглобулінів). Рецепторами для антигенів на поверхні В-лімфоцитів слугують специфічні поверхневі імуноглобуліни. Взаємодія цих рецепторів з антигеном супроводжується диференціацією В-лімфоцитів у плазматичні клітини та генними транслокаціями, що призводять до формування ділянок ДНК, відповідальних за транскрипцію відповідних антитіл. Розглянута система є специфічною відносно хімічної природи антигенів і формується внаслідок взаємодії організму з чужорідними макромолекулами, тобто в процесі "імунологічного навчання".

Розрізняють також вроджену систему неспецифічного імунітету або *систему неспецифічних факторів захисту* організму, яка зумовлює однотипні клітинні та біохімічні реакції на будь-які чужорідні антигени. До неспецифічних факторів захисту належать фагоцити (макрофаги тканин, нейтрофіли та моноцити крові), система комплементу і білки "гострої фази" запалення. Ті з них, що мають бактерицидні властивості, виступають у ролі інгібіторів бактеріальних протеїназ (лізоцим, пропердин, *α*-макроглобулін, *α₁*-інгібітор протеїназ тощо) і беруть участь у реалізації реакцій фагоцитозу.

Імуноглобуліни – складні глобулярні протеїни глікопротеїдної природи, здатні специфічно зв'язуватися з антигеном, який стимулює їх утворення, тобто виявляють властивості антитіл і забезпечують гуморальний імунітет. Переважна їх кількість міститься в глобулярній фракції сироватки крові, лімфі, слині, інших рідинах організму або на поверхні клітинних мембран, де вони виконують роль рецепторів чи беруть участь у нейтралізації/руйнуванні чужих, а іноді і власних антигенів. Становлять до 20% від маси всіх білків плазми крові.

Імуноглобуліни синтезуються плазматичними клітинами, які є продуктами трансформації В-лімфоцитів, що відбувається при стимуляції імунної реакції організму на надходження чужорідних білків, клітин (мікроорганізмів, найпростіших), при інфекційних захворюваннях, за умов вакцинації, переливання крові, злоякісного перетворення клітин власного організму.

Молекули імуноглобулінів – глікопротеїни, білкова частина яких є тетрамером, що складається з чотирьох поліпептидних ланцюгів: двох тяжких Н-ланцюгів (від англ. heavy – тяжкий), та двох легких L-ланцюгів (від англ. light – легкий). У кожній окремій молекулі імуноглобуліну тяжкі та легкі ланцюги попарно однакові, тобто умовна формула будь-якого імуноглобуліну має вигляд H_2L_2 .

Н-ланцюги імуноглобулінів складаються приблизно з 220 амінокислотних залишків, їх молекулярна маса становить 50–70 кДа, а L-ланцюги – із 110 амінокислотних залишків, їх молекулярна маса – 20–25 кДа. Окремі поліпептидні ланцюги в молекулах імуноглобулінів сполучаються між собою дисульфідними зв'язками.

Олігосахаридні залишки, що складаються з залишків манози та N-ацетилглюкозаміну, зв'язані з Н-ланцюгами з боку С-кінців.

У кожному з Н- або L-ланцюгів молекул імуноглобулінів можна виділити окремі *домени*, що відрізняються за структурою та мають певне функціональне значення.

Константні ділянки (С-ділянки) – домени, що характеризуються сталістю амінокислотного складу в різних класах імуноглобулінів. Вони розміщуються з С-кінців L- та Н-ланцюгів і займають $\frac{1}{2}$ довжини L-ланцюга та $\frac{3}{4}$ довжини Н-ланцюга (ділянки C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}) (рис. 2.9).

Варіабельні ділянки (V-ділянки) розміщуються з N-кінців L- та Н-ланцюгів. Вони займають приблизно $\frac{1}{2}$ довжини L-ланцюга (V_L) та $\frac{1}{4}$ довжини Н-ланцюга (V_H) і характеризуються мінливістю амінокислотного складу. За допомогою амінокислотних залишків своїх гіперваріабельних кінцевих ділянок вони беруть участь у формуванні активного центру молекули імуноглобуліну, який за своєю конформацією комплементарний детермінантним групам антигену і забезпечує зв'язування з ним, тобто специфічність імуноглобуліну.

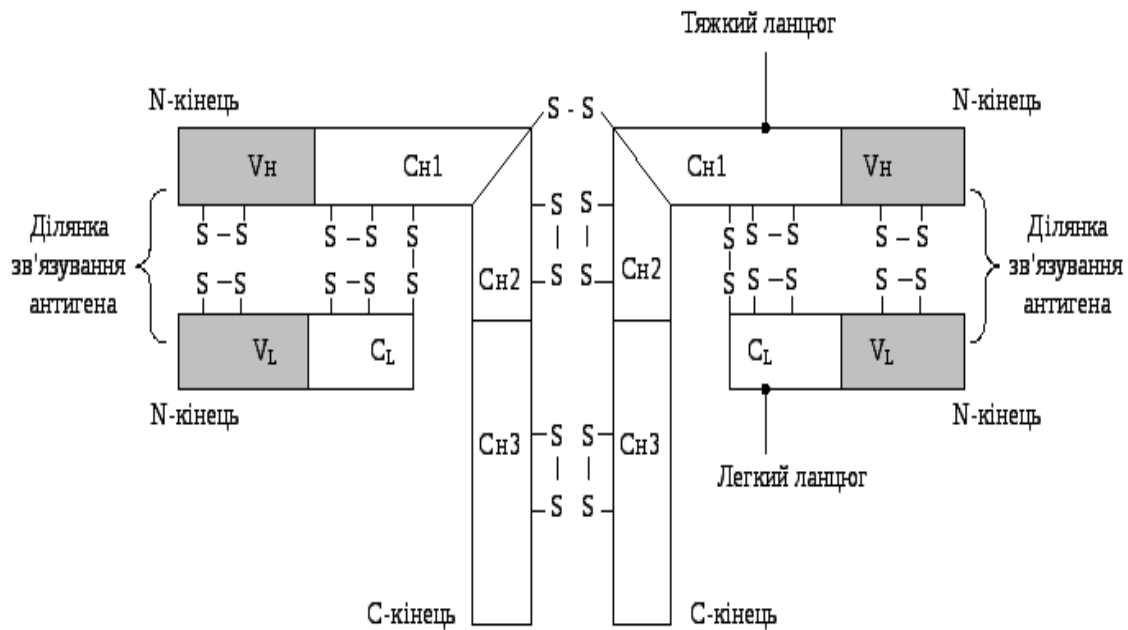


Рис. 2.9. Схема будови імуноглобуліну

За умов розщеплення імуноглобулінів папаїном, яке відбувається в шарнірній частині молекули, утворюються два антигензв'язуючі фрагменти Fab (antigen binding fragment) та фрагмент, що кристалізується, – Fc.

Різні типи тяжких і легких ланцюгів у молекулах імуноглобулінів позначають літерами грецького алфавіту. Відповідно до такої номенклатури розрізняють п'ять типів H-ланцюгів (α , γ , μ , δ , ϵ) і два типи L-ланцюгів (κ , λ). Залежно від типу важкого ланцюга виділяють п'ять класів імуноглобулінів (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM), у складі кожного з яких певний тип H-ланцюга сполучається з одним із двох типів L-ланцюга.

У біологічних об'єктах (сироватці крові, інших біологічних рідинах, тканинах) окремі класи імуноглобулінів утворюють надмолекулярні комплекси ($n = 2-5$). Основними класами імуноглобулінів крові тварин, що реалізують гуморальну імунну відповідь на вторгнення чужорідного антигену, є імуноглобуліни G та M. Імуноглобуліни A відіграють роль антитіл у складі інших біологічних рідин та секретів, а імуноглобуліни класів D та E є мінорними компонентами сироватки крові, що виконують додаткові спеціалізовані функції в комплексі імунних та алергічних реакцій.

Імуноглобуліни класів G, A, M, D, E різняться між собою молекулярною масою, електрофоретичною рухомістю, вмістом вуглеводів та імунологічною активністю. Взаємодіючи з відповідними антитілами, імуноглобуліни утворюють імунні комплекси.

Імуноглобуліни G (IgG) – основний клас сироваткових імуноглобулінів. Із ними пов'язаний процес гуморального захисту організму від багатьох бактерій і вірусів, а також їх токсинів. Активно транспортуються через плаценту та відіграють важливу роль у захисті організму від інфекції.

Імуноглобуліни A (IgA) синтезуються в плазматичних клітинах слизової оболонки дихальних шляхів і травного тракту та майже у всіх екскреторних залозах. Значна кількість його міститься в молозиві, слині, сльозах, а також у носовому і бронхіальному секретах. Локальний синтез IgA зумовлює місцевий імунітет (цим пояснюється висока ефективність аерозольних і пероральних імунізацій). Рівень секреторного IgA в організмі новонародженого вже через 3 тижні наближається до рівня його в дорослій тварини.

Імуноглобуліни M (IgM) – потужний активатор системи комплементу. Імуноглобулінами цього класу є холодові аглютиніни, ізогемаглютиніни. IgM першими з'являються в процесі формування імунної відповіді. Вони мають властивості бактерицидних антитіл до грамнегативних мікроорганізмів, ізогемаглютинінів, холодкових аглютинінів. Вміст IgM у сироватці крові збільшується відразу після народження, досягає значного рівня в місячному віці.

Імуноглобуліни D (IgD) у низьких концентраціях виявлено в сироватці крові здорових тварин. Відомості про специфічні функції цих імуноглобулінів відсутні. Припускають, що їх поява блокує активність імуноглобулінів інших класів за конкурентним механізмом.

Імуноглобуліни E (IgE). У сироватці крові здорових тварин виявляють їх сліди. IgE плазматичними клітинами виробляється з певною специфічністю. До складу цієї фракції входять реагени, які беруть участь в алергійних реакціях. Тривалість перебування в організмі сироваткового IgE – 3 доби, мембранозв'язаних IgE – 14 діб:

Підвищення концентрації γ -глобулінів у сироватці (плазмі) крові спостерігають при бактеріальних інфекціях, інфекційному гепатиті, токсичному ураженні печінки, деяких вірусних (краснуха, інфекційний мононуклеоз), аутоімунних (хвороби сполучної тканини), паразитарних захворюваннях, хронічних інфекціях (бруцельоз, ехінококоз печінки, малярія), холециститі, цирозі печінки, пієлонефриті, гострому поліартриті, сепсисі, гемолітичній жовтяниці.

Гіпогаммаглобулінемія виникає внаслідок виснаження імунної системи при тривалих хронічних інфекціях, лімфолейкозі, лімфогранулематозі, мієломі, ентериті, дистрофії печінки, хворобах нирок, опіках. Після лікування цитостатиками, імунодепресантами, кортикостероїдами, хіміотерапії, опромінення розвивається *агаммаглобулінемія*.

Цитокіни. Існує значна кількість фізіологічно активних сполук, що синтезуються в імунній системі та відіграють роль міжклітинних хімічних сигналів, регулюють її активність та реалізують процеси міжклітинних комунікацій. Ці речовини отримали загальну назву *цитокінів*, або *лімфокінів*.

Цитокіни продукуються активованими лімфоцитами, макрофагами, лейкоцитами, іншими клітинами крові та сполучної тканини, які беруть участь у реакціях імунітету та неспецифічної резистентності організму в процесі запалення. Вони контролюють процеси дозрівання, функціонування та взаємодії між лімфоцитами та іншими клітинними ефекторами імунітету.

Специфічними мішенями для лімфокінів є лімфоцити та макрофаги, що мають на своїй поверхні чутливі рецептори.

Гормональну внутрішньосистемну функцію виконує також загруднинна залоза (тимус), яка секретує біологічно активні субстанції (тимозини, тимопоетини, тимостимуліни тощо), що забезпечують дозрівання Т-лімфоцитів.

За хімічною природою медіатори та гормони імунної системи є білками, глікопротеїнами, низько- та високомолекулярними пептидами, які знаходяться в плазмі крові людини і здійснюють свої регуляторні функції в пікомолярних (10^{-12}) концентраціях. Значна кількість речовин, що виконують функції лімфокінів, до цього часу недостатньо охарактеризовані як індивідуальні хімічні сполуки.

На сьогодні цитокіни прийнято поділяти на інтерлейкіни, інтерферони, фактори некрозу пухлин, колонієстимулівні та трансформувальні фактори росту.

Інтерлейкіни (IL) – це група розчинних пептидів, які виконують функції імунорегуляторів локальної дії. На сьогодні виділено близько тридцяти окремих типів інтерлейкінів (IL-1 – IL-30), які різняться за структурою, фізико-хімічними властивостями та спектром біологічної активності.

Інтерферони (IFN) – група низькомолекулярних глікопротеїнів, які чинять противірусну дію та регулюють імунні реакції. Молекулярна маса IFN в межах 16 000 – 25 000 Да.

Фактори некрозу пухлин (TNF) – цитокіни, що регулюють імунну відповідь. Володіють цитотоксичними та цитостатичними властивостями, підсилюють кілінг пухлинних клітин, активують NK-клітини, що продукуються моноцитами-макрофагами. До TNF належать TNF-а і TNF-б.

За впливом на імунну систему поділяють на два типи:

1. Цитокіни, що регулюють клітинний імунітет (IL-2, IL-12, IFN- γ , ФНП- α);
2. Цитокіни, що стимулюють переважно гуморальний імунітет і послаблюють клітинний (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 і IL-13).
3. За біологічною дією цитокіни умовно поділяють на прозапальні (IL-1, IL-2, IL-6, IL-1 β , IL-12, IFN- γ , ФНП- α) та антизапальні (IL-4, IL-10, IL-13).

Колонієстимулюючі фактори (КСФ) – цитокіни, що стимулюють ріст кровотворних клітин (гранулоцитів, моноцитів, попередників еритроїдних клітин). Вони продукуються Т-лімфоцитами, макрофагами, моноцитами, ендотеліальними клітинами.

Трансформуючі фактори росту (ТФР) – білки, що продукуються різними класами лімфоцитів, тромбоцитами, плацентою, деякими пухлинами. Вони стимулюють процеси проліферації фібробластів, синтезу колагену та фібрoneктину, беруть участь в ангіогенезі, загоюванні ран. Разом із цим, ТФР пригнічують проліферацію Т- та В-лімфоцитів, активність цитотоксичних та кіперних клітин.

Слід зазначити, що активовані лімфоцити та інші імунокомпетентні клітини синтезують пептидні фактори росту, зокрема епідермальний (ЕФР),

нервовий (ФРН), а також соматомедина (інсуліноподібні фактори росту ІФР-1 та ІФР-2), і різні білково-поліпептидні гормони, що свідчить про надзвичайно важливу роль імунної системи в регуляції процесів росту, проліферації та клітинного диференціювання.

Введення цитокінів у організм підвищує кількість циркулюючих лейкоцитів і температуру тіла, зумовлює метаболічні зрушення та низку інших процесів. Лікарські препарати на основі цитокінів знайшли застосування в терапії низки захворювань (наприклад, у лікуванні хворих на злоякісні новоутворення, аплазію кровотворення, різноманітні видії імунопатології). Так, наприклад, введення препарату ІЛ-2 при інфекційних захворюваннях відновлює здатність імунної системи адекватно здійснювати регуляторні та захисні функції (пероральне введення рекомбінантного інтерлейкіну-2 при гострих кишкових інфекціях і місцеве використання при хламідіозі демонструє позитивні наслідки).

Молекулярні механізми протівірусної дії інтерферонів

1. *Зв'язування інтерферонів із рецепторами клітин-мішеней.* Інтерфери, які секретуються в зовнішньоклітинне середовище клітинами-продуцентами, взаємодіють із специфічними рецепторами на мембранах чутливих клітин, що є передумовою генерування хімічного сигналу та його трансмембранної передачі.

2. *Активація внутрішньоклітинної 2',5'-олігоаденілатсинтетази.* Хімічний сигнал за допомогою внутрішньоклітинних месенджерів досягає геному зараженої вірусом клітини й індукуює синтез ферменту, який утворює з молекул АТФ 2',5'-олігоаденілову кислоту (2',5'-оліго-А-синтетази). 2',5'-олігоаденілат є активатором РНКазы I, яка розщеплює односпіральні вірусні РНК (мРНК) та рибосомальні РНК, що необхідні для трансляції вірусних білків.

3. *Активація внутрішньоклітинних протеїнкіназ.* Трансмембранний хімічний сигнал, генерований інтерфероном, спричиняє також активацію протеїнкінази, що фосфорилує білковий фактор ініціації трансляції ІФ-2. Фосфорилування фактора ініціації ІФ-2 призводить до його інактивації та блоку рибосомального синтезу вірусних білків.

Біохімічні компоненти системи комплементу. Система комплементу – одна з найважливіших складових природженого імунітету. Її компоненти включаються в низку процесів, спрямованих на забезпечення нормального розвитку та функціонування імунної системи: антибактеріальний захист, фагоцитоз, виведення імунних комплексів, контроль запалення, хемотаксис лейкоцитів, участь в автоімунних процесах і реакціях гіперчутливості. За хімічною природою ця система належить до термолабільних сироваткових білків, які становлять 5–10 % від загальної кількості білків плазми крові. Вони синтезуються здебільшого в печінці. Для позначення всіх компонентів комплементу (інгібіторів, регуляторів і рецепторів) запроваджена єдина класифікація. Дев'ять основних білків комплементу позначені літерою «С»

(від англ. Complement) і цифрою (C1 – C9; причому C1 складається з трьох білків: C1q, C1r і C1s), а пептиди, що від них відщеплюються літерою «b» (основний, має два центри зв'язування: один для з'єднання з рецептором на клітинній мембрані, інший володіє активністю фермента для розщеплення наступного компонента) і «a» (мінорний, забезпечує хемотаксис і слугує медіатором запалення). Інактивовані компоненти мають префікс «i». Компоненти формують активні ферменти, для позначення яких використовують риску над назвою фактора.

Активация системи комплементу реалізується за одним із механізмів: класичним, альтернативним чи лектиновим.

Класичний шлях запускається імунними комплексами, на яких агреговані IgM або IgG. Процес розпочинається зі зв'язування Ca^{2+} -залежного компонента C1q з молекулою імуноглобуліну, що сприяє почерговому активуванню C1r і C1s. Останній розщеплює компонент C4 на дві частини (C4a і C4b), з яких перша деградує, а друга утворює комплекс з C1. Далі відбувається розщеплення компонента C2 на активний фрагмент C2a (конвертазу) і залишок C2b, який деградує. Утворений комплекс C1 C4b C2a приєднує компонент C3, який теж розпадається на C3a (сприяє вивільненню гістаміну з гранул різних клітин) і C3b. Так утворюється асоціат C1 C4b C2a C3b з протезною активністю, в якому C3b може взаємодіяти з мембраною мікроорганізму. Така взаємодія викликає приєднання лейкоцитів і фагоцитоз. Далі відбувається зв'язування C5, який розпадається на анафілаксин C5a і приєднувану частину C5b. Після послідовного зв'язування C6 і C7 утворюється комплекс C5b,6,7, який послідовно асоціюється з C8 і C9 і вбудовується в ліпідний шар мембрани мікроорганізму, викликаючи її локальне ушкодження та порушення осмотичної рівноваги, що призводить до загибелі клітини.

Альтернативний шлях ініціюють полісахариди мембран бактерій, дріжджів, рослин. Він розпочинається з C3 компонента комплементу. необхідно за цих умов є участь білків пропердинової системи, яка складається з білка пропердину, збагаченого гліцином фактора В і протеази D. У результаті низки біохімічних перетворень утворюється комплекс пропердину, C3b і фактора В, який являє собою C3-конвертазу і послідовно зв'язує C5 – C9, як описано в класичному шляху.

Лектиновий шлях системи комплементу здійснюється через лектин. Активування розпочинається з взаємодії останнього з манозною групою, яка входить до складу полісахаридів мембрани мікроорганізму з подальшою активацією серинових протеїназ і залученням компонентів класичного каскаду.

Система комплементу бере участь не лише в реалізації імунної відповіді, їй також належить провідна роль у розвитку таких імунопатологічних реакцій, як анафілаксія (C3a), аутоімунні захворювання.

Колонієстимулюючі фактори (КСФ) – цитокіни, що стимулюють ріст кровотворних клітин (гранулоцитів, моноцитів, попередників еритроїдних

клітин). Вони продукуються Т-лімфоцитами, макрофагами, моноцитами, ендотеліальними клітинами.

Трансформуючі фактори росту (ТФР) – білки, що продукуються різними класами лімфоцитів, тромбоцитами, плацентою, деякими пухлинами. Вони стимулюють процеси проліферації фібробластів, синтезу колагену та фібронектину, беруть участь в ангіогенезі, загоюванні ран. Разом із цим, ТФР пригнічують проліферацію Т- та В-лімфоцитів, активність цитотоксичних та кіперних клітин.

Слід зазначити, що активовані лімфоцити та інші імунокомпетентні клітини синтезують пептидні фактори росту, зокрема епідермальний (ЕФР), нервовий (ФРН), а також соматомедини (інсуліноподібні фактори росту ІФР-1 та ІФР-2), і різні білково-поліпептидні гормони, що свідчить про надзвичайно важливу роль імунної системи в регуляції процесів росту, проліферації та клітинного диференціювання.

Введення цитокінів у організм підвищує кількість циркулюючих лейкоцитів і температуру тіла, зумовлює метаболічні зрушення та низку інших процесів. Лікарські препарати на основі цитокінів знайшли застосування в терапії низки захворювань (наприклад, у лікуванні хворих на злоякісні новоутворення, аплазію кровотворення, різноманітні види імунопатології). Так, наприклад, введення препарату ІЛ-2 при інфекційних захворюваннях відновлює здатність імунної системи адекватно здійснювати регуляторні та захисні функції (пероральне введення рекомбінантного інтерлейкіну-2 при гострих кишкових інфекціях і місцеве використання при хламідіозі та герпесі демонструє позитивні наслідки).

Імунодефіцитні стани. Порушення у функціонуванні імунної системи – імунодефіцитні стани – розвиваються за умов пошкоджень окремих ланок клітинного або гуморального імунітету. За механізмом походження виділяють *первинні та вторинні імунодефіцити*.

Первинні імунодефіцитні стани (ПІД). Первинні імунодефіцитні стани (ПІД) – це група тяжких генетично детермінованих захворювань, викликаних порушенням одного або декількох імунних механізмів захисту. Більшість цих станів дебютують в ранньому віці підвищеною схильністю до інфекційних захворювань. У даний час у медицині описано понад ста форм ПІД, частота їх виникнення становить в середньому 1:10000.

Розрізняють чотири класи первинних імунодефіцитів, що характеризують неповноцінність окремих основних компонентів імунної системи:

1. В-клітинна недостатність (дефіцит антитіл).
2. Т-клітинна недостатність.
3. Патологія клітин, які фагоцитують.
4. Патологія системи комплементу.

Вторинні імунодефіцити Вторинні імунодефіцити – патологічні стани, що розвиваються внаслідок ушкодження окремих ланок клітинного або гуморального імунітету патогенними факторами біологічного, хімічного або фізичного походження. Найчастіше вони розвиваються при дії на організм

тварини лімфотропної вірусної інфекції, токсичних факторів, іонізуючої радіації.

Полімеразна ланцюгова реакція (PCR) – найсучасніший метод діагностики лейкозу в тварин, що базується на ампліфікації РНК вірусу. Його головною перевагою є висока чутливість, що дозволяє визначити мінімальну кількість нуклеїнових кислот. Проте висока чутливість не дозволяє застосовувати цей метод для дослідження проб, забруднених іншими мікроорганізмами. У зв'язку з цим PCR проводять тільки у високоспеціалізованих лабораторіях із суворим дотриманням умов стерильності. PCR належить до кількісних методів дослідження вірусного генома, тому може використовуватись для оцінки ефективності лікування.

Спадкові дефекти нейтрофілів

До спадкових дефектів нейтрофілів відносяться синдром Чедіака-Хігасі у деяких видів тварин, дефіцит молекул адгезії (β_2 -інтегринів) у собак і великої рогатої худоби, недостатність бактерицидної активності нейтрофілів у собак і циклічний гемопоез у сірих коллі.

Тяжкий комбінований імунodefіцит

Синдроми тяжкого комбінованого імунodefіциту (ТКІД) характеризуються недостатністю продукції Т- і В-лімфоцитів. У арабських коней ТКІД успадковується за аутосомно-рецесивним типом. У хворих лошат число лімфоцитів в крові різко понижене або вони відсутні, спостерігається гіпоплазія первинних і вторинних лімфоїдних органів, здатність продукувати антитіла втрачено унаслідок відсутності зрілих Т- і В-лімфоцитів. Дефект утворення зрілих лімфоцитів обумовлений мутацією в гені, що кодує каталітичну субодиницю ДНК-залежної протеїнкінази (ДНК-ПК). Ця протеїнкіназа необхідна для процесу перебудови генів, в результаті якої формуються антигенспецифічні рецептори Т- і В-лімфоцитів. Сироватка здорових новонароджених лошат, отримана до першого годування, містить деяку кількість IgM, але у лошат з ТКІД IgM не визначається. Якщо такі лошата незабаром після народження починають нормально харчуватися молозивом, то вони отримують імуноглобуліни від матері і в цілому виглядають здоровими. Але після руйнування материнських імуноглобулінів в їх організмі, уражені ТКІД лошата, стають сприйнятливими до найрізноманітніших інфекцій і як наслідок гинуть у віці 4-6 місяців.

Нещодавно з'явилися відомості про ТКІД у джекрассел-тер'єрів. Як і при ТКІД у лошат арабських коней, хворі цуценята також мали спадковий аутосомно-рецесивний дефект каталітичної субодиниці ДНК-ПК. У цих цуценят виявлені глибока лімфопенія, зниження концентрації сироваткових імуноглобулінів і гіпоплазія всіх лімфоїдних органів. Хворі ТКІД цуценята зазвичай гинуть, досягнувши віку 8-14 тижнів.

У собак порід бассет і кардиганвельшкоргі описаний Х-зв'язаний синдром ТКІД. Хворі пси не ростуть, проявляють підвищену чутливість до бактерійних і вірусних інфекцій, у них відсутні пальповані периферичні

лімфовузли і тварини як наслідок гинуть у віці 4 місяців, якщо їх не утримувати в стерильному приміщенні. Тварини не продукують IgG і IgA, проте вміст IgM в їх сироватці нормальний. Абсолютне число лімфоцитів в крові зменшене або знаходиться в нижній межі норми. Відсоток В-лімфоцитів зазвичай не змінений, а відсоток Т-лімфоцитів варіює від нуля до норми. Лімфоцити крові не відповідають на Т-клітинні мітогени. Встановлено, що причиною Х-зв'язаного ТКІД у собак є мутації гена, що кодує загальний γ -ланцюг, важливий компонент рецепторів різних інтерлейкінів – ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-7, ІЛ-9 і ІЛ-15.

Недостатність сироваткових імуноглобулінів

Зниження концентрації імуноглобулінів в сироватці людини і тварин може бути обумовлене різними розладами. Варіабельний некласифікований імунодефіцит у людини (ВНІ) характеризується зниженням рівня сироваткових імуноглобулінів (IgG, IgA і/або IgM) і підвищеною чутливістю до інфекцій. Число В-лімфоцитів в крові, як правило, знаходиться в нормі, але у деяких пацієнтів виявляють дефект дозрівання В-лімфоцитів до плазматичних клітин. У інших випадках відзначають дефіцит Т-хелперів або надлишок цитотоксичних Т-лімфоцитів. Симптоми захворювання зазвичай з'являються в ранньому віці.

Описаний випадок ВНІ у 12-річного скакового коня, який характеризується персистуючою множинною опосередкованою бактерійною інфекцією і значним зниженням змісту IgG, IgG(T), IgM і IgA в сироватці. Загальне число лімфоцитів було нормальним, проте в крові В-лімфоцити не визначалися, а їх число в лімфовузлах і кістковому мозку було помітно знижене. Відсутність зміни загального числа лімфоцитів в крові може бути зв'язане з тим, що В-лімфоцити складають лише незначну їх частину. У коней описані імунодефіцитні стани з падінням рівня IgG одного або декількох типів, що відображає існування різних варіантів ВНІ. Це захворювання було зареєстроване у 7 молодих (вік менше 1 року) карликових такс з пневмонією. З порушень імунного статусу у цих тварин відмічені відсутність В-лімфоцитів в лімфовузлах, зниження концентрації імуноглобулінів усіх класів в сироватці крові і аномальна відповідь лімфоцитів крові на мітогени. Схожі порушення виявлені у молодого бордоського дога.

Є дані про подібний ВНІ у собак породи шарпей. Підвищена чутливість до інфекцій у цих собак виникає приблизно з трирічного віку. У них виявлені порушення з боку В- і Т-лімфоцитів і зниження концентрації імуноглобулінів одного або більше класів (IgG, IgM або IgA) в сироватці. Подібний же дефіцит сироваткових IgA і IgG відмічений у цуценят веймаранерів і ротвейлерів.

Х-зв'язана агаммаглобулінемія виявлена у лошат чистокровних і упряжних коней, у яких була відсутня визначена кількість В-лімфоцитів. У домашніх тварин описані імунодефіцитні стани з вибірковою недостатністю імуноглобулінів того або іншого класу. Таких як дефіцит IgM у коней і собак,

дефіцит IgG у лошат, дефіцит IgG у великої рогатої худоби і дефіцит IgA у собак.

Транзиторна гіпогаммаглобулінемія може виникнути у тварин раннього віку, якщо зникають отримані від матері антитіла. Це відбувається приблизно до 2 місячного віку, продукція власних IgG і IgM у них затримується. Тварини стають сприятливими до бактерійних інфекцій до тих пір, поки їх імунна система не досягне повного розвитку (приблизно до 6-місячного віку).

Дефіцит комплементу

У англійських спанієлів описаний дефіцит третього компоненту комплементу (C3), успадкований як аутосомно-рецесивна ознака. У гомозиготних за цим дефектом тварин розвиваються рецидивуючий сепсис, пневмонія і ранові інфекції. У собак з дефіцитом C3 понижена гуморальна імунна відповідь як на Т-залежні, так і незалежні антигени.

Недостатність антивірусного імунітету

У тварин виявлено ряд розладів, обумовлених недостатністю антивірусного імунітету, і тут ми назвемо лише небагато з них. Це, перш за все, синдром придбаного імунодефіциту кішок, що викликається FIV. Симптоми інфекції у тварин можуть не виявлятися протягом місяців і декількох років, а потім виникає важке хронічне запальне захворювання, що характеризується підвищеною чутливістю до інфекції. Такий стан обумовлений нейтропенією, лімфопенією або поєднанням обох розладів, а також зниженням числа CD4⁺-Т-лімфоцитів. Подібний же синдром відомий у приматів, у яких збудником захворювання є вірус імунодефіциту мавп, SIV (англ. simian immunodeficiency virus).

Котячий вірус лейкозу FeLV, володіє вираженою імуносупресивною дією. У хронічно інфікованих кішок часто виявляють нейтропенію, лімфопенію або і те і інше. Важко уражені функції Т-лімфоцитів, але функція В-лімфоцитів лише слабо порушена. FeLV-позитивні кішки схильні різноманітних вторинних інфекцій. З вірусних інфекцій, які індукують вторинний імунодефіцит з падінням числа Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів або клітин обох типів, можна назвати собачу чуму, інфекцію плодів, що викликається вірусом кінського герпесу і вірусну діарею великої рогатої худоби у телят.

Колостральний імунітет новонароджених

Сутність терміну «колостральний імунітет» заключається в тому, що з молозивом (colostrum) матері, у перші години життя, новонароджена тварина отримує максимальну кількість антитіл, які є природними факторами захисту і нагадують пасивну пероральну імунізацію. У молозиві (порівняно з молоком) у 3 рази більше протеїну, 80 % якого складають імуноглобуліни (материнські антитіла). Останніх у молозиві у 10–12 разів більше, ніж у крові. Частина антитіл надходить у молозиво з крові, а інша – виробляється плазматичними клітинами молочної залози. Впродовж перших 1–3 діб життя у травному тракті новонароджених імунні білки молозива не піддаються

ензимному гідролізу. Протягом перших годин життя у шлунковому соці відсутня вільна хлороводнева кислота, що обумовлює високі значення його рН 6,0–6,5, аналогічні активній реакції кишкового соку (через знижений вміст бікарбонатів), а тому пептидази травних соків залишаються неактивними, внаслідок дефіциту їх активаторів і специфічної дії інгібіторів молозива. Це сприяє засвоєнню антитіл у тонкому кишечнику в нативному вигляді. Антитіла матері руйнуються в організмі новонароджених ссавців упродовж перших місяців життя. Продукти їх розщеплення ініціюють розвиток власної імунної системи організму, що відбувається впродовж перших чотирьох – п'яти місяців життя.

Нині вже неодноразово підтверджено дані 80–90 років про те, що формування імунорезистентного стану організму розпочинається ще у пренатальний період розвитку тварин. Трансплацентарна передача імуноглобулінів (Ig) від матері до плоду в тварин різних видів залежить, перш за все, від епітеліохоріального типу плацентарного бар'єра.

Згідно матеріалів зарубіжних та вітчизняних науковців, у гризунів і приматів, зокрема людини, пасивний імунітет формується внаслідок прямого переходу антитіл матері з крові крізь плацентарний бар'єр до плоду, а після родів – у складі молозива до новонародженого. Проникність плаценти для антитіл різних класів неоднакова. Ig класів М та Е практично не проходять крізь плаценту, а класу А – лише частково. Водночас Ig G (особливо субклас G₁) має високу здатність транспортуватися через плацентарний бар'єр, що зумовлено особливою будовою Fc-фрагмента його молекули. У великої рогатої худоби наявність епітеліохоріального типу плаценти передбачає інший, особливий шлях імунізації новонародженого організму, який полягає у передачі їм нативних Ig із молозивом матері. Тому молозиво є єдиним джерелом материнських Ig, що забезпечують захист новонароджених телят у неонатальний період розвитку. Максимальна концентрація антитіл у ньому виявляється в перші дні після отелу, а потім швидко знижується. Це може бути пов'язано з активним розвитком імунної системи телят у ранній постнатальний період та експресією імуноглобулінових генів імунокомпетентними В-лімфоцитами. У молозиві корів уміст Ig G переважає над Ig А і М, оскільки клітини епітелію альвеол молочної залози мають вищу щільність Fc-γ-рецепторів.

У тварин деяких видів сліди Ig виявляються вже в ембріонах, на початку їх розвитку. Так, ще у 1969 році F. Brambell висловив гіпотезу про те, що окремі материнські глобуліни проникають через плаценту завдяки прикріпленню до специфічних рецепторів на поверхні плазматичної мембрани. Різні автори повідомляють про склад та особливості розповсюдження Fc-γ-рецепторів епітеліальних клітин мишей, щурів і людини. Показана значна гетерогенність поліпептидів цих рецепторів. Стимуляція Fc-γ-рецепторів індукує клітинну відповідь у самих різних типах клітин. Незважаючи на те, що антитіла не проникають через плаценту корів, існують дані, які свідчать про появу імунокомпетентних лімфоцитів і наявність власних Ig у жуйних у плідний період онтогенезу.

Fc- γ -рецептори є не лише в плаценті, але і на плазматичній мембрані епітеліальних клітин тонкої кишки плодів різних видів тварин, у т. ч. і у великої рогатої худоби, завдяки яким пасивний імунітет підтримується материнськими антитілами, що надходять з молозивом. Це може бути пов'язано також з тим, що Ig G властива бактеріостатична дія, і вони є найефективнішими у пренатальному захисті організму від інфекцій.

Виявлені Fc- γ -рецептори в апікальних і базолатеральних ділянках мембран ентероцитів свідчать про активний рециклінг цих рецепторів. Існують дані, які вказують на те, що рециклінг Fc- γ -рецепторів індукується специфічними лігандами, а саме – Ig G. Доведено, що трансцитоз за участю Fc- γ -рецепторів ентероцитів щурів індукується Ig G різних біологічних видів з подібною, але не еквівалентною активністю. Цей факт підтверджує відносну видо-неспецифічність спорідненості Fc- γ -рецепторів до γ -ланцюгів. Оскільки антитіла матері не проходять крізь плаценту, існуючі дані вказують на наявність Ig G та імунокомпетентних клітин, які здатні їх синтезувати на 3–5 місяці розвитку плода великої рогатої худоби.

Припускається важливе значення Fc- γ -рецепторів не лише в транспорті Ig G, але й у багатьох механізмах регуляції захисних реакцій у плідний період онтогенезу жуйних. Нині досить детально вивчено структуру та фізико-хімічні властивості багатьох рецепторних протеїнів. Існують розрізнені дані про функції Fc- γ -рецепторів різних клітинних ліній, які включають тромбоцити, нейтрофіли, еозинофіли, моноцити, макрофаги, гранулярні лімфоцити і В-лімфоцити. У всіх цих типах клітин стимуляція Fc- γ -рецепторів викликає певну клітинну відповідь, яка виявляється у вигляді ендоцитозу, фагоцитозу, антигеннезалежної клітинної взаємодії, генерації супероксидних радикалів, секреції лізосомальних ензимів і цитокінів. Відомо, що Fc- γ -рецептори сумісно діють з іншими гуморальними і клітинними рецепторами, які регулюють імунну відповідь.

Припускається, що збільшення концентрації Fc- γ -рецепторів на апікальній мембрані (АМ) ентероцитів упродовж перших двох триместрів пренатального періоду розвитку з піком їх вмісту у плодів 7-місячного віку пов'язане з наявністю специфічних індукторів в амніотичній рідині. Загальний вміст Fc- γ -рецепторів значно більший на базолатеральній мембрані (БМ) майже протягом усього плідного періоду, на відміну від апікального домену, з найвищою його експресією у 5-місячних плодів. Визначені зміни експресії Fc- γ -рецепторів асоційовані зі зміною фосфоліпідного складу плазматичних мембран (базолатерального полюсу) саме у цей період пренатального онтогенезу, особливо фосфатидилінозиту (ФІ), який є вторинним месенджером внутрішньоклітинної сигналізації.

Встановлене зниження вмісту рецепторів у фракціях АМ і БМ на 9-му місяці плідного періоду пояснюється тим, що в організмі плода на цей час розвитку вже є власні імунокомпетентні лімфоцити, які здатні відповідати на антигенну стимуляцію утворенням специфічних антитіл.

Отже, зміни експресії Fc- γ -рецепторів та їх гетерогенність в апікальних і базолатеральних макродоменах ентероцитів великої рогатої худоби у плідний

період розвитку свідчать про певні особливості розвитку та формування імунних механізмів у плода, починаючи з 3-го місяця пренатального онтогенезу. Імунні реакції за участю Fc-γ-рецепторів забезпечують потенційні адаптивні можливості внутрішньоутробного функціонування організму та готують його до антигенного пресингу після народження.

Співробітниками кафедри біохімії ім. акад. М. Ф. Гулого НУБіП України встановлено, що у плодів і новонароджених телят, порівняно з дорослими, ліпідний склад АМ і БМ ентероцитів характеризується низьким вмістом холестеролу (ХС), загальних фосфоліпідів (ЗФЛ), вищим рівнем ФІ, моноенових жирних кислот (ЖК) і наявністю міристинової кислоти. АМ ентероцитів, порівняно з БМ, має значно нижчу величину ліпід/протеїнового співвідношення та вищу густину.

У плазматичній мембрані ентероцитів тонкого кишечника новонароджених телят відкрито протеїни з молекулярними масами 120, 100, 87, 75 та 24 кДа (Цвіліховський М. І., 1998), які зникають у перші дні постнатального онтогенезу та відсутні в дорослих тварин. Встановлено, що ці протеїни проявляють здатність до рецепції Ig. Запропонована гіпотеза рецепторно-ендоцитозного механізму формування колострального імунітету у великої рогатої худоби.

Спектр ліпідів і протеїнів визначає активність ензимів плазматичної мембрани ентероцитів. У період формування колострального імунітету в новонароджених телят питома активність Na^+ , K^+ -АТФази, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази і Mg^{2+} -АТФази плазмолем ентеро-цитів тонкого кишечника в кілька разів вища порівняно з іншими періодами постнатального онтогенезу жуйних (Цвіліховський М. І., 1998). Це пояснюється необхідністю забезпечення у новонароджених потужної системи для відкачування Na^+ з цитоплазми клітин для інтенсивного всмоктування амінокислот і вуглеводів, підтримання іонного гомеостазу та високою інтенсивністю метаболічних процесів в епітелії слизової оболонки кишечника.

Функціонування кишечного епітелію в перші доби постнатального онтогенезу жуйних представляє інтерес з точки зору дослідження механізмів всмоктування нативних Ig та формування локального і загального імунітету в новонароджених ссавців. На сьогодні доведено тісний взаємозв'язок між параметрами КЛС крові та формуванням резистентного стану організму в новонароджених телят (Грищенко В.А., 1998, рис. 2.10). Обґрунтована необхідність швидкої стабілізації КЛС в організмі телят після народження як важливого регулятора рецепторно-ендоцитозного механізму формування колострального імунітету.

За допомогою регресійного аналізу в телят перших 36-ти год життя виявлено високу кореляційну залежність між показниками КЛС (рН, HCO_3^- , ЗБО) і рівнем у плазмі крові протеїнів γ-гло-булінової фракції: $r(\text{pH}) = 0,85$; $r(\text{HCO}_3^-) = 0,74$; $r(\text{ЗБО}) = 0,82$). Це дозволило побудувати з використанням комп'ютерної техніки математичну модель цих процесів (Грищенко В.А., 1998).

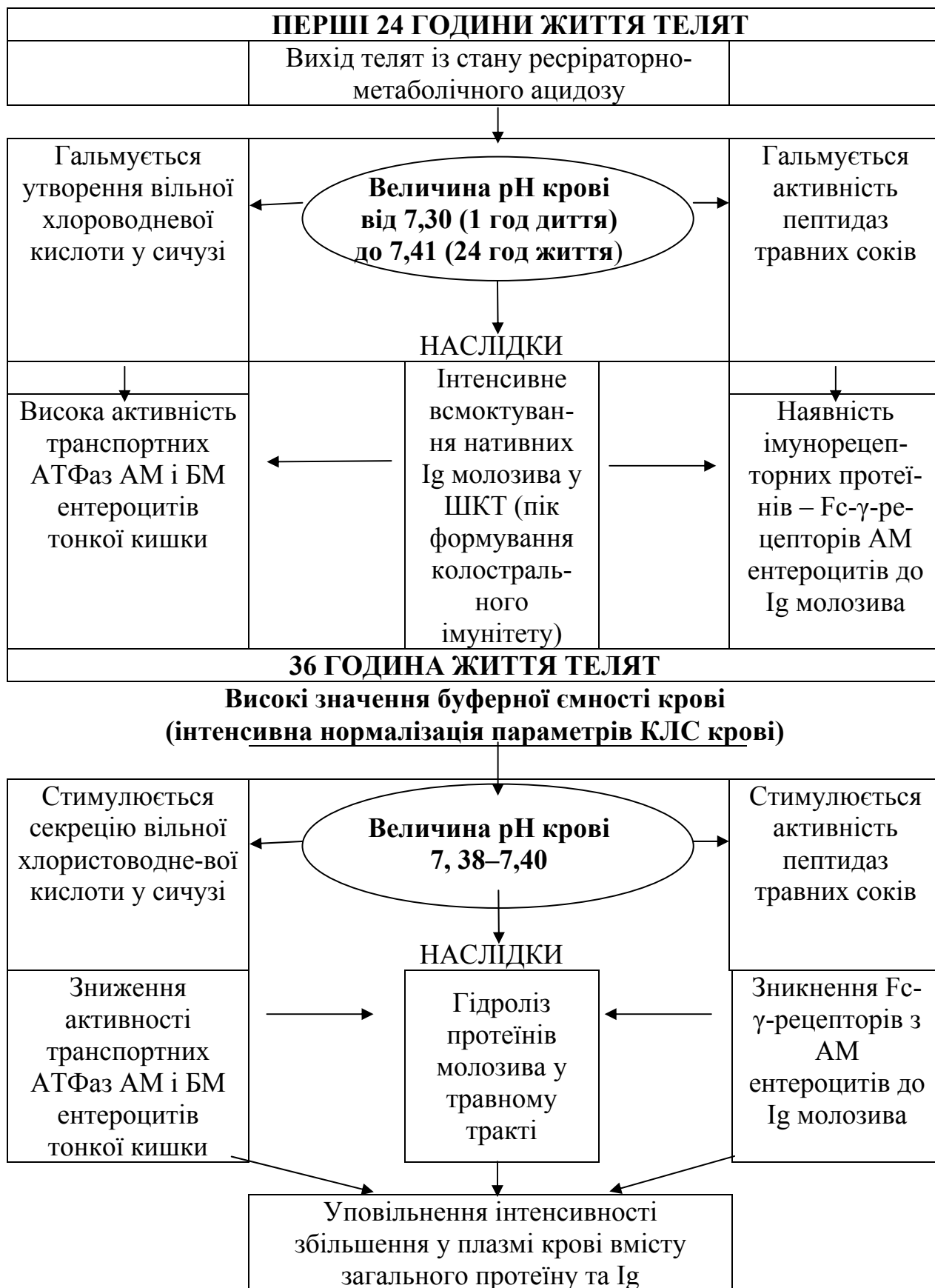


Рис. 2.10. Взаємозв'язок між показниками КЛС і формуванням колострального імунітету в новонароджених телят перших 36-ти год життя (Грищенко В.А., 1998)

$$y = b_1 + b_2 x_3 + b_3 x_4 + b_4 x_6 + b_5 x_1 + b_6 (x_6^3) + b_7 x_4 x_6 + b_8 x_6^2 + b_9 x_4^2 + b_{10} \frac{1}{x_4} + b_{11} \frac{1}{x_6}, \quad (3.1)$$

де y – залежна змінна (рівень γ -глобулінів, г/л);

x – незалежна змінна (показники КЛС крові);

$b_1 - b_{11}$ – коефіцієнти регресії.

Розраховані на персональному комп'ютері за допомогою пакетів прикладних програм MATHCAD невідомі коефіцієнти рівняння регресії мають такі значення:

$b_1 = 1588,56$; $b_2 = -1,413$; $b_3 = -16,638$; $b_4 = -19,415$;

$b_5 = -127,16$; $b_6 = -0,0176$; $b_7 = 0,9229$; $b_8 = -0,5741$;

$b_9 = 0,1112$; $b_{10} = -5774$; $b_{11} = 0,4$.

Підставляючи їх у рівняння (3.1), одержуємо:

$$y = 1588,56 - 1,413x_3 - 16,638x_4 - 19,415x_6 - 127,16x_1 - 0,0176(x_6^3) + 0,9229x_4x_6 - 0,5741x_6^2 + 0,1112x_4^2 + 57,74 + 0,004. \quad (3.2)$$

Таку модель можна розглядати як експрес-метод розрахунку концентрації імунних протеїнів у плазмі крові новонароджених телят у період інтенсивного формування колострального імунітету. Вона дозволяє прогнозувати та швидко діагностувати формування у новонароджених телят стану гіпогаммаглобулінемії. З'являється можливість вчасно коригувати розвиток у них недостатнього рівня в плазмі крові захисних факторів, що особливо актуально у період становлення імунного статусу організму.

Таким чином, представлені дані свідчать про пренатальне становлення механізмів імунологічної реактивності у великої рогатої худоби, що є підґрунтям для рецепторно-ендоцитозного механізму формування колострального імунітету в умовах зміни кислотно-лужного балансу в організмі щойно народжених тварин.

Формування колострального імунітету в новонароджених телят

Дослідження динаміки протеїнів крові дозволяє простежити поетапне становлення імунітету у новонароджених телят разом із виявленням факторів, які його забезпечують. Формування резистентності організму тварин відбувається ще у пренатальний період розвитку за одночасної взаємодії між гальмуючими (імуносупресори) і забезпечуючими (імуноглобуліни) імунітет факторами.

Встановлена зворотна кореляційна залежність між вмістом ембріоспецифічних імуносупресорних протеїнів та імуноглобулінами у плазмі крові телят на ранніх етапах розвитку.

Печінка великої рогатої худоби в антенатальний період онтогенезу синтезує імуносупресорні протеїни плазми крові, дія яких викликає послаблення функції імунної системи шляхом їх впливу на процеси, що пов'язані з поділом імунокомпетентних клітин. Запуск механізму пасивної передачі антитіл потребує спеціальної підготовки організму матері та новонародженого до цього процесу (рис. 2.11).

Відомо кілька груп факторів, які забезпечують формування колострального імунітету у новонароджених тварин. Це мобілізує організм новонародженого теляти і, особливо його шлунково-кишковий тракт, для сприйняття за короткий час імуних протеїнів молозива від корів-матерів.

Найбільш інтенсивно формування колострального імунітету у телят відбувається протягом перших 24–36-ти год життя. Під час першої доби життя у крові новонароджених телят відмічається швидке зростання рівня загального білка (на 43 %, порівняно з першою годиною життя). Максимальної величини вміст загального білка набуває на 36-ту год життя телят.

Разом зі змінами рівня загального протеїну в крові новонароджених телят на 24- і 36-ту год їх постнатального життя спостерігається вірогідне підвищення концентрації імуноглобулінів (у 4,3 та 5,0 рази відповідно часу).

Імуноглобуліни у крові новонароджених телят переважно представлені класами G і M. Вказані протеїни мають важливе значення у формуванні загального і місцевого імунітету.

Важливо, що у період інтенсивного наростання у крові новонароджених тварин рівня загального протеїну та імуноглобулінів, досліджено збільшення концентрації протеїнів-інгібіторів протеаз (імуносупресора – α_2 -макроглобуліну на 74 % і сумарної фракції α_1 -антихімотрипсину на 93 %). На 36-ту год життя телят концентрація цих протеїнів знижується відповідно на 47 і 50 %.

Отже, зростання у крові новонароджених телят концентрації імуноглобулінів супроводжується поступовим зниженням вмісту в ній інгібіторів протеаз та імуносупресорних протеїнів. Це свідчить про існування гомеостатичного механізму контролю за формуванням фізіологічного рівня імуноглобулінів у крові цих тварин

Молозиво є основною проміжною ланкою у механізмі здійснення пасивної передачі антитіл від корів до новонароджених телят. Особливо високі імунобіологічні властивості має молозиво корів першого удою, які визначаються як кількістю, так і співвідношенням окремих класів імуноглобулінів.

КОЛОСТРАЛЬНИЙ ІМУНІТЕТ		
I ГРУПА ФАКТОРІВ	II ГРУПА ФАКТОРІВ	III ГРУПА ФАКТОРІВ
Якісні і кількісні особливості протеїнового спектра крові і молозива	Структурно-функціональні особливості і фізико-хімічні властивості епітелію слизової оболонки травного каналу	Метаболічний профіль організму новонароджених тварин
• відсутність або низький рівень імуноглобулінів у плазмі крові до першої годівлі молозивом; • висока концентрація імунних протеїнів у молозиві та висока активність інгібіторів протеолітичних ензимів у крові та молозиві; • низький вміст загального протеїну в плазмі крові; • оптимальне для всмоктування нативних протеїнів молозива значення величини рН кишкового соку, що становить 6,0–6,5.	• висока активність транспортних АТФ-аз та інших мембранозв'язаних ензимів; • відсутність секреції залозами сичуга вільної HCl протягом перших годин життя; • низька активність протеолітичних ензимів травних соків; • вищий вміст загальних фосфоліпідів, холестеролу, жирних кислот у т.ч. сфінгомієліну, відношення холестерол/фосфоліпіди і менша кількість жирних кислот у БМ на відміну від АМ; • збільшення у плазмолемі ентероцитів вмісту лізофосфатидилхоліну, зниження – холестеролу, збільшення – монооснових і зниження – тетраєнових жирних кислот; • більш низьке значення ліпід/протеїнового співвідношення у БМ та АМ ентероцитів; • рецепторно-ендоцитозний механізм абсорбції імунних протеїнів у тонкому кишечнику.	• народження тварин у стані респіраторно-метаболічного ацидозу, який нормалізується на 24–48-му год життя • висока інтенсивність окисно-відновних процесів у тканинах і підвищення продукції АТФ; • переважання анаболічних процесів у тканинах; • посилене утворення глюкози в реакціях глікогеннолізу і гліуконеогенезу.

Рис. 2.11. Закономірності формування колострального імунітету у новонароджених телят

На наступну добу відбувається різке зниження у молозиві рівня загального білка до 45 г/дм^3 зі зменшенням концентрації імуноглобулінів класу G до 20 г/дм^3 і класу M до $0,16 \text{ г/дм}^3$. На 3–10-ту добу кількість загального протеїну в молозиві (молоці) становить $20\text{--}25 \text{ г/дм}^3$ із поступовим зниженням вмісту імуноглобулінів G- і M-класів ($13\text{--}16 \text{ г/дм}^3$ та $1,4\text{--}1,5 \text{ г/дм}^3$ відповідно).

Потрапивши з молозивом у тонкий відділ кишечника новонародженої тварини, імуноглобуліни утворюють комплекс із специфічними Fс-рецепторними протеїнами з молекулярними масами (120 кД, 100, 87, 75 та 24 кД), які розміщені на апікальних мембранах епітеліальних клітин тонкого відділу кишечника. Вони відсутні на плазмолемі ентероцитів вже у телят 3-добового віку. Отже, транспорт імунних білків молозива у травному каналі новонароджених жуйних відбувається рецепторно-ендоцитозним шляхом.

Значна роль у забезпеченні поживними речовинами організму новонароджених телят належить транспортним аденозинтрифосфатазам апікальної та базолатеральної мембран епітеліальних клітин тонкого кишечника. Характерно, що їх активність у тварин першої години життя набагато вища за таку у телят старшого віку.

Тривалість колострального імунітету становить 5–6 тижнів. Якщо протягом перших 2–3 діб життя новонароджені телята не отримують достатньої кількості захисних протеїнів, то це сприяє зниженню їх імунобіологічної резистентності. На думку багатьох дослідників, гіпогаммаглобулінемія є основною причиною виникнення у новонароджених телят гострих розладів травлення та інших системних патологій. Знання закономірностей формування імунного статусу організму новонароджених телят, особливо в ранній постнатальний період, має важливе значення у розробці методів профілактики та ранньої діагностики імунодефіцитного стану їх організму та його своєчасної корекції з метою попередження розвитку неонатальних захворювань.

Коефіцієнт інтенсивності змін рівня імуноглобулінів у плазмі крові телят у прогнозуванні розвитку імунодефіцитного стану організму

Своєчасність виявлення новонароджених тварин із порушенням фізіологічного процесу становлення рівня імуноглобулінів (γ -глобулінів) сироватки крові у новонароджених телят перших 36-ти год життя і раннє прогнозування формування імунодефіцитного стану їх організму має важливе значення для забезпечення ефективності превентивних і терапевтичних технологій при неонатальній патології телят з метою збереження і вирощування здорового поголів'я продуктивних тварин.

Для розв'язання цього питання пропонується (Грищенко В.А., 2015) визначати коефіцієнт інтенсивності (ІЗІК) змін рівня імуноглобулінів у плазмі крові новонароджених телят перших 36 год життя.

На момент народження телят до першого випоювання молозива у сироватці крові відмічається низький рівень загального протеїну ($48,70 \pm 0,76 \text{ г/л}$) і слідовий вміст γ -глобулінової фракції (табл. 2.20).

Впродовж першої доби життя спостерігається інтенсивне підвищення рівня загального протеїну (на 43 %) порівняно з вихідними даними, що у телят на 24-ту год життя, як відомо, зумовлено інтенсивним всмоктуванням протеїнів молозива у травному каналі (особливо високі імунобіологічні властивості у молозива першого удою), наявністю інгібіторів протеаз і особливим рецепторним механізмом абсорбції нативних протеїнів у кишечнику.

Таблиця 2.20. Інтенсивність змін концентрації імуноглобулінів у сироватці крові здорових телят упродовж перших 36-ти год життя та при моделюванні у них стану метаболічного ацидозу й алкалозу, $M \pm m$; $n = 12$

Період дослідження	C_{Ig} , г/л	$C_{зп}$, г/л	Коефіцієнт ІЗІК (діапазон значень)
інтактні телята			
Через 1 год після народження (до першого випоювання молозива)	$2,23 \pm 0,53$	$48,70 \pm 0,76$	$0,05 \pm 0,01$ (0,04–0,06)
На 24 год життя	$9,63 \pm 0,14^*$	$69,80 \pm 0,25^*$	$0,14 \pm 0,01^*$ (0,13–0,15)
На 36 год життя	$11,17 \pm 0,73^*$	$72,70 \pm 0,20^*$	$0,15 \pm 0,01^*$ (0,14–0,16)
телята у стані штучного ацидозу			
Через 1 год після народження (до першого випоювання молозива)	$2,22 \pm 0,54$	$48,90 \pm 0,70$	$0,05 \pm 0,01$ (0,03–0,06)
На 24 год життя	$8,38 \pm 0,34^*$	$61,80 \pm 3,40$	$0,14 \pm 0,01^*$ (0,13–0,15)
На 36 год життя	$9,01 \pm 0,47^*$	$65,0 \pm 3,10$	$0,14 \pm 0,01^*$ (0,13–0,15)
телята у стані штучного алкалозу			
Через 1 год після народження (до першого випоювання молозива)	$2,23 \pm 0,52$	$48,80 \pm 0,77$	$0,05 \pm 0,01$ (0,04–0,06)
На 24 год життя	$11,56 \pm 1,81^*$	$73,0 \pm 2,30^*$	$0,16 \pm 0,01^*$ (0,14–0,18)
На 36 год життя	$13,82 \pm 0,24^*$	$75,50 \pm 0,22^*$	$0,18 \pm 0,01^*$ (0,17–0,19)

П р и м і т к а. * $p < 0,05$ достовірна різниця динаміки вмісту протеїнів крові порівняно з вихідними результатами.

Максимальної величини рівень загального протеїну набуває на 36-ту год життя телят ($72,70 \pm 0,20$ г/л). Разом зі змінами рівня загального протеїну, у сироватці крові телят на 24- і 36-ту год життя в нормі спостерігається вірогідне підвищення концентрації імуноглобулінів у 4,3 і 5 разів відповідно до часу спостережень. За даними літератури ендogenous біосинтез антитіл відмічається лише з 8–16-тої доби після народження телят, а Ig A – на 64-ту добу. Тому у випадках розвитку в новонароджених тварин неонатального патології або порушення режиму вигодовування молозива в їх крові формується недостатній рівень імуноглобулінів.

КЛС організму суттєво впливає на швидкість і напрям перебігу метаболічних процесів у тканинах. В умовах експериментального метаболічного ацидозу, як і в інтактних тварин, рівень загального протеїну в сироватці крові телят упродовж перших 36-ти год життя характеризується тенденцією до підвищення (див. табл. 2.20). Однак, в перших цей процес відбувається повільніше і тому його значення на 24- і 36-ту год життя на 11 % нижче за контрольні. Цьому можуть сприяти погіршення процесів всмоктування протеїнів молозива у шлунково-кишковому тракті телят у стані ацидозу. Крім того концентрація протеїнів γ -глобулінової фракції у плазмі крові телят у стані експериментального ацидозу на 24-ту год життя була на 13 %, а на 36-ту – на 19 % нижче, ніж у тварин контрольної групи.

Таким чином, підвищення концентрації іонів водню у внутрішньому середовищі організму новонароджених телят негативно впливає на формування рівня γ -глобулінів сироватки крові.

Респіраторно-метаболічний ацидоз в організмі телят періоду новонародженості у процесі стабілізації кислотно-лужних параметрів закономірно переходить у незначно виражений компенсований алкалоз. В експерименті на інтактних тваринах такий стан виявляється на 24-ту год їхнього постнатального життя. Цьому сприяє інтенсивне наростання буферної ємності крові. Одночасно, цей період характеризується інтенсивним підвищенням у сироватці крові тварин рівня загального протеїну.

Переведення новонароджених телят у стан експериментального метаболічного алкалозу призводить до зростання рівня вуглекислоти й концентрації бікарбонатних іонів у сироватці крові таких телят, а також підвищенню вмісту загального протеїну як на 24-, так і на 36-ту год життя (відповідно на 5 і 4 % порівняно з контролем і на 18 та 16 % – із телятами у стані ацидозу), див. табл. 3.20.

Крім того, в їхній сироватці спостерігається порівняно високий рівень протеїнів γ -глобулінової фракції ($11,56 \pm 1,81$ і $13,82 \pm 0,24$ г/л відповідно на 24- і 36-ту год життя). Цей факт доводить позитивний вплив змін показників КЛС в сторону алкалозу на функціонування механізмів, які забезпечують формування резистентного стану організму, що впливає також і на транспорт протеїнів молозива у кров.

Встановлені закономірності інтенсивності змін рівня загального білка та імуноглобулінів у сироватці крові телят упродовж перших 36-ти год життя, в

яких також штучно викликали стан ацидозу й алкалозу, стало основою у розрахунку запропонованого нами показника інтенсивності змін імуноглобулінів крові (коефіцієнта ІЗІК) (див. табл. 2.20).

Його розрахунок передбачає визначення співвідношення концентрації імуноглобулінів (C_{Ig}) і загального протеїну ($C_{ЗП}$) у сироватці крові новонароджених телят на першу годину життя (до випоювання молозива) та на 24- і 36-ту год життя згідно формули:

$$ІЗІК = \frac{C_{Ig}}{C_{ЗП}},$$

де ІЗІК – коефіцієнт, що характеризує інтенсивність зміни імуноглобулінів крові по відношенню до концентрації загального протеїну сироватки крові новонароджених телят перших 36-ти год життя; C_{Ig} – концентрація імуноглобулінів у сироватці крові телят (г/л); $C_{ЗП}$ – концентрація загального протеїну сироватки крові (г/л). Фізіологічні значення цього коефіцієнта для телят на 1 год життя (до випоювання молозива) – 0,05 (0,04–0,06), на 24 год життя – 0,14 (0,13–0,15), на 36 год життя – 0,15 (0,14–0,16), табл. 2.20 та рис. 2.12.

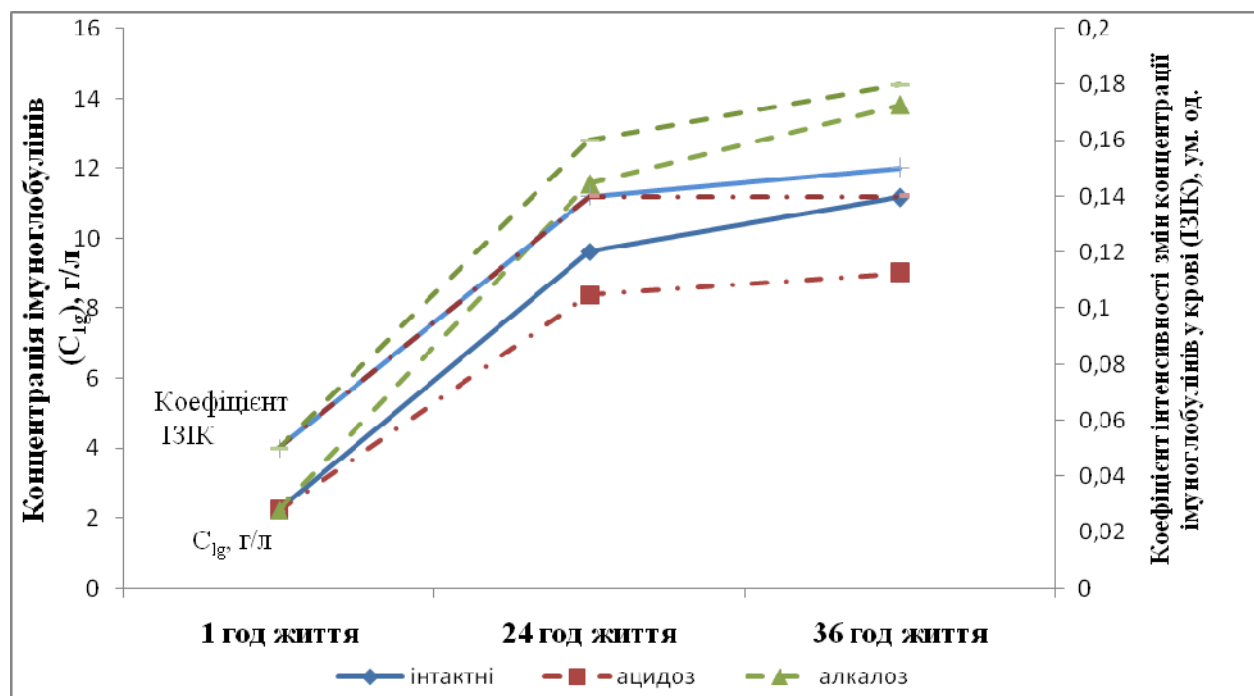


Рис. 2.12. Інтенсивність змін концентрації імуноглобулінів у сироватці крові (коефіцієнт ІЗІК) здорових телят упродовж перших 36-ти год життя та при моделюванні у них стану метаболічного ацидозу й алкалозу

Примітка: коефіцієнт ІЗІК, ум.од. – інтенсивність змін концентрації імуноглобулінів у сироватці крові; C_{Ig} , г/л – концентрація імуноглобулінів у сироватці крові.

У результаті аналізу отриманих величин коефіцієнта ІЗІК можна стверджувати, що перебування телят упродовж перших 36-ти год життя у стані штучного ацидозу супроводжується формуванням дефіцитного рівня імуноглобулінів у сироватці крові і свідчить про тенденцію до формування імунодефіцитного стану організму, а отже схильність цих тварин до виникнення неонатальної патології.

І навпаки, у телят, які перебували зазначений вище період у стані штучного алкалозу, встановлено підвищення рівня імунозабезпечення організму та високі значення цього коефіцієнта.

Отже, визначення величини коефіцієнта ІЗІК пропонується для використання у прикладній ветеринарії з метою діагностики, прогнозування і профілактики розвитку імунодефіцитного стану організму в новонароджених телят та у превентивних і терапевтичних технологіях неонатальної патології для збереження і вирощування здорового поголів'я продуктивних тварин

Питання для самоперевірки:

- 1. Що собою являє імунна система організму?*
- 2. Види імуноглобулінів та їхні функції?*
- 3. Що таке імунодефіцитний стан та його види?*
- 4. Що на сьогодні відомо про формування колострального імунітету в новонароджених ссавців?*
- 5. Особливості формування колострального імунітету у новонароджених телят?*
- 6. Математична модель розрахунку рівня протеїнів γ -глобулінової фракції за відомими показниками кислотно-лужного стану крові?*

Тема 2.9. Біохімічні аналізатори у лабораторній діагностиці

2.9.1 Біохімічні аналізатори: принципи роботи та сфери використання

Сучасні автоматичні аналізатори дають можливість визначати цілий ряд важливих параметрів, дані про які сприяють швидкій постановці правильного діагнозу.

Одним з найбільш незамінних у діагностиці пристроїв виступає біохімічний аналізатор. Цей прилад дозволяє оперативно виконувати як біохімічні, так і клінічні дослідження біологічних рідин.

Перелік найпоширеніших показників клініко-біохімічних досліджень крові при використанні у лабораторній діагностиці біохімічних аналізаторів:

- **ензими:** аланінамінотрансфераза, аспартатамінотрансфераза, амілаза, гаммаглутамілтранспетидаза, креатинкіназа, креатинкіназа-МБ, лактатдегідрогеназа, ліпаза, холінестераза, лужна фосфатаза;
- **іони:** залізо, кальцій, магній, мідь, фосфат, цинк;

- **субстрати:** альбумін, білок загальний, білок у сечі, білірубін загальний, білірубін прямий, глюкоза, креатинін, сечова кислота, сечовина, триацилгліцероли, холестерол загальний, холестерол ЛПВЩ, холестерол ЛПНЩ.

- **специфічні білки:** аполіпопротеїн А, аполіпопротеїн В, гемоглобін глікозильований, трансферин, С-реактивний білок, С3, С4, IgA, IgG, IgM.

Отримання точних результатів за допомогою біохімічних аналізаторів засновано на поєднанні передових оптичних, механічних та комп'ютерних технологій в єдиному діагностичному приладі.

Ключові характеристики біохімічного автоаналізатора:

- принцип роботи – автоматичний/напіваавтоматичний;
- продуктивність;
- кількість проб і реагентів, що розміщуються “на борту” приладу;
- можливість роботи з наборами реагентів різних виробників (відкритість системи);
- витрата реагентів і проб на один аналіз;
- надійність приладу;
- ергономічність, користувальницький інтерфейс;
- вимоги до умов експлуатації.

Біохімічні аналізатори використовуються в оснащенні діагностичних лабораторій будь-якого рівня, що викликано необхідністю впровадження в практику сучасних методів ранньої лабораторної діагностики потенційно фатальних патологій для їх своєчасної профілактики та ефективної терапії.

Аналітичні характеристики

Відтворюваність результату біохімічного аналізу залежить від:

- відтворюваності дозування проби;
- дозування реагентів;
- фотометричного вимірювання.

Більшість сучасних біохімічних аналізаторів дозволяє виконувати фотометричні і турбодиметричні дослідження «по кінцевій точці» і в кінетичному режимі. Математичне забезпечення біохімічного аналізатора залежить від його класу і програмного забезпечення. Більшість сучасних аналізаторів вже містять програми роботи з нелінійними калібруваннями і верифікацію результатів за правилами Вестгарда, побудова карт Леві-Дженнінгса.

Для ефективної роботи лабораторії, необхідно, щоб робочий простір було організовано компактно і зручно. Не в усіх приладів є можливість дозавантаження тестів під час роботи.

Режим доступу до тестів:

- система «тест за тестом» – пакетний доступ, при якому для всіх зразків система визначає спочатку один параметр, потім наступний і т.д. (подібна система характерна для аналізаторів, обладнаних проточною кюветою);
- система «пацієнт за пацієнтом» і/або «тест за тестом» – вільний доступ (RandomAccess), при якому можна обрати режим «визначення всіх параметрів для одного зразка», або, як і при пакетному режимі, визначити

один і той же параметр в усіх зразках. Ця система володіє всіма перевагами. Пакетна система дозволяє проводити екстрене визначення будь-якого параметра (Stat-дослідження), однак вимагає кваліфікованого призначення черговості тестів або ретельної специфічної промивки між певними типами аналізів. У найсучасніших аналізаторах ця проблема вирішена шляхом введення списків тестів, заборонених до послідовної постановки, або за допомогою одноразових реакційних кювет.

Конструкція блоків для реагентів, проб і реакційного вузла:

- Перший тип – це “лінійний” реагентний блок, що представляє собою стрип з гніздами для кювет з реагентами. Серйозним недоліком такої конструкції є необхідність перенесення реагентів з промислових ємностей в спеціальні кювети: по-перше, на цьому етапі можливе забруднення реагентів, по-друге – частина реагенту завжди залишається в кюветі та не підлягає поверненню в основну ємність.

- Другий тип блоку реагентів – “карусель”, в яку поміщають реагенти в “промислових” флаконах. При такій конструкції паркан реагенту здійснюється практично повністю, помилки, забруднення реагенту і його втрати на цьому етапі виключені. У найсучасніших моделях реагентна карусель охолоджується до 10–15° С.

Аналізатори можна розбити на кілька основних класів:

1. Прилади компакт-класу. Це невеликі прилади невисокої продуктивності – 80–120 тестів на годину, як правило, з одним дозатором, деякі ще з проточною кюветою, з 10–30 позиціями для проб, мінімальним об’ємом дозування реагентів до 500 мкдм³ (для приладів застарілої конструкції), хоча самі сучасні мають непогані показники в 200–300 мкдм³. Таким приладом можна обладнати КДЛ з кількістю тестів – 200–400 за добу.

2. Прилади середнього класу. Це аналізатори з реальною продуктивністю 120–250 тестів за годину. Може бути як один, так і два дозатора, 30–50 позицій для проб і реагентів, мінімальний обсяг дозування – 180–250 мкдм³. Фотометричні вимірювання в аналізаторах такого класу зазвичай здійснюється безпосередньо в реакційних кюветах. Це розумний вибір для КДЛ з необхідністю виконання 400–1000 тестів за добу.

3. Прилади високого класу. Це прилади з продуктивністю в 250–400 тестів за годину. Два, а іноді і три дозатори, 60–100 позицій для проб і реагентів. Такі аналізатори вкрай рідко управляються вбудованими комп’ютерами, принтер, як правило, теж зовнішній. На такому приладі можна легко виконувати до 2000 тестів за добу.

4. Прилади вищого класу. Продуктивність в 400–800 тестів на годину, три дозатори, робота тільки на реагентах виробника – це основні риси подібних машин, призначених для обробки величезного потоку пацієнтів. Устаткування такого рівня ставлять в лабораторії великих діагностичних центрів, що виконують кілька тисяч тестів за добу.

Принцип вибору аналізатора в залежності від клінічної задачі і потреб лабораторії: по-перше, необхідно визначити передбачуване завантаження приладу (потік пацієнтів); по-друге – врахувати можливості

штатного розкладу та кваліфікацію персоналу; у третіх – визначити, які саме тести і в якій кількості передбачається проводити.

Таким чином, напівавтоматичний біохімічний аналізатор може бути оптимально використаний при незначному потоці пацієнтів, або у разі проведення численних аналізів одного або декількох схожих показників. Повністю автоматизована система необхідна при потоці більше 10 пацієнтів за добу, особливо – при широкому профілі призначуваних тестів, або при проведенні тестів, що вимагають додаткового обрахунку і верифікації

Серед поширених біохімічних аналізаторів крові, які сьогодні активно використовуються фахівцями діагностичних лабораторій, слід виділити, в першу чергу, напівавтоматичні і автоматичні прилади, а також ручні спектрофотометри.

Напівавтоматичні аналізатори (рис. 2.13)

Дозволяють звести роботу фахівця до мінімуму. В основні завдання фахівця при використанні напівавтоматичного аналізатора входить лише приготування проб і підготовка реагентів. Решта робіт, включаючи розрахунок результатів, виконуються біохімічним аналізатором автоматично, згідно заданого лаборантом алгоритму. При цьому необхідна інформація відображається на дисплеї приладу.

A) GBG Stat Fax 3300



B) Stat Fax 1904 Plus



Рис. 2.13. Біохімічні напівавтоматичні аналізатори – компактна фотометрична, керована мікропроцесором система, що дозволяє проводити дослідження клінічних біохімічних показників крові (сироватки/плазми), сечі, спинномозкової рідини та інших біорідин, а саме: концентрації гормонів, імуноглобулінів, активності ензимів тощо

П р и м і т к а: А) Біохімічний напівавтоматичний аналізатор відкритого типу **GBG Stat Fax 3300** – компактна фотометрична, керована мікропроцесором система, що дозволяє проводити дослідження клінічних біохімічних показників крові (сироватки/плазми), сечі, спинномозкової рідини. Призначений для визначення концентрації гормонів, імуноглобулінів, активності ензимів тощо. Може використовуватися для розрахунку абсорбції або концентрації на основі стандартних крапок чи розрахунку швидкості процесу реакції; В) Аналізатор біохімічний

напівавтоматичний відкритого типу **Stat Fax 1904 Plus** – апарат для визначення хімічного складу крові, концентрації субстратів у досліджуваному біоматеріалі за допомогою оптичних, механічних та комп'ютерних технологій. Основними показниками для визначення у сучасній медицині виступають ензими, метаболіти, субстрати, ліпіди, електроліти.

Аналізатори автоматичні біохімічні (рис. 2.14)

Відносяться до категорії найбільш прогресивних, зручних для повсякденного використання приладів. Застосування пристроїв даного типу практично не потребує участі спеціаліста. У ході досліджень лаборант залишає за собою лише настройку приладу, яка передбачає підбір необхідних профілів, програмування тестів, згідно з якими визначаються потрібні параметри в аналізованих пробах.

A) Sapphire 800



B) Chemray 360



Рис. 2.14. Біохімічні автоматичні аналізатори – система нового покоління з відкритим доступом для клінічної хімії та імунотурбідиметрії

П р и м і т к а: А) **Sapphire 800** – система нового покоління з відкритим доступом провідного європейського виробника реагентів і лабораторного обладнання компанії «Audit diagnostics» (Ірландія) Розрахований на потужні та середні лабораторії з великою кількістю хворих при широкому спектрі призначених аналізів. Серед конкурентних переваг слід відмітити: економічність; низькі витрати реактивів на реакцію; довговічні електроди з можливістю індивідуальної заміни; надійні кювети, ефективна промивна система; розширені аналітичні горизонти; максимальна кількість одночасно виконуваних тестів; постійно зростаючий спектр досліджень; зручність у роботі: сучасний графічний інтерфейс, передове програмне забезпечення, мінімальний об'єм щоденного обслуговування; В) **Chemray 360** – автоматичний біохімічний аналізатор нового покоління для клінічної хімії та імунотурбідиметрії, що дозволяє проводити до 360 досліджень на годину. Повністю відкрита система для реагентів різних виробників з високою

пропускною здатністю і відтворюваністю результатів дослідження. Система відрізняється високою економічністю, дозволяючи додавати нові зразки у процесі роботи (у т.ч. СТАТ проби).

Спектрофотометр (рис. 2.15)

Такий біохімічний аналізатор призначений для реєстрації показників оптичної щільності плазми крові, на основі яких виробляються найпростіші цифрові обчислення отриманих відомостей. Використання спектрофотометрів потребує виконання більшості операцій в ручному режимі. До завдань лаборанта тут відноситься приготування реагентів, встановлення порядку проведення тестів, внесення досліджуваних зразків. Зведені результати дослідження в цьому випадку можуть виводитися як на електронний дисплей, так і на друковану стрічку.

У медико-біологічних дослідженнях спектрофотометри використовуються не тільки для кількісного визначення різних компонентів у біологічних пробах, але і для стандартизації біологічно важливих речовин. Так, наприклад, кращим способом стандартизації гемоглобіну крові вважається спектрофотометричний. Спектрофотометри використовуються у наукових дослідженнях для вивчення будови речовин та їх ідентифікації. Для цього знімаються характеристичні спектри поглинання чистих речовин, які є індивідуальними для кожної речовини. Отримані при дослідженнях записи спектрів поглинання, при порівнянні з уже відомими дозволяють не тільки ідентифікувати речовину, але і виявити наявність домішок, що важливо при дослідженні різних біологічних препаратів. Основними видами досліджень біологічних важливих речовин є: визначення ензимів, гормонів, вітамінів, білків, азотистих речовин, нуклеїнових кислот, вуглеводів, спиртів, фенолів і кетонів, органічних кислот, ліпідів, пігментів, неорганічних речовин. Володіючи високою чутливістю і вибірковістю, спектрофотометри дозволяють проводити визначення ряду речовин у сумішах, без їх відділення, що значно спрощує аналіз. Ряд продуктів азотистого обміну визначають за специфічним поглинанням в ультрафіолетовій області.

А) Спектрофотометр ULAB102



В) Спектрофотометр S261uv



Рис. 2.15. Спектрофотометри – спектральні оптичні прилади, призначені для виміру коефіцієнта пропускання, оптичної щільності досліджуваних твердих і рідких проб при проведенні різного роду аналізів і обчислення оптичної щільності.

П р и м і т к а: А) **Спектрофотометр ULAB 102** – спектральний оптичний прилад, призначений для виміру коефіцієнта пропускання,

оптичної щільності досліджуваних твердих і рідких проб при проведенні різного роду аналізів і обчислення оптичної щільності. Застосовується в аналітичних лабораторіях різного профілю для визначення вмісту широкого спектру речовин у твердих і рідких пробах, а саме для аналізу води (питна, природна, стічна, технологічна), технологічного контролю сировини і готової продукції різних галузей промисловості (харчова, хімічна, фармацевтична, металургійна, нафтохімічна та інших аналітичних завдань; В) **Спектрофотометр S 261UV** – двопроміневий із смугою пропускання 1,8 нм. Модель має два незалежні детектори, що істотно підвищує точність отримуваних результатів аналізу. Забезпечує високоточні виміри в діапазоні 190–1100 нм. Використовуються в клінічних лабораторіях, фармакології та біохімії, а також для рутинних вимірів при ДНК/протеїнаналізі (<http://kiev.etov.ua/product/1007379-spektrofotometr-ulab-102.html>).

Особливості завантаження біохімічних аналізаторів

Загальним правилом, яке впливає на економічність роботи біохімічних аналізаторів, є можливість застосування мінімального обсягу проб і препаратів для отримання найбільш об'єктивних результатів.

Особливу увагу більшості дослідницьких лабораторій приваблює, насамперед, такий прилад, як аналізатор автоматичний біохімічний. У порівнянні з напіваавтоматичними моделями, автоматичні пристрої здатні значно заощадити час фахівця. Нарівні з виконанням практично всіх операцій в автоматичному режимі такі прилади забезпечують найбільш точними, легко відтворюваними діагностичними результатами.

Основна маса інноваційних моделей аналізаторів, без сторонньої допомоги виробляють піпетування реагентів і зразків, виконують їх підігрів, змішування, аналіз, обробку отриманих даних і видають готові результати.

Біохімічний аналізатор автоматичний здатний продемонструвати найвищу продуктивність, самостійно вимірюючи десятки і сотні параметрів протягом години. Застосування більшості моделей таких пристроїв вимагає лише участі фахівця при програмуванні режимів вимірювань.

Біохімічний аналізатор автоматичного типу має наступні переваги:

- найвищу точність і об'єктивність результатів;
- виконання вражаючих обсягів обробки проб і реагентів за одиницю часу;
- повну автоматизацію процесів біохімічного аналізу;
- високу швидкість отримання необхідних результатів;
- роботу зі зручним функціоналом і зрозумілий інтерфейс.

Напіваавтоматичний біохімічний аналізатор, так само як і спектрофотометр, здатний стати вкрай важливим приладом для дослідницьких лабораторій і медичних установ з відносно невеликим потоком пацієнтів і необхідністю багаторазового тестування схожих параметрів.

Оптимальним вибором для дослідницьких центрів найширшого профілю, які потребують проведення різноманітного спектра тестів, є виключно автоматичні моделі аналізаторів.

2.9.2. Модернізація спектроскопічних методів дослідження і лабораторної діагностики хвороб тварин

Сучасні біохімічні технології розвиваються в напрямі інтеграції і мініатюризації декількох стадій хімічної обробки, реакцій, процесів поділу і детектування в єдиному приладі. З введенням інтегральних мікросхем в електроніці і подальшою заміною дискретних елементів на високопродуктивні чипи, мікропроцесори та мікроконтролери, в галузях хімії та біології розвивається інтегрування біохімічних і біоаналітичних процесів. У цій галузі істотним поштовхом став розвиток *мікроелектро-механічних систем* (МЕМС), зокрема рідинних і оптичних. Крім очевидних переваг мініатюризації аналітичних систем, таких як зменшення габаритів, ваги, витрат реагентів і відходів, інтегрування в одному чипі кількох реакторів, змішувачів, екстракторів, насосів, дозаторів, їх застосування дозволяє реалізувати всі стадії пробопідготовки, дозування, змішування реагентів, очищення, розділення та аналізу проби в одному пристрої. Розмір таких систем становить декілька квадратних сантиметрів. Створюються умови для появи цілого класу нових пристроїв з новими функціональними та аналітичними характеристиками.

Розвиток аналітичної техніки відкриває перед хіміками-аналітиками і біохіміками широкий вибір мікрочипів залежно від різних завдань.

«Лабораторія-на-чипі» (lab-on-chip, LOC) – це пристрій, який об'єднує одну або кілька функцій лабораторного аналізу на одному чипі розміром до декількох сантиметрів квадратних. Вона має справу з обробкою надзвичайно малих об'ємів рідини і може бути інтегрована з напівпровідниковими приладами, обробляти лабораторні дані (рис. 2.16)

Лаб-чипи підвищили чисельність випробувань, які передбачають змішування, аналіз і розділення зразків, що зазвичай складаються із суспензії клітин, нуклеїнових кислот, білків тощо.

Можливі аналітичні або оптичні методи їх визначення. Електричні методи ідентифікації залежать виключно від полярних властивостей молекул рідини зразків. Більшість оптичних методів вимагають маркування, що потребує застосування хемілюмінесценції, флуоресценції або радіоактивних маркерів.

Як правило, лаб-чипи складаються з мережі каналів, побудованих на основі напівпровідникової технології.

Ці пристрої можуть бути виготовлені з багатьох видів матеріалів: полімерів, скла, кремнію або комбінацій цих матеріалів.

Лаб-чипи мають низку переваг порівняно з традиційним аналізом:

- низькі обсяги споживання рідини (знижені витрати реагентів і менші обсяги проб для проведення досліджень);
- швидкий аналіз і час відгуку через коротку відстань дифузії;

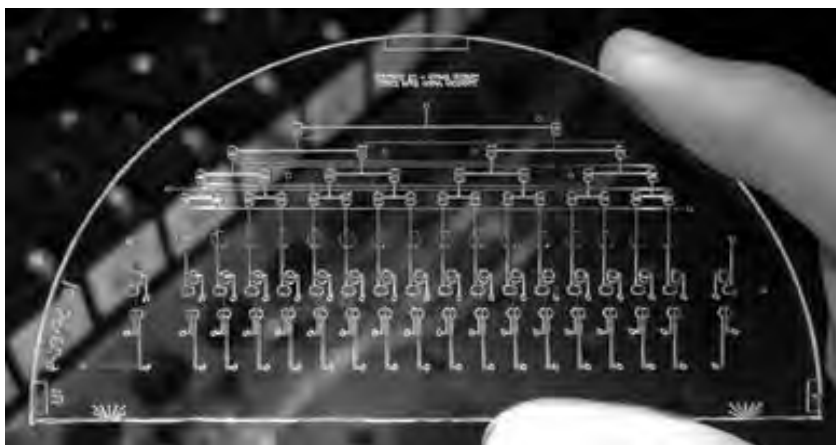


Рис. 2.16. «Лабораторія-на-чипі»

- паралелізм;
- краще управління процесом через швидший відгук системи (наприклад, тепловий контроль для екзотермічних хімічних реакцій);
- компактність системи;
- дослідження проводяться з вищим рівнем безпеки;
- висока відтворюваність даних.

Незважаючи на всі переваги, лаб-чипи мають деякі недоліки порівняно зі звичайними лабораторними аналізами:

- багато аспектів ще не повністю вивчено;
- відбите від стінок світло джерела випромінювання впливає на якість отриманого спектра;
- поєднання фізичних і хімічних процесів ускладнює виготовлення лаб-чипів.

Структура «лабораторії-на-чипі» принципово не відрізняється від будови спектрометрів. Висока продуктивність, легша інтеграція, знижене енергоспоживання робить відповідні матриці найкращими для використання в лаб-чипах.

Лаб-чипи виготовляються, як правило, з використанням фотолітографії. Спочатку в лаб-чипах планували кремнієву підкладку, але пізніше її замінили чипами на скляну. У сучасних моделях передбачені полімерні матеріали замість кремнію і скла.

Прикладом таких портативних лаб-чипів є Qstick. Це usb-спек-трометр, з випромінюванням в діапазоні 360–740 нм з кроком 1 нм. Такий лаб-чип можна використовувати для хімічного аналізу, світлового аналізу, судово-медичної експертизи.

З бурхливим розвитком комп'ютерних технологій та мереж, класифікація зображень широко використовується в багатьох областях. Основна мета класифікації зображень полягає у створенні принципів, за яким вдається розрізняти класи схожих зображень. Щоб розрізняти різні класи зображень, необхідно спочатку отримати деякі особливості основних властивостей зображень. Потім використовують класифікатор для досягнення класифікації за допомогою подібності інформації в класі зображень.

Найпоширенішими методами є використання графів, кластеризації, нейронних мереж, байєсової ймовірності тощо.

При розгляді структури відповідної матриці (рис. 2.17), необхідно відмітити, що вихідними даними є цифровий сигнал, а обробку та класифікацію такого сигналу даних можна інтегрувати в один чип. Це дозволяє відмовитися від персонального комп'ютера як елемента опрацювання даних.

Для класифікації сигналу необхідно його підсилити для отримання вірогідного результату. Цифровий сигнал зберігається в частотній характеристиці, яку отримано за допомогою перетворення Фур'є. Щоб не класифікувати сигнал за всією його хвильовою довжиною, виділяють лише необхідну довжину хвилі, що збільшує швидкодію.



Рис. 2.17. Процес обробки та класифікації сигналу

Модуль класифікації складається з модулів:

- навчання нейронної мережі;
- класифікації за допомогою нейронної мережі;
- даних.

В якості засобу класифікації спектра обрано нейронну мережу як найпоширенішу та через велику кількість наявних моделей для класифікації сигналів, зображень тощо.

Для зручного зберігання та класифікації сигналу його перетворено на двовимірний масив, який складається з амплітуди і відповідної частоти. Невеликі масиви кодових сигналів доцільно зберігати шляхом використання регістрів. Вже за необхідності зберігати десятки сигналів, залучення регістрів призводить до невиправдано великих апаратних витрат. Для зберігання великих об'ємів сигналів найкраще використовувати *запам'ятовувальні пристрої* (ЗП) із спеціальними мікросхемами, в кожній з яких може зберігатися інформація великого об'єму. Доцільно залучати *постійний запам'ятовувальний пристрій* (ПЗП). Цей пристрій пропонується для зберігання даних і команд, за якими цифрові пристрої функціонують. Можна

залучати *перепрограмовані постійні запам'ятовувальні пристрої* (ППЗП), але специфіка лабораторії-на-чипі робить це не доцільним.

Основна проблема використання нейронних мереж – відносно низька швидкість роботи, оскільки задачі, пов'язані з нейронними мережами, як правило, є ресурсоемними. Вибір оптимальної нейромережної моделі зазвичай пов'язаний з проведенням великої кількості експериментів, результати яких дають змогу оцінити якість окремої моделі. Особливо великих затрат часу потребує процес навчання нейронної мережі. Зважаючи на ці проблеми, найоптимальнішим типом для проектування та мікропроцесор є багатошаровий перцептрон, оскільки цей тип нейронної мережі використовує алгоритм зворотного поширення похибки, передбачено два проходи в усіх шарах мережі: прямий і зворотний.

Також цей тип має оптимальний метод навчання – алгоритм зворотного поширення похибки. Перевагами цього методу навчання є: локальність методу змін синоптичних ваг і порогів у багатошаровому перцептроні; ефективність методу обчислення всіх часткових похідних функцій вартості за вільними параметрами.

Інтеграція мікропроцесора з відповідною матрицею та використання нейронної мережі робить лаб-чипи автономними та більш функціональними.

Лабораторії-на-чипі можна розглядати як підмножину МЕМС, які містять багато компонентів, що вийшли з цих досліджень: мікронасоси, капіляри, клапани, датчики, важелі, сенсори тощо. Однією з найбільших переваг лабораторії-на-чипі є невеликі розміри, паралельність і швидкодія. Існують також численні проблеми, проте це можна виправити реінжинірингом на рівні функціональності традиційного лабораторного обладнання.

Структурна схема обробки даних, отриманих спектральним аналізом, дає змогу обробляти та класифікувати спектри без використання комп'ютера. Такою інтеграцією можна пришвидшити розроблення багатофункціональних лаб-чипів, що є надзвичайно важливим та актуальним завданням для прикладної біології, медицини та ветеринарії.

ТЕСТИ КОНТРОЛЮ ЗНАНЬ

Питання 1. Шлункова ахілія - це ...

1. Гастрит;
2. Підвищена кислотність шлункового соку;
3. Відсутність HCl та ензимів у шлунковому соці;
4. Відсутність жовчних пігментів у калі.

Питання 2. Захисна функція слини зумовлена наявністю ензиму, який чинить бактерицидну дію, зумовлюючи лізис полісахаридного комплексу оболонки стафілококів, стрептококів. Який це ензим?

1. Колагеназа;
2. Амілаза;
3. Пептидаза;
4. Лізоцим.

Питання 3. Підвищення в крові вмісту протеїнів α -глобулінової фракції свідчить про ...

1. Патологію печінки;
2. Гострий перебіг патології;
3. Імунодефіцитний стан організму;
4. Хронічний перебіг захворювання.

Питання 4. Плазма крові – це ...

1. Біологічна рідина в якій наявний фібриноген;
2. Біологічна рідина в якій відсутній фібриноген.

Питання 5. Антикоагулянти – це ...

1. Натрію цитрат, натрію хлорид, трилон Б;
2. Трилон Б, натрію оксалат, натрію сульфат;
3. Натрію цитрат, натрію оксалат, трилон Б;
4. Гепарин, натрію оксалат, калію лізинат.

Питання 6. Найчастіше збільшення концентрації креатиніну в сироватці крові відбувається при ...

1. Ураженні печінки;
2. Ураженні серця;
3. Ураженні нирок;
4. Ураженні м'язів.

Питання 7. Який ензим слід визначати для уточнення діагнозу на інфаркт міокарда?

1. Амілазу;
2. Альдолазу;
3. Холінестеразу;

4. Ізоензими ЛДГ.

Питання 8. Підвищення в сечі активності γ -глутамілтранспептидази свідчить про ...

1. Патологію печінки;
2. Інфаркт міокарда;
3. Пневмонію;
4. Патологію нирок.

Питання 9. Органоспецифічним ензимом для нирок є ...

1. Лактатдегідрогеназа;
2. Сукцинатдегідрогеназа;
3. Аспартатамінотрансфераза;
4. Креатинфосфокіназа;
5. Трансамідиназа.

Питання 10. Характерною ознакою інфаркту міокарда є істотне підвищення в крові у першу добу активності:

1. Ліпази;
2. Каталази;
3. Глюкозо-6-фосфатальдолази;
4. α -Амілази;
5. Креатинфосфокінази.

Питання 11. У пацієнта виявили підвищення активності ЛДГ₁, ЛДГ₂, аспартатамінотрансферази, креатинфосфокінази. Для лізису клітин якого органа підвищення активності вищезгаданих ензимів у сироватці крові є патогномонічною ознакою?

1. Серцевого м'яза (початкова стадія інфаркту міокарда);
2. Скелетних м'язів (дистрофія, атрофія);
3. Нирок та наднирникових залоз;
4. Сполучної тканини;
5. Печінки (гепатит).

Питання 12. Для ішемії міокарда характерне ушкодження кардіоміоцитів унаслідок активації ПОЛ. Підвищення вмісту в міокарді яких речовин стимулює цей процес?

1. Катехоламінів;
2. Каталази;
3. Глутатіонпероксидази;
4. Супероксиддисмутази.

Питання 13. Зростання вмісту якого електроліту в цитоплазмі кардіоміоцитів посилює розвиток патоморфологічних змін у міокарді?

1. Кальцій;

2. Хлор;
3. Калій;
4. Марганець.

Питання 14. При атеросклеротичному ураженні судин, вживання якого ліпиду слід обмежити?

1. Лецитину;
2. Олеїнової кислоти;
3. Холестеролу;
4. Моноолеатгліцериду.

Питання 15. Які ліпопротеїни вважаються атерогенними?

1. ЛПДНГ;
2. ХМ;
3. ЛПВГ;
4. ЛПНГ;
5. ХМ і ЛПНГ.

Питання 16. Що слугує мірою метаболічної активності легенів?

1. Ступінь використання кисню;
2. Концентрація АТФ у легеневій тканині;
3. Концентрація жирних кислот у легеневій тканині;
4. Концентрація протеїнів у легеневій тканині.

Питання 17. При гіпоксії у легеневій тканині уповільнюється синтез таких фосфоліпідів:

1. Фосфатидилхоліну та фосфатидилетаноламіну;
2. Фосфатидилсерину та сфінгомієліну;
3. Фосфатидилінозиту та кардіоліпіну;
4. Фосфатидної кислоти;
5. Лізофосфатидилхоліну.

Питання 18. Під час дослідження секреторної функції шлунка методом рН-метрії виявлено гіпохлоргідрію. Зниження активності якого ензиму при цьому спричинює порушення процесу травлення в шлунку?

1. Дипептидази;
2. Гексокінази;
3. Ліпази;
4. Амілази;
5. Пепсину.

Питання 19. У секреті підшлункової залози пацієнта відсутній панкреатичний інгібітор трипсину. Чим небезпечний такий стан?

1. Активацією протеолітичних ензимів ще в підшлунковій залозі;
2. Втратою активності протеолітичних ензимів;

3. “Ухилянням” ензимів у кров;
4. порушенням процесів травлення у дванадцятипалій кишці;
5. порушенням перетворення трипсиногену на трипсин у дванадцятипалій кишці.

Питання 20. Причиною стеатореї є дефіцит у травному каналі:

1. Фосфоліпідів;
2. Жирних кислот;
3. Хіломікронів;
4. Триацилгліцеролів;
5. Жовчних кислот.

Питання 21. У пацієнта порушена екскреторна функція печінки. Серед наведених тестів виберіть біохімічний тест, який характеризує цю функцію:

1. Альбумін крові;
2. Холінестераза крові;
3. Аланінамінотрансфераза крові;
4. Аспартатамінотрансфераза крові;
5. Білірубін крові та сечі.

Питання 22. Фруктозомонофосфатальдоза – ензим специфічний для

...

1. Печінки;
2. Серця;
3. Нирок;
4. Кишечнику.

Питання 23. У хворой на жовтяницю тварини встановлено підвищення у плазмі крові вмісту загального білірубіну за рахунок непрямого (вільного) білірубіну, у калі й сечі – високий вміст стеркобіліну, рівень прямого (зв’язаного) білірубіну в плазмі крові в межах норми. Який це вид жовтяниці?

1. Жовтяниця новонароджених;
2. Паренхіматозна;
3. Обтураційна;
4. Гемолітична.

Питання 24. Ахолічний кал – це кал, який ...

1. Містить краплі жиру;
2. Містить рештки неперетравленого корму;
3. Містить багато слизу;
4. Не містить стеркобіліну;
5. Містить домішки крові.

Питання 25. З недостатністю продукування якої речовини пов'язана анемія, яку спостерігають у пацієнтів з хронічною нирковою недостатністю?

1. Еритропоєтину;
2. Інсуліну;
3. Адреналіну;
4. Окситоцину.

Питання 26. Яка основна причина азотемії при хронічному гломерулонефриті?

1. Зменшення ниркового кровоплину;
2. Посилена протеїнурія;
3. Зниження канальцевої реабсорбції;
4. Затримка натрію в організмі;
5. Зниження клубочкової фільтрації.

Питання 27. Яка можлива причина глюкозурії при концентрації глюкози в плазмі крові 4,2 мМ?

1. Ниркова глюкозурія;
2. Цукровий діабет;
3. Нецукровий діабет;
4. Аліментарна гіперглікемія.

Питання 28. При тривалому застосуванні діуретиків може виникнути ...

1. Гіпокаліємія;
2. Гіперкаліємія;
3. Гіперкупремія;
4. Гупокупремія.

Питання 29. Зростання вмісту якого електроліту в цитоплазмі кардіоміоцитів посилює розвиток патоморфологічних змін в міокарді?

1. Кальцію;
2. Хлору;
3. Калію;
4. Марганцю;
5. Натрію.

Питання 30. Який тип розладів КОС розвивається при бронхопневмонії?

1. Респіраторний ацидоз;
2. Респіраторний алкалоз;
3. Компенсований ацидоз;
4. Метаболічний ацидоз;
5. Метаболічний алкалоз.

Питання 31. У крові знижений рівень рН та вміст гідрокарбонатів, а підвищений – молочної й піровиноградної кислот у крові та сечі. Який тип порушення КОС спостерігається?

1. Метаболічний ацидоз;
2. Метаболічний алкалоз;
3. Респіраторний ацидоз;
4. Респіраторний алкалоз.

Питання 32. Надлишок Цинку в організмі приводить до ...

1. Ламкості кісток;
2. Деформації скелету;
3. Отруєння;
4. Затримки росту;
5. Проносів.

Питання 33. Які імуноглобуліни забезпечують імунний захист новонароджених?

1. IgA;
2. IgG;
3. IgE;
4. IgD.

Відповіді: 1 – 3; 2 – 4; 3 – 2; 4 – 1; 5 – 3; 6 – 3; 7 – 4; 8 – 4; 9 – 5; 10 – 5; 11 – 1; 12 – 1; 13 – 1; 14 – 3; 15 – 4; 16 – 1; 17 – 1; 18 – 5; 19 – 1; 20 – 5; 21 – 5; 22 – 1; 23 – 4; 24 – 4; 25 – 1; 26 – 5; 27 – 1; 28 – 1; 29 – 1; 30 – 1; 31 – 1; 32 – 4; 33 – 2.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Аналітичні методи досліджень. Спектроскопічні методи аналізу: теоретичні основи і методики: навч. посіб. / Д. О. Мельничук та ін.; за ред. Д. О. Мельничука. К.: ЦП «Компринт», 2016. 289 с.
2. Аналітичні методи досліджень. Хроматографічні та електрофоретичні методи аналізу: теоретичні основи і методики: навч. посіб. / В. М. Войцицький та ін. К.: ЦП «Компринт», 2017. 268 с.
3. Ангельські С., Якубовські З., Домінічак М. Клінічна біохімія: підручник. Сопот, 1998. 450 с.
4. Біохімічний склад рідин організму та їх клініко-діагностичне значення / за ред. О. Я. Солярова. К.: Здоров'я, 2004. 192с.
5. Біохімія тварин з основами фізичної і колоїдної хімії: підруч. / Томчук В.А. та ін. К.: НУБіП України, 2020. 447 с.
6. Ветеринарна клінічна біохімія: підруч. 2-ге вид., перероб. та доповн. / В. І Левченко та ін.; за ред. В.І. Левченко і В. В. Влізла. Б. Церква : БДАУ, 2019. 416 с.
7. Ветеринарна клінічна біохімія: посібник / Д. О. Мельничук та ін.; за ред. Д. О. Мельничука. К.: НУБіП України, 2014. 456 с.
8. Використання ліпосом на основі фосфоліпідів молока у гепатології / Д. О. Мельничук та ін.; за ред. Д. О. Мельничука. К.: НУБіП України, 2010. 400 с.
9. Грищенко В. А. Теоретично-прикладні аспекти застосування репаративної терапії на основі фосфоліпідів молока при ентеропатології телят. К.: Видавн. центр НАУ, 2008. 162 с.
10. Дослідження сечі. Методичні рекомендації для студ. ф-ту ветеринарної медицини та слухачів післядипломного навчання спеціалістів ветеринарної медицини / [В. І. Левченко та ін. Біла Церква, 2005. 74 с.
11. Клінічна біохімія: навч. посіб. для студ. вищ. фармац. навч. закл. і фармац. ф-тів вищ. мед. навч. закл. III–IV рівнів акредитації / За ред. О. П. Тимошенко. К. : ВД «Професіонал», 2005. 288 с.
12. Клінічна біохімія: підручник / Д. П. Бойків та ін.; за ред. О. Я. Солярова. К. : Медицина, 2006. 432 с.
13. Клиническая биохимия: посіб. / А. Я. Цыганенко и др. М.: «Триадa-x», 2002. 497 с.
14. Кононський О. І. Біохімія тварин: підручник. К.: «Вища школа», 2006. 454 с.
15. Кучеренко Н. Е., Бабенюк Ю. Д., Войцицкий В. М. Современные методы биохимических исследований. К.: Фитосоциоцентр, 2001. 424 с.
16. Лабораторна діагностика порушень обміну електролітів і кислотно-лужного стану: методичні вказівки для підготовки фахівців спеціальності «Ветеринарна медицина», ОКР «Магістр» з дисципліни «Клінічна біохімія» / Д. О. Мельничук та ін. К.: Вид. центр НАУ, 2008. 17 с.
17. Мейер Д., Харви Дж. Ветеринарная лабораторная медицина. Интерпретация и диагностика: пер. с англ. М : Софион, 2007. 456 с.

18. Мельничук Д. О., Грищенко В. А. Роль кислотно-лужного стану та фосфоліпідів молока у формуванні колострального імунітету в новонароджених телят. К.: ЦП «Компринт», 2015. 250 с.
19. Мельничук Д. О., Цвіліховський М. І., Грищенко В. А. Експрес-метод прогнозування імунодефіцитного стану організму новонароджених телят: рекомендації для підприємств України з профілактики імунодефіцитів та системних патологій у новонароджених телят. К.: Видавничий центр НАУ, 2001. 15 с.
20. Методи дослідження функціонального стану печінки та біліарної системи: навч. посібник для підготовки студентів вищих навчальних закладів: навч. посібник / Д. О. Мельничук та ін.; за ред. Д. О. Мельничука. К. : НУБіП України, 2015. 414 с.
21. Спеціальна біохімія: навч. посібник / С. Д. Мельничук та ін. ; за ред. С. Д. Мельничука. К. : НУБіП України, 2014. 374 с.
22. Спеціальна біохімія: навч. посібник / С. Д. Мельничук та ін. ; за ред. С. Д. Мельничука. К. : НУБіП України, 2015. 649 с.
23. Токсичні речовини у харчових продуктах та методи їх визначення: підруч. / А. А. Дубініна та ін. К.: «Видавничий дім «Професіонал», 2007. – 384 с.
24. Томчук В. А., Грищенко В. А. Ліпіди та ентеропатологія телят: монографія. К.: ЦП «Компринт», 2016. 508 с.
25. Томчук В. А., Грищенко В. А., Цвіліховського В. І. Ветеринарна біохімія: навч. посіб. К.: Прінтеко, 2021. 2-ге вид. 552 с.
26. Энциклопедия клинических лабораторных тестов: перевод с англ.; под ред. В. В. Меншикова. М. : Лабинформ, 1997. 960 с.
27. Conneely M., Berry D. P., Murphy J. P. Effect of feeding colostrum at different volumes and subsequent number of transition milk feeds on the serum immunoglobulin G concentration and health status of dairy calves. *J. of Dairy Science*. 2014. V. 97, Iss. 11. 6991–7000.
28. Hernández-Castellano L. E., Morales-de la Nuez A., Sánchez-Macías D. The effect of colostrum source (goat vs. sheep) and timing of the first colostrum feeding (2 h vs. 14 h after birth) on body weight and immune status of artificially reared newborn lambs. *J. of Dairy Science*. 2014. V. 98, No. 1. 204–210.
29. Hurley W. L. Theil P. K. Perspectives on Immunoglobulins in Colostrum and Milk. *Nutrients*. 2011. V. 3, No. 4. 442–474.
30. Gryshchenko V., Danchenko O., Musiyshuk V. Modification of modeling method of toxic dystrophy of liver in rats. Modern development paths of agricultural production: Nadykto V. (Eds). Cham: Springer, 2019. 689–697.
31. Orinya O. A., Adenkola A. Y., Ogbe R. J. Haematological and biochemical studies on the effect of diclofenac sodium on Wistar *Rattus norvegicus*. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*. 2016. V. 10, No. 5. 2231–2242.
32. Tomchuk V. A. , Gryshchenko V. A. , Tsvilikhovskyi V. I. Veterinary clinical biochemistry: textbook, Part 1. К.: ЦП «Компринт», 2016. 268 с.

33. Tomchuk V. A. , Gryshchenko V. A., Tsvilikhovskyi V. I. Veterinary clinical biochemistry: textbook, Part 2. K.: НУБіП України, 2017. 390 с.

34. Tomchuk V., Gryshchenko, V., Vlizlo, V., Enciu V. Corrective effect of milk phospholipids in pathological conditions. Iași Editura Ion Ionescu de la Brad, 2019. 105 p.

35. Villettaz Robichaud M., Godden S. M., Haines D. M. Addition of gut active carbohydrates to colostrum replacer does not improve passive transfer of immunoglobulin G in Holstein dairy calves. *J. of Dairy Science*. 2014. V. 97, Iss. 9. 5700–5708.

РОЗДІЛ 3. ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ЯКОСТІ ДІЯЛЬНОСТІ БІОХІМІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ

Основні питання: 1. Якість діяльності біохімічної лабораторії; 2. Система менеджменту якості; 3. Стандарти та їхні основні положення; 4. Вибір проб та підготовка їх до аналізу; 5. Валідація аналітичних методик та правильність проведення вимірювань; 6. Здійснення контролю якості та обробка даних.

3.1. Стандарти для лабораторій, їх загальні положення (ISO 9001, ISO/IEC17025, ISO 15189, GLP)

3.1.1. Введення в забезпечення якості

Аналітик надає наукові дані, на підґрунті яких приймаються важливі рішення. Говорити, що аналітиком проводить вимірювання і повідомляє про результати – означало б істотно применшувати функцію аналітичної роботи. Існує якась «додана вартість». Все з'ясовується, коли виникає можливість продемонструвати наочно, що наведені результати отримані в організації, в якій функціонує система управління якістю. Саме важливість аналітичної роботи вимагає гарантій якості. Це означає, що зроблено все необхідне для впевненості в тому, що прийняті до уваги всі фактори впливають на кінцевий результат, що виконувалися всі потрібні вимірювання, до того ж, виконані вірно, за допомогою методу, який пройшов випробування для здійснення аналізу конкретної речовини.

Важливо, щоб вимір, проведений в одній лабораторії хіміком-аналітиком, міг повторити другий аналітик тієї ж (або іншої) лабораторії навіть якщо інша лабораторія розташована за кордоном. Мета – забезпечити порівнянність результатів, отриманих в різних лабораторіях. Якщо ми вимірюємо довжину шматка дроту, масу хімічного реагенту або відраховуємо час в будь-якій лабораторії де б ми не знаходилися, ми впевнені, що отримали дуже близькі результати, тому що існують міжнародні еталони довжини, маси і часу. Для того, щоб отримувати близькі результати, вимірювальні пристрої повинні бути відповідним чином калібровані. Наприклад, ваги калібрують за допомогою еталонної гирі (еталону маси), яка пов'язана з первинним еталоном маси. Проте, недостатньо обмежитися калібруванням приладу/обладнання; важливо, щоб вся методика пройшла процедуру оцінки придатності для аналізу конкретної речовини – від виділення аналіту з проби до підсумкового вимірювання.

Простежуваність даних складається у взаємному визнанні результатів випробувань у національному та міжнародному масштабі. Термін «метрологічна простежуваність» в даному контексті визначає «Міжнародний словник з метрології». «Метрологічна простежуваність – властивість результату вимірювання, за допомогою якого результат може бути порівняний з еталоном через безперервний ланцюг калібрувань і

задокументований, де кожний результат вносить вклад в сумарну невизначеність вимірювання». Коли мова йде про міжнародну торгівлю, важливо, щоб країни-члени організації торгівлі визнавали результати один одного. Це може статися лише у випадку, якщо всі країни дійдуть згоди за стандартами якості випробувань і калібрування. Для того, щоб досягти цієї мети, всі повинні використовувати однакові еталони і бути оціненими третьою стороною.

3.1.2 Система менеджменту якості, забезпечення якості і контролю якості

Система менеджменту якості являє собою сукупність процедур і систему відповідальності, прийняту в організації для того, щоб забезпечити персонал обладнанням та ресурсами для виконання роботи раціональним і ефективним чином. Для формального визнання та контролю системи менеджменту якості, вона повинна бути заснована на визнаних міжнародних стандартах, прийнятих замовниками та іншими організаціями по всьому світу. Хороша система менеджменту якості передбачає кілька аспектів. Серед них: заява про політику в сфері якості, загальна організація лабораторії, позиції і відповідальність, процедури контролю якості, управління документами і представленням результатів, внутрішні перевірки, аналіз з боку керівництва та виконання робіт на субпідряд. Слід пам'ятати, що система менеджменту якості повинна бути вичерпною настільки, щоб задовольняти вимогам усіх замовників. Це означає, що вона може перевершувати очікування окремих замовників.

Якщо говорити коротко, то система менеджменту якості являє собою комбінацію менеджменту якості, контролю якості та забезпечення якості. Забезпечення якості та контроль якості є компонентами лабораторної системи менеджменту якості. Поняття «контроль якості» і «забезпечення якості» часто змішують і, на жаль, використовують одне замість іншого. Це відбувається, ймовірно, від того, що заходи з контролю якості та забезпечення пов'язані між собою. Визначення термінів дано у стандарті ISO 9000 (International Organization for Standardization – Міжнародної організації зі стандартизації).

Забезпечення якості являє собою частину системи менеджменту якості, зосереджену на забезпеченні впевненості в тому, що вимоги щодо якості будуть виконані. Всі планові та систематичні заходи, впроваджені в систему менеджменту якості, наочно представлені в разі потреби, забезпечують необхідну впевненість у тому, що аналітична служба виконує вимоги з якості. Служба забезпечення якості є найважливішою організаційною інфраструктурою, підтримуючої достовірність усіх аналітичних вимірювань. Вона охоплює різні заходи, в тому числі тренінги для персоналу, ведення записів, відповідні умови навколишнього середовища, належні умови для зберігання, що забезпечують цілісність проб, реактивів і розчинників,

графіки технічного обслуговування та калібрування приладів, застосування методів, що пройшли документально підтверджену перевірку.

Існує два види контролю якості – внутрішній контроль і зовнішня оцінка якості (зовнішній контроль). Внутрішній контроль якості забезпечує впевненість керівництва лабораторії в якості, а зовнішній контроль – впевненість замовника. Внутрішній контроль якості являє собою операції, які виконуються персоналом у процесі вимірювань і підтверджують, що система функціонує задовільно і результати є прийнятними. Зовнішня оцінка якості, здійснюється в ході формальних і неформальних міжлабораторних порівнянь. Формальні порівняння здійснюються у рамках програм професійних тестів (PT).

3.1.3. Стандарти та їхні основні положення

Стандарти, що відносяться до якості послуг, розроблені рядом національних і міжнародних організацій. Вимоги до аналітичної лабораторії залежать від її розміру, колу операцій і типів виконуваних аналізів. Виходячи з цього, аналітична лабораторія повинна визнати ряд існуючих стандартів.

Міжнародний стандарт ISO 9001 «Системи менеджменту якості. Вимоги» – це загальний стандарт для всіх типів організацій незалежно від їх розмірів. Цей стандарт встановлює вимоги до системи менеджменту якості для організації, яка:

- хоче продемонструвати здатність послідовно поставляти продукцію, що відповідає вимогам споживачів і відповідним обов'язковим вимогам;
- орієнтована на підвищення задоволеності споживачів за допомогою ефективного застосування системи, включаючи процеси постійного поліпшення системи та забезпечення відповідності вимогам споживача, і обов'язковим вимогам.

Міжнародний стандарт ISO/IEC 17025 «Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій» являє більш спеціалізованим. Цей стандарт призначений для застосування в лабораторіях, які проводять випробування та / або калібрування. Він відноситься до компетентності лабораторії та її персоналу. Лабораторії, які бажають отримати акредитацію за даним стандартом, повинні розробити власну систему менеджменту якості, адміністративні та технічні процедури відповідно до пунктів цього стандарту. Акредитація – формальна процедура, проведена авторитетним органом, що підтверджує компетентність лабораторії у виконанні певних завдань. Сюди входять і питання зв'язані з менеджментом, що відносяться до адміністрації, і інші питання (якості, які вирішуються в рамках сертифікації. Акредитація, як правило, відноситься до окремої комбінації «аналіт, матриця і метод». Національний орган акредитації проводить акредитацію у своїй країні.

До медичних лабораторій пред'являються особливі вимоги, включені в стандарт ISO 15189 «Медичні лабораторії – Додаткові вимоги до якості та компетентності». У нього включені вимоги обох стандартів – ISO 9001 та

ISO/IEC 17025. Він являє собою спеціалізовану версію ISO/IEC 17025 для медичних лабораторій.

3.1.4. Загальні положення стандартів ISO 9001, ISO/IEC 17025 та ISO 15189

Три стандарти – ISO 9001, ISO / IEC 17025 та ISO 15189 – мають багато спільного, проте між ними є окремі тонкі відмінності. На рис. 3.1 представлені загальні положення.

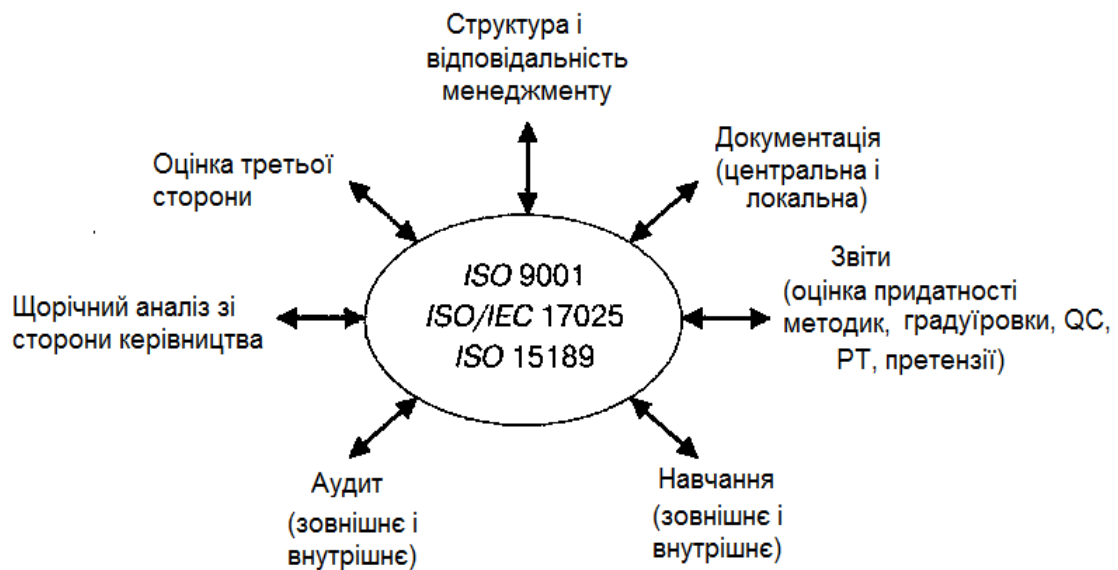


Рис. 3.1. Основні компоненти системи менеджменту якості

У питаннях, що відносяться до структури менеджменту та відповідальності за якість, менеджер з якості, як правило, діє від імені вищого керівництва організації. Структура менеджменту викладена в керівництві з якості, яке є документом найвищого рівня. У ньому чітко показана структура організації, роль і відповідальність менеджерів та їх робочих груп. Крім того, керівництво з якості містить всі документи найвищого рівня, що відносяться до функцій керівництва. Керівництво дотримується локальної документації, наприклад, робочі інструкції та методики. Важливо, щоб у тексті контракту були прописані всі моменти, які стосуються конкретної роботи – від отримання проби до передачі результатів замовнику. Це означає, що всі результати інструментальних вимірів, результати оцінки придатності методики та калібрування вимірювальних пристроїв, а також результати контролю якості повинні бути індивідуально ідентифіковані для конкретної проби. Подібні записи слід зберігати протягом часу, визначеного у керівництві з якості або узгодженого із замовником. Усе частіше від організацій вимагають підтвердження компетентності працюючого в ньому персоналу.

Як відбувається перевірка компетентності? Відповідь на це питання теж може бути викладене в Посібнику з якості. Щоб продемонструвати вищому керівництву організації, що всі необхідні процедури виконуються належним чином, на регулярній основі проводять внутрішні перевірки – їх називають внутрішнім аудитом. Ці перевірки є способом забезпечення правильного функціонування системи якості. Крім того, для отримання сертифікації або акредитації за певним стандартом необхідно провести підтвердження відповідності третьою стороною – органом з оцінки відповідності. Для підтвердження дотримання всіх вимог певного стандарту та задоволення виробничих потреб вище керівництво організації один раз на рік переглядає систему менеджменту якості.

3.1.5. Положення стандарту ISO 9001

Стандарт систем менеджменту якості ISO 9001 пропонує застосовувати «процесний підхід» при розробці, впровадженні та поліпшенні результативності системи менеджменту якості з метою підвищення задоволеності споживачів завдяки виконанню їхніх вимог. Відповідно до даного підходу, будь-яка діяльність, що використовує ресурси для перетворення «входів» у «виходи», може розглядатися як процес. Представлена на рис. 3.2 схема складена на підставі рис. 3.1 і показує як можна інтерпретувати стандарт для лабораторії, що проводить хімічні аналізи.

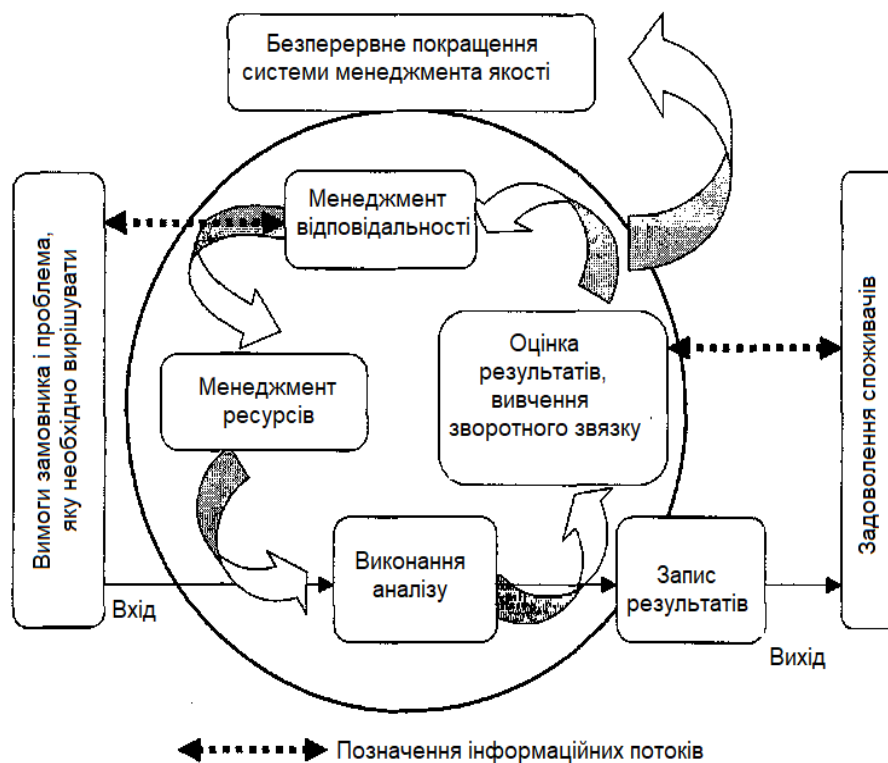


Рис. 3.2. Модель системи менеджменту якості, основаної на процесному підході.

Цей стандарт є дуже загальним документом і не торкається технічних аспектів. Проте, все частіше аналітичні лабораторії обирають сертифікацію за стандартом ISO 9001, що дозволяє їм розширити коло діяльності. У заголовках ранніх версій даного стандарту присутній термін «забезпечення якості», однак зараз його прибрали. Причиною послужило те, що поточний стандарт вимагає більшого, ніж забезпечення якості послуги. Також передбачається збільшення задоволеності замовника поряд з демонстрацією безперервного вдосконалення. На рис. 5.2 цей аспект представлений на схемі в блоці, зв'язаному з оцінкою результатів.

Зміни в лабораторній системі проводять, беручи до уваги існування зворотного зв'язку між замовником та/або лабораторією і офісом. Зміни проводять по завершенні роботи або за результатами внутрішнього аудиту. Керівництво проводить порівняльний аналіз, переглядає та оцінює всю систему і забезпечує ресурси, необхідні для введення змін, наприклад, придбання додаткового/іншого обладнання або найму персоналу. Велика увага приділяється оцінці ефективності роботи і заходам з підвищення задоволеності замовника.

3.1.6. Положення стандарту ISO/IEC 17025

Стандарт ISO/IEC 17025 «Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій» відноситься до компетенції та способів її демонстрації. У той час як стандарт ISO 9001 носить досить загальний характер, ISO/IEC 17025 дуже специфічний. Акредитація видається на проведення конкретних випробувань в термінах області застосування, наприклад, аналіз, матриця, метод і інтервал концентрацій. Даний стандарт складається з двох основних розділів, один з яких описує вимоги менеджменту, а інший – технічні вимоги. Для відповідності вимогам даного стандарту в лабораторії повинна діяти система менеджменту якості, що відповідає принципам ISO 9001. Технічний розділ описує додаткові вимоги до лабораторії, яка бажає продемонструвати свою компетентність у виконанні аналізів і/або калібрування. Серед висвітлених питань – оцінка придатності методу, невизначеність вимірювань і застосування референтних матеріалів і вихідних еталонів для забезпечення простежуваності результатів, які видаються. Крім того, стандарт торкається процедури проведеного лабораторією відбору проби, а також питання збереження проби. Для підтвердження якості результатів лабораторія повинна брати участь у міжлабораторних порівняннях, таких як програми PT.

3.1.7. Положення стандарту ISO 15189

Цей стандарт був підготовлений спеціально для регламентування роботи медичних лабораторій, що виконують дослідження біоматеріалів людського організму. Подібні дослідження проводять з метою отримання інформації, необхідної для діагностики, запобігання та лікування хвороби або оцінки

стану здоров'я людини. ISO 15189 регламентує ряд випробувань, що відносяться до клінічних вимірювань, наприклад, хімічним або мікробіологічним. Даний стандарт заснований на ISO 9001 та ISO/IEC 17025 і включає кореляцію між пунктами стандартів ISO 9001 та ISO/IEC 17025.

Термінологія даного стандарту дещо відрізняється від інших в тому сенсі, що відповідає конкретному направленню. Наприклад, зміст терміну «лабораторія-рефері» (referral laboratories) в ISO 15189 дещо відрізняється від змісту терміну в стандарті ISO/IEC 17025. Якщо лабораторія-рефері є зовнішньою лабораторією, яка приймає проби для додаткових або підтверджуючих аналітичних процедур, то вона в більшій мірі аналогічна «контрактній лабораторії», як написано в ISO/IEC 17025. Також до ISO 15189 є Додаток, що відноситься до етичних питань стосовно лабораторної медицини.

3.2. Вибір проб та підготовка до аналізу

3.2.1. Важливість відбору проб

Відбір проб є важливим процесом, оскільки дозволяє зі знанням справи простежити історію матеріалу, що надходить в лабораторію для хімічного аналізу. Правильний відбір проб надає упевненості в тому, що заявлені показники будуть виявлені.

Відбір проби – процес відділення певним чином частини матеріалу для отримання інформації про загальний об'єм матеріалу.

Термінологія з відбору проб має змішані поняття, тому найкраще використовувати терміни з нормативних документів.

Наприклад, ISO/IEC17025 визначає відбір проб таким чином:

«Певна процедура, за допомогою якої частину речовини, матеріалу або продукту відбирають з метою проведення випробування або калібрування репрезентативного зразка. Необхідність відбору проб може бути вказана у відповідній нормативній технічній документації, згідно з якою проводиться випробування або калібрування речовини, матеріалу або продукції».

Перед тим, як приступати до відбору проб або розробки схеми відбору проб, слід подумати: «Яка мета проведення аналізу?»

Відповідальність аналітика полягає в тому, щоб у процесі обговорення з замовником виявити реальну суть проблеми. Питання: «Скільки кадмію в цій пробі?» – Чи не є проба досить небезпечною? Ви завжди повинні питати, для чого потрібна ця робота або інформація. Від відповіді буде залежати: схема відбору проб, вибір аналітичного методу і прийнятний рівень підсумкового результату.

На жаль, схему відбору проб не завжди визначає аналітик. Проте, слід пам'ятати: аналітичний результат може залежати або не залежати від методу, який застосовується для аналізу, але він завжди буде залежати від плану відбору проб. Важливо знати потенційну величину невизначеності, пов'язаної з відбором проб, оскільки складова невизначеності відбору проби,

може складати більше двох третин загальної невизначеності і спроба зменшити аналітичну невизначеність не завжди досягається.

Оцінка величини невизначеності, зв'язаної з відбором проби, може виявитися складною; докладні вказівки, як правило, є специфічними для даної галузі (*sector-specific*). Якщо вам необхідно оцінити невизначеність відбору проб, то слід звернутися до відповідних вказівок. Проте, якщо результати для контрольних проб представляють без урахування невизначеності відбору проб (*as-received*), то зосереджуються тільки на невизначеностях, зв'язаних з лабораторними операціями (такими як відбір частини проби, попередня обробка проби, вимірювання кількості присутнього аналіту).

Зв'язок між різними операціями наочно демонструє рис. 3.3, де показано схеми відбору проб та аналітичні операції. Це допомагає визначитися з термінами, які використовуються.

Сипучі матеріали існують в різних формах. Серед прикладів, вантаж сипучого матеріалу:

- зерно розсипом;
- ґрунт із забрудненої ділянки;
- корабельний вантаж вугілля.

Для представлених прикладів основна особливість є спільною і полягає в тому, що матеріал не існує у вигляді окремих перманентно ідентифікованих одиниць.

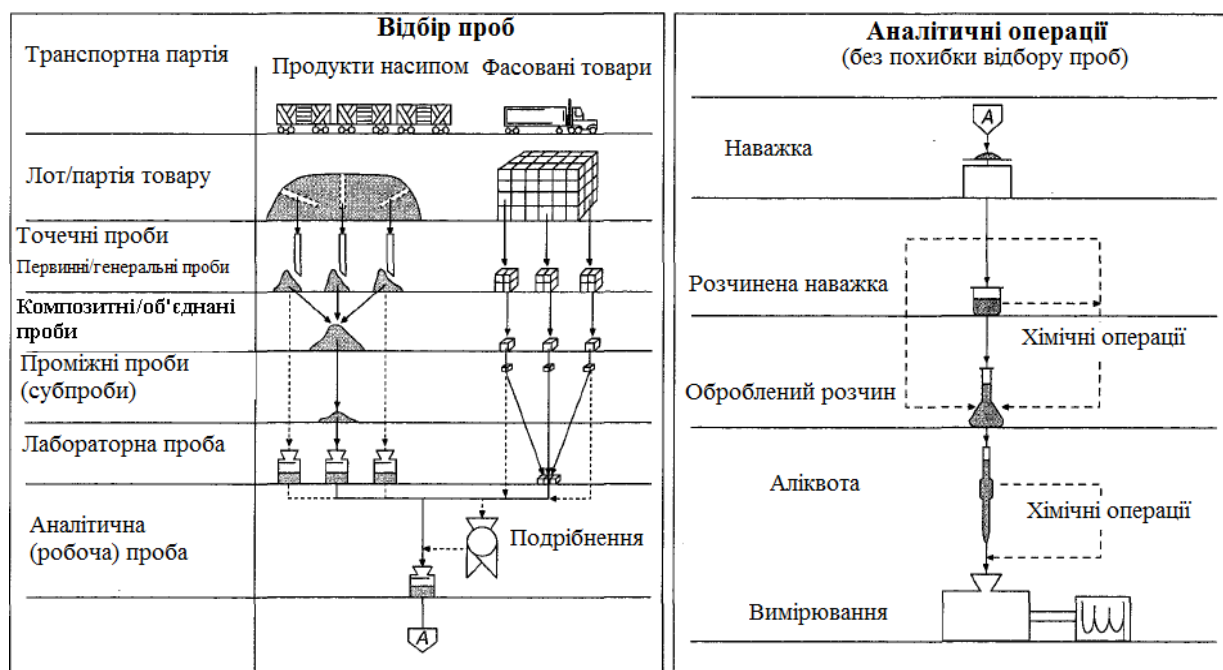


Рис. 3.3. Схема відбору проб і аналітичних операцій

Фасовані товари складаються з ідентифікованих одиниць, можуть бути пронумерованими. В окремих випадках сипучі матеріали можуть бути

упаковані в блоки меншого об'єму, наприклад, в мішки або бочки. Такі блоки називають сегментами.

Примітка. Нижній знак «А» на схемі відбору проб відповідає верхньому «А» на схемі аналітичних операцій.

3.2.2. Ідентифікація видів проб

Транспортна партія вантажу (як сипучих матеріалів так і фасованих товарів) – певна кількість матеріалу, яка переміщується одним видом транспорту, на яку оформлено єдиний пакет товаросупровідних документів.

Лот – певна кількість матеріалу, що представляє собою єдину сукупність з точки зору схеми відбору проб.

Товарна партія – певна кількість матеріалу, яку вироблено в однакових (або вважається однакових) умовах. Лот може складатися з однієї або декількох товарних партій, а в транспортну партію може, у свою чергу, входити один або декілька лотів. У більшості випадків лот або товарна партія занадто великі, що не дозволяє безпосередньо отримати прийнятну лабораторну пробу. Тому для отримання зразка, який буде прийнятий лабораторією, найчастіше необхідно провести ряд проміжних стадій відбору проби.

Точковими пробами називають порції матеріалу, взятого з лоту/товарної партії, за допомогою пристосування для відбору проб (пробовідбірника). Точкові проби часто комбінують для отримання об'єднаної або генеральної (первинної) проби. В окремих випадках лабораторну пробу відбирають безпосередньо з первинної проби.

В інших ситуаціях кілька первинних проб об'єднують або перемішують для одержання змішаної або збірної (композитної) проби.

Лабораторна проба являє собою частину матеріалу, що доставляється в лабораторію для аналізу.

Лабораторну пробу найчастіше отримують з первинної або збірної проби шляхом проведення серії операцій з розділення і подрібнення матеріалу (наприклад, зменшення методом конуса і подальшого квартування, зменшення на жолобчастому скорочувачі).

Робоча частина (testportion) – певна кількість матеріалу, яка фактично використовується для аналізу. В аналітичній хімії робочу частину (наважку) проби іноді називають аналітичною частиною (*analyticalportion*). Якщо лабораторна проба є гомогенною, можливим стає прямий відбір робочої частини (наважки) без додаткової обробки проби.

Найчастіше наважку проби піддають обробці в кілька етапів перед тим, як отримують кінцеву аліквоту. Вимірювання аналітиком характеристики проводять в цій аліквоті.

Існує кілька підходів до опису поняття «проба». У першу чергу, пробу можна описувати термінами її фізичного стану (газоподібна, рідка або тверда). У разі необхідності матеріали можна додатково розділити на гомогенні і гетерогенні.

Інший підхід до опису поняття проба – характеристика проб, що доставляються в лабораторію і залежать від плану відбору проб. За цими ознаками проби поділяють на чотири види:

- представницькі;
- селективні;
- випадкові (рандомізовані);
- композитні (об'єднані) проби.

Представницька проба – проба є типовим зразком вихідного матеріалу при контролі певних його характеристик. *Слід уважно підходити до вибору характеристики, що представляє інтерес для аналітика. Можливо, проба буде представницькою і придатною для аналізу при масовій частці аналіту на рівні 5% (тобто 5 частин на 100), однак виявиться непридатною, якщо аналіт присутній на рівні 5 мг/кг (тобто 5 частин на мільйон). Крім того, важливо знати і розуміти метод аналізу, який буде використовуватися.*

Для отримання адекватної представницької проби слід брати до уваги стан вихідного матеріалу, який ми повинні досліджувати. Існує чотири типи систем.

Гомогенні – однорідна проба, хімічний склад і фізичні властивості якої у всіх частинах однакові або змінюються безперервно, без коливань (між частинами системи немає поверхневих розділень). Складові частини гомогенної проби неможна відділити одна від одної механічним шляхом. Наприклад, рослинна олія при температурі 40 °С (при даній температурі олія знаходиться в рідкому стані); фільтрований водний розчин.

Гетерогенні – неоднорідна проба, яка складається із однорідних частин (фаз), які можуть відрізнятися одна від одної за складом і властивостями. Наприклад, пальмова олія при 15 °С (температура нижче точки плавлення пальмової олії); проба пластівців для сніданку (наприклад, мюслі).

Статична (замкнута) система – склад вихідного матеріалу залишається постійним по відношенню до положення в просторі і стабільним протягом часу, необхідного для відбору проб і дослідження. Можна навести безліч прикладів систем такого типу: олія в бочках; консервовані фрукти на товарному складі.

Динамічна система – в цьому випадку вихідний матеріал змінюється з плином часу. При відборі частини проби в будь-якому випадку виходить лише «моментальний знімок» стану системи в певний момент часу в певній точці простору. Цей результат неможливо відтворити, що викликає труднощі при статистичному контролі, внаслідок чого для даної системи не застосовують звичайні плани вибіркового контролю. Приклади: насичені і ненасичені олії при безперервному змішуванні; вода з естуарію, де солоність води змінюється з плином часу.

Селективна проба – пробу продумано відбирають згідно з планом відбору проб, мета якого – відбір та відстеження матеріалів з певними характеристиками. Відбір проби такого виду називають ще *спрямованим* або *сфокусованим* відбором.

Наприклад, при аналізі харчових продуктів може виникнути необхідність обмежити певну ділянку зіпсованого матеріалу лота, який не змішаний з доброякісним матеріалом:

- забруднення борошна продуктами життєдіяльності гризунів – шерстю або сечею;
- наявність у повітрі промислової зони токсичних газів, причому загальний рівень концентрації газів, можливо, є прийнятним, однак проба, відібрана в певному місці, може містити речовини в небезпечній концентрації.

Рандомізована (випадкова) проба – проба, взята за схемою випадкового відбору, дозволяє уникнути систематичної похибки при відборі проб і створити основу для статистичної інтерпретації результатів вимірювань. Три варіанти процесу відбору проб дозволяють отримати різні види рандомізованих проб.

Простий рандомізований (випадковий) відбір проб полягає у відборі точкових проб сипучого матеріалу таким чином, що вірогідність відбору будь-якої порції з об'ємистого матеріалу була однаковою. До такого виду вибору вдаються при недостатній кількості інформації про матеріал, який досліджують. Крім того, цей спосіб звичайно застосовують при відборі проб з товарної або транспортної партії промислового продукту для контролю якості.

Стратифікований рандомізований (випадковий) відбір проб передбачає поділ партії матеріалу на групи (страти) за попередньо визначеними критеріями. Потім у кожній страті проводять відбір проб за планом простої випадкової вибірки. Кількість проб, що відбираються в кожній страті, пропорційне її розміру (вага або об'єм). Мета стратифікованого відбору – підготовка зразка більш представницького порівняно зі зразком, який одержується при простому рандомізованому відборі.

Систематичний відбір проб – один з найбільш загальноприйнятих методів відбору проб. Він полягає у відборі точкових (миттєвих) проб з об'ємистого сипучого матеріалу через попередньо визначені інтервали згідно плану вибіркового контролю. Першу пробу вибирають випадково, а наступні проби відбирають згідно з попередньо розробленою схемою, наприклад, в кожній 5-й, 10-й точці інтервалу або в інших точках, за необхідністю.

При рандомізованому відборі всі проби, відібрані вищеописаними способами, мають рівні шанси опинитися вибраними, таким чином вдається уникнути систематичної похибки. Слід відзначити, що рандомізована проба може бути одночасно і представницькою пробою – це залежить від природи матеріалу, частину якого беруть для аналізу.

Композитна (об'єднана) проба – відбір композитної (збірної) проби – спосіб зниження вартості робіт при необхідності аналізу великої кількості проб. Композитна проба складається з двох або більше частин матеріалу (відібраних одночасно), обраних таким чином, щоб представляти досліджуваний матеріал в цілому. Співвідношення компонентів композитної

проби можна визначати, виходячи з параметрів маси (об'єму), часу або потоку. Компоненти композитної проби відбирають пропорційно кількості матеріалу, який вони представляють. Такий тип пробовідбору може виявитися прийнятним при проведенні експертизи продуктів харчування.

3.2.3. Суть і значення планів відбору проб

Відбір проб завжди проводиться з певною метою, і дана мета до деякої міри визначає процедуру відбору проб:

- консервовані продукти харчування досліджують з метою перевірки герметичності банок, однорідності вмісту та виявлення шкідливих домішок.
- зернові культури необхідно перевіряти протягом періоду росту для оцінки рівня вмісту пестицидів.
- фармацевтичні продукти досліджують для визначення концентрації активних компонентів і побудови фармакокінетичних кривих.
- проби харчових продуктів відбирають відповідно до нормативних документів для визначення відповідності продуктів вимогам, заявленим на етикетці або гігієнічних норм для споживачів.

Необхідно розробити план відбору проб, який визначає коли, де і як повинні відбиратися проби. *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)* дає наступне визначення поняття «план відбору проб»:

IUPAC – Міжнародний союз фундаментальної та прикладної хімії.

«Попередньо розроблена процедура відбору, вилучення, зберігання, транспортування і підготовки частин матеріалу для відділення їх від загальної маси в якості проб».

Із визначення видно, що план відбору проб має охоплювати всі аспекти процесу відбору, включаючи:

- кількість;
- локалізацію і розмір відібраних проб;
- інструкції формування композитних проб;
- ступеня подрібнення взятих частин матеріалу при приготуванні лабораторної проби;
- чи слід відбирати пробу один раз, або ж цей процес має повторюватися, і якщо так, то з якою частотою? Відповідь на це питання теж повинно міститися в плані відбору проб.

Якщо існують нормативні вимоги до аналізу, план вибіркового контролю називають схемою відбору проб або розкладом відбору проб. Термін «програма відбору проб» часто використовують для опису комбінації процедур, що поєднує кілька взаємопов'язаних схем відбору проб.

Обов'язковий план відбору проб можна скласти на підставі національних і міжнародних стандартів або відповідних документів.

Вказівками можуть бути загальні вказівки з відбору проб Комісії Codex Alimentarius, методики відбору проб за моніторингу якості води (наприклад, ISO 5667-1), методики відбору проб при контролі якості за якісними

ознаками (серії стандартів ISO 2859) і методики відбору проб при контролі якості за кількісними показниками (ISO 3951).

3.2.4. Нормативні і юридичні вимоги

Існують інструкції зі складання схем відбору проб для ряду матеріалів, таких як добрива або харчові продукти. Діють Директиви ЄС, зв'язані з вибіркоvim контролем, наприклад, відбір проб фруктів і овочів при дослідженні на вміст залишкових пестицидів і визначенні слідів елементів у добривах. На міжнародному рівні Комісія Codex Alimentarius має певні схеми відбору проб, наприклад, відбору проб харчових продуктів при визначенні залишків пестицидів. Вам слід ознайомитися з усіма нормативами, що відносяться до області, в якій ви працюєте.

Ви завжди повинні задавати питання: «Як будуть використані результати аналізу?». Якщо ви відбираєте проби для визначення відповідності вимогам контракту, тобто проба повинна містити мінімальну/максимальну кількість аналіту, то важливо знати, як будуть інтерпретовані дані під час написання висновку документу. Комісія Codex Alimentarius рекомендує наступні величини граничного вмісту елементів в харчовій солі:

- миш'як – не більше 0,5 мг/кг;
- мідь – не більше 2 мг/кг;
- олово – не більше 2 мг/кг.

Необхідно розуміти, що це означає: «Вміст в окремих зразках лота не повинно перевищувати ...» або ж «Середній вміст, розрахований по безлічі зразків, не повинен перевищувати ...».

Крім того, вам потрібно знати, чи виконані вимоги нормативних документів, якщо:

- а) проба подрібненого сипучого матеріалу сформована з окремих точкових проб;
або
- б) кожна точкова проба проаналізована окремо, а потім розрахована середня величина результатів.

Ці інтерпретації передбачають різні підходи. Зауважимо, що змішування матеріалу зразків перед аналізом (тобто усереднення результатів, отриманих при аналізі безлічі різних зразків) може призвести до того, що будуть пропущені «гарячі точки» – ділянки з підвищеною концентрацією аналіту в матеріалі. Це важливо, якщо метою аналізу є дослідження забруднення, яке може бути присутнім тільки в окремих зразках матеріалу.

В окремих випадках максимально допустимий вміст аналіту може бути зафіксовано юридично, тобто у встановлених законом граничних нормативах. Для цих ситуацій, можливо, викладені стандартні методики відбору проб. Наприклад, згідно Codex Alimentarius максимально допустима межа залишкового пестициду циперметрину як у цитрусових фруктах, так і в персиках, становить 2 мг/кг.

Щоб правильно підготувати пробу для аналізу, ви повинні знати, що при аналізі цитрусових необхідно використовувати цілі фрукти – шкірку, серцевину, зерна, м'якоть і сік, в той час як при аналізі персиків беруть фрукт з видаленою плодоніжкою і кісточкою, проте залишковий вміст пестициду розраховують і виражають відносно цілісного об'єкту (включаючи кісточку), виключаючи плодоніжку. У деяких випадках виникає необхідність відбору певної кількості проб, який проводиться у присутності свідків.

3.2.5 Види відбору проб

Вірогідна вибірка

Рандомізований (випадковий) відбір проб дозволяє проводити статистичну оцінку результатів. Він необхідний, коли потрібно отримати представницьку пробу.

Невипадковий (направлений) відбір

До цього виду відбору вдаються, коли неможливо відібрати представницьку пробу. Цей підхід відбору є вірним, якщо необхідно отримати селективну пробу. Існує три основних стратегії не випадкового відбору проб.

Умисний (недостатньо випадковий) відбір – вимагає володіти інформацією про досліджуваний матеріал при відборі специфічних зразків.

Пропорційний (квотний) відбір вимагає поділу транспортної партії на групи. Після того, як матеріал розділили на групи, проби з кожної групи відбирають за правилами умисної (не зовсім випадкової) вибірки.

Зручний відбір – передбачає відбір проб на підставі доступності та досяжності.

Відбір проб об'ємистих матеріалів

Цей спосіб відбору проб полягає у взятті проби з матеріалу, який не перебуває з дискретних, ідентифікованих або постійних одиницях. Об'ємистий матеріал може бути газоподібним, рідким або твердим.

Відбір проб для приймального контролю

Відбір проб для приймального контролю передбачає наявність заздалегідь складеного плану відбору проб для визначення відповідності партії товару певним приймальним критеріям. Основна мета відбору проб для приймального контролю – продемонструвати замовникові, що він отримає товар необхідної якості. При цьому слід пам'ятати, що фінансові ресурси обмежені, і вартість одиниці продукту повинна відображати вартість інспекції, так само, як і вартість виробництва товару.

Вибірковий приймальний контроль здійснюють за якісними або за кількісними показниками. При приймальному контролі за якісними ознаками зразок товару у товарній партії визнається відповідним або невідповідним за якістю. Кількість невідповідностей в партії підраховують і, у разі якщо їх кількість досягає певної величини, партію товару відхиляють. При

приймальному контролю за кількісними показниками цікаву для дослідника характеристику вимірюють за числовою шкалою. Якщо середня величина, яка вимірюється, відповідає встановленому значенню, відхиленню і потрапляє в допустимий інтервал для стандартного відхилення, то партію товару беруть.

Для ілюстрації відмінності між двома видами планів вибіркового контролю розглянемо приклад. Кукурудзяні пластівці продають у пакетах вагою по 500 г. При приймальному контролі за якісними ознаками всі пакети, вага яких становить 500 г і більше, проходять контроль, а пакети вагою менше 500 г вибраковують. Якщо число відбракованих одиниць не перевищує встановленого значення, то вся партія товару приймається.

Якщо приймальний контроль проводять за кількісними показниками, пакети зважують, реальні ваги усереднюють і розраховують стандартне відхилення величин. Якщо середня величина відповідає заявленій середній вазі або перевищує його, а значення стандартного відхилення не вказує на значне не доваження, партію товару беруть.

3.2.6 Кількість проб і розмір проби

У плані відбору проб повинні бути детально викладені вимоги, пов'язані з кількістю та розміром первинних проб, які необхідно відібрати з лоту/партії товару. Крім того, план повинен містити опис процедури приготування лабораторної проби. Можливо, аналітик далекий від цих проблем, проте він повинен розуміти, наскільки ці моменти впливають на достовірність результатів будь-якого аналізу.

Більшість хімічних аналізів є деструктивними, і дослідженню не вдається піддати весь матеріал. У будь-якому випадку, це буде не надто ефективно з точки зору витрат. Може виникнути проблема з отриманням представницької проби об'ємистого матеріалу, про який відомо, що він не є гомогенним. План вибіркового контролю повинен бути складений так, щоб можна було дослідити ступінь гомогенності матеріалу.

Якщо метод аналізу пройшов валідацію для аналізу 1 г матеріалу, але в розпорядженні аналітика тільки 100 мг, слід перевірити, чи є метод досить стійким при зменшенні кількості досліджуваного матеріалу. Це необхідно з'ясувати до початку аналітичної роботи, тобто метод має пройти валідацію для аналізу 100 мг матеріалу. Навіть якщо метод аналізу визнаний досить стійким, зменшення масштабу аналізу є можливим лише в тому випадку, коли зменшена проба залишається представницькою в прийнятних межах. Це залежить від ступеню однорідності матеріалу.

Якщо відбір проб проводиться поза лабораторією, аналітик повинен бути проінформований про розмір і кількість аналітичних проб, які належить відібрати з лабораторної проби безпосередньо для аналізу.

Слід з обережністю використовувати термін «об'єм вибірки» (sample size) і завжди знати контекст, в якому його застосовують. Термін «об'єм вибірки» іноді відноситься до кількості проб, що відбираються з більшого

об'єму матеріалу, наприклад з лота або партії продукту. «Об'єм вибірки» – статистичний термін, який застосовується для опису кількості «одиниць», які вибрані з більшої сукупності. Це повинно бути відображено в плані відбору проб. Тим не менш, в лабораторії аналітик може вжити вираз *sample size* для позначення кількості матеріалу, робочої проби або наважки. Обидва значення терміна важливі, і їх слід вживати з розумінням при аналізі процесу відбору проб, незважаючи на те, що вищезазначений процес часто проходить без участі аналітика. Щоб уникнути змішувань понять, користуються певною термінологією, наприклад, такими термінами як об'єм робочої проби, величина наважки, кількість первинних проб і т. д.

3.2.7 Невизначеність відбору проби

Для того, щоб визначити, яку кількість проб нам потрібно, необхідно врахувати всі джерела невизначеності кінцевого результату. Розглянемо невизначеність, що виникає при відборі проб. Тут необхідно використовувати кілька термінів з математичної статистики, а саме: стандартне відхилення (s) і дисперсія (s^2).

Сумарна дисперсія кінцевого результату s_{total}^2 являє собою суму двох доданків. Перший доданок виникає внаслідок варіацій складу лабораторних проб (природні властивості відібраного матеріалу) і діапазону, обумовленого методикою, що застосовується у відборі проб s_{sample}^2 . Інший доданок $s_{analysis}^2$ виникає внаслідок похибок аналізу проби, проведеного в лабораторії:

$$s_{total}^2 = s_{sample}^2 + s_{analysis}^2 .$$

Аналітичну дисперсію ($s_{analysis}^2$) можна визначити шляхом проведення повторних вимірювань проб, які достовірно є гомогенними. Потім можна розрахувати сумарну дисперсію. Для цього потрібно взяти, як мінімум, сім лабораторних проб і проаналізувати кожну з них (зауважимо, що величина s_{sample}^2 характеризує невизначеність, пов'язану з приготуванням лабораторної проби, в той час як $s_{analysis}^2$ включає невизначеності, пов'язані з усіма операціями з обробки проби в лабораторії, які необхідні для приготування робочої проби). Розраховують дисперсію отриманих результатів. Розрахована величина являє собою s_{total}^2 , оскільки включає дисперсію, обумовлену аналітичним процесом, плюс всі додаткові дисперсії, що визначаються методикою відбору проби при підготовці лабораторної проби і розподілом аналізу у сипучому матеріалі.

Величина дисперсії, обумовлена відбором проби, дорівнює

$$s_{sample}^2 = s_{total}^2 - s_{analysis}^2 .$$

3.2.8 Кількість первинних проб

У кожній області діяльності існують особливі вимоги до кількості первинних проб, які необхідно відібрати для аналізу. Для визначення кількості проб з кожного лоту користувалися простими емпіричними правилами, у тому числі формулами $n = \sqrt{N}$ і $n = 3 \times \sqrt[3]{N}$ (n – кількість проб; N – загальна кількість одиниць у лоті). В обох випадках n округлюють до цілого числа.

У планах відбору проб для різних сфер діяльності вказується кількість проб, які слід відбирати з лоту.

3.3 Валідації аналітичних методик та правильність проведення вимірювань

Згідно з міжнародним стандартом ISO/IEC 17025, «валідація методики» – це «підтвердження шляхом дослідження та подання об'єктивних доказів того, що конкретні вимоги до специфічного цільового використання (методики) виконуються». Це означає, що за допомогою методики, що пройшла валідацію, при правильному її застосуванні можна отримувати результати, прийнятні для особи, що приймає рішення на їх підставі. При цьому потрібне глибоке розуміння, для чого потрібні були аналітичні результати, і яким має бути якість наданих результатів, тобто яка невизначеність вимірювань. Це визначає вимоги до робочих характеристик методики. Процес валідації методики являє собою ряд запланованих експериментів, в ході яких визначають її робочі характеристики. У процесі валідації методики зазвичай оцінюють наступні характеристики: вибірковість; прецизійність; повернення; лінійність в робочому діапазоні; межа виявлення; межа визначення, градування і стійкість методики.

Схема процесу валідації представлена на рис. 3.4.

Якщо для необхідного аналізу не існує адекватної методики, то слід адаптувати існуючу методику або розробити нову. Адаптована або знову розроблена методика потребує оптимізації визначення робочих характеристик, для підтвердження того, що методику можна використовувати для рутинних лабораторних аналізів. Потім збирають свідчення, необхідні для демонстрації відповідності методики заданій меті. Рівень валідації, тобто необхідний масштаб експерименту (кількість дослідів), залежить від конкретної проблеми та об'єму доступної інформації.

На рис. 3.5 представлені підходи до проблеми, якими можна скористатися для прийняття рішення про необхідний рівень валідації. Якщо методика опублікована і відомі її робочі характеристики, лабораторія повинна лише підтвердити свою здатність досягти зазначених в методиці робочих характеристик. Важливі параметри, такі як селективність, повернення і робочий діапазон, необхідно перевіряти. Якщо отримана інформація є задовільною, методику можна з упевненістю застосовувати на практиці. Така обмежена валідація, де всі процедури спрямовані на

підтвердження опублікованих встановлених характеристик, називається *верифікацією*.

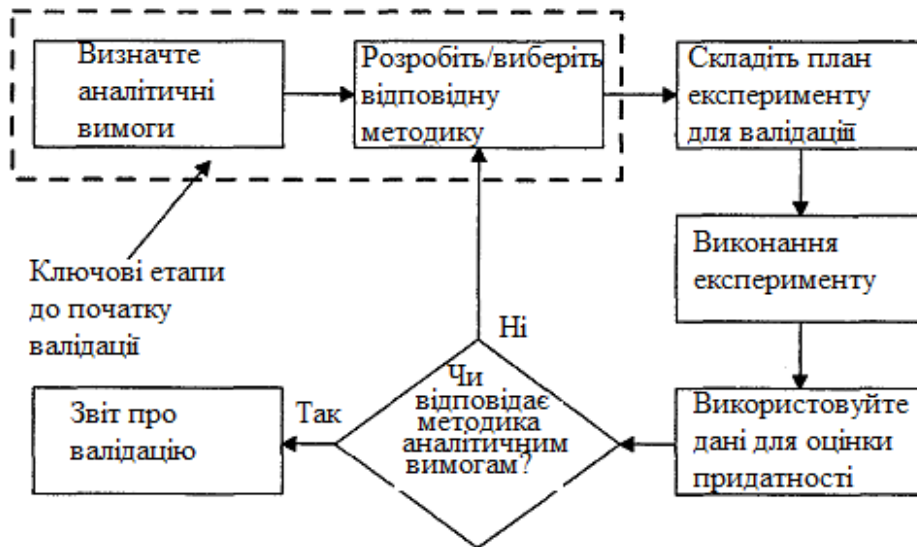


Рис. 3.4. Схема процесу валідації методики

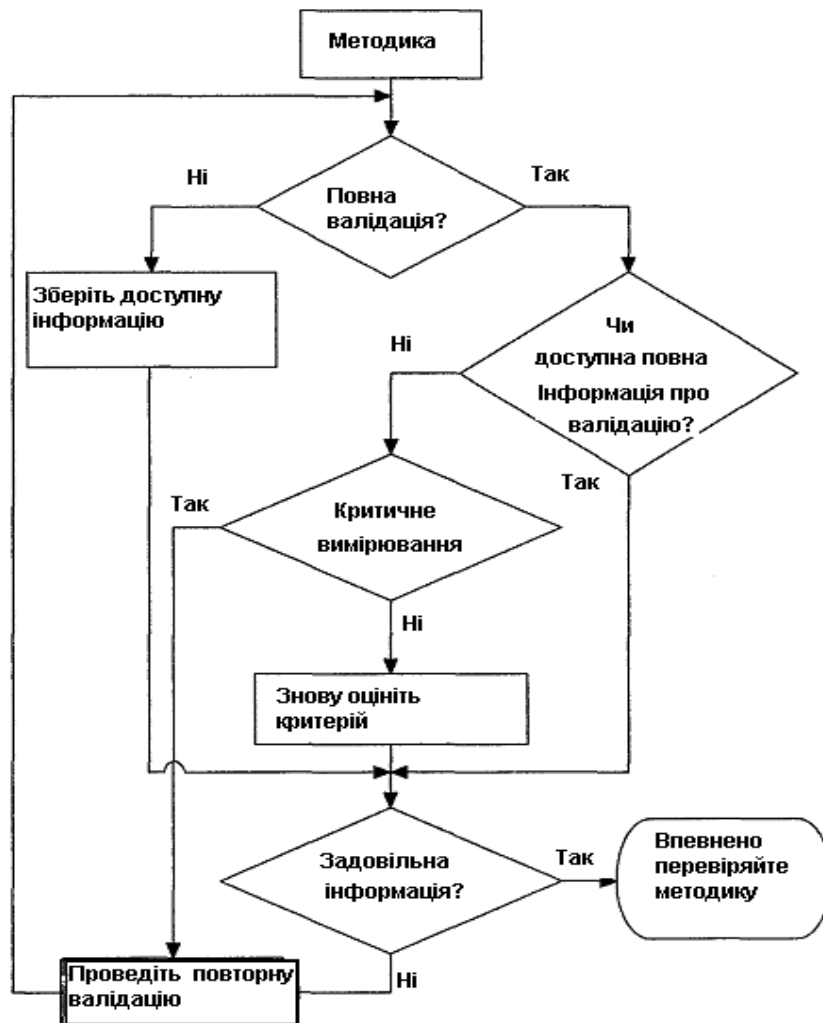


Рис. 3.5. Визначення необхідного рівня валідації – схема вибору

Можливість тривалого постійного ефективного застосування методики необхідно перевірити за допомогою відповідних процедур контролю. Якщо стандартна методика вважається невідповідною (наприклад, стара методика, що не пройшла повної валідації, застосовується для проведення важливого дослідження; або ж ситуація, коли дані валідації, які застосовувалися лише до певної проби, в той час як доводиться працювати з проблематичними пробами), буде потрібна додаткова перевірка її на придатність. Лабораторія повинна, як мінімум, продемонструвати здатність відповідати нормативам, викладеним у специфікації вимог до вимірювань.

У кінцевому рахунку, об'єм проведених валідаційних досліджень повинен забезпечити впевненість відповідності методики заданій меті, з урахуванням ризику, прийнятого як для лабораторії, так і для замовника. Наприклад, при проведенні дуже важливого вимірювання необхідно ретельним чином провести процедуру валідації методики – іншого шляху просто немає.

Слід відзначити, що необхідний рівень валідації залежить від можливого ризику для лабораторії та замовника у разі надання помилкових даних.

З плином часу настає момент, коли потрібна модифікація методики, оскільки в лабораторії відбуваються зміни політики закупівель, наприклад, зміна постачальника реагентів, або ж модифікація з метою забезпечення прийнятності методики для чогось іншого застосування, наприклад, при розширенні робочого інтервалу концентрацій. У таких ситуаціях не потрібна валідація за повною процедурою; необхідно провести перевірку з використанням раніше проаналізованих проб або матеріалів порівняння з аналогічною матрицею. Потрібно перевірити такі параметри, як межу виявлення, прецизійність, повернення та лінійність. Можливо, буде необхідність замінити один метод іншим, наприклад, перейти від GC-FID до GC-MS. У цьому випадку слід продемонструвати, що результати, отримані за новою методикою, відповідають результатам, отриманим за загальноприйнятими методами. Кращий підхід у даній ситуації – «парні порівняння». Проби поділяють на дві партії; першу партію аналізують старою методикою, а іншу – із застосуванням нової методики. Потім результати піддають статистичному аналізу.

Якщо немає даних валідації методики, то всі відповідні параметри необхідно досліджувати. Ступінь ретельності, з якою проводиться дослідження, залежить від таких моментів як «критичність» (важливість) вимірювання та доступність даних з валідації аналогічних методик. Часто в лабораторії, тривалий час використовують певну методику із задовільними результатами, але з відсутністю документації, яка підтверджує робочі характеристики методики. Здавалося б, немає потреби вимагати повної повторної валідації методики, яка успішно працює протягом кількох років. Однак необхідність об'єктивних свідчень не дозволяє приймати на віру достовірність даної методики вимірювань. Можлива послідовність дій представлена нижче.

- Вивчіть доступну інформацію, включаючи інформацію з контрольних карт; характеристики, отримані на етапах програми перевірки кваліфікації; літературу та інформацію з валідації споріднених методик, а також дані порівняння з іншими методиками. Скористайтеся доступною інформацією і професійними оцінками при розгляді кожного істотного пункту процедури валідації, а також підписання і здачі відповідним чином оформлених і документованих звітів.

- Визначте істотні моменти, що вимагають подальшої уваги і надайте інформацію, якої не вистачає. Якщо достовірність методики не викликає серйозних сумнівів, можна продовжувати нею користуватися. Однак, по закінченню обґрунтованого періоду роботи методики, повинна бути надана нова інформація за результатами валідаційних досліджень, що включає експериментальні дані і професійні думки.

Важливо, щоб будь-яка з обраних методик мала розумне наукове обґрунтування в умовах, де вона буде застосовуватися. Крім того, необхідно продемонструвати, що обладнання, яке належить використовувати в роботі, придатне і негативно не вплине на результати дослідження. Це відноситься до всіх типів обладнання. Демонстрація можливостей обладнання називається «перевіркою придатності обладнання». Персонал, що виконує валідаційні дослідження, повинен бути достатньо кваліфікованим і компетентним для виконання покладених на нього обов'язків.

У список включаються процеси, що визначають значення робочих характеристик приладу і контрольні перевірки якості. Важливі робочі характеристики представлені в табл. 3.1, яке нагадує складання пазлу. Чим більше фрагментів потрапляє на свої місця, тим ясніше стає картина. Різниця в тому, що при валідації методики не завжди необхідно використовувати всі фрагменти. У табл. 3.1 відображені чотири різних ситуації, що вимагають дослідження різних параметрів. Важливим є те, щоб процедура була спланована, інакше вона може стати дуже громіздкою і неефективною. Перед тим, як приступати до планування процедури валідації методики, слід володіти термінами статистики та статистичними розрахунками.

Таблиця 3.1. Робочі характеристики, необхідні для валідації при різних видах аналізу

Параметр	Тип аналізу			
	Кількісний	Основний компонент	Аналіз слідів	Фізичні властивості
Вибірковість/специфічність	+	+	+	+
Лінійність/робочий діапазон		+	+	+
Межа виявлення	+		+	
Межа кількісного визначення			+	
Повернення/вилучення		+	+	+
Прецизійність		+	+	+
Стійкість	+	+	+	+

Слід звернути увагу, що в табл. 3.1 відсутній рядок «Відбір проб». Незважаючи на те, що відбір проб є важливим моментом аналітичної роботи, він не включений до процедури валідації методики. Передбачається, що в розпорядженні аналітика є достатня кількість матеріалу проби, і що методика проходить валідацію з використанням матеріалів, що володіють аналогічними або дуже близькими хімічними і фізичними властивостями.

Є ще два параметри, що характеризують результати валідації, але не є частиною процедури. Це невизначеність вимірювань і метрологічна простежуваність. Якщо врахувати ці моменти на етапі планування процедури валідації методики, то інформація, отримана в ході валідації, буде цінним внеском в оцінку невизначеності вимірювань. Простежуваність залежить від робочих процедур при реалізації методики і матеріалів, які застосовуються.

3.3.1 Селективність

При розробці методики необхідно довести, що за допомогою відповідної методики вимірюється вміст аналіту, який нас цікавить. Одним із завдань валідації методики є підтвердження визначення вмісту певного аналіту. Тобто, можливість методу однозначно виявляти і визначати конкретний аналіт в присутності інших супутніх компонентів називають *селективністю* або *специфічністю*. У деяких областях діяльності ці терміни взаємозамінні, і це може викликати непорозуміння. *Селективність* – термін, рекомендований для застосування в галузі аналітичної хімії, що відображає ступінь можливості застосування даного методу для визначення аналітів у зазначених умовах у присутності сполук з аналогічними властивостями. Селективність підвищується при вимірюванні унікальних для даного матеріалу характеристик, наприклад, поглинання на певній довжині хвилі або при відділенні аналіту від інших речовин, присутніх у пробі.

При розробці методики селективності необхідно приділяти належну увагу. Тому, стандартні зразки з добавками потенційно заважаючих речовин порівнюють з сумішами відомого складу, які аналогічні за складом до реальних проб. Серйозні перешкоди необхідно усувати, менш значними перешкодами можна знехтувати, включивши їх вплив у повернення методики і зв'язану з нею невизначеність вимірювання.

Якщо при аналізі складних проб виникають сумніви в придатності методики чітко ідентифікувати аналіт і виміряти його вміст, то необхідно проводити перевірку методики використовуючи матеріал порівняння з близькою за складом матрицею або проаналізувати пробу альтернативною методикою, що пройшла валідацію.

3.3.2 Діапазон вимірювань

У процесі валідації встановлюють співвідношення між аналітичним сигналом і концентрацією речовини, яка досліджується. Слід також переконатися в тому, що калібрувальна крива в інтервалі лінійності методики

не вносить надмірно великої невизначеності вимірювання (невизначеність за рахунок калібровки повинна бути приблизно на 20 % меншою невизначеності, яка вноситься самим значним компонентом). Крім того, потрібно побудувати калібрувальний графік, який знадобиться при рутинному використанні досліджуваної методики. Було б розумно провести перевірку деяких (або всіх) нижчеперелічених параметрів для того, щоб переконатися в тому, що вони не виходять за рамки меж, встановлених нормативами.

Чутливість – швидкість зміни сигналу вимірювального інструменту за зміни концентрації. Параметр можна наочно представити як кут нахилу калібрувальної кривої. Справді, чим більша чутливість, тим більша здатність методики розрізняти близькі концентрації, оскільки невелика різниця концентрацій призведе до значної зміни спостережуваного аналітичного сигналу (відгуку). Чутливість може змінюватися при зміні концентрацій, як показано на рис. 3.6, проте часто лінійність калібрувальної кривої зберігається в широкому діапазоні концентрацій.

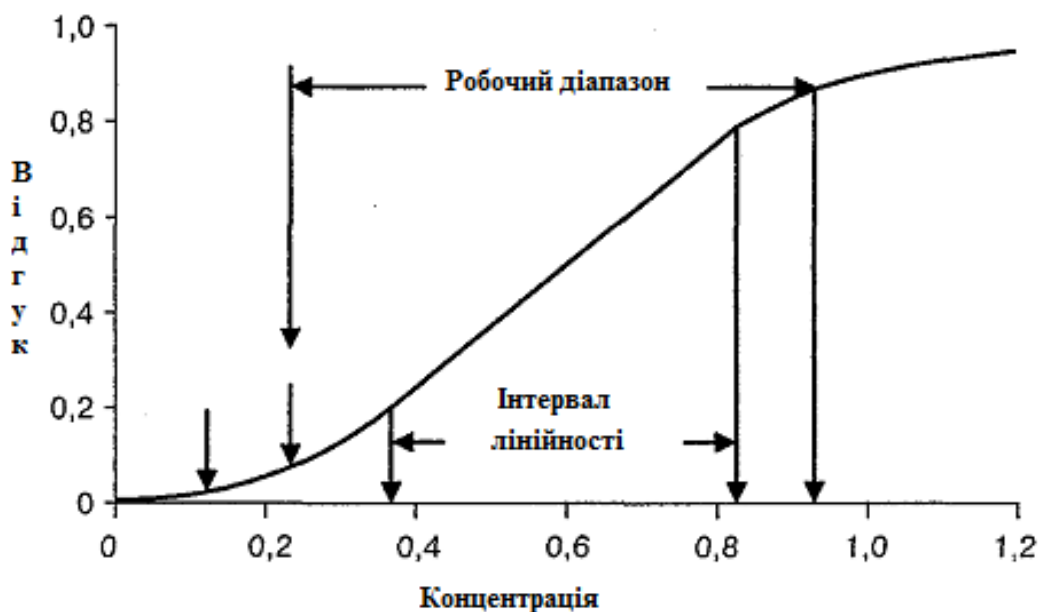


Рис. 3.6. Калібрувальна крива і деякі ключові робочі характеристики

Лінійність і *робочий діапазон* методики визначають шляхом аналізу проб з різними концентраціями аналіту для визначення діапазону концентрацій, в якому зберігається лінійність калібрувальної кривої і прийнятна невизначеність вимірювання. Лінійність можна оцінити шляхом візуального аналізу калібрувальної залежності виміряних значень аналітичного сигналу (відгуку) від відомої концентрації або статистичними методами. Для визнання методики придатною для застосування не обов'язкова ідеальна лінійність калібрувальної кривої. Досить вивести рівняння, що зв'язує аналітичний сигнал (відгук) з концентрацією – ця

залежність називається калібрувальною функцією. *Робочий діапазон* – це область з прийнятною невизначеністю результатів. Він може бути ширше, ніж інтервал лінійності калібрувальної функції. Нижня область робочого діапазону обмежується межею кількісного визначення (LoQ), а верхня область закінчується там, де зміна концентрації викликає недостатню зміну аналітичного сигналу (відгуку), як показано на рис. 3.6.

Для вимірювань, призначених для виявлення аналіту або виявлення його відсутності, порогову детектуючу концентрацію можна визначити за результатами паралельних вимірювань у всьому робочому діапазоні концентрацій. Ці дані дозволяють визначити концентрацію, відповідну точці відсікання – момент переходу від достовірного детектування до відсутності детектування. На кожному рівні концентрації необхідно провести близько 10 вимірювань. Положення точки відсікання залежить від прийнятої кількості помилкових негативних результатів. З таблиці 3.2. видно, що в розглянутому прикладі позитивна ідентифікація аналіту не є надійною при концентраціях нижче 100 мкг/г.

Таблиця 3.2. Відгуки в 10 паралельних аналізах за різних рівнів концентрацій

Концентрація (мкг/г)	Виявлено / не виявлено
200	10/00
100	10/00
75	5/50
50	1/90
25	0/10
0	0/10

Перевірка лінійності

Лінійність є мірою здатності методики видавати аналітичний сигнал, прямо пропорційний концентрації аналіту в пробі. Іноді потрібна певна обробка аналітичного сигналу (через математичну функцію) перед оцінкою лінійності. Кількісна оцінка лінійності може бути отримана різними статистичними методами за даними, які описуються лінійною та вищими функціями.

Визначення лінійності зазвичай вимагає більшої кількості стандартів (і більшої кількості паралельних вимірювань для кожної концентрації), ніж для звичайної калібровки при регулярному використанні методики, що пройшла валідацію. Зауважимо, що при встановленні лінійності немає необхідності в незалежному приготуванні розчинів відомої концентрації. Лінійність повинна існувати в межах, визначених для даної методики концентрацій аналіту і матриці, і охоплювати діапазон концентрацій, який перевищує очікуваний діапазон концентрацій у пробах, наприклад, на $\pm 20\%$.

Для забезпечення достовірної оцінки лінійності проводять дослідження.

- Розподіліть значення концентрацій (x) калібрувальних розчинів рівномірно у всьому досліджуваному діапазоні. Одне або два значення на кінцях діапазону називають «важелями» («leverage») прямої.

- Дослідіть не менше 6 рівнів концентрацій. Проводьте вимірювання у випадковому порядку.

- На кожному рівні проводите від 2 до 6 паралельних вимірювань.

- Переконайтеся в тому, що значення аналітичного сигналу (відгуки) при аналізі проб близькі до середніх значень відгуку, $\bar{y}$, калібрувального набору. Це зменшить внесок у похибку оцінки лінії регресії за методом найменших квадратів.

- Для оцінки лінійності інструментального відгуку можна використувати чисті речовини.

- Для визначення діапазону лінійності методики слід використовувати сертифіковані стандартні зразки або зразки з внесеними добавками з аналогічною матрицею.

- Оцініть лінійність візуальним аналізом графіка залежності відгуку від концентрації.

- Перевірте наявність викидів (різко виділених результатів). Якщо ви виявили результати, що викликають підозру, перевірте за допомогою статистичних тестів, наприклад, тесту Діксона або критерію Граббса. Не відсівайте викиди просто на підставі статистики.

- Можна використовувати й інші статистичні параметри, включаючи аналіз залишків і дисперсійний аналіз. Аналіз може вказати на необхідності перевірки функції нелінійного відгуку.

Детальний розгляд питання про оцінку лінійності виходить за рамки цієї книги, проте кілька загальних зауважень викладено нижче. Важливо встановити однорідність дисперсії («гомоскедастичність») методики у всьому робочому діапазоні. Це можна зробити, виконавши по 10 паралельних вимірювань в крайніх областях діапазону. Розрахувати дисперсію в кожній групі результатів і провести статистичне випробування (F-тест), щоб перевірити, чи значна статистична відмінність між цими двома дисперсіями.

Спочатку лінійність оцінюють шляхом візуального аналізу з нанесенням на графік даних, а потім проводять статистичну оцінку. Лінійність сигналу приладу необхідно встановлювати, оскільки без цієї інформації важко виявляти причини нелінійності. Додаткові статистичні параметри включають коефіцієнт кореляції (r , r^2 і т. д.), графік залишків, стандартне відхилення залишків і критерії значимості для кута нахилу графіка і точки перетину з осями координат. Слід пам'ятати, що коефіцієнт кореляції r не є мірою лінійності – він просто вказує на ступінь зв'язку між залежними і незалежними змінними, наприклад, сигналом приладу і концентрацією аналіту. Важливо провести візуальний аналіз графіка залишків для перевірки трендів. Необхідно провести дослідження лінійності методики для затвердження протоколу градування при використанні даної методики в майбутньому.

3.3.3 Звіт валідації та документація

Валідацію методики проводять, щоб надати об'єктивні свідчення того, що вона придатна для зазначеного застосування. Внаслідок цього потрібна формальна оцінка валідаційної інформації на відповідність специфікації вимог до вимірювань та іншим важливим робочим параметрам методики. Незважаючи на те, що валідація описується як послідовний процес, в реальності може знадобитися неодноразове повторення процедур для оптимізації робочих параметрів методики, наприклад, якщо робочий параметр виходить за рамки зазначених меж, необхідне уточнення методики з повторною валідацією.

При валідації методики отримують інформацію про ефективність методики, її можливості та обмеження при застосуванні для рутинного аналізу із статистичним контролем. Отриману інформацію можна використовувати для встановлення меж контролю якості «QC limits». Межі попередження та дії зазвичай встановлюються на рівні, які в два і три рази перевищують міжлабораторну відтворюваність відповідно. При регулярному використанні методики потрібно періодичне вимірювання зразків для контролю з нанесенням результатів на контрольні карти, щоб підтвердити відповідність методики вимогам статистичного контролю. *Частота перевірок у рамках контролю якості зазвичай встановлюється на рівні не менше 5 % від загальної кількості проб, які досліджуються лабораторією.* Якщо методика є новою, то частота перевірок може бути набагато більшою.

Процес валідації не може вважатися завершеним до пред'явлення докладного опису методики та записів, зроблених у ході валідаційного дослідження. Відповідальна особа повинна підписати документ про відповідність методики вимогам, тобто про її «відповідність заданій меті». Документ сприяє постійному застосуванню методики у вказаних межах з певними робочими параметрами. Це, у свою чергу, гарантує, що при використанні методики в різних лабораторіях в різний час для аналізу однієї і тієї ж речовини, результати вимірювань виявляться схожими. Крім того, документацію буде потрібно для процедур із забезпечення якості, при наглядових перевірках і підписанні контрактів.

Зміни в методики вносять при появі нових варіантів її застосування і нових технологічних розробок. Ці зміни необхідно формально реалізувати і зафіксувати після відповідної валідації. *Періодичний аналіз методики, яка використовується лабораторією зазвичай проводиться один раз на два роки а, у разі потреби, її перегляд вважається «належною лабораторною практикою».*

Система контролю документів, включає обмеження на неофіційне копіювання, необхідна для того, щоб забезпечити впевненість у тому, що лабораторія використовує затверджену методику в останній редакції. Це вимагає уваги до деталей, серед яких слід відзначити наступні: номер редакції; хто затвердив методику; хто вніс поправки; час видання; термін дії; кількість примірників і їх власники і т. д. Існує безліч форматів докумен-

тації, однак стандартний формат представлений в ISO 78-2:1999; на підставі стандарту розроблені форми документів, представлені в додатку 1 до цього розділу.

3.3.4 Організація лабораторного процесу

Організація лабораторного процесу охоплює ряд якостей, таких як акуратність, охайність, старанність, вдумливість, обережність, організованість і самодисципліна. Хімік, що володіє зазначеними якостями і застосовує їх у своїй роботі, швидше отримає правильні результати (і отримає їх з першого разу), ніж хімік, якому ці якості не властиві.

Хіміки, робота яких оцінюється доброю організацією лабораторного процесу, приступаючи до дослідження, обов'язково повинні досконально розуміти, що їм належить зробити. Вони завжди свідомо контролюють свої дії.

Переданалітична стадія

Розглянемо виробничий процес, коли ви отримали завдання: провести аналіз партії проб за допомогою вказаного методу, що пройшов попередню валідацію. Зрозуміло, ви не станете приступати до роботи негайно; спочатку слід скласти план дій, потім визначити, яке обладнання, реактиви і т. д. знадобляться для виконання роботи.

Перед тим, як приступити до роботи необхідно:

- розмістити проби в певному місці;
- переконатися в наявності примірника методики в останній редакції;
- прочитати текст методики, якщо він не цілком вивчений;
- перевірити наявність всього обладнання, необхідного для аналізу, і доступність його на весь період роботи;
- переконатися, що все необхідне обладнання знаходиться в робочому стані, не забруднено і відповідним чином відкаліброване;
- спланувати послідовність роботи, а також послідовність операцій на кожній стадії.
- взяти до уваги процедуру контролю точності.

Перевірити, чи є які-небудь стадії критично важливими, чи повинна робота виконуватися без перерв, і чи є необхідність в завершенні аналізу в той же день. Наприклад, складність методу може лімітувати кількість проб, які можна обробляти одночасно.

Скласти розклад, який допоможе йому планувати роботу:

- врахувати всі правила безпеки, зв'язані з методикою та окремими реактивами;
- врахувати всі фактори, які можуть вплинути на результати, наприклад, при виконанні поточної або завершеної роботи можуть з'явитися джерела забруднення;
- починати роботу тільки при доступності витяжної шафи, лабораторної витяжки, чистого боксу або зони. Правила безпечності і можливість забруднення визначають місце проведення роботи;

- виділити місце для проведення робіт на чистому лабораторному столі, так щоб можна було вільно розмістити все необхідне обладнання;
- переконатися в наявності відповідного лабораторного одягу; як правило, досить лабораторного халата і захисних окулярів, проте при виконанні деяких методик будуть потрібні додаткові засоби захисту, наприклад, рукавички;
- оповістити весь персонал лабораторії про потенційні проблеми. Перед початком роботи підготувати рекомендації з надання першої допомоги. Там, де присутні певні загрози безпеки, можливо, буде потрібно особливий контроль;
- переконатися, що увесь необхідний посуд чистий, не пошкоджений і відповідним чином відкалібрований, якщо це необхідно. Увесь необхідний посуд потрібно приготувати до початку роботи. Слід дотримуватися обережності при митті скляного посуду та іншого обладнання; наприклад, мірний посуд не можна сушити в сушильній шафі, оскільки це може привести до систематичного спотворення і порушення калібрування;
- перевірити реактиви, стандарти та зразки порівняння, щоб переконатися в їх класі чистоти. Якщо реактиви та проби для контролю якості вимагають підготовки, це необхідно зробити заздалегідь. Якщо є запас приготовлених реактивів, слід перевірити їх придатність для використання. Всі реактиви повинні бути правильно марковані;
- планувати процедуру ліквідації відходів, наприклад, використаних проб, реактивів і забрудненого обладнання;
- планувати процедуру очищення обладнання;
- перевірити наявність свідоцтва кваліфікації фахівця, що виконує аналіз.

Аналіз

Під час роботи слід звертати увагу на наступні моменти:

- враховувати всі деталі, що відносяться до кожної проби, зробити позначки про стан проби – дати перехресне посилання у відповідному документі;
- перевірити температуру, при якій зберігаються проби, перед тим, як відкривати контейнери;
- проводити процедуру відбору аналітичної проби, переконавшись, що кожна аліквота правильно маркована на кожній стадії аналізу, щоб забезпечити простежуваність до початкової проби;
- там, де обладнання (або пристосування) використовують по кілька разів для аналізу різних проб, необхідно переконатися в їх адекватному очищенні перед кожним використанням, щоб запобігти перехресному забрудненню;
- якщо в методиці не вказано інше, необхідно проводити градування в певній послідовності; якщо градування задовільне, провести контроль перевірки якості (КЯ); якщо результати перевірки задовільні, приступити до аналізу проб;

- якщо проби аналізують партіями, то, можливо, з'явиться необхідність періодичних перевірок градування та контролю якості в ході аналізу проб однієї партії;

- точно дотримуватися тексту методики; не піддаватися спокусі скоротити деякі етапи – це лише викличе проблеми і неминуче призведе до затягування аналізу;

- реєструйте спостереження, дані і незвичайні деталі при реалізації методики, відповідно до прописаних рекомендацій.

Тут важливо виділити ключову ідею; гарне планування перед початком роботи, а також акуратна і стабільна робота дозволяють звести до мінімуму кількість виникаючих проблем.

Після аналіз

Після закінчення практичної роботи приступайте до наступних дій:

- на підставі отриманих даних розрахуйте результат, звертаючи увагу на явні помилки – не відповідають значення результатів вимірювань паралельних проб, позитивні результати там, де слід очікувати негативних і т. д.;

- перевірте наявність помилок при переписуванні і помилок у розрахунках. Найчастіше цю роботу замість безпосереднього виконавця краще виконає інша людина. Перевіряючий не повинен в обов'язковому порядку бути старшим за посадою, однак він повинен розуміти принципи, що лежать в основі роботи, перевірку якої він виконує. Якщо ви працюєте в складі групи аналітиків, ви можете перевіряти роботу один одного ;

- проби слід зберігати, щонайменше, до закінчення складання задовільного звіту. Пробу можна зберігати і довше, залежно від політики лабораторії, або повернути замовнику, або ж знищити. Всі акти знищення проб повинні проводитися відповідно до правил техніки безпеки, чинними в лабораторії (їх слід сформулювати відповідно до національного законодавства в галузі праці і техніки безпеки;

- ділянка лабораторії, на якій виконували роботу, а також обладнання та пристосування слід ретельно дезінфікувати, очистити і привести в порядок, підготувавши їх до виконання наступного завдання. Реактиви та хімічні стандарти з малими термінами зберігання необхідно утилізувати при дотриманні відповідних правил техніки безпеки. Висновок, який потрібно зробити виходячи з вищевикладеного, такий: на кожній стадії роботи слід проявляти максимум старання. Але навіть у цьому випадку прості помилки можуть закрастися при виконанні вимірювання. Однак це легко виявити при перехресних перевірках. Результати паралельних вимірювань, які погано збігаються, можуть виявитися ключем до ідентифікації проблем всієї вимірювальної системи. Найважливіша частина роботи – приведення в порядок робочого місця та обладнання після закінчення роботи; ви зобов'язані самостійно ліквідувати загрози безпеці, можливо, створені вами. Коротше кажучи, залиште все в такому вигляді, в якому хотіли б отримати.

Калібрування

Проведення будь-яких вимірювань полягає в порівнянні невідомої величини (наприклад, робочої проби) зі стандартом. Стандарт забезпечує зв'язок зі шкалою виміру, яка застосовується (наприклад, лінійка служить для вимірювання довжини, стандартні ваги – для вимірювання мас, чисті хімічні речовини – для визначення кількості присутньої сполуки). Це показано на рис. 3.7.

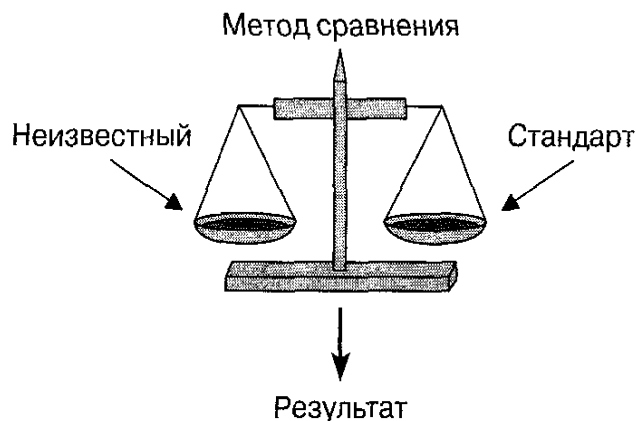


Рис. 3.7. Ілюстрація принципів вимірювань

Калібрування – сукупність операцій, що виконуються з метою визначення співвідношення між сигналом приладу і відповідними значеннями стандарту, наприклад, хімічної речовини відомої концентрації або значення маси, приписане контрольній гирі.

Калібрування інструментів і обладнання (наприклад, скляного посуду) включає порівняння вимірюваної величини з еталонним значенням. Наприклад, для калібрування сигналу спектрофотометра вибирають певний зразок порівняння і в зазначених умовах вимірюють відповідний йому сигнал спектрофотометра. Потім виміряну величину порівнюють із значенням, відомим з літератури. Проводять корекцію результатів подальших вимірювань, або змінюють налаштування приладу.

Крім того, термін «калібрування» (градування) використовують для опису процесу, в ході якого проводять кілька вимірів з метою встановити залежність між аналітичним сигналом і концентрацією речовини. По ряду вимірювань сигналу приладу за різних концентрацій можна побудувати калібрувальний (градувальний) графік (залежності сигналу від концентрації) і вивести калібрувальну (градувальну) функцію, тобто лінійне рівняння або рівняння кривої. Далі, можна виміряти сигнал приладу при невідомій концентрації і за градувальним графіком визначити кількісне значення величини, яке шукають.

На рис. 3.8 наведено приклад градувального графіка та лінійного рівняння, що описує співвідношення між сигналом і концентрацією. Для показаної на малюнку прямої $y = 53,22x + 0,286$, а квадрат коефіцієнта кореляції (r^2) становить 0,9998.

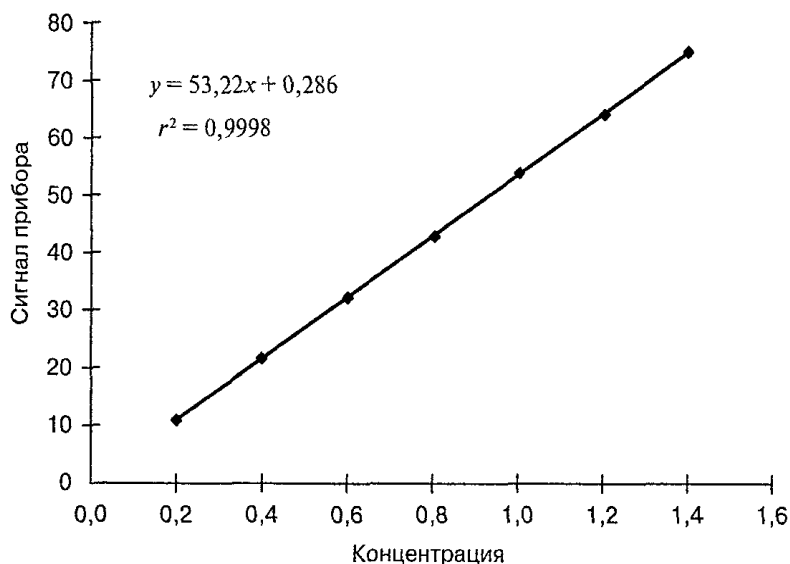


Рис. 3.8. Приклад градуйованого графіка

Розчини чистих хімічних речовин відомої концентрації, які використовують для калібрування приладів, часто називають «стандартними розчинами». Проте, термін «стандарт» має безліч різних значень – його використовують там, де йдеться про «стандартні методи» (методи порівняння), і для позначення документа, наприклад, стандарт ISO/IEC 17025. При вживанні цього терміну, слід переконатися в тому, що його значення трактується однозначно.

Калібрування за допомогою предметів і матеріалів з цілком певними характеристиками широко застосовується в усьому науковому співтоваристві.

Вимірювання фундаментальних базових фізичних величин (довжини, маси, часу, електричного струму, термодинамічної температури і сили світла) проводяться відповідно до давно усталеної системи визнаних міжнародних стандартів, які називають також первинними еталонами. Їх використовують для калібрування матеріалів з менш точно встановленими характеристиками, які називають вторинними еталонами, еталонами порівняння і робочими еталонами. Робочі еталони використовують для калібрування приладів, призначених для вимірювань конкретних характеристик досліджуваного матеріалу або визначення кількості речовини, яку досліджують в досліджуваному матеріалі. Оскільки кожен еталон порівнюють з вищою в ієрархії еталоном (для кожного вказана невизначеність), можна співвідносити результат вимірювання безпосередньо з первинним еталоном. Можливість співвіднесення результату вимірювання з єдиним стандартом (еталоном) називається метрологічною простежуваністю. При фізичних вимірах зазвичай існує пряма простежуваність, проте вважається, що при хімічних вимірах простежуваність може виявитися проблематичною.

Розглянемо наступний приклад. Уявімо, що групі людей запропонували виміряти довжину прямої лінії за допомогою власної лінійки. Ймовірно,

кожна людина отримає результат, який буде дещо відрізнятися від інших, навіть якщо все точно слідували єдиною методикою виконання вимірювань, оскільки лінійки виготовлені і градуйовані різними способами. Лінійки виготовляють з дерева, пластмаси або сталі – всі ці матеріали поведуться по-різному при зміні атмосферних умов. Проте, якби кожен учасник експерименту міг порівняти градування своєї лінійки з градуванням якоїсь «стандартної» лінійки і внести поправку в свій результат через поправочний коефіцієнт, то розкид результатів, ймовірно, був би набагато меншим. Ми привели простий приклад калібрувального експерименту. «Стандартна» лінійка являє собою еталон, щодо якого порівнюють і калібрують інші лінійки. Вимірювання довжини лінії, проведене кожною людиною, простежується до «стандартної» лінійки. Калібрування і простежуваність до стандарту покращує порівнянність вимірювань.

Калібрування за допомогою відповідних фізичних стандартів у більшості випадків є прямою, безпосередньою процедурою. Багато аналітичних методик передбачають взяття точної наважки (певної кількості) речовини – калібрування шкали ваг включає використання фізичного калібранта, такого як еталонна гиря. Більше проблем виникає у аналітика з хімічним калібруванням, оскільки єдиного стандартного зразка, з яким можна було б провести порівняння, для кожного вимірюваної речовини (наприклад, холестерину в сироватці крові), не існує. Метрологічна простежуваність в хімічному аналізі забезпечується наступними способами: по-перше, за допомогою чистих хімічних речовин, а по-друге, шляхом використання зразків з типовими матрицями, в яких чітко визначено кількість присутнього аналіту. Останній із згаданих видів стандарту відомий як матричний зразок порівняння.

Базовою одиницею, прийнятої в хімічних вимірах, є моль – одиниця кількості речовини. Моль – кількість речовини, що містить стільки ж атомів, молекул, іонів або інших структурних одиниць, скільки міститься атомів у 0,012 кг вуглецю 12 (^{12}C). Це єдина величина в системі СІ, яка не має розмірності. Практично майже неможливо виділити моль чистої речовини. Речовини чистотою більш 99,9 % рідкісні; єдиний виняток представляє срібло, яке можна отримувати з чистотою 99,9995 % (срібло «п'ять дев'яток»).

Інша проблема полягає в тому, що не завжди можна виділити весь аналіт з матриці проби, а ефективність хімічного вимірювання, можливо, залежить від складу матриці: сигнал від певної кількості чистого хімічної речовини може відрізнятися від сигналу такої ж кількості речовини в присутності інших хімічних речовин. Якщо можливо кількісне виділення аналіту який шукають з матриці проби, то для калібрування можна використовувати чисті хімічні речовини. Ступінь вилучення аналіту з матриці проби необхідно визначити в процесі валідації методу.

Для забезпечення простежуваності результату вимірювання все, що впливає на результат (впливають величини) повинні простежуватися до національних і міжнародних еталонів. Не потрібно надмірних зусиль для того, щоб забезпечити простежуваність в лабораторії з працюючою

системою менеджменту якості, проте для цього потрібне повне розуміння застосовуваного методу. Крім того, необхідно знати невизначеність, зв'язану з кожною величиною, яка впливає. Один із способів отримання метрологічно-простежуваних результатів – використання первинного методу. Міжнародне бюро мір і ваг (BIPM) визначає первинний метод як метод, що має високі метрологічними характеристиками, дію якого можна до кінця зрозуміти і повністю описати, для якого можна вказати значення повної невизначеності в одиницях системи СІ. Приклади первинних методів включають титриметричний і гравіметричний методи. У багатьох випадках не представляється можливим застосувати первинні методи, інші методи є прийнятними, наприклад, метод нейтронної активації і метод ізотопного розведення.

Загальний шлях забезпечення метрологічної простежуваності показаний на рис. 3.9.

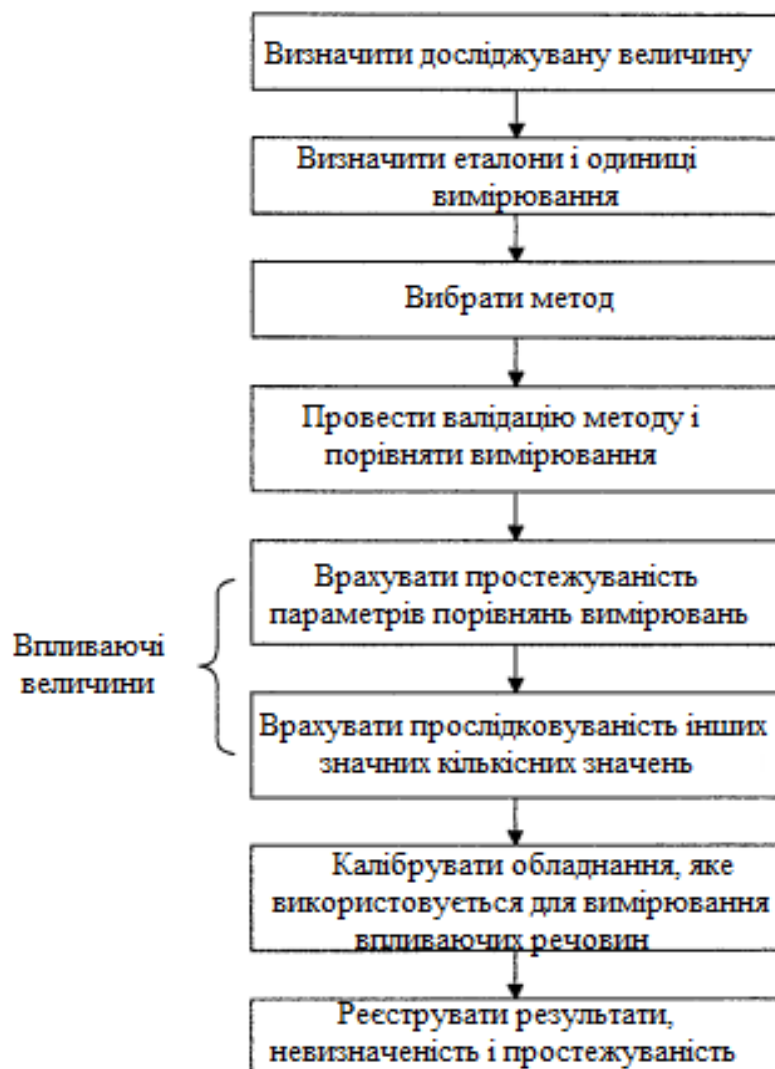


Рис. 3.9. Стратегія забезпечення простежуваності

При встановленні простежуваності важливо, щоб вимірювана величина визначалася однозначно. Розглянемо приклади: екстракція кадмію з ґрунту за допомогою вказаної суміші кислот або вимірювання концентрації металу

певною мірою окислення, наприклад, Fe (II) або Fe (III). У звіті про результат аналізу повинні бути вказані одиниці виміру – відомі та прийнятні; переважні одиниці системи СІ. Метод, який використовується має пройти валідацію; в цьому випадку при точному проходженні тесту методики результати повинні «відповідати заданій меті».

Клас точності скляного посуду повинен бути вказаний в методиці, наприклад, «піпетки й мірні колби класу А», виготовлені з відпо-відним зазначеним допуском. Вимірювальні прилади необхідно регулярно калібрувати і верифікувати їх характеристики щодня.

Застосовувані хімічні речовини повинні являти собою або речовини відомого класу чистоти, або зразки порівняння. Всі параметри рівняння вимірювання повинні простежуватися. Крім того, можуть з'явитися інші змінні, що впливають на результат, але не враховані в рівнянні вимірювання. Найчастіше для отримання несуперечливих результатів потрібна контролювати температуру, час і рН реакційного середовища. У подібних випадках ці параметри теж повинні бути простежені.

Забезпечення метрологічної простежуваності

Зразки порівняння застосовуються як еталони порівняння. До еталонів порівняння звертаються, коли не представляється можливим використовувати національні чи міжнародні еталони або первинні методи. Еталонам порівняння приписані певні значення, і їх можна використовувати для калібрування вимірювальних систем та валідації методів. Крім того, їх можна використовувати для ідентифікації речовин. Приклади еталонів порівняння включають: зразки порівняння (див. нижче), фізичні стандарти (маси, температури) і стандартні довідкові дані (атомне число). Зразок порівняння – це загальний термін, що до особливого класу матеріалів, що застосовуються в якості еталонів порівняння при хімічних вимірах.

А. Зразки порівняння

Термін «зразок порівняння (RM)» визначається як «матеріал або речовина досить однорідне і стабільне стосовно однієї або декількох надійно встановлених характеристик, щоб відповідати заданій меті в процесі проведення вимірювань».

Доповнимо дане визначення.

- RM – узагальнюючий термін .
- Характеристики можуть бути як якісними, так і кількісними, наприклад, ідентифікація речовин або його форми.
- RM використовують у процесі калібрування вимірювальної системи, для оцінки методики вимірювання, для приписування значень іншим матеріалам, а також при контролі якості.
- У процесі даного конкретного виміру RM можна використо-вувати тільки з однією метою.

Пункт 4 є дуже важливим, оскільки підкреслює принцип – зразок порівняння, використаний при валідації методики, не можна використовувати

знову для рутинного градуювання. Можна вико-ристовувати матеріал того ж типу, але від іншого постачальника. Не можна використовувати один і той же матеріал для градуювання і в якості зразка для контролю якості.

Як приклади RM можна навести такі:

- чисті речовини – пестициди з вказаною ступеню чистоти або розчин пестицидів із зазначеними концентраціями (маса/об'єм);
- стандартні розчини: нікель, розчинений в кислоті з вказаною концентрацією (маса/об'єм);
- розчин гідроксиду натрію з вказаною концентрацією (молярна);
- матричні зразки порівняння – природні матеріали: річкові опади з зазначеними концентраціями металів; сухе молоко з вказаним вмістом жиру і паста з крабів з вказаними концентраціями слідових елементів;
- матричні RM – матеріали з внесеними добавками: озерна вода з додаванням мікродомішок і сухе молоко з внесеними добавками органічних домішок;
- фізико-хімічні стандарти – бензойна кислота з вказаною точкою плавлення; п-ксиліл з вказаною температурою спалаху; пісок із зазначеним розподілом часток за розмірами і полімери з вказаним розподілом по молекулярній вазі.

Термін «сертифікований зразок порівняння (CRM) визначається як «зразок порівняння, попередня метрологічна достовірна процедура валідації для оцінки однієї або декількох характеристик, яка супроводжується сертифікатом, що підтверджує значення величини відповідної характеристики, зв'язану з нею невизначеність і метрологічну простежуваність».

• Метрологічна достовірність процедури виготовлення та сертифікації зразків порівняння викладені, серед іншого, в ISO Guide 34 і ISO Guide 35.

• У ISO Guide 31 представлено настанову із зберігання сертифікатів.

Деякі виробники/постачальники зразків порівняння випускають свою продукцію під різними найменуваннями. Наприклад, стандартні зразки порівняння (SRM) представляють собою сертифіковані зразки порівняння, що випускаються Національним інститутом стандартів і технологій (NIST), а Європейські зразки порівняння (ERM) представляють собою CRM, вироблені за участю трьох європейських виробників стандартних матеріалів, а саме BAM (Федеральний інститут дослідження та випробувань матеріалів, Німеччина), IRMM (Європейська комісія. Об'єднаний дослідницький центр, Інститут матеріалів порівняння і вимірів, Бельгія) і LGC (Великобританія).

Сертифіковані зразки порівняння знаходять наступне застосування:

- забезпечення метрологічної простежуваності результатів;
- підтвердження ідентичності матеріалів;
- градуювання та верифікація процесів вимірювання в рутинних умовах;
- перевірка (верифікація) коректності застосування стандартних методів;
- розробка та валідація нових методів вимірювань;
- визначення значень величин для інших матеріалів, які можна використовувати в якості вторинних стандартів (калібрів);
- внутрішній контроль якості та схеми забезпечення контролю якості.

Розробка і атестація сертифікованих зразків порівняння – процес дорогий. Через це сертифіковані зразки порівняння використовуються, як правило, при первинній валідації методу. Застосування сертифікованих зразків порівняння для щоденного контролю якості навряд чи виправдано економічно, хоча їх можна використовувати для «калібрування» інших, більш дешевих вторинних матеріалів, за допомогою яких доцільно проводити рутинний контроль якості.

Б. Хімічні стандарти

Термін «хімічні стандарти» застосовують для позначення хімічних речовин (як правило, індивідуальних речовин), для яких надійно визначена чистота.

Хімічні стандарти можна використовувати для калібрування двома різними способами. Можна застосовувати їх як «зовнішні» стандарти – в цьому випадку вимірювання проводять окремо, не вводячи їх до складу проби; або ж в якості стандартів «внутрішніх» – в цьому випадку стандарт додають у пробу, вимірювання проби і стандарту проводять одночасно, тобто аналізують єдину «збагачену» пробу. Ці два різних підходи часто позначають термінами «зовнішня стандартизація» і «внутрішня стандартизація».

Зовнішня стандартизація

Для зовнішньої стандартизації використовують один або кілька хімічних стандартів відомої концентрації; вимірювання проводять в той же час, що і вимірювання проби, тими ж засобами, якими визначають вміст аналіту в пробах. Чисті хімічні стандарти однієї концентрації можна використовувати для визначення коефіцієнтів чутливості приладів (очікуваної величини, зміни сигналу при зміні концентрації аналіту). При проведенні валідаційних досліджень хімічні стандарти різної концентрації (як правило, щонайменше, сім концентрацій, включаючи холосту пробу) використовують для побудови градуовального графіку. Якщо подібне дослідження показало, що залежність аналітичного сигналу від концентрації є лінійним, то для побудови градуовального графіку можна використовувати меншу кількість концентрацій при застосуванні методу для аналізу проб. Тому коефіцієнт відгуку при вказаній концентрації дорівнює градієнту графіка у зазначеній точці, тобто **чутливості**.

Концентрацію аналіту в пробах визначають за градуовальним графіком шляхом знаходження значення концентрації, відповідного значенню виміряного сигналу. Зауважимо, що при використанні градуовальних графіків не можна виходити з припущення про те, що графік проходить через точку (0,0), якщо це не підтверджено вимірюванням відповідної холостою проби. Розрахунок концентрації аналіту в пробі за допомогою градуовального графіку можна проводити тільки в інтервалі концентрацій, обмеженому максимальною і мінімальною концентрацією хімічного стандарту або величиною сигналу «холостої» проби. Не намагайтеся екстраполювати графік за межу зазначеного інтервалу. Пам'ятайте, що

значення концентрацій, що визначаються за допомогою градуювального графіку, будуть більш надійні в середній ділянці графіку і менш надійні в крайніх областях зазначеного діапазону.

Зовнішні хімічні стандарти використовують у багатьох ситуаціях. В ідеальному випадку, матриці хімічних стандартів повинні збігатися з матрицями проб для того, щоб забезпечити впевненість у тому, що прилад в процесі вимірювання хімічного стандарту дає відгук, аналогічний відгуку при вимірюванні проби. В окремих випадках процесам підготовки проби і вимірювання властиві похибки, які можуть привести до втрати аналіту. У подібних ситуаціях хімічні стандарти слід обробити так само, як і проби, щоб втрати в пробах були еквівалентні втрат у стандарті. У деяких випадках велика похибка з'являється в момент введення проби або стандарту у вимірювальний прилад. Наведемо приклад – ручне введення проби малого об'єму в капілярну колонку газового хроматографа. Потрібна неабияка майстерність для того, щоб вводити постійний об'єм в колонку. Нерідко розкид величин об'єму становить 10–50 %. Вплив варіацій на результат можна усунути, змінивши процедуру. Хімічний стандарт А використовують для побудови калібрувального графіка, а другий хімічний стандарт В додають на етапі вимірювання як до розчину хімічного стандарту А, так і до розчину проби. У цьому випадку будують графік залежності відношення сигналу стандарту А до сигналу стандарту В від концентрації. У цьому випадку концентрація аналіту не залежить від розміру проби або техніки введення проби.

Внутрішня стандартизація

Внутрішня стандартизація полягає в додаванні хімічної стандарту до розчину проби, щоб забезпечити можливість ефективного одночасного вимірювання стандарту і проби. Внутрішні хімічні стандарти можуть являти собою реальний аналіт; аналіт, позначений ізотопом; або ж близьку за хімічним складом речовину. Останнє зазвичай вибирають з числа речовин, імовірно відсутніх в пробі, яке, як вважають, буде проявляти себе в процесі вимірювань аналогічно аналіту. Існує кілька способів застосування внутрішніх стандартів, а іноді вони служать різній меті.

Як згадувалося в останньому абзаці, при додаванні близької хімічної речовини, як до хімічних стандартів, так і до проб, проблеми з розкидом об'єму введеної проби усуваються. Існує інший варіант використання хімічних стандартів подібного роду, тобто стандартів, які є внутрішніми калібрантами. У процесі вимірювання внутрішній стандарт повинен демонструвати характеристики, аналогічні характеристикам проби, проте сигнали повинні бути помітними. Коли близьку речовину додають на ранньому етапі процесу вимірювання, можна припустити, що всі втрати аналіту в результаті процесу вимірювання в рівній мірі проявляться у впливі на хімічний стандарт і аналіт. Таким чином, поправки до результату на компенсацію, наприклад, неповного вилучення, не буде потрібно.

Концентрацію аналіту в пробі визначають за співвідношенням двох сигналів (один сигнал – від стандарту, другий – від проби).

Деякі методи включають процедуру внесення стандартної добавки. Ця процедура полягає в додаванні відомої кількості внутрішнього хімічного стандарту, ідентичного аналіту, до розчину проби. Очевидно, що, якщо внутрішній хімічний стандарт являє собою ту ж речовину, що і аналіт, який визначається то для того, щоб визначити вміст аналіту в пробі, необхідно провести два виміри, а саме: один вимір без додавання хімічного стандарту, другий – з доданням стандарту. Є кілька способів виконання процедури внесення стандартної добавки: тут описані дві з них. Додавання хімічного стандарту, аналогічного аналіту, називають також «spiking» (введення добавки).

При виконанні аналізу першим методом – методом стандартних добавок – до проби додають тільки одну порцію стандарту. В цьому випадку вихідна концентрація аналіту A визначається наступним рівнянням:

$$X = \frac{YAS}{[B - (DA)]}$$

де Y – концентрація доданого внутрішнього хімічного стандарту;

A – аналітичний сигнал для невідомої концентрації аналіту;

B – сумарний сигнал (аналіт невідомої концентрації плюс доданий хімічний стандарт);

$C = (\text{Об'єм}_{\text{стандарту}}) / (\text{Об'єм}_{\text{проби}} + \text{Об'єм}_{\text{стандарту}})$;

$D = (\text{Об'єм}_{\text{проби}}) / (\text{Об'єм}_{\text{проби}} + \text{Об'єм}_{\text{стандарту}})$.

Прийнято користуватися внутрішніми хімічними стандартами високих концентрацій, додаючи їх в об'ємах відносно малих порівняно з об'ємом проби. У подібних випадках, там, де об'єм проби набагато більший об'єму доданого хімічного стандарту, $D = 1$ і C' визначається рівнянням:

$$\text{Об'єм}_{\text{стандарту}} / \text{Об'єм}_{\text{проби}} = C', \text{ де}$$

C – коефіцієнт розведення для хімічного стандарту. Рівняння (3.1) спрощується до рівняння (3.2):

$$X = \frac{YAC'}{(B - A)}$$

Альтернативна процедура внесення стандартних добавок полягає в додаванні декількох порцій відомої кількості хімічного стандарту до розчину проби. Візьміть рівні об'єми розчину проби (рекомендується взяти сім порцій). До всіх цих розчинів, за винятком одного, додайте різні відомі кількості чистого аналіту. Розбавте всі розчини до досягнення однакового об'єму. Виміряйте аналітичний сигнал кожного розбавленого розчину.

Побудуйте графік залежності сигналу від концентрації аналіту. Відрізок, що відсікається графіком в негативній області осі X (при $x = 0$) являє концентрацію аналіту в розчині проби. Процедура проілюстрована на рис. 3.4, де продовжена лінія від точки А до точки В прямо вказує концентрацію речовини в пробі, яку шукають. Оскільки графік залежності аналітичного сигналу від концентрації являє собою пряму лінію, шукана концентрація може бути також одержана діленням відрізка, що відсікається графіком на осі ординат, на кут нахилу прямої. З рівняння прямої, представленого на рис. 3.10, $y = 69,1 x + 7165$, розраховуємо концентрацію аналіту в пробі, вона становить $103,7 \text{ мкг/дм}^3$. Щоб мінімізувати невизначеність отриманого значення концентрації, важливо дослідити концентрації у великому інтервалі доданих значень. Внесення стандартних добавок може виявитися корисним підходом у тих випадках, коли неможливе зовнішнє калібрування через те, що на сигнал приладу впливає матриця проби.

Ні методика внутрішньої стандартизації, ні методика зовнішньої стандартизації, не допускають різної поведінки проб і хімічних стандартів через матричні ефекти в пробах або різний стан аналіту в пробах і в хімічних стандартах.

Хімічний стандарт слід піддавати тій же аналітичній обробці, що й проби, але навіть у цьому випадку слід пам'ятати, що повне вилучення аналіту з матриці проби може виявитися неможливим, якщо аналіт міцно зв'язаний з матрицею. Це необхідно враховувати при розробці аналітичних методів.

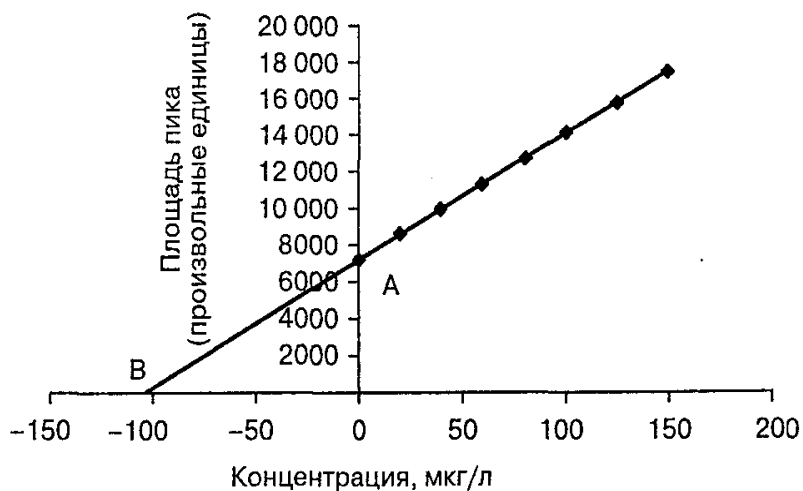


Рис. 3.10. Графік стандартних розведень

Введення добавок розчину шуканого аналіту в пробу також є ефективним способом підтвердження присутності аналіту. При аналізі методом газової або рідинної хроматографії матриця проби нерідко впливає на хроматографічний процес, викликаючи відмінність в часах утримування піків аналіту в пробі і в хімічному стандарті. Таким чином, не можна з

упевненістю визначити, чи викликаний при аналізі проби пік, який досліджується присутністю аналіту або ж він відповідає якійсь іншій речовині. Шляхом внесення добавок хімічного стандарту в пробу і вимірювання хроматографічним часом утримування збільшеного піку, можна підтвердити ідентифікацію аналіту.

3.4. Правила проведення контролю якості та обробка даних

3.4.1. Контроль якості

Заходи проводяться залежно від конкретної ситуації. Вони являють собою засіб оцінки поточних робочих характеристик методу, який використовується, а також загальних процедур, які виконуються лабораторією. Існує два види контролю якості, а саме: внутрішній контроль якості та зовнішня оцінка якості.

Перед детальнішим розглядом цих питань слід пояснити, для чого необхідний контроль якості. Як сказано вище, до нього вдаються для того, щоб переконатися в правильності роботи аналітичної системи. Якщо аналогічні вимірювання проводяться багаторазово, то не слід очікувати отримання абсолютно однакових результатів усіх вимірювань. Незначні відхилення результатів природно виникають через невеликі (прийнятних) відмінностей аналітичних систем. Контроль якості використовують для моніторингу відхилень методу (або методики) результатів дослідження, які виникають через непередбачені впливи. Повторний (багатократний) аналіз зразків контролю являє собою найпоширенішу систему моніторингу. Статистична теорія, що лежить в основі системи контролю якості, докладно викладається в контрольних картах.

Дії, які спрямовані на контроль якості, залежать від аналітичної проблеми, яку необхідно вирішити. Заходи формуються в наступному переліку:

- аналіз холостих проб;
- аналіз контрольних проб;
- аналіз повторних проб;
- аналіз «сліпих» проб;
- аналіз хімічних стандартів і добавок.

А. «Холості» проби

«Холоста» проба – це проба, яка максимально близька за складом до аналітичних проб, проте в ній повинен бути відсутній аналіт.

«Холості» проби використовують для того, щоб визначити, яку похибку вносить хімічний склад матриці, який безпосередньо не вимірюється.

Наприклад, ви можете розчиняти пробу в азотній кислоті при підготовці її до аналізу на вміст слідів міді і нікеля методом атомно-абсорбційної спектроскопії. Досить імовірно, що азотна кислота, так само як і проба, містить ті ж метали в слідових кількостях. Тому аналіз «холостої» проби

повинен полягати в аналізі азотної кислоти, яка не містить проби. Всі реактиви, застосовувані в процесі підготовки проби до аналізу, слід перевіряти для того, щоб не було спотворень результатів вимірювань. Аналіз всіх реактивів за відсутності проби називають іноді «холостим» дослідом.

Б. Зразки контролю (ЗК)

При контролі якості зразки контролю (ЗК) являють собою засіб оцінки варіацій результатів аналізу всередині аналітичних серій і між серіями. Зразок контролю являє собою матеріал, характеристики якого повністю вивчені лабораторією, яка проводить аналітичні вимірювання, або ж третьою стороною. Зразок контролю аналогічний за складом типовим аналітичним пробам, є стабільним, гомогенним матеріалом, доступним у великих кількостях, щоб його можна було використовувати протягом тривалого періоду часу для забезпечення достовірності результатів.

Зразки для контролю не обов'язково досліджувати «повністю». Головна вимога – однорідність і стабільність. Зразок для контролю також не обов'язково повинен бути «аналогічний за складом» робочим пробам. Призначення зразка для контролю – демонструвати стан вимірювального процесу, а для цього достатньо того, щоб він поведився у випробуваннях подібно робочим пробам.

В якості зразка контролю (ЗК) можна використовувати зразок порівняння. Стабільність і гомогенність зразка порівняння забезпечує впевненість у тому, що причиною відхилень результатів аналізу є варіації аналітичного методу, а не зміни в складі зразка. Моніторинг відхилень результатів аналізу зразка контролю зазвичай здійснюють за допомогою контрольних карт. Подібні контрольні карти застосовують для демонстрації статистичного стану вимірювальної системи. Знаходиться вона в статистично стабільному стані, чи проявляє ознаки виходу з стабільного стану, або ж уже вийшла з-під контролю? Не можна розглядати результати аналізу контрольних проб, якщо метод не проходить статистичний контроль; в такому випадку необхідно досліджувати причини цього.

В. Повторні проби

Повторні проби дозволяють проводити перевірку менш формальну, ніж звичайні зразки контролю. У ході аналітичного процесу проби можна аналізувати як одиничні, парні, потрійні і т. д. Як правило, повторна проба являє собою звичайну пробу, яку повторно використовують в аналізі в тій же серії, або в іншій серії проб.

Вивчають відхилення між двома групами результатів для того, щоб переконатися в тому, що відхилення знаходяться в прийнятних межах. Перевищення очікуваних величин відхилень (наприклад, відхилення перевищує заявлену повторюваність методу) вказує на можливі неполадки аналітичної системи. Аналітик, як правило, обізнаний про наявність повторних проб у серії.

Г. Сліпі проби

Сліпі проби являють собою проби, що включаються в аналітичну серію і про які аналітику або може бути відомо, що в серії присутні сліпі проби, проте не знає, які з них. Сліпі проби може розсилати замовник для перевірки роботи лабораторії, або ж керівництво лабораторії для перевірки функціонування конкретної системи. Результати аналізу сліпих проб обробляють так само, як результати аналізу повторних проб – замовник чи керівник лабораторії перевіряють серії результатів для того, щоб оцінити, чи є прийнятним рівень відхилення між результатами повторних вимірювань сліпої проби, або ж між результатами, що досліджуються з очікуваною величиною.

Д. Хімічні стандарти і добавки

Існують два способи застосування хімічних стандартів у хімічному аналізі. По-перше, їх необхідно використовувати для того, щоб переконатися в правильній роботі приладу – це повсякденна операція, іноді її називають перевіркою придатності системи. Цей вид контролю, як правило, не пов'язаний з аналізом конкретних проб і тому є, строго кажучи, швидким способом оцінки якості, ніж способом контролю. По-друге, хімічні стандарти застосовують для градування вимірювальних приладів. Вимірювання стандартів можна проводити окремо від проб (зовнішня стандартизація) або у складі проб (внутрішня стандартизація).

3.4.2. Лабораторне середовище

На жаль, багатьом хімікам – аналітикам доводиться працювати в лабораторіях, абсолютно не пристосованих для проведення необхідних досліджень. Це може серйозно вплинути на якість експонованих результатів. На якість аналітичної роботи може вплинути декілька чинників. Одна з важливих умов: при аналізі проби, яка містить дуже малу кількість досліджуваного аналіту, необхідно виключити всі потенційні джерела забруднення цим аналітом, а також інші джерела, що можуть забруднити пробу домішками і спотворити результат.

Крім забруднення проб, важливими питаннями впливу навколишнього середовища лабораторії є деградація компонентів проби і втрати аналіту в результаті діяльності мікроорганізмів, випаровування або сорбції.

Лабораторне середовище менше впливає на якість вимірів, ніж пряме забруднення.

Потенційні джерела забруднення:

- апаратуру та обладнання, яке контактує з пробами;
- аналіт;
- інші аналіти;
- інші проби;
- реактиви та розчинники;
- чисті хімічні речовини, які використовуються для приготування стандартів;

- повітряне середовище лабораторії;
- лабораторне середовище (в цілому).

Фактори, що впливають на якість

- вібрація;
- бруд;
- сонячне світло;
- радіація;
- електричні й магнітні поля;
- шум;
- температура;
- вологість.

Невеликі зміни температури і вологості в лабораторії, можуть надавати прихований вплив.

3.4.3. Планування лабораторії

Якщо лабораторія сконструйована спеціально для виконання аналітичних робіт, то в ній вплив навколишнього середовища на аналітичний процес зведений до мінімуму. Найчастіше вирішення цих проблем може бути зв'язано з великими витратами, тому при плануванні лабораторії йде пошук компромісу між витратами і зменшенням впливу чинників, що заважають. Якщо лабораторія розміщується в звичайному будинку, пошук рішення може виявитися ще більш важчим. Багато проблем можна вирішити шляхом введення невеликих змін в організацію роботи лабораторії. Вплив сонячного світла можна зменшити, скориставшись щільними шторами, система кондиціонування повітря допоможе стабілізувати температуру, вологість і зменшити вміст пилу в повітрі лабораторії. Серйозні проблеми можуть бути пов'язані з джерелами вібрації, їх вплив можна зменшити шляхом установки спеціальних меблів, призначеної для ізоляції чутливого обладнання від зовнішніх джерел вібрації.

Розміщення обладнання

При організації нової лабораторії перед керівником (менеджером) стоїть завдання: прийнявши в експлуатацію приміщення з усіма його недоліками і недосконалостями, розмістити в ньому всі лабораторні меблі та обладнання так, щоб забезпечити найкращу роботу апаратури.

Більшість хіміків прибувають в лабораторію, в якій їм належить працювати, коли вона вже запущена в експлуатацію. Все має бути розміщено на своїх місцях і, бажано, розміщено правильно. Але це не можна сприймати як само собою зрозуміле. Постійно погана робота окремих одиниць обладнання повинна змусити аналітика задатися питанням: чи може обладнання бути причиною невдач? Надзвичайно важливо знати, які саме чинники навколишнього середовища призводять до появи похибок при

використанні конкретного методу або поганій роботі аналітичного устаткування.

Моніторинг змін

У сучасних лабораторіях для виявлення небажаних змін стану лабораторного середовища та попередження персоналу застосовуються автоматичні сенсорні пристосування. Основні параметри лабораторного середовища, такі як температура, вологість і забрудненість повітря, можна безперервно відстежувати за допомогою сенсорних пристроїв. Результати спостережень можна передавати на записуючий пристрій або ж у комп'ютерну систему лабораторного менеджменту, яка може здійснити коригувальні дії або подати звуковий сигнал у разі перевищення граничного значення певного параметра.

3.4.4. Обладнання, скляний посуд і пристосування

У цьому розділі ми розглянемо питання, пов'язані з лабораторним обладнанням. Термін «обладнання» описує всі предмети, що використовуються в лабораторії для проведення аналітичної роботи, за винятком хімічних реактивів. У попередньому розділі ми розглянули взаємозв'язок між характеристиками обладнання та лабораторного середовища і показали, що необхідно уважно ставитися до розміщення обладнання. У цьому розділі ми розширимо огляд і глибше обговоримо проблему.

Вибір

Існує кілька факторів, які слід враховувати при виборі обладнання для конкретного застосування.

При виборі обладнання, наявного в наявності, вам слід взяти до уваги такі моменти як придатність, тобто «відповідність заданій меті», стан, чистоту і, в окремих випадках, відповідність робочих характеристик обладнання характеристикам, представленим в специфікації. При купівлі нового обладнання, важливо продумати всі можливі варіанти його застосування. Після цього можна приступити до складання специфікації з урахуванням «відповідності заданим цілям», вартості (як початкової, так і вартості поточних витрат) та простоти в експлуатації. Менш очевидні пункти, які все ж таки необхідно враховувати, включають розмір, вагу, вимоги до енергопостачання, репутацію виробника (з точки зору надійності), простоту в експлуатації обладнання та доступність запасних частин. Будь-яке обладнання працює з певними обмеженнями. Наприклад, можливі обмеження по кількості визначення речовини або по точності виконання вимірювань. Якщо ви спробуєте використовувати обладнання з перевищенням його можливостей, то незалежно від того, наскільки правильно ви експлуатуєте обладнання, ви не отримаєте достовірних результатів. Там, де мова йде про конкретний інструмент, «відповідність заданій меті» означає наявність певних характеристик, необхідних для виконання конкретної роботи. Це

відноситься до всього обладнання, і до великого, і до малого. Наприклад, мішалка повинна працювати задовільно, виконуючи поставлене завдання, залишаючись при цьому практично інертною. Існує формальна процедура оцінки придатності обладнання для виконання завдання – вона називається Кваліфікація обладнання або Валідація обладнання.

Придатність

Перед тим як використовувати будь-яку одиницю обладнання, потрібно підтвердити придатність обладнання до використання. Якщо воно придатне, проблем немає, а якщо не придатне, то що потрібно зробити для того, щоб повернути його в задовільний стан? Чи існують способи застосування приладу в його нинішньому або частково відновленому стані? Якщо на це питання негативна відповідь, то сенсу тримати прилад на балансі немає; позбудьтеся від нього – тоді, принаймні, ви будете впевнені в тому, що ніхто не скористається ним через непорозуміння. Якщо обладнання можна полагодити, але не прямо зараз, то на ньому повинна бути наклейка: «Несправне і очікує ремонту», щоб дане устаткування не використали випадково.

Особлива стаття – скляний посуд і пристосування. Скло легко б'ється, а лагодження виробів зі скла доцільне лише в разі пошкодження дорогих складних пристосувань. Навіть невеликі пошкодження, такі як сколені ділянки, можуть привести до провалу експерименту, що може виявитися небезпечним і потребують витрат. Ризик використання пошкодженого обладнання не часто буває виправданим. Від пошкодженого мірного скляного посуду або пристосувань необхідно позбавлятися незалежно від виду ушкодження, оскільки лагодження, швидше за все, призведе до втрати волюметричних характеристик посуду або пристосування, наприклад, значення місткості, витрати і т. д.

Калібрування і очищення скляного посуду важливі, якщо, наприклад, об'єм скляної мірної колби безпосередньо впливає на результати дослідження (приготування градуювальних розчинів, титрування тощо).

Кваліфікація обладнання

Первинна вимога, що відноситься до будь-якого обладнання (будь-то мірна колба, сушильна шафа для висушування проб або атомно-абсорбційний спектрометр, що застосовується для визначення слідових кількостей металів) полягає в тому, що обладнання має «відповідати заданій меті». Будь-яка діяльність лабораторії, наприклад, валідація методик, безпосередньо залежить від правильного функціонування та «відповідності заданій меті», що застосовується. Правила GLP та Міжнародні стандарти, такі як ISO 9001 та ISO / IEC 17025 вимагають, щоб обладнання було придатним для відповідного застосування. Крім того, контрольно-наглядові органи та органи з акредитації постійно вимагають від лабораторій свідчень про те, що обладнання «відповідає заданій меті». Кваліфікація (валідація) обладнання представляє собою формальний процес, метою якого є документальне підтвердження того, що інструмент «відповідає заданій меті»,

підтримується в робочому стані, відкалібрований і придатний для застосування. Формальна сутність і необхідність надання документальних свідчень робить процедуру дещо більш скрупульозною порівняно з рутинною процедурою, що проводиться в більшості лабораторій.

Процес кваліфікації включає 4 етапи.

- Кваліфікація проекту .
- Кваліфікація монтажу.
- Кваліфікація функціонування .
- Кваліфікація в експлуатації.

Кваліфікація проекту – етап планування, що передує купівлі нового інструменту або вибору інструменту з числа наявних для виконання конкретного завдання. На цьому етапі слід звернути увагу на те, як використовуватиметься інструмент і що в цьому випадку потрібно розуміти під «відповідністю заданій меті». Глибина дослідження питання залежить від складності завдання та ризику, зв'язаного з прийняттям неправильного рішення. Можливо, рішення про придатність наявного в лабораторії інструменту для роботи за новою методикою, буде прямим і безпосереднім. Може бути, процедура обмежиться перевіркою документації, необхідної для підтвердження теоретичної здатності інструменту працювати в необхідному інтервалі концентрацій з вказаною для даного методу систематичною похибкою і прецизійністю. Дослідження на «відповідність заданій меті» для нового інструменту може зажадати складної процедури, що закінчується виробленням формальної специфікації, в якій представлені необхідні робочі характеристики інструмента й інші фактори, що відносяться до його експлуатації.

Кваліфікація монтажу потрібна, в першу чергу, при купівлі нового обладнання. На цій стадії виконується перевірка з метою підтвердження того, що отриманий інструмент відповідає специфікації і правильно встановлений в обраному місці у відповідному лабораторному оточенні. Це відноситься як до технічних засобів, так і до програмного устаткування. На цьому етапі розумно скористатися систематизованим списком, щоб забезпечити впевненість, в тому, що перевірено абсолютно все. На цій стадії перевіряють все, що пов'язано з монтажем аж до первісного сигналу при подачі електроживлення, якщо це необхідно. Крім того, відзначимо, що іноді слід повторити окремі аспекти процедури кваліфікації монтажу після переміщення або модернізації приладу.

Кваліфікація функціонування – підтвердження того, що інструмент функціонує відповідно до встановлених вимог лабораторного довкілля. Значення процедури можна оцінити як демонстрацію того, що основні робочі характеристики інструменту відповідають специфікації, і істотних відмінностей між значеннями заданих і реальних величин немає. Наприклад, коли насос налаштований на швидкість потоку $1,0 \text{ см}^3/\text{хв}$, а реальна величина швидкості потоку знаходиться в межах заданого допуску ($0,95$ до $1,00 \text{ см}^3/\text{хв}$), то різниця не є істотною, на відміну від, наприклад, $0,7$ або $1,3 \text{ см}^3/\text{хв}$.

Кваліфікація в експлуатації сприяє вирішенню двох завдань. У першу чергу, вона служить для демонстрації правильного функціонування апаратури в цілому. Крім того, кваліфікація в експлуатації підтверджує, що при зміні характеристик інструменту (наприклад, обумовлених зносом ущільнення поршня насоса) поточні робочі характеристики «відповідають заданій меті». Свідчення правильного функціонування апаратури в цілому можна отримати за допомогою незалежної системи контролю (наприклад, в хроматографії це «тест-колонка» або «контрольна суміш») або за результатами щоденних перевірок придатності методу (придатність системи, калібрування і аналітичний контроль якості). Перевірка за допомогою тест-колонки та контрольної суміші має ряд переваг. Вона дозволяє оцінити ефективність роботи обладнання за допомогою добре розробленої процедури контролю і проводити порівняння результатів з даними, які були отримані раніше, або будуть отримані в майбутньому. Вона дозволяє також порівнювати робочі характеристики інструменту з аналогічними параметрами інших приладів, що знаходяться в лабораторії або де б то не було.

Можливо, вам покажеться, що ця процедура вимагає великих додаткових зусиль. Але в даному випадку не ви приймаєте рішення про періодичність проведення подібних перевірок. Етап 1 проводять один раз – або при виборі інструмента з числа наявних, або при купівлі нового інструменту. Етап 2 також проводиться, як правило, одноразово – при доставці або переміщенні інструменту. Етап 3 здійснюють регулярно, проте не надто часто, його слід проводити після первинного монтажу нового обладнання. Частота перевірок залежить від ряду факторів, включаючи наступні:

- «критичність» робочих параметрів інструменту;
- ступінь навантаження на інструмент – високі робочі навантаження можуть викликати прискорене зношування інструменту; в цьому випадку потрібно ретельна перевірка перед кожним використанням;
- особливості методу, який здійснюється за допомогою даного інструменту: наприклад, застосування агресивних розчинників викликає прискорене зношування компонентів насоса;
- навколишнє середовище – інструмент мобільної лабораторії, можливо, буде потрібно тестувати частіше, ніж інструмент, що знаходиться в приміщенні з системою кондиціонування повітря;
- рекомендації виробника.

Завжди рекомендується проводити етап 3 після сервісного обслуговування. Свідчення, що підтверджують безперервну задовільну роботу обладнання (етап 4), отримують за результатами щоденних перевірок роботи методу (наприклад, контролю стабільності системи, градуювання і аналітичного контролю якості). Можна порадити встановити порогові значення робочих параметрів інструменту, вихід за які означає, що інструмент більш непридатний до використання. Кожен етап кваліфікації необхідно повністю документувати, щоб свідчення, що підтверджують робочі параметри, можна було надати для перевірки в будь-який призначений час.

Очищення

Очищення є обов'язковим компонентом експлуатації обладнання, особливо при повторному використанні інструменту; проте термін відноситься також до процесу очищення обладнання після використання в «брудному» оточенні. Мета очищення – підтвердження того, що при використанні вимірювального (або іншого) устаткування, ризик забруднення від попередніх проб, хімічних реактивів, стандартів і лабораторного середовища, зведений до мінімуму. У більшості випадків процес очищення включає введення хімікатів у системи, які очищаються. Після очищення обладнання потрібно ретельно промити для видалення слідів хімікатів, що застосовувалися для очищення, а потім висушити.

При очищенні слід переконатися в тому, що в процесі очищення не виникне проблем серйозніших, ніж проблема початкового забруднення. Деякі потенційні проблеми абсолютно очевидні, в той час як інші приховані – особливо там, де хімічні реакції можуть привести до фізичного пошкодження обладнання. Наприклад, принцип дії капілярного віскозиметра з U-подібною трубкою заснований на законах капілярних явищ, в яких основну роль відіграють такі параметри як «змочуваність» і поверхневий натяг. Деякі розчинники або детергенти/сурфактанти, застосовувані для очищення, можуть викликати необоротні зміни змочуваності поверхні капіляра. При очищенні мірного скляного посуду слід уникати машинного миття, надмірних температур і застосування сильних кислот/лугів або сурфактантів.

Очищення тонких інструментів або їх компонентів може призвести до їх пошкодження, через що виникнуть проблеми більш серйозні, ніж викликані початковим забрудненням. Якщо в керівництві з експлуатації інструменту немає чіткої інструкції з очищення, адресованої аналітику, безпечніше доручити цю процедуру інженеру з експлуатації обладнання. Якщо виникають сумніви, зверніться до експерта. Інші джерела інформації про очищення доступні у виробників очищувальних засобів. Якщо процедура очищення проводиться перед важливим дослідженням, її слід задокументувати.

Сушка

При сушінні обладнання після очищення слід також дотримуватися обережності. Існує чотири основних способи сушіння обладнання:

- фізична сушка за допомогою абсорбуючого матеріалу;
- ополіскування летючим розчинником з наступним його випаровуванням при кімнатній температурі;
- видалення розчинника при кімнатній температурі в потоці повітря;
- видалення розчинників при підвищеній температурі.

Останній спосіб зручний і, як правило, безпечний. Більшість лабораторій обладнано промисловими сушильними печами (шафами) для сушіння скляного посуду. З'являється спокуса сушити всю скляну посуду тільки так, а проте, в двох випадках це неприйнятно. Гарячу сушильну піч, так само як і

будь-який інший джерело тепла, не рекомендується застосовувати для видалення органічних розчинників. Крім того, не слід сушити при підвищених температурах мірний скляний посуд. Скло розширюється при нагріванні, і процес цей може виявитися не цілком оборотним, тому нагрівання слід уникати – воно може призвести до порушення калібрування і виходу значення за рамки допуску. Більш відповідний спосіб сушіння в цьому випадку – сушка в потоці повітря; при цьому приміщення необхідно добре вентилувати, переважно проводити процедуру у витяжній шафі.

3.4.5 Хімічні реактиви та витратні матеріали

У цьому розділі йдеться про правильне використання хімічних реактивів та інших витратних матеріалів у процесі хімічного аналізу. У розділ включені рекомендації щодо застосування розчинників, реагентів (речовин, що відіграють особливу роль, що безпосередньо беруть участь в хімічному процесі) та інших матеріалів, необхідних для дослідження, але не вступають в хімічні взаємодії. Кілька прикладів використовуваних матеріалів представлено нижче.

Реактиви – агентиокиснювачі та відновники, індикатори, осушувачі, буферні розчини, комплексоутворювачі, кислоти й луги.

Розчинники – вода, органічні розчинники і надкритичні флюїди.

Витратні матеріали – фільтрувальний папір, кипілки, втулки для апаратів Сокслета, сорбенти для хроматографічних колонок.

При роботі з цими матеріалами слід звертати увагу на такі аспекти як клас чистоти, маркування, виготовлення, утримання, зберігання, безпека, стабільність і утилізація. Всі згадані аспекти розглянуті в наступних розділах. Більшість рекомендацій даного розділу застосовуються при роботі з пробами.

Клас чистоти

Для більшості хімічних реактивів, що використовуються в лабораторіях, існує кілька класів чистоти, що визначаються, як правило, концентрацією присутніх у них домішок, загалом, чим чистіше реактив, тим вище його вартість, в каталозі виробника вказані класи чистоти хімічних реактивів, наявних у продажу, разом зі специфікаціями їх чистоти. Необхідно пам'ятати, що в специфікації, можливо, вказані не всі присутні в реактиві домішки. Природа домішок може виявитися важливою (або не важливою), залежно від того, як буде використаний реактив.

Наприклад, в виготовлених промисловим чином мінеральних кислотах, таких як сірчана, хлороводнева або азотна, неминуче присутні в невеликих концентраціях домішки металів. Якщо кислота призначена для використання в простій реакції, присутність невеликих кількостей металів, ймовірно, не виявиться важливим фактором. Однак, якщо кислоту використовують для мінералізації проби з наступним визначенням слідів металів методом атомно-абсорбційної спектроскопії, то цілком очевидно, що присутність домішок

металів може істотно спотворити результати аналізу. Для вищеприписаного застосування необхідно скористатися кислотами високого ступеня чистоти, які практично не містять домішок металів.

Аналогічно, існує безліч способів застосування органічних рідин. Наприклад, гексан, що містить, як правило, домішки ароматичних сполук, згідно з низкою методик застосовують для екстракції з проб неполярні хімічні сполуки. При подібному застосуванні наявність домішок в гексані може виявитися важливим (або не важливим) фактором. Проте, якщо гексан призначений для використання в якості розчинника в УФ-спектроскопії або аналізу методом ВЕРХ з детектуванням по УФ-поглинання або флуоресцентним детектуванням, то слід враховувати, що присутність ароматичних домішок зробить гексан менш прозорим в УФ-області. Важливо вибрати відповідний клас чистоти реактивів.

Маркування

Маркування – досить істотний аспект лабораторного менеджменту. Правильний дизайн і застосування етикеток забезпечує користувача чіткою інформацією про ідентичність і статус реактивів, хімічних стандартів, апаратури і устаткування. Існує ряд вимог, яким повинна відповідати етикетка на контейнері.

- Етикетка повинна бути надійно прикріплена до корпусу (але не до кришки) контейнера.
- На етикетці має бути достатньо місця для розміщення всієї необхідної інформації.
- Напис на етикетці має бути практично незмивним або захищеним від розмивання або забруднення.

З вищесказаного можливі винятки, тому слід пам'ятати про призначення етикетки. При приготуванні вагових розчинів часто доводиться використовувати кілька ідентичних контейнерів з кришками. У цьому випадку важливо чітко маркувати і контейнер, і відповідну кришку. Іноді етикетки не можуть зберігати постійну вагу – в цьому випадку написи, зроблені безпосередньо на контейнері, можуть виявитися кращим виходом з положення. Виливати і наливати рідини/розчинники слід з великою обережністю, щоб інформація на етикетці не виявилася втраченою.

Приготування реактивів

Часто виникає необхідність у приготуванні окремих реактивів. Можливо, комусь це здається звичайною лабораторною роботою, проте її значення часто недооцінюють. Тут зазвичай з'являється джерело похибки, і є сенс витратити час на те, щоб переконатися, що реактиви і особливо хімічні стандарти приготовані правильно. Тут працюють дуже прості принципи. Дотримуйтесь робочих інструкцій, дотримуйтесь правил техніки безпеки, використовуйте обладнання належним чином і завжди пам'ятайте: необхідно переконатися в тому, що ви розумієте, що робите, перед тим, як приступити до роботи.

Деякі інструкції можна тлумачити неправильно, якщо не прочитати їх уважно.

Утилізація відходів

Важливим аспектом належної лабораторної практики є утилізація відходів хімічних реактивів, проб і витратних матеріалів. Існують надзвичайно суворі нормативи, що стосуються відходів, які зливаються безпосередньо в каналізаційну мережу. Можливо, допустимо зливати безпосередньо в каналізацію деякі хімікати одночасно з великими обсягами води. Існують особливі інструкції по збору та ліквідації відходів інших матеріалів, і їм необхідно слідувати. До них включені такі способи як збір окремих типів хімічних відходів у контейнери для подальшого знищення спалюванням або захоронення і т. д.

Сховища, такі як холодильники, морозильні камери та лабораторні шафи необхідно регулярно перевіряти і позбавлятися від накопичених непотрібних предметів. Реактиви та стандарти із закінченими термінами придатності; проби, яких необхідність зберігання відпала, слід ліквідувати відповідно до правил. Записи, що містять інформацію про те, що, коли і, ймовірно, яким чином ліквідовано, повинні бути в ідеальному порядку.

3.4.6 Технічне обслуговування та калібрування обладнання

Розумно розраховувати на те, що нове обладнання буде працювати з максимальною ефективністю, проте воно може швидко прийти в непридатність, якщо його неправильно обслуговують і належно не калібрують. Технічне обслуговування обладнання може бути плановим або ж виконаним з метою ремонту. Деякі прості операції в рамках технічного обслуговування може виконувати користувач, проте в більшості випадків відповідальність за нього бере на себе виробник, постачальник або сертифікований агент. Звернення за «професійним технічним обслуговуванням» може бути умовою гарантійних зобов'язань, а ремонт «власними силами» може призвести до визнання гарантії недійсною.

При необхідності планового обслуговування укладається контракт на регулярне профілактичне технічне обслуговування інструмента з частотою, що залежить від характеру технічного обслуговування. Планове обслуговування являє собою спосіб підтвердження того, що інструмент знаходиться в «доброму стані», а також ідентифікації довгострокових проблем. Планове технічне обслуговування не дає гарантії від раптової поломки інструменту, хоча іноді в угоду з виробником включають пункт про пільгове обслуговуванні в разі раптової поломки.

Технічне обслуговування з метою усунення пошкодження передбачає виклик інженера лише у випадку поломки інструменту, яку не може усунути користувач. Якщо користувач не здійснював щоденний догляд за інструментом, то досить імовірно, що інструмент просто «заїздили», що викликало

поломку. Таким чином, більша частина відповідальності за збереження інструменту лягає на користувача.

Профілактичне обслуговування є більш досконалим способом підтримки інструментів у робочому порядку. На перший погляд здається, що контракт на профілактичне обслуговування є більш дорогим варіантом з двох можливих. Однак у довгостроковій перспективі, з урахуванням таких факторів як термін служби інструменту і втрата часу через простій, виявляється, що цей варіант більш дешевий.

У проміжку між зовнішніми сервісними візитами співробітники лабораторії повинні виконувати прості щоденні операції з обслуговування обладнання. Природно, інструмент слід утримувати в чистоті, зокрема, необхідно якнайшвидше очищати обладнання від пролитих хімічних речовин. Інші прості способи перевірки, які можна виконувати в лабораторії, як правило, перераховані у «Вказівках» виробника.

Регулярне калібрування і верифікація підтверджують, що параметри, які вимірюються конкретним інструментом, можуть бути співвіднесені з визнаним стандартом. Частота калібрування інструмента може бути різною, залежно від способу застосування. Якщо в ході верифікації робочих характеристик інструменту було показано, що інструмент підтримує точність калібрування протягом приблизно трьох місяців, то калібрування слід повторювати з інтервалом близько двох місяців. Проте, верифікація (перевірка придатності системи) виконується кожен раз при виконанні аналізу проб. При виконанні деяких критично важливих аналізів калібрування слід проводити для кожної партії проб або, у надзвичайних випадках, для кожної окремої проби.

Сучасні інструменти з мікропроцесорним управлінням найчастіше забезпечені «внутрішнім стандартом» і проходять автоматичну верифікацію кожного разу при використанні інструменту. Це може виявитися досить корисним, якщо стандарт може бути порівняний з калібрувальними стандартами, який необхідний при перевірці. Щоб це перевірити, необхідно провести підтверджуючий вимір вручну з використанням зовнішнього стандарту. Наприклад, перевірку внутрішнього стандарту маси на електронних вагах можна провести за допомогою набору каліброваних гир. Якщо в результаті процедури підтвердження виявляється, що показання приладів виходять за рамки заданих допусків, то потрібно провести певні коригувальні дії. Ймовірно, доведеться заново налаштувати інструмент, щоб вимірювання проводилися відповідно до специфікації; можливо, буде потрібно візит спеціаліста з технічного обслуговування.

У «зразковому господарстві» процедури верифікації повинні бути повністю документовані. Там, де лабораторія прагне відповідати певному стандарту менеджменту якості, існують суворі вимоги до управління згаданою документацією. Калібрування/верифікація є дуже важливим аспектом проведення вимірювання; весь процес вимірювання опирається на надійне калібрування. Документація повинна включати інформацію про реальну процедуру та якусь «область техніки» до вказівок, коли слід

проводити коректувальні дії, які корегувальні дії необхідно зробити, а також як реєструвати дані про калібрування. Хід процедур калібрування/верифікації слід акуратно і ретельно документувати, оскільки крім того, що ці документи служать доказом правильного функціонування системи, вони вказують на погіршення робочих характеристик інструменту і необхідність коригувальних дій або технічного обслуговування. Наприклад, відгук спектрометра при введенні певного хімічного стандарту довгий час залишався постійним, оскільки прилад працював справно. У міру розвитку дефекту в детекторі спектрометра відгук на хімічний стандарт змінювався, що відображають результати, отримані в ході верифікації.

Лабораторія повинна скласти план, що містить наступну інформацію: які робочі характеристики слід перевіряти для кожного приладу; чому необхідні подібні перевірки і як їх треба проводити. Документи, що встановлюють періодичність технічного обслуговування та перевірки робочих характеристик для певних інструментів представлені в «Посібнику з якості в аналітичній хімії» CITAC/Eurachem.

3.4.7 Основи статистики

Сукупності та вибірки

При проведенні хімічного аналізу ми майже завжди зацікавлені в вимірах щодо малої кількості проб, обраних із набагато більшої кількості потенційних проб. Таким чином, отримані дані представляють вибірку з набагато більшою сукупності даних. Ми використовуємо наші вибіркові дані для оцінки характеристик відповідної сукупності даних, з яких зроблена вибірка.

Опис розподілу даних

Аналітику доручили визначити концентрацію холестеролу в упаковці спреду з низьким вмістом жиру. Аналітик взяв з упаковки десять проб і визначив концентрацію холестеролу в кожній пробі. Результати дослідження представлені в табл. 3.3.

Таблиця 3.3. Результати визначення холестеролу

Холестерол	мг/100 г
271,4	268,4
267,8	269,6
268,7	272,5
269,6	270,1
269,7	268,6

Ці десять результатів є вибіркою з великої за об'ємом сукупністю даних, оскільки теоретично аналітик міг би відібрати з упаковки спреду з низьким вмістом жиру набагато більше проб. Через неминучі випадкові похибки

результати повторних вимірів завжди відрізняються один від одного. На рис. 5.11 представлена частотна діаграма (гістограма) даних. Стовпці уздовж горизонтальної осі представляють діапазон результатів, а по вертикальній осі відкладають частоти, з якими результати з'являються в кожному діапазоні (стовпці).

Аналітика можуть зацікавити три оцінки, які можна зробити на підставі даних, представлених на рис. 3.11, а саме:

- оцінка дійсної величини параметра, що вимірюється (тобто реальній концентрації холестеролу в упаковці спреду);
- оцінка розкиду результатів (тобто наскільки різняться результати окремих вимірювань);
- оцінка розбіжності оціночних значень істинних величин для різних наборів даних.

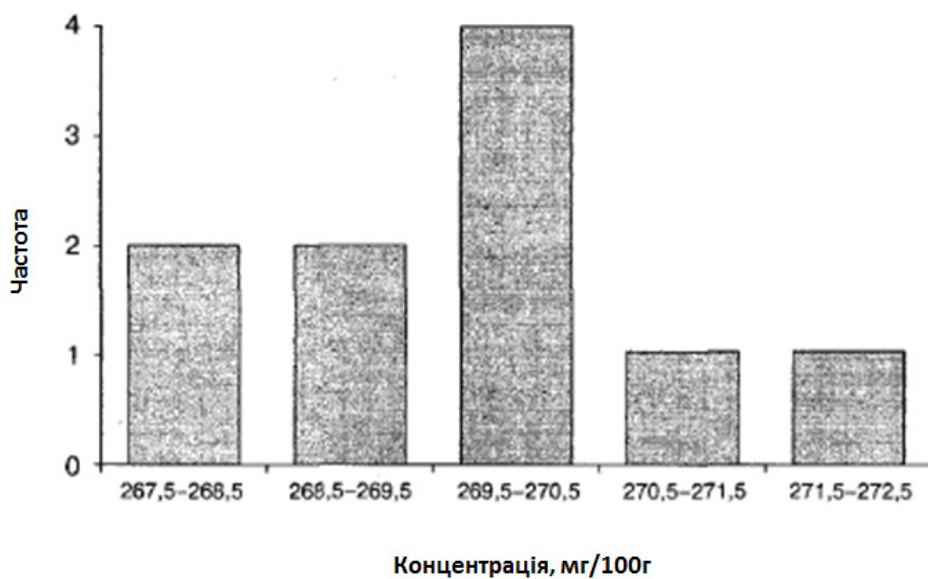


Рис. 3.11. Частотна діаграма (гістограма) даних, представлених в табл. 5.3

На рис. 3.12 представлена частотна діаграма для більшої вибірки даних (1000 експериментальних точок), яка була побудована виходячи з набору даних, представлених в табл. 3.3, за допомогою комп'ютерної програми.

При великому об'ємі вибірки гістограма представляє набагато чіткішу картину розподілу даних. Потрібно звернути увагу, що результати сконцентровані в центральній частині гістограми, а розподіл є приблизно симетричним. Нарешті, для дуже великого масиву даних і великої кількості стовпців, як показано на рис. 3.13, чітко проявляється форма генеральної сукупності.

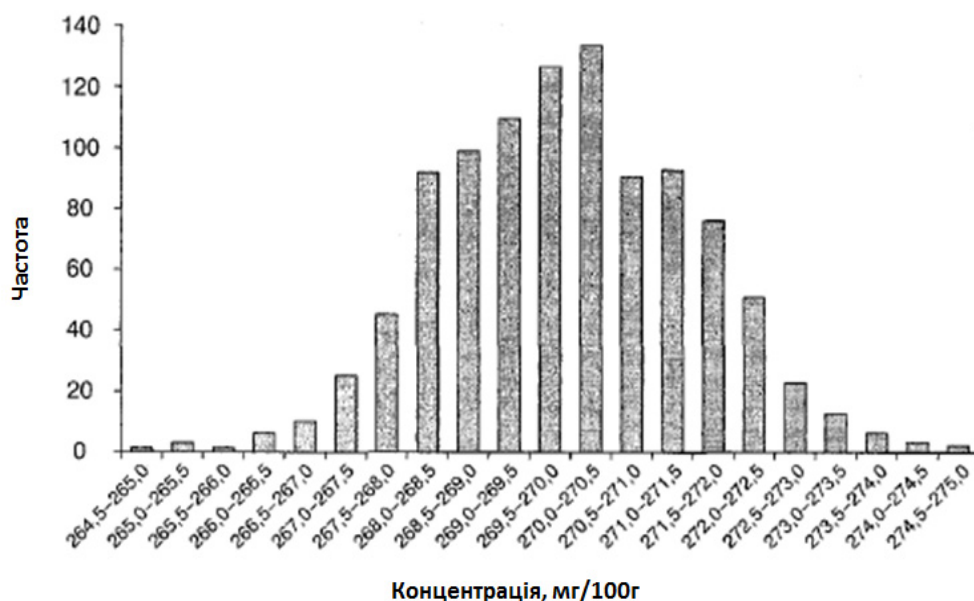


Рис 3.12. Розподіл набору даних, імітованих на підставі даних, представлених у табл. 5.3

Тепер, коли сукупність даних обмежена плавною кривою, ми можемо, в принципі, визначити рівняння цієї кривої. Розподіл, представлений на рис. 3.13, називають «нормальним розподілом».

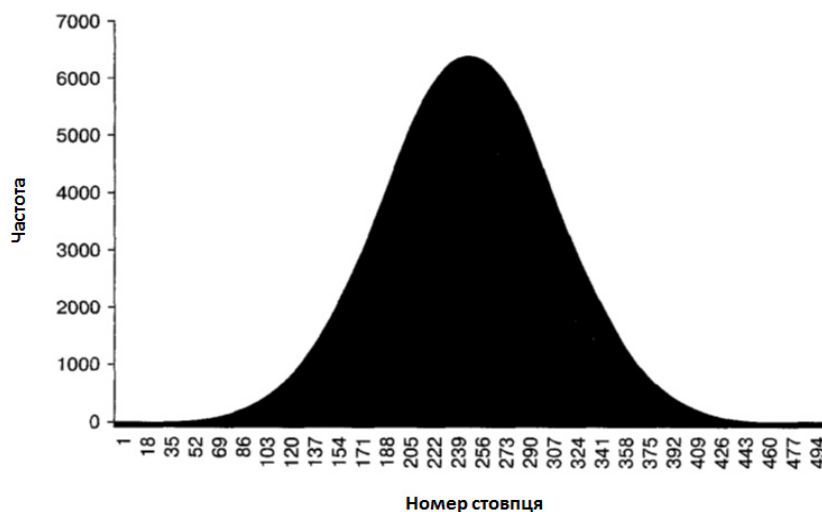


Рис. 3.13. Ілюстрація нормального розподілу даних

Нормальний розподіл описує звичайну картину розподілу результатів вимірювань. Цей тип розподілу даних називають також розподілом Гаусса. Більшість результатів вимірювань, багаторазово повторених, укладаються в розподіл Гаусса. При нормальному розподілі більшість результатів

групується біля центрального значення, кількість результатів убуває з видаленням від центру. Розподіл існує в нескінченному інтервалі, і значення можуть виявитися на вельми великій відстані від центру, хоча ймовірність цього дуже мала.

Сукупність даних з нормальним розподілом можна охарактеризувати двома параметрами. Центр розподілу одиниць сукупності характеризує параметр μ , а розкид значення характеризує параметр σ , як показано графічно на рис. 3.14. Параметр μ називають середнім генеральної сукупності, а σ – стандартним відхиленням генеральної сукупності.

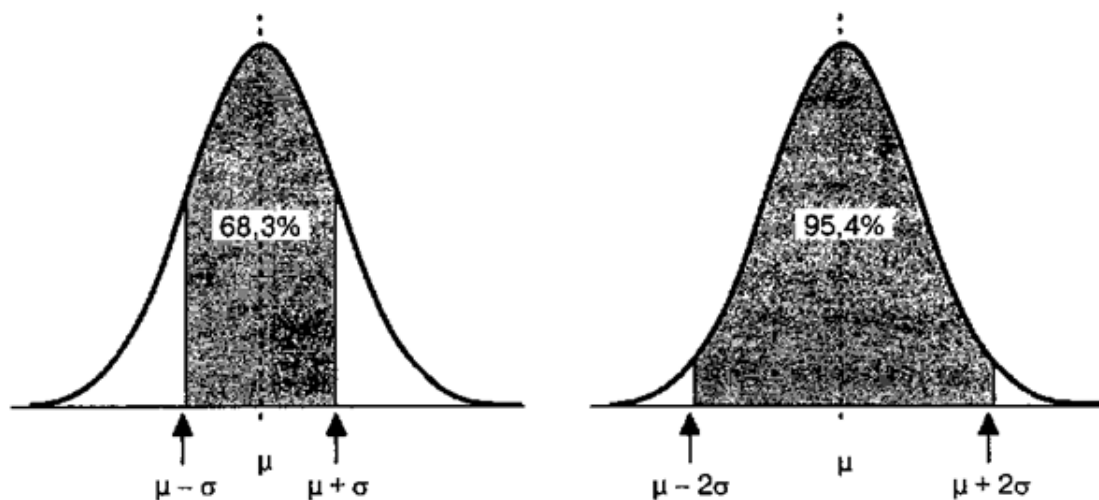


Рис. 3.14. Площі під кривою нормального розподілу

При нормальному розподілі даних 68,3 % значень потрапляють в інтервал ± 1 стандартне відхилення від середнього, а 95,4 % значень знаходяться в інтервалі ± 2 стандартних відхилення від середнього, як показано на рис. 5.14.

Крім того, 99,7 % значень потрапляють в інтервал ± 3 стандартних відхилення від середнього. Таким чином, майже всі значення при нормальному розподілі потрапляють в інтервал ± 3 стандартних відхилення від середнього.

Основні розрахунки

Аналітики зазвичай працюють з вибіркою з більшої сукупності даних. До вибірки вдаються для оцінки характеристик генеральної сукупності, таких як середнє і стандартне відхилення.

А. Середнє

Середнє арифметичне вибірки, x , що включає n експериментальних точок, визначають за формулою:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Якщо вибірка є випадковою, то $\bar{x}$ є найкращою оцінкою середнього генеральної сукупності μ :

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N}$$

де N – кількість експериментальних точок в генеральній сукупності.

Б. Дисперсія

Дисперсія генеральної сукупності, σ^2 є середньоквадратичне відхилення кожного значення від середнього генеральної сукупності:

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}{N}$$

Дисперсія вибірки, s^2 , дорівнює:

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$$

В. Стандартне відхилення

Стандартне відхилення являє собою *квадратний корінь* з дисперсії. Стандартне відхилення сукупності розраховують за формулою:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2}{N}}$$

в той час як стандартне відхилення вибірки розраховують за формулою:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Стандартне відхилення вибірки, s , дозволяє оцінити стандартне відхилення сукупності, σ . Величину $(n - 1)$ в рівняннях часто називають *числом ступенів свободи*, яке в статистичних таблицях часто позначають грецькою буквою ν . За цією величиною роблять висновок про надійність статистичних оцінок, таких як величина стандартного відхилення. Число

ступенів свободи – це число експериментальних точок (n) за вирахуванням числа параметрів, які використані для оцінки даних. У випадку стандартного відхилення вибірки, наприклад, $\nu = n - 1$, оскільки середнє значення, яким скористалися при обчисленні s вже було розраховано з тих же даних.

Г. Відносне стандартне відхилення і коефіцієнт варіації

Найчастіше користуються відносними оцінками розкиду даних, особливо у випадках, коли, наприклад, розкид результатів зростає при підвищенні концентрації аналіту. Відносне стандартне відхилення (RSD) є мірою розкиду даних в порівнянні з середньою величиною по масиву даних:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}}$$

Відносне стандартне відхилення відомо також як коефіцієнт варіації (CV). Величину RSD часто висловлюють у відсотках:

$$\%RSD = \%CV = 100 \times \frac{s}{\bar{x}}$$

Д. Стандартне відхилення середнього

При певному постійному розкиді даних (стандартне відхилення, s), у міру збільшення масиву даних, наша впевненість в оцінці середньої величини $\bar{X}$, що є точним поданням середнього по сукупності, μ , зростає.

У міру збільшення кількості спостережень, n , в кожній вибірці, стандартне відхилення середніх значень зменшується. Це показано на рис. 3.15.

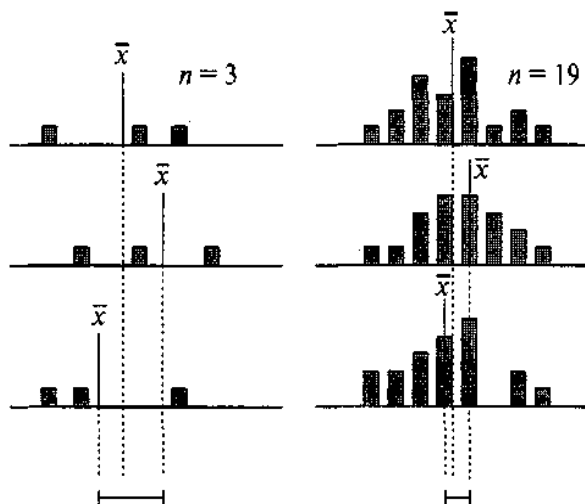


Рис. 3.15. Зменшення дисперсії середніх значень при збільшенні обсягу вибірки n

Стандартне відхилення середнього, $s(\bar{x})$, являє собою оцінку дисперсії середніх величин:

$$s(\bar{x}) = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

де S – стандартне відхилення вибірки, а n – кількість експериментальних точок у вибірці

Е. Довірчий інтервал для середнього

Довірчий інтервал позначає інтервал значень, в який з певним рівнем достовірності потрапляє істинне середнє. Його розраховують шляхом множення стандартного відхилення середнього на відповідне значення

$t_{(v, \alpha)}$

$$\bar{x} \pm t_{(v, \alpha)} \times \frac{s}{\sqrt{n}}$$

де $t_{(v, \alpha)}$ – є t-критерій Стюдента, взятий зі статистичних таблиць (таблиця значень t-критерію Стюдента подано в Додатку 2). Відповідна величина t залежить від $(n - 1)$, тобто кількості ступенів свободи і від необхідного рівня вірогідності. У багатьох статистичних таблицях рівень вірогідності представлений через α – ймовірність попадання величини за межі вказаного інтервалу. Рівень вірогідності, виражений у відсотках, дорівнює $100 \times (1 - \alpha)$. Наприклад, для 95 % достовірності, α дорівнює 0,05.

Крім того, використовується поняття «рівень значущості». Це величина, виражена у відсотках: 95 % рівень вірогідності відповідає 5 % рівнем значущості. Якщо відомий довірчий інтервал, то можемо сказати: «Частка випадків збігу середнього, що досліджується з істинним середнім в межах зазначеного інтервалу дорівнює $(1 - \alpha)$ ». Точно також, частка випадків випадання середнього за межу зазначеного інтервалу за аналогічних експериментів дорівнює α .

Питання для обговорення та самоперевірки:

1. Організація системи управління якістю в лабораторії:
 - роль персоналу у системі управління якістю;
 - розроблення плану перевірки компетентності персоналу;
 - послідовність дій щодо оцінювання та підтримання компетенції персоналу;
 - аналіз потенційних проблем із замовниками;
 - методи вимірювання задоволеності.
2. Кількість проб і розмір проби:
 - невизначеність відбору проби, кількість первинних проб.
3. Відбір субпроби:
 - методика відбору субпроби.
4. Важливість правильної пробопідготовки і зберігання проб.

5. Робочі характеристики методик, які використовуються.
6. Робочі характеристики вибраних методик для визначення аналітів:
 - розділення тонкошаровою хроматографією;
 - розділення газовою або рідинною хроматографією.
7. Причини неправильних аналітичних результатів.
8. Розрахунок правильності зміщення.
9. Перевірка лінійності.
10. Проведення метрологічної простежуваності:
 - зразки порівняння;
 - хімічні стандарти.
12. Запис розподілення даних.
13. Стандартне відхилення.
14. Відносне стандартне відхилення.
15. Вірогідний інтервал для середнього.
16. Застосування статистичних методів у програмах перевірки кваліфікації лабораторії.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Загальні вимоги до компетентності випробувальних та калібрувальних лабораторій: ДСТУ ISO/IEC 17025:2006. [Введ. в дію 27 грудня 2006 р.]. К.: Держспоживстандарт України, 2007. 26 с.
2. Медичні лабораторії. Вимоги до якості та компетентності: ДСТУ EN ISO 15189:2015. [Введ. в дію 01 січня 2016 р.]. К.: Держспоживстандарт України, 2016. 20 с.
3. Одноралов В. М. Калібрування та повірка засобів вимірювальної техніки: відмінності та збіжності. *Метрологія*. 2014. 49–52.
4. Причард Э., Барвик В. Контроль качества в аналитической химии: перевод с англ. языка; под ред И. В. Болдырева. СПб.: ЦОП «Профессия», 2012. 320 с.
5. Системи управління якістю. Вимоги: ДСТУ ISO 9001:2015 (ISO 9001:2015, IDT). [Введ. в дію 31 грудня 2015 р.]. К.: ДП «УкрНДНЦ», 2016. 22 с.
6. Системи управління якістю. Основні положення та словник термінів: ДСТУ ISO 9000:2015 (ISO 9000:2015, IDT). [Введ. в дію 12 грудня 2015 р.]. К.: ДП «УкрНДНЦ», 2016. 45 с.
7. Суліма Л. О. Вимоги до керівництва медичних лабораторій згідно міжнародного стандарту ISO 15189:2003. *Збірн. наук. пр. ОДАТРЯ*. 2013. № 1(2). 37–40.
8. Томчук В. А., Грищенко В. А., Цвіліховський В. І. Ветеринарна біохімія: навч. посіб. К.: Прінтеко, 2021. 2-ге вид. 552 с.
9. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results Part 1: General Principles and Definitions, ISO 5725-1:1994, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 1994.
10. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. Part 2: Basic Method for the Determination of Repeatability and Reproducibility of a Standard Measurement Method, ISO 5725-2:1994, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 1994.
11. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. Part 3: Intermediate Measures of the Precision of a Standard Measurement Method, ISO 5725-3:1994, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 1994.
12. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. Part 4: Basic Methods for the Determination of the Trueness of a Standard Measurement Method, ISO 5725-4:1994, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 1994.
13. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results – Part 5: Alternative Methods for the Determination of the Precision of a Standard Measurement Method, ISO 5725-5:1998, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 1998.

14. Miller, J. N. and Miller, J. M., Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry, 5th Edition, ISBN 0-13-129192-0, Pearson Education Ltd, Harlow, UK, 2005.
15. Sargent, M. and Holcombe, G., VAM Bull, Iss. 34, 19-23. 2006. [<http://www.nmschembio.org.uk>] (accessed 8 November, 2007).
16. Statistical Methods for Use in Proficiency Testing by Interlaboratory Comparisons, ISO 13528:2005, International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 2005.

ДОДАТКИ

МІЖНАРОДНА СИСТЕМА ОДИНИЦЬ ФІЗИЧНИХ ВЕЛИЧИН

Міжурядова генеральна конференція з мір та вагів прийняла таку систему, з 1960 р. уточнювала її і дала назву *System International unites* (Міжнародна система одиниць) з міжнародним скороченням SI (українською мовою – CI).

Українські та міжнародні позначення для одиниць фізичних величин подані відповідно до таких державних стандартів України: ДСТУ 3651.0-97. Метрологія. Одиниці фізичних величин Міжнародної системи одиниць. Основні положення, назви та позначення. ДСТУ 3651.2-97. Метрологія. Одиниці фізичних величин. Фізичні сталі та характеристичні числа. Основні положення, назви та значення.

Фізико-хімічні сталі

Назва величини	Позначення	Рівняння	Значення величини
Швидкість світла у вакуумі	c	—	$2,99792458 \cdot 10^8$ м/с
Прискорення вільного падіння (стандартне значення)	g	—	$9,80665$ м/с ²
Стала Планка	h	—	$6,626176 \cdot 10^{-34}$ Дж·с
Елементарний електричний заряд	e	—	$1,6021892 \cdot 10^{-19}$ Кл
Маса спокою електрона	m_e	—	$9,109534 \cdot 10^{-31}$ кг = $5,4858026104$ а.о.м.
Енергія спокою електрона	—	$m_e c^2$	$0,5110034$ MeV = $8,18724110^{-14}$ Дж
Маса спокою протона	m_p	—	$1,6726485 \cdot 10^{-27}$ кг = $1,007276470$ а.о.м.
Енергія спокою протона	—	$m_p c^2$	$938,2796$ MeV = $1,503302 \cdot 10^{-10}$ Дж
Атомна одиниця маси	а.о.м.	$m(12C)/12$	$1,6605655 \cdot 10^{-27}$ кг
Маса спокою атома водню (¹ H)	m_H	—	$1,67355948 \cdot 10^{-27}$ кг = $1,007825036$ а.о.м.
Число Авогадро	N_A	—	$6,022045 \cdot 10^{23}$ моль ⁻¹

Число Фарадея	F	NAe	$9,648456 \cdot 10^4$ Кл/моль
Стала Больцмана	k	–	$1,380662 \cdot 10^{-23}$ Дж/К
Універсальна газова стала	R	kNA	$8,31441$ Дж/(моль·К)
Молярний об'єм ідеального газу за нормальних умов ($T = 273,15$ К, $p = 101325$ Па)	V_H	RT/p	$22,41383 \cdot 10^3$ м ³ /моль
Абсолютний нуль температури	–	–	$-273,15$ °C
Атмосфера нормальна	–	–	101325 Па

**Префікси для позначення похідних одиниць метричних систем,
кратних і часткових головній одиниці**

Префікс	Множник	Скорочене позначення		Префікс	Множник	Скорочене позначення	
		укр.	міжнар.			укр.	міжнар.
дека	10	да	da	деци	10^{-1}	д	d
гекто	10^2	г	h	санти	10^{-2}	с	c
кіло	10^3	до	до	мілі	10^{-3}	м	m
мега	10^6	М	M	мікро	10^{-6}	мк	μ
гіга	10^9	Г	G	нано	10^{-9}	н	n
тера	10^{12}	Т	T	піко	10^{-12}	п	p
пета	10^{15}	П	P	фемто	10^{-15}	ф	f
екса	10^{18}	Е	E	атто	10^{-18}	а	a

Одиниці молекулярної фізики

Величина	Символ	Позначення одиниці		Розмірність у СІ
		укр.	міжнародне	
Ат. н.	Z	1	1	1
Відносна ат. м.	A_r	1	1	1
Відносна мол. м.	M_r	1	1	1
Молярна маса	M	кг/моль	kg/mol	кг/моль
Молярний об'єм	V_m	дм ³ /моль	dm ³ /mol	дм ³ /моль
Об'ємна концентрація молекул або частинок	n	м ⁻³	m ⁻³	м ⁻³
Масова концентрація речовини	ρ	кг/дм ³	kg/dm ³	кг/дм ³
Молярна концентрація речовини	c	моль/дм ³	mol/dm ³	моль/дм ³
Молярність	b, m	моль/кг	mol/kg	моль/кг
Густина	ρ	кг/дм ³	kg/dm ³	кг/дм ³
Коефіцієнт дифузії	D	м ² /с	m ² /s	м ² /с

Одиниці вимірювання і розмірності деяких фізичних величин

Величина	Одиниця			
	Найменування	укр.	міжнар.	символ
Довжина	метр	м	m	L
Маса	кілограм	кг	kg	M
Час	секунда	с	s	T
Сила електричного струму	ампер	A	A	I
Кількість речовини	моль	моль	mol	N

Таблиця розчинності солей, основ та кислот у воді

Аніони	Катіони																			
	H ⁺	K ⁺	Na ⁺	NH ₄ ⁺	Ba ²⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	Cr ³⁺	Fe ²⁺	Fe ³⁺	Ni ²⁺	Mn ²⁺	Zn ²⁺	Ag ⁺	Hg ²⁺	Cu ²⁺	Pb ²⁺	Sn ²⁺	
OH ⁻		р	р	р	р	м	н	н	н	н	н	н	н	н	-	-	н	н	н	н
Cl ⁻	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	н	р	р	м	р	р
Br ⁻	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	н	м	р	м	р	р
I ⁻	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	-	р	р	р	н	н	-	н	н	м
S ²⁻	р	р	р	р	р	м	м	-	-	н	-	н	н	н	н	н	н	н	н	н
SO ₃ ²⁻	р	р	р	р	н	н	н	-	-	н	-	н	н	н	н	-	-	н	-	-
SO ₄ ²⁻	р	р	р	р	н	м	р	р	р	р	р	р	р	р	м	р	р	н	н	р
PO ₄ ³⁻	р	р	р	р	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	н	-	н	н	н
CO ₃ ²⁻	р	р	р	р	н	н	н	-	-	н	-	-	н	н	н	н	н	н	н	-
SiO ₃ ²⁻	н	р	р	-	н	н	н	н	-	н	н	-	н	н	-	-	н	н	н	-
NO ₃ ⁻	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р	р
CH ₃ COO ⁻	р	р	р	р	р	р	р	-	р	р	-	р	р	р	м	р	р	р	р	р

Примітка. Р – розчиняється, М – мало розчиняється, Н – не розчиняється, **риска** – сполука розкладається водою або не існує.

Дія основних характерних реактивів на катіони І групи

Реактиви	Катіони			
	K ⁺	Na ⁺	Mg ⁺	NH ₄ ⁺
Натрію гексанітро кобальтат (III) Na ₃ [Co(NO ₂) ₆]	Жовтий кристалічний осад K ₂ Na·[Co(NO ₂) ₆]	Немає осаду	Немає осаду	Жовтий кристалічний осад (NH ₄) ₂ Na·[Co(NO ₂) ₆]
Натрію гідротартрат NaHC ₄ H ₄ O ₆	Білий кристалічний осад KHC ₄ H ₄ O ₆	Немає осаду	Немає осаду	Білий кристалічний осад NH ₄ HC ₄ H ₄ O ₆
Калію дигідроантимонат KH ₂ SbO ₄	Немає осаду	Білий кристалічний осад NaH ₂ SbO ₄	Білий кристалічний осад Mg·(H ₂ SbO ₄) ₂	Білий аморфний осад HSbO ₃
Ацетат ураніл UO ₂ (CH ₃ COO) ₂	Немає осаду	Жовтий кристалічний осад NaUO ₂ ·(CH ₃ COO) ₃	Немає осаду	Немає осаду
Натрію гідрофосфат Na ₂ HPO ₄ в присутності NH ₃ ·H ₂ O, NH ₄ Cl	Немає осаду	Немає осаду	Білий кристалічний осад MgNH ₄ PO ₄ · 6H ₂ O	Немає осаду
Калію гідрооксид КОН або натрію гідрооксид NaOH	-	-	Білий аморфний осад Mg(OH) ₂	Газ NH ₃
Реактив Несслера K ₂ [HgI ₄] і КОН	Немає осаду	Немає осаду	Немає осаду	Червоно-бурий осад [Hg ₂ I ₂ NH ₄]I
Забарвлення полум'я	Світло-фіолетове	Жовте	Не забарвлює	Не забарвлює

Дія основних реактивів на катіони II групи

Катіони	Реактиви			
	$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	K_2CrO_4	$(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$	H_2SO_4
Ba^{2+}	Осад білого кольору BaCO_3 розчиняється в HCl або HNO_3 і в CH_3COOH	Осад жовтого кольору BaCrO_4 ; розчиняється в HCl або HNO_3 і не розчиняється в CH_3COOH	Осад білого кольору BaC_2O_4 ; розчиняється в HCl або HNO_3 і в CH_3COOH при нагріванні	Дрібні кристали BaSO_4 (під мікроскопом)
Ca^{2+}	Осад білого кольору CaCO_3 ; розчиняється в HCl або HNO_3 і в CH_3COOH	Немає осаду	Осад білого кольору CaC_2O_4 розчиняється в HCl або HNO_3 і не розчиняється в CH_3COOH при нагріванні	Великі кристали в вигляді голки $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ під мікроскопом

Дія найважливіших реактивів на катіони III аналітичної групи (Al^{3+} , Cr^{3+} , Fe^{3+} , Fe^{2+})

Реактив	Катіони (умови проведення реакції і властивості продуктів реакції)			
	Al^{3+}	Cr^{3+}	Fe^{3+}	Fe^{2+}
$(\text{NH}_4)_2\text{S}$	3 нейтрального або слабколужного розчину білий осад $\text{Al}(\text{OH})_3$. Розчиняється в розведених кислотах і лугах	3 нейтрального або слабколужного розчину сіро – зелений осад $\text{Cr}(\text{OH})_3$. Розчиняється в розведених кислотах і лугах	3 нейтрального або слабколужного розчину чорний осад Fe_2S_3 . Розчиняється в розведених кислотах.	3 нейтрального або слабколужного розчину чорний осад FeS . Розчиняється в розведених кислотах.
H_2S	-	-	Fe^{3+} відновлюється до Fe^{2+}	-
NaOH KOH	Білий осад $\text{Al}(\text{OH})_3$. розчиняється в надлишку реактиву, при цьому утворюється NaAlO_2 . При нагріванні з NH_4Cl знову осаджується $\text{Al}(\text{OH})_3$	Сіро-зелений осад $\text{Cr}(\text{OH})_3$. Розчиняється в надлишку реактиву, при цьому утворюється NaCrO_2 . При розведенні розчину водою і кип'ятінні знову осаджується $\text{Cr}(\text{OH})_3$. Сіро-зелений осад $\text{Cr}(\text{OH})_3$	Буро-червоний осад $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Розчиняється в розведених кислотах, не розчиняється в надлишку реактиву	Білий осад $\text{Fe}(\text{OH})_2$ на повітрі зеленіє, потім буріє. Розчиняється в кислотах.
NH_4OH	Білий осад $\text{Al}(\text{OH})_3$	Сіро-зелений осад $\text{Cr}(\text{OH})_3$	Буро-червоний осад $\text{Fe}(\text{OH})_3$	Білий осад $\text{Fe}(\text{OH})_2$
CH_3COO	При нагріванні білий осад основної солі. - Розчиняється в	Осаджується лише в присутності Al^{3+} Fe^{3+}	На холоді має червоне забарвлення, при нагріванні- буро-	-

Реактив	Катіони (умови проведення реакції і властивості продуктів реакції)			
	Al^{3+}	Cr^{3+}	Fe^{3+}	Fe^{2+}
	розведених кислотах і лугах.		червоний осад основної солі	
Na_2CO_3 K_2CO_3	Білий осад $\text{Al}(\text{OH})_3$	Сіро-зелений (іноді фіолетовий) осад $\text{Cr}(\text{OH})_3$	Буро-червоний осад основної солі	Білий осад на повітрі буріє
$(\text{NH}_4)\text{CO}_3$	Білий осад	Сіро-зелений (іноді фіолетовий) осад	Буро-червоний осад основної солі	Білий осад
Na_2HPO_4	Білий осад AlPO_4 Не розчиняється в оцтовій кислоті, розчиняється в мінеральних кислотах і лугах.	Сіро-зелений (іноді фіолетовий) осад CrPO_4 . Не розчиняється в оцтовій кислоті, розчиняється в мінеральних кислотах і лугах.	Жовтий-білий осад FePO_4 . Не розчиняється в оцтовій кислоті, розчиняється в мінеральних кислотах і лугах.	Білий осад $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$. Розчиняється в кислотах (мінеральних і оцтовій)
$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	-	-	Синій осад (берлінська лазур) $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ не розчиняється в HCl	Білий осад $\text{K}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ і $\text{K}_2\text{Fe}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. На повітрі внаслідок окиснення осад синіє
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	-	-	Розчин забарвлюється в бурій колір внаслідок утворення $\text{K}[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	Темно-синій осад (турбульова синь). $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ Не розчиняється в HCl
NH_4SCN або KSCN	-	-	В результаті утворення феруму роданіду $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ розчин забарвлюється в червоний колір	-

Реактив	Катіони (умови проведення реакції і властивості продуктів реакції)			
	Al^{3+}	Cr^{3+}	Fe^{3+}	Fe^{2+}
Реакції окиснення	-	Окислювачі переводять іон Cr^{3+} CrO_4^{2-} у лужному, а в $\text{Cr}_2\frac{2}{7}$ у кислому середовищі. Окиснювачі в лужному середовищі: а) хлорна і бромна вода б) H_2O_2 і Na_2O. У кислому середовищі: а) KMnO_4 б) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	-	Окислювачі переводять іон Fe^{2+} Fe^{3+} . У лужному середовищі - H_2O_2 і Na_2O та інші. У кислому середовищі – HNO_3 та інші.
Кристали $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ або $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$	-	Смарагдово-зелений колір	-	-

Дія найважливіших реактивів на катіони III аналітичної групи (Mn^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+})

Реактив	Катіони (умови проведення реакції і властивості продуктів реакції)			
	Mn^{2+}	Zn^{2+}	Co^{2+}	Ni^{2+}
$(\text{NH}_4)_2\text{S}$	З нейтрального або слабколужного розчину світло-рожевий осад MnS . Розчиняється в розведених кислотах.	З нейтрального або слабколужного розчину білий осад ZnS . Не розчиняється в оцтовій кислоті, але розчиняється в розведених мінеральних кислотах.	З нейтрального розчину чорний осад CoS . Не розчиняється на холоді в розведених кислотах, розчиняється при нагріванні в HNO_3 і царській горілці.	З нейтрального розчину чорний осад NiS . Не розчиняється на холоді в розведених кислотах, розчиняється при нагріванні в царській горілці.
H_2S	-	В оцтовокислому середовищі білий осад ZnS . Розчиняється в мінеральних кислотах.	-	-
NaOH КОН	Білий осад $\text{Mn}(\text{OH})_2$. На повітрі буріє і утворює $\text{MnO}(\text{OH})_2$. Розчиняється в кислотах	Білий осад $\text{Zn}(\text{OH})_2$. Розчиняється в кислотах і при надлишку реактиву, утворюючи при цьому ZnO^{2-}_2	Синій осад (при нагріванні рожевий) $\text{Zn}(\text{OH})_2$. На повітрі буріє. Розчиняється в розведених кислотах.	Зелений осад $\text{Ni}(\text{OH})_2$. Розчиняється в розведених кислотах.
NH_4OH	Білий осад $\text{Mn}(\text{OH})_2$	Білий осад $\text{Zn}(\text{OH})_2$. Розчиняється при надлишку NH_4OH .	Синій осад основної солі. Розчиняється при надлишку NH_4OH . На повітрі розчин червоніє	Зелений осад основної солі. Розчиняється при надлишку NH_4OH . Аміачний розчин синього кольору.
CH_3COO	-	-	-	-
Na_2CO_3 K_2CO_3	Білий осад MnCO_3	Білий осад основного карбонату. Розчиняється	Рожевий осад основної солі	Зелений осад

Реактив	Катіони (умови проведення реакції і властивості продуктів реакції)			
	Mn^{2+}	Zn^{2+}	Co^{2+}	Ni^{2+}
		в розведених кислотах і лугах і аміаку		
$(NH_4)CO_3$	Білий осад	Білий осад. Розчиняється в надлишку реактиву	Рожевий осад. Розчиняється в надлишку реактиву	Зелений осад. Розчиняється в надлишку реактиву
Na_2HPO_4	Білий осад $Mn_3(PO_4)_2$. Розчиняється в кислотах (мінеральній і оцтовій)	Білий осад $Zn_3(PO_4)_2$. Розчиняється в кислотах (мінеральних і оцтовій), в лугах і в аміаку	Фіолетовий осад $Co_3(PO_4)_2$. розчиняється в кислотах (мінеральних і оцтовій і аміаку)	Зелений осад $Ni_3(PO_4)_2$. Розчиняється в кислотах (мінеральних і оцтовій і в аміаку)
$K_4[Fe(CN)_6]$	Білий осад $Mn_2[Fe(CN)_6]$ Не розчиняється в HCl	Білий осад $Zn_2[Fe(CN)_6]$ I $Zn_3K_2[Fe(CN)_6]_2$ Не розчиняється в кислотах. Розчиняється в лугах	Зеленуватий осад $Co_2[Fe(CN)_6]$	Жовто-бурий осад $Ni_2[Fe(CN)_6]$. Не розчиняється в кислотах.
$K_3[Fe(CN)_6]$	Бурий осад $Mn_3[Fe(CN)_6]_2$	Коричнево-жовтий осад $Zn_3[Fe(CN)_6]_2$	Бурувато-червоний осад $Co_3[Fe(CN)_6]_2$	Жовто-бурий осад $Ni_3[Fe(CN)_6]_2$
NH_4SCN або $KSCN$	-	-	синє забарвлення спиртового шару, внаслідок екстракції комплексу $(NH_4)_2 [Co(SCN)_4]$	-
Реакції окиснення	Окиснювачі переводять у лужному середовищі іон Mn^{2+} у $MnO(OH)_2$, а в кислому	-	Окиснюється у лужному середовищі киснем повітря, хлорною і бромною водою. У кислому середовищі	Окиснюється тільки в лужному середовищі хлорною або бромною водою. При окисненні у $Ni(OH)_3$ чорного

Реактив	Катіони (умови проведення реакції і властивості продуктів реакції)			
	Mn^{2+}	Zn^{2+}	Co^{2+}	Ni^{2+}
	середовищі іон Mn^{2+} у MnO_4^- . Окиснювачі в лужному середовищі: а) хлорна і бромна вода; б) H_2O_2 і Na_2O_2 ; в) $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$. У кислому середовищі: а) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ в присутності іона Ag^+ ; б) PbO_2 ; в) NaBiO_3		окиснюється: а) дією KNO_2 з утворенням $\text{K}_3[\text{Co}(\text{NO}_2)_6]$; б) дією α -нітрозо- β нафтолу з утворенням осаду $[\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NOO}]_3\text{Co}$	кольору
Кристали $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ або $\text{NaNH}_4\text{HPO}_4$	-	-	Синій колір	Червоно-коричневий колір

Дія найважливіших реактивів на іони V аналітичної групи

Реактив	Іони і властивості продуктів реакції					
	As (III)	As(V)	Sb(III)	Sb(V)	Sn(III)	Sn(IV)
H ₂ S у присутності HCl	Жовтий осад As ₂ S ₂ . Не розчиняється в HCl.	Жовтий осад суміші As ₂ S ₅ .(S). Швидко осаджується з розчинів, нагрітих до температури 70-80C. Осад розчиняються (NH ₄) ₂ S і (NH ₄) ₂ S ₂ , з утворенням у першому випадку суміші (NH ₄) ₃ AsS ₃ і (NH ₄) ₃ AsS ₄ , у другому - (NH ₄) ₃ AsS ₄ .	Оранжевий осад Sb ₂ S ₃ . розчиняється в (NH ₄) ₂ S і (NH ₄) ₂ S ₂ , утворюючи відповідні тіосоли: (NH ₄) ₃ SbS ₃ і (NH ₄) ₃ SbS ₄ . при підкисленні тіосолей до кислої реакції вони руйнуються, утворюючи відповідно осад Sb ₂ S ₃ і Sb ₂ S ₅ . Обидва осад розчиняються в (NH ₄) ₂ CO ₃ ; при цьому утворюються суміші тіо-	Оранжевий осад Sb ₂ S ₃ . розчиняється в (NH ₄) ₂ S і (NH ₄) ₂ S ₂ , утворюючи відповідні тіосоли: (NH ₄) ₃ SbS ₃ . При підкисленні до кислої реакції тіосіль руйнуються і утворюються осад Sb ₂ S ₅ . Осад розчиняються в концентрованій HCl і не розчиняються в (NH ₄) ₂ CO ₃	Бурий осад SnS. Не розчиняється в (NH ₄) ₂ S, розчиняється в (NH ₄) ₂ S ₂ , утворюючи тіосіль (NH ₄) ₂ SnS ₃ . При підкисленні до кислої реакції тіосіль руйнуються і утворюються осад SnS ₂ . Осад розчиняється в концентрованій HCl і не розчиняється в (NH ₄) ₂ CO ₃	Жовтий осад SnS ₂ розчиняється в (NH ₄) ₂ S і (NH ₄) ₂ S ₂ , утворюючи відповідно (NH ₄) ₂ S та SnS ₃ . При підкисленні до кислої реакції тіосіль руйнується і утворюється осад SnS ₂ . Осад розчиняється в концентрованій HCl, не розчиняється в (NH ₄) ₂ CO ₃ .

Реактив	Іони і властивості продуктів реакції					
	As (III)	As(V)	Sb(III)	Sb(V)	Sn(III)	Sn(IV)
	При підкисленні тіо-солей до кислоти реакції в першому випадку випадає осад As_2S_3 , у другому As_2S_5 . обидва осад розчиняється в конц. HNO_3 .	і оксосолей. При підкисленні тіосолей до кислоти реакції випадають осад As_2S_3 і As_2S_5 . Обидва сульфіді розчиняються в конц. HNO_3 .	розчиняються в $(NH_4)_2CO_3$			
H_2O	-	-	Білий осад SbO_2Cl . Розчиняється у винній кислоті	Білий осад SbO_2Cl . Розчиняється у винній кислоті	Білий осад основних солей	Білий осад основних солей
$Na_2S_2O_3$ (в кислому розчинні)	Жовтий осад As_2S_3	Жовтий осад	Оранжевий осад Sb_2S_3	Оранжевий осад Sb_2S_5	Бурий осад SnS	Жовтий осад SnS_2
KOH , $NaOH$, K_2CO_3 , Na_2CO_3 , NH_4OH	-	-	Білий осад $HSbO_2$. Розчиняється в HCl та KOH	Білий осад $HSbO_3$. Розчиняється в HCl та KOH	Білий осад $Sn(OH)_2$. Розчиняється в HCl та KOH	Білий осад $Sn(OH)_4$. Розчиняється в HCl та KOH
Fe метал. в присутності HCl	-	-	Чорний осад Sb	Чорний осад Sb	-	Відновлюється до $Sn(II)$

Реактив	Іони і властивості продуктів реакції				
	As (III)	As(V)	Sb(III)	Sb(V)	Sn(III) Sn(IV)
Hg ₂ Cl ₂	-	-	-	-	Білий осад Hg ₂ Cl ₂ -
Солі віс муту (III) в лужному середовищі	-	-	-	-	Чорний осад Bi -
AgNO ₃	Жовтий осад Ag ₃ AsO ₃ . Розчиняється в кислотах	Коричневий осад Ag ₃ AsO ₄ . Розчиняється в кислотах	-	-	Чорний осад Ag (реакція в лужному середовищі) -
MgCl ₂ в присутності NH ₄ OH, NH ₄ Cl	-	Білий осад MgNH ₄ AsO ₄ Розчиняється в кислотах	-	-	-
(NH ₄) ₂ MoO ₄ в присут- ності HNO ₃	-	Жовтий осад (NH ₄) ₂ [As (Mo ₃ O ₁₀) ₄]. Роз- ся в аміаку	-	-	-

Ензими-маркери субклітинних фракцій

Фракції		Маркерний ензим
Плазматична мембрана	Базолатеральна	Аденілатциклаза Na^+, K^+ -АТФаза
	Апікальна	5'-нуклеотидаза γ -Глутамилтранспептидаза
Ендоплазматичний ретикулум	-	Глюкозо-6-фосфатаза Епоксидгідролаза
Апарат Гольджи	Транс-область	Галактозилтрансфераза НАДН-фосфатаза
Мітохондрії	Внутрішня мембрана	Сукцинатдегідрогеназа Цитохромоксидаза
	Зовнішня мембрана	Моноамінооксидаза
Лізосоми	-	Кисла фосфатаза
Пероксисоми	-	Каталаза
Цитозоль	-	Лактатдегідрогеназа

Зміна активності ензимів сироватки крові у часі (зменшення на 10 %) порівняно з вихідним станом

Компоненти	Температура		
	20° С	4° С	-18° С
Амілаза	4 доби	5 міс	2 міс
Холінестераза	8 год	1 тиж	1 тиж
Глутаматдегідрогеназа	1 доба	7 діб	1 доба
Лактатдегідрогеназа	1 доба	1–2 доби	1–2 доби
Лужна фосфатаза	1 доба	2–3 доби	1 міс
Кисла фосфатаза	2–4 год	3 доби	3 доби
Креатинкіназа	12 год	3 доби	1 міс
γ -Глутамілтранспептидаза	2 доби	1 тиж	1 міс
Аспартатамінотрансфераза	8 год	3 доби	1 міс
Аланінамінотрансфераза	8 год	1 тиж	Нестабільна

Примітка. Потрібно пам'ятати! Не залежно від виду досліджень розморожена сироватка крові не може бути повторно замороженою.

9.1. Документування методики

Викладені нижче вимоги до змісту методики розроблені на підставі стандарту ISO 78-2. Також документ має включати нижчена-ведені розділи, кожна сторінка повинна бути пронумерована, слід вказати також загальну кількість сторінок і номер видання.

9.2. Список уточнень і переглядів методики

Призначення цього пункту подвійне. По-перше, він забезпечує можливість внесення невеликих змін до тексту методики без повного перегляду і передруку тексту методики. По-друге, лабораторії реко-мендовано періодично переглядати методику на предмет її відпо-відності заданій меті; записи ж свідчать про те, що перегляд був проведений. Список змін зазвичай поміщають перед описом методи-ки, безпосередньо під обкладинкою.

9.3. Уточнення

Рукописні зміни в тексті методики прийнятні за умови, що вони вже внесені в таблицю (форму таблиці представлено нижче, рукописні записи припустимі) і належним чином авторизовані. Авторизація включає той факт, що вплив змін на придатність методики вивчено, зміни не викликали проблем і внесені в усі примірники методики.

#	Розділ	Суть змін	Дата	Підпис
1 (напр.)	3.4	Зміна швидкості потоку до 1,2 см ³ /хв	8.02.2015	Петренко І.П.

9.4. Перегляд

Методику рекомендовано передивлятися кожні два роки.

Дата перегляду	Результат перегляду	Дата наступного перегляду	Підпис

9.5. Заголовок

Переважний формат: визначення А (аналіту або речовини, яку шукають) у присутності В (речовини, яка заважає) в С (матриці) за допомогою D (методу).

9.6. Міри безпеки

Детальний опис заходів безпеки, існуючих загроз та необхідності дотримання пересторог повинно бути винесено у даний розділ. Включити графу «відомості відсутні».

Включити відповідні запобіжні заходи, пов'язані з:

- підготовкою проб;

- проведенням аналізу або приготуванням розчинників, реактивів, стандартів або інших матеріалів;
- експлуатацією обладнання;
- вимогами до спеціального обладнання, наприклад, до витяжних шаф;
- наслідками збільшення масштабів експерименту (межа вибухонебезпечності);
- правилами поводження з усіма матеріалами/обладнанням.

9.7. Межі застосування методу

Даний розділ дозволяє потенційному користувачеві швидко зрозуміти, чи є методика придатною для бажаного застосування. Необхідно описати такі деталі:

- аналіт (або аналіти), потенційно визначаються зазначеною методикою;
- форма, в якій визначають аналіт (аналіти) – похідні, загальні / доступні і т. д.;
- матриці проб, у складі яких "визначають аналіт (аналіти);
- діапазон концентрацій аналіту (аналітів), в яких застосовується зазначена методика;
- відомі впливи, що перешкоджають застосуванню методики або обмежують її застосування;
- обладнання, яке потрібно при реалізації методики;
- мінімальний розмір проби;
- питання, які необхідно погоджувати із замовником, наприклад, придатність методики для встановлення відповідності специфікаціям або нормативним вимогам.

9.8. Посилання на нормативні документи

Перерахуйте посилання на документи, відповідність яким є обо-в'язкове.

9.9. Визначення

Необхідно дати визначення всім нестандартним термінам; використовуйте визначення із стандартів ISO там, де це можливо. Цитуйте першоджерела. Приводьте приклади хімічних структур там, де це доречно.

9.10. Описання метод

Опишіть метод, який використаний у даній аналітичній методиці. Можливо, тут слід представити схему послідовності аналітичних операцій. У цьому розділі слід викласти коротку інформацію про те, як працює методика. Включіть пояснення принципу розрахунків. Там, де це необхідно для пояснення роботи методики або принципу розрахунків, включіть опис деталей відповідних хімічних реакцій (наприклад, там, де методика включає етап отримання похідних сполук або титрометричний аналіз).

Наприклад, «Концентрацію визначають за калібрувальним графіком, побудованим за 6 точками, шляхом знаходження концентрації, що відповідає величині абсорбції проби, скоригованої за значенням холостого сигналу, і помножене на значення коефіцієнту розведення».

9.11. Реактиви та матеріали

Перерахуйте всі реактиви, матеріали, речовини для холостих вимірювань, зразки для Контролю якості (КЯ), стандарти і CRM, необхідні для аналітичного процесу; пронумеруйте їх для подальших посилань. Включіть в список наступну інформацію:

- опис потенційних загроз та інструкції щодо поводження з матеріалом;
- ступінь чистоти реактивів;
- необхідність калібрування матеріалів КЯ (матеріалів, призначених для контролю якості) з різних товарних партій;
- подробиці приготування, включаючи необхідність попереднього приготування;
- вимоги до упаковки та зберігання.
- терміни зберігання сировини і готових реактивів.
- необхідну концентрацію (із зазначенням одиниць виміру).
- вимоги до маркування.

9.12. Прилади і обладнання

Опишіть в подробицях кожен прилад і елемент обладнання, порядок їх з'єднання для того, щоб схема вимірювання була чіткою і ясною. Перерахуйте мінімальні вимоги до робочих характеристик і вимоги до процедури верифікації, з перехресними посиланнями на розділ калібрування, і різні вказівки з експлуатації приладів. Пронумеруйте пункти для подальших посилань. Для скляного посуду вкажіть клас точності, де це необхідно (майте на увазі, що використання посуду певного класу точності може зажадати обґрунтувань і доказів відповідності). Включіть вимоги до безпеки навколишнього середовища (наявність витяжних шаф і т. д.). Для наочності можна прикласти схеми та діаграми.

9.13. Проби і пробовідбір

Даний розділ не ставить завдання описати процес складання плану відбору проб, який слід представити окремо в документації за планом відбору проб. Опишіть в подробицях, як отримують робочу частину проби з проби, доставленої в лабораторію. Включіть деталі, що відносяться до зберігання, підготовки та утилізації матеріалу проби.

9.14. Калібровка

Вкажіть критичні етапи аналітичного процесу, де необхідний ретельний контроль та калібрувальні операції. Дайте перехресні посилання на відповідні розділи, представлені вище. Включіть опис процесу калібрування обладнання: які прилади вимагають калібрування, як проводиться калібрування, які матеріали застосовують при калібруванні і як часто необхідно його проводити? Візьміть до уваги простежуваність калібрантів і вкажіть на обмеження, пов'язані з терміном зберігання калібрантів.

9.15. Контроль якості

Опишіть необхідні процедури контролю якості, частоту перевірок у рамках КЯ при аналізі товарної партії, критерії проходження контролю/вибраковування і дії в разі невідповідності результатів контролю. Дайте перехресні посилання на відповідні розділи, представлені вище.

9.16. Методика

Опишіть аналітичну методику, даючи перехресні посилання на відповідні розділи там, де це необхідно, включаючи пронумеровані реактиви, прилади та обладнання. Там, де вказані критично важливі для методики параметри процесів (час, температура і т. д.), слід дати перехресні посилання на відповідну частину розділу калібрування. Вкажіть, на якому етапі аналітичної методики застосовують КЯ і проводять калібрування.

Якщо процедури екстракції та очищення матеріалів є особливо складними, то на них може знадобитися окремий затверджений документ.

9.17. Розрахунки

Запишіть рівняння для розрахунку результатів, переконавшись в тому, що всі члени рівняння чітко визначені й описані. Вкажіть вимоги до контролю і дайте посилання на нормативи контролю якості.

9.18. Особливі випадки

Додайте всі модифікації методу, необхідність в яких виникає через наявність або відсутність в аналізованих пробах специфічних компонентів.

9.19. Складання звіту, разом з представленими результатами

Вкажіть, у якій формі варто представляти результати, включаючи способи округлення чисел, одиниці виміру, в яких виражений кінцевий результат, його невизначеність і довірчу ймовірність.

9.20. Додаток. Валідація методу

В залежності від кількості процедур, необхідних для валідації методу, можливо, доведеться перерахувати їх у даному розділі або дати посилання на окремий файл.

9.21. Додаток. Невизначеність вимірювання

Слід вказати основні джерела загальної невизначеності методики. Необхідно згадати внесок невизначеностей, що не враховуються при остаточному розрахунку через їх незначні величини. Вкажіть загальну невизначеність і поясніть, як вона була розрахована. Можна дати перехресне посилання на файл, який представляє більш детальне обговорення питання.

9.22. Бібліографія

Включіть всі посилання, що містять інформацію з розробки та валідації методики.

Таблиця критичних значень двохсторонніх t-критеріїв Стюдента

v	Рівні вірогідності (%)						
	80	90	95	98	99	99,8	99,9
1	3,078	6,314	12,71	31,82	63,66	318,3	696,6
2	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	22,33	31,60
3	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	10,21	12,92
4	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	7,173	8,610
5	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	5,893	6,869
6	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,208	5,959
7	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,785	5,408
8	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	4,501	5,041
9	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,297	4,781
10	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,144	4,587
11	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,025	4,437
12	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,930	4,318
13	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,852	4,221
14	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,787	4,140
15	1,341	1,753	2,131	2,602	2,974	3,733	4,073
16	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,686	4,015
17	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,646	3,965
18	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,610	3,922
19	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,579	3,883
20	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,552	3,850
21	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,527	3,819
22	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,505	3,792
23	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,485	3,768
24	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,467	3,745

25	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,450	3,725
26	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,435	3,707
27	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,421	3,690
28	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,408	3,674
29	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,396	3,659
30	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,385	3,646
40	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,307	3,551
50	1,299	1,676	2,009	2,403	2,678	3,261	3,496
60	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,232	3,460
70	1,294	1,667	1,994	2,381	2,648	3,211	3,435
80	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639	3,195	3,416
90	1,291	1,662	1,987	2,368	2,632	3,183	3,402
100	1,290	1,660	1,984	2,364	2,626	3,174	3,391
∞	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,090	3,291

УМОВНІ СКОРОЧЕННЯ

АДГ	– алкогольдегідрогеназа (ЕС 1.1.1.1);
АлАТ	– аланінамінотрансфераза (ЕС 2.6.1.2);
АЛДГ	– ацетальдегіддегідрогеназа (ЕС 1.2.1.3);
АМ	– апікальна мембрана;
АНС	– 1-анілінонафталін-8-сульфонат;
АО	– антиокиснювальна система;
АОЗ	– антиоксидантний захист;
АсАТ	– аспартатамінотрансфераза (ЕС 2.6.1.1);
АТФ	– аденозинтрифосфорна кислота;
АДФ	– аденозиндифосфорна кислота;
АМФ	– аденозинмонофосфорна кислота;
АХП	– алкогольна хвороба пеїнки;
ВГЛ	– відновлений глутатіон
ВЖК	– вільні жирні кислоти;
ГГТП	– γ-глутамілтранспептидаза (ЕС 2.3.2.2);
ГЛДГ	– глутаматдегідрогеназа (ЕС 1.4.1.2);
ГП	– глутатіонпероксидаза (ЕС 1.11.1.9);
ГР	– глутатіонредуктаза (ЕС 1.6.4.2);
Г-6-ФДГ	– глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа (ЕС 1.1.1.49);
ГХДХК +ГДХК	– глікохено- і глікодезоксихолева кислоти;
ГХК	– глікохолева кислота;
2,4-Д	– 2,4-дихлорфеноксицтова кислота;
ДГК	– докозагексаєнова кислота;
ДК	– дієнові кон'югати;
ДПК	– докозапентаєнова кислота;
ЕЖК	– есенційні жирні кислоти;
ЕПР	– ендоплазматичний ретикулум;
ЕХС	– естерифікований холестерол;
ЖК	– жирні кислоти;
ЗЛ	– загальні ліпіди;
ЗПВ	– задня порожниста вена;
ЗФЛ	– загальні фосфоліпіди;
Кат	– каталаза (ЕС 1.11.1.6);
КЛ	– кардіоліпін;
ЛДГ	– лактатдегідрогеназа (ЕС 1.1.1.27);
ЛП	– ліпопротеїн;
ЛПВЩ	– ліпопротеїни високої щільності;
ЛПДНЩ	– ліпопротеїни дуже низької щільності;
ЛПЛ	– ліпопротеїнліпази (ЕС 3.1.1.34);
ЛПНЩ	– ліпопротеїни низької щільності;
ЛФ	– лужна фосфатаза (ЕС 3.1.3.1);
ЛФХ	– лізофосфатидилхолін;

ЛХК	– літохолева кислота;
МДА	– малоновий діальдегід;
МК	– мікросомальна мембрана;
МНЖК	– мононенасичені жирні кислоти;
МЕОС	– мікросомальна ензимна окиснювальна систем;
НАДН	– нікотинамідаденіндинуклеотид відновлений;
НАДФН	– нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат відновлений;
НЖК	– насичені жирні кислоти;
НПЗП	– нестероїдні протизапальні препарати;
ПНЖК	– поліненасичені жирні кислоти;
ПОЛ	– пероксидне окиснення ліпідів;
СМ	– сфінгомієлін;
СМЧЕ	– субмітохондріальні частини (ентероцити);
СМЧП	– субмітохондріальні частини (печінка);
СОД	– супероксиддисмутаза (ЕС 1.15.1.1);
ТАГ	– триацилгліцерол(и);
ТБК-активні продукти	– тіобарбітурової кислоти активні продукти;
ТХДХК + ТДХК	– таурохено- і тауродезоксихолева кислоти;
ТХК	– таурохолева кислота;
ТХОК	– трихлороцтова кислота;
ФЕ	– фосфатидилетаноламін;
6-ФГДГ	– 6-фосфоглюкуронатдегідрогеназа (ЕС 1.1.1.4);
ФІ	– фосфатидилінозитол;
ФЛ	– фосфоліпід(и);
ФС	– фосфатидилсерин;
ФХ	– фосфатидилхолін;
ХДХК + ДХК	– хено- і дезоксихолева кислоти;
ХК	– холева кислота;
ХС	– холестерол;
ЦТК	– цикл трикарбонових кислот (цикл Кребса).

ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК

А

<i>А-амілаза</i>	<i>182</i>
<i>Абсолютна азотемія</i>	<i>211</i>
<i>Абсолютний показник заломлення..</i>	<i>39</i>
<i>Агар</i>	<i>59,82</i>
<i>Агароза</i>	<i>59, 82, 102</i>
<i>Адсорбційна хроматографія</i>	<i>42</i>
<i>Адсорбційно-комплексоутворююча хроматографія</i>	<i>42</i>
<i>Адсорбція.....</i>	<i>46, 59, 79</i>
<i>Аланінамінопептидаза.....</i>	<i>154</i>
<i>Альбуміни</i>	<i>144</i>
<i>Амілоїдоз нирок</i>	<i>211, 215</i>
<i>Амінотрансферази.....</i>	<i>154, 202</i>
<i>Аналітична хроматографія</i>	<i>42</i>
<i>Аналітичний етап</i>	<i>138</i>
<i>Антигени</i>	<i>115,117,237</i>
<i>Антикоагулянти.....</i>	<i>139,183</i>
<i>Аргентометрія.....</i>	<i>13,17</i>
<i>Атомна спектроскопія.....</i>	<i>33</i>
<i>Атомно-абсорбційна спектроскопія</i>	<i>34</i>
<i>Атомно-емісійна спектроскопія ...</i>	<i>34, 35,36</i>
<i>Атомно-спектроскопічні методи ..</i>	<i>33</i>
<i>Атомно-флуоресцентна спектроскопія</i>	<i>34</i>
<i>Афінна хроматографія.....</i>	<i>42</i>

Б

<i>Бікарбонатна буферна система ..</i>	<i>237</i>
<i>Білірубін.....</i>	<i>142, 196-205</i>
<i>Біологічні мембрани.....</i>	<i>133, 134</i>
<i>Біохімічні аналізатори</i>	<i>259, 260</i>
<i>Буфери.....</i>	<i>56, 58, 121</i>

В

<i>Вазоактивні пептиди</i>	<i>165, 166</i>
<i>Валідація методики</i>	<i>295</i>
<i>Величина значення рН.....</i>	<i>58</i>
<i>Верифікація методики</i>	<i>312,329</i>
<i>Вид біоматеріалу</i>	<i>140</i>
<i>Види відбору проб</i>	<i>292</i>
<i>Високоєфективна рідинна хроматографія</i>	<i>50</i>
<i>Витіснявальна хроматографія.....</i>	<i>43</i>
<i>Відносне стандартне відхилення ..</i>	<i>335</i>
<i>Відносний показник заломлення.....</i>	<i>39</i>
<i>Відсоткові розчини</i>	<i>10</i>
<i>В-лімфоцити.....</i>	<i>237,246,249</i>
<i>Внутрішня стандартизація ..</i>	<i>313,314</i>
<i>Вольтамперометрія</i>	<i>18</i>
<i>Вуглеводи.....</i>	<i>145,192,215</i>

Г

<i>Газова хроматографія</i>	<i>45</i>
<i>Газоворідинна хроматографія</i>	<i>49</i>
<i>Гама-глутамілтранспептидаза</i>	<i>41</i>

Гель-фільтрація.....	42
Гемоглобінова буферна система..	233
Гемолітична жовтяниця	197
Гепарин.....	139,164
Гіпергідрія.....	226
Гіперкаліємія.....	41, 229
Гіпернатріємія	228
Гіпогаммаглобулінемія.....	240
Гіпокаліємія.....	230
Гіпонатріємія	223
Гіпофаза	168
Гістамін	166,167
Глутаматдегідрогеназа	153,203
Гостра ниркова недостатність ..	214
Гострий гломерулонефрит	212
Грам-еквівалент	11
Густина	12

Д

Дегідратація	226
Детектор електронного захвату...47	
Детектор по теплопровідності.....	48
Дефіцит комплементу.....	247
Джерело живлення	60
Диск-електрофорез у поліакриламідному гелі	95
Діапазон вимірювань.....	299
Діодноматричний детектор.....	50
Доаналітичний етап	138
Довірчий інтервал для середнього	336

Е

Ексклюзивна хроматографія	42
Екстрацелюлярна гіпергідратація	227
Екстрацелюлярна дегідратація ...	226
Еластин	164
Електрична напруга.....	57
Електричний опір	57
Електрод порівняння	23
Електромагнітне випромінювання оптичного діапазону.....	26
Електроосмос	59
Електрорушійна сила	22
Електрофорез.....	53
Електрофорез у градієнті концентрації поліакриламідного гелю	95
Електрофорез у капілярах.....	117
Електрофорез у полакриламідно- агарозному складовому гелі	102
Електрофоретичні методи аналізу	51
Електрохімічні методи аналізу.....	18
Елюєнтна хроматографія	43
Ензими	161
Ензими печінки	202
Ензими плазми крові	152
Ензимопатії.....	159

Ж

Жовтяниця.....	197
Жовч.....	187
Жовчні кислоти.....	187, 201
Жовчоутворення.....	188, 201

З

Забезпечення якості.....	279, 280
Загальні тактичні принципи клінічної біохімії.....	143
Закон бугера-ламберта-бера.....	27
Залишковий азот.....	211
Замісне титрування.....	9
Зворотне титрування.....	9
Зміни балансу електролітів.....	227
Зовнішня стандартизація.....	313
Зональний електрофорез.....	69
Зразки контролю.....	318
Зразки порівняння.....	311, 312

І

Ідентифікація видів проб.....	287
Ізоелектричне фокусування.....	103
Ізоелектричне фокусування в капілярах.....	110
Ізоензими.....	149
Ізоахофорез.....	124
Ізоахофорез у капілярах.....	124
Імуноглобуліни.....	238
Імуноглобуліни d.....	240

Імуноглобуліни g.....	239
Імуноглобуліни a.....	240
Імуноглобуліни e.....	240
Імуноглобуліни m.....	240
Імунодефіцитні стани.....	244
Імуноелектрофорез.....	114
Індикаторний електрод.....	23
Інкреторні ферменти.....	152
Інтрацелюлярна гіпергідратація.....	226
Інтрацелюлярна дегідратація.....	226
Інфрачервоні детектори.....	48
Іонна сила (концентрація) буферів.....	58
Іонообмінна хроматографія.....	42, 44

Й

Йодометрія.....	16

К

Калібрування.....	328
Калібрування обладнання.....	328
Каломельний електрод.....	23
Капілярний гель-електрофорез.....	121
Капілярний зональний електрофорез у гелях.....	121
Кваліфікація обладнання.....	322
Кератансульфат.....	164
Кисла фосфатаза.....	156
Кисотно-лужна рівновага.....	232
Кисотно-лужне титрування.....	13
Кількісний аналіз у ТІІХ.....	44

Кількісний хроматографічний аналіз	41
Клас чистоти хімічних реактивів	326
Класифікації хроматографічних методів.....	42
Класифікація оптичних методів	29
Клініко-діагностичне значення дослідження ензимів	153
Кліренс	209
Клітинні ензими.....	152
Клубочковий фільтрат.....	208
Коефіцієнт (індекс) атерогенності	178
Коефіцієнт варіації.....	335
Колаген	163
Колонієстимулюючі фактори	243
Колостральний імунітет	247
Комплексонометрія	13
Кондуктометр	19
Кондуктометрія	19
Контроль якості	317
Креатинфосфокіназа.....	157
Кювети	32

Л

Лабораторна проба	287
Лабораторне середовище.....	319
Лактатдегідрогеназа	157

Лінійність методики	300
Ліпаза	158
Лот	287
Лужна фосфатаза.....	155
Лужний резерв крові.....	235

М

Мас-спектрометр.....	39
Мас-спектрометрія.....	37
Меркуриметрія.....	13
Метаболічний профіль показників крові	144
Метод комплексометрії.....	17
Метод нейтралізації	13
Метод непрямого ультрафіолетового детектування	120
Метод тонкошарової хроматографії	43
Методи оксидиметрії	15
Методи осадження	16
Методи прямого і непрямого флуоресцентного детектування..	120
Метрологічна простежуваність ..	279
Механічна жовтяниця.....	200
Мінеральні сполуки.....	145
Молекулярні сита.....	59
Молярна електропровідність	20
Молярні розчини	10
Монохроматори	32

Н

Невизначеність відбору проби.....	294
Нереспіраторний алкалоз.....	236
Нереспіраторний ацидоз.....	234
Нефроз.....	215
Нефросклероз.....	215
Низьковольтний та високовольтний електрофорез.....	63
Нирки	207
Ниркова азотемія.....	211
Нормальні розчини	10

О

Одиниці активності ензимів.....	158
Ондуктометричне титрування	18
Оптичні методи аналізу.....	26
Організація лабораторного процесу	304
Органоспецифічність ензимів.....	149
Осадова хроматографія.....	42
Основи статистики	330
Основні види методу ізоелектричного фокусування.....	106

П

Паперова хроматографія.....	43
Паренхіматозна жовтяниця	198
Патологічні компоненти сечі.....	215
Патологічні стани нирок	212
Перманганатометрія.....	13

Печінка	193
Підшлункова залоза.....	182
План відбору проб	290
Планування лабораторії.....	320
Повторні проби	318
Позаниркові азотемії	211
Порушення метаболічних процесів при хворобах шлунково-кишкового тракту	180
Порушення обміну ліпідів	181
Порушення обміну протеїнів	180
Постаналітичний етап.....	139
Потенціометричне титрування....	24
Потенціометрія.....	21
Препаративна хроматографія.....	42
Придатність	322
Приймач випромінювання	32
Продукційна азотемія	211
Промислова хроматографія	43
Простагландини.....	167
Протеїнова буферна система.....	233
Протромбін	144
Пряма кондуктометрія.....	20
Пряма потенціометрія	24
Пряме титрування	9

Р

Реабсорбція.....	209
Респіраторний алкалоз.....	235
Респіраторний ацидоз.....	234

Ретенційна азотонемія	211
Рефрактометричний метод аналізу	39
Рефрактометрія	39
Рідинна хроматографія	49
Рідинно-рідинна хроматографія	49
Робоча частина проби	287
Робочий діапазон методики	300
Роданідометрія	13
Розміщення обладнання	320
Розподільна хроматографія	42

С

Світлофільтри	32
Секреторні ензими	152
Селективність	299
Сечокам'яна хвороба	218
Сила електричного струму	57
Система менеджменту якості	280
Сіменс	19
Сліпі проби	319
Сорбітолдегідрогеназа	158
Спадкові дефекти нейтрофілів	245
Спектрофотометричні методи аналізу	29
Спектрофотометрія	31
Спеціальні методи електрофорезу	63
Стандарти	281
Стандартне відхилення середнього	335

Стеаторея	182
Сурфактант	168

Т

Термоіонний детектор	48
Технічне обслуговування обладнання	328
Типи іонообмінних смол	45
Титриметричний аналіз	9
Титровані розчини	11
Товарна партія	287
Тонкошарова хроматографія	43
Точкові проби	287
Трансамідиназа	158
Транспортна партія	287
Трансформуючі фактори росту	241, 243
Тяжкий комбінований імунodefіцит	245

Ф

Фактори, що впливають на показники крові	145
Фактори, що впливають на якість	320
Флуориметричний детектор	50
Фосфатази	155
Фосфатна буферна система	233
Фосфоліпіди	136
Фотоіонізаційного детектору	48
Фотоколориметрія	30

Фронтальна хроматографія.....	43
Фронтальний електрофорез.....	66
Функції фосфоліпідів мембран	136

Х

Хімічний аналіз	9
Хімічний склад крові тварин	144
Хімічні стандарти	319
Хлор-срібний електрод	23
Холестаз.....	201, 204
Холінестераза.....	203
Холості проби.....	317
Хроматографічні методи аналізу..	41
Хроматографія.....	41
Хроматографія на колонці.....	43
Хроматомас-спектрометрія.....	51
Хроматометрія.....	13
Хронічна ниркова недостатність.....	214
Хронічний гломерулонефрит.....	212
Хронічний пієлонефрит	212
Хронокондуктометричне титрування.....	21

Ц

Цитокіни	240

Я

Якісний аналіз у ТПХ	44
Якісний хроматографічний аналіз ..	41

АВТОРИ

Томчук Віктор Анатолійович, д-р вет. наук, професор, завідувач кафедри біохімії і фізіології тварин ім. акад. М. Ф. Гулого Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Грищенко Вікторія Анатоліївна, д-р вет. наук, професор кафедри біохімії і фізіології тварин ім. акад. М. Ф. Гулого Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Цвіліховський Валерій Іванович, канд. біол. наук, доцент кафедри біохімії і фізіології тварин ім. акад. М. Ф. Гулого Національного університету біоресурсів і природокористування України.

ТОМЧУК ВІКТОР АНАТОЛІЙОВИЧ
ГРИЩЕНКО ВІКТОРІЯ АНАТОЛІЇВНА
ЦВІЛХОВСЬКИЙ ВАЛЕРІЙ ІВАНОВИЧ

ВЕТЕРИНАРНА БІОХІМІЯ

Підручник

Підписано до друку 29.11.22 Формат 60x84\16
Ум. друк. арк. 21,9 Наклад 100 прим. Зам. № 220415

Видавець і виготовлювач Національний університет біоресурсів
і природокористування України,
вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ, 03041.
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи
ДК № 4097 від 17.06.2011