

В.С.Камышников

**ТЕХНИКА
ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ
В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ**

4-е издание

 Москва
«МЕДпресс-информ»
2016

УДК 612.08
ББК 51.1(2)
К18

Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть воспроизведена в любой форме и любыми средствами без письменного разрешения владельцев авторских прав.

Рецензенты:

Е.М.Рахманько – доктор химических наук, профессор;

С.А.Мечковский – доктор химических наук, профессор;

С.В.Барановская, Д.А.Барцевич, Н.Н.Чеботаревич – сотрудники Гродненского государственного медицинского колледжа, преподаватели высшей квалификационной категории.

Камышников В.С.

К18 Техника лабораторных работ в медицинской практике / В.С.Камышников. – 4-е изд. – М. : МЕДпресс-информ, 2016. – 344 с. : ил.
ISBN 978-5-00030-279-8

В книге приводятся сведения о современных требованиях к организации выполнения работ в клиничко-диагностической лаборатории, о лабораторной посуде и реагентах, их приготовлении, о технике взятия биологического материала на исследование. Представлена информация об используемых в медицинской практике технологиях лабораторного исследования (оптическом, иммуноферментном, молекулярно-биологическом и других видах анализа), о вспомогательном и аналитическом оборудовании для выполнения мануальных и автоматизированных биохимических, гематологических и общеклинических исследований.

Издание предназначено для специалистов службы клинической лабораторной диагностики со средним специальным и высшим образованием, а также студентов и преподавателей медицинских колледжей, училищ и вузов.

УДК 612.08
ББК 51.1(2)

ISBN 978-5-00030-279-8

© Камышников В.С., 2011, 2013

© Оформление, оригинал-макет.

Издательство «МЕДпресс-информ», 2011

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение. Клиническая лабораторная диагностика как медицинская и научная специальность (общие представления о предмете).....	7
---	---

Раздел 1

ПРИНЦИПЫ ОРГАНИЗАЦИИ ВЫПОЛНЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Глава 1. Обязанности и роль среднего медицинского персонала в выполнении клинико-лабораторных исследований.	
Устройство и оборудование клинико-диагностической лаборатории	13
1.1. Обязанности сотрудников лаборатории со средним медицинским образованием	13
1.2. Структура подразделений клинико-диагностической лаборатории крупного лечебно-профилактического учреждения	16
1.3. Санитарно-гигиенические требования к клинико-диагностической лаборатории	16
1.4. Оборудование клинико-диагностической лаборатории	17
1.5. Техника безопасности при работе в лаборатории	19
1.6. Оказание помощи пострадавшим	28
1.7. Противопожарная безопасность	29
1.8. Основные принципы осуществления производственной деятельности сотрудников лаборатории. Лабораторная документация	31
1.9. Санитарно-эпидемиологический режим и требования к его выполнению в клинико-диагностической лаборатории лечебно-профилактического учреждения	35
1.10. Основные этапы клинико-лабораторного анализа	44
Глава 2. Лабораторная посуда, уход за ней, методы очистки. Вспомогательные принадлежности	45
2.1. Лабораторная посуда (общие сведения)	45
2.2. Лабораторная посуда из стекла и специальных полимерных материалов.....	46
2.3. Другие изделия для выполнения лабораторных работ.....	78
2.4. Изделия из металла	87
2.5. Хранение посуды	89
2.6. Мытье лабораторной посуды	90
2.7. Сушка стеклянной посуды	97
Глава 3. Химические реактивы и методы их дополнительной очистки	99
3.1. Химические реактивы, их хранение, правила использования.....	99
3.2. Методы очистки реактивов	103

Глава 4. Электронагревательные приборы	132
Глава 5. Весы и взвешивание	134
5.1. Весы для грубого взвешивания	135
5.2. Весы для точного взвешивания	136
5.3. Весы для очень точного взвешивания (аналитические).....	138
5.4. Полуавтоматические весы.....	142
5.5. Торсионные весы.....	143
5.6. Электронные весы.....	144
Глава 6. Растворы: приготовление, способы выражения концентрации, исправление	145
6.1. Точные растворы.....	150
6.2. Буферные растворы.....	155
Раздел 2	
ОСНОВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ	
Глава 7. Технологии выполнения весового, объемного и газового анализа	159
7.1. Весовой анализ.....	159
7.2. Объемный анализ.....	159
7.3. Газовый анализ.....	175
Глава 8. Оптические методы количественного анализа	176
8.1. Свет и его взаимодействие с веществом.....	177
8.2. Абсорбционная фотометрия.....	178
8.3. Оптические измерительные приборы	182
8.4. Нефелометрический (турбидиметрический) анализ: иммунотурбидиметрия, лазерная нефелометрия, агрегатометрия, коагулометрия.....	187
8.5. Эмиссионный спектральный анализ (флуориметрия, пламенная фотометрия, атомно-эмиссионная фотометрия, люминометрия)	190
Глава 9. Электрохимический анализ	194
9.1. Потенциометрия.....	195
9.2. Кондуктометрия	197
9.3. Вольтамперометрия и полярография	198
9.4. Амперометрическое титрование	200
Глава 10. Технологии фракционирования компонентов биологических жидкостей и тканей	201
10.1. Электрофорез	201
10.2. Хроматография.....	207
Глава 11. Сатурационный анализ: технология выполнения радионуклидных исследований	214
Глава 12. Иммуноферментный анализ	223
12.1. Техника лабораторного исследования.....	224

12.2. Отдельные представители современных автоматических устройств для выполнения иммуноферментных исследований	227
Глава 13. Иммунофлуоресцентный анализ и проточная цитофлуориметрия	231
13.1. Иммунофлуоресцентный анализ	231
13.2. Проточная цитофлуориметрия.....	233
13.3. Технологии электрохемилюминесцентных исследований.....	234
Глава 14. Молекулярно-биологический анализ на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР-технология)	235
Организация работ в клинико-диагностических лабораториях при проведении ПЦР-исследований.....	239
Глава 15. Оценка результатов и качества выполнения клинико-лабораторного исследования	241
15.1. Оценка результатов лабораторного исследования по оптической характеристике фотометрируемого раствора.....	241
15.2. Расчет результатов по формуле.....	248
15.3. Расчет результатов в условных единицах	249
15.4. Выбор светофильтра	249
15.5. Методология контроля качества лабораторных исследований.....	250
Глава 16. Обозначения размерностей показателей лабораторных тестов.....	254
Глава 17. Условия, правила и техника взятия биологического материала на исследование	257
17.1. Лабораторная часть преаналитического этапа (пробоподготовка)	257
17.2. Факторы, влияющие на результат (надежность) клинико-лабораторного исследования. Внелабораторные и лабораторные ошибки	259
17.3. Исследование крови. Общие правила	264
17.4. Современные технологии взятия крови на лабораторное исследование.....	272
17.5. Исследование мочи и кала. Общие правила	282

Раздел 3

ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Глава 18. Современные технологии и анализаторы для выполнения лабораторных исследований в полуавтоматическом и автоматическом режимах	287
18.1. Общая характеристика технологических принципов работы автоматических клинико-биохимических анализаторов	287
18.2. Классификация медицинских лабораторных анализаторов	292
18.3. Этапы лабораторного анализа и функциональное назначение отдельных блоков (модулей) жидкостных автоматических биохимических анализаторов.....	295

18.4. Отдельные модели современных автоматизированных устройств для выполнения клинико-биохимических исследований	296
Глава 19. Выполнение экстренных мануальных и автоматизированных клинических лабораторных исследований	301
Глава 20. Гематологические исследования с использованием автоматизированных устройств	307
20.1. Гематологические анализаторы, использующие в работе метод кондуктометрии	309
20.2. Гематологические анализаторы, использующие в работе метод проточной цитометрии.....	313
20.3. Гематологические анализаторы, использующие в работе метод проточной цитофлуориметрии	316
20.4. Механические и электронные счетчики форменных элементов крови.....	317
20.5. Автоматические анализаторы оценки системы гемостаза.....	318
Глава 21. Системы компьютерного анализа изображения клеток.....	320
Глава 22. Автоматизированное исследование мочи	321
Глава 23. Микроскоп и техника микроскопирования	323
23.1. Классификация микроскопов.....	323
23.2. Устройство микроскопа	327
23.3. Препараты для микроскопирования и их подготовка.....	330
23.4. Техника микроскопирования	332
23.5. Уход за микроскопом и его хранение	333
23.6. Отдельные модели микроскопов, используемых для выполнения клинико-лабораторных исследований.....	333
Приложение. Технологии определения основных физических констант ...	339
Заключение	341
Литература	343

ВВЕДЕНИЕ

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА КАК МЕДИЦИНСКАЯ И НАУЧНАЯ СПЕЦИАЛЬНОСТЬ (ОБЩИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ПРЕДМЕТЕ)

Клиническая лабораторная диагностика (КЛД) – это научная медицинская дисциплина, которая возникла на стыке точных наук (химии и физики) и медико-биологических специальностей (биологии и медицины). Вместе с тем, КЛД представляет собой специализированный вид оказания лечебно-профилактической помощи населению.

Стратегия и тактика клинико-лабораторной деятельности определяются национальной службой КЛД. Основная ее задача состоит в том, чтобы помочь лечащему врачу в постановке диагноза заболевания, лечении больных, осуществлении профилактических мероприятий.

Интерес к лабораторно-диагностическому исследованию биологических жидкостей человека появился у врачей еще до нашей эры. Так, указания на изучение свойств мочи обнаружены в древнеиндийских и древнекитайских трактатах, написанных в X–VI вв до н.э. Большим опытом и знаниями в области исследовании этой биологической жидкости человека обладали древние египтяне, греки, об этом писал в своих трактатах известнейший врач Абу Али ибн Сина (Авиценна). Однако предпосылки научной лабораторной диагностики в современном понимании этого термина можно обнаружить лишь в XV–XVI вв в трудах Кузанциса, Парацельса, Р.Бойля. Существенный вклад в формирование основ отдельных разделов КЛД в XVIII–XIX вв внесли М.В. Ломоносов, А.П. Лавуазье и другие ученые. Дальнейшему совершенствованию лабораторной диагностики способствовали изобретение микроскопа и колориметра, открытие строения клетки, труды выдающихся ученых А.П.Бородин, А.Я.Данилевского, И.А.Кассирского. Получили большое признание в среде практикующих врачей и руководства по клинической лабораторной диагностике, подготовленные российскими (С.Д. Балаховский, А.А. Покровский, И.И. Иванов, Ф.И. Комаров, И.М. Маркелов, В.В. Меньшиков, В.В. Долгов и др.) и белорусскими (М.Ф. Мережинский, Л.С. Черкасова, В.Г. Колб, Е.П. Иванов, А.А. Чиркин, В.С. Камышников) учеными.

Предметом КЛД является изучение закономерностей взаимосвязей между физиологическим и патологическим состоянием организма, с одной стороны, и изменением состава компонентов его клеток и биологических жидкостей – с другой; разработка методов объективного исследования клеточного и химического состава тканей, биологических жидкостей и использование сведений, полученных с помощью рекомендованных методов, для выявления отклонений от нормы; установление

диагноза, прогноза заболеваний, оценка эффективности проводимого лечения, контроль медикаментозной терапии и профилактики расстройств здоровья.

С течением времени предмет и содержание КЛД изменялись. На заре ее развития значительный объем клинико-лабораторных исследований составляли бактериологические и серологические методы, в дальнейшем стали преобладать морфологические методы анализа. В настоящее время от 2/3 до 3/4 всего объема выполняющихся в клинико-диагностических лабораториях исследований составляют общеклинические, гематологические и биохимические методы анализа; в настоящее время заметно увеличилось количество выполняемых цитологических (в том числе цитохимических) исследований.

КЛД включает в себя различные виды лабораторного анализа, в том числе биохимические, морфологические (цитологические) и микробиологические методы.

Поскольку лабораторные исследования применяются во всех областях медицины, КЛД тесно связана со многими другими клиническими дисциплинами: гематологией, трансфузиологией, нефрологией, кардиологией, гастроэнтерологией, инфекционными заболеваниями, эндокринологией и т.д.

Специалист в области клинической лабораторной гематологии должен хорошо знать морфологию клеток периферической крови, костного мозга, лимфатических узлов, уметь правильно читать гемограмму, лимфограмму, миелограмму, делать соответствующие заключения.

Клиническая цитология включает в себя группу методов морфологического исследования клеток крови и других биологических жидкостей (в том числе секретов и экскретов), клеточного материала тканевых пунктатов.

Как медицинская дисциплина КЛД включает в себя и клиническую биохимию. К КЛД относится прежде всего тот раздел клинической химии (биохимии), который охватывает исследование биологических жидкостей, отдельных клеток и клеточных структур с целью постановки диагноза заболевания, оценки прогноза, эффективности проводимого лечения.

Основными направлениями исследований в КЛД являются:

- изучение особенностей изменения состава биологических жидкостей и тканей, механизмов регуляции функций организма при отдельных заболеваниях (в том числе при их моделировании на животных);
- установление биохимических, гормональных, иммунологических, серологических, гематологических, коагулологических, цитологических и некоторых других критериев нормы и патологии для отдельных форм заболеваний;
- выявление на основе изучения обменных процессов в организме метаболических факторов риска, отражающих снижение устойчивости организма человека к неблагоприятным влияниям внешней, вну-

тренней среды, способствующих возникновению состояния предболезни; разработка способов предотвращения перехода предболезни в болезнь путем коррекции нарушенных обменных процессов в организме;

- усовершенствование и разработка новых методов клинико-лабораторного исследования, обладающих более высокой аналитической и диагностической чувствительностью, специфичностью, диагностической эффективностью, прогностической ценностью положительного и отрицательного результатов теста;
- дальнейшее совершенствование методологии и технологии осуществления контроля качества клинических лабораторных исследований.

Основными объектами клинико-лабораторного исследования являются: содержимое сосудов и полостей (кровь и ее морфологические элементы, плазма, сыворотка, цереброспинальная жидкость (ЦСЖ), трансудаты, экссудаты, внутрисуставная жидкость, содержимое желудочно-кишечного тракта), выделения человеческого организма (моча, кал, слюна, сперма, конденсат выдыхаемой влаги), ткань паренхиматозных органов, дериваты кожи (ногти, волосы) и др. В последние годы все большее внимание биохимиков привлекают эритроциты, которые принято рассматривать как своеобразный биопунктат тканей.

В КЛД нашли широкое применение современные методы химического, физико-химического и молекулярно-биологического исследования, основанные на использовании оптического, ионометрического, иммуноферментного, иммунофлуоресцентного, радиоиммунного, генетического, электрофоретического, хроматографического и других видов анализа, а также методы с использованием реагентов на твердофазных носителях, технологии автоматизированного выполнения биохимических, гематологических, иммунологических исследований. В большинстве больниц и поликлиник наряду с используемой в течение многих лет фотометрической аппаратурой применяется и более современная (автоматизированные фотометры), позволяющая в считанные минуты выполнять единичные лабораторные исследования, причем без использования агрессивных жидкостей (кислот, щелочей). В крупных клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений используются специальные приборы для выполнения лабораторных анализов в полностью автоматизированном режиме. Для осуществления срочных, экспресс-исследований у постели больного применяются специальные индикаторные (сухие) тест-полоски, при нанесении на которые капля крови или мочи пациента происходит характерное для заболевания изменение окраски индикаторной зоны.

Таким образом, используемые в настоящее время методы клинико-лабораторных исследований основываются на новейших достижениях не только в области химического, физико-химического и молекулярно-биологического анализа, но также информатики и инженерной техники.

Применение современных лабораторно-диагностических технологий создало объективные предпосылки и для **выполнения научных исследований в области лабораторной медицины, т.е. для подготовки научно-педагогических кадров высшей квалификации** (кандидатов и докторов наук) по специальности 14.00.46 (14.03.10) – клиническая лабораторная диагностика (медицинские и биологические науки).

Раздел 1

**ПРИНЦИПЫ ОРГАНИЗАЦИИ
ВЫПОЛНЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ
В КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ
ЛАБОРАТОРИИ**

Глава 1. ОБЯЗАННОСТИ И РОЛЬ СРЕДНЕГО МЕДИЦИНСКОГО ПЕРСОНАЛА В ВЫПОЛНЕНИИ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ. УСТРОЙСТВО И ОБОРУДОВАНИЕ КЛИНИКО- ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ

Слово «лаборатория» происходит от латинского «laborare» (работать, обрабатывать). Роль клинико-диагностических лабораторий (КДЛ) в системе здравоохранения трудно переоценить, поскольку от качества проводимых исследований (биохимических, коагулологических, гематологических, гормональных, иммунохимических, общеклинических, гистологических и др.) во многом зависит правильность постановки диагноза.

Основными работниками в области лабораторной медицины являются врачи лабораторной диагностики и их надежные помощники – сотрудники КДЛ со средним специальным образованием.

1.1. Обязанности сотрудников лаборатории со средним медицинским образованием

К работникам КДЛ со средним медицинским образованием относятся медицинские технологи, медицинские лабораторные техники и лаборанты (в России), а также фельдшеры-лаборанты и лаборанты (в Белоруссии). В соответствии с существующими положениями все они (далее именуемые в тексте учебника лаборантами) должны уметь выполнять под руководством специалистов КДЛ с высшим образованием (врача клинической лабораторной диагностики и биолога КДЛ в России и врача лабораторной диагностики – в Белоруссии) различные виды лабораторных исследований, в том числе биохимические, гематологические, коагулологические, общеклинические, серологические, бактериологические, гистологические,

молекулярно-биологические, генетические и др. Для этого, в первую очередь, нужно научиться правильно оборудовать и организовывать свое рабочее место и изучить правила техники безопасности при работе в лаборатории.

Каждому специалисту, начинающему свою работу в лаборатории, необходимо овладеть такими техническими приемами, как взвешивание на весах разных видов, приготовление растворов реактивов, фильтрование, центрифугирование, мытье стеклянной посуды, выполнение исследований на фотометрических устройствах, микрофотографирование, стерилизация инструментов. Знание приемов лабораторных работ, а также требований, предъявляемых к анализируемому объекту, существенно помогает в освоении новейших методов лабораторных исследований.

Лаборант должен уметь правильно подготовить больного к взятию биологического материала (крови, мочи, желудочного сока и др.) и знать требования по его дальнейшему использованию. Полученный биоматериал следует поместить в чистую, а при необходимости – стерильную посуду и сопроводить специальным бланком с указанием фамилии, инициалов, возраста (обязательно для ребенка), диагноза пациента, отделения, палаты того лечебного учреждения, где он находится на лечении, вида биологического материала и исследования, на которое он направляется. От лаборанта также требуется умение организовать работу младшего медицинского персонала КДЛ, правильно осуществлять прием, маркировку и регистрацию поступившего в лабораторию биоматериала, его хранение. Важно не загромождать рабочее место излишней лабораторной посудой и инструментарием, на столах должно быть только самое необходимое.

Средний медицинский персонал должен хорошо владеть техникой взятия крови из пальца, вены, получения мазков из зева или половых органов. В случае выполнения более сложных манипуляций с участием врача (веносекция, спинномозговая пункция, взятие пунктатов из полостей) лаборант должен уметь продезинфицировать кожу, правильно подготовить необходимый инструментарий.

На лаборанта возлагаются также обязанности осуществлять регистрацию проведенных исследований (с использованием персонального компьютера), ведение учетно-отчетной документации (регистрация, записи в журналах и бланках результатов анализа, составление заявок на реактивы, учет своей работы, составление отчетов и т.д.). Он должен обладать навыками использования методов статистической обработки результатов исследований, в том числе применительно к внутри- и межлабораторным методам контроля качества. Лаборант должен хорошо владеть навыками построения калибровочных графиков, основами работы с компьютером.

Важным в деятельности лаборанта являются осуществление контроля качества клинических лабораторных исследований и обеспечение мероприятий по повышению их надежности. Для этого требуется его способность на основании анализа статистических показателей установить причины погрешностей (преаналитические и аналитические).

В обязанности лаборанта входят участие в разработке и внедрении новых методов лабораторного анализа, а также умение на основании полученных результатов дать качественную и количественную оценку объекта исследования, дифференцировать нормальные и патологические показатели лабораторных тестов и по результатам анализов выявлять типичные признаки патологических процессов в органах и тканях.

Он должен уметь правильно готовить, фиксировать и окрашивать препараты для исследования клеточных элементов, отбирать материал для микроскопического исследования, владеть техникой световой, поляризационной, фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии.

От овладения техникой лабораторных работ зависит качество выполнения лабораторного анализа. Так, плохо вымытая лабораторная посуда, неправильное отмеривание объемов реагентов, неточное приготовление титрованных растворов, неумелое пользование приборами, применение некалиброванных пипеток и бюреток, неправильное взятие биологического материала для исследования могут служить причиной лабораторных и внелабораторных ошибок определения. Особое внимание следует уделять подготовке к эксплуатации необходимых приборов, посуды, инструментария, реактивов.

Лаборант обязан бережно относиться к оборудованию, экономно расходовать реактивы, соблюдать правила техники безопасности при работе с приборами и реагентами, особенно при использовании агрессивных жидкостей (концентрированных растворов кислот, щелочей и др.), правильно вести документацию, в том числе отчетную.

Каждый специалист лаборатории со средним медицинским образованием обязан иметь свой рабочий журнал, куда он записывает результаты выполненных анализов, а также все потребовавшиеся для их получения расчеты. В дальнейшем результаты исследования заносятся заведующим лабораторией или другим ответственным лицом в общий лабораторный журнал.

В распоряжении работающего в лаборатории должны быть халаты, налокотники, перчатки, прорезиненный или полиэтиленовый фартук, защитные очки (при работе с кислотами и щелочами).

Лаборант обязан всегда соблюдать правила техники безопасности, в частности, остерегаться ожогов кислотами или щелочами, производить под тягой работы с легко воспламеняющимися или летучими веществами. Поскольку исследуемый материал может быть заразным, при работе с ним следует быть особенно внимательным и осторожным. После работы с инфицированным материалом необходимо тотчас обеззаразить его, а также всю посуду, бывшую в употреблении. Обеззараживание биологического материала производится с помощью различных химических средств (дезинфицирующих растворов, в том числе приготовленных в лаборатории), а также нагреванием (пастеризацией, стерилизацией в автоклаве, сушильных шкафах и т.д.). При работе с радиоактивными веществами следует соблюдать специальные меры предосторожности. Лаборант должен при-

нимать меры к предотвращению ситуаций, связанных с нарушением техники безопасности, и уметь оказывать первую помощь при несчастных случаях.

В обязанности лаборанта входит выполнение поручений заведующего КДЛ по материально-техническому обеспечению лаборатории.

1.2. Структура подразделений клинико-диагностической лаборатории крупного лечебно-профилактического учреждения

Устройство, состав помещений и площади КДЛ определяются соответствующими строительными нормами и правилами. Основными подразделениями лабораторий являются производственные помещения, в которых размещаются функциональные подразделения для выполнения клинико-биохимических, гематологических, общеклинических, цитологических, бактериологических, серологических и некоторых других видов исследования.

В структуре лабораторий должны быть кабинеты заведующего лабораторией, врачей лабораторной диагностики (специалистов КДЛ с высшим образованием), лаборантские, помещения для приема и регистрации биологического материала от больных стационара и пациентов поликлиник, моечная. Целесообразно иметь отдельные комнаты для размещения весов, центрифуг, фотометрической аппаратуры, автоклавов, отдельные кабинеты для освоения новых методик, взятия проб крови, желудочного сока, дуоденального содержимого, материальную комнату для хранения расходных материалов, реактивов и др., комнату для приема пищи, помещения для хранения грязного белья и инвентаря для уборки помещений, душевую, регистрацию и комнату ожидания.

1.3. Санитарно-гигиенические требования к клинико-диагностической лаборатории

Все помещения КДЛ должны быть просторными и светлыми; предпочтительно размещать их в зданиях, которые имеют прочный фундамент, предохраняющий строение от вибрации, так как это может в значительной мере отразиться на работе точных приборов (в том числе аналитических весов). Лаборатория должна иметь два входа: служебный и для посетителей.

Следует стремиться к тому, чтобы рабочее место освещалось сбоку, желательно с левой стороны (освещенность его в дневное и ночное время должна быть не ниже 60 лк). Для искусственного освещения рабочего места можно использовать скрытые лампы дневного света, расположенные впереди работающего.

Каждому лаборанту отводится стол длиной не менее 1,5 м при ширине от 60 до 90 см.

Стены и потолок должны быть гладкими, что позволяет легко очистить их от пыли, провести влажную уборку помещений. При необходимости периодического обеззараживания поверхности стен производят их облицовку глазурованной плиткой на высоту 1,6 м. В местах установки оборудования, вызывающего увлажнение стен, облицовка стен осуществляется на высоту 1,6 м и ширину, равную ширине приборов и оборудования плюс 15 см с каждой стороны. Остальную площадь стен желательнo наполовину высоты окрасить масляной краской (чтобы их можно было мыть). Лабораторная мебель должна быть светлого цвета, лабораторные столы рекомендуется покрывать кислотоупорным пластиком. Полы в лабораторных помещениях покрываются линолеумом или ренолином. Все это делает возможной частую влажную уборку в помещениях лаборатории.

Для проведения работ с газовыми, летучими и ядовитыми веществами в лаборатории должны быть установлены шкафы с приточно-вытяжной вентиляцией. Скорость движения воздуха в полностью открытых створках вытяжного шкафа должна быть 0,3 м/с (при работе с ртутью – 0,4 м/с, сероводородом – 0,7 м/с).

Водопроводные раковины следует устраивать с подводкой холодной и горячей воды.

Особое внимание следует уделять правильному хранению и применению агрессивных жидкостей и токсичных веществ. Ядовитые средства должны храниться в металлических шкафах или сейфах, закрытых на ключ и опломбированных, в отдельной комнате, оборудованной водопроводом, канализацией, вентиляцией и вытяжным шкафом. На окнах комнаты, где хранятся ядовитые средства, устанавливаются железные решетки; двери обиваются железом. В лабораториях с небольшим объемом работы металлический шкаф (сейф) с ядовитыми средствами, а также вытяжной шкаф для работы с ними могут находиться в материальной комнате.

В распоряжении сотрудников лаборатории должны быть описания рекомендованных к использованию в КДЛ методов исследования, необходимые справочники, пособия или учебные руководства для получения достаточного объема информации по ходу выполнения работы.

1.4. Оборудование клиничко-диагностической лаборатории

Современные КДЛ лечебно-профилактических учреждений должны располагать широким спектром оборудования общего и специального назначения, в том числе лабораторными столами (покрытыми линолеумом или кислотоупорным пластиком), вытяжными шкафами, центрифугами, термостатами, сушильными шкафами, аналитическими и другими весами, шкафами для хранения реактивов, холодильниками (рефрижерато-

рами), аппаратами для получения дистиллированной или деминерализованной (деионизированной) воды, автоматизированными фотометрами, спектрофотометрами, автоанализаторами (в том числе биохимическими, гематологическими, иммунохимическими), установкой для электрофореза и др.

Рекомендуемый перечень оснащения оборудованием и инструментарием лаборатории врачебной амбулатории, сельской участковой больницы, амбулаторных лечебно-профилактических учреждений (отдельно с числом посещений в смену менее 500, 500–750, свыше 750), стационарных лечебно-профилактических учреждений (отдельно с коечным фондом менее 400, 400–600, свыше 600), диагностических центров приводится, в частности, в Приложении к Приказу Министерства здравоохранения Республики Беларусь №315 «Об утверждении примерного табеля оснащения клиничко-диагностических лабораторий лечебно-профилактических учреждений приборами, оборудованием и медицинским инструментарием» от 6 октября 1999 г.

В соответствии с этим приказом врачебная амбулатория должна быть оснащена: баней водяной, весами техническими с точностью взвешивания до 0,01 г, гемоглобинометром фотометрическим, глюкометром портативным, дистиллятором или установкой для получения деионизированной воды, ионометром, калькулятором, камерой Горяева (6 шт.), капельницей, капиллярами для определения СОЭ (по потребности), комплектом-укладкой для взятия проб на дому (2 шт.), комплектом устройств для пробоподготовки в копрологии, копьём-скарификатором (по потребности), коробкой стерилизационной круглой (4 шт.), лупой офтальмологической ручной, мешалкой магнитной, микроскопом биологическим бинокулярным с иммерсией (2 шт.), набором ареометров для определения плотности жидкостей, наконечниками к полуавтоматическим дозаторам (по потребности), одноканальным автоматическим биохимическим фотометром с термостатируемым кюветным отделением, пинцетом анатомическим (2 шт.), пинцетом хирургическим (4 шт.), полуавтоматическим дозатором (пипеткой) с переменным объемом 5–50 мкл (2 шт.), 50–200 мкл (2 шт.), 200–1000 мкл (2 шт.), до 5000 мкл (2 шт.); посудой лабораторной (по потребности), пробирками (по потребности), прибором для определения СОЭ (2 шт.), скальпелем остроконечным, секундомером (2 шт.), счетчиком-калькулятором для подсчета форменных элементов крови (2 шт.), термостатом водяным, термостатом суховоздушным, урометром (2 шт.), установкой для ультразвуковой мойки, устройством для окраски мазков, центрифугой лабораторной, часами сигнальными (таймером), холодильником бытовым, шкафом вытяжным, шкафом сушильно-стерилизационным, шпателями (по потребности), штативом для кипячения пробирок, штативами полиэтиленовыми для пробирок (по потребности). Могут быть также использованы: анализатор билирубина фотометрический, анализатор состава мочи на основе методов сухой химии (полуавтоматический), экспресс-гематологический анализатор.

1.5. Техника безопасности при работе в лаборатории

Техника безопасности – раздел охраны труда, обеспечивающий использование безопасных приемов и методов работы, правильную организацию рабочего места, внедрение в практику средств защиты от опасных производственных факторов. Допущенная в работе небрежность может не только исказить результаты выполненных анализов, но и явиться причиной возникновения несчастных случаев и травм (ожогов, отравлений, заражений и др.). Поэтому овладение элементами техники лабораторных работ представляет собой задачу первостепенной важности.

1.5.1. Основные правила техники безопасности при работе в химической лаборатории

Необходимо проветривать помещение каждый раз перед началом работы.

В помещении лаборатории запрещается:

- оставлять без присмотра включенные электронагревательные приборы и зажженные горелки, держать вблизи них вату, марлю, спирт и другие легко воспламеняющиеся вещества;
- проводить работы, связанные с перегонкой, экстрагированием, растиранием вредных веществ и т.д. при неисправной вентиляции;
- наклоняться над сосудом, в котором кипит какая-либо жидкость;
- хранить запасы ядовитых, сильнодействующих, взрывоопасных веществ и растворов на столах и стеллажах;
- хранить и применять реактивы без этикеток;
- содержать в рабочих помещениях какие-либо вещества неизвестного происхождения;
- работать без установленной специальной санитарной одежды и защитных приспособлений;
- хранить и принимать пищу в комнате, где работают с ядовитыми веществами и кислотами.

На рабочем месте разрешается иметь минимальное количество огнеопасных веществ, достаточное для выполнения необходимых операций.

Каждый сотрудник лаборатории должен иметь халат, а также фартук или передник из полиэтилена (поливинилхлорида).

Все работы с агрессивными, токсичными, огнеопасными веществами следует проводить только в работающем вытяжном шкафу.

Нагревая жидкость, следует держать пробирку так, чтобы ее отверстие было направлено в сторону, противоположную от работника и его коллег.

Ведя перегонку жидкости, все время необходимо следить за аппаратом для дистилляции и нормальной работой холодильника. Нельзя оставлять прибор без наблюдения даже на короткое время.

При перерыве подачи воды необходимо перекрыть краны (особое внимание уделить тем, из которых вода поступает в приборы по резиновым трубкам), а при прекращении подачи электрического тока – выключить все электроприборы.

Уходя из лаборатории в конце рабочего дня, следует убедиться в том, что все краны (газовые, водопроводные и др.) закрыты; все моторы и электронагревательные приборы выключены; дверцы вытяжных шкафов опущены; стол чист и убран; все дорогостоящие приборы закрыты или убраны; никаких огнеопасных веществ на столах нет. Необходимо проверить, на месте ли противопожарные средства, выключить свет и только тогда закрыть лабораторию.

1.5.2. Хранение реактивов

При хранении реактивов необходимо придерживаться следующих правил:

1. На каждую банку или другой сосуд, в котором находится реактив, нужно наклеить этикетку, где будут указаны название вещества и его концентрация.
2. Концентрированные растворы кислот должны храниться в специальных бутылках (склянках) с притертой пробкой, поверх которых необходимо надевать стеклянный притертый колпачок.
3. Щелочи следует хранить в широкогорлых банках оранжевого стекла, закрытых корковыми или полиэтиленовыми пробками, залитыми слоем парафина.
4. Посуда для хранения ядовитых веществ, щелочей и кислот должна иметь четкие надписи (чернилами по стеклу или др.).
5. Биксы, банки, бутылки с летучими веществами необходимо открывать только в момент непосредственного пользования ими.
6. Горючие и взрывоопасные вещества должны содержаться в толстостенных емкостях (банках).
7. Емкости с горючими и взрывоопасными жидкостями должны храниться в железных ящиках, выложенных асбестом (*внимание*: асбест является канцерогенным веществом). Место, где находится ящик, должно быть удалено от выделяющих тепло поверхностей и приборов. Следует обеспечить удобный подход к ящику.
8. Реактивы должны быть хорошо закупорены. В случае надобности пробки парафинируют.
9. При закупоривании реактивов пробками следует учитывать свойства реактивов. Так, резиновые пробки сильно набухают под действием некоторых химических веществ, например, спирта, бензола, ацетона, эфира. Под влиянием галогенов (брома, йода) резиновые пробки становятся хрупкими, теряют эластичность. Такие реагенты лучше закупоривать стеклянными притертыми пробками. Растворы щелочи, наоборот, нельзя закупоривать стеклянными пробками, так как в промежутке между внутренней поверхностью горла склянки и наружной пробки возникает слой раствора щелочи, в котором образуются карбонаты, плотно заклинивающие пробку.
10. Если реактив чувствителен к действию света (например, бромистое серебро, азотнокислое серебро, перекись водорода, гипосульфит и др.), его хранят в банках из оранжевого стекла. Банку из светлого стекла

можно завернуть в темную бумагу и поставить в шкаф, непроницаемый для света.

11. Многие вещества при их смешивании могут давать самовоспламеняющиеся, взрывоопасные, ядовитые и другие продукты. Поэтому категорически запрещается хранение легковоспламеняющихся огне- и взрывоопасных веществ с кислотами и щелочами.
12. Легко воспламеняющиеся жидкости (например, ацетон, бензол, бензин, ксилол, нефть, сероуглерод, скипидар, спирты, этилацетат, диэтиловый и петролейный эфиры, дихлорэтан) нельзя хранить вместе с:
 - бромом, перманганатом калия, серной и азотной кислотами;
 - хлоратами и селитрами;
 - карбидом кальция, фосфористым кальцием и натрием; промасленными волокнистыми материалами;
 - сжатыми и сжиженными газами;
 - мышьяковистыми препаратами, ртутными солями, хлором.
13. Легковоспламеняющиеся взрывчатые вещества, а также сильные окислители (перекись водорода, хлорную кислоту) следует хранить в ограниченных количествах в местах, защищенных от пыли, влаги и света.
14. В хранилище кислот надлежит иметь достаточные количества нейтрализующих веществ (содовые и известковые растворы) для «гашения» пролитых кислот.

1.5.3. Хранение ядовитых веществ и правила работы с ними

При хранении ядовитых веществ необходимо придерживаться следующих правил:

1. Ядовитые средства хранятся в отдельной комнате в металлических шкафах или сейфах, запертых на ключ и опломбированных. Комната должна быть оборудована водопроводом, канализацией, вентиляцией и вытяжным шкафом. На окнах комнаты, где содержатся ядовитые средства, оборудуются железные решетки, двери должны быть обиты железом (при необходимости устраивается сигнализация). В лабораториях с небольшим объемом работы допускается нахождение металлического шкафа или сейфа с ядовитыми средствами и вытяжного шкафа для работы с ними в материальной комнате.
2. В аудиториях, где производятся занятия с учащимися, хранение ядовитых средств после окончания учебных занятий не разрешается.
3. Ядовитые средства подлежат предметно-количественному учету в отдельных книгах, пронумерованных, прошнурованных и скрепленных печатью и подписью руководителя.
4. На каждую упаковку, содержащую ядовитые средства, должны наклеиваться этикетки:
 - с обозначением наименования ядовитого средства;
 - с изображением перекрещенных костей и черепа с надписями: «Яд» и «Обращаться с осторожностью».

5. Расфасовка, измельчение, отвешивание и отмеривание ядовитых и сильнодействующих средств должны проводиться в вытяжных шкафах с помощью специально выделенных для этой цели приборов и посуды (весы, воронки, ступки, цилиндры и т.д.).
6. Нагревание ядовитых веществ проводится только в круглодонных колбах. Нагревать колбы на открытом огне запрещается.
7. Работу с ядовитыми веществами следует проводить только в резиновых перчатках, защитных очках, при необходимости – в противогазе.
8. После окончания работы следует тщательно вымыть руки, а в отдельных случаях – почистить зубы и прополоскать рот.

Следует иметь в виду, что некоторые из органических веществ относятся к числу одурманивающих. Среди них встречаются летучие и нелетучие соединения. К летучим относятся углеводороды (пентан, гексан, гептан, октан, изооктан, петролейный эфир, бензин, циклопропан, циклопентан, циклогексан, бензол, толуол), спирты (метанол, этанол, н-пропанол, изопропанол, изобутанол, н-бутанол, н-пентанол, изоамиловый спирт), кетоны (ацетон, циклогексанон), эфиры (диэтиловый, этилацетат, бутилацетат), галогеноводороды (дихлорметан, хлороформ, дихлорэтан); к нелетучим – кислоты (производные барбитуровой кислоты: барбитал, фенобарбитал, гексенал), нейтральные вещества (хлоралгидрат), амфотерные соединения и слабые основания (хлордиазопексид, феназепам), основания (морфин, кодеин, атропин, кокаин, папаверин, аминазин, дифрил и др.).

1.5.4. Обращение с химическими реактивами

При обращении с реактивами необходимо придерживаться следующих правил:

1. Не следует применять в работе вещества, состав которых неизвестен, так как в таком случае нельзя заранее определить, будут ли в ходе реакции образовываться опасные продукты (горючие, ядовитые или взрывчатые).
2. Нельзя пробовать на вкус или вдыхать никаких веществ, так как они могут оказаться ядовитыми.
3. При работе с новыми веществами нужно тщательно выяснить все возможные виды опасностей и заблаговременно принять меры к их предотвращению – использовать защитные очки, щитки и другие приспособления. Первые исследования нужно проводить с минимальными количествами вещества.
4. При использовании веществ, обладающих повреждающим действием на кожу (кислоты, щелочи, окислители, перекиси и др.) или способных проникать в организм через кожу, необходимо применять резиновые перчатки. При этом нужно следить, чтобы ядовитое вещество не попало на руки, лицо, одежду.
5. При дроблении едких щелочей следует покрывать голову косынкой или головным убором, так как кусочки щелочи, попавшие на волосы, вызывают ожог и разрушают их.

6. Смешивая концентрированные кислоты с водой, нужно добавлять кислоту к воде, а не наоборот! Во время добавления кислоты нужно сильно перемешивать жидкость!
7. Следует соблюдать осторожность при работе с легко воспламеняющимися веществами (ацетон, эфир, бензол, спирт и др.), остерегаться вспышки или взрыва! Следует иметь в лаборатории как можно меньше легко воспламеняющихся веществ!
8. Работа с легко воспламеняющимися жидкостями и горючими веществами должна проводиться в вытяжном шкафу с частично опущенными дверцами и при действующей вентиляции. Газовые горелки нужно выключить.
9. Перегонять и нагревать вещества с низкой температурой кипения (ацетон, эфир, спирты и т.д.) следует только в круглодонных колбах, изготовленных из тугоплавкого стекла, либо с использованием бань, заполненных соответствующими теплоносителями (водой или маслом в зависимости от температуры кипения вещества). Запрещается опускать колбу с легковоспламеняющейся жидкостью в горячую воду без предварительного постепенного подогрева колбы.
10. Во избежание «переброса» перегоняемой жидкости в нагреваемую колбу помещают стеклянные капилляры или кусочки прокипяченной и высушенной пемзы.
11. Перед перегонкой горючих веществ заполняют холодной водой холодильник. Лишь после того как ток воды установится, включают нагревательный прибор. Колбу приемника помещают на противень с песком.
12. При загрязнении сильнодействующими и ядовитыми веществами спецодежды и полотенец их следует немедленно сменить на чистые, а грязные передать младшему медицинскому персоналу для нейтрализации и стирки.
13. Просыпав или пролив ядовитые вещества и кислоты, следует немедленно полностью собрать их и вымыть стол, пол, другие поверхности, на которые они попали!
14. Жидкие ядовитые вещества и кислоты недопустимо набирать в пипетку ртом. С этой целью следует использовать сифон или специальную пипетку.
15. Прежде чем вылить ядовитое вещество в раковину, его необходимо обезвредить.
16. Работа со ртутью, необходимо поместить приборы на широкий противень, а случайно разлившуюся ртуть немедленно полностью собрать и обезвредить. Сбор ртути производить только посредством пипетки с резиновой грушей, а мелкие капли, оставшиеся в щелях и других труднодоступных местах, – при помощи амальгированной пластинки! Загрязненное ртутью место обезвреживают химическим способом, промывая 20% раствором хлорида трехвалентного железа, засыпая порошком серы или пользуясь другим демеркуризатором.

Внимание: Оставшиеся капли ртути испаряются, длительно отравляя воздух лаборатории.

17. Открывание сосудов с концентрированными кислотами и щелочами и приготовление растворов из них разрешаются только в вытяжном шкафу с включенной вентиляцией.
18. Щелочи следует брать из банки шпателями.
19. При приготовлении растворов щелочей определенную навеску вещества опускают в большой сосуд с широким горлом, заливают необходимым количеством воды и тщательно перемешивают. Большие куски сухого реагента разбивают на мелкие в специально отведенном месте. При этом щелочь накрывают холстом (или другими материалами), волосы покрывают косынкой или специальным головным убором, так как кусочки щелочи, попав на волосы, разрушают их.
20. При пролипании неядовитых реактивов достаточно вытереть поверхность стола тряпкой, держа ее резиновыми перчатками, после чего хорошо прополоскать тряпку, вымыть стол и перчатки.
21. Если пролит раствор щелочи, то его надо засыпать песком или опилками, затем удалить песок или опилки и залить это место сильно разбавленной соляной или уксусной кислотой, после этого удалить кислоту тряпкой, вымыть стол и перчатки.
22. Если пролит раствор кислоты, то его надо засыпать песком (опилками засыпать нельзя), затем удалить пропитанный песок и засыпать это место содой, затем соду также удалить и промыть поверхность большим количеством воды.
23. Растворы для нейтрализации концентрированных кислот и щелочей должны находиться на стеллаже (полке) в течение всего рабочего времени.
24. Будьте осторожны при переноске кислот и других опасных жидкостей в бутылках! Проверяйте исправность тары и бутылей, прежде чем нести бутылку! При наличии в бутылке трещин производите разлив, не вынимая бутылки из корзины! При переливании опасных жидкостей пользуйтесь специальными сифонами; надевайте предохранительные очки, резиновые перчатки и передник! Бутылки с кислотами, щелочами и другими едкими веществами следует переносить вдвоем в специальных ящиках или корзинах или перевозить на специальной тележке. Совершенно недопустим перенос едких жидкостей и кислот в открытых сосудах по лестницам!

1.5.5. Работа с приборами

При работе с приборами необходимо придерживаться следующих правил:

1. При эксплуатации приборов и другого оборудования необходимо строго руководствоваться правилами (инструкциями), изложенными в технических паспортах, прилагаемых к приборам и оборудованию заводом-изготовителем. Возле каждого прибора должна находиться инструкция по эксплуатации.

2. Металлические корпуса всех электроприборов и электродвигателей (автоклавов, центрифуги, муфельные печи, сушильные шкафы и т.д.) должны быть обязательно заземлены.
3. Следует регулярно проверять исправность электроприборов и электрооборудования. Использование неисправных электроприборов и электрооборудования запрещается.
4. Оценка состояния электронагревательных приборов начинается с изучения состояния подводящего электроэнергию шнура, который должен иметь хорошую изоляцию.
5. В целях электробезопасности следует пользоваться электроплитками с закрытой спиралью.
6. При эксплуатации центрифуг необходимо соблюдать правила строгого попарного уравнивания при загрузке их роторов стаканами или пробирками; перед включением центрифуги в электрическую сеть нужно проверить, хорошо ли привинчена крышка к корпусу; при включении центрифуги следует плавно (постепенно) увеличивать угловую скорость вращения ротора. После отключения надо дать возможность ротору остановиться, тормозить рукой запрещается; после работы центрифугу нужно осмотреть и протереть.
7. При эксплуатации термостата запрещается ставить в него легко воспламеняющиеся вещества; чистку термостата следует проводить только после отключения от сети.
8. Холодильники (рефрижераторы) нельзя устанавливать и перемещать в другие помещения без участия специалиста.
9. Электроплиты, муфельные печи и другие нагревательные приборы должны устанавливаться на подставке из асбеста или другого теплоизолирующего материала. Нельзя допускать попадания на них кислот, щелочей, растворов солей и т.д.

1.5.6. Обращение с лабораторным стеклом и мытье посуды

При обращении с лабораторным стеклом и мытье посуды необходимо придерживаться следующих правил:

1. Требуется постоянно соблюдать меры предосторожности при работе со стеклом (резание стеклянных трубок и другие манипуляции). Следует избегать поломки стеклянных трубок и других частей стеклянных приборов при их сборке во избежание ранений (порезов).
2. При работе с вакуум-насосом стеклянную посуду, находящуюся в условиях разряженного воздуха, нужно накрывать полотенцем, чтобы избежать разлета осколков стекла в случае взрыва.
3. Если в стеклянной посуде (колбах, мензурках, пробирках) производится кипячение растворов, нельзя закрывать стеклянные изделия пробкой до полного остывания раствора.
4. При мытье посуды необходимо соблюдать такие же меры безопасности, как при работе с кислотами и щелочами.

5. При обработке стеклянной посуды хромовой смесью ее необходимо промыть водой во избежание взрыва и выбрасывания! При мытье пипеток хромовую смесь в них набирают при помощи резиновой груши.
6. В некоторых случаях посуду можно мыть одними только концентрированными кислотами или щелочами, которые легко отмывают жирные или смолистые загрязнения.
7. После мытья посуду необходимо прополоскать большим количеством воды, так как моющие растворы при смешивании могут образовывать опасные соединения.
8. Лабораторную посуду, содержащую растворы едких веществ, во избежание ожогов пальцев рук следует мыть в резиновых перчатках.

1.5.7. Спецодежда и требования к ней

Средствами индивидуальной защиты при работе в лабораториях химического профиля являются халаты (из плотной белой или черной ткани), косынки или шапочки, прорезиненный или полиэтиленовый фартук, резиновые перчатки, защитные очки, противогаз.

Прорезиненный или полиэтиленовый фартук, резиновые перчатки, защитные очки (должны плотно прилегать к лицу) необходимы при работе с едкими веществами.

Каждый работающий в лаборатории должен иметь два полотенца, одно из которых предназначено для постоянного пользования и находится всегда под рукой, другое – исключительно для чистых работ.

1.5.8. Работа с инфицированным материалом

Содержащие инфицированный биологический материал банки и пробирки обтирают дезинфицирующим раствором и ставят на металлические подносы, кюветы или в штативы.

Перед проведением бактериологических исследований следует тщательно проверить целостность стеклянной посуды, проходимость игл и поршней у шприцев. Запрещается прикасаться руками к исследуемому материалу и конденсату воды в засеянных чашках. Работу с инфицированным материалом нужно проводить с помощью инструментов (пинцетов, игл, петлей, корнцангов и т.д.).

В процессе проведения исследований необходимо соблюдать следующие меры предосторожности:

1. Посев в пробирки и чашки Петри проводить только около горячей горелки с обжиганием петли, шпателя и краев пробирки.
2. Не допускать переливания инфицированных жидкостей из одной емкости в другую через край сосуда.
3. Осуществляя посев биологического материала, в обязательном порядке делать надписи на пробирках, чашках, колбах и прочей посуде с указанием названия материала, номера анализа и даты посева.
4. Не проводить другие виды работ в комнате, предназначенной для обработки и посева инфицированного материала.

5. После окончания работ использованные предметные стекла, пипетки, шпатели погружают на одни сутки в банки с дезинфицирующим раствором, затем моют и кипятят.
6. Посуду с использованными питательными средами, калом, мочой и другими материалами, взятыми от инфекционных больных, собирают в баки и обеззараживают автоклавированием, обработкой дезинфицирующим раствором или кипячением. Не следует оставлять на столах инфицированные мазки, чашки Петри, пробирки и другую посуду с инфицированным материалом.
7. По окончании работ и при перерыве в работе поверхность рабочих столов необходимо обработать дезинфицирующим раствором, руки обмыть дезинфицирующим раствором, а затем – теплой водой с мылом.
8. При уборке помещения в конце рабочего дня полы моют с применением дезинфицирующего раствора; стены, двери, полки, подоконники, окна, наружную поверхность лабораторной мебели протирают дезинфицирующим раствором. Все дезинфекционные работы персонал лаборатории должен проводить в резиновых перчатках.
9. Правила техники безопасности при работе с биологическим материалом состоят в использовании отдельной, а также специальной посуды, подвергаемой стерилизации.
10. Новую стеклянную посуду, предназначенную для бактериологических исследований, ополаскивают водой, затем кипятят в течение одного часа в 1–2% растворе хлористоводородной (соляной) кислоты во избежание выщелачивания стекла и растрескивания, промывают в содовом растворе (в сочетании с механической обработкой ершиком), ополаскивают проточной и дистиллированной водой. В полностью высушенные колбы и пробирки вставляют ватные пробки, которые готовят из простой необезжиренной или гигроскопической ваты. Сначала берут кусочек ваты соответственно размеру горлышка и, положив на стол, придают ему форму четырехугольной пластинки. Затем все четыре края ее загибают внутрь, чтобы получилась ленточка, ширина которой равнялась бы длине пробки. Из этой ленточки скатывают валик, по диаметру несколько меньший, чем отверстие пробирки. Этот валик несколько раз прокатывают между ладонями рук, после чего надевают на него ватный колпачок и вдвигают полученную пробку в горлышко колбы или пробирки. Края колпачка заворачивают наружу. Пробка считается хорошо приготовленной, если при вынимании ее из горлышка слышен слабый цокающий звук. Пробка должна выступать над краем на 1/3 своей длины. Пробирки затыкают комочком ваты, притом не очень плотно.
11. Посев исследуемого материала на питательные среды производится с помощью петель, стеклянных шпателей и пипеток. В бактериологической лаборатории для выращивания микробов используют питательные среды, искусственно созданные субстраты различного со-

става, на которых могут размножаться микроорганизмы. Весь процесс посева на питательные среды должен проводиться в стерильных условиях, поэтому лучше производить его в специально приспособленных боксах – помещениях, отгороженных от общей лабораторной комнаты. Посев в пробирку производят над пламенем горелки. Сначала обжигают быстрым движением верхнюю часть пробирки и пробку. Затем, открыв пробирку и держа в правой руке пробку, заранее обожженной петлей быстро берут исследуемый материал и вносят его в пробирку со средой, после чего пробку и отверстие пробирки вновь обжигают и плотно закрывают пробкой.

12. Для приготовления препаратов из выращенных на питательных средах культур микроорганизмов необходимо иметь предметные стекла, склянки для красителей, чашку для окрашивания препаратов и пр.

1.6. Оказание помощи пострадавшим

На случай необходимости оказания первой помощи в лаборатории всегда должны быть: бинты, гигроскопическая вата, 3% раствор йода, 2% раствор борной кислоты, 5% раствор уксусной кислоты, 35% раствор двууглекислого натрия, коллодий, нашатырный спирт (аммиак), 5% раствор марганцовокислого калия.

При *ранениях стеклом* следует удалить его осколки из ранки (если они там есть), смазать ранку йодом и перевязать ее.

При *термических ожогах* первой степени обожженное место следует присыпать двууглекислым натрием, рисовым или картофельным крахмалом или тальком. Хорошо помогают примочки из свежеприготовленных растворов питьевой соды (2%) или марганцовокислого калия (5%). При более тяжелых или обширных ожогах следует обратиться к врачу. В порядке оказания первой помощи при ожогах второй и третьей степени допустимы примочки только из растворов марганцовокислого калия (1% раствор).

При *химических ожогах* кислотами и щелочами производят немедленное 5–10-минутное обильное промывание пораженного участка кожи водой под краном с последующим накладыванием сухой повязки. Категорически запрещается протирание пораженных мест сухой или влажной ватой, бинтом или другим материалом, так как при этом происходит вторичное вещества в кожу, что усугубляет ожог.

При попадании кислоты или щелочи в глаза следует промыть их большим количеством воды, разбавленным раствором питьевой соды (при попадании кислоты), насыщенным раствором борной кислоты (при попадании щелочи). После первичной обработки глаз пострадавшего нужно отправить к врачу.

Оказание помощи при *отравлениях* сводится прежде всего к удалению яда из организма. Для этого нужно вызвать рвоту приемом внутрь 3–4 стаканов мыльной воды, стакана теплой воды, в котором растворена 1 ч.л. гор-

чицы, 1 ст.л. 1% раствора сульфата меди (через 5–10 мин) или половины стакана теплой воды, в котором растворено 0,25 г сульфата меди.

При отравлении кислотами и щелочами вместо дачи рвотного средства осуществляют промывание желудка. Если яд достиг кишечника, применяют слабительное средство; если яд всосался в кровь, используют потогонные или мочегонные средства.

Далее приступают к обезвреживанию яда. При отравлении щелочью принимают 1% раствор уксусной кислоты; при отравлении кислотой принимают внутрь жженую магнезию (2 ст.л. на стакан воды), сначала выпивают полстакана, а затем пьют по 1 ст.л. через каждые 10 минут. Используют также обволакивающие средства. Ими являются молоко, белковая вода (2 яичных белка на 3 стакана воды – принимают стаканами), крахмальный клейстер, мучная болтушка, чай, кофе, танин (0,1–0,2 г в 1/4 стакана воды).

Применяют абсорбирующие вещества. В качестве таковых используют животный или древесный уголь (1 ст.л. угля на 2 стакана воды; полученную смесь выпивают). Одновременно с приемом угля для последующего удаления его из организма следует употребить слабительные средства (горькую или глауберову соль).

Применяют также смесь из 50 г древесного угля, 25 г жженой магнезии, 25 г танина; смесь просеивают сквозь сито и взбалтывают в половине стакана воды (принимают по 1 ст.л. каждые 5–10 минут).

При поражении электрическим током следует разомкнуть электрическую цепь, выключить ток, пересечь провод, отвести его от пострадавшего сухой палкой или веревкой, отделить от земли, оттащить пострадавшего от провода, затем провести искусственное дыхание пораженному электрическим током.

1.7. Противопожарная безопасность

При работе в лаборатории для соблюдения требований противопожарной безопасности необходимо придерживаться следующих правил:

1. В коридоре на видном, хорошо доступном месте должны быть щит с набором противопожарного инвентаря, установленные пожарный гидрант и огнетушитель. В помещениях, где производится работа с нагревательными приборами и взрывоопасными реактивами, должны находиться огнетушитель, ящик с сухим мелким чистым песком, асбестовое или суконное одеяло или кошма, совок или лопата.
2. При возникновении пожара персонал должен самостоятельно принимать меры для его ликвидации, одновременно оповестив о пожаре администрацию учреждения.
3. При ликвидации очага возгорания надо пользоваться сухим песком и огнетушителем! *Помните!* Вода часто не только не тушит загоревшиеся жидкости, но способствует их разбрызгиванию и тем самым вызывает распространение пожара.

4. При проведении всех работ, связанных с использованием горючих веществ, поблизости не должно быть открытого огня (газовой горелки, открытого электрического нагревателя и пр.).
5. При загорании одежды нельзя допускать быстрых движений – это раздувает пламя. Для тушения загоревшейся одежды набросьте на пострадавшего кошму или пальто.
6. Не заменяйте штатный предохранитель электросети проволочным «жучком», это может вызвать искрение, которое в лаборатории опаснее, чем в других местах, так как в воздухе ее помещений могут быть горючие газы и пары, образующие взрывоопасную смесь.
7. Нельзя использовать в лаборатории открытые, неизолированные электрические провода, так как они могут стать причиной особо опасного в условиях лаборатории искрения!
8. При загорании проводов немедленно отключите электрический ток. Тушите загоревшиеся провода только сухим песком. Применение воды или пенного огнетушителя для тушения в данном случае *недопустимо!*
9. Баллоны с газами нельзя хранить в местах, освещаемых прямыми солнечными лучами, их не следует располагать вблизи нагревательных и отопительных приборов, нельзя допускать их соприкосновения с электрическими проводами! Баллоны со сжатым газом должны иметь предохранительные колпачки.

Расстояние от радиаторов и других отопительных приборов до баллонов должно быть не менее 1 м, а от печей и других источников тепла с открытым огнем – не менее 5 м. При наличии у отопительных приборов экранов, предохраняющих баллоны от местного перегрева, расстояние между экраном и баллоном должно быть не менее 10 см. Баллоны должны быть тщательно закреплены в вертикальном положении.

10. Вентиль баллона с газом нужно открывать осторожно! Опасайтесь слишком быстрого выпуска газа из баллона: *возможен взрыв!*

Смесь газа с воздухом взрывоопасна! При появлении запаха газа следует быстро проветрить помещение. Нельзя зажигать огонь и включать электрические приборы в сеть до полного удаления газа.

11. Сушите только небольшие количества взрывоопасных веществ и при сушке их не превышайте допустимые пределы температуры в сушильном шкафу. Не запирайте дверцу сушильного шкафа, так как ее свободное открывание ослабляет разрушительное действие случайного взрыва.
12. Отработанные горючие жидкости нужно собрать в специальную герметично закрывающуюся тару и передать для регенерации или уничтожения. Спуск таких жидкостей в канализацию воспрещается, можно зарыть их в землю.

Использованные кислоты и щелочи следует собирать отдельно в специально предназначенную посуду. Небольшие количества агрессивных веществ можно выливать в раковину лишь после сильного разведения их водой.

13. Для слива отходов летучих веществ, распространяющих резкий, неприятный запах, необходимо предусмотреть раковину в вытяжном шкафу с подведенным к ней водопроводным краном.
14. Ответственность за хранение и учет сильнодействующих, взрывоопасных и огнеопасных веществ и растворителей в лаборатории должна возлагаться приказом на заведующего лабораторией (при его отсутствии – на лицо, выполняющее его функции).
15. Ответственность за использование ядовитых, сильнодействующих, взрыво- и огнеопасных средств и растворителей, выданных для проведения практических занятий с учащимися, несет преподаватель, проводящий их.
16. При возникновении пожара в лаборатории требуется:
 - не давать пламени приближаться к местам, где хранятся легко воспламеняющиеся вещества;
 - убрать все огнеопасные и взрывчатые вещества в безопасное место (которое следует особо предохранять от пламени);
 - немедленно использовать все имеющиеся под рукой средства тушения, одновременно вызвав местную пожарную охрану.
17. Следует помнить о том, что огнетушители подлежат периодической проверке, в случае необходимости – перезарядке, а с инструкцией по обращению с огнетушителями должны быть знакомы все работники лаборатории.
18. Периодически необходимо проводить обучение технологии тушения пожара.
19. Особое внимание следует обращать на состояние электрических проводов, электророзеток и электроприборов, которые должны всегда содержаться в исправном состоянии (во избежание возникновения пожароопасной ситуации).

1.8. Основные принципы осуществления производственной деятельности сотрудников лаборатории. Лабораторная документация

Рабочий день в лаборатории следует организовывать рационально. Все процедуры нужно выполнять точно и аккуратно, быстро, но без спешки, которая неизбежно приводит к ошибкам. Необходимо бережно относиться к аппаратуре, постоянно изучать и строго соблюдать правила техники безопасности при пользовании электрическими и другими приборами, применении ядовитых, взрыво- и огнеопасных веществ.

В лаборатории нужно иметь самые необходимые справочные пособия, книги и учебники.

Персонал должен быть обучен оказанию пострадавшим необходимой первой помощи при несчастных случаях. В медицинской аптечке следует иметь основные средства для оказания первой помощи (в том числе пе-

ревязочные материалы). Особое внимание следует уделять соблюдению санитарно-эпидемиологического режима в лаборатории.

1.8.1. Лабораторная документация

К числу документов, наличие которых обязательно для выполнения работ в КДЛ, относятся:

1. *Паспорт клиничко-диагностической лаборатории* (утвержденный приказом главного врача ЛПУ), состоящий из титульного листа и форм (в виде таблиц), отражающих сведения о:
 - перечне выполняемых в КДЛ исследований;
 - имеющихся средствах измерения (аппаратуре);
 - имеющемся вспомогательном оборудовании;
 - имеющихся стандартных контрольных материалах;
 - мерной посуде, применяемой в КДЛ;
 - штатном обеспечении и кадровом составе КДЛ;
 - помещениях КДЛ.
2. *Положение о клиничко-диагностической лаборатории* (должно быть утверждено приказом главного врача ЛПУ).
3. *Должностные инструкции* (функциональные обязанности) для каждой категории работников, на каждого сотрудника, утвержденные в установленном порядке.
4. *Инструкции по санитарно-противоэпидемическому режиму* для каждого участка, вида работ.
5. *Инструкции по охране труда и технике безопасности* для каждого участка, вида работ.
6. *Инструкции по противопожарной безопасности* (должны быть утверждены главным врачом и председателем профкома ЛПУ) для каждого участка, вида работ. Инструкции должны включать раздел о действиях персонала при различных видах аварий, обновляться ежегодно и по необходимости.

Все сотрудники КДЛ должны быть ознакомлены с действующими инструкциями. После проведения инструктажа в журнале инструктажа по технике безопасности и санитарно-противоэпидемическому режиму делается соответствующая отметка, каждый работник также расписывается на должностной инструкции. Рабочие экземпляры инструкции должны иметься на рабочих местах.

7. *Нормативно-техническая документация, инструкции по эксплуатации средств измерений*, в том числе приказы Министерства здравоохранения Республики Беларусь и МЗ и СР РФ об унификации методов исследований, перечни утвержденных соответствующими регулирующими органами методов исследования, инструкции к наборам реагентов, руководства по эксплуатации анализаторов.

Папка с основными экземплярами методик хранится у заведующего КДЛ. Рабочие экземпляры должны быть на рабочих местах. Папки инструкций по проведению исследований должны включать протоко-

лы построения калибровочных графиков. Калибровка приборов проверяется каждое полугодие и по необходимости.

8. *Описание используемых методов лабораторного анализа*, в том числе унифицированных.
9. *Учетная документация* в соответствии с профилем деятельности КДЛ: журналы регистрации исследований, учета количества выполненных анализов, приготовления и контроля питательных сред, контроля работы стерилизаторов, листок ежедневного учета работы, бланки анализов и др.

Для статистической отчетности в лаборатории необходимо вести дневники работы каждого специалиста, в которых ежедневно учитывается вся номенклатура выполненных им исследований. Ведется также дневник количества выполненных исследований по структурным подразделениям ЛПУ. На основании данных дневников ежемесячно заполняется журнал учета количества выполненных анализов в лаборатории. При ведении журнала учета количества анализов допускается выделение отдельных страниц для учета:

- количества анализов по всей номенклатуре без разбивки по отделениям;
- количества анализов по отделениям без разбивки по номенклатуре, но с разбивкой по группам исследований (биохимические, гематологические, общеклинические и др.).

Дополнительно ежемесячно рассчитываются нагрузка лаборатории (при необходимости – отделов лаборатории, отдельных сотрудников) в соответствии с нормативами затрат рабочего времени на лабораторные исследования, а также показатели уровня лабораторного обследования больных (количество анализов на больного, на койко-день, на 100 посещений и др.).

Журналы регистрации результатов исследования должны иметь регистрационный номер ЛПУ, оформленный титульный лист с указанием ЛПУ, названия лаборатории, групп регистрируемых исследований, дат начала и окончания ведения журнала. Журналы должны быть пронумерованы, прошнурованы, скреплены подписью руководителя ЛПУ и печатью, не иметь исправлений. В наименованиях граф (столбцов) результатов должны быть указаны единицы измерения данного показателя. Каждый день в начале работы в журналах регистрации результатов исследований отмечаются физические параметры в рабочих помещениях КДЛ (температура, атмосферное давление, влажность). Столбцы результатов каждого вида исследований за каждый день подписываются непосредственным исполнителем вида исследований. Журналы регистрации результатов исследований хранятся в архиве ЛПУ или в КДЛ в течение 3 лет.

Результаты исследований выдаются КДЛ *на бланках утвержденных образцов*, с обязательным указанием единиц измерений, значений диапазона референтных (нормальных) величин, при необходимости –

методики определения. Бланк результатов исследования датируется и подписывается исполнителем, ответственным сотрудником или ведущим КДЛ.

10. *Журнал учета этилового спирта.*
 11. *Журнал учета сильнодействующих и ядовитых веществ.*
 12. *Журнал учета проведения внутрилабораторного контроля качества.*
Если в КДЛ ежедневно ведется только контроль воспроизводимости, то он должен дополняться хотя бы периодически (1–4 раза в месяц) контролем правильности.
- Документацией по внутрилабораторному контролю качества являются контрольные карты (с регистрацией результатов исследования контрольных проб и расчетом статистических показателей качества исследований в КДЛ) и журнал регистрации результатов исследований контрольных проб.
13. *Отчет о деятельности КДЛ.*
 14. *Графики поверки средств измерений, свидетельства о поверке.*
 15. *Копии заявок на приобретение контрольных и калибровочных материалов и сывороток, посуды, реактивов.*

1.8.2. Схема исследований в КДЛ

Схема исследований в КДЛ полностью зависит от требований лечебных учреждений. Как правило, в общеклиническом, гематологическом, биохимическом, изосерологическом и бактериологическом подразделениях лаборатории существует своя схема. Она включает в себя забор (взятие) материала в отделениях и доставку его в лабораторию сотрудниками лечебного отделения, регистрацию, первичную обработку и проведение необходимых исследований. После выполнения исследований результаты анализов (на бланках) доставляются в отделения, или бланки кладутся в раскладку.

1.8.3. Основные показатели деятельности КДЛ

К основным показателям деятельности КДЛ относятся:

1. Среднедневная нагрузка на одного специалиста клинической лабораторной диагностики, которая рассчитывается как число выполненных в КДЛ анализов за год, деленное на произведение числа рабочих дней в году и числа занятых должностей.
2. Количество анализов, выполненных на одного больного в стационаре, которое рассчитывается делением общего числа анализов за год на общее число больных за год.
3. Число анализов на 100 амбулаторных посещений у врача (за год), которое рассчитывается как результат деления общего числа анализов амбулаторных больных за год на общее число амбулаторных посещений у врача, умноженный на 100.
4. Число анализов на одного жителя (за год), которое рассчитывается делением общего числа анализов по поликлинике за год, деленное на численность населения, прикрепленного к поликлинике.

5. Нагрузка на койку в год и в день. Для подсчета этих показателей необходимо количество исследований за год разделить на количество коек в больнице (нагрузка на койку в год) и результат разделить на количество рабочих дней в году (нагрузка на койку в день).
6. Количество исследований на одного больного, которое рассчитывается делением всего количества исследований на количество больных в больнице.

1.9. Санитарно-эпидемиологический режим и требования к его выполнению в клиничко-диагностической лаборатории лечебно-профилактического учреждения

Используемый для установления диагноза заболевания биологический материал (мокрота, кровь, слюна и др.) представляет опасность заражения сотрудников лаборатории вирусными и другими инфекциями. В связи с этим при работе с ним требуется соблюдать особые меры предосторожности.

Прежде всего необходимо предотвратить возможность непосредственного контакта биологического материала с кожными покровами и слизистыми оболочками сотрудника лаборатории. Для этого все исследования нужно производить, используя халаты, сменную обувь и медицинские шапочки. При угрозе забрызгивания кровью или другими биологическими жидкостями работу необходимо выполнять в масках, очках, с обязательным применением клеенчатого фартука. Нужно взять за правило постоянно использовать резиновые перчатки. При этом все повреждения на коже должны быть закрыты лейкопластырем или закрыты напальчниками. Обработку лабораторной посуды нужно осуществлять только после ее предварительной дезинфекции.

В случае попадания на кожу каплей крови (или других потенциально инфицированных жидкостей) следует немедленно, в течение 2 мин, произвести обработку соответствующих участков кожи тампоном, обильно смоченным 70° этиловым спиртом, а затем вымыть с мылом под проточной водой и вытереть индивидуальным полотенцем. При загрязнении перчаток кровью их необходимо протереть тампоном, смоченным 3% раствором хлорамина или 6% раствором перекиси водорода. В случае попадания крови на слизистые оболочки их немедленно обильно промывают водой или, лучше, 1% раствором борной кислоты; слизистую носа обрабатывают 1% раствором протаргола; рот и горло прополаскивают 70° этиловым спиртом, или 1% раствором борной кислоты, или 0,06% раствором марганцовокислого калия.

Запрещается пипетирование крови ртом, для этого следует использовать специальные автоматические пипетки, в крайнем случае – насаженную на конец пипетки резинову грушу соответствующего объема. При загрязнении кровью или биологическими секретами мебели, инвентаря, прибо-

ров их следует немедленно дважды протереть ветошью, ватными или марлевыми тампонами, обильно смоченными в дезинфицирующих растворах. Исползованную ветошь сбрасывают в емкость с дезраствором, которую маркируют надписью «Для дезинфекции использованной ветоши».

Средства для дезинфекции, стерилизации и защиты персонала от инфекций поставляются разными производителями, в том числе НПФ «Абрис +» (Россия), фирмой «Pliva-Lachema» (Чехия), НПЦ «ЭКО-Сервис» (Россия) и др.

В практике работы клиничко-диагностических лабораторий ЛПУ Белоруссии широко используются отечественные дезинфицирующие средства, а также дезсредства производства совместных предприятий Белоруссии с иностранными фирмами.

Для обработки рук и перчаток можно использовать антисептическое средство Септодез на основе этилового спирта (ЗАО «БелАсептика», Белоруссия), Септодез без спирта используется только для обработки перчаток.

Для антисептики рук используются:

1. Спиртосодержащие средства:
 - Септоцид-Синерджи и Септоцид-Р плюс (ЗАО «БелАсептика», Белоруссия);
 - Инол (ИП «Инкраслав», Белоруссия).
2. Антисептические средства без спирта:
 - ДезОр – на основе бигуанида (ЗАО «БелАсептика», Белоруссия);
 - Аквин – полигексаметилгуанидина фосфат (ПГМГ-фосфат) (ИП «Инкраслав», Белоруссия).

Для обработки поверхностей изделий медицинского назначения – пробирок, колб и т.д. – используются препараты (дезинфицирующие средства для внешних объектов), которые подразделяются на следующие группы:

1. Четвертичные аммонийные соли (ЧАС); препаратами на их основе, в частности, являются препараты Анасепт (ИП «Инкраслав», Белоруссия), Полидез, Гриндез, Дескоцид (СООО «БелАсептика-Дез», Белоруссия).
2. Полигуанидины, например, Инкрасепт-10А (ИП «Инкраслав», Белоруссия).
3. Альдегиды (глutarовый альдегид, глуксаль). Альдегиды входят в состав препаратов Флавин, Триасан (ИП «Инкраслав», Белоруссия), а также Гексадекон, КД (комплект дезсредств), Изодез Форте (государственный завод «Изотрон», Белоруссия).
4. Кислородсодержащие дезсредства на основе трех компонентов: надуксусной кислоты, уксусной кислоты и перекиси водорода. К ним относятся препараты Фандим, Фандим Д, Фандим НУК (СООО «БелАсептика-Дез», Белоруссия).
5. Дезсредства на основе перекиси водорода и полигуанидина. К этой группе относится Пероксин (ИП «Инкраслав», Белоруссия) – единственный препарат для инактивации биологических жидкостей (крови, сыворот-

ки, плазмы, мочи, ЦСЖ и т.д.), поверхности лабораторной посуды (стеклянной и др.).

6. Препараты на основе триамина: Аминоцид, Триацид (СООО «БелАсептика-Дез», Белоруссия), Биактин (ИП «Инкраслав», Белоруссия).
7. Препараты для быстрой (в течение 5 мин) обработки поверхности лабораторной посуды, выпускаемые в виде спрея: Ультрацид, в состав которого входят изопропиловый спирт и глутаровый альдегид (СООО «БелАсептика-Дез», Белоруссия), Роса-спрей (ИП «Инкраслав», Белоруссия).
8. Хлорсодержащие дезинфицирующие препараты (на основе дихлоризоциануровой кислоты) производства ЗАО «БелАсептика», Белоруссия: Хлороцид (таблетки), Хлордез (гранулы).

ООО «Научно-производственный центр ХИММЕДСИНТЕЗ» (Республика Беларусь) создана и внедрена в лечебно-профилактические организации серия эффективных препаратов для очистки и дезинфекции поверхностей, предстерилизационной очистки, дезинфекции и стерилизации изделий медицинского назначения, гигиенической обработки кожи рук персонала.

Предприятием разработаны (на основе пероксида водорода) средства для дезинфекции поверхностей, инструментов и оборудования – Крышталлин-Пералин, Крышталлин-Перолюкс, Перосан, а также препарат для гигиенической обработки кожи рук персонала Персепт.

Для обеспечения инфекционной безопасности при оказании медицинской помощи используются такие препараты, как биоцидные вещества, четвертичные аммонийные соединения, гуанидины, амины, спирты, соединения, содержащие активный хлор: Крышталлин-Дезосепт, Крышталлин-Дезамин, Крышталлин-Экодез.

Для очистки поверхностей и дезинфекции оборудования применяются инновационные препараты Крышталлин-Ф (энзимная очистка) и дезинфектант Дезолюкс, содержащие гликолевую кислоту и проявляющие высокую антимикробную активность широкого спектра, что позволяет ограничить применение препаратов на основе надуксусной кислоты и альдегидов.

В практике здравоохранения нашли использование поставляемые предприятием препараты:

- *Аквадез* – средство для экстренной дезинфекции на водной основе. Биоцидное действие препарата обеспечивается полигексаметиленбигуанидина гидрохлоридом (ПГМБ).
- *Дермаклин* – средство для гигиенической обработки кожи рук. Биоцидный эффект доказан в процессе предрегистрационных испытаний. Основа препарата – ПГМБ, агрегатная форма – гель, что позволит минимизировать потери при обработке и визуализировать процесс втирания препарата в кожу.
- *Натасан* – дезинфицирующее средство с моющим эффектом – принципиально новый препарат для отечественного здравоохранения.

Биоцидный эффект обеспечивается активным кислородом *in statu nascendi*. Агрегатное состояние – порошок в упаковке типа «саше», что удобно при использовании и исключает влияние «человеческого фактора» при подготовке рабочих растворов.

Во избежание возникновения резистентности микроорганизмов к воздействию антисептиков следует чередовать препараты каждые 3 месяца.

Взятие крови следует проводить в резиновых перчатках, соблюдая правила асептики, после предварительной обработки резиновых перчаток 70° этиловым спиртом перед каждым взятием крови. Кожу пальца обследуемого перед проколом протирают стерильным тампоном (шариком из ваты), смоченным 70° этиловым спиртом (стерильные тампоны хранят в упаковке из бумаги согласно ОСТ 42-21-2-85 в количестве не более 20 шт.). Прокол кожи проводят стерильными скарификаторами. Извлечение их из стерильной упаковки осуществляется только с помощью пинцета, хранящегося в растворе дезинфицирующих средств. После взятия крови к раневой поверхности прикладывают новый стерильный тампон, смоченный 70° этиловым спиртом.

Для выполнения общеклинических исследований крови сразу же после прокола кожи спускают несколько (не менее 3–4) капель крови на индивидуальное стерильное предметное (часовое) стекло, которое используют для анализа. В ряде случаев кровь непосредственно с капли, выступившей на поверхности кожи пальца пациента после прокола ее индивидуальным скарификатором, набирают в индивидуальные стерильные, предварительно выверенные капилляры объемом 20 мкл и капилляры Панченкова. Капилляры Панченкова предварительно промывают 5% раствором цитрата натрия (соотношение объемов раствора цитрата натрия и крови должно составить 1:4). Широко используется и такой вариант взятия крови: после прокола кожи пальца 6–8 капель крови спускают в стерильную пластиковую пробирку, в которую предварительно внесено небольшое (на кончике глазной лопаточки) количество трилона Б, пробирку с кровью тщательно перемешивают (вращая ее между ладонями). Дальнейший разлив крови с помощью пипеток осуществляется непосредственно в КДЛ.

В последнее время используют специальные пробирки для забора капиллярной крови для гематологических и других видов исследований (например, MiniCollect объемом 500 и 200 мкл, содержащих калиевую соль ЭДТА и закрытых протыкаемой резиновой лепестковой пробкой), что позволяет осуществлять взятие крови и проведение анализа без вскрытия пробирки и, тем самым, предотвратить контакт лаборанта с кровью пациента.

Биологический материал следует транспортировать в пробирках, закрывающихся резиновыми пробками. При этом запрещается помещать бланки направлений в пробирку с кровью (сопроводительную документацию помещают в упаковку, исключающую возможность ее загрязнения биоматериалом). Транспортировку биологического материала в пределах медицинского учреждения осуществляют в специальных контейне-

рах – бюксах с закрывающимися крышками из материала, который не портится при дезинфекции, на дне которых находятся 4 слоя марли, пропитанной дезраствором – допускающих возможность их стерилизационной обработки. При открывании пробок бутылок, флаконов, пробирок с кровью, плазмой, секретами нельзя допускать разбрызгивания содержимого! При хранении потенциально инфицированного материала в холодильнике необходимо поместить его в полиэтиленовый пакет. В случае, если в процессе центрифугирования биоматериала произошло повреждение пробирок, дезинфекционные мероприятия следует проводить не ранее чем через 30–40 мин (за этот промежуток времени происходит осаждение аэрозоля).

При сборе мокроты нужно помнить, что она часто является инфицированным биологическим материалом, поэтому при работе с ней необходимо соблюдать меры безопасности, а именно: осторожно открывать плевательницу с мокротой, не взбалтывать ее во избежание образования инфицирующих аэрозолей (мельчайших капелек мокроты). В целях максимальной защиты сотрудников лаборатории от заражения необходимо готовить и окрашивать препараты в вытяжном шкафу. Манипуляции следует выполнять только на лотке, который необходимо дезинфицировать каждый день после использования – либо термическим способом (огнем), либо обработкой 5% раствором хлорамина.

После выполнения лабораторного исследования весь инструментарий (иглы, скарификаторы, счетные камеры и пр.) и сам биологический материал должны быть подвергнуты дезинфекции. Для этого чаще всего используются следующие дезинфицирующие средства: 3% раствор хлорамина, 3% раствор осветленной хлорной извести, 6% раствор перекиси водорода, 6% раствор перекиси водорода с 0,5% раствором современного моющего средства (например, Лотос, Астра), 0,5% раствор сульфохлоронтина, 0,5% раствор дезоксона-1, а также другие, специально предназначенные для этой цели средства.

Все перечисленные дезинфицирующие растворы применяют однократно. В процессе их использования лабораторную посуду погружают в специальные емкости с крышками. Процедура обеззараживания должна длиться 1 ч.

Используют механические, физические, химические и другие способы обработки инструментария и биологического материала.

Дезинфекция физическим способом обычно сводится к кипячению, эффект которого возрастает при добавлении к дезинфицирующему раствору гидрокарбоната (бикарбоната) натрия и хозяйственного мыла из расчета 20 г бикарбоната и 10–20 г хозяйственного мыла на 1 л раствора. Применяется также водяной пар, уничтожающий не только микроорганизмы, но и споры.

Наиболее распространенными являются химические методы с применением различных дезинфицирующих средств. Так, широко используют процедуру обезвреживания сухой хлорной известью или нейтральным гипохлоритом кальция в соотношении 1:5 в течение 1 ч.

Поверхности столов, загрязненные мокротой, смачивают дезинфицирующим раствором и оставляют в таком состоянии на 6 ч, а затем промывают его теплым 2% раствором соды. По окончании работы остатки мокроты сливают в специальную посуду и обеззараживают сухой хлорной известью (соотношение мокрота : известь 1:5) в течение часа.

Лабораторную посуду, чашки Петри, баночки, предметные стекла обеззараживают погружением их на 1 ч в емкость с одним из дезинфицирующих растворов: 5% раствором хлорамина, 3% раствором осветленной хлорной извести или 6% раствором перекиси водорода.

Пинцеты и другие изделия обрабатывают пламенем или заливают 3% раствором хлорамина. Предметный столик микроскопа и оптическую систему обрабатывают 70° этиловым спиртом. После окончания работы перчатки кипятят в течение 15 мин в 2% растворе соды.

При дезинфекции выделений больного (фекалии, моча, дуоденальное и желудочное содержимое, рвотные массы) их засыпают сухой хлорной известью, белильной известью или нейтральным гипохлоритом кальция (в соотношении 200 г/кг) и оставляют на 60 мин, после чего спускают в канализацию. Если выделения содержат мало влаги, то добавляют воду (в соотношении 1:4). Опорожненную от биологического материала посуду обеззараживают: в 3% растворе хлорамина (или хлорной извести), в 1% растворе гипохлорита в течение 30 мин; в 1% растворе хлорамина, хлорной извести, извести белильной, 0,5% растворе гипохлорита натрия – в течение 60 мин. Затем промывают снаружи и изнутри водой.

По окончании проведения анализа исследуемые пробы вместе с посудой, в которой они доставлялись, обеззараживают в автоклаве при температуре $132\pm 2^\circ\text{C}$ (при давлении 0,2 МПа) в течение 20 мин.

В начале и в конце рабочего дня перчатки протирают двукратно тампоном, обильно смоченным 70° этиловым спиртом, с последующим мытьем водой с мылом. После снятия перчаток руки обрабатывают тампоном, смоченным 70° этиловым спиртом, с последующим мытьем с мылом.

Использованные наконечники, планшеты погружают в емкость с 6% раствором перекиси водорода или 70° этиловым спиртом на 2 ч либо по окончании работы подвергают автоклавированию. Кюветы, оптику, аппаратуру протирают тампоном, смоченным 70° этиловым спиртом, с экспозицией 15 мин с последующим протиранием 96° этиловым спиртом для удаления влаги.

Рабочие поверхности столов, centrifуг, термостатов дважды обрабатывают тампоном, смоченным 70° этиловым спиртом.

Влажная уборка помещений проводится горячим мылосодержащим раствором (температура 50–60°C) ежедневно. Генеральная уборка проводится один раз в неделю с обязательным использованием дезинфицирующих средств.

Уборочный инвентарь (ветошь, мочалки) кипятят в 2% растворе соды или в растворе любого моющего средства в течение 15 мин с момента закипания.

Стерилизацию капилляров, микропипеток, игл-копьев, предметных стекол проводят в крафт-пакетах; каждый пакет содержит индивидуальный набор для пациента.

Стерилизация паровым методом производится под давлением пара 2 атм в течение 20 мин (132°C) или 1 атм – в течение 45 мин (120°C).

Химическая стерилизация проводится с использованием 6% раствора перекиси водорода при 18°C в течение 6 ч.

На рабочих столах для обработки рук и поверхностей, загрязненных потенциально инфицированным биологическим материалом, должны находиться емкости с 6% раствором перекиси водорода, 70° этиловым спиртом.

При дезинфекции изделий, имеющих внутренние каналы, раствором дезинфицирующих средств в объеме 5–10 мл пропускают через канал с помощью груши, что позволяет удалить остатки крови, сыворотки и др. После этого изделия полностью погружают на 1 ч в дезинфицирующий раствор. При погружении инструментов в горизонтальном положении полости каждого из них должны быть заполнены дезинфицирующим раствором.

Кюветы фотометрических приборов, пластиковые пробирки следует обеззараживать только 6% раствором перекиси водорода с последующим промыванием проточной водой.

Спецодежду, загрязненную кровью или биологическими секретами, снимают, предварительно обработав участок загрязнения дезинфицирующим раствором. Стирка спецодежды на дому категорически запрещается. Смену спецодежды осуществляют не менее 2 раз в неделю. Перчатки после окончания работы обеззараживают погружением в 3% раствор хлорамина или 6% раствор перекиси водорода на 1 ч или кипячением в течение 30 мин.

Перед проведением стерилизации инструментов, соприкасавшихся с кровью или другими биологическими жидкостями, для осуществления процедуры полного уничтожения микроорганизмов (их вегетативных и споровых форм) следует провести предстерилизационную очистку.

Предстерилизационная очистка состоит в удалении с изделий белковых, жировых, механических загрязнений и остаточных количеств химических препаратов. Осуществляется она ручным (механическим) способом с применением специальных моющих растворов, например, они могут состоять из 3 (5) г моющего средства Биолот и 997 (995) мл воды (применяется при механизированной очистке струйным методом).

Для ручной очистки используются также 5% раствор Биолота или раствор, состоящий из 17 мл 27% перекиси водорода и 5 г моющего средства и дистиллированной воды в количестве, необходимом для доведения общего объема до 1 л. Посуда погружается в бачок при 55°C на 15 мин. Каждое изделие моют при помощи ершика или ватного тампона, ополаскивают под проточной водой в течение 5 мин, сушат, затем ополаскивают дистиллированной водой и сушат горячим воздухом в сушильном шкафу. Моющий

раствор Биолот используют однократно, так как фермент, входящий в состав этого средства, разрушается при нагревании. Раствор с перекисью водорода, если он не изменил цвет, можно подогревать 6 раз. Качество предстерилизационной очистки изделий оценивают на наличие крови по азопирамовой реакции, на наличие остатков моющих средств – по фенолфталеиновой пробе. Самоконтроль на качество очистки в лаборатории проводится ежедневно. Для контроля берется 1/100 часть от каждого вида обработанных изделий, но не менее 3–5 единиц; при положительной пробе на кровь всю посуду необходимо обработать повторно до получения отрицательного результата.

Предстерилизационную очистку осуществляют также раствором, содержащим 5 г моющего средства Лотос (Прогресс, Айна, Лотос-автомат, Маричка и других аналогичных) и 995 мл воды.

В процессе механической очистки изделий струйным методом, при очистке посуды с применением ультразвука, широко используется раствор перекиси водорода (из 17 мл концентрированного 27,5% раствора перекиси водорода и 978 мл воды).

При применении ручного метода предстерилизационной обработки посуду погружают на 15 мин в раствор моющего средства, подогретый до температуры 40–45°C. Качество предстерилизационной очистки изделий оценивают на наличие крови путем постановки азопирамовой пробы, а также на наличие остаточных количеств щелочных компонентов моющего вещества, для чего ставится фенолфталеиновая проба.

Азопирамовый тест позволяет выявить наличие гемоглобина, пероксида растительного происхождения (растительных остатков). Он становится положительным при наличии окислителей (хлорамина, хлорной извести, стирального порошка с отбеливателями, хромовой смеси для обработки посуды и др.), а также ржавчины (оксидов и солей железа) и кислот.

При положительной пробе на кровь всю партию обработанных изделий подвергают повторной обработке до получения отрицательных результатов.

Контроль качества предстерилизационной очистки осуществляют сотрудники санитарно-эпидемиологической станции 1 раз в квартал.

Методика выполнения азопирамовой пробы для оценки качества предстерилизационной очистки изделий

Реактивы:

1. Амидопирин медицинский (порошок).
2. Анилин солянокислый (чда или ч).
3. Перекись водорода, 3% раствор.
4. Этиловый 96° спирт, ректификат.

Приготовление исходного (основного) раствора азопирама

В сухую посуду вносят 100 г амидопирин и 1,0–1,5 г солянокислого анилина. Смесь тщательно перемешивают стеклянной палочкой, вносят в нее порциями этанол, доводя объем раствора до 1 л.

При необходимости приготовления исходного раствора в меньшем объеме количество компонентов пропорционально уменьшают (при большом объеме исследований его готовят порциями по 50–200 мл).

Раствор годен к употреблению в течение 2 мес. при условии его хранения в темноте при 4°C и не более 1 мес. в случае хранения в темноте при комнатной температуре.

Рабочий раствор азопирама готовят из основного внесением в него перекиси водорода (в качестве окислителя) непосредственно перед использованием. Для этого смешивают равные объемы исходного раствора азопирама и перекиси водорода. В присутствии следов крови сразу или не позднее чем через 1 мин после контакта реактива с загрязненным участком появляется окрашивание: вначале фиолетовое, быстро переходящее в сиреневое или буроватое (розово-сиреневое). Окрашивание, появившееся позже чем через 1 мин после обработки исследуемых предметов, не учитывается (при наличии на исследуемых предметах ржавчины и хлорсодержащих окислителей возникает буроватое окрашивание).

Для оценки пригодности рабочего раствора азопирама 2–3 его капли наносят на кровавое пятно. Если не позже чем через 1 мин появляется фиолетовое окрашивание, переходящее затем в сиреневый цвет, реактив пригоден к употреблению. Если окрашивание в течение 1-й минуты не появляется, реактивом пользоваться нельзя.

Исследуемые изделия должны иметь комнатную температуру (желательно, не выше 25°C); нельзя подвергать проверке горячие изделия или держать рабочий раствор на ярком свете или при повышенной температуре (например, вблизи нагревательных приборов).

Обработку поверхности изделий производят тампонами, смоченными реактивом (или вносят несколько капель реактива на изделия с помощью пипетки). При обработке шприцев внутрь их вносят 3–4 капли рабочего раствора и несколько раз продвигают поршень для того, чтобы смочить реактивом внутреннюю поверхность шприца, особенно места соединения стекла с металлом, где чаще всего остается кровь. Реактив в шприце оставляют на 0,5–1 мин, после чего его выпускают на марлевую салфетку.

Обработку игл производят пропусканием через них 3–4 капель реактива на марлевую салфетку. Очистку катетеров или других полых изделий осуществляют пропусканием через них (в течение 0,5–1 мин) рабочего раствора азопирама, нагнетаемого с помощью шприца.

Примечание. Рабочий раствор азопирама должен быть использован в течение 1–2 ч. При более длительном его хранении возможно появление спонтанного розового окрашивания раствора. Если это окрашивание мешает работе, а исследование необходимо продолжить, следует заменить изменивший цвет раствор свежим. При температуре выше 25°C рабочий раствор розовеет быстрее, поэтому его рекомендуется использовать в течение 30–40 мин.

Следует соблюдать особую осторожность при обращении с солянокислым анилином и концентрированным раствором перекиси водорода (пер-

гидролем), при приготовлении раствора перекиси водорода из пергидроля нужно пользоваться резиновыми перчатками. Поскольку в состав раствора входит этанол, необходимо остерегаться его возгорания.

После проведения дезинфекции и предстерилизационной очистки приступают к стерилизации шприцев, пробирок и других изделий химическим, воздушным и паровым методом.

При проведении серологической диагностики СПИДа осуществляют особый противоэпидемический режим, описанный в соответствующих инструкциях.

В конце рабочего дня поверхность всех столов следует продезинфицировать. Это нужно делать немедленно в случае отмеченного в ходе работы их загрязнения.

Все помещения лаборатории следует содержать в идеальной чистоте. Для этого уборку помещений осуществляют не менее 1 раза в сутки.

1.10. Основные этапы клинико-лабораторного анализа

Клинико-лабораторный анализ включает в себя:

1. Подготовку необходимой посуды и приготовление реактивов.
2. Взятие материала, хранение его и подготовку к исследованию.
3. Выделение из анализируемого биологического материала соответствующих соединений (если это предопределено ходом исследования).
4. Определение количественного содержания вещества либо активности фермента в специально обработанной пробе.
5. Представление полученных данных в соответствующей размерности величин.
6. Оценка (интерпретация) данных клинико-лабораторного исследования.

Глава 2. ЛАБОРАТОРНАЯ ПОСУДА, УХОД ЗА НЕЙ, МЕТОДЫ ОЧИСТКИ. ВСПОМОГАТЕЛЬНЫЕ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ

2.1. Лабораторная посуда (общие сведения)

Лабораторная посуда может быть общего, специального назначения и мерная.

К лабораторной посуде *общего назначения* относятся изделия, используемые для проведения большинства технологических процедур. Это воронки, плоскодонные и конические колбы, промывалки, химические стаканы, кристаллизаторы, холодильники, сифоны и др.

К лабораторной посуде *специального назначения* относятся те изделия, которые предназначаются для выполнения отдельных, специальных процедур: эксикаторы, склянки Вульфа, дефлегматоры, аппарат Киппа, колбы для дистилляции (круглодонные), колбы Кьельдаля и некоторые другие.

Мерная лабораторная посуда – это мензурки, пипетки, бюретки, мерные цилиндры, мерные колбы, градуированные пробирки.

Лабораторная посуда изготавливается как из стекла, так и из пластмасс, других химических материалов (фарфора, металла).

Стеклоянная и пластиковая лабораторная посуда производится и поставляется рядом предприятий и фирм, аккредитованных в России, Белоруссии и других странах СНГ, в том числе: НПФ «Абрис +» (Россия); «Амтео М» (Россия); «Гален» (Россия) – поставщик изделий из пластика для клинических лабораторных исследований; «Гем» (Россия) – поставщик пробирок с пробками (в том числе с антикоагулянтами), микропробирок, пипеток, наконечников, пластиковой лабораторной посуды; «Лаб-Троникс» (Россия) – поставщик лабораторного «пластика», «Медицинская компания ОМБ» (Россия) – поставщик лабораторной пластиковой посуды. Фирма «МиниМед» (Россия) – производитель и поставщик бюксов, воронок, капельниц, колб, пробирок, спиртовок, стаканов, холодильников, эксикаторов и пр., мерных изделий (бюреток, колб мерных, мензурок, пипеток, пробирок мерных, цилиндров), кювет для фото/спектрометрии, а также лабораторной посуды и принадлежностей из пластмассы (штати-

вы для предметных стекол, пробирок, наконечников, пипеток; наконечники к дозаторам, пробирки, стаканы, цилиндры): стеклянных изделий для медицинских и микробиологических лабораторий (ареометры-урометры, камеры Горяева, капилляры гематокритные и для определения СРБ, СОЭ, пипетки Пастера, Сали, стекла предметные и покровные, емкости и штативы для окраски мазков, часы песочные, часы процедурные), а также скарификаторов. «МиниМедЛаб» (Россия) – производитель лабораторной посуды, обеспечивает комплексное оснащение КДЛ пробирками, мерными изделиями из стекла (колбы, мензурки, цилиндры, бюретки, пипетки, ареометры), стеклами предметными и покровными, чашками Петри, пластиковой посудой. Компания «Ольвекс Диагностикум» (Россия) осуществляет поставку лабораторной посуды; НПЦ «ЭКО-Сервис» (Россия) – изделий из высококачественного лабораторного стекла; ООО «Файн Хемикалс» (Белоруссия, представитель фирмы «Fine Chemicals», Австрия) обеспечивает комплексное оснащение лабораторий специальной посудой (в том числе компании «Brandt», Германия). В Белоруссии лабораторная посуда из пластмасс, стекла и других материалов поставляется также ОДО «Альгимед» (мерная и химико-лабораторная посуда, а также аппараты и приборы по каталогу ОАО «Химлаборприбор» и ООО «МиниМед», Россия), предприятием «БИОН», ЗАО «Пять океанов» и др. Фирма «СИМАС» (Россия) поставляет широкий спектр изделий лабораторного назначения: пробки, промывалки, полимерные изделия для лабораторий, автоклавируемую и неавтоклавируемую посуду.

2.2. Лабораторная посуда из стекла и специальных полимерных материалов

Стеклоянная лабораторная посуда обладает рядом достоинств, к которым относятся прежде всего инертность к агрессивным жидкостям, возможность визуального и оптического контроля за ходом реакции, легкость и простота отмеривания жидкостей по градуировке или отметке, нанесенной на стекло, легкость обработки (мытьё, стерилизация), дешевизна, простота изготовления различных стеклянных устройств.

2.2.1. Лабораторная посуда общего назначения

Наиболее широкое использование в лаборатории получили пробирки, обычные (изготавливаемые из легко-, тугоплавкого стекла, кварца) и центрифужные (градуированные и неградуированные – без делений на наружной поверхности стекла) (см. рис. 2.1).

Пробирки биологические – ПБ (цилиндрические) применяются для проведения различных качественных реакций и других лабораторных работ. Наиболее широко используются ПБ трех размеров (см. табл. 2.1). Пробирки цилиндрические П2 (биологические) выпускаются также диаметром 7, 10, 11, 12, 22, 24, 25 мм и большего размера.

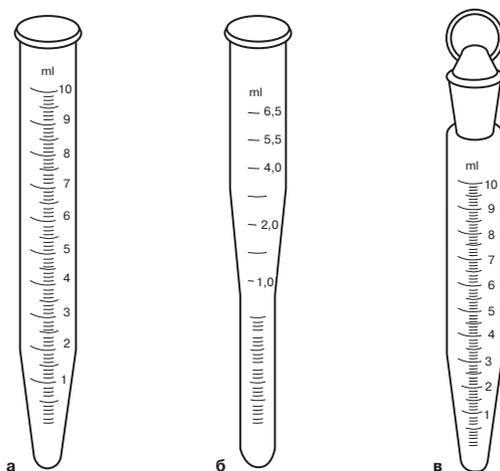


Рис. 2.1. Градуированные центрифужные пробирки: *а* – обычная градуированная центрифужная пробирка; *б* – градуированная центрифужная пробирка с выпрямленной нижней частью; *в* – градуированная центрифужная пробирка с нормальным шлифом.

Пробирки биохимические ПБХ (наружным диаметром 16 мм и высотой 120 мм) применяются для проведения различных качественных реакций и других лабораторных работ.

Пробирки химические ПХ (цилиндрические с развернутым краем) применяются для проведения различных качественных реакций и других лабораторных работ. Наиболее широко используются химические пробирки трех размеров (см. табл. 2.2). Пробирки цилиндрические с развернутым краем (хим.) выпускаются также диаметром 6, 7, 22, 25, 35 мм.

Пробирки центрифужные применяются для отделения осадков при центрифугировании. Выпускают градуированные (деления нанесены на всю длину пробирки) и неградуированные центрифужные пробирки. Их допустимая погрешность составляет $\pm 0,2$ мл. Наиболее широко используются центрифужные пробирки вместимостью 10 мл с разной ценой деления (см. табл. 2.3).

Кроме того, существуют пробирки разных видов, которые применяются при проведении различных химико-лабораторных работ (см. табл. 2.4).

В КДЛ находят применение пробирки с пробкой (со шлифом) диаметром 12, 16 мм, пробирки типа П4 диаметром 13 и 33 мм, пробирки с плоским дном диаметром 25 и 35 мм, пробирки мерные лабораторные (со шлифом – КШ) вместимостью 5, 10, 15, 20, 25 мл, пробирки с пробкой вместимостью 5, 10, 15, 20, 25 мл, пробирки разные диаметром 8, 9, 10, 11, 13, 14, 24 мм, пробирки с отводом, пробирки поглотительные, пробирки культуральные (стеклянные).

Таблица 2.1

Наиболее широко используемые в лабораторной практике размеры биологических цилиндрических пробирок

Диаметр наружный, мм	Высота, мм
14	120
16	150
21	200

Таблица 2.2

Наиболее широко используемые в лабораторной практике размеры химических цилиндрических пробирок

Диаметр наружный, мм	Высота, мм
14	120
16	150
21	200

Таблица 2.3

Наиболее широко используемые в лабораторной практике виды центрифужных пробирок

Вместимость, мл	Цена деления
10	0,1
10	0,2
10	Без деления

Таблица 2.4

Виды пробирок, используемые в лабораторной практике

Наименование	Диаметр, мм	Высота, мм
Видаля	10	80
Видаля	10	90
Серологическая	10	120
Серологическая	12	120
Флоринского	14	60
Флоринского	12	60

Наряду со стеклянными используются и пробирки, изготовленные из полимерных материалов (полиэтилена, полипропилена и др.), в том числе:

1. Центрифужные пробирки конические емкостью 10–50 мл, изготовленные из полистирола (абсолютно прозрачны), не автоклавируются. Пробирки, изготовленные из полипропилена низкой плотности, относительно прозрачные, обладают высокой устойчивостью к агрессивным соединениям, автоклавируются при 120°C. Имеется большое поле для надписей. Полипропиленовые и полистироловые пробирки емкостью 10 мл, диаметром 16 мм, которые можно центрифугировать при ускорении до 12 000 g.

2. Центрифужные пробирки конические, с резьбовыми крышками, стерильные; закручивающиеся крышки изготовлены из полиэтилена низкой плотности, не автоклавируются; выпускаются емкостью 15 и 50 мл.
3. Свободностоящие резьбовые пробирки объемом 5–50 мл из полипропилена. Пробирки удобны для хранения и транспортировки биологических жидкостей. Имеются литая градуировка, широкая муаровая полоса для нанесения надписей, герметичные литые кольцевые прокладки на крышках. Выпускаются емкостью 5–10 мл (с градуировкой, без крышки) и 50 мл (стерильные, с крышками и градуировкой). Полистироловые пробирки без пробки (5 мл), полипропиленовые с крышкой (10 мл).
4. Пробирки полистироловые (полиэтиленовые) с пробкой из полиэтилена емкостью 1, 2, 4 и 10 мл (предназначены для длительного хранения проб биологических жидкостей в условиях низкой температуры (-20°C); пробирки полистироловые прозрачные.
5. Микроцентрифужные пробирки (Эппендорфа) из полипропилена, объемом 0,6; 1,5; 1,6 и 2,0 мл. Градуировка в сочетании с прозрачностью стенок позволяют определять объем образцов. Выдерживают нагревание до 120°C и замораживание до -80°C .
6. Микропробирки с резьбой и крышки к ним QSP объемом 0,5; 1,5 и 2,0 мл; пробирки микроцентрифужные с крышкой вместимостью 1,5 и 2,0 мл.
7. Пробирки для ИФА и автоматических анализаторов из полипропилена. Выдерживают автоклавирование при 120°C и замораживание до -80°C ; объемом 1,2 мл.
8. Микропробирки для ПЦР (ПЦР-пробирки) из полипропилена высочайшего качества, вместимостью 0,5 (0,6) и 0,2 мл, совместимые с амплификаторами всех производителей. Сертифицированы на отсутствие на отсутствие РНКаз, ДНКаз.
9. Криопробирки с крышками, из полипропилена, стерильные. Предназначены для хранения образцов при температуре не ниже -196°C в парах жидкого азота. Выдерживают автоклавирование и центрифугирование при ускорении 17 000 g. Крышка открывается одним движением руки (1 и 1/4 оборота). Конструкция резьбы крышки предотвращает возможную контаминацию, а внутренний край крышки обеспечивает герметичность, даже при очень низких температурах. Сертифицированы на отсутствие РНКаз, ДНКаз, апиrogenность. Выпускаются вместимостью 1,2; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 и 10 мл. Пробирки в стрипах для ПЦР емкостью 0,2 мл. Планшеты для ПЦР (изготовлены из полипропилена). Для размещения пробирок используются штативы, изготовленные из полиэтилена (на 10, 20, 40 пробирок) или металлические (на 40 пробирок).

В КДЛ поставляются штативы для пробирок («рабочее место»), изготовленные из оргстекла, которые имеют резиновые ножки для устойчивости на рабочем столе. Объемы размещаемых в них пробирок варьируют

от 0,2 до 1,5 мл, а также штативы для хранения пробирок. В качестве примера можно привести следующие штативы:

- Штатив для пробирок («Хеликон», Россия) изготовлен из полипропилена, выдерживает автоклавирование при 120°C и замораживание до -70°C, компактное расположение пробирок позволяет экономить место на рабочем столе.
- Штативы для пробирок («Simport Plastics Limited», Канада), могут автоклавироваться, устойчивы к агрессивным жидкостям, выпускаются для пробирок объемом 5–10, 10–15 и 50 мл, зеленого, лилового, оранжевого, синего, желтого цветов.
- Штативы пластмассовые («Heathrow Scientific» и «QSP», США) для пробирок и автоматических пипеток (на 5 мест); устойчивы к опрокидыванию, изготовлены из полипропилена (могут автоклавироваться) и полистирола, имеют широкую цветовую гамму, буквенно-цифровую маркировку гнезд.
- Штативы для криопробирок фирмы «Cryostore OriGen Biomedical» (США) позволяют фиксировать пробирки, каждая ячейка пронумерована, могут автоклавироваться в течение 20 мин при 120°C.

Стекланные пробирки до использования следует хранить завернутыми в плотную бумагу (по 10 шт. в каждой пачке). Пробирки, постоянно используемые в работе, после мытья и сушки нужно аккуратно складывать в специально приспособленные для этого коробку или в ящик стола со специальным отделением для пробирок.

Пипетки (бюретки и другие стекланные приборы) следует хранить в ящиках, дно которых выложено ватой.

Химические стаканы (рис. 2.2) бывают двух видов: с носиками и без носиков. Они изготовлены из тонкого стекла, выдерживают нагревание на водяной бане. В клиничко-диагностических лабораториях используются:

- Стаканы лабораторные высокие без носика вместимостью 150, 250, 400, 600, 800, 1000, 2000, 3000 мл.
- Стаканы лабораторные высокие с носиком (В-1) вместимостью 150, 250, 400, 600, 800, 1000, 2000, 3000 мл.
- Стаканы лабораторные высокие с носиком (ВН) вместимостью 50, 100, 150 мл.

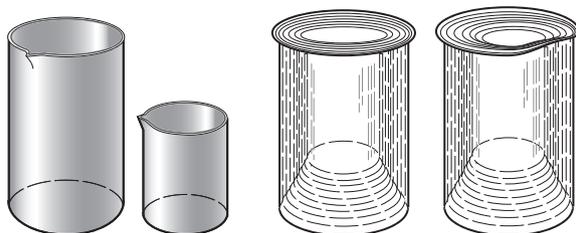


Рис. 2.2. Химические стаканы.

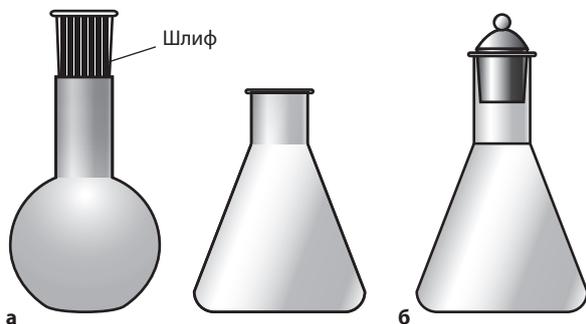


Рис. 2.3. Колбы: а – плоскодонные; б – конические.

- Стаканы лабораторные низкие без носика вместимостью 150, 250, 400, 600, 800, 1000, 2000, 3000 мл.
- Стаканы лабораторные низкие с носиком вместимостью 150, 250, 400, 600, 800, 1000, 2000, 3000, 5000 мл.
- Стаканчики для взвешивания высокие диаметром 20, 25, 30, 40 мм.
- Стаканчики для взвешивания низкие диаметром 32, 43, 58, 82 мм.
- Стаканы с градуированной цветной шкалой на 50, 100, 250, 500, 1000 мл и стаканы с градуированной цветной шкалой на 5, 10, 20, 25, 50, 100, 250, 400, 600, 800, 1000, 2000, 5000 мл.

В КДЛ также используются *батареинные стаканы*, которые, в отличие от химических, предназначены для работы без нагревания. Они могут быть высокие, низкие, с меткой, со шкалой. Кроме того, в КДЛ широко используются круглые (плоскодонные, круглодонные) и конические (Эрленмейера) колбы (рис. 2.3).

Колбы конические (Эрленмейера) предназначены для титрования, поскольку жидкость при перемешивании в них не расплескивается. Конические колбы, снабженные притертой пробкой, используются для йодометрического исследования. Наиболее часто используются следующие виды колб:

- Колбы конические с цилиндрической горловиной. Применяются для титрования, в качестве приемников при перегонке. Выпускаются вместимостью 50, 100, 250, 300, 500, 750, 1000, 2000 мл.
- Колбы конические со шлифами. Используются для титрования, в качестве приемников при перегонке, перекристаллизации органических веществ из легколетучих растворителей, для хранения веществ. Выпускаются вместимостью 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750, 1000, 2000 мл.

От расширенной части *круглых колб* отходит горло разной длины и ширины, с носиком или без него. В ЛПУ поставляются конические колбы со шлифом, без шлифа (КН1, КН3), а также колбы круглодонные со шлифом и круглодонные без шлифа (К1, К3).

Колбы могут быть с круглым (*круглодонные*) или плоским дном (*плоскодонные*). В отличие от плоскодонных, круглодонные колбы размещают на кольцах или специальных подставках.

В КДЛ используются следующие виды круглодонных и плоскодонных колб:

- Колбы плоскодонные с цилиндрической горловиной вместимостью 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 10 000 мл. Применяются в качестве приемников при перегонке, для различных видов органического синтеза и аналитических работ.
- Колбы плоскодонные со шлифами на цилиндрической горловине. Применяются в качестве приемников при перегонке, для различных видов органического синтеза и аналитических работ. Их вместимость может составлять 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 10 000 мл.
- Колбы круглодонные с цилиндрической горловиной вместимостью 50, 100, 250, 500, 1000 и 2000, 4000, 6000, 10 000 мл.
- Колбы круглодонные со шлифами горловиной вместимостью 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 10 000 мл.
- Колбы круглодонные для перегонки со шлифом КП-1 (Вюрца) вместимостью 150, 250, 500, 1000 мл.
- Колбы круглодонные с двумя горловинами под углом со шлифами вместимостью 500, 1000, 2000, 4000, 6000 мл.
- Колбы круглодонные с тремя горловинами под углом со шлифами вместимостью 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 10 000 мл.
- Колбы круглодонные с четырьмя горловинами под углом со шлифами вместимостью 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 10 000 мл.
- Колбы *остродонные*.

Кристаллизаторы (кристаллизационные чаши) (рис 2.4) применяются не только для перекристаллизации веществ, но и для выпаривания растворов.

Воронки: предназначаются для переливания жидкости из сосуда с широким горлом в сосуд с узким горлом или для фильтрования. Изготавливаются чаще всего из стекла, но также из фарфора или пластмасс (рис. 2.5).

Воронки лабораторные (В) выпускаются диаметром 36, 56, 75, 100, 150, 250 мм.

Воронки лабораторные (стеклянные): применяются для переливания жидкостей и фильтрования, диаметр 36, 56, 75, 100, 150, 250 мм.

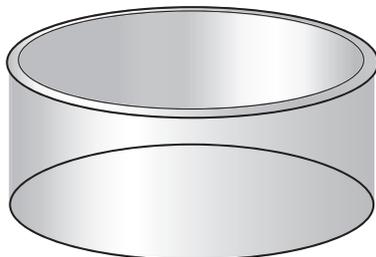


Рис. 2.4. Кристаллизатор.

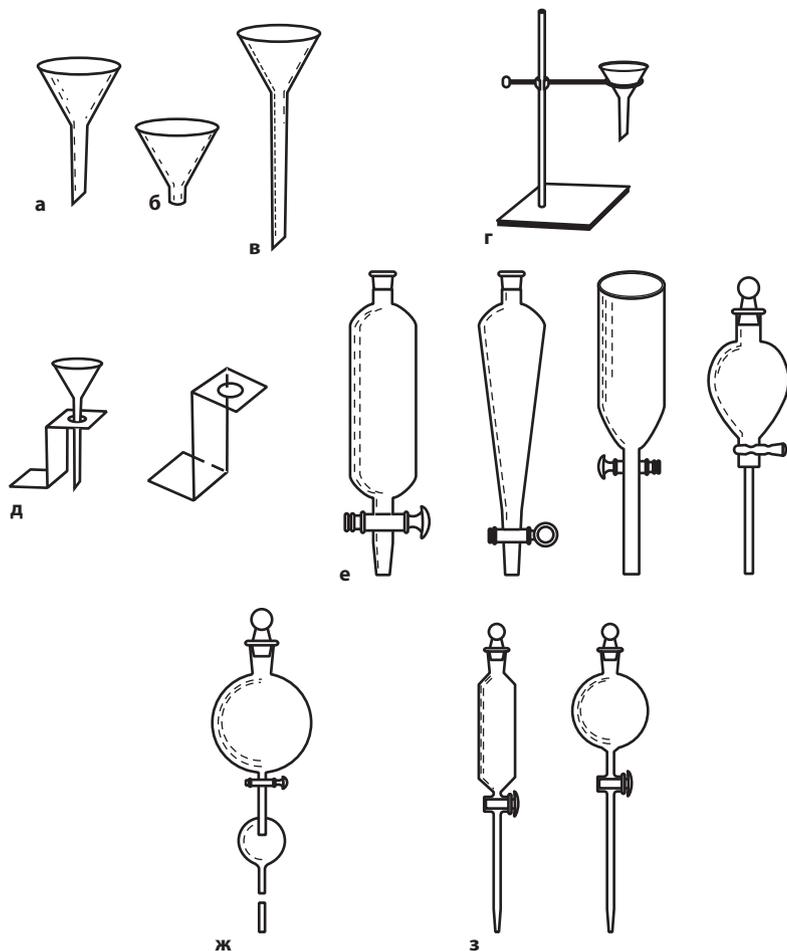


Рис. 2.5. Воронки: *а* – обыкновенная; *б* – воронка с обрезанной трубкой; *в* – аналитическая воронка; *г* – укрепление химической стеклянной воронки в штативе; *д* – приспособление для крепления воронки на стакане; *е* – делительные воронки; *ж* – капельная воронка с насадкой; *з* – капельные воронки.

Широкое применение нашли и воронки, изготовленные из пластика (полипропилена). Полипропилен обладает высокой химической устойчивостью к сильным, концентрированным и разбавленным кислотам, щелочам, альдегидам, спиртам, а также алифатическим углеводородам, к галогензамещенным углеводородам и углеводородам химического ряда, простым и сложным эфирам. К числу изделий лабораторного назначения, изготовленных из пластмассы, относятся и обычные воронки (диаметром 56, 100, 150 и 200 мм), выпускаемые в России.

Обычные воронки имеют ровную внутреннюю стенку. Существуют также специальные воронки для порошков. Для ускоренного фильтрования иногда применяют воронки с ребристой внутренней поверхностью. Воронки для фильтрования всегда имеют угол 60° и срезанный длинный конец.

Для осуществления процесса фильтрования жидкости в стакан воронку укрепляют на кольце штатива. При этом оттянутая сторона трубки воронки должна касаться стенки стакана, что обеспечивает спокойное стекание жидкости, предотвращает ее разбрызгивание. В том случае, если воронку помещают непосредственно в горло колбы, следует обеспечить зазор между наружной стенкой воронки и горлом колбы (установив, например, в этом промежутке проволочку, жгутик из бумаги и пр.).

2.2.2. Лабораторная посуда специального назначения

Для разделения двух или нескольких жидкостей, нерастворимых друг в друге и имеющих разную плотность, применяют *делительные воронки* цилиндрической или грушевидной формы (см. рис. 2.5, е). Они снабжены стеклянной пробкой. В верхней части отводной трубки находится притертый кран. Емкость делительных воронок варьирует от 50 мл до нескольких литров.

После перемешивания внесенных в делительные воронки жидкостей делительные воронки укрепляют в штативе с помощью колец и лапок. При этом смесь жидкостей расслаивается на отдельные фазы, жидкость с большей плотностью оказывается внизу. Далее каждую из жидких фаз сливают по очереди в подставляемые сосуды.

В клинической лабораторной практике используются воронки делительные (ВД) следующих видов:

- цилиндрические без керна ВД-10 емкостью 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 12 200 мл, применяются для разделения двух несмешивающихся жидкостей;
- цилиндрические с керном ВД-2 емкостью 250, 100, 50, 25, 10 мл, применяются для разделения двух несмешивающихся жидкостей;
- шарообразные;
- конусные.

Для размещения делительных воронок в вертикальном положении используются штативы для делительных воронок.

Капельные воронки (см. рис. 2.5, з), представляющие собой небольшие шарообразные воронки с краном под самым шаром воронки, от которого отходит длинная трубка, применяются, если необходимо добавить раствор вещества в реакционную среду небольшими порциями (на дно сосуда) или по каплям (например, в аппарате Киппа, предназначенном для получения CO_2 , Cl_2 , H_2 и др.), а также для разделения двух несмешивающихся жидкостей.

Стеклянные *промывалки* (рис. 2.6) представляют собой небольшие круглые плоскодонные колбы емкостью 250, 500 и 1000 мл. Используются для промывания и смывания осадков со стенок сосудов, в частности, для промывания электродов, спектрофотометрических кювет и т.д.

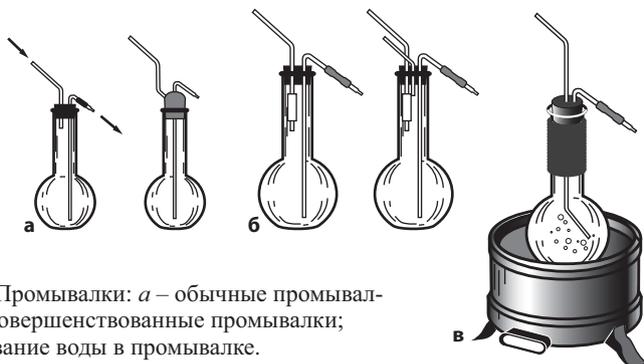


Рис. 2.6. Промывалки: *а* – обычные промывалки; *б* – усовершенствованные промывалки; *в* – нагревание воды в промывалке.

(250 и 500 мл), а также для хранения небольших количеств дистиллированной воды. Колбу заполняют до горла дистиллированной водой и закрывают резиновой пробкой с двумя отверстиями, через которые пропускают две изогнутые стеклянные трубки. Конец одной из них слегка вводят в колбу для создания избыточного давления воздуха. Вторая трубка доходит почти до самого дна колбы, через нее выводится наружу находящаяся в колбе жидкость. На наружный конец трубки надевается короткая каучуковая трубочка, к которой присоединяется короткий отеклянный наконечник.

Для очистки и промывания газов используются *склянки Дрекселя*.

Колбы Бунзена – конические толстостенные колбы с боковым отростком, к которому присоединяется шланг от вакуум-насоса; используются для фильтрации в условиях пониженного давления (рис. 2.7). В горло колбы Бунзена вставляется укрепленная в резиновой пробке фарфоровая воронка. Используются колбы с тубусом с цилиндрической горловиной вместимостью 250, 500, 1000 и 2000 мл и колбы с тубусом со шлифом вместимостью 250, 500, 1000 и 2000 мл.

Внимание! Перед началом процесса фильтрации колбу Бунзена следует испытать на прочность. С этой целью ее заворачивают в полотенце, в горло колбы вставляют пробку с пропущенной через нее стеклянной, за-

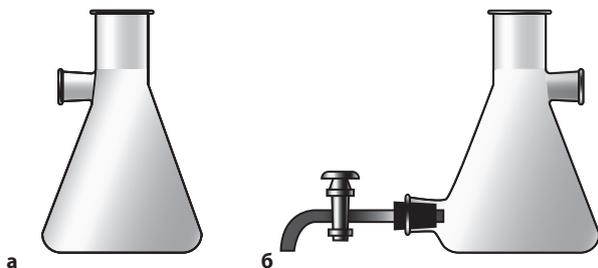


Рис. 2.7. Колбы Бунзена: *а* – для фильтрации под вакуумом; *б* – со сливным краном.

Рис. 2.8. Колбы Вюрца.

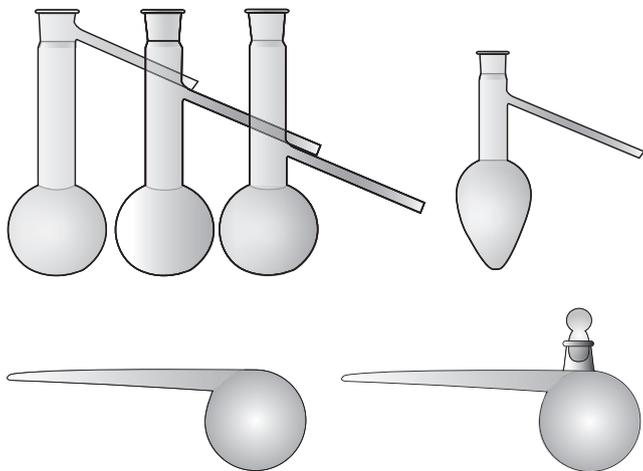


Рис. 2.9. Реторты.

канчивающейся капилляром трубкой. С помощью вакуум-насоса создают в колбе максимальное разрежение. Проверенную колбу Бунзена хранят, тщательно оберегая от царапин, могущих значительно уменьшить ее прочность и привести к аварии при создании вакуума.

Для перегонки (дистилляции) жидкостей с низкой температурой кипения предназначены *колбы Вюрца* – круглодонные колбы с длинным горлом, от которого под углом отходит длинная узкая отводная трубка (рис. 2.8).

Перед осуществлением процесса перегонки жидкости в горло колбы Вюрца плотно вставляют корковую или резиновую пробку с термометром, а боковую трубку присоединяют с помощью пробки (или шлифа) к холодильнику. Термометр устанавливают так, чтобы его резервуар не касался стенок шейки и находился посередине горла напротив отверстия отводной трубки. Пробку на боковую трубку колбы надевают так, чтобы конец трубки, вставляемый в холодильник, входил в него не менее чем на 4–5 см. Подготовленную к перегонке жидкости колбу укрепляют в лапке штатива, помещают в водяную или масляную баню, и лишь затем присоединяют холодильник. Перед началом работы из колбы вынимают пробку с термометром, в горло вставляют воронку с концом такой длины, чтобы он был ниже уровня отводной трубки, и в колбу наливают жидкость, предназначенную для дистилляции. Когда она заполнит (максимум на 3/4) шар колбы, ее закрывают пробкой с термометром, еще раз проверяют весь прибор и приступают к перегонке. Для перегонки также используют грушевидные колбы со шлифами вместимостью 10, 25, 50, 100, 250 мл.

Реторты (рис. 2.9) обычно используются для проведения химических реакций, требующих отсутствия резиновых деталей. Эти стеклянные изделия можно нагревать на открытом огне. Если у реторты имеется притертая стеклянная пробка, то прежде чем охлаждать жидкость, следует вынуть пробку, иначе ее может «заесть».

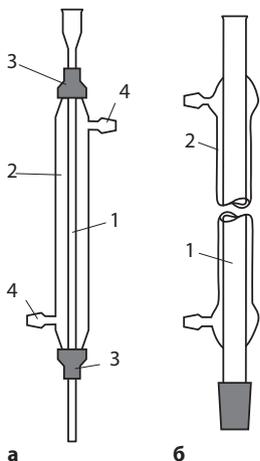


Рис. 2.10. Прямые холодильники (Либиха): *а* – с резиновыми муфтами; *б* – со шлифом. 1 – форштосс; 2 – рубашка; 3 – соединительные резиновые трубки (муфты); 4 – отростки.

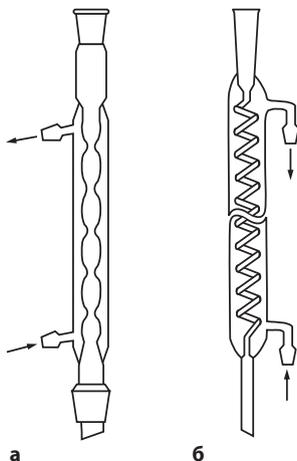


Рис. 2.11. Обратные холодильники: *а* – шариковый (Аллина); *б* – змеевиковый.

Холодильники – специальные стеклянные устройства, применяемые для охлаждения и конденсации паров жидкости. В зависимости от конструкции прибора жидкость, образующаяся в холодильнике при охлаждении паров (конденсат), или отводится в приемник, или возвращается в тот сосуд, в котором проводится нагревание. Различие в назначении холодильников определяет их форму и название. Холодильники, предназначенные для собирания конденсата, называются прямыми (холодильники типа ХПТ), или нисходящими (рис. 2.10), а холодильники, из которых конденсат вновь возвращается в процесс, – обратными (рис. 2.11).

Для выполнения лабораторных работ используются холодильники с прямой трубкой, спиральные, с внутренним и наружным охлаждением, шариковые.

Прямые холодильники (холодильники Либиха) состоят из длинной стеклянной трубки (форштосса), один конец которой расширен. Холодильная трубка приварена к стеклянной рубашке, на концах которой перпендикулярно ее оси расположено по одному отводу; на них надевают резиновые трубки. Одну из трубок, находящуюся около узкого конца форштосса, соединяют с водопроводным краном, а другую отводят в сточную трубу. Присоединяя холодильник, необходимо помнить о том, что вода всегда должна поступать в холодильник с нижнего, опущенного конца и выходить из верхнего, приподнятого. При таком подключении вода в холодильнике движется навстречу парам охлаждаемой жидкости. В процессе перегонки холодильная рубашка (муфта) должна быть заполнена водой, иначе при продолжительной перегон-

ке холодильная трубка сильно нагреется и на границе с уровнем воды может лопнуть. При сборке холодильника прежде всего следует подобрать соединительные резиновые трубки и, смазав их внутренние стенки вазелином, осторожно, все время поворачивая, надеть на стеклянные отрезки холодильника.

Со временем в холодильной рубашке образуется красновато-желтый налет окислов железа, попадающих с водой из водопроводной воды. Налет мешает следить за процессом конденсации паров в холодильной трубке, что весьма нежелательно. Для удаления налета холодильник отсоединяют от водопроводного крана, выпускают всю воду и наливают в холодильную рубашку 10–16% раствор соляной кислоты; при этом на резиновые трубки около отводов надевают зажимы. Осторожно поворачивая холодильник, растворяют в соляной кислоте налет окислов железа, затем кислоту выливают, холодильник снова соединяют с водопроводом и пропускают воду в течение 5–6 мин.

Применять холодильник Либиха для перегонки жидкости можно в том случае, если температура ее паров не превышает 150°C.

Обратные холодильники могут быть шариковыми (холодильник Аллина, холодильники типа ХШ), змеевиковыми и других форм. У шариковых холодильников трубка состоит из шарообразных расширений, а у змеевиковых она свернута в виде спирали. Такая форма трубки увеличивает поверхность охлаждения, при этом происходит более полная конденсация паров. Холодильник Аллина устанавливается только в вертикальном положении, но не в наклонном, так как в последнем случае в шариках будет собираться сконденсированная жидкость, мешающая правильному отбору фракций.

Обратный холодильник допускается присоединять к колбе и без пробки или шлифа. Для этого трубка холодильника должна входить в горло колбы неплотно, с зазором около 0,5 мм. В этом зазоре конденсируются пары нагреваемой жидкости, слой ее создает герметичность при кипячении жидкости в колбе. Герметизирующий слой жидкости при кипячении не обновляется. Особенно удобно применение такого способа при длительном кипячении кислот или щелочей, т.е. веществ, наиболее опасных для воздействия на шлифы.

Обратный холодильник используется в аппаратах Кьельдаля (на шлифах) при определении содержания азота в органических веществах.

Дефлегматоры – стеклянные изделия, изображенные на рисунке 2.12. Их помещают в горло перегонной колбы; сверху в отверстие дефлегматора вводят термометр, шарик которого должен находиться на уровне паропроводной трубки. Поскольку дефлегматоры очень хрупки, с ними надо обращаться весьма осторожно. К тому же они не выдерживают слишком сильного кипения жидкости в колбе.

Аллонж – устройство, предназначенное для выведения капель конденсата паров жидкости в сосуд-приемник (рис. 2.13). Он представляет собой изогнутую под прямым углом (иногда прямую) трубку, плавно расширяющуюся к одному из концов. Расширенный конец его надевают на отросток внутренней трубки холодильника, другой конец опускают в сосуд-прием-

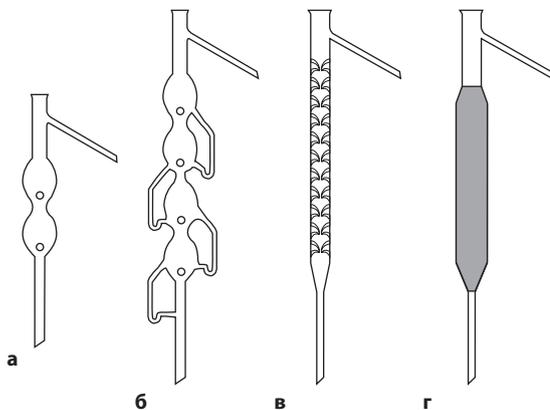


Рис. 2.12. Дефлегматоры: *a* и *б* – шариковые; *в* – елочный; *г* – с насадкой.

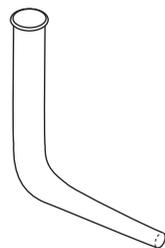


Рис. 2.13. Аллонж.

ник. Аллонжи, изогнутые под углом 70° , применяются для сборки различных лабораторных приборов, аппаратов и установок.

Эксикаторы обычно используются для медленного высушивания и сохранения реактивов, легко поглощающих влагу из воздуха, а также для предохранения различных препаратов от увлажнения. Они представляют собой тяжелые толстостенные сосуды, закрывающиеся притертой стеклянной пробкой (см. рис. 2.14). Состоят из двух частей: верхней, более широкой, цилиндрической или слегка расширяющейся кверху, и нижней, в виде усеченного конуса, суживающегося кверху. На дно верхней части эксикатора помещают вкладыш, чаще в виде фарфоровой пластины с отверстиями, служащей для размещения тиглей и сосудов с препаратами. На дно нижней части эксикатора наливают концентрированную серную кислоту, кладут хорошо прокаленный хлористый кальций или какое-либо другое гигроскопичное вещество.

Притертые поверхности эксикатора и его крышку смазывают вазелином. При закрывании эксикатора крышку нужно надвигать сбоку, а не накладывать сверху, причем следует как можно лучше притереть поверхности, поворачивая крышку. Открывать эксикатор рекомендуется так же, как и закрывать, осторожно сдвигая крышку в сторону, а не приподнимая ее. Эксикатором без крышки пользоваться нельзя. Если в эксикатор помещают горячие тигли, то их ставят в середине, несколько раздвигая (и опять задвигая) крышку, чтобы мог выйти расширившийся от нагревания воздух.

В лабораторной практике находят применение два основных типа эксикаторов: обыкновенные и вакуум-эксикаторы, имеющие либо отверстие, через которое вставляют трубку на резиновой пробке с краном, либо размещенный в крышке тубус с притертой стеклянной пробкой, к которой припаяна трубка с краном. Благодаря такому устройству делается возможным соединять эксикатор с вакуумным насосом и производить высушива-

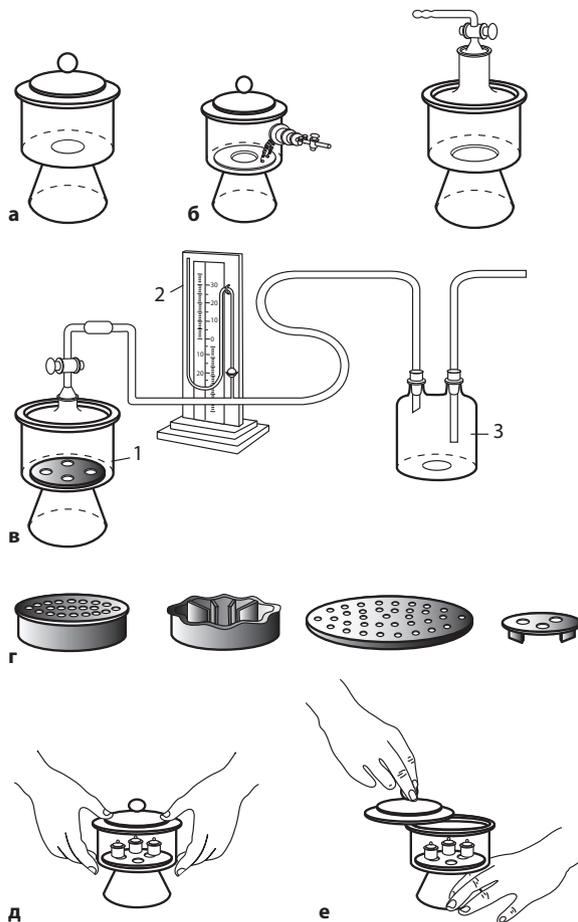


Рис. 2.14. Эксикаторы: *а* – обычный; *б* – вакуум-эксикаторы; *в* – схема соединения вакуум-эксикатора с вакуум-насосом (*1* – вакуум-эксикатор; *2* – манометр; *3* – предохранительная склянка); *г* – фарфоровые вкладки для эксикаторов; *д* – положение рук при переносе эксикатора; *е* – открывание эксикатора.

ние под вакуумом. Между вакуум-эксикатором и вакуум-насосом обычно помещают манометр и предохранительную склянку.

Перед тем как извлечь вещество из вакуум-эксикатора, необходимо устранить разрежение воздуха. Делать это нужно очень осторожно, так как струя врывающегося воздуха может разбросать высушиваемое вещество. Поэтому впускной кран нужно поворачивать очень медленно, а поднимать крышку следует только через 5 мин после того, как впускной кран будет приоткрыт. При переносе эксикатора надо обязательно придерживать крышку рукой во избежание ее соскальзывания.

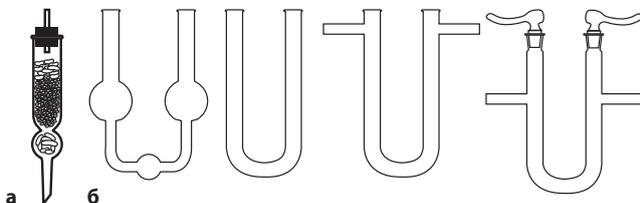


Рис. 2.15. Хлоркальциевые трубки: а – простая; б – U-образные.

В качестве основных влагопоглощающих средств используют:

- Безводный хлористый кальций (в виде кусков), которым наполняют эксикатор на 1/3 высоты его конической части.
- Концентрированную серную кислоту (95–96%), опасность разбрызгивания или расплескивания кислоты уменьшается при заполнении конической части эксикатора песком (или стеклянными шариками); кислоту меняют лишь тогда, когда она потемнеет. Поскольку пары серной кислоты насыщают воздух, содержащийся в эксикаторе, ее нельзя применять в том случае, если она может каким-либо образом взаимодействовать с высушиваемым веществом.
- Силикагель и окись алюминия (безводная), к которым (для удобства наблюдения за состоянием адсорбентов) добавляют немного хлористого кобальта. Безводные силикагель и окись алюминия окрашены в синий цвет, при поглощении влаги они приобретают розовую окраску.
- Оксид пятивалентного фосфора (фосфорный ангидрид). Это наиболее действенное высушивающее средство. Фосфорный ангидрид меняют, когда он расплывется.

Как и колбы Бунзена, новые вакуум-эксикаторы должны быть подвергнуты предварительному испытанию. Проверка их надежности состоит в том, что вакуум-эксикатор заворачивают в полотенце (или старый халат), после этого откачивают воздух, создавая по возможности наиболее глубокий вакуум.

Для предохранения содержащегося в стеклянной таре реактива от увлажнения и действия углекислого газа воздуха применяют разной формы *хлоркальциевые трубки* (рис. 2.15), которые наполняют прокаленным хлористым кальцием (для поглощения воды) и натронной извести (для связывания углекислого газа воздуха). Вещества, помещаемые в трубку, должны быть в виде небольших гранул. В шарик трубки укладывают вату, а сверху в трубку вставляют резиновую пробку с короткой отводной трубочкой. Хлоркальциевые U-образные трубки заполняют аналогично, но вату в них кладут поверх поглотителя; оба колена закрывают пробками с отведенными от них трубками.

Для создания разрежения в сосуде получили распространение *водоструйные насосы* – стеклянные, металлические и пластмассовые (см. рис. 2.16). При пропускании через них воды скорость струи в месте сужения трубки резко возрастает, при этом создается разрежение, и через

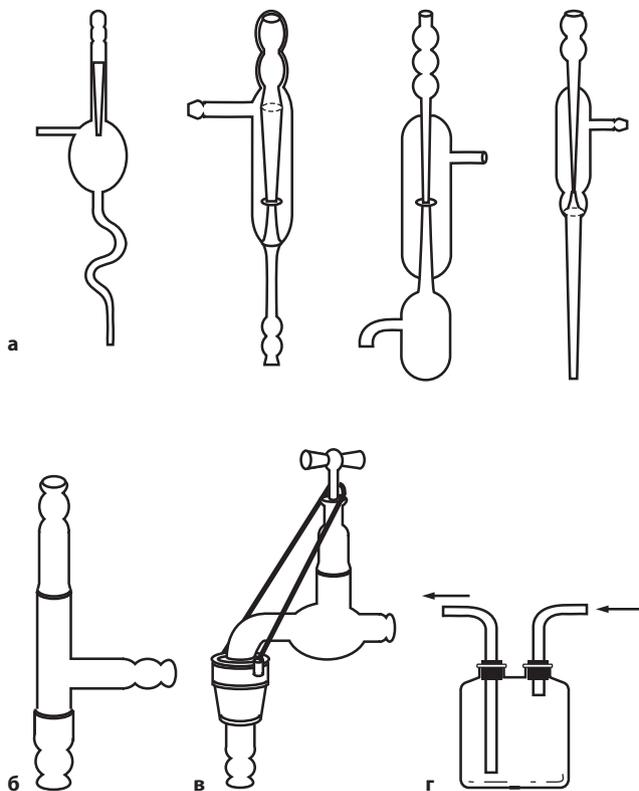


Рис. 2.16. Водоструйные вакуум-насосы: *а* – стеклянные; *б* – металлический; *в* – насадка к водопроводному крану для крепления водоструйного насоса; *г* – предохранительная склянка к водоструйному насосу.

боковой отросток всасывается воздух. Насос прочно укрепляется на водопроводном кране.

Между вакуум-насосом и сосудом должна находиться *предохранительная склянка Вульфа*, так как при падении давления в водопроводной сети вода из насоса может переливаться через боковой отросток; при отсутствии предохранительной склянки она может попадать в сосуд, в котором создан вакуум. Через резиновую пробку склянки почти до дна вставляют стеклянную трубку, на наружный конец которой надевают резиновую трубку, соединяющую предохранительную склянку с водоструйным насосом. Во вторую резиновую пробку также вставляют стеклянную трубку, выступающую на 2–3 см из узкого конца пробки; эту трубку соединяют с колбой Бунзена.

В лабораториях находят применение так называемые *капельницы* (рис. 2.17), в том числе капельницы в виде шарообразного стеклянного баллончика, в верхней части которого имеются отросток и отверстие,

предназначенное для наполнения сосуда жидкостью. При охватывании капельницы рукой расширяющийся от тепла воздух выталкивает из наклоненного баллончика несколько капель жидкости. Удобна в работе и капельница, представляющая собой стеклянный сосудик с притертой стеклянной пипеткой, оканчивающейся небольшим баллончиком.

В лабораторной практике находят применение *капельные палочки* (рис. 2.18) – изогнутые стеклянные палочки, позволяющие выливать жидкость каплями из сосуда любой формы. Применяя палочки разного диаметра, можно получать капли различного размера.

Выпускаются и *капельницы-дозаторы* вместимостью 2–25, 2–50, 50, 100 мл, а также капельницы с притертой пробкой-пипеткой вместимостью 25 и 50 мл и каплесчетатели. Капельницы-дозаторы изготавливаются из толстостенного темного стекла, которое защищает фотолabile реактивы от разрушения. Они снабжены удобной пипеткой с расширением в верхней части, которое препятствует попаданию реагентов в спринцовку. Применяются для дозирования индикаторов и других растворов в лабораторной практике.

Выпускаются также капельницы лабораторные с колпачками, каплеуловители с отводной трубкой, пипетки с каплесчитателем. При выполнении ряда технологических операций используются и *капельницы Шустера*.

Для переливания жидкостей используют различные *сифоны* (рис. 2.19). Переливание можно производить с помощью обычной резиновой или изогнутой стеклянной трубки. С этой целью ее заполняют жидкостью и, закрыв оба конца трубки пальцами, один конец опускают в жидкость, а другой вводят в сосуд-приемник, расположенный ниже уровня жидкости. Отняв затем пальцы, дают жидкости стекать.

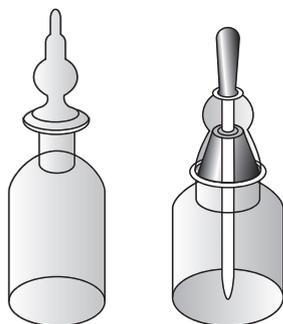


Рис. 2.17. Капельницы.

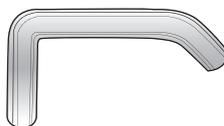


Рис. 2.18. Капельная палочка.

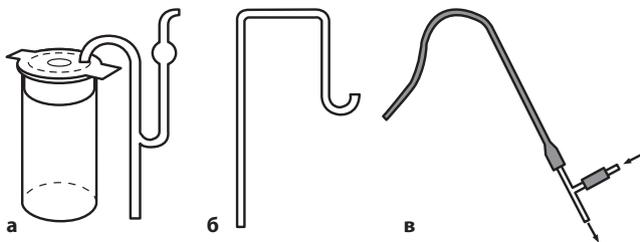


Рис. 2.19. Сифоны: *а* – для небольших приборов; *б* – для сливания жидкостей над осадком; *в* – приспособление для сифонирования.



Рис. 2.20. Переходная олива.

Переходные оливы – стеклянные трубки, на концах которых имеется ряд утолщений убывающего диаметра (рис. 2.20). Предназначаются для соединения резиновых трубок различного диаметра.

2.2.3. Мерная (измерительная) посуда

Используемая в клиничко-лабораторной практике мерная посуда включает изделия как для грубого, так и для точного измерения объемов жидкостей.

Измерительная посуда для приготовления растворов неточной концентрации

Для приготовления растворов неточных концентраций применяются мензурки, цилиндры и градуированные пробирки.

Мензурки (рис. 2.21) – стаканы конической формы с носиком для более удобного сливания жидкости. Предназначаются для отмеривания объемов жидкости, выпускаются объемом 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 мл. Применяются также для отстаивания мутных жидкостей, при этом осадок собирается в нижней суженной части, и для измерения объемов жидкостей. На боковой поверхности мензурки наносится шкала делений, соответствующая ее вместимости. Цена наименьшего деления у мензурок объемом 50 мл составляет 5 мл, 100 мл – 10 мл, 250 и 500 мл – 25 мл и 1000 мл –

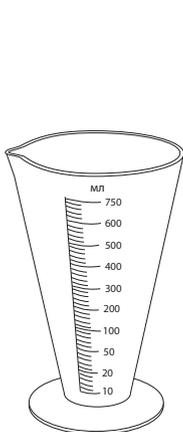


Рис. 2.21. Мензурка.

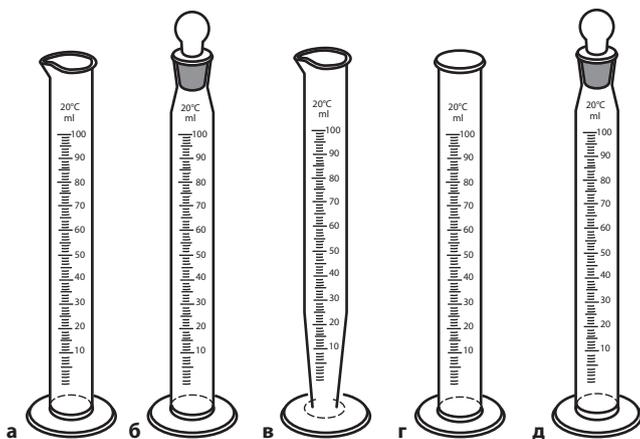


Рис. 2.22. Цилиндры: а – измерительный с носиком; б – измерительный с шлифованной пробкой; в – измерительный с суженным основанием; г – обыкновенный; д – с притертой пробкой.

50 мл. Используются также мензурки с ручкой и объемной шкалой на 50, 1000 и 2000 мл.

Мерные цилиндры – толстостенные сосуды с носиком и нанесенными на наружной стенке делениями, указывающими емкость в миллилитрах (см. рис. 2.22). При работе с летучими веществами применяют мерные цилиндры с шлифованными стеклянными пробками. Выпускаются объемом 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 и 2000 мл. Для большего удобства считывания показателей объема жидкости выпускаются градуированные цилиндры с объемной шкалой, а также цилиндры с притертой пробкой (вместимостью 10, 25, 50, 100 мл) и цилиндры с пластмассовой пробкой (вместимостью 10, 25, 50, 100, 250 мл).

Замер уровня жидкости в мерных цилиндрах производят так же, как и в градуированных пипетках, мерных колбах, бюретках и других стеклянных устройствах – по нижнему уровню мениска. Но если жидкость смачивает стекло и является непрозрачной, замер делают по верхнему уровню мениска.

Получили известность мерные цилиндры Blaubrand («Brand», Германия) объемом 5, 10, 20, 25, 50, 100, 250, 1000, 2000, 5000 мл. Наряду со стеклянными выпускаются цилиндры из полипропилена вместимостью 10, 50, 100, 250, 500, 1000 и 2000 мл.

Градуированные пробирки (см. рис. 2.1) выпускаются объемом 10 мл (с ценой деления 0,1 и 0,2 мл) и могут использоваться наравне с мерными цилиндрами соответствующего объема. Центрифужные градуированные пробирки служат для одновременного определения объема осадка и надосадочной жидкости после центрифугирования. Допускаемое отклонение на полный объем не должно превышать 2% (т.е. 0,2 мл).

Измерительная посуда для приготовления растворов точной концентрации

Для точных измерений объемов жидкостей наиболее широко используются мерные колбы, пипетки и бюретки.

Мерные колбы (см. рис. 2.23) предназначаются для растворения каких-либо веществ (в сухом, жидком агрегатном состоянии) в определенном объеме раствора (растворителя) или для доведения объема растворов до требуемого внесением в колбу соответствующего растворителя. Это плоскодонные колбы различной емкости с отходящим от их шарообразной части длинным отростком; мерные колбы могут иметь шлифованные стеклянные пробки. Наиболее часто применяются мерные колбы без шлифов, они закрываются резиновыми пробками соответствующего размера (удобны пробки из пластмассы, полиэтилена и полипропилена). Однако мерные колбы могут закрываться и стеклянными пробками.

Колбы мерные с цилиндрической горловиной и с одной отметкой предназначены для проведения различных аналитических работ, разбавления растворов, растворения веществ в определенном объеме растворителя, приготовления растворов заданных концентраций. Выпускаются вмести-

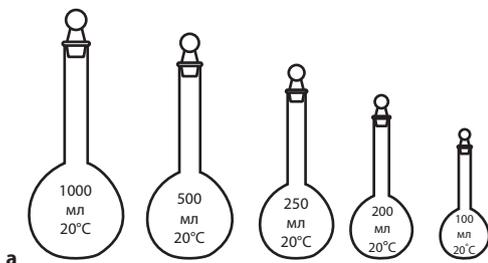
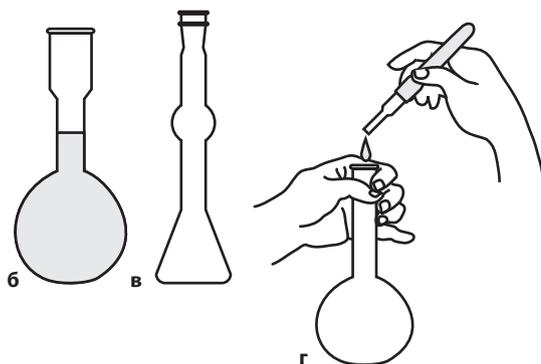


Рис. 2.23. Мерные колбы: *а* – обычные; *б* – с расширением над мерной частью; *в* – с расширением над мерной частью и пластмассовой пробкой; *г* – добавление последних капель в мерную колбу.



мостью 5, 10, 25, 50, 100, 200, 250, 500, 1000, 2000 мл. Используются также колбы мерные с пластмассовой и притертой пробкой вместимостью 5, 10, 25, 50, 100, 200, 250, 500, 1000, 2000 мл, колбы стеклянные с градуированной горловиной вместимостью 50, 100, 200, 250, 500, 750, 1000 мл. Хорошо зарекомендовали себя мерные колбы Blaubrand и Silberbrand («Brand», Германия) объемом 5, 10, 20, 25, 50, 100, 250, 1000, 2000, 5000 мл.

Наряду с узкогорлыми встречаются и широкогорлые мерные колбы. На расширенной их части указываются объем (25, 50, 100, 250, 500, 1000 мл) и температура, при которой они калиброваны. Значение емкости колбы показывает, что при данной температуре объем воды, налитой в колбу до имеющейся на горле кольцевой метки, точно соответствует указанному. Объем же вылитой из колбы воды будет несколько меньше помеченного, так как часть ее неизбежно останется на стенках. Поэтому обычные мерные колбы не пригодны для получения точного объема вылитой из них жидкости. Мерные колбы чаще калибруются только на наливание.

Мерные колбы, предназначенные для выливания, имеют две метки (дополнительная верхняя метка предназначена для выливания). Если наполнить колбу до этой метки, а затем вылить ее содержимое, вылитая жидкость будет иметь объем, указанный на колбе.

Потребителям предлагают колбы мерные на объемы от 5 до 2000 мл, в том числе с пласмассовой, стеклянной пробкой. Обычные мерные колбы (без шлифа) имеют маркировку 1:100, 1:1000, 1:200, 1:2000, 1:25, 1:250, 1:50, 1:500; со шлифом – 2:100, 2:1000, 2:25, 2:200, 2:2000 и др. Если отпадает надобность в находящемся в мерной колбе растворе, он должен быть тотчас удален, а колба тщательно вымыта. При хранении пустой колбы во избежание «заедания» стеклянной пробки ее вставляют в горло колбы, обернув фильтровальной или чистой писчей бумагой.

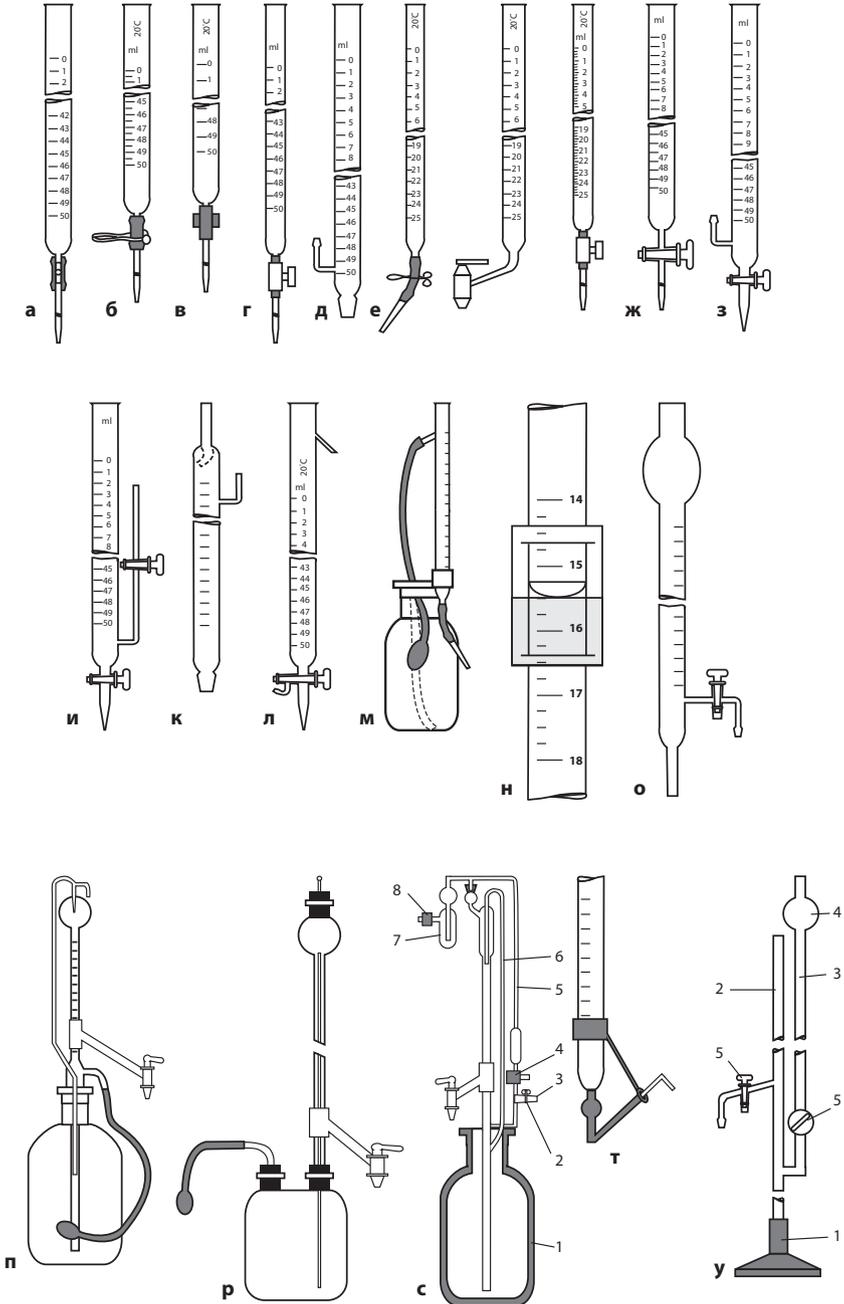
В процессе заполнения колбы жидкостью ее смело вливают сначала до уровня на 0,3–0,5 см ниже кольцевой отметки, а затем доводят до полного объема путем добавления жидкости по каплям из пипетки.

При измерении объема ориентируются на наиболее низкую часть мениска, соприкасающуюся с отметкой. Обращают внимание на соответствие температуры раствора той, которая указана на наружной стороне расширенной части колбы. Нельзя производить измерение объемов растворов, температура которых резко отличается от температуры калибровки (горячих или сильно охлажденных), так как это может вызвать значительную погрешность.

Для приготовления в мерной колбе какого-либо раствора вначале в нее вносят (насыпают или наливают) через воронку растворяемое вещество (остатки его на воронке тщательно, без потерь, смывают небольшими порциями воды), а затем наполняют колбу до половины водой, осторожно встряхивая, перемешивают ее содержимое до полного растворения и доливают воду. При пересыпании через воронку измельченных твердых веществ следует применять только сухую воронку, причем всыпать всю навеску сразу не рекомендуется. Лучше перемещать вещество понемногу, слегка встряхивая воронку легкими ударами пальцев. При быстром высыпании всей навески может случиться, что порошок застрянет в трубке воронки и перевести его в колбу будет труднее. Никогда не следует начинать обмывание воронки прежде, чем вся навеска из нее высыпется в колбу. Для введения в мерную колбу измельченных веществ удобнее применять воронку с укороченным концом.

Раствор следует перемешивать многократным переворачиванием его в мерной колбе. При этом прежде всего следует убедиться, прочно ли закрыта колба и не будет ли при переворачивании ее вытекать жидкость. Мерную колбу можно держать только за горлышко, придерживая большим и средним пальцами правой руки, одновременно прижимая пробку указательным пальцем. Совершенно недопустимо держать мерную колбу за шар, так как это вызывает нагревание колбы с жидкостью и изменение объема последней.

Бюретки – приборы, предназначенные для проведения титрования, измерения точных объемов жидкостей, обычно растворов веществ (см. рис. 2.24). В работе специализированных химических лабораторий и КДЛ используются различные виды бюреток: объемные, весовые, поршневые, газовые и микробюретки.



Объемные бюретки – градуированные стеклянные трубки с несколько оттянутым нижним концом (бескрановые) или снабженные краном (крановые).

На наружной стенке по всей длине бюретки сверху вниз нанесены деления ценой обычно в 0,1 мл, что позволяет производить отсчеты с точностью до 0,02 мл. Калибруются бюретки только на выливание. Нижняя метка определяет вместимость, которая чаще всего соответствует 10, 25, 50, 100 и 200 мл (оцифровка бюреток на 10 мл обычно делается через 1 мл, с ценой наименьшего деления шкалы 0,05 мл; на 25 и 50 мл – через каждые 2 мл, цена наименьшего деления в таких бюретках 0,1 мл; у бюреток на 100 мл оцифровка производится через каждые 5 мл при цене наименьшего деления 0,2 мл). Из этого следует, что объемными бюретками можно отмеривать растворы с точностью от 0,2 до 0,05 мл.

Используются бюретки двух типов: с притертым краном и бескрановые с оттянутым концом, к которому присоединяют посредством резиновой трубки стеклянную трубку с капиллярным сужением внизу. Резиновую трубку перекрывают с помощью специальных приспособлений: либо зажима Мора, либо стеклянной бусинки (отрезка стеклянной палочки диаметром около 3 мм и толщиной 1,5 мм), заложенных внутрь трубки (конец стеклянной палочки закругляют оплавлением над пламенем газовой горелки; острые края в месте излома сглаживают напильником). Нажимая на участок резиновой трубочки в области вложенной стеклянной бусинки, вызывают образование узкой щели, через которую и стекает жидкость из бюретки.

Используются бюретки без крана вместимостью 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 мл, бюретки с одноходовым краном вместимостью 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 мл, бюретки с двумя кранами, бюретки с отводом вместимостью 50 и 25 мл, бюретки с боковым краном вместимостью 10, 25, 50 мл.

Заполняя бюретки растворами, необходимо помнить, что в бюретки со стеклянным притертым краном нельзя помещать растворы щелочей, так как под действием углекислого газа воздуха щелочь при хранении в бюрет-

◀ **Рис. 2.24.** Бюретки: *a* – прямая без крана с бусинкой в резиновой трубке; *б* – прямая без крана с металлическим пружинным зажимом на резиновой трубке; *в* – с резиновой насадкой вместо крана; *г* – с пластмассовым вентиляем; *д* – без крана с боковым тубусом; *е* – объемные; *ж* – прямая с краном; *з* – с краном и боковым тубусом; *и* – с краном на боковом тубусе; *к* – с внутренним отростком; *л* – с автоматическим нулем и двухходовым краном; *м* – с автоматическим нулем и сосудом из эластичной пластмассы; *н* – подвижный визир к бюретке; *о* – с автоматическим нулем и склянкой; *п* – с автоматической установкой уровня; *р* – с автоматическим нулем и склянкой; *с* – для растворов, взаимодействующих с воздухом (1 – бутыль; 2, 4, 8 – краны; 3 – боковой отвод; 5 – трубка для выравнивания давления; 6 – трубка для заполнения бюретки; 7 – сосуд); *т* – приспособление для запирания бюреток; *у* – микробюретка с краном (1 – деревянный штатив; 2 – микробюретка; 3 – трубка для заполнения бюретки жидкостью; 4 – воронка; 5 – краны).

ке может закристаллизоваться в шлифе, и кран «заест». С другой стороны, в бюретки с резиновыми наконечниками нельзя наливать растворы сильных окислителей, например перманганата калия, йода, бихромата калия и др., так как эти растворы разъедают резину.

После окончания работы с бюреткой ее следует вымыть водой и оставить в штативе, перевернув открытым концом вниз. Чтобы в бюретку не попадала пыль, ее лучше заткнуть кусочком ваты. У бюреток с краном нужно вынуть кран, обернуть его один раз куском чистой фильтровальной бумаги и снова вставить в бюретку. Если этого не сделать, шлиф может испортиться и кран начнет протекать. Для обычных работ кран у бюретки можно смазать очень тонким слоем вазелина. Для этого слегка смазывают шлиф и, поворачивая кран взад и вперед, добиваются равномерного распределения смазки. Хороший результат дает использование специальной смазки для кранов. Бюретки желательно заполнять жидкостью через воронку с коротким концом, не доходящим до нулевого деления бюретки; открыв кран или зажим, заполняют раствором часть бюретки, расположенную ниже крана или зажима (до нижнего конца носика стеклянной трубки). Причем нужно следить за тем, чтобы в отводной части бюретки не оставалось пузырьков воздуха; если они останутся, то при титровании израсходованный объем жидкости будет определен неправильно.

Важно избавиться от воздушного пузыря в носике бюретки. Из бюретки с краном его можно удалить быстрым опусканием жидкости. Если этот способ не дает эффекта, рекомендуется опустить сливной конец бюретки в сосуд с раствором, а через верхний конец всосать немного жидкости в бюретку (естественно, открыв при этом кран); пузырек при этом поднимается кверху. У бескрановых бюреток пузырек воздуха удаляют, загнув резиновую трубку с капилляром так, чтобы кончик капилляра был направлен вверх и в сторону от работающего и его коллег. Затем нужно осторожно открыть зажим и вытеснить раствором весь воздух. Зажим закрывают лишь тогда, когда из кончика капилляра начнет вытекать жидкость.

Для того чтобы под бусинкой или отрезком стеклянной палочки не скапливался воздух, при титровании следует нажимать на верхнюю часть затвора, а не на нижнюю (для сохранения затвора не следует оставлять бюретки без жидкости, в крайнем случае можно налить в нее немного воды). Первоначально бюретку заполняют таким образом, чтобы уровень жидкости оказался на 3–4 см выше нулевого деления шкалы. Затем, осторожно приоткрыв кран, устанавливают уровень жидкости на нулевое деление. Каждое отмеривание дозы или титрование предпочтительно начинать всегда с нулевой отметки. При работе с мало прозрачными или очень интенсивно окрашенными жидкостями уровень устанавливается не по нижнему, а по верхнему мениску. Задняя стенка бюретки может быть молочного цвета с продольной темной, чаще всего синей, полоской. Эта полоска значительно улучшает условия отсчета показаний и повышает их точность.

В процессе отсчета глаз наблюдателя должен находиться в одной горизонтальной плоскости с уровнем жидкости.

Отсчет показаний следует делать лишь после того, как с внутренней стенки бюретки стечет раствор и уровень жидкости установится окончательно. Время установки постоянного уровня жидкости зависит в первую очередь от вязкости раствора. Показания принято записывать не раньше чем через 30 с после окончания титрования. Разновидностью прямых бюреток с оливой являются *прямые бюретки с оливой и боковым тубусом* на 10, 25, 50, 100 и реже на 200 мл. Наличие бокового тубуса позволяет производить периодическое заполнение бюретки раствором по мере его расходования, что в известной степени экономит время при проведении серийных анализов.

Получили распространение *бюретки* различных типов с *автоматическим нулем*.

В бюретках с наружной питающей трубкой жидкость поднимается по наружной трубке и заполняет бюретку до нулевой отметки. Избыток сливается через ту же трубку, отверстие которой находится на уровне отметки. Заполнение бюретки производится давлением воздуха, создаваемым резиновым баллоном.

Вместо зажимов Мора можно использовать простое, но надежное приспособление (см. рис. 2.24, м), действие которого основано на том, что согнутая резиновая трубка совершенно не пропускает жидкость. Для этого тонкое резиновое кольцо с прикрепленной к нему резиновой полоской надевают на бюретку несколько выше резиновой трубки, другой конец полоски прикрепляют к согнутому отрезку стеклянной трубки. Длина резиновой полоски должна быть такой, чтобы в свободном состоянии она поддерживала трубку так, как показано на рисунке 2.24, м. При титровании пальцем нажимают на согнутую стеклянную трубку, выпрямляя резиновую трубку. Чем больше трубка отклоняется вниз, тем сильнее ток жидкости.

В тех случаях, когда требуется очень точный учет результатов, в обычную предварительно выверенную бюретку помещают стеклянный поршень-поплавок, свободно передвигающийся внутри бюретки. Применение этого поплавка увеличивает точность отсчета уровня жидкости, и расхождение между отдельными определениями не превышает 0,02 мл. Бюретка с поплавком дает возможность работать с окрашенными растворами и с такими, которые могут изменяться при соприкосновении с воздухом, так как поплавок препятствует контакту раствора с воздухом. Титровать рекомендуется только свежим раствором, причем перед наполнением бюретку следует ополаскивать титрованным раствором.

Микробюретки отличаются от обычных тем, что они имеют градуировку не по 0,1 мл, а по 0,01 мл и дают возможность делать отсчет с точностью до 0,005 мл. В лабораториях применяются микробюретки с краном и бескрановые (см. рис. 2.24, у).

Для заполнения микробюретки с краном вначале наливают в воронку титрованный раствор, закрыв сливной кран и открыв кран на боковой трубке. Когда жидкость заполнит микробюретку немного выше нуля шкалы, боковой кран закрывают и, осторожно открывая сливной кран, уста-

наливают жидкость точно на нуле. Лишь после этого начинают титрование. Для доведения уровня жидкости в микробюретке после титрования снова до нуля осторожно открывают боковой кран. При этом в микробюретку поступает запасная жидкость из воронки. Как только уровень раствора дойдет до нуля, кран закрывают.

При наливании раствора в воронку в боковой трубке иногда остаются пузырьки воздуха, которые мешают титрованию. Для удаления их жидкость наливают в воронку и, открыв боковой кран, пропускают жидкость в бюретку до тех пор, пока из нее не будут вытеснены воздушные пузырьки. После этого боковой кран закрывают и, открывая сливной кран, устанавливают уровень жидкости в бюретке на ноль.

При работе с микробюретками требуется большая осторожность, особенно при их мытье. Сушить микробюретки лучше холодным воздухом.

Бюретки и микробюретки поставляются в ЛПУ Белоруссии ОДО «Альгимед» (Белоруссия), фирмой «Fine Chemicals» (Австрия) и др.

Одним из основных технологических приемов в лабораторном анализе является пипетирование, т.е. отбор проб биологических жидкостей (крови, сыворотки, плазмы, ЦСЖ и мочи), реагентов и внесение их в другие емкости (чаще всего пробирки).

Пипетки предназначаются для точного отмеривания относительно небольших объемов водных растворов или жидкостей, близких по вязкости к воде (рис. 2.25).

Пипетки (для жидкостей) представляют собой стеклянные трубки различного диаметра, прямые (*градуированные*) или с расширением посередине, грушевидной, шарообразной или цилиндрической формы (*пипетки Мора*). Последние предназначаются для точного отмеривания какого-либо одного объема жидкости. Нижний конец пипетки слегка оттянут к сливному концу и имеет диаметр около 1 мм. В верхней части пипеток или на расширенной их части указываются номинальный объем, температура, при которой они калибруются (20°C, калибруются только на выливание) и класс точности.

В КДЛ поставляются пипетки градуированные прямые, пипетки с делениями на слив от любой отметки до сливного кончика (верхняя отметка соответствует номинальной вместимости (0,1, 0,2, 1, 2, 5, 10, 25 мл), пипетки градуированные с расширением.

Наряду с градуированными пипетками используются пипетки Мора – с одной меткой, с расширением (применяются для отмеривания определенных объемов жидкостей (1, 2, 5, 10, 20, 25, 50, 100, 200 мл).

В последние годы в КДЛ все более широкое использование находят градуированные пипетки на полный слив с хлопковым фильтром объемом 1 и 2 мл, градуированные пипетки на полный слив объемом 0,5; 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100 мл, пипетки Мора *Vlaubrand* с одной меткой объемом 0,5; 1, 2, 2,5; 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100 мл, пипетки Мора с двумя метками объемом 0,5; 1, 2, 2,5; 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 мл под торговой маркой *Vlaubrand* («Brand», Германия).

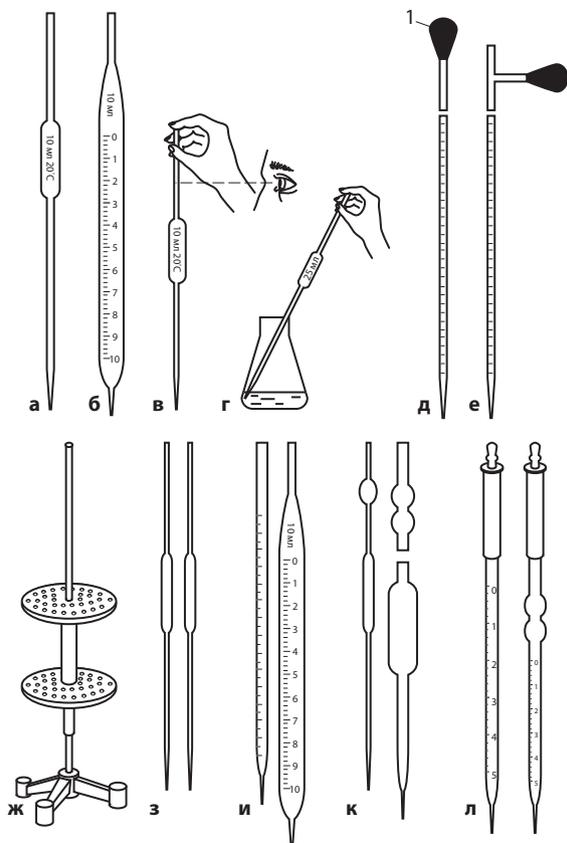


Рис. 2.25. Пипетки: *а* – простая; *б* – градуированная; *в* – положение пипетки при установлении мениска на уровне метки; *г* – выливание раствора из пипетки; *д* – пипетка с резиновым баллончиком с отверстием (*л*); *е* – пипетка с резиновым баллончиком на боковом отростке; *ж* – штатив для хранения пипеток в вертикальном положении; *з* – пипетки с расширением в мерной части с одной и двумя метками; *и* – пипетки с делениями; *к* – «безопасные» пипетки с одним и двумя шарообразными расширениями на всасывающей трубке; *л* – «безопасные» шприцевые пипетки.

Широкое применение находят градуированные пипетки серологические (с широким носиком) и пипетки Пастера. Стекланные пипетки Пастера предназначены для недозированного отбора малых объемов жидкостей (часто жидких бактериальных и других сред) в лабораториях клинической бактериологии, санитарно-эпидемиологических станций, лабораториях бактериологических производств. Пипетки представляют собой трубку нейтрального стекла, один из концов которой оттянут в виде капилляра.

В последние годы все более широкое применение находят *пипетки из полистирола*. Среди них: серологические, имеющие градуированную

шкалу на весь объем пипетки и цветную колировку концевой вставки, пипетки Пастера, изготовленные из полиэтилена низкой плотности (выпускаются градуированные и стерильные). Пипетки объемом менее 1 мл называются *микropипетками*.

В настоящее время в большом количестве выпускаются пипетки, имеющие две основные (кольцевые) отметки: в верхней и нижней части; после нижней отметки находится мертвое пространство. Соответствующий объем вмещается между верхней и нижней отметками. Пипетки этого типа являются более практичными, так как в случае поломки конца пипетки его можно оттянуть, не изменяя объема пипетки. Начальный и конечный объемы в этих пипетках устанавливаются по нижнему мениску. Однако более удобны в работе «концевые» пипетки, т.е. те, у которых градуировка доходит непосредственно до нижнего, сливного конца.

Оба вида пипеток позволяют производить отмеривание жидкостей как в пределах всего объема пипетки (при использовании пипеток Мора этот объем составляет от 1 до 100 мл), так и в пределах его частей (в зависимости от градуировки).

Используются градуированные пипетки с делениями на 1, 2, 5, 10 и 25 мл. Они бывают 1-го и 2-го класса точности. Для наполнения пипетки нижний конец ее опускают в жидкость при помощи груши или другого специального приспособления. Жидкость набирают так, чтобы уровень ее был на 2–3 см выше метки; затем быстро закрывают верхнее отверстие указательным пальцем правой руки, придерживая в то же время пипетку большим и средним пальцами. Рекомендуется указательный палец слегка увлажнить, поскольку влажный палец более плотно закрывает пипетку. При ослаблении нажима указательного пальца жидкость медленно вытекает из наполненной пипетки. Как только нижний мениск жидкости окажется на одном уровне с меткой, палец снова прижимают. Для полного опорожнения пипетки нижним концом ее прикасаются к внутренней стенке сосуда. После вытекания из нее жидкости пипетку держат прислоненной к стенке сосуда еще в течение 5 с, слегка поворачивая ее вокруг оси. После этого пипетку удаляют, не обращая внимания на оставшуюся в ней жидкость.

Для большего удобства в верхней части баллончика проделывают маленькое отверстие диаметром 2–3 мм. Отверстие должно быть гладким, с ровными краями, резина баллончика не очень мягкая, объем пипетки не более 5 мл. Баллончик надевается на пипетку, отверстие в нем прикрывается пальцем. Сжимая баллончик, погружают сливной конец пипетки в жидкость, после чего, прекратив сжатие баллончика, всасывают жидкость выше отметки и, установив пипетку вертикально, слегка приоткрыв пальцем отверстие в баллончике, дают стечь избытку жидкости. Осушив нижний конец пипетки и установив нижний мениск на соответствующей отметке градуировки, прикоснувшись сливным концом пипетки к стенке сосуда, вновь сжимают баллончик и сливают жидкость в сосуд, в который производят отмеривание. На рисунке 2.25, г продемонстрировано, как следует правильно выливать раствор из пипетки в коническую колбу. Нужно обращать

внимание на то, чтобы жидкость стекала по стенке колбы, не разбрызгиваясь, так как прилипшие к стенкам колбы капли при последующем титровании могут не вступить в реакцию с раствором, приливаемым из бюретки.

Не нужно стремиться выгонять остаток жидкости из пипетки выдуванием или нагреванием рукой расширенной части пипетки.

Можно применять и другой способ опорожнения – свободное истечение жидкости из вертикально установленной пипетки при открытом отверстии в баллончике. В работе, однако, нужно всегда пользоваться каким-либо одним способом опорожнения, так как это будет способствовать уменьшению погрешности.

При работе с ядовитыми веществами и инфицированным материалом удобны так называемые «безопасные пипетки». Конструкция их может быть различной. В качестве примера типичных представителей «безопасных» пипеток могут быть приведены шприц-пипетки, изображенные на рисунке 2.25, л. Насасывание жидкости в такую пипетку производится поднятием поршня шприца. В лаборатории легко и просто собрать такую шприц-пипетку, используя установленную вертикально в лабораторном штативе градуированную пипетку или пипетку Мора, верхний конец которой сообщается посредством резиновой трубки с установленным в другой лапке штатива (или на деревянной колодке) медицинским шприцем (например, объемом 10 мл).

Отдельными предприятиями выпускаются пипетки для отбора проб серной кислоты.

В последнее время все шире в практике КДЛ используются различные *полуавтоматические и автоматические пипетки*. Полуавтоматические пипетки предназначены для взятия либо одного (фиксированного) объема жидкости, либо разных объемов жидкости (в пределах определенного диапазона – вари-пипетки). Пипетки могут быть одно- и многоканальными.

Механические (пипеточные) и электронные дозаторы и наконечники выпускаются компаниями «Human» (Германия), «Medica», (США), «J. T. Baker» (Нидерланды), «Biohit» (Финляндия), «Thermo Electron Corporation» (Финляндия), «HTL» (Польша), «Gilson» (США) и др. и поставляются на рынок российскими фирмами «Диакит», НПЦ «ЭКО-Сервис», ЗАО «Термо Электрон» (Россия), которое осуществляет сборку пипеток компании «Thermo Electron Corporation» под торговой маркой Ленпипет, и многими другими.

Широкое применение в деятельности КДЛ нашли *устройства дозирующие*, к которым относятся автоматические пипетки тоговой марки Ленпипет серий Колор, Дигитал, Классик, Лайт, Сайнтифик, Степпер, которые используются при различных видах лабораторных работ.

Автоматические пипетки серии Ленпипет Колор представляют собой одноканальные и многоканальные механические дозаторы переменного и фиксированного объема, они являются легкими, удобными в использовании механическими устройствами (см. рис. 2.26). Цветовая кодировка корпуса, головки поршня и сбрасывателя наконечника, большой цифровой дисплей,



Рис. 2.26. Автоматические пипетки серии Ленпипет Колор.

двойной термостатируемый корпус рукоятки гарантируют высокое качество, безопасность и точность исследования, быструю идентификацию по объему. Калибруются пипетки в лаборатории по международным правилам GLP с помощью весов пользователя и инструкции по эксплуатации. Отдельными представителями автоматических пипеток Ленпипет Колор являются:

- одноканальные пипетки фиксированного объема с объемом дозирования 10, 20, 50, 100, 200, 500 и 1000 мкл (каждому объему соответствует определенный цвет);
- одноканальные пипетки переменного объема (0,5–10, 5–30, 20–200, 100–1000 и 1000–5000 мкл);
- восьмиканальные пипетки переменного объема (5–50 и 50–300 мкл); каждому диапазону объемов соответствует набор двух цветов.

Автоматические пипетки серии Ленпипет Дигитал обладают небольшой массой (самые легкие в своем классе) и достаточно хорошей эргономикой, поэтому их целесообразно использовать в КДЛ с большим количеством рутинных исследований. Для получения абсолютной стерильности все пипетки могут подвергаться полному автоклавированию. Серия Ленпипет Дигитал представлена полностью автоклавируемыми одноканальными пипетками фиксированного (10, 20, 50, 100, 200, 500 и 1000 мкл), переменного объема (0,5–10, 20–200, 100–1000, 1000–5000 и 2000–10000 мкл) и пипетками восьмиканальными переменного объема (5–50 и 50–300 мкл). Это новое поколение цифровых пипеток, они представляют собой пипетки с эффективным механизмом «супервыталкивания» жидкости и ярлыком безопасности для легкой идентификации и дополнительной безопасности исследований.

Пипетки серии Ленпипет Лайт – это механические одноканальные дозаторы переменного и фиксированного объема; пипетки серии Ленпипет Степпер позволяют быстро раскапывать реагенты до 44 раз без повторного заполнения наконечника, универсальная рукоятка может работать с 7 типами наконечников различного размера, что позволяет дозировать объемы от 10 до 5000 мкл.

Используются также пипеточные механические дозаторы фиксированного и переменного объема Biohit mLine и Biohit Proline производства фирмы «Biohit» (Финляндия), которые поставляются на рынок рядом дистрибьюторов, например, «Ольвекс диагностикум» (Россия). Также используются автоматические пипетки фирмы «НТЛ» (Польша), которые имеют съемный сбрасыватель, кнопка которого расположена таким образом, чтобы пользователь не мог случайно задеть ее при дозировании жидкости. Автоматические пипетки фирмы «Eppendorf» (Германия) серии Research – удобные в использовании и точные механические пипетки с плавным изменением дозируемого объема. Предназначены в первую очередь для научных лабораторий. Разные объемные диапазоны маркируются цветом. Одноканальные пипетки переменного объема серии Eppendorf Research выпускаются с диапазонами объемов 0,1–2,5, 0,5–10, 2,0–20, 10–100, 20–200, 100–1000 и 500–5000 мкл, каждая пипетка имеет 3 значения объема, из них два крайних, одно – промежуточное. Восьмиканальные пипетки серии Eppendorf Research выпускаются объемом 30, 50 и 300 мкл.

Также в современных КДЛ широко используются автоматические пипетки фирмы «Gilson» (США) серии Pipetman, которые являются автоматическими одноканальными пипетками переменного объема сверхвысокой точности и надежности (0,2–2, 1–10, 2–20, 20–100, 50–200, 200–5000 и 1000–10000 мкл), каждая пипетка позволяет получить три значения объема: два крайних и одно промежуточное. Восьмиканальная пипетка рассчитана на диапазон объема 20–200 мкл. Одноканальные пипетки серии Pipetman Ultra переменного объема позволяют производить дозирование жидкостей в диапазонах 0,2–2, 1–10, 2–20, 20–100, 50–200, 200–5000 и 1000–10000 мкл (каждая пипетка рассчитана на получение трех объемов жидкости, из них два крайних и один промежуточный). Используются также пипетки серии Microman. В КДЛ также используются электронные и ручные, одноканальные и многоканальные (восьмиканальные) микро- и макропипетки фирмы «Socorex» (Швейцария), которые на рынок, в частности, поставляет компания «Альгимед» (Белоруссия).

В КДЛ находят применение *пипеточные дозаторы* (дозирующие устройства для пластиковых и стеклянных пипеток) и *флаконы-диспенсеры*, предназначенные для дозирования фиксированного объема жидкости большими сериями. Они позволяют осуществлять дозирование прямо из емкости для хранения реактива (например, бутылей и флаконов). Устройства этого типа способствуют значительной экономии времени при отборе проб и разливе реактивов, облегчают эти процессы и делают их практически безопасными, так как исключают необходимость всасывания жидкостей в пипетку через рот. Диапазоны дозирования для этих устройств могут быть 0,5–5,0; 1,0–10,0; 2,5–20 и 5–50 мл.

Наряду с механическими используются *электронные дозаторы*, в частности электронные дозаторы серий ePet, eLine и Proline и специальные электронные дозаторы вязких сред ViscoPet фирмы «Biohit» (Финляндия).

2.3. Другие изделия для выполнения лабораторных работ

При выполнении лабораторных работ также используются изделия, изготовленные из стекла и пластмасс:

1. *Капилляры для определения СОЭ (Панченкова)*. Применяются для измерения высоты столба плазмы крови при определении СОЭ. Имеют линейную шкалу. Применяются для укомплектования СОЭ-метра ПР-3. Диапазон измерения – от 0 до 90 мм, цена шкалы деления – 1 мм.
2. *Капилляры гематокритные*. Применяются для взятия крови и определения гематокрита. Капилляры имеют высоту 32, 75, 100 мм.
3. *Капилляр для определения С-реактивного белка (СРБ)* высотой 90 мм.
4. *Камеры Горяева (2- и 4-сеточные)*. Предназначены для подсчета форменных элементов крови. Представляют собой пластины из толстого предметного стекла с нанесенными на них поперечными канавками, образующими три поперечно расположенные плоские площадки. Средняя площадка продольной канавкой разделена на две, каждая из которых имеет выгравированную на ней сетку. На 0,1 мм выше средней площадки расположены две другие площадки. Их плоскости служат для притирания покровного стекла до появления так называемых ньютоновских колец. После притирания покровного стекла создается камера, закрытая с двух сторон, а в двух других имеются капиллярные пространства, через которые заполняют камеру. В комплект входят 5 специально полированных покровных стекол, обеспечивающих заданную точность объема камеры. Покровные стекла можно приобрести отдельно.
5. *Кюветы для фотометрии*. Предназначены для фотометрии на колориметрах фотоэлектрических концентрационных (КФК) и других обычных фотометрах. Изготовлены из оптического стекла (марки К-8), имеют стандартную ширину 24 мм и разную длину оптического пути.
6. *Кюветы для спектрофотометрии*. Изготовлены из кварцевого стекла. Могут использоваться для различных спектрофотометрических и флуориметрических измерений в широком диапазоне длин волн, включая ультрафиолетовый. Легко отмываются от загрязнений. Имеют разную длину оптического пути (1, 3, 5, 10, 20, 30, 50 и 100 мм). Для выполнения спектрофотометрических и флуориметрических исследований при длинах волн более 340 нм также используются одно-разовые пластиковые (акриловые и полистироловые) кюветы фирмы «Sarstedt» (Германия) с оптическим путем 10 мм. Находят применение кварцевые кюветы производства предприятий России, имеющие длину оптического пути 1, 2, 5 и 10 мм.
7. *Стекланные палочки* диаметром 4–6 мм, предназначенные для перемешивания жидкостей в процессе приготовления растворов. Они должны быть длиннее химического стакана на 5–6 см. Во избежание царапания посуды и с целью предохранения рук работающего от порезов концы палочек должны быть хорошо оплавлены (для снятия последних

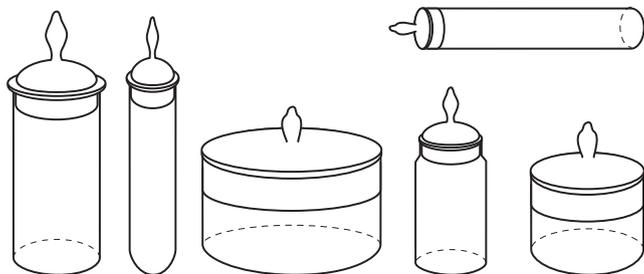


Рис. 2.27. Бюксы, или стаканчики для взвешивания.

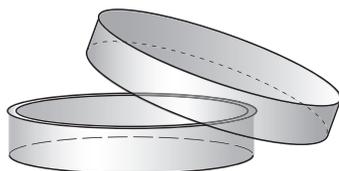


Рис. 2.28. Чашки Петри.



Рис. 2.29. Чашка Коха.

следов осадка применяют палочку с резиновым наконечником, который делают из кусочка резиновой трубки длиной 10–15 мм).

8. Для отвешивания каких-либо сыпучих веществ применяют *часовые стекла*, но более часто с этой целью используются *бюксы* (рис. 2.27). Высушивание различных веществ в сушильных шкафах осуществляют в бюксах, *чашках Петри* (рис. 2.28) и другой посуде, например, *чашках Коха* (рис. 2.29).
9. *Стекла предметные для микропрепаратов*. Предназначены для микроскопирования в видимой области спектра, применяются в клинико-диагностических и патологоанатомических исследованиях в ЛПУ. Стекла предметные с полоской для записи имеют матовую полосу для записи любым карандашом информации о пациенте, дате исследования и т.п. Выпускаются размерами 25×75×1,8; 75×25×1,8 и 25×75×1,0 см. Имеют разную маркировку.
10. *Стекла покровные для микропрепаратов*. Предназначены для предохранения микропрепаратов от пыли и механических повреждений при микроскопировании в видимой области спектра, применяются в клинико-диагностических и патологоанатомических исследованиях в ЛПУ.
11. *Сорбционные* (в том числе хлоркальциевые) *трубки*.
12. Для выполнения микробиологических исследований используются *спиртовки*. Они предназначены для подогрева жидкостей, твердых веществ в лабораторных условиях. Спиртовки изготавливаются двух типов: со стеклянным колпачком, с фенопластовым колпачком и металлической подставкой. Номинальная вместимость спиртовок – 100 мл.

Таблица 2.5

Характеристики лабораторных склянок

Объем, мл	Горло	Стекло
60	Узкое/широкое	Светлое/темное
125	Узкое/широкое	Светлое/темное
250	Узкое/широкое	Светлое/темное
500	Узкое/широкое	Светлое/темное
1000	Узкое/широкое	Светлое/темное
2000	Узкое/широкое	Темное

13. *Стекланные флаконы* используются для хранения, транспортировки реактивов, биологических сред, диагностикумов, поставляются отечественными и зарубежными фирмами, такими, как «Sci/Spec» и «Wheaton Science Products» (США). Флаконы фирмы «Sci/Spec» изготовлены из боросиликатного стекла, их объем может быть от 2 до 60 мл. В зависимости от природы реагента, который предполагается в них хранить, можно использовать флаконы с крышками с тефлоновыми или поливиниловыми прокладками. Различными производителями выпускаются прозрачные флаконы объемом 2, 4, 11, 22, 25 и 40 мл, а также темные флаконы объемом 4, 11, 30, 60 и 125 мл.
14. *Бутыли темного стекла* вместимостью от 250 мл до 4 л. Бутыли из темного стекла с закручивающимися крышками, автоклавируемые, объемом 25, 50, 100, 250, 1000, 2000 и 5000 мл.
15. *Лабораторные бутылки* с диаметром горловины под крышку с резьбой 45 мм. На горловине – эластичное кольцо из полипропилена для усиления герметичности. Крышки белого цвета, автоклавируемые. Выпускаются объемом 100, 250, 500, 1000 и 2000 мл.
16. *Склянки* предназначены для хранения реактивов. Их характеристика представлена в таблице 2.5.
17. Для последовательного разлива сывороток и реактивов применяется *дозатор Флоринского* (на 10 и 12 гнезд).
18. В клинично-лабораторной практике используются также *чашки Петри, чашки выпарные плоскостонные* (без носика) вместимостью 100, 250, 400, 1000, 2500 мл.

2.3.1. Приборы и аппараты, используемые в лабораторной практике

В лабораторной практике используются приборы и аппараты:

1. *Сосуды Дьюара* – металлические сосуды с вакуумной изоляцией для хранения и транспортировки жидкого азота емкостью 6, 16, 25 и 40 л (СК-6, СК-16, СК-25, СК-40). Они представляют собой резервуары типа «сосуд в сосуде», межстенное пространство которого заполнено многослойной изоляцией и в нем создан высокий вакуум. Высокий вакуум поддерживается в течение длительного времени, что обеспечи-

вадет стабильность технических характеристик в течение всего периода эксплуатации. Внутренний и наружный сосуды выполнены из алюминиевого сплава, горловина – из нержавеющей стали.

2. *Прибор СОЭ-метр ПР-3* предназначен для измерения скорости оседания эритроцитов (СОЭ). Специальные белый экран и особая краска, применяемая для нанесения градуировки, обеспечивают максимальный контраст при измерении СОЭ. В комплект включены штатив с резиновыми пробками и 20 капилляров ПС/СОЭ-0,1.
3. *Часы песочные с пластиковым основанием* (1, 2, 3, 5, 10, 15 и 20 мин).
4. *Сосуд для проведения микроэкстракции.*
5. *Ареометры (общего типа и др.).*

2.3.2. Лабораторная посуда и изделия из пластмасс

В настоящее время все более широкое применение находят изделия из пластмасс. В этом отношении особый интерес представляет полиэтилен, из которого изготавливают флаконы, воронки, промывалки, мерную посуду (в частности, цилиндры) и пр. Полиэтилен по сравнению со стеклом обладает меньшей теплопроводностью, поэтому нагревание посуды из полиэтилена на водяной бане недостаточно эффективно. Вместе с тем, полиэтиленовая посуда обладает способностью абсорбировать некоторые вещества, например белок, азотную, соляную кислоты и некоторые другие. Поскольку стенки полиэтиленовой посуды очень трудно отмыть от сорбируемых веществ, это ограничивает возможность использования такой посуды. Следует также иметь в виду, что разные полимеры обладают различной устойчивостью к химическим веществам. При их воздействии могут наблюдаться физические изменения, вызванные впитыванием растворителей материалом пластических масс, растворением пластика, его разрушение. Не следует использовать пластиковую посуду (за исключением изготовленной из отдельных видов тефлона) для хранения окислителей.

Тем не менее, в лабораторной практике широко применяются:

1. *Полиэтиленовые промывалки*, которые оказались весьма удобными в использовании. Через отверстие в их пробке проводят только одну трубку, доходящую до дна сосуда, наружная часть которой изогнута под острым углом (рис. 2.30). Перед наполнением водой (или иной промывочной жидкостью) пробку вывинчивают и при помощи воронки наливают жидкость в промывалку почти до верха. При сжимании промывалки жидкость из нее вытекает.

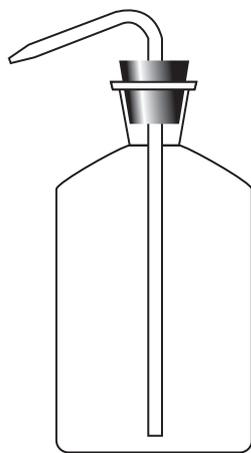


Рис. 2.30. Промывалка из полиэтилена.

В лабораторной практике наряду с импровизированными применяются полиэтиленовые промывалки производства, например, ЗАО «НПО Экрос» (Россия) емкостью 500 мл и «VitLab» (Германия) емкостью 250 и 500 мл.

2. *Пластиковая тара.* Пластиковая тара производства «Wheaton Science Products» (США) представлена флаконами и бутылками из неокрашенного и коричневого полиэтилена высокой плотности объемом от 4 до 10 000 мл. Это самая герметичная полимерная тара, используемая в области биотехнологии. Флаконы имеют сложную горловину, на внешнем крае которой сделан выступ, препятствующий образованию и стеканию капель по внешней поверхности бутылки. Сложная форма герметизирующего конуса и его полная совместимость с горловиной гарантируют герметичность флаконов и бутылок. К флаконам можно подобрать отдельные крышки из полипропилена белого, красного, голубого, зеленого цвета или неокрашенные.

Пластиковая тара производства «Zinsser Analytic» (Германия) – это флаконы из высококачественного полиэтилена, неокрашенные и черного цвета, объемом от 4 до 250 мл. Химически устойчивы ко многим веществам. Герметичность обеспечивается полной совместимостью резьбовых крышек с герметизирующим корпусом и резьбой горловины корпуса, выполненный методом литья с раздувом. Крышки могут быть белого, красного синего, черного, лилового, зеленого и желтого цветов, диаметром 15 мм для флакона 4 мл и 22 мм для флаконов всех остальных объемов.

Виалы из тефлона PFA, неокрашенные, объемом от 2 до 64 мл, свободностоящие с крышками производства «Savillex Corporation Laboratory Products» (США) выдерживают автоклавирование, пребывание в диапазоне температур от -196 до 260°C . Контейнеры из тефлона PFA, неокрашенные, объемом от 60 до 2200 мл, с крышками. Выдерживают температуру от -196 до 250°C .

3. В КДЛ также используются следующие изделия из пластмасс:
- ванночки для многоканальных пипеток;
 - ванночки-контейнеры для окраски препаратов;
 - емкости с 8 резервуарами для заполнения многоканальной пипетки (облегчают заполнение многоканальных пипеток);
 - насос с колбой-ловушкой для отсасывания микрообъемов надсадочных растворов;
 - открывалка для пробирок;
 - перчатки медицинские полиэтиленовые;
 - пестики для гомогенизации в микропробирках;
 - коробки для мелочей универсальные;
 - комплекты лабораторные для окраски микропрепаратов, в состав которых входят штатив-рамка, 20 предметных стекол (толщиной 2 мм), 40 предметных стекол (толщиной 1 мм), контейнер-ванночка с герметичной крышкой, штатив из полипропилена, устойчивый к красителям;

- спринцовки;
 - пробки;
 - наконечники для пипеточных дозаторов;
 - планшеты;
 - микролуночные планшеты;
 - стаканы низкие из полипропилена 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 3000, 5000 мл;
4. *Наконечники без фильтра.* Все применяемые для лабораторных работ наконечники изготовлены из высококачественного полипропилена, выдерживают многократное автоклавирование при 120°C и давлении 1 атм в течение 15 мин.
- Наконечники с фаской уменьшают потери дозируемой жидкости и увеличивают точность дозирования. Наконечники с широким отверстием устраняют возможность разрушения хрупких клеток, облегчают набор малых объемов вязких жидкостей.
- Наконечники для нанесения на гель используют для нанесения образцов в «карманы» гелей, полярографические ячейки, щелевые кюветы. Сверхдлинные наконечники применяют для нанесения и отбора проб из труднодоступных мест. Совместимы с пипетками различных производителей пипеток, выпускаются разной вместимости: до 10 мкл, до 200–300 мкл, до 1000 мкл, до 5 мл.
5. Используются также *наконечники с фильтром*, изготовленные из полипропилена. Они сертифицированы на отсутствие РНКаз, ДНКаз и апиrogenность. Выпускаются вместимостью до 10, 20, 50, 100, 200 и 1000 мкл.
- Выпускаются и стерильные наконечники с фильтром в штативах. Используются при выполнении молекулярно-биологических исследований, в том числе ПЦР-анализа.
6. Пластиковая посуда применяется также для выполнения исследований в области микробиологии, иммуноферментного анализа, производства культуральных работ; используются аксессуары для молекулярно-биологических исследований на основе ПЦР, в том числе заклеивающая пленка, которая плотно прилегает к планшету и не дает испаряться реакционной смеси в процессе амплификации, и резиновый ролик, предназначенный для закатывания пленки, а также чашки для автоматических анализаторов (например Technicon, «Hitachi», Япония и др.), изготовленные из полистирола.
7. *Чашки Петри микробиологические* обычные и трехсекционные (с крышкой) многократного и однократного применения из полистирола (стерильные и вентилируемые), размерами 40×13, 60×15, 90×17, 100×15, 35×10, 60×15 и 94×16 мм. Оптически прозрачная и однородная поверхность позволяет использовать их для проведения микроскопии. Поверхность чашек способствует хорошему прикреплению и росту клеток.
8. *Микробиологические петли*, изготовленные из полистирола.

9. *Планишеты для ИФА*, изготовленные из полистирола (размером 128×86 мм, 96 лунок) с плоским и скошенным дном, а также планшеты культуральные, изготовленные из полистирола, с плоским дном. Они обладают вполне удовлетворительными оптическими свойствами, сертифицированы на апириногенность.
10. *Планишеты для определения групп крови.*
11. *Флаконы культуральные.*
12. *Пробирки для взятия биопроб* из полипропилена с крышками (зелеными, розовыми, голубыми и красными), содержат калиевую соль ЭДТА, цитрат натрия, гранулы геля.
13. *Контейнеры для взятия биоматериала:* мочи и кала, изготовлены из полипропилена, имеют муаровую поверхность для надписей.
14. *Корытца для взвешивания* размером 41×41×8, 89×89×25 и 140×140×22 мм из прорезиненного полистирола, выдерживают нагревание до 93°C.
15. *Шприцы-наконечники к диспенсерам.*
16. *Лабораторная посуда из фторопласта* (пробирки, стаканы, чашки, колбы, воронки, трубки).
17. *Резиновые трубки, пробки и груши.* Материал резиновых трубок может обладать различными свойствами. Различают резину кислотоустойчивую, дренажную, вакуумную, поливакуумную медицинскую, силиконовую медицинскую. Резиновые пробки выпускаются разных размеров, в зависимости от их диаметра им присваивается номер (5; 7,5; 10; 12,5; 14,5; 16; 19; 24; 29; 34,5; 40; 45; 50; 60; 100). Груша резиновая лабораторная помогает точно и быстро осуществить дозирование стеклянными и пластиковыми мерными пипетками объемом от 1 до 10 мл.

2.3.3. Лабораторная посуда и изделия из других материалов

В тех случаях, когда вещества нужно сильно нагревать, прокалывать, выпаривать или получать из них сплав, применяют более устойчивую к действию высоких температур *высокоогнеупорную* (фарфоровую, кварцевую) посуду: воронки Бюхнера (N1–5), тигли (высокие и низкие), чашки выпаривательные, ступки фарфоровые (N1–6), кружки N1–5 от 250 до 2000 мл, стаканы N1–8 от 25 до 2000 мл, ложки для сжигания, ложки фарфоровые, шпатели.

Фарфоровые чашки – это неглубокие глазурированные изнутри сосуды диаметром от 3–4 до 50 см и более с круглым дном (рис. 2.31, 2.32). Их часто называют *выпаривательными*, так как они допускают нагревание на открытом огне (для чего фарфоровые чашки укрепляются на кольце штатива или в фарфоровом треугольнике, если они маленькие).

Фарфоровые тигли – это глубокие сосуды разных размеров, которые по форме напоминают горшочки (рис. 2.33). Тигли служат для прокалывания в них веществ при температуре до 1200°C. Фарфоровые тигли можно размещать в муфельных, тигельных печах или на открытом пламени горелки.

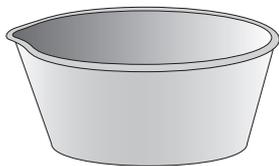


Рис. 2.31. Фарфоровая чашка.



Рис. 2.32. Набор фарфоровых выпаривательных чашек.

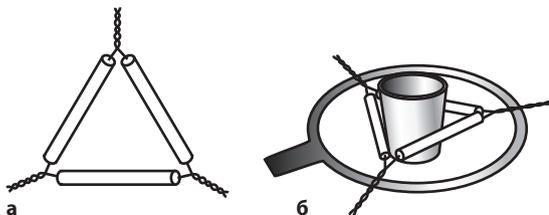


Рис. 2.33. Фарфоровый тигель.

В последнем случае их ставят в фарфоровые треугольники, которые делают из насаженных на проволоку фарфоровых трубок (рис. 2.34). Треугольник следует брать таких размеров, чтобы тигель, вставленный в него, выдавался не более чем на $1/3$ высоты. Подогрев ведут постепенно: вначале тигель нагревают над пламенем горелки, а затем его постепенно вводят в бесцветное пламя горелки. В тиглях можно прокалывать любые вещества, кроме тех, которые вступают в реакцию с глазурью (щелочей и фтористых солей). Перед работой тигли должны быть хорошо промыты. Цвет их внутренней поверхности не должен быть изменен. Тигли могут иметь крышки.

Фарфоровые ступки, в отличие от фарфоровых чашек – толстостенные сосуды, глазурованные снаружи (см. рис. 2.35). Внутренняя поверхность их неглазурованная. Они предназначены для растирания в них веществ с помощью фарфорового пестика (нижняя поверхность которого тоже неглазурована).

Ступку следует заполнять измельченным веществом лишь на $1/3$ объема. В ней можно только растирать, но не толочь вещество. В некоторых случаях применяют агатовые ступки.



в



г

Рис. 2.34. Тигли: *а* – треугольник для тиглей; *б* – тигель в фарфоровом треугольнике; *в* – металлический тигель; *г* – платиновый тигель.

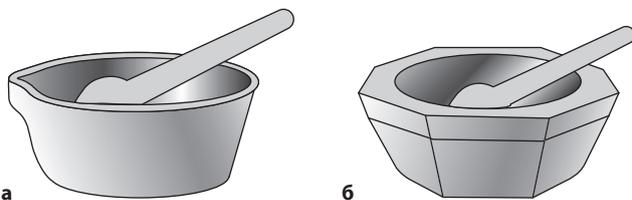


Рис. 2.35. Ступки с пестиком: *а* – фарфоровая; *б* – агатовая.

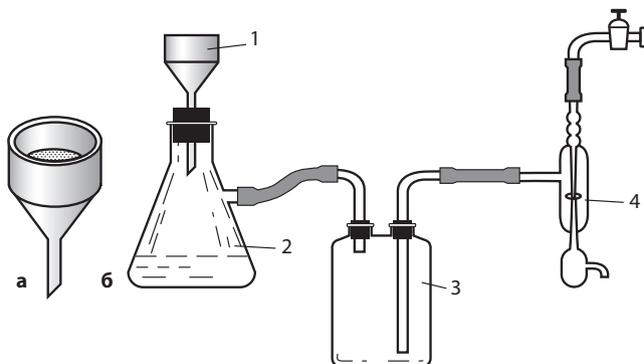


Рис. 2.36. Фильтрация при помощи фарфоровой воронки Бюхнера: *а* – воронка; *б* – схема устройства для фильтрации (*1* – воронка; *2* – колба; *3* – предохранительная склянка; *4* – водоструйный насос).

Для фильтрации под вакуумом используют *фарфоровые воронки Бюхнера*, конструкция которых отличается от обычных (стеклянных) воронок наличием вертикальной стенки, перегородки с отверстиями и конической нижней частью с трубкой (рис. 2.36). Через резиновую (каучуковую) пробку воронка Бюхнера вставляется в коническую колбу Бунзена, которая присоединяется к водоструйному насосу посредством резиновой (каучуковой) трубки. При употреблении воронки Бюхнера на сетчатое дно ее помещают два кружка фильтровальной бумаги, диаметр которых примерно на 1 мм меньше внутреннего диаметра воронки. Для изготовления таких кружков листок фильтровальной бумаги кладут на воронку и слегка нажимают на него ладонью; при этом на бумаге получается отпечаток отверстия воронки. По сделанному отпечатку лист бумаги обрезают ножницами и подгоняют к размерам дна воронки. Бумажные фильтры плотно укладывают в воронку, смачивают дистиллированной водой и, соединив колбу Бунзена с водоструйным насосом через предохранительную склянку, приступают к фильтрации.

В клиничко-лабораторной практике широко используют и *фарфоровые стаканы* того же объема, что и стеклянные (рис. 2.37).

Для отбора веществ, снятия осадков с фильтров применяют *фарфоровые ложки-шпатели* (см. рис. 2.38). В практике находят применение *фарфоровые ложки для прокаливания* и *фарфоровые трубки* (см. рис. 2.39).



Рис. 2.37. Набор фарфоровых стаканов.



Рис. 2.38. Фарфоровая ложка-шпатель.

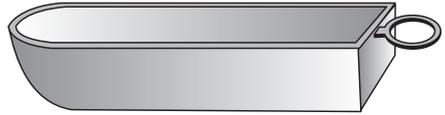


Рис. 2.39. Фарфоровая ложка для прокаливания.

В отдельных случаях в качестве лабораторной посуды используются изделия из кварца.

Кварцевую посуду можно без риска нагревать на открытом пламени горелки и сразу же охлаждать, например, опустив нагретый сосуд в холодную воду: при этом сосуд не лопается.

Кварц, к тому же, свободно пропускает ультрафиолетовые лучи, поэтому из него изготавливают спектрофотометрические кюветы. Кроме того, такие кюветы легко отмываются от загрязнений. Длина оптического пути в оптических кюветах из кварца может составлять 1, 3, 5, 10, 20, 30, 50 и 100 мм.

Кварц используется для производства колб всех видов, пробирок, стаканов, выпаривательных чашек, тиглей, термометров и пр. Однако кварцевую посуду нельзя употреблять при работе с фтористоводородной (плавиковой) кислотой, так как кремнезем с ней взаимодействует.

2.4. Изделия из металла

В лабораториях широко применяется разнообразное вспомогательное оборудование из металла. Постоянным атрибутом КДЛ является обычный лабораторный *штатив*, представляющий собой стальной стержень, укрепленный на тяжелой стальной подставке, чаще всего имеющей форму четырехугольника (рис. 2.40).

Металлические штативы (типа ШФР и др.) служат для закрепления в них всякого рода приборов. Обычно штативы поступают в продажу с набором *держателей (лапок)* различной величины. Иногда держатели для бюреток отлиты вместе с муфтой; лапки и муфты выпускаются самых разнообразных форм и величин. Они предназначены для закрепления бюреток, холодильников, делительных воронок, колб и др. Чтобы внутренняя часть губ лапок не раздавила при зажимании стекло, ее покрывают пробкой или же на губы лапки натягивают куски резиновой трубки. С помощью колец устанавливают на нужной высоте колбы, стаканы и другие приборы.

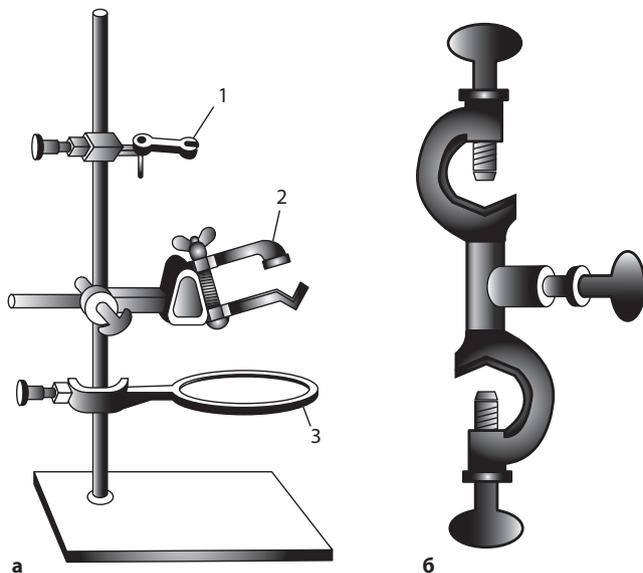


Рис. 2.40. Лабораторный штатив из железа с набором: *а* – набор (1 – лапка малая; 2 – лапка большая; 3 – кольцо); *б* – муфты для лапок и колец.

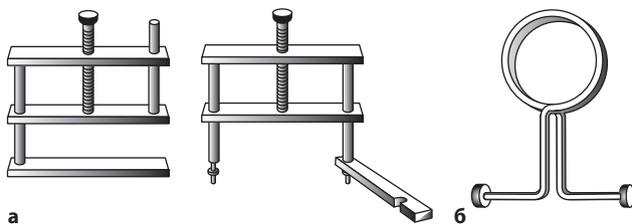


Рис. 2.41. Зажимы: *а* – Гофмана; *б* – Мора.



Рис. 2.42. Пинцеты.

При проведении большинства работ в КДЛ используются *зажимы* двух типов: *винтовые* (зажимы Гофмана) и *пружинные* (зажимы Мора) (рис. 2.41). Зажимы Гофмана обычно используются тогда, когда требуется значительная герметичность системы и нет необходимости их часто открывать. В тех же случаях, когда приходится очень часто пользоваться зажимом (например, на бюретках и пр.), предпочтительно применять зажимы Мора.

Пинцеты (рис. 2.42) служат для взятия разнообразных небольших предметов.

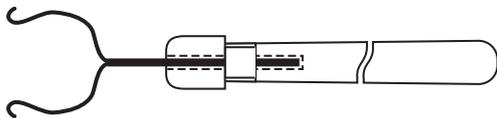


Рис. 2.43. Ухватик.



Рис. 2.44. Тигельные щипцы.

Тигельные щипцы и ухватки (рис. 2.43, 2.44) используются для захватывания тиглей.

При пользовании металлическими тиглями следует учитывать прежде всего особенности реакционной способности металла. Так, нельзя плавить в платиновых тиглях гидроксиды щелочных металлов (едкие щелочи), нитриты, оксиды железа, соли свинца, олова и некоторых других тяжелых элементов. Вместе с тем, в них можно помещать фториды и проводить работы с плавиковой кислотой. Раскаленные платиновые тигли нужно брать обязательно щипцами с платиновыми наконечниками и регулярно после работы промывать водой. Нагревать платиновый тигель следует в самой верхней части пламени. Платиновые тигли нельзя чистить щеткой или наждаком.

Кроме того, в лабораторной практике используют металлические *соединители для трубок, магниты для мешалок* (обладают высокой магнитной силой и имеют долгий период службы за счет инкапсулирования немагнитной основы в тефлоновую оболочку).

Медные и чугунные ступки используются для того, чтобы разбивать в них крупные куски веществ. Пестик изготавливается из того же металла, что и сама ступка. Внутренняя поверхность дна металлических ступок округлая.

2.5. Хранение посуды

Стеклоянная лабораторная посуда требует бережного, специального хранения. Размещать ее можно на стеллажах, каждая полка которых соответствует высоте стеклянных изделий. Круглодонные колбы обычно хранят на полках с невысокими бортиками (чтобы они не скатывались с полки). Бюретки, пипетки, а также стеклянные приборы нужно держать в ящиках, дно которых выложено ватой.

Пробирки до употребления следует держать завернутыми в плотную бумагу по 10 шт. в каждой пачке. Вымытые и высушенные пробирки после

употребления складывают в специально приспособленный для этой цели ящик или ящик стола, в котором предусмотрено отделение для пробирок.

Нельзя хранить стеклянную посуду вместе с металлическими деталями, так как при этом стекло неминуемо разобьется.

При хранении мерных колб и бюреток со шлифованными деталями все пробки и краны протирают насухо, и между шлифами прокладывается фильтровальная бумага (во избежание их «заедания»), детали закрепляются резинкой или ниткой.

2.6. Мытье лабораторной посуды

Все изделия, предназначенные для выполнения лабораторных работ, должны быть чистыми. Стеклянная посуда считается хорошо вымытой в том случае, если со стенок ее вода стекает равномерно, не оставляя отдельных капель (образуя равномерную тончайшую пленку).

Для мытья лабораторной посуды используются механические, физические (физико-химические) и химические методы.

Стойкий налет или осадок со стенок посуды очищают механическим путем, с помощью щеток, называемых в быту ершиками. При этом надо следить за тем, чтобы ершик не царапал стенки и не пробивал дно у пробирок.

Лабораторная посуда, не загрязненная смолистыми, жировыми и другими плохо растворяющимися в воде веществами, обрабатывается теплой водой. Тщательно вымытую указанным способом посуду в обязательном порядке споласкивают 2–3 раза дистиллированной водой для удаления солей, содержащихся в водопроводной воде.

Мытье паром. Некоторые вещества (в том числе смолистые и жировые) хорошо удаляются струей водяного пара. Данный прием применяется на практике довольно редко, поскольку требует длительного времени (так, если обычную колбу можно вымыть за 5–10 мин, то для мытья паром нужен как минимум 1 ч).

Для практического осуществления процедуры мытья посуды паром в колбу (емкостью 3–5 л) наливают до половины объема воду, на дно кладут несколько стеклянных капилляров (для равномерного и стойкого кипения). Колбу плотно закрывают пробкой с пропущенными через нее трубкой для отвода пара и воронкой, предназначенной для собирания конденсата, вновь стекающего в колбу. Для предотвращения прорыва пара конец воронки опускают в воду (приблизительно на 2–3 см). Верхний же конец трубки вводят в сосуд, укрепленный в лапке или в кольце штатива. После мытья паром посуду, не переворачивая, высушивают или продуванием чистого воздуха, или в сушильном шкафу, или же просто на воздухе (остерегаясь при этом ее загрязнения).

Органические вещества, не растворимые в воде, хорошо удаляются обработкой *органическими растворителями*: диэтиловым (медицинским,

серным, простым) эфиром, ацетоном, спиртом, петролейным эфиром, бензином, скипидаром и т.д.

Применяют и растворы других химических веществ: мыло и, особенно, 10% раствор тринатрийфосфата. Для повышения эффективности этих моющих средств в колбу полезно поместить кусочки чистой фильтровальной бумаги: при последующем встряхивании колбы происходит механическое удаление с их внутренних стенок всех приставших к ним загрязнений. Посуду, вымытую в мыльной воде либо в растворе тринатрийфосфата, следует промыть проточной водопроводной, а затем ополоснуть 3–4 раза дистиллированной водой.

2.6.1. Химические методы очистки посуды

Традиционно используемым химическим способом мытья посуды является обработка ее *хромовой смесью*, точнее, раствором бихромата калия в концентрированной серной кислоте. Моющее действие ее основано на проявлении сильно выраженных окислительных свойств хромовокислых солей в кислом растворе. Поскольку при смешивании бихромата с серной кислотой происходит сильное разогревание смеси, ее рекомендуется готовить в большой фарфоровой ступке или фарфоровом стакане.

Нами рекомендуются несколько хорошо оправдавших себя на практике способов приготовления хромовой смеси («хромпика»):

1. На дно кристаллизатора насыпают тонким слоем порошок бихромата калия, слегка смачивают его дистиллированной водой и очень осторожно, при постоянном помешивании смеси, добавляют концентрированную серную кислоту. Полученную смесь закрывают крышкой.
2. Одну часть бихромата калия или натрия смешивают с тремя частями концентрированной серной кислоты (плотность 1,84).
3. 6 г двуххромовокислого калия (натрия) растворяют в 100 мл воды, а затем в раствор осторожно добавляют 100 мл концентрированной серной кислоты (плотность 1,84).
4. 50 г бихромата калия (натрия) растворяют при нагревании в 50 мл воды, затем приливают 1 л концентрированной серной кислоты.
5. 200 г бихромата калия растворяют в 1 л концентрированной серной кислоты. Этот раствор обладает очень хорошими моющими свойствами, к тому же он более стоек, чем обычная хромовая смесь, а по своим моющим свойствам даже превосходит ее.
6. К 200 г бихромата калия ($K_2Cr_2O_7$) добавляют 100 мл дистиллированной воды и доводят объем смеси до 1 л серной кислотой.
7. В фарфоровой посуде смешивают 200 г бихромата калия с небольшим количеством воды (200 мл) и затем приливают концентрированную серную кислоту. В результате получается сиропообразная жидкость.

Стекланную посуду перед обработкой хромовой смесью обязательно смачивают дистиллированной водой, иначе может произойти выбрасывание жидкости или даже взрыв в зависимости от того, какие вещества находились в посуде.

Если стеклянная посуда загрязнена остатками засохшей крови, ее следует предварительно погрузить на некоторое время в щелочные растворы (едкого натра или калия), способствующие растворению белков и лишь после тщательного ополаскивания водой переходить на обработку хромовой смесью.

Лабораторная посуда, загрязненная жирами и/или жироподобными веществами, до мытья хромовой смесью должна быть тщательно промыта горячей мыльной водой. При этом дополнительно осуществляется механическая очистка загрязнений с помощью ершика.

Перед употреблением рекомендуется слегка подогреть хромовую смесь (до 45–50°C), что повышает эффективность ее моющего действия. С этой целью используют разные приемы:

- подогревают некоторое количество помещенной в колбу хромовой смеси на горячей водяной бане;
- очень осторожно добавляют в хромовую смесь небольшое количество воды и концентрированной серной кислоты;
- предварительно споласкивают горячей водой отмываемый предмет.

Холодной или, лучше, слегка подогретой хромовой смесью заполняют стеклянное изделие до 1/3–1/4 объема и осторожно смачивают ею внутренние стенки, затем смесь выливают обратно в тот же сосуд, в котором она хранится. Слив всю хромовую смесь, посуду оставляют постоять несколько минут, затем промывают 5–7 раз водопроводной и 3 раза дистиллированной водой (чтобы убедиться, что кислота отмыта, можно воспользоваться лакмусовой бумагой или каплей индикатора метилового красного). Поскольку при мытье колб труднее всего отмываются загрязнения на горлышке, для их удаления рекомендуется слегка обогретое горло колбы опустить в хромовую смесь и подержать в ней 1–2 мин.

Самым распространенным способом мытья пипеток и бюреток является погружение их в толстостенный цилиндр, заполненный на 3/4 хромовой смесью, так, чтобы трубки могли быть погружены в нее более чем на половину длины. Через некоторое время стеклянные изделия вынимают и помещают их в цилиндр обратными концами.

В случае необходимости хромовую смесь насасывают в пипетку резиновой грушей (баллончиком), присоединенной через резиновую трубку к пипетке. Можно воспользоваться следующим приемом. Сделав в резиновой груше небольшое отверстие, закрывают его большим пальцем и, сжав грушу, пипетку опускают в хромовую смесь. Не снимая с отверстия большого пальца, постепенно разжимают руку, при этом хромовая смесь поступает в пипетку. После выдерживания хромовой смеси в ней в течение 1–2 мин отнимают большой палец от отверстия груши и дают жидкости стечь. Повторив несколько раз эту операцию, пипетку моют, как обычно.

После длительного употребления хромовой смеси цвет ее из темно-оранжевого переходит в темно-зеленый, что расценивается как признак ее непригодности к использованию. Особенно следует остерегаться попадания в хромовую смесь спирта, который, тотчас окисляясь, восстанавливает шестивалентный хром в ионе $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ в трехвалентный. В результа-

те этой трансформации раствор приобретает зеленую окраску. *Внимание!* Хромовую смесь нельзя применять, если посуда загрязнена продуктами перегонки нефти: керосином, минеральными маслами, парафином и др. В этих случаях ее сначала нужно вымыть органическими растворителями или паром.

Хромовую смесь недопустимо использовать для мытья изделий из пластмассы, а также посуды, предназначенной для проведения ферментных и флуориметрических исследований (при этом способе обработки на стекле остается тонкая пленка соединений хрома, отмывающаяся с большим трудом). Известно, что ионы хрома способны ингибировать ряд ферментов и поглощать ультрафиолетовые лучи.

Хромовая смесь вызывает ожог кожи и разъедает одежду, поэтому обращаться с ней нужно весьма осторожно, соблюдая правила техники безопасности.

Если в процессе мытья посуды хромовая смесь случайно попала на кожу или одежду, участок, на котором она оказалась, следует немедленно и тщательно промыть большим количеством воды, затем слабым (1–2%) раствором питьевой соды (двууглекислого натрия) или аммиака.

Отработанную хромовую смесь нельзя сливать в раковину без предварительной нейтрализации и разбавления во избежание порчи материала раковины, а также металлических и пластмассовых труб внутренней канализационной сети. Хромовую смесь выливают в раковину лишь после выполненной с осторожностью нейтрализации щелочью или при сильном разбавлении водой.

В случае, если ионы хрома мешают течению реакции или наблюдению за ходом ее проведения, для мытья стеклянной посуды с успехом может быть использована смесь концентрированных серной и азотной кислот в соотношении 1:1.

Вместо бихромата калия в качестве окислителя применяют 4% или 5% раствор перманганата калия. К 100 мл раствора марганцовокислого калия добавляют тонкой струей 3–5 мл концентрированной серной кислоты. При этом температура раствора поднимается до 50–60°C. В таком теплом растворе кислого характера перманганат калия проявляет ярко выраженные окислительные свойства, и марганец восстанавливается (исходно семивалентный до двухвалентного). Нужно следить, чтобы из раствора не выпал осадок, так как это снижает его функциональные качества. Пользоваться такой смесью можно так же, как и хромовой.

Иногда после мытья посуды раствором марганцовокислого калия на стенках ее появляется бурый налет; его можно удалить, ополаскивая посуду 5% раствором гидросульфита (бисульфита) натрия NaHSO_3 , растворами закисного сернокислого железа (FeSO_4), соли Мора или органических кислот, лучше всего щавелевой $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$. После этого посуду моют водой.

При работе с подкисленным раствором марганцовокислого калия следует придерживаться тех же приемов мытья и мер предосторожности, которые применимы к пользованию хромовой смесью.

Отработанный подкисленный раствор марганцовокислого калия обычно выливают и повторно не используют, но иногда его применяют несколько раз.

В качестве моющего раствора хорошо зарекомендовала себя смесь *Комаровского*, состоящая из равных объемов 22% раствора соляной кислоты (6 N раствор) и 5% раствора перекиси водорода. Преимуществом этой смеси является то, что она, действуя весьма активно, не оставляет трудно отмывающегося остатка (иногда покрывающего внутренние стенки лабораторной посуды при использовании хромовой смеси).

Смесь наливают в слегка подогретую посуду (мерную посуду нагревать нельзя), или саму смесь подогревают до 30–40°C, обмывают ею стенки посуды, затем выливают в ту же емкость, в которой она хранилась (для повторного использования). После этого посуду моют водой, как обычно.

2.6.2. Мытье серной кислотой и растворами щелочей

При загрязнении обрабатываемых стенок смолистыми веществами посуду можно мыть концентрированной серной кислотой или концентрированным (до 40%) раствором натриевой или калиевой щелочи (смолы большей частью растворяются или в кислоте, или в щелочи). Обработку посуды концентрированным раствором серной кислоты используют и в случае невозможности применения хромовой смеси. Загрязненный сосуд заполняют раствором щелочи на 1/4 его объема.

Обращаясь с этими агрессивными жидкостями нужно весьма осторожно. Кислоту нельзя выливать в раковину: загрязненную серную кислоту или щелочь следует сливать в отдельные стеклянные банки, которые всегда должны стоять около водопроводной раковины.

Во избежание разрушения канализационной сети крепкие растворы кислот и щелочей необходимо предварительно нейтрализовать или сильно разбавить водопроводной водой (обычно такое разбавление достигается при смешивании над раковиной тонкой струи выливаемого реактива с сильным током водопроводной воды).

Загрязнение посуды керосином удаляют обработкой известковым молоком (5–10%). Процедуру его внесения в посуду и встряхивания повторяют 2–3 раза. На колбу емкостью 1 л достаточно взять 100–200 мл известкового молока.

Высокими моющими свойствами обладает тринатрийфосфат (Na_3PO_4), раствор которого готовят из расчета 50–100 г соли на 1 л воды. Вследствие гидролиза соли раствор приобретает щелочную реакцию, и поэтому он используется для удаления со стенок посуды органических веществ (например, белков, жиров и пр.). Посуду, обработанную в этом растворе, промывают проточной водопроводной водой, а затем прополаскивают не менее 3–4 раз дистиллированной водой.

Щелочными растворами тринатрийфосфата или соды (2–5%) производится очистка лабораторной посуды от остатков белка (кровь, сыворотка). В этих растворах изделия оставляют на 1–2 ч, после чего следует их мно-

гократная промывка простой, а затем трехкратно – дистиллированной водой. Белок хорошо растворяет также 0,5–1% раствор пепсина в 1% (0,1 N) растворе соляной кислоты (растворение происходит быстрее в термостате при температуре 37°C).

По стенке хорошо вымытой посуды вода должна стекать, не оставляя капель.

Наряду с широко распространенными способами мытья посуды содовыми и мыльно-содовыми растворами, для обработки ее часто применяются синтетические моющие средства – детергенты. Основой их являются поверхностно-активные вещества, а различные добавки к ним (щелочные и нейтральные электролиты, гидрофильные защитные коллоиды и др.) служат для усиления моющего эффекта.

Для мытья посуды могут использоваться также стиральные порошки. После их употребления посуду рекомендуется сполоснуть 3% раствором хлористоводородной (соляной, HCl) кислоты (для лучшего удаления фосфатов), и лишь затем промыть водопроводной и дистиллированной водой.

Надписи, сделанные карандашом по стеклу, также хорошо удаляются при замачивании посуды в 3% растворе стирального порошка.

Для удаления со стенок лабораторных изделий неполярных веществ, обработки кварцевых и других кювет, ускорения процесса сушки применяется мытье в органических растворителях: этиловом спирте, затем диэтиловом (медицинском) эфире или смеси спирта с эфиром в соотношении 1:2 (смесь Никифорова). Такие смешанные способы мытья лабораторной посуды используются, в частности, при мытье бюреток со стеклянными кранами. Перед их мытьем следует вынуть кран из муфты и очистить его от смазки с помощью эфира, затем вновь поставить кран в муфту и закрепить резинкой, чтобы он не выпал при мытье. В бюретку наливают один из моющих растворов (кислоту; растворы щелочей; раствор марганцовокислого калия, подкисленный серной кислотой или хромовой смесью в зависимости от характера загрязнения) и оставляют на 6–8 ч. Под кран бюретки следует подставить какой-либо сосуд, так как без смазки он может протекать. После сливания моющей смеси бюретку тщательно промывают вначале водопроводной, а затем дистиллированной водой.

2.6.3. Очистка посуды для особо точных работ

Поскольку стенки стеклянной и кварцевой лабораторной посуды обладают способностью сорбировать многие ионы, например, свинца, меди, цинка, кадмия, хрома и др. (что может вызывать ошибку при аналитических определениях), после ополаскивания дистиллированной водой их следует обмыть 5% раствором комплексона (ЭДТА, версен, хелатон III), а для удаления хромат-ионов – ополоснуть примерно 0,01 N раствором щавелевой кислоты. Затем лабораторные изделия еще раз обмывают водой, споласкивают комплексоном и заканчивают мытье, как обычно.

2.6.4. Мытье лабораторной посуды из пластмасс

Учитывая способность полиэтилена адсорбировать ионы кислот и щелочей, после контакта лабораторной посуды с кислотой изделия следует быстро промыть слабым (1%) раствором соды, и наоборот, после работы со щелочами посуду нужно смочить слабым раствором кислоты. В обоих случаях затем должна следовать промывка водой.

Полиэтиленовые изделия нельзя подвергать нагреванию выше 40°C, иначе они могут деформироваться. При температуре выше 130°C лабораторная посуда может расплавиться. Поэтому полиэтиленовую лабораторную посуду нельзя использовать для работы с горячими растворами; ее не следует сушить в сушильном шкафу, кипятить в моющих растворах, а также подвергать действию окислителей.

Изделия из полиэтилена в большинстве случаев не требуют сушки. При правильном использовании и не слишком быстром выливании растворов в чистых пипетках практически не остается жидкости (вследствие водоотталкивающих свойств полиэтилена). Если же возникает необходимость просушить полиэтиленовую посуду (в частности, пипетки), то сушку производят на воздухе (при комнатной температуре) или в суховоздушном термостате при температуре 37–38°C.

2.6.5. Устройства для мытья посуды

В связи с большим объемом работ, ежедневно выполняемых в лабораториях ЛПУ по удалению загрязнений с поверхности лабораторной посуды, с этой целью все более широко используются специальные моющие устройства. Известно, что при мытье лабораторной посуды приходится сталкиваться с разнообразными загрязнениями: остатками крови и других биологических жидкостей, примесями реактивов и продуктов реакций, которые представляют собой органические и неорганические, твердые и жидкие вещества.

Для удаления загрязнений, прилипших к поверхности стекла, требуется перевести их в состояние суспензии и эмульсии (именно в этом состоит основной принцип действия моющих веществ). С данной целью используют детергенты (поверхностно активные вещества), влияние которых сочетается с действием физических факторов (ультразвука, струи жидкости, подогрева). Интенсивные ультразвуковые колебания в жидкости вызывают эффект кавитации, сопровождаемый местными воздействиями до сотен и тысяч атмосфер. При этом образуется множество мельчайших пузырьков, возникает более активное перемешивание среды, что еще более усиливает диспергирующее действие детергентов. Наиболее эффективно применение ультразвукового воздействия для мытья мелкой лабораторной посуды, в том числе капилляров. В настоящее время в ряде лабораторий находят применение как отечественные, так и импортные машины для мытья лабораторной посуды.

Посуда считается хорошо вымытой, если по стенке ее вода стекает, не оставляя капель.

В соответствии с Приказом Министерства здравоохранения Республики Беларусь №315 «Об утверждении примерного табеля оснащения клиничко-диагностических лабораторий лечебно-профилактических учреждений приборами, оборудованием и медицинским инструментарием» от 6 октября 1999 г. амбулаторные лечебно-профилактические учреждения рекомендуется оснащать мощными устройствами ультразвуковой очистки лабораторной посуды.

2.7. Сушка стеклянной посуды

В обязательном порядке сушка используется, если реакцию необходимо проводить в отсутствие следов влаги. Если же технологические процедуры постоянно проводят с водными растворами, то, как правило, сушка лабораторной посуды нерациональна.

2.7.1. Методы холодной сушки

Самый распространенный способ такой обработки посуды – сушка на колышках. Для этого над раковиной помещают специальную доску с колышками. На эти колышки надевают вымытую посуду, оставляя ее до тех пор, пока она не высохнет (нужно следить за чистотой колышков!). Недостатком сушки на колышках является возможность загрязнения посуды. Для предотвращения этого колышки можно обертывать чистой фильтровальной бумагой и уже потом надевать на них посуду. Иногда в лабораториях пользуются *столами для сушки*. Это обычный стол, в крышке которого прорезаны круглые отверстия (гнезда) различного диаметра.

Вымытую посуду можно высушить и струей воздуха, создаваемой воздуходувками (в том числе резиновой грушей). Для этой цели с успехом можно использовать сжатый воздух. Воздух необходимо очистить от пыли и других механических загрязнений путем фильтрования через слой чистой (лучше стеклянной) ваты, помещенной в поглотительную склянку.

Сушка лабораторной посуды может производиться обработкой *этиловым спиртом и эфиром*. Обтерев сосуд снаружи чистым полотенцем, ополаскивают его сначала чистым этиловым спиртом, а затем диэтиловым (серным, медицинским) эфиром. Пары эфира удаляют продуванием холодного воздуха.

Высушивание в эксикаторе позволяет предотвратить загрязнения влажной посуды веществами, содержащимися в воздухе. Для этой цели лучше применять вакуум-эксикаторы, заполненные силикагелем, хорошо адсорбирующим пары воды, но не серной кислотой.

2.7.2. Методы горячей сушки

Для быстрой сушки стеклянной лабораторной посуды используются *сушильные шкафы* (электрические и др.). Посуду помещают в сушильный шкаф после того, как она некоторое время постояла перевернутой (на ко-

лышках, на решетках или на сушильном столе) для удаления воды. На полках шкафа размещают листы чистой фильтровальной бумаги, сушку проводят при 80–100°C.

При высушивании в сушильном шкафу посуду не следует ставить вверх дном, поскольку это замедляет улетучивание паров воды. Посуду, извлеченную из сушильного шкафа, сразу применять нельзя, ей нужно сначала дать остыть.

Иногда используется сушка горячим воздухом, для чего стеклянные лабораторные изделия размещают над электроплиткой, пламенем горелки.

В случае необходимости используется электротермическое оборудование, например, электропечи для аналитических работ, обжига керамических изделий и термообработки (лабораторные печи, позволяющие создавать температуру свыше 1000°C), муфельные печи различных модификаций, вакуумные, сушильные ламинарные шкафы (например, производства фирмы «Heraeus Instruments», Германия), электрошкафы для сушки различных материалов в воздушной среде (лабораторные сушильные шкафы, создающие температуру 350°C), стерилизаторы для сушки, дезинфекции и стерилизации медицинских инструментов, посуды (позволяющие поддерживать температуру в пределах 200°C), термостаты с рабочей температурой от 5 до 70°C, стерилизаторы (с температурой в камере от 10 до 250°C) производства «Heraeus Instruments» (Германия) и др., электросушитель для рук теплым воздухом.

В клиничко-лабораторной практике нашли использование сухожаровые шкафы крупной российской торгово-промышленной компании «Дельрус», имеющей представительства в 62 городах России, Белоруссии, Казахстана, Украины; сухожаровые шкафы, поставляемые группой компаний «Стормофф» (Россия); роторные испарители, поставляемые ООО «Файн Хемикалс» (Белоруссия) – представителем фирмы «Fine Chemicals» (Австрия).

Глава 3. ХИМИЧЕСКИЕ РЕАКТИВЫ И МЕТОДЫ ИХ ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ОЧИСТКИ

3.1. Химические реактивы, их хранение, правила использования

Химические реактивы (химические реагенты) – это очищенные вещества, предназначенные для выполнения клинико-лабораторных и других исследований.

Емкость, в которой поступает в лабораторию реактив, снабжена этикеткой, которая содержит следующие сведения:

1. Название реактива, его химическую формулу.
2. Массу вещества.
3. Номер Государственного стандарта (ГОСТ).
4. Квалификацию (степень чистоты) реактива.

Степень чистоты реактива увеличивается в ряду следующих квалификационных характеристик: технический (техн.), чистый (ч.), чистый для анализа (ч.д.а.), химически чистый (х.ч.), особо чистый (о.ч.), спектрально чистый, полупроводниково чистый. Некоторые реактивы имеют квалификацию: очищенный (оч.) и высшей очистки (в.оч.).

Степень чистоты импортных реактивов обозначается как: techn. (технические), pur. (чистые), puriss. (самые чистые). Специально для аналитических целей выпускаются препараты высокой степени чистоты с обозначением *pro anal.*

В практической работе КДЛ широко используются реактивы производства следующих компаний: «Fine Chemicals» (Австрия), «Sigma-Aldrich» (США), «Fermentas» (США), «АмерКард» (Россия), «Амтео М» (Россия), «Ай-Си-Эн-инструментс» (Россия), «Pliva-Lachema» (Чехия), «Reanal» (Венгрия), «ПОСН» (Польша), «ARIAC» (Армения), НТПК «Анализ X» и ОДО «Альгимед» (Белоруссия).

Фирма «Sigma-Aldrich» поставляет реактивы для биохимии и исследований в области естественных наук, для тонкого органического синтеза, лабораторные, химические и аналитические реагенты, реактивы для выполнения хроматографических исследований.

Реагенты для выполнения молекулярно-биологических исследований поставляются фирмой «Fermentas» (США), в том числе реагенты для ПЦР, для молекулярной биологии, маркеры молекулярной массы белков, реагенты для электрофореза белков и ДНК/РНК, нуклеиновые кислоты, нуклеотиды, микробиологические среды.

Российская академия сельскохозяйственных наук поставляет типовые реактивы на 40°, 50° и 96° спирте, водные растворы (фуксинсернистые реактивы и др.).

Компания «Альгимед» поставляет для нужд КДЛ наборы реагентов для выполнения клинико-биохимических и молекулярно-биологических исследований, аналитические и сверхчистые реактивы (в том числе кислоты, основания, соли), реактивы фармакопейного качества, растворители и красители для спектрометрии, хроматографического анализа и органического синтеза, стандартные растворы от ведущих европейских производителей, а также культуральные среды и продукты для микробиологии.

В КДЛ также используются ионообменные материалы, стандарт-титры и фиксалялы, а также расходные материалы – пластины для тонкослойной хроматографии, ацетатцеллюлозная пленка, фильтровальная бумага, питательные среды и др.

Если реактив поступает в крупной таре, то по мере надобности его расфасовывают в более мелкую посуду, с которой удобнее обращаться. В этом случае на каждую банку или склянку наклеивают свою этикетку, на которой указывают формулу, а в некоторых случаях и название вещества. Помимо бумажных этикеток можно пользоваться надписями на стекле, выполняемыми разными способами.

В целях соблюдения мер безопасности запрещается хранить и применять реактивы без этикеток.

Токсичные, ядовитые вещества хранят в несгораемом шкафу, ключ от которого должен находиться у материально ответственного лица.

Летучие, легко испаряющиеся вещества, обладающие резким неприятным запахом, а также образующие ядовитые пары, следует хранить в вытяжном шкафу или в помещении, которое можно хорошо проветрить.

Огнеопасные вещества размещают в железных ящиках с асбестовой прокладкой, в местах, удаленных от открытого пламени. Особенно внимательно нужно следить за тем, чтобы эти реактивы были очень хорошо закупорены. В случае надобности следует парафинировать пробки.

Баллоны с газом в сжатом или жидком состоянии следует размещать как можно дальше от нагревательных приборов, радиаторов отопления, не допускать воздействия на них солнечных лучей и пр. Во избежание взрыва с баллонами нужно обращаться очень осторожно.

Надо обращать внимание на возможность взаимодействия реактива с материалом пробки, которой закупоривается содержащая их емкость. Известно, например, что резиновые пробки сильно набухают под действием органических жидкостей (спирта, бензола, ацетона, эфира). Под влиянием галогенов (брома, йода) резиновые пробки теряют эластичность, становятся

ся хрупкими. Поэтому при хранении данных реактивов флаконы лучше закупоривать стеклянными притертыми пробками, так же следует поступать и при хранении кислот.

Что касается растворов щелочей, то флаконы, в которых они хранятся в твердом виде и тем более в виде раствора, нельзя закупоривать притертыми пробками, так как при наливании раствора внутренняя поверхность горла сосуда смачивается щелочью, а затем под влиянием углекислого газа между горлом и пробкой образуются карбонаты, которые плотно заклинивают пробку и ее становится невозможно вынуть (пробку, как говорят, «заедает»). Чтобы предохранить щелочь от действия углекислого газа воздуха, сосуд с реагентом закрывают резиновой пробкой, в которую вставлена хлоркальциевая трубка с твердой натронной известью для поглощения углекислого газа.

Иногда реактив хранят в ампулах. Это касается в основном очень гигроскопичных легко испаряющихся веществ, активно взаимодействующих с газами воздуха.

Реактивы, весьма чувствительные к действию света (например, AgBr , AgNO_3 , H_2O_2 и др.), хранят в склянках из оранжевого стекла. Иногда содержащие такие вещества бутылки заворачивают в темную бумагу и ставят в шкаф, непроницаемый для света.

Реактивы, не требующие специальных условий хранения, лучше всего размещать на стеллажах с узкими полками, ширина которых достаточна для размещения друг за другом двух банок средней величины. Для удобства пользования реактивами рекомендуется расставлять их следующим образом. Неорганические вещества размещают в последовательности согласно общеизвестной классификации: простые вещества (металлы, неметаллы), оксиды, основания, соли. Соли лучше всего сгруппировать по катионам, т.е. металлам, входящим в их состав. Органические вещества удобнее расставлять по алфавиту.

Кислоты нужно хранить отдельно.

Если ассортимент реактивов очень разнообразен, то шкафы и полки следует пронумеровать, а на сами реактивы завести картотеку, по которой можно было бы легко найти любой необходимый реактив.

При пользовании реактивами их нужно беречь от загрязнения. В связи с этим, если реактив получен в крупной расфасовке, не рекомендуется в повседневной работе брать его из крупной тары. Следует отсыпать реактив или отлить часть раствора в более мелкую посуду для постоянного его использования.

Недопустимо сыпать или сливать реактивы из посуды, в которой проводится реакция, обратно. Если взято слишком много реактива, то его нужно высыпать или отлить в новую чистую посуду, сделать на ней надпись и использовать в дальнейшем.

Нельзя использовать пробки от разных реактивов или хранить реактивы в открытых емкостях. Вскрывать запечатанные склянки с реактивами необходимо осторожно, во избежание попадания в них парафина и грязи с пробок.

Нельзя брать реактивы руками. Если реактив порошкообразный, используют роговые или фарфоровые ложечки, совочки, лопаточки. Если реактив требуется поместить в пробирку, то его можно зачерпнуть чистой сухой пробиркой прямо из склянки.

Пересыпать порошкообразный реактив допустимо через воронку, сделанную из чистого листа белой глянцевой бумаги, целлофана или пергаменты. При переливании раствора реактива из бутылки в сосуд с более узким горлом необходимо всегда пользоваться воронкой. Если же бутылка, из которой берут жидкость, очень велика, пользуются пипеткой или сифоном. Набирать реактив пипеткой можно только с помощью резиновой груши.

Крупные куски реактива извлекают из емкости тигельными щипцами. Крупные куски реактива нужно разбить на более мелкие части, которые затем растереть в ступке, соблюдая меры предосторожности. Для извлечения реактива из ампулы сначала на ее узком конце делают надрез напильником, затем, обернув руки полотенцем, отламывают конец ампулы, осуществляя одновременно как бы растягивающее движение, чтобы не поранить руки стеклом.

Особые предосторожности следует соблюдать при растворении кислоты в воде. Всегда надо приливать кислоту к воде, а не наоборот.

Ни в коем случае нельзя пробовать реактивы на вкус. Если требуется понюхать реактив, то содержащую его емкость нельзя подносить непосредственно к носу, поскольку многие реактивы имеют очень резкий запах и, к тому же, весьма токсичны. Для этого направляют к себе ладонью струю выделяющегося газа, имеющего запах реактива.

Для быстрого приготовления точных растворов различных веществ (кислот, щелочей и солей) весьма удобно применять *фиксаналы*, представляющие собой запаянные стеклянные ампулы, содержащие 1/10 (иногда 1/20, 1/100) грамм-эквивалента вещества. Фиксаналы поставляются в коробках, соержащих по 10 ампул. На каждой ампуле имеется надпись с указанием названия вещества (или его раствора) и количества реактива в грамм-эквивалентах.

Наиболее широкое применение в практике КДЛ находят фиксаналы, содержащие в запаянных ампулах точное количество серной (H_2SO_4), соляной (HCl), щавелевой ($H_2C_2O_4$) кислот, гидрата окиси калия (KOH), гидрата окиси натрия (NaOH), карбоната натрия (Na_2CO_3), гидрокарбоната натрия ($NaHCO_3$), хлористого натрия (NaCl), хлористого калия (KCl), оксалата натрия ($Na_2C_2O_4$), бихромата калия ($K_2Cr_2O_4$), тиосульфата натрия ($Na_2S_2O_3$), перманганата калия ($KMnO_4$), нитрата серебра ($AgNO_3$), тиоционата аммония (NH_4SCN), тиоционата калия (KSCN), оксалата калия ($K_2C_2O_4$), оксалата аммония ($[NH_4]_2C_2O_4$), нейтрального йода (I_2), тетрабората натрия ($Na_2B_4O_7$), хлористого бария ($BaCl_2$) и др.

Широкий спектр фиксаналов и стандарт-титров предлагается фирмой «Fine Chemicals» (Австрия), имеющей представительства в разных городах стран СНГ, в том числе и в Белоруссии (ООО «Файн Хемикалс»).

3.2. Методы очистки реактивов

В случае, если степень чистоты реактива не удовлетворяет исследователя, его приходится дополнительно очищать в лаборатории. Самыми распространенными методами дополнительной очистки являются фильтрование, дистилляция (перегонка), возгонка (сублимация), перекристаллизация, центрифугирование, абсолютирование (высушивание).

3.2.1. Фильтрование

Технологический процесс отделения от жидкости твердых частиц вещества при помощи фильтрующей перегородки называется фильтрованием. Если величина частичек взвеси превышает размеры пор фильтра, фильтрование идет легко. Однако по мере приближения размеров частиц и пор фильтра друг к другу процесс фильтрования замедляется и может даже прекратиться совсем. Если размер частиц твердого вещества оказывается меньше размеров пор фильтра, отфильтровать взвесь не удастся. Эффективность процедуры механического разделения твердых и жидких компонентов смеси во многом зависит от соразмерности диаметра отделяемых частиц и величины пор фильтра, вязкости, температуры жидкости и других факторов.

Чем выше вязкость жидкости, тем труднее идет процесс фильтрации. Вязкость жидкости зависит от температуры: чем она ниже, тем выше вязкость жидкости, и наоборот. По этой причине растворы веществ, образующие студни (желатина, агар-агара и др.), фильтруются при нагревании.

Скорость фильтрации зависит и от давления: чем оно выше, тем быстрее фильтруется жидкость. Фильтрование может быть проведено под вакуумом или под давлением.

Проводя фильтрование, надо учитывать возможность адсорбции некоторых веществ материалом фильтра. По этой причине фильтры из обычной фильтровальной бумаги оказываются совершенно непригодны для фильтрования растворов, содержащих белковые вещества.

Перед фильтрованием жидкость следует хорошо взболтать и выливать на фильтр, все время встряхивая сосуд с фильтруемой жидкостью.

Фильтрующие материалы

Применяемые в лаборатории фильтрующие материалы могут быть неорганическими (кварцевый песок, прессованное стекло, фарфоровые пластинки, керамические фильтры и др.) и органическими (целлюлоза), сыпучими (кварцевый песок) и пористыми (фильтровальная бумага).

Неорганические материалы применяются для фильтрования жидкостей, нагретых до температур выше 100°C.

Выбор фильтрующего материала зависит от его свойств и требований к чистоте получаемого реактива. Концентрированные растворы щелочей нельзя фильтровать через прессованное стекло, так как содержащаяся в нем двуокись кремния, растворяясь в щелочи, загрязняет ее.

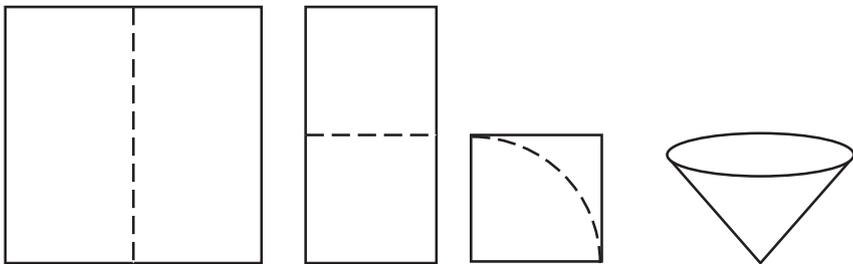


Рис. 3.1. Порядок складывания простого фильтра.

В лабораторной практике наибольшее применение находит фильтровальная бумага, отличающаяся от обычной тем, что она волокниста, более чиста по составу и не проклеена. Бумага фильтровальная предназначена для использования в общелабораторных работах.

В зависимости от размера пор и некоторых других свойств различают фильтры:

- быстрофильтрующие (диаметр пор около 10 нм);
- средней проницаемости (диаметр пор около 3 нм);
- «баритовые», плотные (диаметр пор 1–2,5 нм), которые предназначены для фильтрования мелкозернистых осадков;
- обезжиренные фильтры.

Бумажные фильтры бывают обычными и беззольными (бумага считается беззольной, или обеззоленной, если в значении массы золы одного фильтра после запятой стоит четыре нуля (например, масса золы одного фильтра = 0,00007 г). Обеззоленные фильтры классифицируются как:

1. «Белая лента» – лента средней фильтрации (ФС). Фильтрующая способность составит не более 45 с. Разделительная способность: задерживает осадки, аналогичные свинцу сернокислому хлорноосажденному.
2. «Красная лента» – лента быстрой фильтрации (ФБ). Фильтрующая способность составит 26 с. Разделительная способность: задерживает осадки, аналогичные свинцу сернокислому горячеосажденному.
3. «Синяя лента» – лента медленной фильтрации (ФМ). Фильтрующая способность составляет 100 с. Разделительная способность: задерживает такие осадки, как барий сернокислый.

Фильтры обеззоленные (белая, красная, синяя лента) выпускаются как круги диаметром 7, 9, 11, 12,5, 15, 18 см.

Используемые в лаборатории бумажные фильтры могут быть простыми и складчатыми (плоеными). Для изготовления простого фильтра квадратный кусок фильтровальной бумаги складывают в 4 раза и обрезают ножницами, как показано на рисунке 3.1.

Складчатый, или плоеный, фильтр лучше простого, так как фильтрование через него идет быстрее, потому что фильтрующая поверхность плоеного фильтра вдвое больше, чем простого. Квадратный листок фильтровальной бумаги нужного размера складывается вначале пополам

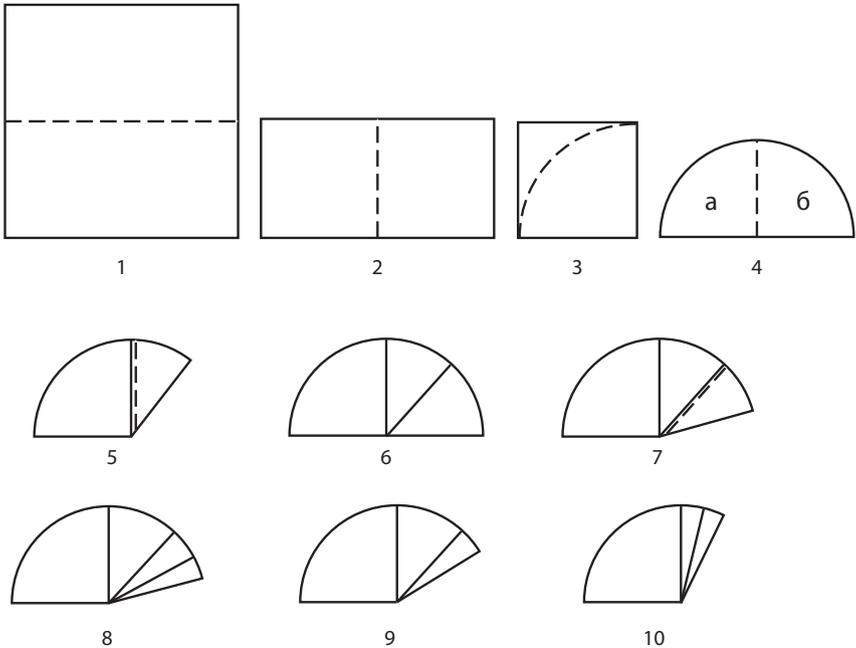


Рис. 3.2. Порядок складывания пленого фильтра.

(рис. 3.2), а затем вчетверо и обрезается ножницами, как при изготовлении простого. Разворачивают фильтр, и правую четверть его сгибают пополам внутрь; полученную восьмую долю фильтра складывают пополам внутрь; наконец, полученную шестнадцатую долю фильтра снова складывают пополам наружу. После этого по размеру полученной дольки ($1/32$ фильтра) складывают гармошкой весь фильтр, разворачивают его и вкладывают в воронку (рис. 3.3). Нужно стремиться к тому, чтобы складки фильтра не подходили вплотную к его центру: в противном случае фильтровальная бумага в центре фильтра может прорваться. Фильтр не должен доходить до краев воронки на 5–10 мм. На рисунке 3.4 показан порядок складывания экономичного фильтра.

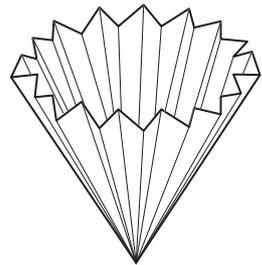


Рис. 3.3. Складчатый фильтр.

Бумажные и стекловолоконные фильтры (а также лодочки для взвешивания, экстракционные гильзы) производятся разными предприятиями, в том числе фирмами «СИМАС» (Россия), «Whatman» (Великобритания–Германия), «Schleicher&Schuell» (Германия).

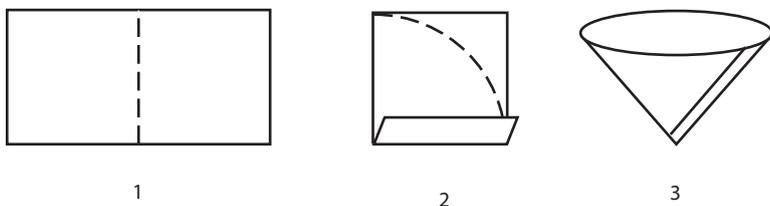


Рис. 3.4. Порядок складывания экономичного фильтра.

Фильтрация при обычном давлении

Фильтрация при обычном давлении осуществляется следующим образом. В укрепленную в кольце обыкновенного или специального штатива воронку помещают бумажный (или другой) фильтр, который перед тем как наливать фильтруемый раствор, слегка смачивают чистым растворителем (обычно водой). Фильтр укладывают в воронку таким образом, чтобы край его не доходил до края воронки приблизительно на 5 мм (рис. 3.5).

Чтобы ускорить процесс фильтрования, иногда получают и искусственно удлиняют столб жидкости в трубке воронки. Столб жидкости может быть получен путем легкого приподнимания захваченного указательным пальцем фильтра. Для удлинения столба жидкости используют резиновую трубку. Образовавшийся столбик жидкости, спускаясь, действует как насос и тем самым ускоряет фильтрование. Наполнение трубки жидкостью облегчается, если трубка воронки имеет петлю, как, например, у аналитических воронок для фильтрования (см. рис. 3.6). Такой удлиненный конец с петлей может быть приспособлен и к воронке с коротким концом при помощи резиновой трубки, снабженной зажимом. В случае, если между фильтровальной бумагой и стенкой воронки образуется прослойка воздуха, фильтрование значительно затрудняется. Для удаления этого воздушного кармана внутри воронки создают небольшое давление, закрывая воронку ладонью и делая ею прижимающее движение.

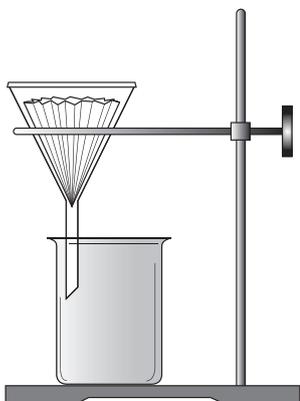


Рис. 3.5. Фильтрация через стеклянную воронку с плоским фильтром.

Перед фильтрованием жидкость должна отстояться в том сосуде, в котором получен осадок. К стакану, в котором находится жидкость с осадком, прикладывают стеклянную палочку (длина свободного конца которой не должна быть больше 6–7 см) и спускают по ней жидкость, направляя ее не в середину фильтра, а немного в сторону, на стенку его, где находится тройной слой бумаги (см. рис. 3.7). После того как основная масса жидкости будет пропущена через фильтр, осадок

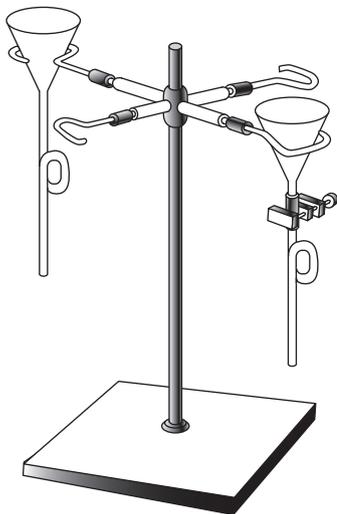


Рис. 3.6. Аналитические воронки для фильтрации.

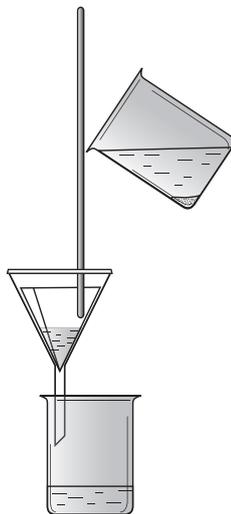


Рис. 3.7. Фильтрация через бумажный фильтр.

вновь несколько раз промывают с применением декантации и затем переносят на фильтр.

Основная масса осадка должна заполнять фильтр не более чем на $1/3$ его высоты. При таком заполнении в фильтре остается достаточное пространство для воды, вводимой при промывке осадка.

Фильтрация под вакуумом

Фильтрация под вакуумом осуществляется путем создания в приемнике уменьшенного давления, вследствие чего жидкость фильтруется под давлением атмосферного воздуха.

Для фильтрации под вакуумом собирают установку, изображенную на рисунке 2.36, б и состоящую из фарфоровой воронки Бюхнера, колбы Бунзена, предохранительной склянки (или другого предохранительно-приспособления), помещаемой между колбой Бунзена и вакуум-насосом. Смочив фильтровальную бумагу на воронке водой, открывают водоструйный насос и проверяют, хорошо ли уложен фильтр. В случае хорошо уложенного фильтра слышится ровный шум; если же фильтр уложен неплотно и происходит подсос воздуха, слышится свистящий звук. Края неплотно установленного фильтра прижимают пальцем к сетчатой перегородке до тех пор, пока свистящий звук не сменится ровным шумом. Затем, не выключая насоса, в воронку наливают жидкость (до половины ее высоты). В колбе Бунзена создается разрежение, и жидкость под влиянием атмосферного давления протекает в колбу. Периодически в воронку добавляют новые порции жидкости. Отсасывание продолжают до тех пор, пока

с конца воронки не перестанет капать жидкость; тогда выключают насос, воронку вынимают, а находящееся в ней вещество вытряхивают на лист фильтровальной бумаги вместе с фильтром и подсушивают. Фильтр отделяют от еще влажного осадка.

При фильтровании под вакуумом нужно следить, чтобы фильтрат, заполняя колбу, не поднимался до уровня отростка, соединенного с насосом, иначе фильтрат будет втягиваться в насос и нарушится правильный ход работы. Поэтому, по мере накопления фильтрата, колбу отсоединяют от насоса (прежде чем остановить водоструйный насос, его следует осторожно отсоединить от колбы, в противном случае из насоса затянется вода), удаляют из нее фильтрат и снова присоединяют.

Фильтрующие пластинки из пористого стекла (с разным диаметром пор) перед употреблением сначала промывают раствором горячей соляной кислоты (с ее отсасыванием), а затем водой. При такой обработке удаляются все примеси и частички пыли, которые могут содержаться в порах.

Фильтрование при нагревании

Оно проводится в тех случаях, когда жидкости (обычно концентрированные растворы) имеют большую вязкость. Фильтрование при нагревании можно проводить при нормальном давлении, под вакуумом и под повышенным давлением. Осуществляется с помощью специальной воронки для горячего фильтрования с электрообогревом (рис. 3.8).

Фильтрование при охлаждении

Поскольку некоторые органические вещества (бензол, уксусная кислота и др.) при температуре ниже комнатной затвердевают и кристаллизуются, для их отделения от водной фазы часто прибегают к фильтрованию при охлаждении. Осуществляется оно в приборе, изображенном на рисунке 3.9.

В глиняную бутылку с отрезанным дном помещают резиновую пробку, в которой высверлены два отверстия: одно для воронки, другое для отводной трубки. Сосуд обертывают войлоком, закрепленным веревкой. После этого в пробку вставляют воронку и отводную трубку и заполняют устройство охлаждающей смесью (например, льдом, снегом или смесью льда с солью).

3.2.2. Промывание осадков

Промывание осадков состоит в проведении процедур перемешивания и осторожного сливания (декантации) жидкости с отстоявшегося осадка. С этой целью осадок, подлежащий промыванию, заливают дистиллиро-

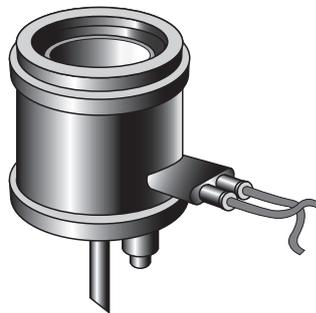


Рис. 3.8. Воронка для горячего фильтрования с электрообогревом.

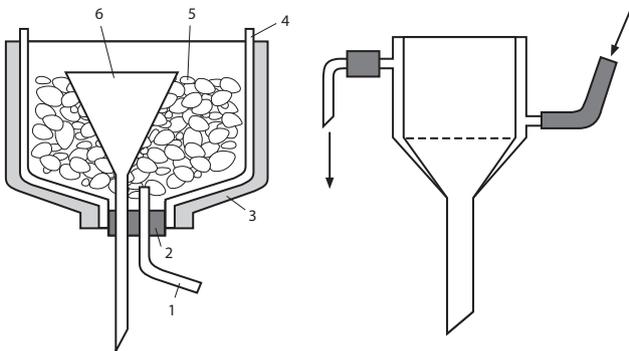


Рис. 3.9. Прибор для фильтрования с охлаждением: 1 – отводная трубка; 2 – пробка; 3 – войлок; 4 – сосуд; 5 – охлаждающая смесь; 6 – воронка.

ванной (предпочтительно горячей) водой (или другой промывной жидкостью), взбалтывают при помощи стеклянной палочки, затем дают отстояться и образующуюся над осадком жидкость осторожно сливают при помощи стеклянной палочки на установленный в воронке фильтр (при этом осадок должен оставаться в колбе или стакане (рис. 3.10, 3.11). К оставшемуся в сосуде осадку снова приливают промывную жидкость и повторяют проделанную процедуру. После третьего или четвертого промывания проверяют степень полноты отмывки. С этой целью из последней порции промывной воды берут несколько капель жидкости, переносят на часовое стекло или в пробирку и проверяют, содержится ли во взятой пробе отмываемое вещество. Если они присутствуют, повторяют промывку еще 1–2 раза.

Промывание на фильтре продолжают до тех пор, пока в фильтрате не будет обнаруживаться то вещество, которое отмывают. Промывание нужно стремиться провести возможно малым количеством воды (или другой промывной жидкости). Это обусловлено тем, что абсолютно нерастворимых веществ нет и каждый раз при промывании свежей порцией жидкости часть осадка все же переходит в раствор; вполне понятно, что чем больше взято жидкости для промывания, тем больше поте-

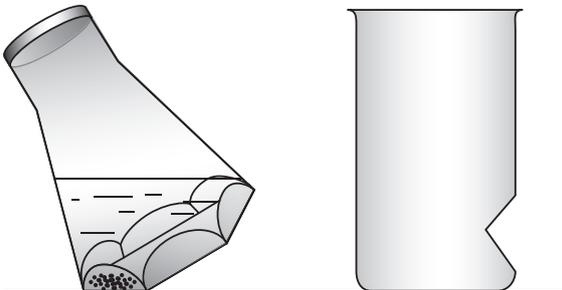


Рис. 3.10. Колба и стакан для промывания осадков с применением декантации.

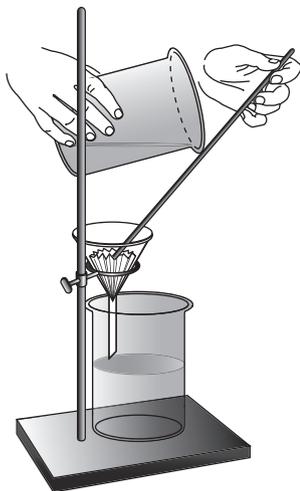


Рис. 3.11. Сливание жидкости с осадка на фильтр.

ри, а следовательно, и ошибка при анализе. При промывании осадка горячей дистиллированной водой ее следует нагревать в колбе-промывалке, которую предварительно нужно обязательно встряхнуть, чтобы предотвратить выброс кипятка через трубку (вода в промывалке может оказаться перегретой).

В случае, если отмываемое вещество не обнаруживается, к осадку в сосуде добавляют еще некоторое количество воды, взбалтывают его и, не давая отстояться, по палочке переводят на фильтр, через который сливали промывную жидкость. Эту операцию повторяют до тех пор, пока на фильтр не будет переведен весь осадок. Последние остатки осадка удаляют со стенок стакана вымыванием струей воды из промывалки, как показано на рисунке 3.11. Отфильтрованный осадок окончательно промывают на фильтре.

При промывании осадка на фильтре нужно:

- воду наливать на фильтр в таком количестве, чтобы она полностью покрывала осадок и не доходила до краев фильтра 3–5 мм;
- каждую новую порцию воды вносить на фильтр не раньше, чем будет полностью профильтрована предыдущая (в противном случае промывание осадка сильно затягивается, а на процесс промывания потребуется большое количество жидкости);
- воду на фильтр выливать по стеклянной палочке (во избежание разбрызгивания жидкостей).

3.2.3. Центрифугирование

При работе с малым количеством осадков вместо фильтрования целесообразно проводить центрифугирование. Для этого используют специальные центрифужные пробирки, позволяющие получить плотный слой осадка. Надосадочную жидкость осторожно отбирают при помощи пипетки, затем в пробирку наливают столько же воды (или другой промывной жидкости), сколько ее было использовано для первого центрифугирования; осадок взбалтывают при помощи стеклянной палочки и вновь центрифугируют. Жидкость, отделенную от осадка (центрифугат) проверяют на полноту осаждения.

Разделение смеси жидкого и твердого вещества осуществляется в специальных приборах (центрифугах). Возникающая при центрифугировании центробежная сила направляет частички более плотных веществ по радиусу ко дну пробирок.

В КДЛ хорошо зарекомендовали себя центрифуги типа ОПН-3 (1–3000 об./мин) и ОПН-8 (до 8000 об./мин) производства фирмы «Дастан» (Россия), центрифуги серии СМ («Elmi», Латвия), различные модифика-



Рис. 3.12. Центрифуги: *а* – МР («StatSpin», США); *б* – MSC 3000 («Biosan», Латвия); *в* – ОПН-8 («Дастан», Россия).



Рис. 3.13. Центрифуга CM 6M («Elmi», Латвия).

ции центрифуг фирмы «Heraeus Instruments» (Германия), многоцелевые центрифуги МР и экспресс-центрифуги Express 3 («StatSpin», США), центрифуги MSC 3000 и MSC 6000 («Biosan», Латвия). Центрифуги поставляются рядом компаний, в частности, ТПК «Дельрус» (Россия), имеющей представительства в 62 городах России, Казахстана, Украины, Белоруссии; «Детстом-1» (Россия), являющейся представителем в России фирмы «Elmi»; «Витал-Диагностикс» (Россия) – официальным дилером компании «Pliva-

Lachema» (Чехия); «Диасис», «Вест Медика» и «Интермедика» (Россия). Налажено производство центрифуг для КДЛ в Белоруссии (рис. 3.12).

Центрифуга лабораторная клиническая ОПН-3 («Дастан», Россия) является обычной переносной центрифугой периодического действия с частотой вращения 1000, 1500, 3000 об./мин, со ступенчатой регулировкой угловой скорости вращения ротора. Используется для одновременного центрифугирования 10 пробирок (объемом до 15 мл). Применяется для разделения неоднородных жидких систем плотностью до 2 г/см³ в поле центробежных сил.

Центрифуга лабораторная ЦПА1-12 настольная («Долгопрудненское научно-производственное предприятие», Россия) с частотой вращения ротора 1500 и 3000 об./мин, с блокировкой крышки, не требует уравнивания пробирок; время разгона до максимальной частоты вращения ротора – 2 мин.

Центрифуга CM 6M («Elmi», Латвия), рассчитанная на одновременное центрифугирование 12 пробирок, со скоростью вращения 100–3000 об./

мин, звуковым сигналом остановки ротора, цифровой индикацией времени и скорости вращения (рис. 3.13).

Низкоскоростная центрифуга для малых объемов СМ-6 («Elmi», Латвия) является очень простой и надежной моделью для выполнения рутинных задач в различных областях химии, биологии и медицины. Имеет бакет-ротор на 12 пробирок объемом до 15 мл, 3 фиксированные скорости вращения ротора (1000, 1500, 2750 об./мин.) устанавливаются индивидуальными кнопками: На световом индикторе отображаются время и скорость вращения. Имеется блокировка крышки во время работы двигателя, звуковой индикатор остановки ротора. Практически неограниченный режим непрерывной работы.

Многофункциональные центрифуги. К ним относятся, в частности, высокоскоростная напольная охлаждаемая центрифуга KR 25i производства «Thermo Electron Corporation» (Финляндия) для работы с пробирками от 1,5 до 500 мл и высокоскоростные центрифуги производства компании «Beckman Coulter» (США).

Микроцентрифуги – это небольшие настольные центрифуги, специально предназначенные для центрифугирования микропробирок от 0,2 до 2,0 мл. Все модели имеют цифровой дисплей и таймер. Среди них микроцентрифуга СМ-50 («Elmi», Латвия) с угловым ротором на 12 мест, создающим центробежное ускорение до 18000 g, оснащена цифровым индикатором времени, таймером, устройством для регулирования скорости торможения, звуковым оповещением окончания работы; центрифуга медицинская настольная ЕВА 20 (скорость вращения ротора – от 500 до 6000 об./мин) и высокоскоростная многоцелевая лабораторная центрифуга ЕВА 21 (скорость вращения ротора – от 4000 до 18000 об./мин) фирмы «Hettich» (Германия); микроцентрифуги фирмы «Eppendorf» (Германия) позволяют получить максимальное ускорение от 10600 до 20800 g, для выполнения специальных исследований с успехом используется микроцентрифуга Espresso производства компании «Thermo Fisher Scientific» (Франция).

Центрифуги гематокритные, например, центрифуга СМ-70 («Elmi», Латвия).

При пользовании центрифугами необходимо соблюдать ряд требований. Наполненные жидкостью центрифужные пробирки должны иметь одинаковую массу. Уравновешивание их производится попарно на специальных весах для взвешивания (тарирования) пробирок. Уравновешенные пробирки вставляют в гнезда центрифуги. Центрифугу необходимо запускать на полный ход не сразу, а постепенно. При появлении сильной вибрации центрифуги ее нужно сразу же отключить до выяснения причины ее появления. При этом предохранительная крышка должна быть закрыта как во время пуска и остановки, так и во время работы центрифуги.

После выключения следует дать возможность центрифуге остановиться самой, только после этого можно вынимать пробирки. Центрифуги с большой массой ротора (не оснащенные тормозным устройством) тре-

буют длительного времени для остановки. Оснащение центрифуг автоматическим тормозом значительно сокращает время до полной остановки после выключения. Центрифуги также могут быть оснащены часами с устройством для автоматического выключения по истечении заданного времени. В практике лабораторных работ используются также центрифуги с охлаждением, сверхскоростные центрифуги (до 40 000 об./мин), которые применяют для центрифугирования вязких растворов.

Для расчета числа оборотов ротора центрифуги в единицу времени при заданном числе g (относительное центростремительное ускорение – ОЦУ) используют формулу:

$$n = \frac{30}{\pi} \cdot \sqrt{\frac{980 \cdot g}{r}},$$

Для вычисления фактора разделения (ФР) используют формулу:

$$\Phi P = 1,117 r n^2 \cdot 10^{-3},$$

где n – число оборотов в 1 мин; r – радиус ротора центрифуги (см); g – гравитационная постоянная g ; π – константа (3,14).

С этой целью используют и номограммы, например, подобную приведенной на рисунке 3.14.

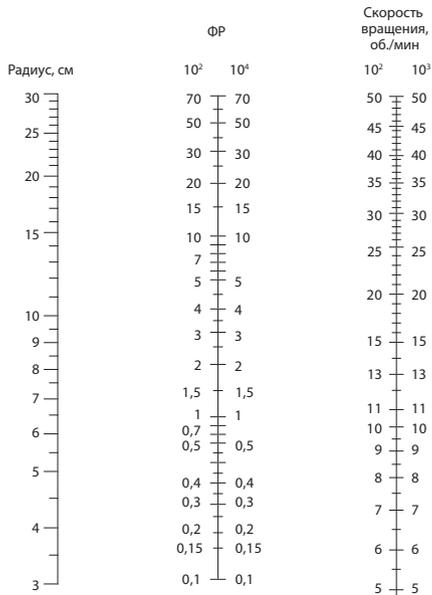


Рис. 3.14. Номограмма пересчета числа оборотов в величину ФР центрифуги.

3.2.4. Перегонка (дистилляция)

Перегонка – это способ дополнительной очистки вещества, основывающийся на конденсации паров перегоняемой жидкости. Известно, что температура, при которой жидкость закипает (температура кипения), соответствует состоянию, когда давление пара больше, чем внешнее атмосферное давление (температура кипения часто используется для характеристики чистоты вещества). При падении внешнего давления уменьшается температура кипения жидкости, и наоборот. Если жидкость нагревать до кипения и отводить образующийся пар по трубке, то при охлаждении их на стенках начнется образование капелек жидкости. Этим явлением пользуются для очистки жидкостей, применяя процесс *дистилляции*, или *перегонки*.

Понижением температуры кипения при уменьшении давления очень часто пользуются в лаборатории, так как некоторые вещества при нагревании их до температуры кипения при нормальном давлении разлагаются. Поэтому если такие вещества требуется перегнать (например, с целью очистки), то применяют перегонку в условиях пониженного давления или в условиях вакуума (вакуум-перегонку). В химических справочниках всегда указывают, при какой температуре и каком соответствующем ей давлении жидкость кипит. Если, например, в справочнике указано $118^{\circ}\text{C}/14$, это значит, что данная жидкость кипит при температуре 118°C , если давление равно 14 мм рт.ст.

На характер кипения жидкости существенное влияние оказывает растворенный в ней воздух, пузырьки которого служат тем центром, возле которого образуются пузырьки пара (после удаления воздуха воду можно нагреть до 130°C при атмосферном давлении). Кипение дистиллированной воды значительно облегчается при введении в нее какого-либо пористого тела, например, кусочка пемзы или неглазурованного фарфора. Такие твердые тела, вводимые для облегчения кипения, называются *«кипелками»*. Хороший результат дает простое механическое перемешивание, которое легче и удобнее всего проводить при помощи магнитной мешалки.

Кипение жидкости часто сопровождается «толчками». Для их предотвращения в горло перегонной колбы слоями размещают (выше уровня жидкости) стеклянную вату. Иногда к перегоняемой жидкости добавляют соединения, которые при нагревании разрушаются, выделяя газ (например, двууглекислый натрий). В качестве агентов, выделяющих неактивный газ, можно использовать только такие соединения, продукты распада которых не действуют как-либо на перегоняемое вещество. Для предотвращения «толчков», сопровождающих кипение, можно использовать стеклянные диски из спрессованного волокна, которые, быстро двигаясь под действием конвекционных токов кипящей жидкости, предотвращают образование перегретых участков, около которых возникают «толчки». Для предотвращения задержки кипения из-за перегрева жидкости используется также принцип перегрева в малом объеме. На дно стакана помещают часовое стекло выпуклостью вверх, а в круглодонную колбу – часовое стекло вы-

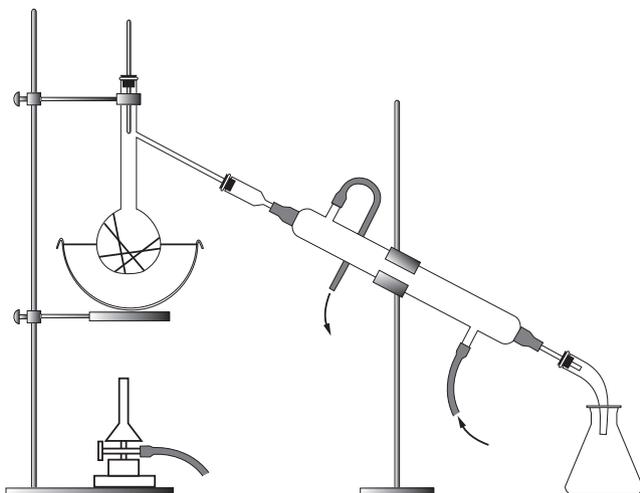


Рис. 3.15. Прибор для перегонки при нормальном давлении.

пуклостью вниз или диск. Между дном сосуда и часовым стеклом или диском создается зазор, в котором происходит кипение.

Перегонка при нормальном давлении допустима в тех случаях, когда процесс нагревания не вызывает распад вещества и когда перегоняемая жидкость имеет не слишком высокую температуру кипения. Осуществляется такая перегонка в приборе, состоящем из круглой (круглодонной и плоскодонной) колбы, можно использовать колбу Вюрца, прямого холодильника (Либиха) и приемника, которые укрепляют лапками на штативе (рис. 3.15).

Колбу помещают в водяную или другую баню либо ставят на кольцо, укрепленное в лапке штатива. Отводная трубка колбы должна входить в форштосс холодильника не менее чем на 4–5 см (от пробки). Убедившись в надежном соединении колбы с холодильником и прочности крепления колбы, в ее горло вставляют воронку таких размеров, чтобы нижний конец ее был на 2–3 см ниже отводной трубки, вливают жидкость, подлежащую перегонке (она должна занимать не более $2/3$ объема колбы) и закрепляют в горле пробку с отводной трубкой (дефлегматором), в котором размещен термометр. Собранный прибор тщательно проверяют (надежность крепления элементов установки, хорошо ли подобраны пробки, правильно ли стоит термометр и т.д.) и только после этого подставляют под выходное отверстие холодильной трубки приемник для дистилляции и начинают нагревание. Приемником могут служить химические стаканы, конические колбы и другие сосуды. При перегонке нельзя допускать бурного кипения, так как поднимающаяся с парами жидкость может попасть в отводную трубку и загрязнить дистиллят. Для обеспечения процесса равномерного кипения в колбу бросают несколько стеклянных капилляров, запаянных с одного конца.

Иногда используют процедуру фракционной, или дробной, перегонки, позволяющей выделить отдельные компоненты из смесей жидкостей с различными температурами кипения. Такую перегонку ведут с обязательным применением дефлегматора (см. рис. 2.12). Не все смеси жидкостей с отличающимися температурами кипения можно разделить дробной перегонкой. Так, не разделяется на составные части смесь, состоящая из 7 частей этилового спирта и 93 частей бензола. Температура кипения этой жидкости равна 60°C, этилового спирта – 78°C, бензола – 80°C. Подобные смеси получили название *нераздельно кипящих*, или *азетропных*.

Путем перегонки под обыкновенным давлением получают дистиллированную и бидистиллированную воду.

3.2.5. Дистиллированная и деминерализованная вода, технологии получения

Путем однократной перегонки водопроводной воды получают дистиллированную воду. Она практически не содержит неорганических и органических веществ. Процесс перегонки (дистиляции) осуществляется в специальных аппаратах, называемых *перегонными кубами*, или *дистилляторами*. Для этих целей в КДЛ наиболее часто используют дистилляторы (перегонные аппараты) ДЭ-1, ДЭ-2, ДЭ-4, ДЭ-10, ДЭ-25 («ЭМО», Россия), КДЛ также могут оснащаться дистилляторами фирмы «GFL» (Германия), например, GFL-2001/2 производительностью 2 л/ч, GFL-2001/4 производительностью 4 л/ч, GFL-2002/2 (бидистиллятор) производительностью 2 л/ч. Дистиллятор (перегонный аппарат) состоит из камеры испарения с вмонтированным в ее дно электронагревателем, конденсатора пара и устройства для автоматического наполнения камеры водой, или уравнивателя. Избыток воды выливается через резиновую трубку, надетую на ниппель (эту теплую воду можно использовать для мытья посуды).

Через ниппель по резиновой трубке вода из водопровода непрерывно поступает в рубашку конденсатора, где она подогревается, а затем через уравниватель попадает в специальную камеру. Пары воды через патрубок направляются в конденсатор, и образующийся конденсат стекает через ниппель по резиновой трубке в приемник для дистиллированной воды. Чтобы предотвратить повышение давления пара в конденсаторе, в аппарате предусмотрено отверстие для выхода избыточного пара (рис. 3.16, 3.17). Воду после перегонки собирают в стеклянные бутылки.

Дистиллированная вода всегда содержит незначительные примеси веществ, попадающих из воздуха в виде пыли, или вследствие выщелачивания стекла посуды, в которой хранится вода. Для предотвращения попадания пыли промежутки между резиновой трубкой и внутренней поверхностью горла бутылки, в которую собирают дистиллированную воду, заполняют ватой. В дистилляте также обнаруживаются соли, попадающие в дистиллят вместе с мельчайшими капельками воды, переносимыми паром.

Чтобы очистить дистиллированную воду от органических веществ, ее подвергают вторичной перегонке, добавляя немного марганцовокисло-

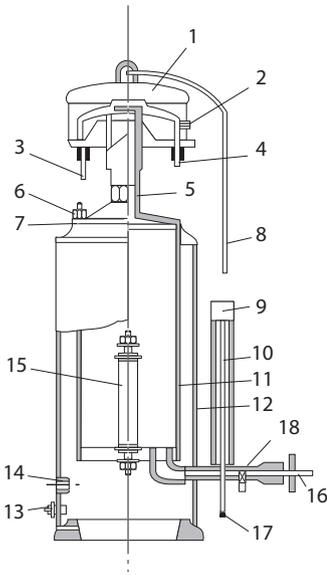


Рис. 3.16. Принципиальная схема перегонного аппарата для получения дистиллированной воды: 1 – конденсатор; 2 – отверстие для выхода избыточного пара; 3 – ниппель для соединения с линией водопровода; 4 – ниппель для спуска дистиллированной воды; 5 – патрубков, через который пар поступает в конденсатор; 6 – гайка; 7 – фланец; 8 – сливная трубка; 9 – воронка уравнивателя; 10 – уравниватель; 11 – камера испарения; 12 – металлический кожух; 13 – клемма заземления; 14 – втулка для ввода провода; 15 – электронагреватель; 16 – кран для выпуска воды из камеры испарения; 17 – ниппель для спуска воды из уравнивателя; 18 – крестовина уравнивателя.

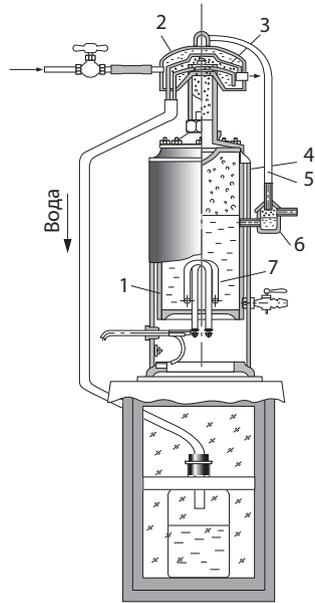


Рис. 3.17. Перегонный аппарат ДЭ-1: 1 – испаритель; 2 – конденсатор пара; 3 – камера конденсатора; 4 – стальной кожух, 5 – сливная труба; 6 – уравниватель для автоматического наполнения испарителя водой; 7 – электронагревательные приборы.

го калия (0,1 г на 1 л жидкости) и несколько капель серной кислоты. Полученную после вторичной перегонки воду, не содержащую следов органических веществ, называют апиrogenной. Для получения ее используют перегонный аппарат, изображенный на рисунке 3.16. Круглодонную литровую колбу наполняют на 2/3 дистиллированной водой. Для окисления органических веществ к воде добавляют несколько кристаллов марганцовокислого калия (KMnO_4) и каплю серной кислоты (или кусочек едкого

натра). С помощью пробки и изогнутой под углом трубки колбу соединяют с трубкой прямого холодильника Либиха. Для перегонки можно применять и колбу Вюрца. На нижний и верхний тубусы кожуха холодильника плотно надевают резиновые трубки, нижнюю трубку соединяют с водопроводным краном, а верхний служит в качестве сливного. На нижний, отводной конец холодильника при помощи пробки надевают аллонж, погруженный в приемник. Затем открывают водопроводный кран, включают нагревательный прибор и начинают отгонку. Первые порции дистиллированной воды выливают. Для получения бидистиллированной воды используют специальные, фабрично изготовленные устройства, например, бидистиллятор БС («Химлаборприбор», Россия).

Бидистиллированная вода бесцветна, не имеет запаха и вкуса. После прибавления азотнокислого серебра, а также хлористого бария она не мутнеет. Добавление реактива Несслера не приводит к появлению желтой окраски, а известковой воды – к помутнению.

Следует, однако, помнить, что дважды перегнанная дистиллированная вода (так называемый бидистиллят) нужна не всегда, а только для проведения особо точных работ. В подавляющем большинстве случаев в лаборатории применяют обычную дистиллированную воду, по своей чистоте вполне удовлетворяющую предъявляемым к ней требованиям.

Важно контролировать качество каждой вновь поступающей в лабораторию партии дистиллированной воды (а также стоявшей длительное время в лаборатории), определяя ее pH и солевой состав.

Для оценки pH около 25 мл воды наливают в чистый стакан и добавляют несколько капель индикатора метилового оранжевого (метилоранж). Окраска индикатора в чистой (нейтральной) воде должна быть желтой; затем добавляют к ней одну каплю 0,04 N раствора серной или соляной кислоты, что должно вызвать появление розового оттенка.

Для испытания на присутствие примесей небольшое количество воды (обычно 5–10 капель) выпаривают на чистом часовом стекле. В случае, если степень чистоты воды недостаточно высока, на стекле появляется небольшой налет.

Стеклообразные бутылки с запасом дистиллированной воды лучше всего закрывать стеклянными притертыми пробками (в крайнем случае, корковыми или резиновыми).

Емкость с содержащейся в ней дистиллированной водой рекомендуется закрывать также пробками с хлоркальциевой трубкой, заполненной натронной известью и прикрытой ватой (рис. 3.18).

В последние годы в клиничко-лабораторной практике находят применение и более высокотехнологичные системы очистки воды, например, путем обратного осмоса. Обратный осмос позволяет удалить 90–99% всех обычных примесей, находящихся в воде (неорганические ионы, органические соединения, микроорганизмы и взвешенные частицы). По сравнению с обычной дистилляцией этот метод является гораздо более эффективным, поскольку удаляет не только неорганические соли, частицы и бактерии,



Рис. 3.18. Емкости для хранения дистиллированной воды: *а* – бутылка с хлоркальциевой трубкой; *б* – бутылка с тубусом; *в* – колба с защитой от поглощения CO_2 .

но и летучие органические и неорганические вещества. Он является и более экономичным, поскольку расход воды и электроэнергии при его использовании гораздо ниже, чем при дистилляции.

На использовании обратного осмоса основана система очистки воды Arium-613 («Sartorius», Германия) – настольная установка для получения воды для общих лабораторных потребностей, например, конечного ополаскивания лабораторной посуды, промывки аппаратуры, заправки очищенной водой оборудования (автоклавы и др.), заправки очищенной водой систем для получения апиrogenной (сверхчистой) воды. Систему заполняют водопроводной водой. Эффективность удаления ионов – 94–99%, микроорганизмов – 99%. Производительность – до 15 л/ч.

Система Arium-611 («Sartorius», Германия) – установка для получения особо чистой воды, которая используется для приготовления химических (биохимических) реактивов, микробиологических сред, подготовки воды для высокочувствительных анализов (атомной абсорбционной спектроскопии, атомной эмиссионной спектроскопии, масс-спектрометрии, ядерно-магнитной резонансной спектроскопии, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), газовой хроматографии. Система заполняется дистиллированной деионизированной водой или водой, прошедшей очистку обратным осмосом (например, с использованием системы Arium-613).

Продолжительное хранение дистиллированной воды в стеклянной посуде приводит к загрязнению ее продуктами выщелачивания. Поэтому дистиллированную воду следует либо хранить непродолжительное время либо в старых стеклянных бутылках, уже не один раз использовавшихся для этой цели, достаточно выщелоченных. Для особо ответственных работ, например приготовления титрованных растворов, проведения некоторых колориметрических определений и т.д., следует брать только свежеприготовленную воду или даже бидистиллят.

В последние годы для хранения дистиллированной и бидистиллированной воды используют полиэтиленовую посуду. При приготовлении рас-

творов щелочей стремятся освободить воду от углекислого газа. Для этого чаще всего ее кипятят продолжительное время (в течение нескольких часов). Освобожденную от углекислого газа еще горячую воду переливают в сосуд, предназначенный для приготовления раствора, и закрывают его пробкой, снабженной хлоркальциевой трубкой.

Если воду нужно освободить от растворенного в ней кислорода, доводят температуру воды до 75–85°C и опускают в нее кусочки сплава Вуда. После того как он расплавится, воду взбалтывают и перегоняют в условиях, предотвращающих попадание воздуха.

Наряду с бидистиллированной используют и деминерализованную воду. По качеству деминерализованная вода не уступает дистиллированной и часто соответствует бидистилляту. Для ее получения используют ионитовые фильтры (рис. 3.19), действие которых основано на способности избирательно связывать катионы или анионы солей.

Водопроводную воду вначале пропускают через катионит, связывающий только катионы (в результате вода приобретает кислую реакцию), а затем через анионит (связывающий только анионы). Вода, пропущенная через оба ионита, не содержит минеральных солей. Таким образом, пропуская дистиллированную воду через 2 колонки (с катионитом и анионитом), получают особо чистую воду. При получении и хранении особо чистой воды нельзя применять стеклянную посуду. Она должна быть изготовлена либо из пластика, либо из алюминия.

Со временем иониты насыщаются ионами металлов и перестают действовать, однако их легко регенерировать, после чего они вновь могут быть использованы. Ионитовые установки (в частности, фирмы «Millipore», США) широко применяют для очистки воды в КДЛ.

К дистилляции под уменьшенным давлением (*вакуум-перегонке*) прибегают в тех случаях, когда при температуре кипения жидкости в нормальных условиях происходит разложение или изменение химической структуры веществ. Перегонку чаще всего проводят при умеренном вакууме. Перегонка в условиях высокого вакуума (молекулярная перегонка) используется редко. Умеренный вакуум (до 5 мм рт.ст.) чаще всего создается при помощи водоструйного насоса (см. рис. 2.36), более высокий – с помощью специальных вакуум-насосов, позволяющих получать средний (до 103 мм рт.ст.) и глубокий (меньше 103 мм рт.ст.) вакуум.

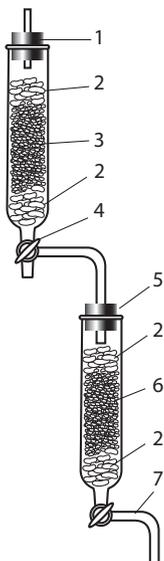


Рис. 3.19. Схема лабораторной установки для получения деминерализованной воды: 1, 5 – пробки; 2 – стеклянная вата; 3 – катионит; 4 – трехходовой кран; 6 – анионит; 7 – сливная трубка.

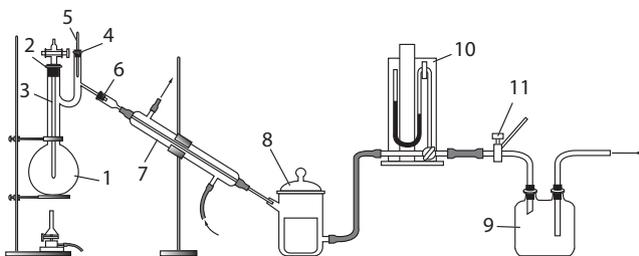


Рис. 3.20. Прибор для перегонки в условиях вакуума: 1 – колба Клайзена или Амбурже; 2, 4, 6 – пробки; 3 – трубка; 5 – термометр; 7 – холодильник; 8 – приемник; 9 – предохранительная склянка; 10 – манометр; 11 – трехходовой кран.

Действие водоструйных насосов основано на том, что давление жидкости, протекающей по трубе более узкого диаметра, уменьшается, но скорость струи возрастает. Направленная в водоструйный насос водопроводная вода протекает через конически суживающуюся трубку, из сопла которой поступает в другую, расположенную ниже трубку, и выливается наружу. В области сужения первой трубки воздух захватывается струей и выводится наружу.

При проведении вакуум-перегонки аппаратура должна быть полностью герметизирована, поэтому используемые для данной цели приборы должны быть собраны на шлифах (рис. 3.20).

В качестве соединительных применяют специальные вакуумные резиновые трубки, которые отличаются от обыкновенных тем, что имеют более толстые (2–3 мм) стенки.

В клиничко-лабораторной практике хорошо зарекомендовали себя лабораторные вакуумные насосы фирмы «KNF Neuberger» (Германия).

3.2.6. Возгонка (сублимация)

Этот способ дополнительной очистки реактивов основан на способности некоторых веществ (йода, серы, хлористого аммония и др.) переходить при нагревании из твердого состояния в газообразное, минуя жидкую фазу (не плавясь). При последующем охлаждении паров вещество, уже освобожденное от примесей, осаждается на охлаждающей поверхности в виде кристаллов.

Для получения чистого йода методом возгонки тонкостенный стакан устанавливают в песочную баню так, чтобы дно его было погружено в песок на 1–2 см; сверху накрывают его часовым стеклом,

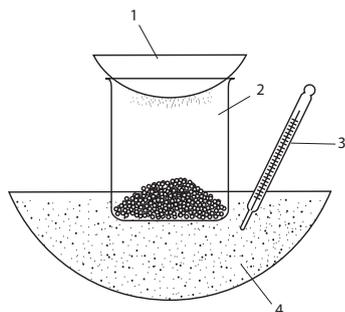


Рис. 3.21. Простейшее устройство для возгонки: 1 – часовое стекло; 2 – стакан; 3 – термометр; 4 – песочная баня.

обращенным выпуклой стороной внутрь стакана (см. рис. 3.21). При осторожном нагревании стакана на часовом стекле собираются игольчатые кристаллы йода. Для улучшения охлаждения на часовое стекло наливают холодную воду и кладут небольшие кусочки льда. Перед возгонкой технический йод рекомендуется смешать с KI и CaO (на 6 частей йода берет-ся 1 часть KI и 2 части CaO, смесь растирается).

Для получения йода еще более высокой степени чистоты повторяют процедуру его возгонки. Чтобы не загрязнять полученные кристаллы при их удалении с часового стекла, следует считать йод стеклянной палочкой (но ни в коем случае не металлическим ножом или шпателем, так как йод взаимодействует с большинством металлов).

3.2.7. Экстракция

Под экстракцией понимают процедуру извлечения отдельного компонента из смеси веществ с помощью растворителей.

Известно, что большинство жидких и твердых веществ способно растворяться не в одном, а в нескольких растворителях. Например, уксусная кислота очень хорошо растворяется в воде и бензоле. Бензол же в воде практически нерастворим. Поэтому, если к водному раствору уксусной кислоты добавить бензол, то уксусная кислота распределится между водой и бензолом. Повторяя операцию несколько раз, можно извлечь из воды почти всю уксусную кислоту.

Возможен и другой вариант, когда растворители хорошо смешиваются между собой, но данное вещество растворяется только в одном из них; при добавлении в раствор другого растворителя происходит выделение вещества. Например, если к раствору скипидара в спирте добавить воду, то он выпадает в виде тонкой эмульсии.

В основе метода экстракции, базирующегося на законе распределения вещества между двумя несмешивающимися жидкостями, лежит различная его растворимость в каждой из них.

В некоторых случаях приходится проводить так называемую реэкстракцию. Например, органическим растворителем можно извлечь из смеси какое-либо вещество, хорошо растворяющееся в воде. Вместо отгонки органического растворителя полученный экстракт можно обработать водой, и все извлеченное вещество перейдет в водный раствор; очищенный же от примесей органический растворитель может быть снова использован для экстракции.

Различают экстрагирование твердых веществ и жидкостей. В зависимости от применяемых растворителей осуществляют экстракцию водой, водными или органическими растворителями, расплавами.

Наиболее часто в практике лабораторных работ приходится сталкиваться с экстрагированием жидкостей (например, при проведении гормональных исследований).

Экстрагирование жидкостей осуществляется обычно в делительной воронке, заполняемой раствором до половины объема (см. рис. 2.5, е).

В нее вносят подходящий растворитель, не смешивающийся с раствором, в количестве около половины взятого раствора. Подбирают такой растворитель, в котором растворимость экстрагируемого вещества была бы выше, чем в исходном. Если растворенное вещество сравнительно малолетуче, то экстрагированное вещество получают в чистом виде после отгонки растворителя; по этой причине для извлечения вещества обычно применяют такой растворитель, который обладал бы невысокой температурой кипения.

Техника проведения экстракции состоит в следующем. Делительную воронку закрывают и, придерживая одной рукой пробку, а другой кран, плавными движениями многократно переворачивают ее вверх и вниз в течение 15–20 мин, стремясь к тому, чтобы жидкости как бы скользили одна по другой. Ни в коем случае нельзя энергично взбалтывать содержимое воронки, так как при этом неизбежно образуются стойкие эмульсии, на разрушение которых требуется много времени. Очень часто при экстракции наблюдается повышение давления внутри воронки, которое время от времени необходимо уравнивать с атмосферным. Для этого в тот момент, когда воронка находится горлом вниз, кран осторожно открывают, а затем закрывают. По окончании экстракции делительную воронку укрепляют на штативе и дают постоять в течение некоторого времени, пока не произойдет полное расслоение и между обоими растворителями не установится резкая граница. После этого снимают пробку с делительной воронки, затем осторожно поворачивают кран, давая медленно стечь нижнему слою жидкости в приемник. Когда нижний край верхнего слоя окажется близко к крану, уменьшают скорость истечения жидкости. Дав верхнему слою заполнить воронку вплоть до крана, его закрывают и выливают оставшуюся в воронке жидкость через горло в соответствующий сосуд.

Иногда для более полного извлечения вещества экстрагирование его повторяют несколько раз. Затем растворитель отгоняют, и в перегонной колбе остается выделенное вещество.

3.2.8. Выпаривание и упаривание

При работе с различными растворами (водными и неводными) нередко возникает необходимость в *выпаривании*, т.е. удалении растворителя путем испарения с целью повышения концентрации раствора (упаривание) или выделения вещества, содержащегося в нем (собственно выпаривание).

Скорость испарения жидкости зависит от ряда факторов, из которых важнейшими являются температура, давление, площадь поверхности испарения, движение воздуха над испаряемой жидкостью, толщина ее слоя (более тонкие слои испаряются заметно быстрее, чем более толстые), перемешивание раствора или его циркуляция (испарение растворителя со спокойной поверхности раствора постепенно уменьшается вследствие повышения концентрации растворенного вещества у поверхности испарения и образования своеобразной корочки, затрудняющей испарение растворителя; по-

этому скорость испарения может быть увеличена в циркулирующем или перемешиваемом выпариваемом растворе).

Выпаривание проводится в фарфоровых, стеклянных или эмалированных чашках, заполняемых раствором так, чтобы до краев чашки оставалось не менее 2–3 см (если она большая) или же на 2/3 ее высоты (если чашка небольших размеров).

Для выпаривания очень малых количеств раствора применяются фарфоровые или платиновые тигли.

Процедура выпаривания осуществляется в вытяжных шкафах или специально предназначенных для этого приборах. Они обычно представляют собой водяную баню, в которую помещаются широкие пробирки с пробками, имеющими короткий и более длинный (доходящий до уровня выпариваемой жидкости) стеклянный отросток (рис. 3.22).

При нагревании воды в бане до определенной температуры и пропускании через пробирки тока воздуха происходит интенсивное испарение растворителя. Пары его выбрасываются в атмосферу, а на дне (и стенках) пробирки выделяется сухой экстракт.

Для *упаривания* фильтратов и промывных вод следует пользоваться стаканами, но не коническими колбами. Жидкость, налитая в стакан, должна занимать не более 2/3–3/4 его объема. Упаривать более удобно на песочной бане. Упариваемый раствор следует время от времени перемешивать стеклянной палочкой. Если этого не делать, может произойти внезапное вскипание и выброс жидкости. Такое вскипание особенно часто происходит при упаривании в конических колбах.

3.2.9. Кристаллизация

Кристаллизация – это выделение кристаллов вещества при охлаждении его горячего насыщенного раствора.

Вещество, подлежащее кристаллизации, растворяют в соответствующем растворителе, нагретом до кипения, стараясь получить насыщенный (или концентрированный при данной температуре) раствор. Для удаления механических примесей или мути раствор отфильтровывают через воронку для горячего фильтрования, используя в качестве приемника кристаллизатор, фарфоровую чашку, коническую колбу или стакан. Если же полученный раствор совершенно прозрачен и не содержит механических примесей, фильтрование излишне и даже вредно, так как оно неизбежно связано с потерей некоторого количества кристаллизующего вещества.

При перекристаллизации стараются получить вещество в виде кристаллов среднего размера, так как крупные кристаллы обычно содержат

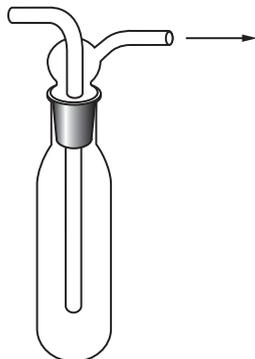


Рис. 3.22. Широкая пробирка со стеклянной пробкой со шлифом, через которую продувается воздух.

включения с находящимися в них примесями, в результате чего перекристаллизованное вещество оказывается загрязненным. С другой стороны, очень мелкие кристаллы, будучи свободными от этих включений, образуют густую кашу, в которой между отдельными ее кристаллами очень прочно удерживается маточный раствор и отмыть его полностью без большой потери вещества не удается.

Величина выделяющихся при перекристаллизации отдельных кристаллов зависит от скорости охлаждения раствора. Если температура раствора понижается медленно, то образующиеся кристаллы постепенно растут и могут достичь очень больших размеров; и наоборот, при быстром охлаждении формируются мелкие кристаллы.

Выпавшее при кристаллизации вещество отделяют от маточного раствора путем фильтрования под вакуумом; кристаллы тщательно отжимают на воронке плоской стороной стеклянной пробирки и промывают небольшим количеством холодного чистого растворителя. Маточный раствор упаривают до половины и получают новую порцию вещества.

Отфильтрованные кристаллы высыпают на фильтровальную бумагу, равномерно распределяют на ней, сверху закрывают другим листом фильтровальной бумаги и сушат на воздухе. Если вещество не теряет кристаллизационной воды, его можно сушить в эксикаторе. Вещества, расплывающиеся на воздухе, быстро отжимают на пористой глиняной тарелке и перекладывают в банку с притертой пробкой.

Требуемый объем растворителя находят исходя из критериев растворимости кристаллизуемого вещества при различных температурах. Его можно определить и опытным путем.

Перекристаллизация нестойких веществ должна проводиться в особых условиях. Например, в силу большой чувствительности к свету красной кровяной соли ее очищают кристаллизацией при красном свете или даже в темноте, причем температура раствора этой соли не должна превышать 70°C.

3.2.10. Высушивание (газов, органических жидкостей, твердых веществ)

Под высушиванием понимают процесс удаления из вещества остатков воды (обзвоживание) или органических растворителей.

Чаще всего приходится иметь дело с необходимостью *обезвоживания* веществ. Вода может образовывать с веществом механическую смесь или вступать с ним в химическое соединение. В последнем случае так называемую кристаллизационную воду удалить нередко оказывается весьма сложно.

Высушивание может осуществляться следующими способами:

1. Испарение при низких температурах (используется при высушивании негигроскопичных веществ, не выдерживающих нагревания до 50–60°C). Проводится оно либо непосредственно на воздухе, либо под вакуумом. На воздухе сушка идет очень медленно; при этом необходимо

- предохранить высушиваемое вещество от загрязнения, для чего бывает достаточно закрыть его листом чистой фильтровальной бумаги. Непременным условием является распределение вещества тонким слоем и перемешивание его через определенные промежутки времени. Чем тоньше слой, тем быстрее происходит высушивание. Высушивание можно ускорить, если над слоем вещества создать движение воздуха (хотя бы настольным вентилятором).
2. Испарение воды при нагревании (до температуры 105–110°C и выше). Применяется наиболее часто.
 3. Вымораживание. При охлаждении жидкостей или газов, содержащих воду, образуются кристаллы льда, которые могут быть отфильтрованы или отделены каким-либо способом, например, сливанием (иногда вымораживание проводят под вакуумом).
 4. Поглощение паров воды гигроскопичными веществами. К таким веществам относятся серная кислота и некоторые соли (например, CaCl_2).
 5. Химическое связывание воды – один из лучших методов обезвоживания. Заключается в том, что вода, присутствующая в качестве примеси в газах, парах или органических жидкостях, активно реагирует с некоторыми веществами (например, метаболическим натрием и кальцием, карбидом кальция и др.), индифферентными в химическом отношении к высушиваемому веществу. Однако высушенное таким способом вещество приходится очищать от образующихся посторонних продуктов реакции.

Обезвоженную органическую жидкость следует предохранять от соприкосновения с наружным воздухом, всегда содержащим некоторое количество влаги.

Высушивание газов осуществляется пропусканием их через концентрированную серную кислоту, твердые поглотители (например, хлористый кальций, силикагель и др.) либо путем вымораживания.

При высушивании газа концентрированной серной кислотой пользуются склянками Дрекселя (рис. 3.23), Вульфа (рис. 3.24) или Тищенко (рис. 3.25). Чистую концентрированную кислоту наливают не более чем на 2/3 высоты сосуда, а при использовании склянки Тищенко – не более 1/4 объема.

Высушивание газа пропусканием над твердыми веществами можно осуществлять в специальных поглотительных колонках или трубках, заполняемых обычно хлористым кальцием. Для высушивания газов применяют также и U-образные хлоркальциевые трубки (см. рис. 2.15).

Абсолютирование (высушивание) органических жидкостей. Наиболее распространенным средством для обезвоживания органических жидкостей, содержащих небольшое

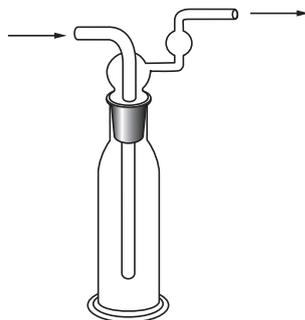


Рис. 3.23. Склянка Дрекселя.

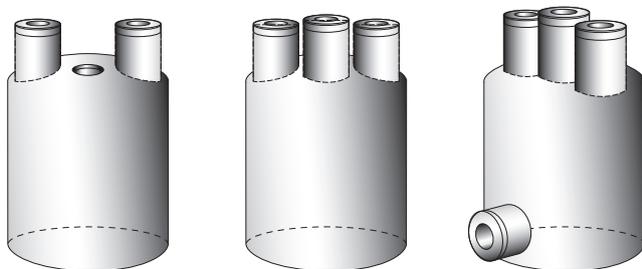


Рис. 3.24. Слянки Вульфа.

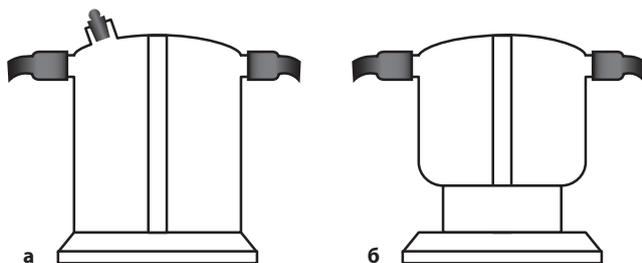


Рис. 3.25. Слянки Тищенко: *а* – для жидких поглотителей; *б* – для твердых поглотителей.

количество воды, является прокаленный хлористый кальций (хлористым кальцием нельзя сушить спирты и амины). Перед использованием его прокаливают на железной сковороде, размещая соль слоем не толще 1–2 см. Соль вначале плавится с выделением кристаллизационной воды; после того как вода постепенно испарится, прокаливание продолжают еще некоторое время. Спекшуюся соль разбивают на более мелкие куски и еще теплой кладут в заранее заготовленную совершенно сухую банку. Банка должна закрываться герметически, чтобы в нее не проникал воздух, всегда содержащий некоторое количество паров воды. При пользовании корковой пробкой ее следует тщательно залить сверху парафином или воском.

Прокаленную соль в нужном количестве насыпают в сосуд с высушиваемой жидкостью, сосуд плотно закрывают пробкой и несколько раз встряхивают. Затем его оставляют стоять не менее 12 ч. Хлористый кальций можно употреблять многократно, если после каждого использования прокаливать его.

Для высушивания органических жидкостей применяют также прокаленный (по способу, описанному для CaCl_2) сернокислый натрий ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$).

Для высушивания спиртов чаще всего применяют CuSO_4 или CaO . Сернокислая медь $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ в виде кристаллов голубого цвета содержит кристаллизационную воду; если кристаллы прокалить, получается по-

рошок безводной соли желтоватого цвета. При увлажнении одна молекула сульфата меди присоединяет две молекулы воды и окрашивается в синий цвет. Зная содержание воды в спирте, можно рассчитать количество CuSO_4 , необходимое для полного ее высушивания.

Пример: Имеется 500 г 96° этилового спирта (т.е. содержащего 4% воды). Содержание воды в этом количестве спирта определяют исходя из следующей пропорции:

$$\begin{array}{l} 100 - 4 \\ 500 - X \text{ или} \end{array}$$

$$x = \frac{4 \cdot 500}{100} = 20 \text{ г.}$$

Теперь можно подсчитать, сколько нужно взять безводной соли, чтобы произвести обезвоживание спирта. Молекулярная масса CuSO_4 равна 159,61 г. Одна молекула соли в данных условиях может присоединять всего лишь две молекулы воды, т.е. 159,61 г CuSO_4 способны связать $18 \cdot 2 = 36$ г воды. Чтобы удалить из спирта 20 г воды, нужно взять соли:

$$\begin{array}{l} 159,61 - 36 \\ X - 20 \text{ или} \end{array}$$

$$x = \frac{159,61 \cdot 20}{36} = 88,7 \text{ г.}$$

Для полной уверенности следует взять избыток соли: не 88,7, а, например, 100 г. После добавления к спирту CuSO_4 колбу несколько раз встряхивают и затем нагревают на водяной бане с обратным холодильником до тех пор, пока соль не приобретет светло-голубой цвет (обычно на это уходит 6–8 ч). После этого, отделив соль фильтрованием, спирт отгоняют.

Примечание: Безводный медный купорос CuSO_4 (получают просушиванием $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ при 220°С в сушильном шкафу при периодическом перемешивании; хранят в герметически закрытых склянках) заливают 96° этиловым спиртом, хорошо перемешивают и оставляют стоять на 3–4 сут. (при ежедневном перемешивании). Затем спирт сливают и засыпают новой порцией медного купороса. Операцию продолжают до тех пор, пока цвет порошка сульфата меди не будет изменяться.

Однако получить совершенно безводный, так называемый абсолютный, спирт очень трудно. Для этого после просушки CuSO_4 спирт нужно еще два или три раза перегнать с чистой окисью кальция (CaO), причем приемник должен быть плотно соединен с холодильником и снабжен хлоркальциевой трубкой, заполненной сухим хлористым кальцием. Полученный таким способом абсолютный этиловый спирт пригоден для большин-

ства выполняемых в КДЛ биохимических методов исследования. Но даже в нем остается до 0,5–0,7% воды, освобождение от которой является самым трудным. Для удаления этого остатка применяют металлический натрий и кальций.

Натрий, реагируя в первую очередь с водой, тем не менее, взаимодействует и со спиртом, образуя этилат натрия. Поэтому после полного удаления добавленного к этанолу натрия требуется дополнительная отгонка спирта. Металлический натрий хранят в банках под слоем керосина, вазелинового масла или толуола (не содержащего воды). Необходимость такого хранения металлического натрия обусловлена его способностью окисляться на воздухе и энергично взаимодействовать (нередко со взрывом) даже с небольшим количеством воды. Поэтому работать с металлическим натрием нужно всегда очень осторожно. Следует всегда заботиться о том, чтобы около рабочего места не было воды. Работать рядом с раковиной или кранами для воды совершенно недопустимо.

Самым лучшим обезвоживающим средством для спирта является этилат магния, который можно легко получить при взаимодействии магния и этилового спирта (содержащего не более 1% воды) в присутствии небольшого количества йода (используемого в качестве катализатора). Обезвоживание спирта по этому способу проводится следующим образом.

В колбу емкостью 1,5 л с обратным холодильником насыпают 5 г стружек магния, наливают 65–70 мл этилового спирта, добавляют 0,5 г йода и нагревают до растворения последнего, после чего происходит выделение водорода:



Когда реакция закончится, к раствору добавляют 800–900 мл обычного абсолютного спирта, т.е. такого, в котором содержится 0,5–0,7% воды, кипятят полчаса с обратным холодильником и затем отгоняют абсолютный спирт.

Таким же способом можно обезводить и другие спирты, например, метиловый и *n*-пропиловый. Этиловый спирт можно сушить при помощи металлического кальция, пользуясь колбой с обратным холодильником. На 1 л спирта добавляют 20 г сухих стружек кальция и нагревают на водяной бане до кипения, которое поддерживается в течение нескольких часов, после чего спирт перегоняют с соблюдением всех описанных мер предосторожности.

Органические жидкости могут быть также высушены при помощи карбида кальция, который разлагается водой с образованием ацетилена и гидроксиды кальция.

Как указывалось выше, вода, бензол и этиловый спирт образуют азеотропную смесь. При содержании этилового спирта, воды и бензола в соотношении 18,5:7,4:74,1 смесь кипит при 65°C, что позволяет применять ее для удаления следов воды из спирта. Для этого к этиловому спирту, содержащему не менее 99% C₂H₅OH, прибавляют сухой бензол. Практически

на одну часть содержащейся в спирте воды следует брать 11–12 г сухого бензола. После этого смесь подвергают фракционной перегонке. Первая фракция перегоняется при $64,85^{\circ}\text{C}$ и состоит из спирта, воды и бензола. Вторая фракция кипит при $68,25^{\circ}\text{C}$ и состоит из избытка бензола и спирта. Та часть этилового спирта, которая остается в перегонном сосуде, представляет собой абсолютный этиловый спирт. Обезвоженный спирт следует тщательно охранять от действия влаги воздуха. Поэтому, быстро перелив его в хорошо высушенную посуду, последнюю тщательно закрывают. Этим способом можно обезводить все спирты, кроме метилового.

В некоторых случаях используется и способ *вымораживания* жидкостей с использованием бензола. Последний переходит в твердое состояние при 4°C . Охлаждая водный бензол до 1 или даже 0°C , получают кристаллический бензол, а выделившуюся воду сливают.

Очень эффективным способом высушивания органических жидкостей и газов является высушивание *при помощи цеолитов*, остаточная влажность при этом оказывается равной десятитысячным долям процента. Полнота обезвоживания этилового спирта может быть определена на основании следующих качественных проб: безводный спирт растворяет $\text{Ba}(\text{OH})_2$, образуя окрашенный в желтый цвет раствор; раствор парафина не образует в нем мути; в абсолютном спирте безводная серноокислая медь не изменяет своей окраски.

Высушивание твердых веществ можно проводить на открытом воздухе при обычной температуре, при подогреве и обычном атмосферном давлении, при низкой температуре под уменьшенным давлением, в атмосфере с малым давлением водяных паров (в эксикаторе) и, наконец, в атмосфере инертного газа. Наиболее часто используется способ высушивания при подогреве и обычном атмосферном давлении.

С этой целью используют сушильные шкафы, в том числе: сушильный шкаф прямоугольный ШС 40М (НПФ «Термокон», Россия), шкафы сушильные лабораторные серии SNOL («Omega», Литва) и др. При выполнении ряда работ используются и суховоздушные термостаты, в частности, термостаты серии ТС-1 производства группы компаний «Медсталь» (Россия).

Продолжительность высушивания зависит от многих факторов: количества вещества, толщины его слоя, температуры, правильности проведения сушки. Чем меньше вещества и чем тоньше слой его, тем скорее идет высушивание. Выгоднее большую партию разбить на ряд мелких, чем высушивать сразу большое количество толстым слоем. Чем равномернее поднимается температура, тем правильнее и скорее пройдет высушивание. Быстро поднимать температуру в шкафу не следует, иначе верхний слой вещества и образовавшаяся корка будут препятствовать равномерной сушке.

Для высушивания веществ, легко разлагающихся или изменяющихся при нагревании до 100°C , применяют высушивание при низкой температуре и уменьшенном давлении в вакууме.

Сильно гигроскопичные вещества высушивают в эксикаторе, содержащем какое-либо вещество, энергично поглощающее влагу, например, хлористый кальций, концентрированную серную кислоту, окись пентавалентного фосфора.

Подлежащее высушиванию вещество помещают в бюкс или чашку, которые ставят открытыми на фарфоровый вкладыш эксикатора и оставляют в последнем на сутки или более в зависимости от необходимости.

Глава 4. ЭЛЕКТРОНАГРЕВАТЕЛЬНЫЕ ПРИБОРЫ

К числу электронагревательных приборов относится разнообразное оборудование, в том числе сушильные шкафы, вакуум-шкафы, песочные, масляные бани и другие изделия.

Сушильный шкаф обычно имеет керамические дырчатые полки. Стенки шкафа металлические двойные, снаружи облицованы асбестом. Между стенками, а также в дне шкафа смонтирована электроспираль. Температура в шкафу достигает 200°C. Регулируется температура автоматически с помощью терморегулятора с сигнальной лампой, а контролируется по термометру, вставленному в специальное отверстие в потолке шкафа.

Вакуум-шкаф – прибор, используемый для высушивания веществ в условиях разрежения, создаваемого вакуум-насосом.

Муфельная печь – керамический резервуар (муфель), имеющий форму горизонтально расположенного полуцилиндра, снаружи муфель обмотан проволокой и помещен в металлический корпус, выложенный изнутри теплоизоляционным материалом. Муфельная печь снабжена терморегулятором, она рассчитана на температуру 800–1200°C, муфель имеет керамическую дверцу с окошечком для наблюдений.

Бани используются для нагревания вещества до невысоких температур в течение длительного времени. *Водяные бани* используются для длительного нагревания вещества при температуре не выше 100°C. Обычно такая баня закрывается рядом съемных колец различного размера. Часто используются для нагревания органических веществ с низкой температурой кипения. Водя баня должна быть заполнена наполовину или на 2/3 объема. Посуда (за исключением пробирок) должна быть погружена в баню на 1 см.

В клиничко-лабораторной практике хорошо зарекомендовали себя водяные бани Jouan («Thermo Electron», Финляндия) с точностью поддержания температуры 0,3°C; BWT-U на 8 и 20 л с цифровой установкой температуры и жидкокристаллическим дисплеем («Biosan», Латвия) и водяные бани TW-2-02, TW-2-03 («Elmi», Латвия) с точностью поддержания температуры 1 и 0,1°C соответственно.

Воздушная баня напоминает водяную, но для нагрева используется горячий воздух.

Песочная баня допускает более сильное нагревание, чем в водяной бане. Она представляет собой электрическую плитку с закрытой керами-

кой спиралью, на которую насыпается слой песка. Песок должен быть чистый, просеянный и прокаленный. Обогреваемый сосуд не должен касаться дна бани. В качестве песочной бани можно использовать обычную электроплитку с закрытой керамикой (в целях электробезопасности) спиралью, если насыпать на нее песок.

Масляная баня устроена так же, как и водяная, только заполнена минеральным маслом. В зависимости от сорта масла в ней возможно нагревание до температуры от 180 до 270°C. При более высокой температуре масло может вспыхнуть. Гасить загоревшееся масло удобнее всего, закрывая его заранее для этого заготовленным листом асбеста.

Круглодонную колбу, в отличие от плоскодонной, можно нагревать на открытом пламени, однако прежде чем производить интенсивный нагрев на открытом пламени, нужно обязательно прогреть все части колбы.

Фарфоровую посуду можно нагревать на открытом пламени, в банях, тигельных и муфельных печах (для нагревания фарфоровой чашки ее ставят на кольцо штатива соответствующего диаметра либо на керамический треугольник). Нельзя нагревать толстостенную стеклянную посуду (кристаллизаторы, мерную посуду, неградуированные цилиндры и др.).

Термостат – прибор, предназначенный для поддержания определенной температуры (чаще всего 37°C) вещества в течение длительного времени. Суховоздушный термостат представляет собой камеру с двойными деревянными, металлическими или пластмассовыми стенками. В толще наружной стенки прокладывают слой теплоизолирующего материала. Между стенками термостата либо наливается вода, либо по трубкам осуществляется циркуляция нагретого воздуха. Дверцы термостата делают двойными. Наружная дверца массивная, обитая изнутри теплоизолирующим материалом; вторая дверца изготавливается из стекла, вставленного в металлическую рамку.

В верхнюю стенку термостата через специальное отверстие вставлен контрольный термометр, показывающий температуру внутри камеры. Постоянство температуры в термостате поддерживается при помощи терморегуляторов (регулировка температуры при помощи контактного термометра построена на принципе размыкания и замыкания электрических контактов; реже используются биметаллические терморегуляторы). В клиничко-лабораторной практике нашли применение, в частности, твердотельные термостаты «Термит» фирмы «Erpendorf» (Германия) с диапазоном температуры от комнатной до 99°C.

В практике КДЛ также применяются шкафы сухо-тепловые, например, аппараты серии ШСТ, а также стерилизаторы воздушные (ГП-20-3, ГП-40-3), используемые для проведения стабилизированной термической обработки в воздушной тепловой среде, стерилизации, дезинфекции и сушки горячим воздухом инструментов, стеклянной посуды, прочих изделий медицинского и другого назначения производства предприятия «Витязь» (Белоруссия).

Для обеспечения надлежащих условий выполнения лабораторных работ находят применение шкафы вытяжные, например, шкафы серии Prof, производимые предприятием «Евролаб» (Россия), серии ШВ, производимые компанией «Спецбалтмебель» (Россия).

Глава 5. ВЕСЫ И ВЗВЕШИВАНИЕ

Взвешивание – это процедура сравнения массы взвешиваемого тела с заранее известной массой гирь. Осуществляется с помощью весов. В зависимости от точности производимого на них взвешивания они подразделяются на весы для грубого (с точностью до 1 г), точного взвешивания (с точностью от 1 до 10 мг) и аналитические, которые, в свою очередь, могут быть обычными (с точностью взвешивания до 0,1–0,2 мг), полумикрохимическими (с точностью до 0,01–0,02 мг), микрохимическими (с точностью до 0,001 мг), ультрамикрохимическими (с точностью до 10^{-6} – 10^{-9} мг) и специальными (пробирные, торсионные и пр.).

Весы оснащаются разновесами. В большинстве случаев это помещенный в футляр набор гирь, на каждой гире обозначена ее номинальная масса (она может несколько отличаться от истинной). Величина отклонения номинальной массы от истинной (характеризующая точность разновеса) практически не сказывается на точности определения навески).

В КДЛ нашло широкое применение весовое оборудование российского предприятия «Госметр», в том числе весы следующих моделей:

1. Весы лабораторные равноплечие:
 - ВЛР 200 г (предел взвешивания 200 г, цена деления 0,05 мг, погрешность ± 5 мг);
 - ВЛР 1 кг (предел взвешивания 1000 г, цена деления 10 мг, погрешность ± 10 мг);
 - ВЛР 10 кг (предел взвешивания 10 000 г, цена деления 50 мг, погрешность ± 100 мг);
 - ВЛР 20 кг (предел взвешивания 20 000 г, цена деления 100 мг, погрешность ± 200 мг);
 - ВЛР 50 кг (предел взвешивания 50 000 г, цена деления 200 мг, погрешность ± 500 мг).
2. Весы лабораторные квадрантные:
 - ВЛКТ 160 г (предел взвешивания 160 г, цена деления 1 мг, погрешность ± 5 мг);
 - ВЛКТ 500 г (предел взвешивания 500 г, цена деления 10 мг, погрешность ± 20 мг);
 - ВЛКТ 2 кг (предел взвешивания 2000 г, цена деления 100 мг, погрешность ± 200 мг);
 - ВЛКТ 5 кг (предел взвешивания 5000 г, цена деления 100 мг, погрешность ± 200 мг).

3. Весы лабораторные микрокомпьютерные:
 - ВЛМК 220 г (предел взвешивания 220 г, цена деления 1 мг, погрешность ± 10 мг);
 - ВЛМК 550 г (предел взвешивания 550 г, цена деления 5 мг, погрешность ± 20 мг);
 - ВЛМК 1100 г (предел взвешивания 1100 г, цена деления 5 мг, погрешность ± 30 мг);
 - ВЛМК 2200 г (предел взвешивания 2200 г, цена деления 20 мг, погрешность ± 60 мг).
4. Весы торсионные однодиапазонные (WT 500 мг, WT 1000 мг).
Потребителям предлагаются наборы гирь:
 - Г2 210 (от 1 до 100 г);
 - Г3 1110 (от 1 до 500 г);
 - Г3 1111,10 (от 1 г до 5 кг);
 - Г3 2110,10 (от 10 мг до 10 кг);
 - Г3 5110,10 (от 10 мг до 20 кг);
 - Г0 2110,10 (от 10 мг до 10 кг);
 - МГ4 1110 (гири миллиграммовые).

Используются также весы фирм «Ohaus» (США): аналитические, прецизионные, портативные, промышленные, а также весы фирмы «Sartorius» (Германия), зарегистрированные в Государственном реестре средств измерений в Республике Беларусь: микро- и полумикрохимические, аналитические и прецизионные, и др.

Принцип выполнения процедуры взвешивания на весах различных моделей аналогичен.

5.1. Весы для грубого взвешивания

Весы для грубого взвешивания могут быть рычажными, типа безменов, чашечными и циферблатными (столовыми). На весах указана предельная нагрузка, допустимая при пользовании (грузоподъемность). Она варьирует от 1 до 50 кг. Точность взвешивания на рычажных весах составляет до 2%, на циферблатных – до 0,5%.

Весы размещают на строго горизонтальной поверхности стола, не допуская перекосов. Чашечные весы устанавливают в положении равновесия, стрелка указателя рычажных или циферблатных весов при этом должна показывать на нулевое деление. Перед взвешиванием необходимо обязательно проверять не только правильность установки, но и чистоту чашек (площадок) весов.

Для осуществления процесса взвешивания применяют так называемый разновес, т.е. комплект чугунных, фарфоровых или латунных, иногда никелированных гирь, которые хранятся в деревянной колодке с гнездами, размер которых соответствует диаметру гирь. В колодке разновеса для больших чашечных весов могут быть гири: 1 кг, 500, 200 (2 шт.), 100, 50, 20 (2 шт.),

10, 2 (2 шт.) и 1 г. Для циферблатных весов мелкий разновес до 100 г не нужен, так как масса в граммах указывается стрелкой на циферблате.

Разного рода сыпучие материалы насыпают не непосредственно на чашу весов, а в предварительно взвешенную (тарированную) или уравновешенную посуду (коробку, ящик, банку, стакан и т.д.). На правую чашу весов ставят тару, в которой намереваются производить взвешивание, а на левую помещают груз, уравновешивающий тару (например, гири, дробь, гвозди и т.п.). Лишь после этого на левую чашку весов кладут гири требуемой массы. Затем в тару насыпают взвешиваемый материал до тех пор, пока весы не уравновесятся. Если взвешиваемый материал окажется в избытке, его снимают при помощи рогового совочка, шпателя, ложки либо картона или бумаги. Чем ближе к завершению процедура взвешивания, тем осторожнее следует досыпать материал (нельзя снимать излишки или досыпать недостающее количество материала руками!).

При определении массы конкретного предмета его помещают на левую чашку весов, а гири – на правую (вначале более крупные, потом мелкие).

Жидкость, навеску которой требуется определить, осторожно вливают в сосуд, взвешенный вместе с воронкой (немного меньше требуемого количества), а затем из мензурки или стакана с носиком постепенно вливают остальное количество жидкости (до уравновешивания весов).

5.2. Весы для точного взвешивания

Весы для точного взвешивания устанавливают в определенном месте лаборатории, стационарно, строго по отвесу или по жидкостному уровню с пузырьком воздуха, используя вращение передних винтовых ножек, опирающихся на круглые металлические подставки с выемками в центре.

Одним из видов весов для точного взвешивания являются ручные, или аптечные (рис. 5.1), с предельной нагрузкой не выше 100 г. Обычно их устанавливают на штативе.

Более совершенными являются технические химические весы (грузоподъемность от 200 г до нескольких килограммов). Они снабжены балансировочными гайками и арретирным устройством, благодаря которому самые ответственные части весов – призмы коромысла и подушки – в нерабочем положении не изнашиваются (отделяются и не касаются площадок). Это предохраняет призму от износа, а весы – от потери чувствительности. В рабочее положение весы приводятся поворотом ручки арретира. Если при опускании арретира весы не придут в равновесное состояние, его добиваются при помощи балансировочных гаек.



Рис. 5.1. Весы ручные, или аптечные.

Отдельные элементы технических химических весов (особенно призмы, подушки для них, а также чашки) следует время от времени очищать. Поскольку на многих технических химических весах серьги, стремена и чашки пронумерованы, при сборке таких весов обращают внимание на соединение деталей с одинаковыми номерами.

Для взвешивания на технических химических весах применяют точный разновес, гири которого (500 г и меньше) обычно никелированные. Кроме граммовых гирь в разновесе имеются миллиграммовые – в виде пластинок из алюминия, нейзильбера или никеля. Для удобства распознавания гири делают разной формы: 500 и 50 мг – шестигранные, 200 и 20 мг – прямоугольные, 100 и 10 мг – треугольные. Каждая миллиграммовая гирька имеет загнутый краешек (за который ее берут пинцетом, как за ушко) и соответствующую гравировку – число, обозначающее массу гири в миллиграммах: 500, 200, 100, 50, 10 и реже 5, 2 и 1.

Процедура взвешивания на технических химических весах более сложная, чем на весах для грубого взвешивания. Прежде всего необходимо убедиться в правильности установки весов. Для этого проверяют, точно ли по отвесу стоят весы; если нет, то с помощью установочных ножек-винтов добиваются их правильного (строго горизонтального) положения. Затем опускают арретиром коромысло и наблюдают колебания стрелки по нижней шкале весов. Если стрелка при колебании отклоняется от нуля на одно и то же число делений вправо и влево, весами можно пользоваться. Если же стрелка отклоняется от нуля в одну сторону более, чем в другую, нужно посмотреть, нет ли на чашках весов каких либо загрязнений, чисты ли призмы и гнезда для них. Если и после устранения этих неполадок стрелка будет отклоняться в одну сторону больше, чем в другую, нужно при помощи балансировочных гаек добиться равномерного колебания стрелки или, как говорят, установить весы на ноль.

Взвешиваемый материал насыпают в стеклянный стаканчик, на часовое стекло или на чистый лист бумаги (любая тара должна быть предварительно уравновешена или взвешена). Разновесы помещают на чашку весов до тех пор, пока весы не придут в равновесие. Полученный вес подсчитывают по пустым гнездам, записывают и вновь проверяют при укладывании разновесов в футляр.

Однако и при условии, что весы не установлены строго на ноль, можно провести точное взвешивание. Для этого на правую чашку весов помещают взвешиваемый предмет, на левую – гири до установления весов на ноль. Затем взвешиваемый предмет переносят на левую чашку, гири – на правую. При этом одна из чашек будет перевешивать другую; добавляя или снимая разновесы, снова уравновешивают весы. Истинная масса взвешиваемого предмета равна среднему арифметическому между результатами этих двух взвешиваний. Такой прием называется способом двойного взвешивания.

Пример: Масса предмета при первом взвешивании оказалась равной 30,00 г. При втором взвешивании, когда взвешиваемый предмет и гири по-

меняли местами, масса оказалась равна 30,60 г. Истинная масса предмета в этом случае составляет:

$$\frac{33,00 + 30,60}{2} = 30,30 \text{ г.}$$

5.3. Весы для очень точного взвешивания (аналитические)

Аналитические весы всегда заключены в футляр (обычно застекленный, с поднимающейся передней стенкой и открывающимися боковыми дверками. Во время взвешивания и в период, когда весами не пользуются, все дверки должны быть закрыты. Аналитические весы устанавливают стационарно, и переносить их с места на место не рекомендуется. Для предохранения весов от пыли их полезно закрывать поверх футляра чехлами из плотной ткани.

Аналитические весы могут быть полуавтоматическими и автоматическими, периодического качания и аperiodические (демпферные), 1-го и 2-го класса точности. В КДЛ широко используются полуавтоматические (электрические) демпферные весы.

Аналитические весы желательно устанавливать в специально отведенной весовой комнате. В ней не должно быть никакой мебели и оборудования, не относящихся к процессу взвешивания. Двери и окна ее рекомендуется закрывать тяжелыми портьерами (чтобы предохранить весы от резкого тока воздуха при закрывании и открывании двери), а также от попадания прямого солнечного света); весы следует располагать далеко от отопительных приборов (в противном случае возможно неравномерное нагревание плеч коромысла весов, приводящее к неравноплечию). Весы не следует помещать у наружной стены здания, имеющей разную температуру летом и зимой. Нельзя устанавливать весы в тех местах, где фундамент или стены вибрируют, дрожат от прохождения по дороге автомобильного транспорта и т.п.

Если аналитические весы приходится устанавливать в здании, подвергающемся сотрясению от работы тяжелых машин или движения транспорта, используют массивные мраморные плиты, которые кладут на прокладки из резины или пенопласта (причем лучше применять три прокладки, расположив их в виде треугольника). Стол, на который укладывают мраморную плиту, укрепляют на кронштейнах, вмонтированных в капитальную стену. Между ножками весов и поверхностью, на которой они стоят, рекомендуется помещать дополнительные амортизаторы. Некоторые весы выпускаются с установочными винтами, снабженными постоянными амортизаторами. Для установки аналитических весов можно использовать стол для весов с вибрационной подушкой (750×600×800 мм) белорусского производства, который имеет простую надежную конструкцию. Каркас стола (станина) выполнен из металлического профиля, окрашен стойкой порош-

ковой эмалью. Регулируемые по высоте ножки позволяют легко установить горизонтальный уровень расположения рабочей плиты. Сама плита (750×600 мм) выполнена из материалов с покрытием «Dugson» (химически стойкое), в центре ее вмонтирована установленная на виброизоляторах гранитная плита (500×400×30 мм) с полированной поверхностью.

В середине весовой комнаты или около некапитальной стены ставят стол с техническими химическими весами. На этом столе размещают эксикаторы с бюксами, тиглями и др.

В весовую комнату не должны попадать пары кислот или других вредных веществ. Воздух весовой комнаты должен быть совершенно чистым.

Аналитические весы нередко устанавливают на полке, укрепленной на капитальной стене с помощью кронштейнов. На эту полку нельзя ничего ставить, кроме аналитических весов; недопустимо также облокачиваться на нее. Слева от полки для аналитических весов (несколько ниже ее) рекомендуется укрепить другую полку, на которую можно ставить эксикатор со взвешиваемым предметом.

Грузоподъемность аналитических весов обычно 200 г. Они дают возможность взвешивать с точностью до 0,0001 или 0,0002 г. Для взвешивания на аналитических весах применяют специальный, так называемый аналитический разновес, т.е. набор очень точных гирь, собранных в особом футляре с крышкой. Футляр внутри выложен бархатом. Аналитические граммовые гири чаще всего бывают позолоченными, реже покрыты никелем или хромом. Позолота лучше других покрытий предохраняет гири от окисления, а следовательно, от изменения массы.

Для каждой гири в футляре имеется свое гнездо. Миллиграммовый разновес находится в специальных отделениях того же футляра, где для каждой гири отведено свое постоянное место. Эта часть футляра покрыта стеклом, которое снимают только при пользовании разновесом. В каждом футляре обязательно должен быть пинцет с роговыми, костяными или пластмассовыми наконечниками. Применять стальной пинцет не рекомендуется, так как им можно поцарапать миллиграммовый разновес и этим изменить его массу. Брать руками гири нельзя, так как даже малейшие следы грязи или жира, попавшие на гири, делают их неточными и поэтому непригодными для аналитической работы.

Каждый аналитический разновес снабжен паспортом, в котором указана номинальная масса гирь и отклонения от истинной массы. Аналитические разновесы имеют следующий набор гирь: 100, 50, 20, 10, 10, 5, 2, 1 (3 шт.) г, иногда 2 шт. по 2 и 1 г; 500, 200, 100 (3 шт.), иногда 2 шт. по 200 и 1 шт. 100 мг, 50, 20, 10 (3 шт.), иногда 2 шт. по 20 и 1 шт. 10 мг и два рейтера, каждый массой по 10 (или 5) мг, в зависимости от системы весов.

Разновесы меньше 0,01 г в обычном наборе аналитических разновесов отсутствуют; их заменяет так называемый рейтер. Коромысло аналитических весов может иметь шкалу с делениями от 0 до 100.

Важнейшими качествами аналитических весов являются их чувствительность и устойчивость (т.е. постоянство показания). Чувствительность

любых весов выражается нагрузкой в миллиграммах, вызывающей отклонение стрелки на одно деление. Для облегчения отсчета по очень мелкой шкале современные весы оборудованы специальными приспособлениями, представляющими собой или вогнутое зеркало, или микроскоп, и увеличивающими стрелку и деления шкалы.

Самой важной частью аналитических весов являются три призмы: средняя, на которую опирается коромысло при взвешивании, и две боковых, на которые опираются серьги с подвешенными к ним чашками. Во время взвешивания наибольшую нагрузку несет средняя призма. Если весы не арретировать, то острые ребра всех трех призм от постоянного упора на подушки быстро затупятся и весы потеряют чувствительность.

Спереди к коромыслу аналитических весов периодического качания прикреплена стрелка, движущаяся вместе с коромыслом. Внизу под стрелкой размещена шкала, разделенная на 20 делений. У некоторых весов на этой нижней шкале цифр, указывающих деления, нет. Тогда при взвешивании среднее деление шкалы принимают за ноль и ведут отсчет по числу делений вправо со знаком плюс, влево со знаком минус. Встречаются весы, у которых ноль стоит на середине шкалы и крайние деления имеют цифры 10. Иногда ноль помещен на крайнем правом делении, 10 посередине и 20 – у крайнего левого деления шкалы.

Порошкообразные вещества, высушенные при нагревании или в эксикаторе, рекомендуется взвешивать в закрытых сосудах-бюксах (для исключения интенсивной абсорбции влаги из воздуха, сказывающейся на результатах взвешивания). Жидкости и сухие вещества, пары которых корродируют металлы (кислоты, йод и пр.), также взвешивают в бюксах или колбах с притертыми пробками (можно использовать и другую аналогичную лабораторную посуду).

Для ускорения процедуры взвешивания на аналитических весах рекомендуется предварительно взвешивать навески на технических химических весах (с точностью до 0,1 г), чтобы знать их приблизительную массу. Этим, к тому же, предотвращается перегрузка аналитических весов.

Полагается иметь специальную мягкую щетку или кисть, которыми следует смахивать пыль из футляра и с чашек весов. Касаться весов грязными руками недопустимо.

5.3.1. Аналитические весы аperiodического качания

Затухание колебаний коромысла на аналитических весах с периодическим качанием происходит очень медленно. Взвешивание на них обычно занимает много времени, оно очень утомительно. Этих недостатков лишены весы с аperiodическим качанием стрелки, так как они имеют приспособление для воздушного или магнитного торможения колебаний коромысла и стрелки.

Аналитические весы с аperiodическим качанием стрелки бывают обычными и полуавтоматическими, с верхним и нижним размещением демпферов. Демпферы представляют собой широкие цилиндры, прикрепленные или к дужке, или к чашке весов, они свободно перемещаются вну-

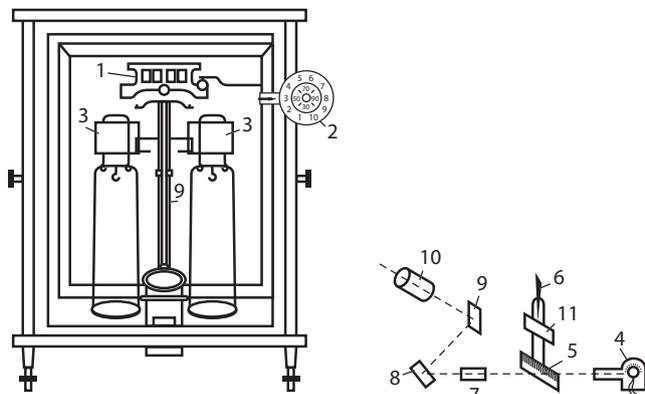


Рис. 5.2. Полуавтоматические весы аperiодического качания с рейтрографом АДВ-200: 1 – плечо коромысла; 2 – лимбы с делениями; 3 – демпферы; 4 – источник света; 5 – микрошкала; 6 – стрелка; 7 – увеличитель; 8, 9 – зеркала; 10 – матовый экран; 11 – микрошкала.

три других полых цилиндров, непосредственно укрепленных на колонке, как, например, у весов АДВ-200 («Balanta Analitica», Молдова) (рис. 5.2). Сжимаемый при опускании чашки весов воздух стремится выйти наружу через узкую щель между цилиндрами. Вследствие этого создается воздушная подушка, тормозящая колебания коромысла, и стрелка весов быстро приходит в состояние равновесия.

Нулевая точка весов должна располагаться в пределах одного деления в ту или другую сторону шкалы. Если смещение нулевой точки будет больше, то весы следует перестроить при помощи балансировочных гаек на коромысле. После того как нулевая точка установлена, приступают к взвешиванию. Для этого открывают левую дверку весов и левой рукой ставят в центр чашки предмет, который нужно взвесить, после чего закрывают дверку. Открывают правую дверку и при помощи пинцета из аналитического разновеса извлекают граммовую гирьку и ставят в центр чашки.левой рукой немного поворачивают рукоятку арретира и замечают, куда отклоняется стрелка. При этом нельзя полностью открывать арретир. Нельзя также допускать, чтобы стрелка выходила за пределы шкалы. Если предмет перевешивает, ставят все гирьки по очереди от большей к меньшим. Если вес гирек велик, убирают 2 г гирю и ставят миллиграммовые (500, 200 мг и т.д.).

Если разновес 10 мг окажется лишним, ее снимают и продолжают взвешивание при помощи рейтера (который в нерабочем положении должен находиться на нулевом делении шкалы; после взвешивания рейтер возвращают на то же место). При взвешивании на весах с двусторонней рейтерной шкалой рейтер помещают только на то плечо коромысла, где находятся гири.

Запись результатов производят после подсчета гирек, который делают дважды. Суммируют массу вынутых из коробки гирек и миллиграммовых

разновесов по пустым местам. Подсчет производят вторично, когда снимают гирьки и убирают их в коробку. Вначале подсчитывают массу граммовых гирек и записывают число граммов, затем ставят запятую и подсчитывают число миллиграммов по рейтерной шкале (как правило, одно деление соответствует 0,2, реже 0,1 мг). Порядок и правила взвешивания на весах аperiodического качания, а также разновес к ним совершенно такие же, как и для обычных весов.

5.4. Полуавтоматические весы

Полуавтоматические весы снабжены приспособлениями для механической нагрузки гирь. Примером могут служить весы аperiodического качания с вейтографом АДВ-200. Для облегчения работы и ускорения процедуры взвешивания предмет предварительно взвешивают на технических химических весах с точностью до второго знака после запятой (т.е. до сотых грамма). Перед взвешиванием весы подключают (через трансформатор) к осветительной сети. Поворачивают штурвал арретира и наблюдают перемещение освещенной шкалы. Если ноль шкалы совпадает с отсчетной линией, можно приступать к взвешиванию (если такого совпадения нет, то небольшим вращением головки корректора арретира добиваются их совпадения). Открыв левую дверку витрины, на чашку весов помещают взвешиваемый предмет, после чего дверку закрывают. На середину правой чашки весов помещают гири из разновеса к весам АДВ-200, не имеющего миллиграммовых гирек. За показаниями весов наблюдают, открыв арретир. Если микрошкала на экране перемещается влево от отсчетной линии, взвешиваемое тело тяжелее гирь, положенных на правую чашку; тогда арретир закрывают, и на чашку помещают новые гири.

Оказавшуюся избыточной последнюю гирю (массой 1 г) снимают, и приступают к автоматическому накладыванию миллиграммовых гирь с помощью лимба. Сбоку от лимбов имеется неподвижный указатель со стрелкой. На наружном лимбе нанесены деления от 0 до 10. Каждое деление соответствует нагрузке 100 мг. Таким образом, при помощи наружного лимба можно подобрать только сотни миллиграммов, т.е. когда последняя кольцевая гиря окажется избыточной (указатель лимба стоит, например, против деления «6»), ее снимают (указатель против деления «5») и приступают к подбору кольцевых гирь при помощи внутреннего лимба, по окружности которого стоят цифры от 00 до 90. При помощи этого лимба накладывают гири массой от 10 до 90 мг, т.е. находят второй знак после запятой в значении массы взвешиваемого предмета. Когда последняя гиря окажется избыточной (указатель лимба, например, напротив деления «80»), внутренний лимб переводят на одно деление назад (указатель против деления «70») и дают весам прийти в равновесие. На световой шкале видно, какое деление шкалы совпадает с неподвижной линией.

Предположим, что эта линия оказалась на шестом делении между цифрами «+3» и «+4». Первая цифра со знаком + дает третий знак после запятой, а деления между этими цифрами дают четвертый знак. Таким образом, в приведенном примере после запятой будут стоять цифры 5736: «5» – на наружном лимбе, «70» – на внутреннем лимбе и «+36» – на освещенной шкале. Однако окончательный результат взвешивания может быть определен в том случае, если цифры на световой шкале будут меньше 10. В таком случае из показаний на лимбах вычитают значение по освещенной шкале. Например, если в рассматриваемом случае против указателя оставить цифру «80» внутреннего лимба, то тогда освещенная шкала покажет «64» и окончательный результат взвешивания будет получен, если из 0,5800 вычесть 0,0064 ($0,5800 - 0,0064 = 0,5736$). Более удобно работать с частью шкалы, имеющей плюсовые деления, так как при этом облегчается отсчет результатов.

В практике КДЛ также широко используются одноплечие электромагнитные автоматические весы (системы Меттлера). Взвешивание на таких весах исключает ошибку, зависящую от работающего.

Большой чувствительностью отличаются *полумикровесы* (аналитические весы для полумикроанализа) и *микрхимические весы*. Они устроены аналогично описанным аналитическим весам, но отличаются меньшей грузоподъемностью.

5.5. Торсионные весы

Торсионные (пружинные, циферблатные) предназначены для взвешивания небольших грузов (до 500 мг). Чашка весов заключена в шкафчик, весы устанавливаются горизонтально по уровню, который находится на одной из ножек. В зависимости от конструкции торсионные весы бывают двух типов: с неподвижной циферблатной шкалой и подвижной стрелкой (рис. 5.3) и с подвижной шкалой и неподвижной стрелкой.

Порядок взвешивания на торсионных весах состоит в следующем. Вначале открывают арретир и ставят стрелку на ноль. Затем проверяют, установлен ли указатель равновесия с чертой равновесия. Закрывают арретир, открывают дверку шкафчика и ставят на чашку (подвеску) взвешиваемый предмет. После этого закрывают дверку, открывают арретир и поворачивают указатель массы до тех пор, пока указатель равновесия

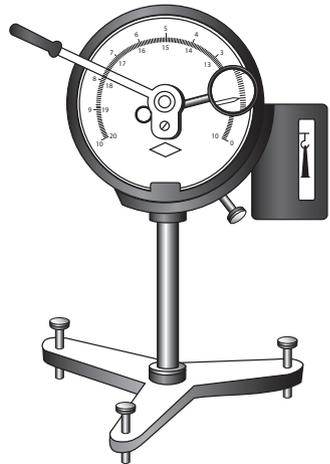


Рис. 5.3. Весы торсионные, или пружинные, с неподвижной стрелкой.

не совместится с чертой равновесия. Закрывают арретир и записывают деление, на которое указывает стрелка. Это значение и будет искомой массой предмета. Сама процедура взвешивания не занимает много времени.

5.6. Электронные весы

Электронные весы применяют для специальных целей. Они обладают существенными преимуществами перед механическими. Так, например, весы фирмы «Sartorius» (Германия) позволяют определять суммарный вес компонентов при формировании смеси, осуществлять индикацию веса в процентах относительно заданной навески, а также усреднение – взвешивание при нестабильных внешних условиях и др. Они имеют весовые чашки треугольной формы. Дверцы ветрозащитной витрины открываются плавно и широко. Все части витрины легко снимаются, что обеспечивает легкую очистку весовой камеры. Отдельные марки весов имеют пределы взвешивания 60, 120, 230, 310 г с точностью до 0,1 мг (класс точности 1).

Весы фирмы «Sartorius» (Германия) серии TE (Talent) – простые, компактные, надежные весы для рутинных взвешиваний, которые предназначены для использования в небольших лабораториях. Могут работать как от сети, так и от батареи. Пределы взвешивания составляют: 150, 320, 420 (точность, или дискретность, 1 мг) или 620, 2200 г (точность – 10 мг).

Аналитические весы «Ohaus» (США) представлены торговыми марками Adventurer, Exporter Pro, Analytical Plus. Весы Analytical Plus – классическая модель аналитических весов, проверенная временем и простая в обслуживании. Они обладают весьма высокими аналитическими характеристиками и полным набором современных функций: счет предметов в штуках, взвешивание брутто/нетто, автоматическое обнуление и тарирование, взвешивание в процентах, динамическое взвешивание, протокол измерений, статистическая обработка 2555 результатов взвешивания, возможна регистрация нескольких пользователей. Выпускаются весы с пределами взвешивания, в том числе 62, 110, 210 г, и точностью 0,1 мг.

Электронные лабораторные весы фирмы «Ohaus» (200,00 г; дискретность 0,01 г) и немецкой фирмы « Kern» (300,00 г; дискретность 0,01 г) обладают коротким временем стабилизации, составляющим 2–3 с.

Глава 6. РАСТВОРЫ: ПРИГОТОВЛЕНИЕ, СПОСОБЫ ВЫРАЖЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ, ИСПРАВЛЕНИЕ

Переход химических веществ в состояние раствора является обязательным условием протекания различных метаболических процессов в организме и выполнения многих видов клинико-лабораторного исследования. Раствор – это жидкая, газообразная или твердая гомогенная система, состоящая из двух или более компонентов, относительные количества которых могут быть произвольно изменены в довольно широких пределах.

Жидкие растворы бывают *водные* и *неводные*. Те и другие представляют собой однородную физико-химическую дисперсную систему, в которой равномерно по отношению друг к другу распределены частицы растворенного вещества, растворителя и продукты их взаимодействия. Обычно растворителем считают тот компонент, который в чистом виде существует в таком же агрегатном состоянии, что и полученный раствор. Если обе составные части системы до растворения находились в одинаковом агрегатном состоянии (например, спирт и вода), то растворителем считается жидкость, взятая в большем количестве.

В зависимости от размера частиц распределенного вещества выделяют три класса растворов как дисперсных систем:

1. Ионно-молекулярные (истинные растворы): размер частиц распределенного в них вещества не превышает 1 нм.
2. Коллоидные системы (коллоидные растворы) с размерами частиц до 100 нм; для такой системы характерно рассеивание проходящего через нее света (феномен Тиндаля).
3. Грубодисперсные системы, содержащие частицы твердого (суспензии) и жидкого (эмульсии) вещества диаметром более 100 нм.

Все вещества обладают определенной, присущей им растворимостью. Она выражается количеством граммов вещества, которое, будучи растворенным при определенной температуре в 100 г растворителя, дает насыщенный раствор. Иначе говоря, *растворимость* – это то максимальное количество вещества (в граммах), которое может быть растворено в 100 г растворителя определенной температуры.

При нагревании растворимость твердых веществ в воде, как правило, повышается, а газов – уменьшается. На ухудшении растворимости с понижением температуры раствора основаны выделение вещества (обычно в виде кристаллов определенной структуры) и очистка его от примесей. Этот процесс называется кристаллизацией. Началу кристаллизации способствует встряхивание раствора или внесение в него кристаллика растворенного вещества. Процесс кристаллизации идет тем быстрее, чем выше исходная концентрация раствора. Завершается кристаллизация установлением динамического равновесия между двумя противоположными процессами: растворения и перехода вещества из раствора в структуры кристаллов. После достижения такого состояния раствор становится насыщенным (в нем не может быть растворено дополнительное количество вещества при данной температуре). В момент установления динамического равновесия между процессами растворения и кристаллизации количество вещества, перешедшего в раствор, не изменяется, и растворение практически прекращается.

Если в растворе вещества находится меньше, чем в насыщенном, он называется ненасыщенным. При создании определенных условий могут быть получены пересыщенные растворы. Некоторые вещества особенно склонны к образованию пересыщенных растворов, что следует иметь в виду при выполнении биохимических исследований. Так, в процессе определения ионов калия химическим методом, основанным на реакции образования купрумгексанитрата калия свинца – $K_2Pb[Cu(NO_2)_6]$, получается пересыщенный раствор, для осаждения из которого сформированной комплексной двойной соли требуется длительное потирание стеклянной палочкой о внутренние стенки пробирки (с целью образования центров кристаллизации). В противном случае могут возникнуть ложно заниженные результаты.

Понятия «насыщенный» и «ненасыщенный» не следует отождествлять с понятиями «концентрированный» и «разбавленный». Концентрированный раствор отнюдь не обязательно должен быть насыщен. Например, раствор, содержащий 20 г KNO_3 в 100 г воды, является концентрированным, но если температура его $20^\circ C$, то он еще далеко не насыщен. Для получения насыщенного раствора при этой температуре нужно было бы взять 31,5 г соли на 100 г воды. С другой стороны, и насыщенный раствор может быть разбавленным (если вещество малорастворимо). Так, насыщенный раствор гипса при $20^\circ C$ содержит всего лишь 0,21 г вещества в 100 г раствора. Представление о количественном содержании вещества в растворе выражается понятием *концентрации*.

Концентрацией раствора называется массовое (г, кг) или объемное (мл, л) содержание вещества в определенном количестве или объеме раствора. В зависимости от способа выражения концентрации растворы делят на приблизительные и точные.

Согласно требованиям Международной системы единиц (System International, SI) доля содержания вещества в приблизительных растворах

в настоящее время используются размерности массовой концентрации, массовых и объемных отношений, заменившие соответствующие размерности отдельных видов процентной концентрации.

Под *процентной концентрацией* принято понимать определенное количество вещества (г или мл), содержащееся в 100 г или 100 мл раствора. Это общее определение понятия процентной концентрации включает несколько ее разновидностей. В зависимости от размерности единиц объема или массы, используемой для обозначения количества растворенного вещества и раствора, различают массовую (весовую), массо-объемную (весо-объемную), объемную, объемно-массовую (объемно-весовую) процентную концентрацию.

Массовая (весовая) процентная концентрация (%) показывает, сколько граммов вещества содержится в 100 г раствора.

$$\% = \frac{a}{a+b},$$

где a – количество растворенного вещества, b – количество растворителя в граммах (в сумме составляют 100 г).

Например, 38% раствором соляной кислоты называют такой раствор, в 100 г которого содержится 38 г хлористого водорода и 62 г воды. Для получения раствора этого вида процентной концентрации навеску вещества вносят в химический стакан, в который затем вливают 62 мл воды (масса 1 мл воды комнатной температуры составляет примерно 1 г). При приготовлении растворов различных химических реагентов удобно использовать массовую концентрацию.

Массо-объемная процентная концентрация (г%) представляет собой отношение количества растворенного вещества в граммах к 100 мл раствора. Размерность этого вида процентной концентрации – г/мл (масса/объем). Например, 10 г% раствор хлористого натрия содержит 10 г соли в 100 мл раствора. Для его получения навеску соли (10 г) вносят в мерный цилиндр или мензурку и доливают водой до метки. В случае водных растворов одинаковой (по численному обозначению) массовой и массо-объемной процентной концентрации различия в количественном содержании вещества в единице объема практически не выявляются или же ими можно пренебречь. Однако при использовании неводных растворов они могут быть весьма значительны. Так, в 10% растворе жира в четыреххлористом углеороде (жидкости плотностью 1,6 кг/л) на 10 г жира приходится около 90 мл растворителя, тогда как в 10 г% растворе значительно меньше – 56 мл.

Объемная процентная концентрация (об%, или °) – это отношение количества миллилитров растворенного вещества к 100 мл раствора. Размерность этого вида процентной концентрации – мл/мл (объем/объем). Например, 5 об% (5°) раствор этилового спирта содержит 5 мл абсолютного (безводного) спирта и 95 мл воды. Следует, правда, иметь в виду, что при смешивании

разных жидкостей, бесконечно растворяющихся друг в друге (как, например, в случае этилового спирта и воды), в силу явления контракции (т.е. взаимного проникновения молекул одного вещества через промежутки между молекулами другого) конечный объем раствора может составлять менее 100 мл.

Объемно-массовая процентная концентрация, отражающая количество миллилитров вещества, содержащегося в 100 г раствора. Редко используется в клинико-лабораторной практике.

Многие химические реактивы поступают в лабораторию (приобретаются) в виде кристаллогидратов. Растворы процентной концентрации приготавливают из них двумя способами: точным и условным.

Для приготовления раствора процентной концентрации требуется прежде всего рассчитать навеску кристаллогидрата, содержащую заданное количество вещества. Если необходимо получить 10% раствор сернокислой меди из кристаллогидрата соли состава $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, для определения соответствующей навески кристаллогидрата исходят из того, что на одну молекулу сернокислой меди приходится 5 молекул воды. Молекулярная масса кристаллогидрата сернокислой меди, составляющая 245 г, складывается из 155 г чистой соли и 90 г воды ($18 \cdot 5$), где 18 – молекулярная масса воды. Требуемую навеску кристаллогидрата (x) находят путем решения пропорции:

$$\begin{aligned} 245 \text{ г } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \text{ содержат } 155 \text{ г } \text{CuSO}_4 \\ x \text{ г } \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} \text{ содержат } 10 \text{ г } \text{CuSO}_4 \end{aligned}$$

$$x = \frac{10 \cdot 245}{155} = 30,80 \text{ г}$$

На этикетке бутылки, в которой хранится такой раствор, должно быть написано: 10% (или 10 г%) раствор CuSO_4 . Это значит, что в 100 г (или 100 мл) раствора содержится 10 г сернокислой меди, а не ее кристаллогидрата.

Условный способ выражения процентной концентрации базируется на использовании для получения раствора кристаллогидратов веществ. Например, для приготовления 10% раствора медного купороса ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) отвешивают 10 г кристаллической соли и приливают к этому его количеству воду до объема 100 мл. Поскольку такой раствор не является строго 10%, на этикетке сосуда, в котором он хранится, должна быть надпись: 10% (или 10 г%) раствор $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

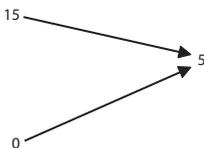
При использовании кристаллических солей важно быть уверенным в полном соответствии действительного (фактического) состава соли ее химической формуле. При неправильном хранении препаратов кристаллогидратов (в разгерметизированной посуде) может происходить частичная потеря кристаллизационной воды (выветривание), из-за чего часть вещества, особенно на поверхности кристаллов, переходит в аморфное состояние. Такой реактив не пригоден для приготовления растворов ни первым, ни вторым способом. В данном случае требуется предварительно переكري-

сталлизовать его (т.е. восстановить кристаллическую структуру реагента) или, если это позволяют химические свойства вещества, прокалить, переводя его, таким образом, в аморфное состояние.

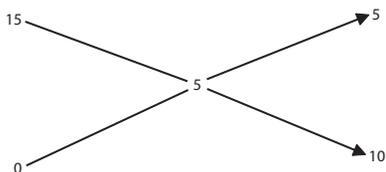
Поскольку в соответствии с требованиями Международной системы единиц в качестве единицы массы и объема раствора используются килограмм и литр соответственно, для получения необходимых показателей размерности значения отдельных видов процентной концентрации требуется умножить на 10. При этом массовая и объемная процентные концентрации преобразуются в массовое и объемное отношения с размерностью г (кг)/кг, мл (л)/л, массо-объемная процентная концентрация – в массовую концентрацию с размерностью г (кг)/л.

Для приготовления неточных растворов используются технико-химические (технические), аптекарские весы и неточная мерная посуда (цилиндры, мензурки). В случае, если возникает потребность в получении приблизительных растворов путем разбавления более концентрированных, можно воспользоваться простым и быстрым способом, именуемым «правилом креста».

Если требуется получить 5% (50 г/л) раствор хлористого аммония из более концентрированного 15% (150 г/л), составляют первую запись:

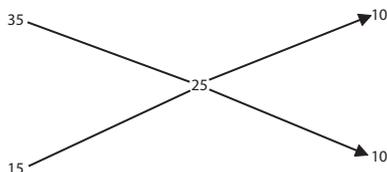


где 15 – показатель концентрации взятого раствора, 0 – вода и 5 – значение требуемой концентрации. Из 15 вычитают 5, и полученное значение записывают в правом нижнем углу. Вычитая же 0 из 5, записывают цифру в правом верхнем углу. После этого схема принимает вид:



Это означает, что для получения 5% раствора нужно 5 объемов 15% раствора смешать с 10 объемами воды.

Если смешивать два исходных раствора одного и того же вещества для получения раствора промежуточной концентрации, то из схемы устраняется 0. Пусть смешиванием 35% и 15% раствора требуется приготовить 25% раствор. В этом случае схема примет вид:



Следовательно, для приготовления 25% раствора нужно взять по 10 объемов обоих исходных растворов.

Приведенными схемами можно пользоваться только тогда, когда не требуется достижения особой точности приготовления растворов.

6.1. Точные растворы

Точные растворы характеризуются размерностью молярной (моль/л), моляльной (моль/кг), нормальной (г-экв/л) концентрации и титра (Т). Для получения растворов точной концентрации применяют *исходные вещества*, т.е. реактивы категории «х.ч.», строго отвечающие своей химической формуле, устойчивые к воздействию света и воды, негигроскопичные, не взаимодействующие с углекислым газом воздуха, обладающие большой молекулярной массой (что позволяет свести к минимуму техническую ошибку взвешивания), фиксаналы, точная мерная посуда и весы для очень точного взвешивания (аналитические, полумикрохимические, микрохимические).

Приготовление точных растворов из фиксаналов осуществляется следующим образом. Вначале необходимо теплой водой смыть надпись на ампуле и хорошо обтереть ее. Затем в мерную колбу емкостью 1 л вставляют специальную воронку с вложенным в нее стеклянным бойком (он прилагается к каждой коробке фиксанала), острый конец которого должен быть обращен вверх. Если специальной воронки нет, можно воспользоваться обычной химической воронкой, вставив в нее стеклянный боек. Когда боек будет правильно уложен в воронке, ампулу с фиксаналом дают свободно упасть так, чтобы тонкое дно ампулы разбилось при ударе об острый конец бойка. После этого пробивают боковое углубление ампулы и дают содержимому вытечь. Затем, не изменяя положения ампулы, ее тщательно промывают дистиллированной водой из промывалки. Для промывания рекомендуется употреблять не менее чем шестикратное (от объема ампулы) количество воды. Промыв ампулу, раствор доливают дистиллированной водой до метки, закрывают колбу пробкой, встряхивают.

В случае, если используются сухие фиксаналы, ампулу вскрывают так, как описано выше, при этом необходимо использовать абсолютно сухую воронку. Когда ампула будет разбита, все содержимое ее осторожным встряхиванием высыпают в колбу, ампулу промывают дистиллированной водой.

Однако не всегда раствор, приготовленный таким образом, оказывается действительно строго децинормальным. Возможны ошибки и на заводе,

хотя они встречаются очень редко. Более существенно то обстоятельство, что многие вещества, заключенные в ампулы фиксалялов, являются химически нестойкими. Так, например, растворы едкого натра и едкого калия при длительном хранении в фиксаляльных трубках мутнеют (концентрированные растворы едких щелочей медленно взаимодействуют со стеклом, в связи с чем очень старые, 2–3-летней давности щелочные фиксалялы могут оказаться неточными в результате загрязнения продуктами выщелачивания стекла. Тиосульфат, растворяясь в воде, вступает в реакцию с присутствующей в ней угольной кислотой и уже через несколько суток хранения приготовленный раствор изменяет свою концентрацию. Йод способен испаряться из растворов; некоторые органические вещества в относительно разбавленных растворах разрушаются попадающими из воздуха микроорганизмами и т.д. Поэтому после некоторого срока хранения считать строго децинормальным можно только относительно небольшое количество растворов, приготовленных из фиксалялов. К ним относятся растворы серной кислоты, двуххромовокислого калия, хлористого натрия и некоторые другие. *Все остальные растворы требуют проверки.*

При отсутствии в лаборатории фиксалялов точно децинормальные растворы (как и растворы другой концентрации) могут быть приготовлены из так называемых исходных веществ.

Поскольку не всегда удается получить точный раствор нужной концентрации путем растворения приготовленной навески вещества или содержимого ампул (фиксальалов), его приходится проверять путем титрования, находить коэффициент поправки и при необходимости исправлять.

6.1.1. Способы исправления растворов

Исправление растворов базируется на расчете коэффициента (фактора) поправки. Коэффициент поправки (K) – это число, которое показывает, во сколько раз данный раствор отличается от близкого к нему по концентрации точного раствора определенной нормальности ($0,1 N$, $0,01 N$ и др.).

Определение коэффициента поправки дает возможность получить нужную концентрацию раствора добавлением воды или реактива. Коэффициент поправки чаще всего устанавливают по отношению объемов взаимодействующих точно определенной нормальности и испытуемого растворов.

Техника определения коэффициентов поправки для децинормальных растворов

Один из растворов (удобнее испытуемый) наливают в бюретку. Приблизительно 35–50 мл раствора точной нормальности из бутылки отливают в сухой чистый сосуд (колбу). Из сосуда отбирают (желательно пипеткой Мора) в три конические колбы или химических стакана (параллельные пробы) по одной и той же порции точно отмеренных объемов жидкости (чаще – по 10 мл) для проведения последующего титрования.

К отмеренным порциям раствора прибавляют подходящий индикатор и производят титрование. Результаты записывают. Если полученные

результаты оказываются близкими (с расхождением, не превышающим 0,1 мл, максимум 0,2 мл), рассчитывают среднеарифметическую величину. Если же расхождение в результатах титрования более значительное, необходимо протитровать еще одну пробу и отбросить данные титрования пробы с отличающимися результатами (по-видимому, в этом случае была допущена техническая ошибка); затем определяют среднюю величину из трех близких по значениям результатов титрования. Остатки точного раствора из сосуда, в который была отлита его часть, выливают (опускать пипетки или вливать ранее отлитую жидкость в основную массу точного раствора категорически запрещается) и производят расчет.

Расчет. Поскольку K – это число, показывающее, во сколько раз данный раствор отличается от близкого к нему по концентрации раствора точной нормальности, его определяют, рассчитывая отношение объема титрованного раствора (V_t) (строго определенной нормальности) к объему испытуемого раствора ($V_{исп.}$), принимавшего участие в титровании:

$$K = \frac{V_t}{V_{исп.}}$$

При взаимодействии точного и проверяемого раствора могут иметь место три варианта:

1. Растворы взаимодействовали в одинаковых объемах. Например, на титрование 10,0 мл 0,1 N раствора пошло 10,0 мл испытуемого. Уже на основании одного этого можно заключить, что нормальность их одинакова, и испытуемый раствор точно децинормальный.

$$K = 10,0 \text{ мл} : 10,0 \text{ мл} = 1,00$$

2. На взаимодействие с определенным объемом точного раствора пошел меньший объем испытуемого раствора. Например, на 10 мл 0,1 N (!) пошло 9,5 мл испытуемого.

$$K = 10,0 \text{ мл} : 9,5 \text{ мл} = 1,05$$

3. На взаимодействие с определенным объемом точного раствора пошел больший объем испытуемого раствора. Например, на 10 мл 0,1 N (!) пошло 10,5 мл испытуемого.

$$K = 10,0 \text{ мл} : 10,5 \text{ мл} = 0,95$$

Коэффициент поправки всегда больше единицы, если испытуемый раствор более концентрированный, чем раствор точной нормальности, и меньше единицы, если концентрация испытуемого раствора меньше, чем раствора сравнения. Коэффициент поправки принято рассчитывать с точностью до второго знака после запятой.

В практической работе фактор поправки широко применяют при титровании так называемыми установленными растворами. В этом случае резуль-

таты каждого титрования умножают на значение K и таким образом определяют, сколько было бы затрачено на титрование не приблизительного, а точного раствора определенной нормальности (например, децинормального).

Если нет полной уверенности в точном приготовлении раствора определенной нормальности, отдают предпочтение приготовлению раствора более высокой концентрации, тем более что умножать на числа несколько больше единицы (например, 1,01, 1,03 и т.д.) удобнее, чем на числа, которые меньше единицы (0,97, 0,98 и т.д.). Растворами, фактор поправки которых значительно отличается от единицы, пользоваться не рекомендуется, поскольку даже в известном приближении их нельзя отнести к 0,1 N, 0,01 N и другим точным растворам. Как правило, допускаются колебания K от 0,95 до 1,05.

Исправление растворов, коэффициент поправки которых больше 1

Такие растворы более концентрированные, чем нужно, и, следовательно, нуждаются в разбавлении. Последнее обстоятельство делает способ их исправления чрезвычайно простым, и по этой причине в ряде случаев предпочитают готовить более концентрированные растворы. Если нет оснований сразу рассчитывать на получение точного раствора, стараются приготовить его несколько более концентрированным, чем точный раствор (определенной нормальности).

Пример. На титрование 10 мл точного 0,1 N раствора HCl пошло 9,2 мл раствора NaOH. Всего раствора NaOH 500,0 мл. Вначале находят K , а затем разницу между его численным значением и единицей:

1. $10,0 : 9,2 = 1,086$ ($K = 1,086$).
2. $1,086 - 1,000 = 0,086$.

Полученная разница означает, что к каждому миллилитру щелочи следует добавить 0,086 мл воды, чтобы сделать концентрацию раствора щелочи точно 0,1 N.

3. Рассчитывают дополнительный объем воды, который нужно добавить к имеющемуся раствору: $500 \cdot 0,086 = 43,0$ мл.

Исправление растворов, коэффициент поправки которых меньше 1

Для определения недостающего в таких растворах количества вещества (г-экв.) устанавливают разность между теоретическим титром раствора (определенной нормальности) и действительным содержанием вещества (в граммах) в 1 мл раствора (величина отношения теоретический титр : значение титра = T выражается числом с четырьмя значащими цифрами после запятой, например, $T = 0,003682$ г/мл. Найденная величина показывает, сколько вещества (г) надо прибавить к 1 мл раствора для доведения его концентрации до заданной нормальности.

Пример. Коэффициент поправки 0,1 N раствора NaOH = 0,80. Объем раствора составляет 2000 мл. Требуется привести раствор к 0,1 N.

Грамм-эквивалент $\text{NaOH} = 40$ г, поэтому теоретический титр (T_r) для 0,1 N раствора равен 0,0040. Практический титр ($T_{\text{пр.}} = T_r \cdot K$) раствора в данном примере равен $0,0040 \cdot 0,80 = 0,0032$ г/мл. Разность между теоретическим и практическим титром составляет $0,0004 = 0,0040 - 0,0036$. Поскольку объем всего раствора равен 2000 мл, то для исправления к нему следует добавить $2000 \cdot 0,0008 = 1,6$ (г) NaOH .

Использование 0,1 N растворов, имеющих коэффициент поправки, для приготовления точно санти-, милли- и другой нормальности разбавленных растворов

Разбавление исходного (примерно 0,1 N) раствора в 10 и 100 раз производят с учетом фактора поправки. Если раствор оказывается более концентрированным, чем строго децинормальный ($K > 1$), для приготовления сантинормального раствора необходимо взять исходного раствора во столько раз меньше, чем 0,1 N, во сколько раз он концентрированнее децинормального.

Вначале рассчитывают объем (в миллилитрах) точно 0,1 N (!) раствора, а затем делят полученную величину на коэффициент поправки. Например, требуется приготовить 100 мл 0,01 N раствора из 0,1 N раствора с $K = 1,05$. Если бы раствор был точно 0,1 N, следовало бы взять его в количестве 10,0 мл, внести в мерную колбу и довести водой до 100 мл, но так как имеющийся в наличии раствор более концентрированный, чем точный, в 1,05 раза, его необходимо взять не 10,0 мл, а $10,0 \text{ мл} : 1,05 = 9,52$ мл.

Если же раствор относительно разбавленный ($K < 1$, например, 0,90), при делении 10,0 мл на значение K объем раствора увеличивается во столько раз, во сколько он более разбавлен, чем точно децинормальный. В данном случае объем равен $10,0 : 0,90 = 11,1$ мл.

6.1.2. Приготовление раствора трихлоруксусной кислоты точной концентрации

Допустим, требуется приготовить 500 мл раствора трихлоруксусной кислоты (ТХУ) концентрации 100 г/л. Предположим, что в лаборатории имеется бутылка с влажными кристаллами ТХУ и титрованный 0,1 N раствор NaOH с $K = 1,02$.

Первоначально из кристаллов ТХУ готовят исходный концентрированный раствор. Отбирают 1 мл концентрированного раствора в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем до метки дистиллированной водой. В параллельные пробы вносят по 10 мл ($V_{\text{исп.}}$) разведенного в 100 раз исходного раствора ТХУ, добавляют по 2 капли раствора фенолфталеина (индикатор) и титруют с помощью 0,1 N раствора NaOH до появления бледно-розовой окраски.

Если среднее значение объема 0,1 N раствора NaOH с $K = 1,02$, прошедшего на титрование, оказалось равно 5,9 мл (V_r), тогда титр теоретический (T_r) 0,1 N раствора ТХУ будет равен 0,01635 г/мл (так как мол. масса 1 моля ТХУ равна 163,5 г). Отсюда массовая концентрация 0,1 N раствора

ТХУ равна 16,35 г/л. Далее по приведенной формуле рассчитывают массовую концентрацию исходного концентрированного раствора кислоты:

$$A \text{ (г/л)} = T_{\text{пр.}} \text{ (г/мл)} \cdot 1000 = \frac{T_{\text{т}} \cdot V_{\text{т}} \cdot K \cdot 1000 \cdot \text{разведение}}{V_{\text{исп.}}};$$

$$A \text{ (г/л)} = \frac{0,01635 \cdot 5,9 \cdot 1,02 \cdot 1000 \cdot 100}{10} = 917,2.$$

Для приготовления 500 мл раствора ТХУ концентрации 100 г/л требуется 50 г вещества: в 100 мл раствора должно содержаться 100 г ТХУ, в 500 мл – b г ТХУ. Отсюда $b = 50$ г. Необходимое для приготовления 500 мл раствора количество ТХУ содержится в следующем объеме его исходного концентрированного раствора:

$$x \text{ (мл)} = \frac{b \text{ (г)} \cdot 1000}{a \text{ (г/л)}} = \frac{50 \cdot 1000}{917,2} = 54,5.$$

В мерную колбу вместимостью 500 мл необходимо поместить рассчитанный объем раствора ТХУ и добавить дистиллированной воды до метки.

Использование титрометрического анализа позволяет приготовить надежные рабочие растворы, от которых зависит правильность результатов выполнения биохимических анализов.

6.2. Буферные растворы

Буферные растворы – это растворы, содержащие слабую кислоту и ее соль с сильным основанием или слабое основание и его соль с сильной кислотой. Характерной их особенностью является то, что при разбавлении или добавлении небольших количеств кислоты (или щелочи) рН этих растворов изменяется весьма незначительно. Они обычно используются для проведения тех реакций, которые нуждаются в поддержании постоянного значения рН.

Каждый буферный раствор обладает определенной буферной емкостью, под которой понимают количество грамм-эквивалентов кислоты или щелочи, которое необходимо добавить к 1 л буферного раствора, чтобы изменить его рН на единицу. Вполне понятно, что более концентрированные буферные растворы обладают и большей буферной емкостью. Наиболее часто буферные растворы применяются при проведении фракционирования белков методом электрофореза на носителях. Известно, что от кислотности (щелочности) среды, ионной силы буферной смеси

и некоторых других факторов во многом зависят знак и величина электрического заряда молекул белков, их электрофоретическая подвижность. При проведении зонного электрофореза широко используется трис-буфер с рН 8,9 (в 1 л дистиллированной воды растворяют 60,5 г триоксиметиламинометана (трис), 6 г ЭДТА и 4,6 г борной кислоты). Ранее (при осуществлении электрофоретического разделения белков на хроматографической бумаге) находили применение буферные растворы на основе мединала и веронала (с ними нужно обращаться с осторожностью, так как это наркотические вещества!), которые готовили по следующим прописям:

1. *Вероналовый (веронал-мединаловый) буфер с рН 8,6*

Мединал (натриевая соль веронала) в количестве 10,32 г растворяют в 300 мл дистиллированной воды в химическом стакане емкостью 500 мл. После растворения мединала добавляют 1,84 г веронала и, помешивая, нагревают смесь на водяной бане до его растворения. После охлаждения до комнатной температуры раствор количественно полностью переносят в мерную колбу емкостью 1000 мл. Чтобы достичь этого, химический стакан промывают несколькими порциями дистиллированной воды, сливая каждый раз полученный раствор в мерную колбу. Проверяют и, если необходимо, устанавливают рН. Затем объем буферной смеси доводят до метки дистиллированной водой.

2. *Веронал-ацетатный буфер с рН 8,6*

В 30 мл дистиллированной воды растворяют 8,71 г веронала, 1,89 г едкого натра и 6,48 г уксуснокислого натрия. Доливают к раствору 60 мл 0,1 М раствор соляной кислоты и доводят его объем дистиллированной водой до 1 л.

Раздел 2

ОСНОВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Глава 7. ТЕХНОЛОГИИ ВЫПОЛНЕНИЯ ВЕСОВОГО, ОБЪЕМНОГО И ГАЗОВОГО АНАЛИЗА

Большинство существующих методов количественного определения исследуемых веществ основывается на использовании весового, объемного и оптического анализа.

7.1. Весовой анализ

Состоит в определении навески анализируемого вещества, выделенного из биологических жидкостей (или тканей), для чего используются весы для очень точного взвешивания (аналитические, торсионные и др.).

Весовым методом обычно устанавливается содержание фибриногена.

7.2. Объемный анализ

Объемный анализ включает в себя титриметрический и газометрический (манометрический). Из этих двух основных разновидностей объемного анализа в клиничко-лабораторной практике наиболее часто применяется титриметрический, базирующийся на точном измерении объемов растворов веществ, реагирующих между собой полностью и без остатка (т.е. в эквивалентных отношениях).

Свое название титриметрический объемный анализ получил от понятия «титрование», которое является процессом медленного, по каплям добавления раствора из бюретки к точно отмеренному объему исследуемого раствора (содержащегося в колбочке) до достижения точки эквивалентности.

Раствор с точно известной концентрацией называется титрованным, или рабочим, а раствор, концентрацию которого требуется определить, – испытуемым.

Для регистрации достижения конца реакции используются вспомогательные реактивы – индикаторы. Это вещества, которые изменением (например, метиловый оранжевый), появлением или исчезновением цвета (фенолфталеин), выделением газа или выпадением осадка свидетельству-

ют о полном израсходовании одного из веществ, об установлении эквивалентных отношений между ними.

В некоторых случаях индикатором является непосредственно одно из реагирующих веществ. Так, например, темно-фиолетовый раствор KMnO_4 при титровании обесцвечивается восстановителем. В эквивалентной точке обесцвечивание прекращается, и одна лишняя капля раствора KMnO_4 окрашивает весь раствор в розовый цвет.

Установив конец реакции между двумя взаимодействующими между собой растворами реагентов и зная точный объем одного из них, легко установить концентрацию во взятом объеме исследуемого раствора по уравнению эквивалентов Гей-Люссака:

$$N_1 V_1 = N_2 V_2 \text{ или}$$

$$\frac{N_1}{N_2} = \frac{V_2}{V_1};$$

$$N_2 = \frac{N_1 \cdot V_1}{V_2}.$$

Между объемами раствора реагирующих веществ и их концентрациями (нормальностями) существует обратно пропорциональная зависимость. Уравнение эквивалентов Гей-Люссака позволяет установить не только концентрацию, но и объем исследуемого раствора, если известны три величины, приведенные в уравнении:

$$V_2 = \frac{N_1 \cdot V_1}{N_2}.$$

Для выполнения объемного анализа требуется, чтобы реакция между веществом, взятым для анализа, и выбранным реактивом проходила быстро и количественно до конца. При этом завершение реакции должно точно определяться по четкому изменению цвета раствора или по каким-либо другим признакам.

Таким образом, при проведении объемного анализа возникают две практические задачи:

1. Приготовить рабочий раствор с точно известной концентрацией.
2. Точно измерить объемы растворов, содержащих эквивалентные количества веществ.

Для получения надежных результатов выполнения объемного анализа важно не только точно приготовить раствор известной концентрации, но и измерить объем реагирующих между собой веществ. При этом следует стремиться к тому, чтобы объем жидкости, идущей на титрование, был

достаточно большим, но не превышал объем бюретки, так как при повторном заполнении ее раствором точность титрования уменьшается.

При исследовании растворов, концентрация которых неизвестна, вначале производят грубое, ориентировочное титрование. С этой целью в колбу наливают небольшое количество испытуемого раствора (1–5 мл) и, прибавляя индикатор, быстро титруют, не боясь перетитровать (допустимо прибавление титрованного раствора струей). Замечают, но не записывают объем жидкости, пошедшей на титрование, и затем решают вопрос о том, какой объем следует взять для точного титрования. Если раствор оказался слишком концентрированным, прибегают к предварительному его разбавлению (в 10, а иногда и в 100 раз), после титрования учитывают при расчете степень разведения.

7.2.1. Техника титрования, условия его проведения

В коническую колбу (Эрленмейера) вносят раствор с помощью пипетки Мора (предназначенной для точного взятия одного объема жидкости).

Жидкость из пипетки выливают медленно, по каплям. Во все порции, взятые для анализа, добавляют соответствующий индикатор. Нижний мениск раствора в бюретке устанавливают точно на одной из черт градуировки (удобнее на ноль). Показания бюретки записывают. Кран, зажим или бусинку бюретки берут в одну, а сосуд с испытуемой жидкостью – в другую руку. Раствор из бюретки добавляют осторожно, по каплям. Содержимое колбы перемешивают, для чего во время титрования производят спокойные равномерные круговые движения. По окончании титрования записывают показания бюретки. Разница в титровании параллельных проб не должна превышать 0,1 мл, максимум (при употреблении малочувствительных индикаторов) – 0,2 мл (при титровании из микробюретки – 0,01–0,02 мл, максимум – 0,03 мл). Если были получены более значительные расхождения, титрование следует повторить. Результаты титрования умножают на коэффициент поправки (пересчитывая их тем самым на объем точного раствора соответствующей нормальности). Если $K = 1$, необходимость в этом отпадает. Рассчитывая концентрацию испытуемой жидкости, первоначально определяют содержание растворенного вещества в 1,0 мл раствора, т.е. практический титр ($T_{\text{пр.}}$). Для этой цели используют уравнение:

$$T_{\text{пр.}} = \frac{T_{\text{т}} \cdot V_{\text{т}}}{V_{\text{исп.}}},$$

где $T_{\text{пр.}}$ – титр практический, $T_{\text{т}}$ и $V_{\text{т}}$ – титр и объем точного (рабочего) раствора, $V_{\text{исп.}}$ – объем исследуемого раствора, титр которого $T_{\text{пр.}}$ определяется. Если полученную величину умножить на 100, то концентрация будет выражена в массо-объемных процентных отношениях. Если испытуемый раствор для титрования разведен в определенное число раз, полученный результат следует умножить на степень разведения.

Пример. На титрование 10 мл разведенного в 10 раз раствора серной кислоты пошло 20 мл децинормального раствора едкой щелочи с $K = 1,08$. Определяют концентрацию серной кислоты в растворе и выражают ее в массо-объемных отношениях следующим образом.

Грамм-эквивалент серной кислоты равен 49 г. Отсюда, титр для децинормального раствора (T_1) составляет 0,0049 г.

$$\text{Концентрация} = \frac{0,0049 \text{ г} \cdot 20 \text{ мл} \cdot 1,08 \cdot 10 \cdot 100}{10 \text{ мл}} = 10,6\%$$

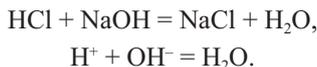
(10,6 г серной кислоты в 100,0 мл раствора).

Наряду с прямым титрованием, применяется и прием обратного титрования, когда к испытуемому раствору добавляется точно отмеренный объем титрованного раствора, содержащего избыток вещества. Остаток титрованного раствора оттитровывают вторым титрованным раствором той же нормальности. Израсходованный на реакцию с испытуемым раствором объем титрованного раствора в этом случае равен разности между количеством раствора, внесенного в избытке, и количеством второго раствора той же нормальности.

В зависимости от природы химической реакции, положенной в основу титриметрического объемного анализа, различают следующие его разновидности: метод нейтрализации, оксидиметрию, комплексометрию, методы осаждения.

7.2.2. Метод нейтрализации

В основе метода нейтрализации лежит реакция взаимодействия кислоты с щелочью, во время которой происходит образование молекул воды из ионов водорода и гидроксила:



Реакция нейтрализации заканчивается тогда, когда прореагируют эквивалентные количества веществ. Зная объемы растворов прореагировавших веществ и концентрацию одного из них, можно вычислить концентрацию раствора второго вещества.

Количественное определение содержания кислот называется *ацидиметрией*, щелочей – *алкалиметрией* (от англ. «alkali» – щелочь, «acid» – кислота).

При осуществлении реакции нейтрализации точка эквивалентности может наступить в нейтральной, щелочной и кислой среде. Если реагируют сильная кислота и щелочь, то в точке эквивалентности среда будет нейтральной (рН 7). Если же с щелочью реагирует слабая кислота, то вследствие гидролиза образующейся соли реакция среды в точке эквивалент-

ности окажется щелочной ($\text{pH} > 7$). При взаимодействии сильной кислоты и слабого основания из-за гидролиза получающейся соли реакция среды в точке эквивалентности будет кислой ($\text{pH} < 7$).

Применяемые для определения точки эквивалентности при реакциях нейтрализации индикаторы представляют собой органические красители со слабыми кислотными или основными свойствами, меняющие цвет в зависимости от реакции среды, в которой они находятся. Существует несколько теорий, объясняющих механизм действия индикаторов. Наиболее распространенной из них является предложенная в 1891 г. теория *Оствальда*, основанная на представлении об электролитической диссоциации. Согласно этой теории индикаторы, применяемые при использовании объемного анализа методом нейтрализации, представляют собой слабые электролиты, цвет растворов ионизированных форм которых отличается от цвета растворов, в которых преобладают недиссоциированные молекулы. В соответствии с этим индикаторы могут быть одноцветными и двухцветными. У одноцветных индикаторов недиссоциированные молекулы бесцветны, а ионы окрашены. Двухцветные индикаторы характеризуются тем, что недиссоциированные молекулы их имеют один цвет, например, красный, а ионы – другой цвет, например, желтый. Примером одноцветных индикаторов может служить фенолфталеин, двухцветных – метиловый оранжевый.

Метиловый оранжевый – 4-(4-диметиламиноазобензол)сульфоновая кислота или натриевая соль этой кислоты. Представляет собой азокраситель. В растворе это соединение находится в равновесии:



где HInd – недиссоциированная молекула индикатора (молекула кислоты), а Ind^- – ее анион. Недиссоциированная молекула получила название кислотной формы индикатора; анион Ind^- , присутствующий главным образом в щелочной среде, представляет собой щелочную форму индикатора.

Из уравнения диссоциации видно, что в растворе присутствуют обе цветные формы индикатора: анион и недиссоциированная молекула. Изменяя концентрацию ионов водорода, это равновесное состояние можно сдвинуть в ту или другую сторону. Так, если к раствору индикатора прибавить какую-либо кислоту, то концентрация ионов H^+ увеличится, и равновесие по закону действующих масс сместится влево, т.е. в сторону образования недиссоциированных молекул HInd . Количество анионов Ind^- уменьшится, и окраска раствора будет обусловлена цветом недиссоциированных молекул индикатора. Наоборот, уменьшение концентрации ионов H^+ вызывает диссоциацию нового количества молекул индикатора. Если к раствору индикатора прибавить какую-либо щелочь, например NaOH , то появляющиеся в растворе гидроксильные ионы OH^- будут связывать ионы H^+ индикатора в недиссоциированные молекулы H_2O ; равновесие по закону действующих масс сместится вправо, т.е. в сторону увеличения в растворе концентрации анионов Ind^- , и цвет раствора изменится. Преобладание той

или иной формы индикатора нарастает постепенно, и, наконец, в определенный момент количественные изменения переходят в новое качество, и вместо одного цвета раствора мы видим другой.

Тот диапазон между двумя значениями рН, в котором происходит визуально определяемое изменение цвета раствора индикатора, называется интервалом перехода индикатора, или зоной перемены окраски. Каждый индикатор имеет свой индивидуальный интервал перехода, соответствующий различным значениям рН. Различные значения интервала перехода окраски у разных индикаторов объясняются тем, что они имеют разные константы диссоциации.

В этом можно убедиться, наблюдая за изменением цвета раствора метилового оранжевого в зависимости от рН раствора. При добавлении к раствору щелочи 1–2 капля метилового оранжевого (0,05 г индикатора в 100 мл воды) раствор приобретает желтую окраску. Если к этому раствору постепенно приливать раствор кислоты, то рН его начинает падать, однако желтый цвет раствора длительное время продолжает сохраняться, даже после того, как вся щелочь полностью нейтрализована и рН станет равен 7. Желтый цвет раствора сохраняется при титровании до тех пор, пока рН не достигнет 4,4. Только с этого момента при дальнейшем уменьшении рН окраска раствора начинает постепенно переходить из желтой в розовую. По достижении рН 3,1 окраска становится ярко-розовой. Таким образом, метиловый оранжевый меняет свой цвет в интервале рН между 4,4 и 3,1.

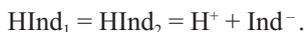
Фенолфталеин меняет свой цвет в интервале значений рН от 8,2 до 9,8 (при рН >10 он приобретает красный цвет, при рН <8 становится бесцветным. В интервале же значений рН от 8 до 10 раствор фенолфталеина постепенно из бесцветного становится красным).

Фенолфталеин – слабая органическая кислота, молекулы которой бесцветны, а анионы окрашены в малиновый цвет. Этот индикатор представляет собой соединение ароматического ряда со слабыми кислотными свойствами. Молекулы фенолфталеина в нейтральных и кислых водных средах не подвергаются диссоциации, а потому не окрашивают раствор; в щелочной среде фенолфталеин окрашивает раствор в красный цвет вследствие диссоциации молекул. Интервал его перехода находится в пределах значений рН от 8 до 9,8, так как константа диссоциации фенолфталеина равна $8 \cdot 10^{-10}$. Вследствие высокой чувствительности к кислотам титрованию с фенолфталеином мешает присутствие углекислоты, которую удаляют предварительным кипячением растворов. Фенолфталеин применяется при титровании кислот и щелочей; для титрования же растворов слабых оснований его использовать нельзя. В концентрированных растворах щелочей фенолфталеин разлагается, поэтому при титровании такие растворы должны быть предварительно разбавлены водой. Раствор фенолфталеина (1%) обычно готовят путем внесения 1 г фенолфталеина в 70 мл 96° этилового спирта и 30 л воды. Для проведения титрования 1–2 капли индикатора добавляют к каждому 25 мл титруемого раствора.

Хромофорная теория индикаторов объясняет изменение окраски индикатора изменением строения его молекул, происходящим в результате внутримолекулярной перегруппировки атомов, что приводит к образованию одной из хромофорных групп. Таковыми являются: азогруппа ($N=N$), хиноидная группа и т.д.

Согласно *хромотропионной теории* молекула индикатора может находиться в двух таутомерных формах, отличающихся между собой внутренним строением молекул. Изменение окраски индикатора вызвано переходом одной таутомерной формы в другую, что сопровождается возникновением или исчезновением хромофорных групп.

Переход одной таутомерной формы в другую – это обратимый процесс, зависящий от изменения концентрации ионов водорода. Обозначив отдельные таутомерные формы индикатора как $HInd_1$ и $HInd_2$, можно представить схему перехода как



Окраска таутомерной формы $HInd_1$ отличается от окраски таутомерной формы $HInd_2$; вместе с тем, анионы Ind^- такого же цвета, как и форма $HInd_2$, поскольку внутреннее строение молекул не изменяется. При добавлении в раствор ионов водорода (H^+) равновесие в приведенном уравнении смещается влево, и раствор окрашивается в цвет, соответствующий форме $HInd_1$. Гидроксильные ионы OH^- , введенные в раствор, связывают ионы водорода H^+ , и равновесие смещается вправо. Раствор принимает окраску, соответствующую анионам $HInd$ и таутомерной форме $HInd_2$.

Из всех, в том числе промежуточных, цветов раствора индикатора практическую значимость имеет тот, который наиболее отчетливо воспринимается визуально. Обычно титрование заканчивают при получении того оттенка индикатора, которому соответствует определенное значение pH в зоне перехода индикатора. Величина pH , при которой заканчивают титрование, называется показателем титрования P_t .

При определении эквивалентной точки титрования кислот и оснований с разными индикаторами титрование заканчивается при различных значениях pH . К тому же, показатель титрования P_t обычно не совпадает и с нейтральностью среды, определяемой равенством концентраций ионов H^+ и OH^- (pH 7). Так, например, титрование с фенолфталеином заканчивают тогда, когда раствор имеет еще щелочную реакцию (pH 9), а с метиловым оранжевым – кислоту (pH 4).

Реакция раствора индикатора на процесс титрования зависит от множества факторов: температуры, свойств и концентрации титруемого и рабочего растворов, присутствия посторонних веществ и, наконец, от содержания в реакционной смеси самого индикатора. Поэтому для получения точных результатов необходимо производить титрование при одних и тех же условиях: т.е. при одинаковых температуре, освещении, соблюдать один и тот же порядок титрования, использовать одинаковое количество раствора индикатора и пр.

Метод нейтрализации широко применяется в клинической лабораторной диагностике для определения кислотности желудочного сока, количественного определения содержания аммиака и кислот, входящих в состав мочи.

Для того чтобы правильно подобрать индикатор, необходимо проследить, как в различных, наиболее типичных случаях изменяется кислотность или щелочность раствора по мере его нейтрализации путем титрования. Изменения рН, происходящие по мере нейтрализации различных по степени диссоциации кислот и оснований, принято изображать графически.

Графические изображения, показывающие ход изменения рН раствора в процессе титрования, называются *кривыми титрования* (или кривыми нейтрализации). Для их построения на оси ординат откладывают значения рН раствора, а на оси абсцисс – объем прибавляемого титрованного раствора кислоты или щелочи (в миллилитрах).

Титрование сильной кислоты щелочью

Если 0,1 N раствор (10 мл) соляной кислоты титруется 0,1 N раствором едкого натра, то в процессе титрования концентрация ионов водорода и соответственно рН среды будет характерно изменяться.

Процесс изменения рН в процессе титрования может быть проиллюстрирован на следующем примере. В коническую колбу (Эрленмейера) пипеткой Мора внесено 10 мл строго 0,1 N раствора хлористоводородной (соляной) кислоты, которая подлежит титрованию точно приготовленным раствором щелочи (NaOH). Все количество находящегося в растворе соляной кислоты ионов водорода, принимаемое за 100%, обуславливает рН 1. При добавлении к этому раствору 9,0 мл раствора щелочи (NaOH) рН возрастает на одну единицу. Это объясняется тем, что если 10 мл исходного раствора соляной кислоты заключают в себе 100% ионов водорода, то после нейтрализации раствором щелочи (такой же нормальности, что и кислота) 9 мл раствора соляной кислоты остается неизрасходованным 1 мл его, на который приходится 10% ионов водорода (от исходного количества). Известно, что всякое 10-кратное уменьшение концентрации ионов водорода сопровождается увеличением рН на одну единицу. Для того чтобы вызвать дальнейшее увеличение рН на одну единицу, очевидно, требуется нейтрализовать 0,9 от оставшегося 1 мл раствора соляной кислоты, для этого нужно к остатку неизрасходованного раствора соляной кислоты добавить 0,09 мл раствора щелочи (той же нормальности). Поскольку объем одной капли раствора (добавляемой из бюретки) обычно равен 0,05 мл, то от внесения в колбу двух капель рН титруемого раствора скачкообразно возрастает с 4 до 7 и более единиц. При добавлении следующей капли раствора щелочи рН возрастает до 10 и более.

Из рисунка 7.1 видно, что рН среды вначале изменяется постепенно и достигает значения 4, когда нейтрализовано 99,9% кислоты. При дальнейшем прибавлении раствора едкого натра концентрация ионов водорода падает скачкообразно, и при нейтрализации последних количеств кислоты рН изменяется сразу на 6 единиц (от 4 до 10). Такое резкое изменение

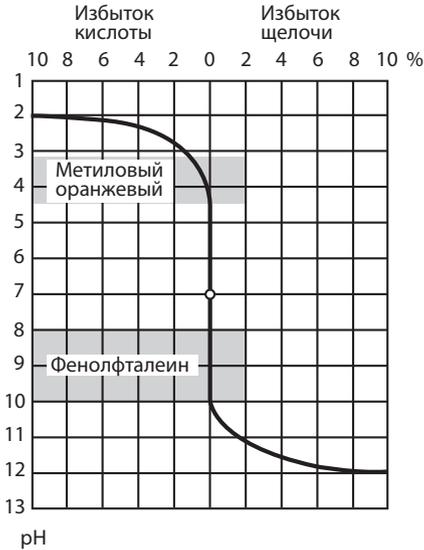


Рис. 7.1. Кривая титрования 0,1 N раствора HCl 0,1 N раствором NaOH (или наоборот).

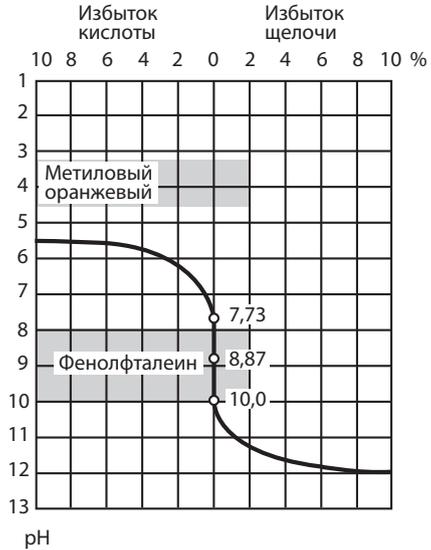


Рис. 7.2. Кривая титрования 0,1 N раствора CH_3COOH 0,1 N раствором NaOH (или наоборот).

pH исследуемого раствора, вызванное добавлением одной капли рабочего раствора, называется *скачком титрования*. Точка на кривой титрования, соответствующая моменту нейтральности раствора, находится как раз посередине скачка титрования. При дальнейшем прибавлении избытка едкого натра ход кривой титрования изменяется аналогично, но в обратном направлении. Следовательно, в случае титрования сильной кислоты щелочью (или наоборот) точка эквивалентности совпадает с нейтральной точкой среды. Это объясняется тем, что в момент эквивалентности в растворе находится только соль NaCl, образованная сильной кислотой и сильным основанием (как известно, такие соли гидролизу не подвергаются, а потому pH раствора этих солей, как и у чистой воды, равен 7).

Титрование слабой кислоты щелочью

Если, например, 10 мл 0,1 N раствора уксусной кислоты титруется 0,1 N раствором едкого натра, то по мере прибавления к уксусной кислоте едкого натра в растворе образуется соль – ацетат натрия (CH_3COONa). После того как вся кислота будет нейтрализована, pH раствора будет зависеть практически только от присутствия в нем CH_3COONa . Вследствие гидролиза этой соли раствор приобретает щелочную реакцию, а потому в эквивалентной точке титрования pH будет больше 7 (рис. 7.2). Из рисунка видно, что кривая титрования раствора уксусной кислоты раствором щелочи начинается ближе к линии нейтральности (pH 7), чем в случае титрования

раствора HCl, а эквивалентная точка не совпадает с нейтральной точкой раствора, она лежит в части кривой, где pH равно 8,9. Это объясняется тем, что в момент эквивалентности в растворе есть только CH_3COONa , гидролиз этого соединения обуславливает щелочную реакцию (pH 8,87); скачок pH на кривой титрования в данном случае значительно меньше, чем в случае титрования раствора HCl.

Титрование слабого основания сильной кислотой

В процессе титрования 0,1 N раствора HCl 0,1 N раствором аммиака (NH_4OH) в результате реакции образуется хлористый аммоний (NH_4Cl). При гидролизе этой соли раствор приобретает кислую реакцию, поэтому эквивалентной точке титрования соответствует pH < 7.

Из рисунка 7.3 видно, что эквивалентная точка не соответствует точке, в которой раствор является нейтральным (pH 7), ей соответствует pH 5,13 (это объясняется тем, что в момент эквивалентности в растворе присутствует только NH_4Cl , pH 5,12); скачок pH на кривой титрования в этом случае выражен меньше, чем в случае использования сильного основания NaOH, и составляет 2,25.

При титровании слабой кислоты, например CH_3COOH , слабым основанием (чаще всего NH_4OH) скачок pH на кривой титрования почти совершенно исчезает, резкого изменения цвета индикатора от одной лишней капли кислоты или основания не происходит, поэтому точное титрование в данном случае становится невозможным (рис. 7.4).

Выбор индикатора для определения конца титрования

Точка перегиба кривой титрования (середина скачка титрования) показывает, какой индикатор предпочтителен в каждом случае. При титровании сильных кислот щелочами можно применять любой индикатор, зона перехода которого лежит в диапазоне значений pH от 4,0 до 10,0, в том числе метиловый оранжевый, метиловый красный, фенолфталеин и др. Все эти индикаторы от одной последней капли прибавляемого 0,1 N раствора кислоты или щелочи резко меняют цвет (см. рис. 7.1).

При титровании слабой кислоты 0,1 N раствором едкого натра кривая титрования сдвинута в щелочную сторону, перегиб ее менее резкий и находится в диапазоне значений pH от 8,0 до 10,0. Для определения конца реакции в данном случае можно использовать, очевидно, те индикаторы, растворы которых именно в этом промежутке pH меняют свой цвет. Этому условию соответствует фенолфталеин (интервал перехода 8,0–9,8); метиловый оранжевый в данном случае не подходит, так как он изменяет свой цвет от красного до оранжево-красного в интервале значений pH 3,1–4,4.

При титровании 0,1 N раствора аммиака 0,1 N раствором хлористоводородной (соляной) кислоты кривая титрования, в противоположность предыдущему случаю, сдвинута в кислую сторону, перегиб ее лежит в диапазоне значений pH от 3,0 до 6,0. Для определения конца реакции в данном случае можно использовать метиловый оранжевый, имеющий интервал пе-

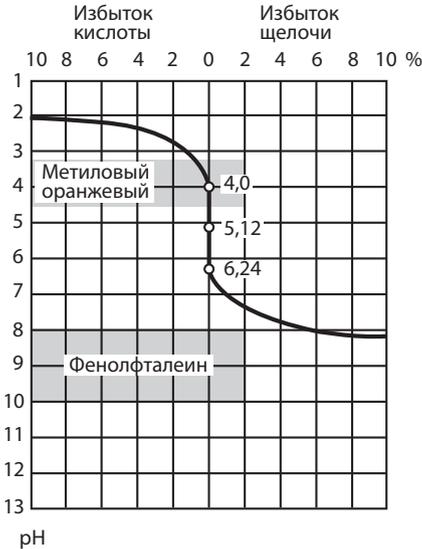


Рис. 7.3. Кривая титрования 0,1 N раствора NH_4OH 0,1 N раствором HCl (или наоборот).

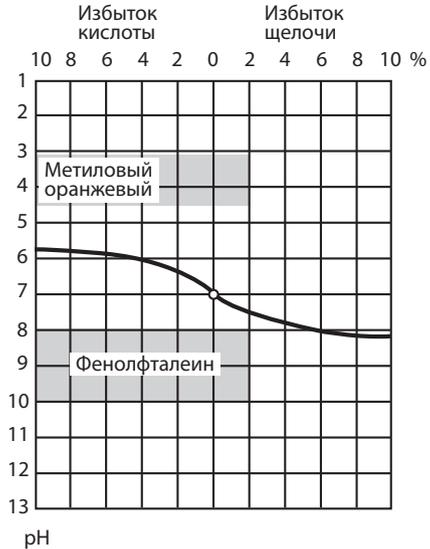


Рис. 7.4. Кривая титрования 0,1 N раствора CH_3COOH 0,1 N раствором NH_4OH (или наоборот).

перехода в диапазоне значений pH 3,1–4,4 (при его отсутствии можно использовать индикатор метиловый красный с интервалом перехода 4,2–6,2).

При выборе индикаторов для титрования следует обращать внимание не только на соответствие между значением pH, при котором происходит заметное изменение цвета раствора индикатора, и pH, при котором устанавливаются эквивалентные отношения, но и на другие свойства индикаторов, в частности, на резкость изменения цвета, способность глаза четко его фиксировать. Визуально хорошо определяется переход окраски раствора от бесцветного до розового цвета (фенолфталеин) и от желтого к оранжевому (метиловый оранжевый). В то же время, визуально значительно хуже регистрируется переход от красного цвета к желто-розовым оттенкам и обесцвечиванию раствора.

В ряде случаев используются смешанные индикаторы. Благодаря содержащимся в них компонентам усиливается резкость перехода цвета раствора. Примером может служить *индикатор Ташира* – раствор, содержащий метиловый красный и метиленовый синий (интервал перехода 4,4–6,2). Метиловый красный в кислой среде имеет красный цвет, в слабокислой – желтый, при совместном использовании с метиленовым синим раствор имеет в кислой среде красно-лиловый цвет, который переходит в зеленый при повышении значения pH. Приготавливается индикатор Ташира из двух отдельных растворов; один из них получают растворением 0,05 г метилового красного в 150 мл этилового спирта с последующим добавлением 100 мл

воды; второй представляет собой 0,1% водный раствор метиленового синего. Смешивают 25 мл первого раствора и 3,0 мл второго. Рекомендуется смесь долго не хранить и готовить свежую по мере необходимости.

На точность получаемого при титровании результата влияет и количество используемого раствора индикатора. Более надежные результаты получаются в том случае, когда количество прибавляемого индикатора невелико, обычно не больше 2 капель на 20–25 мл титруемого раствора. Индикатор, прибавленный в избытке, требует затраты большого количества титрующей жидкости и медленно изменяет окраску. Несмотря на то что в таком случае окраска раствора получается более яркой, перемену ее уловить значительно труднее. При титровании же особенно важно, чтобы изменение окраски индикатора происходило быстро и резко. Только в таком случае легко будет визуально определить момент достижения эквивалентной точки и, следовательно, получить более точные результаты.

На точность результатов оказывает влияние не только количество и качество индикатора, но и порядок титрования. Например, при титровании соляной кислоты едким натром в качестве индикатора можно применять фенолфталеин или метиловый оранжевый. Результаты анализа должны получаться очень близкими по значению; однако в случае применения метилового оранжевого переход цвета от розового к желтому воспринимается глазом с трудом и не может быть точно определен визуально. Для глаза более заметен переход от желтого цвета к розовому, поэтому титрование с метиловым оранжевым производят обычно от щелочи к кислоте, т.е. приливают к щелочи кислоту из бюретки. Наоборот, когда в качестве индикатора используют фенолфталеин, удобнее титровать от кислоты к щелочи, так как при этом легче заметить появление розового цвета, чем его исчезновение. Однако в этом случае порядок титрования не имеет столь большого значения, как при применении метилового оранжевого, поскольку переход окрашенного раствора в бесцветный визуально регистрируется вполне четко.

Для лучшего определения изменения цвета в момент окончания титрования рекомендуется сравнивать цвет исследуемого раствора с цветом так называемых «свидетелей». Раствор-свидетель должен иметь приблизительно тот же объем и тот же состав, что и анализируемый раствор в конце титрования. Количество капель индикатора, прибавленное в обоих случаях, должно быть также одинаковым. Исследуемый раствор в момент окончания титрования должен иметь точно такой же цвет, что и раствор-свидетель. Применение «свидетеля» при титровании позволяет очень легко определить момент нейтрализации.

Технология приготовления рабочих растворов, используемых при анализе методом нейтрализации

При применении метода нейтрализации наиболее часто в качестве рабочих растворов используются соляная кислота и едкий натр, чаще всего 0,1 N концентрации. Известны два способа приготовления растворов с точно известной концентрацией: с помощью точно измеренной навески

исходного вещества и из фиксанала. Первый способ заключается в том, что сначала на аналитических весах взвешивают необходимое количество вещества и растворяют его в определенном объеме дистиллированной воды, пользуясь мерной колбой. Этот способ может быть использован в том случае, если взятое вещество химически чистое, устойчивое на воздухе, не окисляется, не поглощает влагу и углекислый газ воздуха (например, бора – $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, оксалат натрия – $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$, щавелевая кислота – $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Такие реактивы относят к числу исходных веществ.

Раствор, в 1 л которого содержится 1 г эквивалент-вещества, называется одноразовым или (часто) просто нормальным. Точно десятиразовые растворы готовят из химически чистых или специально очищенных (перекристаллизованных или перегнанных) исходных веществ. Желательно, чтобы исходное вещество обладало по возможности большой молекулярной массой. Чем больше навеска, тем меньше относительная ошибка взвешивания. Большую навеску можно получить и за счет увеличения объема раствора (что не всегда удобно). Поэтому, как правило, стараются применять для приготовления растворов вещества с большей молекулярной массой.

Процедура приготовления точных десятиразовых растворов сводится к выполнению следующих операций. Исходное вещество и бюкс предварительно помещают в эксикатор над хлористым кальцием или серной кислотой (с учетом свойств вещества). Рассчитывают десятую часть грамм-эквивалента и взвешивают его на аналитических весах. Над мерной колбой с помощью кольца, укрепленного в штативе Бунзена, подвешивают большую воронку с возможно более широким концом таким образом, чтобы он свободно входил в горло мерной колбы на 5–7 см (свободное пространство между воронкой и внутренней поверхностью горла колбы необходимо для выхода из нее воздуха). Иногда воронку вставляют в горло колбы. В этом случае нужно между горлом колбы и воронкой вставить маленькую деревянную палочку, длина которой должна быть меньше носика воронки (при этом образуются щель для выхода воздуха).

Навеску из бюкса осторожно переносят через воронку в колбу. Воронку и бюкс многократно промывают растворителем (обычно водой), для чего удобно использовать промывалку. Растворитель прибавляют приблизительно до половины объема колбы. Жидкость помешивают до полного растворения вещества, затем объем жидкости в колбе доводят почти до метки, оставляя незаполненным пространство между уровнем жидкости и меткой 0,5–1,0 см. Колбу берут в руки, помещают на уровне глаза и осторожно (что удобно делать пипеткой с узким концом) доводят объем жидкости до метки, при этом нижний мениск жидкости должен точно совпадать с чертой метки. Колбу плотно закрывают притертой или резиновой пробкой, а в тех случаях, когда растворителем служат органические вещества или же когда растворяются летучие препараты – корковой пробкой. После этого раствор еще раз перемешивают.

Готовый раствор переносят в чистую сухую бутылку. Иногда ее из предосторожности ополаскивают 20–30 мл приготовленного раствора, который выливают. Бутылку соединяют с системой для титрования или герметиче-

ски закрывают пробкой. Если используются неисходные вещества, то вначале готовят раствор приблизительно заданной концентрации (навеска берется на технических химических весах, объем растворителя и раствора отмеряют мензуркой), а затем путем титрования устанавливается точная его нормальность. Этот способ применяется, если вещество является не-исходным, например, KMnO_4 , HCl и др.

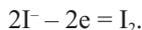
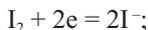
7.2.3. Методы оксидиметрии – титрования с применением окислительно-восстановительных реакций

Перманганатометрия

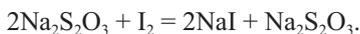
В основе метода лежит окислительно-восстановительная реакция между марганцовокислым калием и каким-либо восстановителем. В качестве титрованного, рабочего раствора применяется раствор перманганата калия. Реакцию осуществляют в кислой среде. Поскольку окисление веществ перманганатом калия при обычных температурных условиях протекает медленно, перед титрованием реагирующие жидкости необходимо нагреть. Индикатором служит сам KMnO_4 , раствор которого имеет фиолетовую окраску, обусловленную присутствием анионов MnO_4^- ; в ходе реакции раствор обесцвечивается вследствие образования катиона почти бесцветного двухвалентного марганца. После образования первых ионов двухвалентного марганца ход реакции окисления–восстановления значительно ускоряется вследствие их аутокаталитического действия. По прекращении обесцвечивания капли добавляемого раствора перманганата калия (избыток которого приводит к окрашиванию исследуемого раствора в розовый цвет) судят о конце реакции. Таким образом, при титровании раствором перманганата калия никакого индикатора не требуется, так как он сам является индикатором.

Йодометрия

В основе йодометрии (йодатометрии) лежит окислительно-восстановительная реакция между свободным йодом и каким-либо восстановителем, в результате которой атомы йода превращаются в ионы. Нейтральный йод может быть получен путем предварительного воздействия на йодиды окислителем:



В первой реакции свободный йод является окислителем, во второй ион I^- является восстановителем. Вещества, играющие роль восстановителей по отношению к свободному йоду, отдавая свои электроны атомам йода, восстанавливают их в бесцветные ионы I^- , например:



Следовательно, имея титрованный раствор йода и зная его объем, израсходованный на титрование определенного объема раствора тиосульфата

натрия ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), легко определить нормальность и титр последнего, и наоборот, имея титрованный раствор $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, можно определить нормальность и титр раствора йода.

Основными рабочими растворами в йодометрии служат растворы тиосульфата натрия и йода. В качестве индикатора применяют крахмал, который в присутствии свободного йода и незначительных следов ионов йода дает синее окрашивание раствора.

Таким образом, при использовании йодометрического метода необходимы три раствора: йода, тиосульфата натрия и крахмала. Следует иметь в виду, что:

- титрованные растворы йода летучи;
- в качестве вещества, способствующего растворению «металлического» йода, следует применять KI (раствор Люголя);
- раствор тиосульфата необходимо готовить на дистиллированной воде, лишенной углекислого газа, поскольку в кислой среде тиосульфат превращается в очень нестойкий продукт – тиосерную кислоту, легко разлагающуюся с выделением атомарной серы.

Для приготовления раствора крахмала 1 г «растворимого» крахмала растирают в ступке с небольшим количеством воды, полученную смесь вливают при помешивании тонкой струей в 1000 мл кипящей воды, кипятят еще несколько минут, а затем колбу закрывают воронкой и оставляют в покое. На следующий день на дне колбы собирается небольшой осадок лопнувших оболочек крахмальных зерен, а над ним остается совершенно прозрачная жидкость.

Эту жидкость разливают в склянки емкостью 30–50 мл, закрывают их при помощи пробок из ваты и стерилизуют в течение 45 мин, для чего склянки помещают в кастрюльку, которую ставят на воду и нагревают. Простерилизованные таким способом растворы крахмала сохраняются месяцами без изменения свойств.

Для стабилизации растворов крахмала удобно использовать концентрированные растворы поваренной соли. Способ приготовления стабилизированного раствора крахмала состоит в следующем: из химически чистой поваренной соли готовят приблизительно 25–30% водный раствор. 100 мл его доводят до кипения; 1 г сухого крахмала взбалтывают в нескольких миллилитрах дистиллированной воды и осторожно, помешивая, вливают в кипящий раствор хлористого натрия.

Приготовленный раствор крахмала испытывают на его пригодность в качестве индикатора: одна капля 0,01 N раствора йода, прибавленная к раствору крахмала, должна окрашивать его в синий цвет. Если окрашивание бурое или фиолетовое, то раствор крахмала не пригоден к употреблению.

Для определения конца реакции в ходе титрования используют 2–3 мл раствора крахмала. Его рекомендуется приливать к раствору йода перед окончанием титрования, когда раствор йода уже станет светло-желтым. Чувствительность йодокрахмальной реакции при комнатной температуре настолько велика, что крахмал окрашивается в синий цвет от присутствия

в растворе 0,00002 N раствора нейтрального йода и весьма небольшого количества ионов йода: чистый йод с крахмалом не дает синего окрашивания, для его появления необходимо присутствие хотя бы следов ионов йода.

Механизм действия крахмала как индикатора заключается в том, что молекулы йода проникают внутрь пространственной структуры молекул крахмала, сближаются, фиксируются по отношению друг к другу и приобретают возможность взаимодействовать между собой (возбуждая электроны на орбитах атомов). Образуется длинная цепь, в которой каждая молекула йода связана с соседней посредством одного электрона. Йод, находящийся в таком состоянии, получил название «синего йода». Такой тип соединения атомов с макромолекулой называется «соединением включения». При большой концентрации йода выход его в раствор из молекул крахмала происходит медленно (образуется относительно прочная структура, что препятствует титрованию).

Качество титрования зависит от соблюдения ряда условий, в том числе освещенности и порядка внесения индикатора: его рекомендуется добавлять лишь после того, как раствор в процессе титрования приобретет слабо выраженную окраску.

7.2.4. Методы осаждения

Сущность метода осаждения заключается в выделении определяемого вещества в виде труднорастворимого осадка. Конец реакции в этих методах определяется или по моменту прекращения выпадения осадка, или при помощи индикаторов. В качестве индикатора можно использовать лишь такие вещества, которые вступают в реакцию после того, как закончится основная реакция. Вступая в реакцию с одним из участвующих в титровании ионов, индикатор вызывает образование осадка иного цвета либо изменение цвета самой жидкости. Зная объемы растворов прореагировавших веществ и концентрацию одного из них, можно определить концентрацию исследуемого вещества. Однако не все реакции осаждения применимы в объемном анализе. Условия их использования следующие: реакция не должна быть обратимой, иначе не будет достигнута полнота осаждения; в ходе ее не должны образовываться пересыщенные растворы и аморфные осадки.

Методы осаждения не имеют широкого применения в объемном анализе. Наиболее часто используют те реакции осаждения, в результате которых образуются труднорастворимые соединения серебра: AgCl , AgBr , AgI , AgCN , AgCNS . Важнейшим реактивом, применяемым в этом случае, является титрованный раствор AgNO_3 . Поэтому метод, основанный на применении этого реактива, называют аргентометрическим. Методы осаждения используются для определения содержания хлоридов в моче, желудочном соке, крови, при анализе питьевых вод и т.д.

Для количественного определения галогенов и серебра наиболее часто пользуются методами Мора и Фольгарда, представляющими собой модификацию метода Гей-Люссака.

Метод Мора основан на том, что анионы галогенов (обычно хлора) дают с ионами серебра практически нерастворимые соединения, выпада-

ющие в осадок. В качестве рабочего, титрованного раствора употребляется AgNO_3 . Для определения конца реакции пользуются хроматом калия K_2CrO_4 . В этом случае в водной фазе протекают две реакции:



Обе получающиеся соли – AgCl и Ag_2CrO_4 – труднорастворимы в воде, но при добавлении AgNO_3 к раствору, содержащему кроме ионов хлора также хромат-ионы, первоначально образуется AgCl и только потом, когда ионы Cl практически полностью будут удалены из раствора, начинается образование Ag_2CrO_4 . В этот момент цвет осадка начинает меняться от белого или желтого на красноватый, по появлению которого судят о том, что реакция между ионами хлора и серебра закончилась.

Метод Фольгарда основан на реакции образования нерастворимого в воде роданида серебра AgCNS , имеющего белый цвет. В качестве рабочих, титрованных растворов применяются раствор нитрата серебра (AgNO_3) и раствор роданида калия (KCNS). В отличие от метода Мора, метод Фольгарда может применяться как в нейтральной, так и в кислой среде. По этой причине он получил большее распространение, чем метод Мора.

7.2.5. Метод комплексообразования

Этот метод основан на образовании прочного комплексного соединения между ионами определенного вещества и комплексообразователем. В качестве такового наиболее широко используется трилон Б (имеющий множество синонимов: ЭДТА, хелатон III, версен и др.). Трилон Б, так же как и другие комплексообразователи, образует прочные растворимые в воде внутрикомплексные соли с различными двухвалентными катионами. Конец реакции определяется путем прибавления специального индикатора, образующего с двухвалентными катионами окрашенное соединение. По мере связывания в комплексное соединение определяемых ионов их концентрация постепенно убывает. Окраска раствора в точке эквивалентности обусловлена цветом индикатора (мурексид, эриохромовый черный Т и др.).

7.3. Газовый анализ

Для объемного анализа используется только одна из разновидностей газового анализа – определение объема газа, образовавшегося при разрушении какого-либо химического соединения. Примером подобного вида анализа является определение мочевины по Борозину (с использованием аппарата Коварского).

Глава 8. ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО АНАЛИЗА

Оптический количественный анализ базируется на регистрации изменений, происходящих с лучом света при прохождении его через исследуемый раствор: интенсивности поглощения (абсорбционная фотометрия); свечения молекул и атомов вещества (флуориметрия, пламенная фотометрия); отклонения от первоначального направления распространения монохроматического светового потока (рефрактометрия); изменениях угла вращения плоскополяризованного света (поляриметрия).

В соответствии с этим оптические методы количественного анализа подразделяются на:

1. Рефрактометрию.
2. Поляриметрию.
3. Фотометрию:
 - абсорбционную спектрофотометрию, в том числе нефелометрию (собственно нефелометрию и турбидиметрию, в частности все более широко используемую в настоящее время иммунотурбидиметрию), атомно-абсорбционную фотометрию;
 - эмиссионную фотометрию, в том числе флуориметрию, пламенную фотометрию, атомно-эмиссионную спектрометрию.

Метод *рефрактометрии* состоит в определении содержания вещества в растворе путем измерения показателя преломления света. Ранее этот метод применялся в основном для установления содержания общего белка в плазме (сыворотке) крови. Поскольку преломляющая способность сыворотки зависит от содержания не только белков, но и небелковых компонентов, метод дает ложно завышенные результаты.

В основе *поляриметрии* лежит свойство прозрачных веществ вращать плоскость поляризованного луча света.

Известно, что естественный, неполяризованный луч представляет собой совокупность волн, колебательные движения которых равномерно распределены вдоль множества плоскостей, проходящих через линию распространения луча. Если луч сложного (белого) света пропустить через пластинку поляроида или призму Николя (кальцит), то каждая волна этого луча разложится на составляющие, направленные по взаимно перпендикулярным осям поляроида (рис. 8.1). Поскольку поляризующий материал обладает способностью поглощать одну из этих составляющих, электромаг-

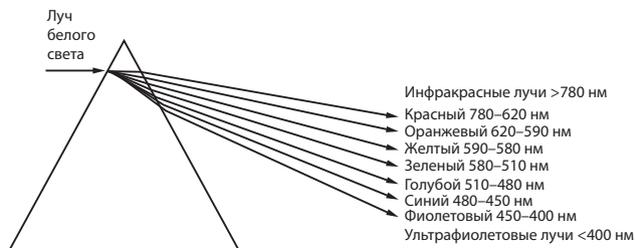


Рис. 8.1. Разложение сложного (белого) луча света призмой.

нитные колебания в выходящем луче света происходят только в одной плоскости, поэтому он называется плоскополяризованным. Если на его пути поместить второй поляризатор, то через него подобным же образом пройдет только та составляющая луча, плоскость колебаний которой параллельна оси поляризатора. Поскольку в луче поляризованного света колебания совершаются только в одном направлении, при повороте второго поляризатора (называемого анализатором) на 90° мощность светового пучка падает до нуля. Очевидно, поляризованный луч света будет проходить через призмы Николя только в том случае, если их оси находятся в одной плоскости.

Ранее в клиничко-лабораторной практике широко применялся поляриметр, приспособленный для определения концентрации растворов глюкозы и других углеводов (так называемый «сахариметр»).

Более 80% используемых в КДЛ методов биохимического исследования базируется на принципе абсорбционной фотометрии. Для понимания особенностей проведения этого вида фотометрического анализа требуются определенные сведения из области природы света и его взаимодействия с веществом.

8.1. Свет и его взаимодействие с веществом

Световые волны – одна из форм электромагнитного излучения, характеризуется частотой (ν), длиной волны (λ) и постоянной скоростью распространения в вакууме (c , 300 000 км/с). Эти величины связаны одна с другой следующим отношением:

$$\nu = \frac{c}{\lambda}.$$

При взаимодействии света с веществом могут иметь место два случая:

1. Свет, проходя через вещество, поглощается очень слабо, так как вещество достаточно прозрачно. Отношение скорости света в вакууме к его скорости в данном веществе определяет показатель преломления этого вещества. Поскольку он во многом зависит от длины волны, белый свет при прохождении через прозрачную призму разлагается на цвета

спектра (по длинам волн). По обе стороны от его видимой части находятся невидимые инфракрасные и ультрафиолетовые лучи; вещество поглощает значительную часть световой энергии.

- Согласно квантовой теории, энергия света поглощается порциями, квантами. При этом отдельные молекулы, обладающие совокупностью близко расположенных один от другого энергетических уровней, могут, поглощая кванты света, переходить с более низкого энергетического уровня на более высоких. Оказавшись в таком «возбужденном» состоянии, они способны флуоресцировать или претерпевать фотохимические изменения. В результате «возбуждения» сложных атомов испускаются электромагнитные волны самых разнообразных частот, образующих спектр испускания.

В зависимости от состояния излучающего тела спектр может быть сплошным или линейчатым. Сплошной спектр испускания дает раскаленная вольфрамовая нить, линейчатый спектр имеют газы, пары ртути (рис. 8.2).

Вещество поглощает те длины волн проходящего света, которые само способно излучать в определенных условиях (спектр поглощения).

Электронные спектры молекул обычно охватывают область электромагнитных излучений с длиной волны от 100 до 800 нм. Видимая область, воспринимаемая человеческим глазом, соответствует интервалу длин волн от 400 до 760 (800) нм. Интервал между 200 и 400 нм называется ближней ультрафиолетовой областью, а область длин волн меньше 200 нм носит название далекой, или вакуумной-ультрафиолетовой области.

Указанный диапазон электромагнитных излучений создается при «возбуждении» электронов, располагающихся на внешнем электроном слое. В случае, если «возбуждаются» электроны внутреннего слоя (например, потоком быстро летящих электронов в рентгеновской трубке), то испускаются рентгеновские лучи (с длиной волны от 0,001 до 1 нм).

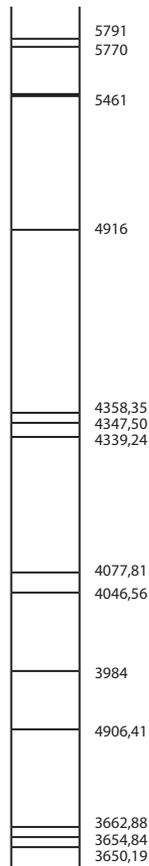


Рис. 8.2. Спектр испускания ртути.

8.2. Абсорбционная фотометрия

Абсорбционный фотометрический анализ основывается на физическом свойстве веществ избирательно поглощать монохроматический поток све-

товой энергии. Характер и степень светопоглощения раствора оказывают влияние на окраску, которая, в свою очередь, непосредственно связана с концентрацией вещества в растворе.

Определение интенсивности потока световой энергии, прошедшего через исследуемый раствор, всегда производится относительно раствора сравнения, при приготовлении и исследовании которого применяются растворитель и кюветы, аналогичные используемым в опытном образце. Вследствие этого поглощение светового потока стенками кюветы и отражение его в окружающую среду кюветой и растворителем можно не принимать во внимание.

Зависимость между ослаблением интенсивности параллельно направленного монохроматического светового потока, толщиной поглощающего слоя и концентрацией выражается объединенным законом Бугера–Ламберта–Бера:

$$I_t = I_0 \cdot 10^{\varepsilon l c},$$

где I_t – интенсивность света, прошедшего через раствор; I_0 – интенсивность падающего на раствор света; l – толщина слоя раствора (см); c – молярная концентрация поглощающего свет вещества; ε – коэффициент поглощения (абсорбции, экстинкции), являющийся коэффициентом пропорциональности и показывающий, какая часть светового потока поглощается раствором толщиной 1 см. Логарифм отношения I_0/I_t представляет собой величину абсорбции, или оптическую плотность вещества (раствора), обозначаемую буквой A (иногда встречается ранее использовавшееся обозначение оптической плотности: D , E):

$$A = \lg \frac{I_0}{I_t} = \varepsilon l c.$$

Оптическая плотность равна ε , если концентрация раствора составляет 1 моль/л и толщина поглощающего свет слоя раствора составляет 1 см.

Отношение интенсивности монохроматического потока излучения, прошедшего через исследуемый объект, к интенсивности первоначального светового потока именуется пропусканием, или прозрачностью (светопроницаемостью) раствора и обозначается буквой T . Обычно величину T выражают в процентах:

$$T (\%) = \frac{I_t}{I_0} \cdot 100.$$

Светопроницаемость раствора дает представление о том, какая часть светового потока пропускается через раствор, а оптическая плотность характеризует долю света, поглощаемого им. Характерно, что оптическая плотность показывает величину светопоглощения безотносительно к абсолютной вели-

чине интенсивности падающего на кювету монохроматического светового потока.

Прямо пропорциональная зависимость между величинами, характеризующими процесс абсорбции, толщиной поглощающего слоя и концентрацией вещества в растворе может быть получена только при постоянном молярном коэффициенте поглощения. Величина оптической плотности (A) является функцией длины волны и не зависит от концентрации вещества в растворе. По этой причине именно абсорбция (но не светопропускание) характеризует индивидуальные свойства поглощающего вещества.

Весьма важное условие получения надежных результатов при выполнении абсорбционной фотометрии – монохроматичность светового потока. Для этой цели наиболее часто применяются *светофильтры*.

Наряду с обычными фильтрами (окрашенными стеклами), недостатком которых является широкая полоса пропускания, все более широко применяются так называемые интерференционные светофильтры. Они представляют собой обычно стеклянную пластинку, на которую нанесены две (или более) полупрозрачные металлические пленки, разделенные слоем прозрачного вещества. Расстояние между металлическими пленками определяет длину волны проходящего света.

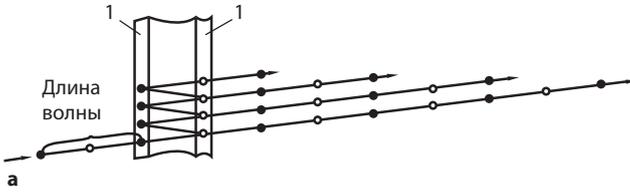
Действие светофильтра основывается на принципе интерференции. Типичная кривая пропускания светофильтра показана рисунке 8.3, на котором представлен поперечный разрез интерференционного светофильтра, показывающий, что часть падающего излучения подвергается многократному внутреннему отражению слоями серебра. Лучи, исходящие вправо от пластинки, будут усиливать друг друга только при длинах волн, вдвое больших, чем расстояние между слоями серебра. Для других длин волн лучи будут ослаблять друг друга.

Как видно, в отличие от обычного, интерференционный светофильтр пропускает практически монохроматический световой поток. Интерференционные светофильтры, помимо того, что выделяют узкие полосы с относительно высоким пропусканием, обладают большой термоустойчивостью, что связано с тем, что они не поглощают, а отражают не прошедший через них свет. Благодаря этому свойству их можно применять с высокоинтенсивными источниками света.

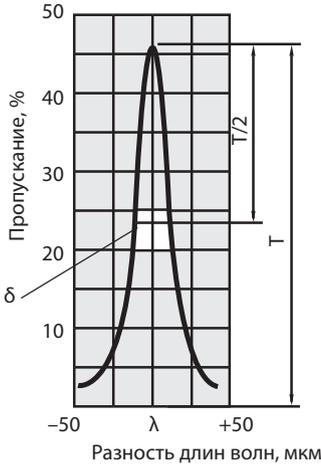
Самым лучшим способом выделения узких спектральных интервалов является применение *монохроматоров*, устроенных на базе призмы или дифракционной решетки. При использовании источника света, излучающего сплошной спектр, такие устройства позволяют получать практически любую длину волны.

В качестве основных *приемников излучения* в ультрафиолетовой, видимой и ближней инфракрасной областях спектра применяют фотоэлементы, фотосопротивления и фотоумножители.

Принцип действия фотоэлементов основан на явлении фотоэффекта, которое заключается в том, что при действии света вещество (представленное обычно одновалентным металлом, например, цезий и др.) испуска-



а



б

Рис. 8.3. Устройство (а) и характеристика (б) типичного интерференционного фильтра: l – полупрозрачная пленка (толщиной в половину длины световой волны); λ – длина волны в максимуме; T – пропускание в максимуме; δ – половина ширины.

ет электроны, которые в безвоздушном пространстве лампы устремляются со стороны фотокатода к аноду.

На практике выделяют два типа фотоэлементов: с внешним и внутренним фотоэффектом. Фотоэлементы с внешним фотоэффектом могут быть вакуумными и газонаполненными. Вакуумные фотоэлементы обладают значительно меньшей интегральной чувствительностью (мкА/лм), чем газонаполненные, так как последние вызывают усиление фототока вследствие ионизации газа фотоэлектронами.

Освобождение электронов происходит не только в металлах, но и в полупроводниках, что увеличивает их электропроводность при освещении. Фотоэлементы с внутренним фотоэффектом носят название фотосопротивлений.

Широкое применение нашли фотоэлементы с запирающим слоем, которые, обладая высокой чувствительностью, не требуют внешнего источника напряжения.

Фотоумножитель – достаточно совершенный тип фотоэлектрического приемника света высокой чувствительности. Он включает фотоэлемент с внешним фотоэффектом, дающий фототок, который усиливается вследствие вторичной электронной эмиссии. Вторичная электронная эмиссия заключается в том, что при ударе о поверхность вещества падающий элек-

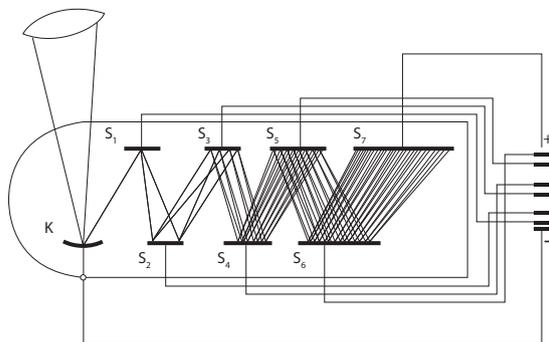


Рис. 8.4. Принципиальная схема электронного фотоумножителя.

трон выбивает из него несколько новых электронов, называемых вторичными. Схема фотоумножителя приводится на рисунке 8.4.

Наиболее широко фотоумножители используются в приборах для эмиссионной фотометрии (флуориметры и др.).

8.3. Оптические измерительные приборы

К оптическим измерительным приборам, используемым в клинической лабораторной диагностике, относятся:

- фотометры и спектрофотометры;
- денситометры, предназначенные для сканирования, т.е. количественного определения содержания разделенных на носителях (хроматографической бумаге, пленках ацетатцеллюлозы, геле, пластинах с тонким слоем силикагеля) веществ;
- нефелометры и турбидиметры, позволяющие судить о содержании взвешенных в объеме жидкости частиц по интенсивности светорассеяния (используются, в частности, для оценки выраженности коллоидно-осадочных реакций);
- флуориметры, применяемые для определения концентрации сложных органических веществ (витаминов, гормонов и др.) путем измерения интенсивности флуоресценции (в том числе поляризационные);
- люминометры, измеряющие количество излученного света (светосумму) и позволяющие на основании этого показателя судить о содержании в биологических жидкостях некоторых веществ (ацилгидроперекиси и др.), при разложении которых ионами металлов переменной валентности либо другими реактивами происходит кратковременное излучение света;
- пламенные фотометры, используемые для измерения интенсивности светоизлучения (эмиссии) внесенных в пламя ионов металла;

- атомные абсорбциометры, позволяющие определять содержание ионов металлов (в том числе относящихся к микроэлементам) в разных биологических жидкостях; как и при использовании пламенной фотометрии, анализируемый раствор вводится в пламя в виде аэрозоля с помощью распылителя. Однако измеряется не излучение, а поглощение монохроматического светового потока атомами исследуемого элемента. Метод позволяет определять содержание элементов, находящихся в пламени в виде свободных атомов; (атомно-абсорбционные спектрофотометры в КДЛ поставляет, в частности, фирма «CCS Services», Швейцария);
- атомно-эмиссионные многоканальные спектрометры. Методика исследования на приборах такого типа является следующей. Подготовленная к анализу проба помещается в камеру образца, где под действием электрического разряда вещество испаряется и его атомы возбуждаются. Излучаемый атомами световой поток специальной оптической системой направляется в полихроматор, где происходит его разложение по спектральным составляющим. Регистрация спектра осуществляется с помощью оптического многоканального анализатора, что позволяет по оценке интенсивности или площади спектральных линий установить содержание 10 и более химических элементов в одной пробе.

Фотометры. Для оценки количественного содержания вещества в исследуемой биологической жидкости (либо ткани) оценивают показатели оптической плотности (но не пропускания!) анализируемых растворов, несмотря на то, что между значениями абсорбции и пропускания имеется определенное соответствие. Так, если оптическая плотность раствора соответствует 1, то через слой его проходит 10% интенсивности падающего на него светового потока (остальные 90% поглощаются). Для большинства современных автоматизированных приборов это крайне большая величина, превышение которой не гарантирует получение надежных результатов измерения. Во всех выпускавшихся ранее фотометрах наибольшая точность измерения достигалась при значениях абсорбции около 0,3 (в этом случае через раствор проходит половина падающего на него светового потока); по мере ее снижения точность измерения, а следовательно и достоверность полученных результатов, уменьшались.

Значение абсорбции (оптической плотности) – это произведение величины концентрации на толщину слоя раствора. Практически одинаковые показатели экстинкции получают при фотометрии исходного раствора в кювете с длиной оптического пути 1 см и того же раствора, предварительно разведенного в 2 раза, но в кювете с длиной оптического пути 2 см. К повышению чувствительности измерения приводит удлинение оптического пути за счет сокращения поперечного сечения кюветы (при этом объем раствора остается прежним). Однако возможности этого приема фотометрии ограничены, так как чем уже и длиннее кювета, тем большие требования предъявляются к фокусировке и юстировке луча света. Поэтому

большинство клинико-биохимических исследований рассчитано на проведение фотометрий в кювете с длиной оптического пути 1 см; значительно реже используется кювета с длиной оптического пути 0,5 см, а кюветы с длиной оптического пути 2 см – практически никогда. *Следует стремиться к тому, чтобы фотометрия осуществлялась в кюветах с толщиной слоя 10 мм*, так как доказано, что этот режим фотометрии самый правильный. Повышение чувствительности фотометрического исследования обычно достигается путем использования особых по конструкции (узких и длинных) кювет, при применении которых удаётся значительно уменьшить объем фотометрируемого раствора. Однако нужно иметь в виду, что при уменьшении объема раствора до величины меньше 0,5 мл точность фотометрического измерения снижается и возрастает вероятность появления ошибки в результатах определения. В большинстве современных биохимических анализаторов используются кюветы с длиной оптического пути 1 см при объеме внесенной в них жидкости 0,5–1,0 мл.

Благодаря использованию проточных кювет точность фотометрии значительно возрастает, поскольку при этом отпадает необходимость каждый раз вынимать кювету для заполнения ее новой порцией исследуемого раствора, что не только сделало процедуру измерения более быстрой и удобной, но и повысило точность фотометрии.

Фотометрические приборы представлены обычными фильтровыми фотометрами и спектрофотометрами, в которых отдельные участки спектра выделяют при помощи призм или дифракционных решеток; это позволяет установить любую длину волны в весьма большом диапазоне (спектрофотометры типа СФ-4, СФ-26, СФ-46 производства «ЛМО», Россия; РВ-1251-С производства «СОЛАР», Россия, и др.).

При выполнении клинико-биохимических исследований фотометрия чаще всего проводится в диапазоне длин волн 400–700 нм. Особенно широко распространена регистрация содержания никотинамидадениндинуклеотида (восстановленного) НАД·Н₂ и НАДФ·Н₂ по поглощению света с длиной волны 340 нм, т.е. в ближнем ультрафиолетовом диапазоне. Для фотометрических измерений в видимой и ближней инфракрасной области пригодны кюветы из обычного стекла; для регистрации оптической плотности раствора в ближней ультрафиолетовой области нужны кюветы из специальных сортов стекла, так называемого увиолевого, в коротковолновой ультрафиолетовой области – только кюветы из кварца и сапфира.

При выполнении фотометрических исследований оценку результатов чаще всего производят тремя способами:

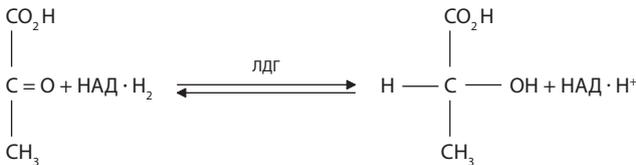
- по конечной точке (измерение в конечной точке);
- по фиксированному времени (примером может служить прямой псевдокинетический метод Яффе);
- кинетическим (кинетическое измерение).

Определение *по конечной точке* состоит в учете образования продукта за некоторое (порой относительно длительное) время инкубации. Для расчета результатов требуется параллельное проведение стандартной пробы.

Способ исследования *по методологии фиксированного времени* основан на установлении количества нарабатываемого (расходуемого) продукта за определенный промежуток времени с последующим расчетом концентрации (активности) по стандарту. Он осуществляется на фотометрах с обычными светофильтрами или спектрофотометрах, оснащенных термостатированным кюветным отделением.

Кинетический метод исследования, как и предыдущий, является ферментативным. Выполняется с применением строго монохроматизированного светового потока (фотометров с интерференционными светофильтрами или спектрофотометров) и использованием термостатируемой кюветы (при температуре 25, 30 и, чаще всего, 37°C). После старта реакции через определенный интервал времени (например, 60 с) трехкратно определяют изменение оптической плотности, из полученных значений рассчитывают среднюю величину и с использованием соответствующих температуре инкубации коэффициентов производят расчет с выражением результатов в ЕД/л (кат/л) и их производных.

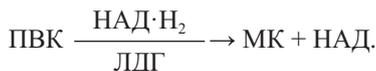
Методы второй и особенно третьей группы обладают рядом существенных преимуществ перед одноточечными (конечной точки): их выполнение занимает мало времени, они не связаны с применением агрессивных жидкостей, точны, позволяют получать достоверные результаты (в особенности при исследовании активности ферментов, когда, к тому же, не требуется разводить в определенное количество раз сыроворотку крови для предотвращения эффекта «разбавления» при гиперферментемии). Подавляющее их большинство базируется на использовании *оптического теста Варбурга*, состоящего в ферментативном (с участием лактатдегидрогеназы – ЛДГ) превращении НАДН в НАД (и наоборот), существенно отличающихся величиной оптической плотности при длинах волн 340, 334 и 365 нм.



Этот принцип исследования положен, в частности, в основу ферментативного, с участием ЛДГ, определения пировиноградной (ПВК) и молочной (МК) кислот (по катализируемой этим энзимом прямой и обратной реакции).

При определении содержания разнообразных субстратов и их метаболитов, а также активности многих ферментов реакции стараются провести таким образом, чтобы они «замыкались» на превращении ПВК в МК (и наоборот) с участием ЛДГ и НАД (НАД·H₂). Так, в методике установления активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) используются следующие реакции:

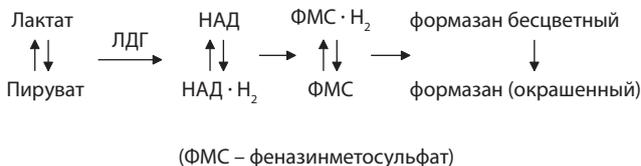
Аланин + α -кетоглутаровая кислота \longrightarrow ПВК + глутаминовая кислота



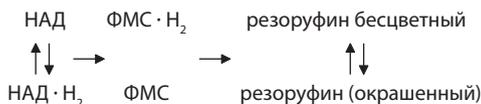
Наряду с ЛДГ находит применение и малатдегидрогеназа (МДГ).

В настоящее время с использованием оптического теста Варбурга определяется активность более 100 ферментов.

Чтобы избежать необходимости осуществлять измерения в ультрафиолетовом световом потоке (что выполнимо лишь с применением специальных дорогостоящих анализаторов), в реакционную смесь добавляют вещество, приобретающее способность излучать свет в видимой области спектра. Образующиеся в результате ферментативной реакции $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ и $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$ восстанавливают индикатор формазан с образованием окрашенного продукта, количество которого легко определить колориметрически. Примером такого подхода может служить определение активности ЛДГ:



Еще более удобны прямые колориметрические методы с использованием тимо-НАД ($\text{ТНАД} \cdot \text{H}_2$) и тимо-НАДФ ($\text{ТНАДФ} \cdot \text{H}_2$). При восстановлении этих производных они окрашиваются в желтый цвет и могут быть определены в коротковолновой области спектра (398 нм). Ход ферментативных реакций можно регистрировать методом флуориметрического анализа (в 100–1000 раз более чувствительным, чем колориметрический). Они обычно основаны на собственной флуоресценции пиридинкоферментов ($\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ и $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$). Однако благодаря использованию флюороэсцирующих индикаторов (флуоресцентной редоксиндикаторной цепи) чувствительность этих методов анализа становится еще выше.



В приведенной схеме резорурфин (окрашенный продукт) флуоресцирует в 100 раз сильнее $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$.

Применяя бактериальную люциферазу, становится возможным получить продукт, флуоресценция которого в 1000 раз превышает флуоресценцию НАД·Н₂.

8.4. Нефелометрический (турбидиметрический) анализ: иммунотурбидиметрия, лазерная нефелометрия, агрегатометрия, коагулометрия

Нефелометрия – это вид оптического анализа, в основе которого лежит измерение интенсивности светового потока, рассеиваемого в направлении, почти перпендикулярном направлению падающего пучка. Светорассеяние имеет место в том случае, если размеры встречаемых на пути света частиц превышают длину волны электромагнитного излучения. Чем мутнее дисперсная система, тем больше она рассеивает света и тем меньше его пропускает. В определенных условиях наблюдается пропорциональная зависимость между содержанием частиц во взвеси (либо капелек в эмульсии) и ее мутностью.

Иначе говоря, принцип нефелометрии заключается в измерении количества света, рассеиваемого частицами в жидкой среде. Оптимальные условия применения этого метода состоят в использовании растворов низкой концентрации.

Турбидиметрия представляет собой широко используемую в клинико-лабораторной практике разновидность нефелометрии. При турбидиметрии оценивается непрозрачность фотометрируемой системы по измерению степени абсорбции проходящего через нее светового потока. Поглощение монохроматического светового потока происходит в случае, если длина волны электромагнитного излучения значительно меньше, чем размеры частиц. Турбидиметрия – менее чувствительный метод по сравнению с собственно нефелометрией, поскольку для турбидиметрического анализа используются среды с относительно большим содержанием частиц в единице объема.

Если при использовании собственно нефелометрии падающий на кювету монохроматический световой поток и приемник излучения (фотоэлемент) находятся под прямым (или близким к нему) углом, то при применении турбидиметрии источник света и приемник излучения располагаются на одной линии. Это и позволяет использовать многие фотометры в качестве и колориметров, и нефелометров (такowymi являлись ранее выпускавшиеся двухлучевые фотометры ФЭК-56, ФЭК-Н-57 и др.). В приборах этого типа имеется специальный светофильтр для нефелометрических определений с максимумом пропускания около 590 нм.

В настоящее время собственно нефелометрия в клинической лабораторной диагностике используется редко, она выполняется с применением дорогостоящих приборов, например, лазерных нефелометров.

В последние годы турбидиметрический анализ находит все более широкое применение в лабораторной практике. Если раньше он использовался в основном для оценки проб коллоидной устойчивости (тимоловая, цинк-сульфатная, проба Вера, Бурштейна и Самая), то в настоящее время – для исследования системы свертывания крови (коагулометры, агрегометр производства компания «СОЛАР», Белоруссия, и др.). По анализу агрегатограмм можно судить об изменениях структурно функциональных свойств тромбоцитов, характерных для определенных заболеваний.

В практику клинико-лабораторного исследования все более широко внедряются технологии иммунотурбидиметрических исследований, направленных на оценку иммунного статуса организма и установление содержания в плазме (сыворотке) крови так называемых специфических белков (в том числе белков острой фазы), что имеет большое значение для диагностики, оценки эффективности лечения и прогноза различных заболеваний внутренних органов.

Методы лазерной нефело- и иммунотурбидиметрии основываются на регистрации протекающей в жидкой среде реакции «антиген–антитело», сопровождающейся образованием соответствующего преципитата. О ходе реакции можно судить как по установлению степени мутности системы в конечной точке (т.е. через определенный промежуток времени – статическая нефелометрия), так и кинетически, по динамике нарастания этих эффектов.

Все определяемые методом нефелометрии (иммунотурбидиметрии) вещества представляют собой белки, содержащиеся в основной внеклеточной жидкости – плазме (сыворотке) крови – в относительно большом количестве. Среди них:

- факторы гуморального иммунитета: иммуноглобулины А, G, M; C3 и C4 компоненты комплемента, χ - и λ -цепи, пропердиновый фактор В;
- специфические белки (белки острой фазы): α_1 -кислый гликопротеин, α_1 -антитрипсин, α_2 -макроглобулин, β_2 -микроглобулин, церулоплазмин, гаптоглобин, С-реактивный белок, трансферрин, ревматоидный фактор, орозомукоид, преальбумин;
- апопротеины (белковый компонент атеро- и антиатерогенных липопротеинов): апопротеин А1, апопротеин В;
- другие белки плазмы (альбумин);
- белки мочи (микроальбумин).

Таким образом, нефелометрический анализ в настоящее время включает в себя многие виды инструментальных лабораторных исследований, а именно: иммунотурбидиметрию, лазерную нефелометрию, агрегатометрию, коагулометрию.

В 1969–1973 гг. Ritchie и соавт. разработали систему автоматизированной нефелометрии, с помощью которой исследуется содержание белков не только в плазме (сыворотке) крови, но и в моче, спинномозговой, суточной и амниотической жидкостях.

Нефелометры, учитывающие конечную точку реакции, производятся, например, фирмой «Behringwerke AG» (Германия), в них применяется рассеяние света исследуемым субстратом. Обычно процесс анализа состоит в том, что реагенты смешивают в кювете, выдерживают в течение 30–60 мин (в зависимости от типа исследуемого белка), после чего считывают показания нефелометра.

Иммунотурбидиметры, выпускаемые фирмой «Behringwerke AG» (Германия) и др., в отличие от лазерных (с использованием другого мощного источника света) нефелометров, представляют собой небольшие настольные приборы, в которые установлена специальная программа определения перечисленных белков по учету светопоглощения при длине волны 360 нм.

Другой подход к оценке реакции используется в приборах фирмы «Beckman Coulter» (Австрия) и др. Он состоит в учете результата на уровне максимума скорости реакции, а не в конечной ее точке.

Осуществление иммунохимических исследований возможно также на некоторых полуавтоматических анализаторах (типа ФП-901 производства компании «Labsystems», Финляндия) и полностью автоматических анализаторах, допускающих возможность проводить оценку результатов по нелинейной калибровке (например, «Cobas Mira» производства «F. Hoffman-La-Roche Ltd.», Швейцария).

Используемые в настоящее время в медицинской практике наборы реагентов для выполнения иммунотурбидиметрических исследований позволяют определять:

1. *Факторы гуморального иммунитета:*

- иммуноглобулины А, G, М, Е;
- компоненты комплемента С3 и С4;
- χ - и λ -легкие цепи;
- пропердиновый фактор В.

2. *Специфические белки острой фазы:*

- α_1 -кислый гликопротеин;
- α_1 -антитрипсин;
- α_2 -макроглобулин;
- β_2 -микроглобулин;
- церулоплазмин;
- гаптоглобин;
- С-реактивный белок;
- трансферрин;
- ревматоидный фактор;
- орозомукоид;
- преальбумин.

3. *Апопротеины:*

- апопротеин А1;
- апопротеин В.

4. *Другие белки плазмы:*

- альбумин.

5. Белки мочи:

- микроальбумин.

Одним из хорошо зарекомендовавших себя при выполнении коагулологических исследований турбидиметром является гемокоагулометр CGL 2110 производства компании «СОЛАР» (Белоруссия).

Применяемые для выполнения клинико-лабораторных исследований *лазерные анализаторы агрегации* производства НПФ «Биола» (Россия) используют традиционный метод измерения агрегации тромбоцитов – по регистрации светопропускания способом турбидиметрии, предложенным G.V.R.Vorn и Y.R.O’Vrien. Метод основан на учете изменений светопропускания обогащенной тромбоцитами плазмы. Это позволяет исследовать не только агрегацию, но и изменение формы тромбоцитов, а также регистрировать кинетику образования малых агрегатов в реальном времени, измерять концентрацию тромбоцитов и других клеток. В комплекте с анализатором поставляется программное обеспечение. Модель лазерного агрегометра Биола 230 LA производства НПФ «Биола» (Россия) используется для диагностики состояния тромбоцитарного звена гемостаза при различных заболеваниях, а также для диагностики врожденных и приобретенных нарушений гемостаза (в том числе болезни Виллебранда), оценки эффективности лечения антитромбоцитарными препаратами, жизнеспособности тромбоцитарной массы при переливании крови, изучения взаимодействия между белками или липидными комплексами, выполнения токсикологических исследований.

Последние достижения в области компьютерных и лазерных технологий нашли воплощение в спермоанализаторах. Спермоанализаторы НПФ «Биола» (Россия), например SFA-500, используются для анализа основных показателей фертильности спермы. Эти лазерные оптические анализаторы с компьютерной обработкой и отображением получаемых результатов, предназначенные для исследования подвижности и концентрации сперматозоидов в неразбавленном эякуляте, позволяют быстро и точно диагностировать основные нарушения репродуктивной функции у мужчин и определить тактику лечения пациента.

Принцип турбидиметрии используется и для оценки системы гемостаза, в том числе с применением наборов реагентов, производимых фирмой «Технология стандарт» (Россия).

8.5. Эмиссионный спектральный анализ (флуориметрия, пламенная фотометрия, атомно-эмиссионная фотометрия, люминометрия)

В клинической химии в последние годы наряду с методами абсорбционного молекулярного спектрального анализа все более широко применяются методы эмиссионного анализа (эмиссия – излучение), основанные на способности многих органических веществ (фенолов, ароматических аминов,

полициклических соединений, сопряженных полиаминов и др.) люминесцировать, т.е. давать характерный спектр испускания (светиться) при освещении исследуемого образца ультрафиолетовым или другим коротковолновым излучением (*флуориметрия*), а также способности ряда простых веществ (металлов: макро- и микроэлементов) испускать свет при нагревании анализируемого образца до высокой температуры (*пламенная фотометрия, атомно-эмиссионный спектральный анализ*). Швейцарской фирмой «CCS Services» поставляется оборудование для атомного эмиссионного анализа, в том числе для подготовки проб к его выполнению.

Приборы, использующиеся для измерения концентрации вещества по интенсивности его флуоресценции (т.е. вторичного излучения, возникающего в ответ на облучение анализируемого вещества светом с более короткой длиной волны, обычно ультрафиолетовым), именуются *флуориметрами*. В отличие от абсорбционных фотометров (фотоэлектроколориметров, автоматизированных фотометров), в них всегда используется источник ультрафиолетового света, монохроматизация световых потоков (возбуждение и испускание) достигается за счет применения интерференционных светофильтров или монохроматоров. Исследуемый раствор вносится в кварцевую кювету, приемник излучения (фотоумножитель, ФЭУ) располагается под прямым углом к возбуждающему флуоресценцию монохроматическому световому потоку, а возбуждаемый в ФЭУ сигнал подается либо непосредственно на чувствительный гальванометр, либо, после предварительного усиления, – на стрелочный или цифровой прибор и затем на печатающее устройство.

Методы этой группы характеризуются исключительно высокой специфичностью и избирательностью благодаря применению в большинстве из них процедуры предварительного отделения анализируемого продукта от других, обладающих близкой химической структурой; преобразованию его в соединение, отличающееся более высоким квантовым выходом (что осуществляется, например, в тригидроксиндоловом методе определения катехоламинов); использованию такой узкой области ультрафиолетового (монохроматического) света, в которой возбуждается флуоресценция лишь интересующего исследователя метаболита, а также благодаря существенным различиям в максимумах спектров возбуждения и флуоресценции продуктов с несколько разной химической структурой и весьма малой вероятности того, что в содержимом кюветы флуориметра имеются два или более вещества, способных подвергаться свечению в выбранном режиме возбуждения флуоресценции. Применение же для регистрации свечения ФЭУ и усилителей «снимаемого» с них сигнала придает методам флуоресцентного анализа высокую чувствительность.

Лабораторные флуориметры нового поколения позволяют осуществлять все виды клиничко-биохимических исследований методами ультра- и субмикрoанализа, в том числе и те, которые не могут быть выполнены с применением абсорбционной фотометрии. Они содержат набор светофильтров, позволяющий производить исследования биологически актив-

ных веществ (катехоламинов, гистамина и др.), гормонов (11-оксикортикостероидов), витаминов (групп В, Е и др.), атерогенных липопротеинов (при использовании флуоресцентного зонда), порфиринов, ферментов (активность АСТ, АЛТ и др.), субстратов и т.д.

Из выпускаемых в настоящее время в странах СНГ клинико-лабораторных флуориметрических анализаторов особое внимание привлекают приборы серии Флуорат (НПФ «Люмэкс», Россия). Базовая модель – Флуорат 02 (малогабаритный, размещающийся на обычном столе прибор) – представляет собой не только собственно флуориметр, но также нефелометр, коагулометр, фотометр, хемилюминиметр. Весьма большие потенциальные возможности прибора реализуются благодаря использованию ряда дополнительных приспособлений: «ПИФА» (поляризационная флуориметрия), «Стрип» или «Планшет» (гетерогенный иммуноанализ), «КРИО» (экспресс-анализ свинца), «ВЭЖХ» (жидкостная хроматография), «КЭФ» (капиллярный электрофорез). Прибор может с успехом применяться для выполнения классических однотоочечных методов анализа – определения содержания субстратов, метаболитов, витаминов, микроэлементов, ферментов, гормонов, медиаторов, аминокислот, осуществления мониторинга многих лекарственных веществ, определения наркотиков.

Пламенная фотометрия – вид исследования, используемый для определения содержания электролитов и некоторых других элементов, атомы которых способны возбуждаться и испускать свечение в высокотемпературном пламени газовой горелки. Принцип определения состоит в следующем. Растворенный в воде образец (биологический материал) вводят в пламя посредством распылителя. В случае достаточно высокой температуры пламени внешние электроны атома, захватывая часть тепловой энергии, переходят на более высокие энергетические уровни. В таком возбужденном состоянии атомы способны пребывать весьма непродолжительное время. При возвращении возбужденных электронов на исходный стационарный уровень поглощенная ими энергия выделяется в виде квантов световой энергии. Длина волны испускаемого света, зависящая от структуры электронной оболочки атома, отражает химическую природу элемента.

Если свет пламени, в котором находятся атомы металлов, разложить с помощью призмы в спектр, то он окажется линейчатым (спектр испускания). По интенсивности свечения его основной, так называемой характеристической линии, выделяемой с помощью интерференционного светофильтра, можно судить о количественном содержании элемента в исследуемой биологической жидкости.

Основными ограничениями в исследовании спектра элементов являются: сравнительно низкая температура пламени (недостаточная для возбуждения свечения атомов множества элементов) и переходы электронов без излучения квантов света, характерные для атомов многих соединений. Для достижения высокой температуры пламени используют различные горючие газы: наиболее часто бутан, пропан, хотя лучший тепловой эффект отмечается при использовании ацетилена или водорода. В качестве окис-

лителя обычно применяют подаваемый под давлением (компрессором) атмосферный кислород.

Одна из наиболее важных областей применения пламенной фотометрии – одновременное определение натрия и калия (а иногда и кальция, лития). Эти элементы возбуждаются значительно легче остальных, и характерные линии их спектра излучения четко отделены друг от друга. При применении более «горячего» пламени и чувствительных регистрирующих устройств становится возможным анализировать до 50 элементов. Интенсивность излучения при длине волны, характерной для определяемого элемента, практически пропорциональна концентрации соответствующих катионов. Пламенная фотометрия осуществляется с применением специального прибора – пламенного фотометра.

Атомно-эмиссионный спектральный анализ. Широкое использование этого вида исследования стало возможным благодаря разработке атомно-эмиссионных многоканальных спектрометров. В состав прибора входят источник возбуждения спектров, полихроматор, оптический многоканальный анализатор и управляющий персональный компьютер с комплектом программного обеспечения.

Подготовленная к анализу проба помещается в камеру образца источника возбуждения спектра. Под действием электрического разряда анализируемое вещество испаряется, и его атомы возбуждаются в области разряда. Излучаемый световой поток с помощью оптической системы направляется в полихроматор, где разлагается на спектральные составляющие. Обработка спектров производится с применением калибровки по стандартам автоматически: по площади или высоте пиков. На все исследование уходит несколько минут. Общее число определяемых этим способом элементов – до 50. НПФ «Люмэкс» (Россия) разработан атомно-абсорбционный анализатор МГА-915, позволяющий выполнять исследования без предварительной минерализации проб.

Люминометрия – вид исследования, осуществляемый с использованием специальных приборов – *люцинометров*, позволяющих измерять количество излученного света (светосумму) и на основании этого судить о содержании в биологических жидкостях некоторых веществ (ацилгидроперекисей и др., при разложении которых ионами металлов переменной валентности либо другими реактивами происходит кратковременное излучение света).

Глава 9. ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ

Используемые в клинической лабораторной диагностике методы электрохимического анализа обычно включают в себя приемы непосредственного измерения (например, путем регистрации конечной точки титрования) растворенного вещества по изменению (или величине) электропроводности, предельного диффузионного тока либо электрохимического потенциала растворов. Поэтому их относят также к электроаналитическим (электрообъемным) методам количественного анализа. Все электрообъемные методы основываются на исследовании электрохимических свойств растворов.

Если два металлических электрода, опущенных в раствор электролита, соединить с внешним источником электрической энергии, то при достаточной величине напряжения через раствор потечет электрический ток. С другой стороны, подобный элемент сам может являться источником электрической энергии и давать ток во внешнюю цепь. Проявление этих свойств в каждом отдельном случае зависит от природы и состава используемого раствора, материала и размера электродов, расстояния между ними, перемешивания раствора, температуры и свойств внешней электрической цепи, направления протекания тока и т.д. Один из двух помещенных в раствор электродов является инертным, другой – активным.

Инертный электрод необходим для установления электрического контакта с раствором. Наиболее подходящими для изготовления инертного электрода являются благородные металлы, как правило, для этих целей используется платина, иногда золото или серебро; в некоторых случаях хороших результатов можно достичь, применяя угольный электрод.

Активным электродом называется электрод, состоящий из химического элемента в чистом виде. При погружении в раствор он входит в химическое равновесие с ионами того же элемента, находящегося в растворе. Электрические свойства такого электрода, в частности его потенциал, зависят от концентрации соответствующих ионов в растворе. Наиболее часто в качестве электрода такого типа используются серебро, ртуть и водород.

Пропускание постоянного тока через раствор электролита сопровождается реакциями окисления–восстановления. На электроде, называемом *анодом*, происходит окисление с передачей электронов от восстанавливае-

мых веществ к аноду, на *катоде* идет восстановление с передачей электронов от катода к окисленным веществам. Функцией внешней цепи является перенос электронов от анода к катоду. Электрическая цепь замыкается через ионную проводимость раствора.

Электроаналитические (электрообъемные) методы делятся на три основных вида: *потенциометрию*, *кондуктометрию* и *вольтамперометрию*.

9.1. Потенциометрия

Метод потенциометрического анализа основан на измерении электрохимического потенциала того или иного электрода, погруженного в раствор. Для проведения потенциометрии используют схему, состоящую из электрода, потенциал которого известен (потенциал сравнения), и электрода, потенциал которого измеряется (индикаторный электрод). Полученные значения потенциала индикаторного электрода позволяют судить об активности присутствующих в растворе ионов.

9.1.1. Ионметрическое (потенциометрическое) определение рН, электролитов плазмы (сыворотки) крови и других биологических жидкостей

Определение рН и содержания в биологических жидкостях ионов Na^+ , K^+ и Cl^- – одно из наиболее важных клиничко-лабораторных исследований, составляющих основу не только обычного, но и неотложного клиничко-биохимического анализа, выполнение которого особенно необходимо больным, находящимся в критическом состоянии.

Ионометрический (потенциометрический) метод анализа, основанный на измерении электрохимического потенциала ионоселективного электрода, погруженного в исследуемый раствор, обладает рядом существенных преимуществ перед колориметрическим и пламенным фотометрическим способом определения электролитов. Электрическая схема потенциометра включает электрод сравнения (потенциал которого известен) и индикаторный (ионоселективный) электрод, потенциал которого измеряется. Значения разности потенциалов между двумя электродами позволяют судить об активности присутствующих в растворе ионов: водорода, калия, натрия, лития, кальция и др.

Потенциометрический метод определения рН сводится к измерению электродвижущей силы гальванического элемента, потенциал одного электрода в котором известен (электрод сравнения), а потенциал другого зависит от рН среды. В современных приборах эта разница в потенциалах прокалибрована в единицах рН. Техника работы с такими приборами, из которых весьма хорошо зарекомендовали себя выпускаемые Гомельским заводом измерительной аппаратуры (Белоруссия) ионометры И-130 и И-160, подробно изложена в прилагаемых к ним инструкциях.

Ионоселективные анализаторы электролитов – малогабаритные настольные приборы, позволяющие устанавливать уровень свободных, не связанных с белком, а следовательно функционально активных, ионов.

В настоящее время наиболее эффективным средством контроля ионного состава крови и других биологических жидкостей признаны автоматические и полуавтоматические анализаторы, в которых используются электрохимические датчики типа ионоселективных электродов. В зарубежных клиниках определение ионов натрия, калия, хлорида практически полностью проводится с помощью таких анализаторов. К их числу, в частности, относятся Electrolite 2 («Beckman Coulter», Австрия); приборы серии «Easylyte» («Medica», США): «Easylyte», «Easylyte Plus», «Easylyte Lithium».

Анализаторы серии «Easylyte» удобны в эксплуатации, в них используется диалоговый режим работы с прибором, предусмотрены автоматическая калибровка, диагностика возможных неисправностей; осуществляется автоматическое вытирание заборника проб. Полуавтоматический анализатор может доукомплектовываться пробоотборником, что превращает его в автоматический анализатор. Время анализа – 65–100 с для крови, 100 с – для мочи.

9.1.2. Потенциометрическое титрование

Как и любое другое титрование, потенциометрическое титрование основывается на определении точки эквивалентности, регистрируемой по резкому изменению потенциала индикаторного электрода.

Единственное требование к этому виду титрования – чтобы реакция титрования вводила или связывала такой ион, для регистрации которого существует подходящий электрод. Например, титрование методом нейтрализации можно осуществлять со стеклянным электродом в качестве индикаторного и каломельным – в качестве электрода сравнения. Измерение потенциала (в вольтах), отражающего значение рН, производится каждый раз после добавления небольшого количества титрующего раствора (гидроксида натрия или хлористоводородной кислоты). Кривая зависимости потенциала (или рН) от объема реагентов (раствора щелочи или кислоты) очень похожа на кривую обычного титрования, используемую при выборе индикаторов. Потенциометрические кривые характеризуются максимальной крутизной в конечной точке титрования. Этим объясняется тот факт, что добавление небольшого количества реагента всегда оказывает наибольшее влияние на раствор вблизи конечной точки, чем на других участках кривой (известно, что одна капля реагента способна изменить цвет индикатора в конечной точке титрования, однако не оказывает никакого заметного влияния в начале титрования или после добавления избытка реагента).

Приборы для автоматического титрования впускаются двух типов:

- приборы, в которых производится вычерчивание полной кривой титрования на листе бумаги;

- приборы, которые автоматически прекращают титрование (закрывают вентиль бюретки) в точке эквивалентности.

Приборы второго типа представляют собой *самопишущие рН-метры*. Типичным их представителем является автоматический титратор, в котором для управления работой вентиля бюретки используется электронный усилитель. В этом случае всегда необходимо заранее знать разность потенциалов между электродами в конечной точке титрования. Величина этого напряжения устанавливается вручную на шкале прибора. Поток реагента из бюретки управляется при помощи усилителя. К концу титрования поток жидкости автоматически замедляется во избежание перелива. По окончании титрования зажигается сигнальная лампа.

9.2. Кондуктометрия

Кондуктометрические методы анализа позволяют установить конец реакции при титровании по изменению электропроводности раствора в точке эквивалентности.

Известно, что если два платиновых электрода погрузить в раствор электролита и присоединить их к источнику электричества, то сила протекающего тока определится как величиной приложенного напряжения (E), так и электрическим сопротивлением (R) той части раствора, которая находится между электродами. Это соотношение называется законом Ома:

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

где I – сила тока (А), E – напряжение (В) и R – сопротивление (Ом).

Электрическая проводимость зависит от температуры, ее значение увеличивается приблизительно на 2% при повышении температуры на 1°C. Поэтому при точных измерениях следует соблюдать постоянство температуры (обычно для всех измерений берется температура 25°C).

В водных растворах сильных электролитов имеется почти линейная зависимость проводимости от концентрации. При больших концентрациях проводимость, достигнув максимума, начинает уменьшаться вследствие того, что взаимодействие между ионами препятствует их свободному движению через раствор.

Метод измерения электропроводности растворов оказался, в частности, пригодным для определения небольших количеств свободного аммиака в биологическом материале. Аммиак удаляют из образца и поглощают раствором борной кислоты. После этого измеряют удельную проводимость раствора и сравнивают ее с результатами, полученными с эталонными растворами.

Используя метод измерения проводимости, можно произвести определение одного иона в присутствии умеренной концентрации других, если

имеется реагент, который может произвести селективное удаление данного иона в виде осадка или недиссоциированного комплекса. Для этого измеряется удельная проводимость раствора до и после добавления известного количества реагента. Добавление реагента (если он диссоциирован) вызывает увеличение проводимости, в то время как удаление определяемого иона путем связывания его с эквивалентным количеством реагента приводит к ее уменьшению. Прибавление реагента должно производиться со значительным избытком, чтобы окончательная проводимость всегда была больше, чем первоначальная.

Кондуктометрическое титрование применяется при условии значительной разницы и удельной электропроводности между исходным раствором и реагентом (или продуктами реакции). Оно может быть рассмотрено на примере *реакции нейтрализации*, происходящей при титровании 0,01 N раствором соляной кислоты 0,1 N раствора едкого натра. Первоначальная проводимость раствора будет очень велика вследствие большой эквивалентной проводимости ионов водорода. Проводимость за счет наличия в среде ионов хлора в процессе титрования остается постоянной, в то время как проводимость за счет ионов водорода в конце титрования снижается до нуля. Ионы водорода заменяются таким же количеством ионов натрия, однако последние имеют малую подвижность, так что общая проводимость к концу титрования равномерно понижается. После прохождения конечной точки проводимость снова возрастает, так как в растворе начинают появляться ионы натрия и гидроксиды.

Метод кондуктометрии еще более хорошо приспособлен для определения конечных точек титрования в реакциях осаждения, например, при титровании раствора серноокислого серебра раствором хлористого бария, когда два вещества одновременно выпадают в осадок. При этом в конечной точке титрования проводимость падает до очень малой величины. Подобное же явление наблюдается при титровании серноокислого магния и других сульфатов гидроокисью бария.

9.3. Вольтамперометрия и полярография

В основу этих методов положено изучение вольтамперных (напряжение–ток) кривых, отражающих изменение силы тока в процессе электролиза различных химических соединений при увеличении напряжения на электродах. При этом один из электродов является неполяризуемым (нормальным), а другой – поляризуемым (инертным). Вольтамперометрия – это общее название этих методов анализа. Термин «полярография» используется только для тех методов, где роль поляризуемого электрода играет ртутный капельный электрод. Амперометрия в основном аналогична вольтамперометрии, за исключением того, что в этом методе оба электрода могут быть поляризуемыми.

Рассмотрим более подробно явления, происходящие в электролизере, в котором один электрод может быть поляризован, а другой нет. Изучение

такой системы удобно проводить с помощью кривых «напряжение–ток», т.е. методом вольтамперометрии. В качестве неполяризованного электрода, являющегося электродом сравнения, обычно используется насыщенный каломельный электрод. Поляризуемый электрод делают меньше по размерам и иногда называют микроэлектродом. Обычно его изготавливают из чистого металла, например, ртути или платины; иногда для его изготовления используют золото. Наиболее распространенным микроэлектродом является ртуть в виде капле (ртутный капельный электрод), вытекающих из тонкого стеклянного капилляра, что приводит к обновлению поверхности электрода, предотвращая его «отравление».

Оба электрода соединяют последовательно с микроамперметром и источником регулируемого напряжения. Простейшей из конструкций электролизеров является небольшой стакан, в который погружены ртутный капельный электрод и соляной мостик нормального каломельного электрода. График зависимости силы тока от времени имеет вид пилообразной кривой с рядом острых максимумов. Искомой величиной является среднее значение силы тока.

Анализ проводят с помощью особых приборов – полярографов. Данные приборы изготовлены так, что из-за большой разницы в площадях электродов потенциал одного из них (анода) остается при изменении силы тока постоянным, потенциал же другого заметно меняется, что в конечном итоге дает ток насыщения (предельный диффузионный ток), величина которого при некоторых постоянных условиях зависит только от концентрации электролизуемого вещества. На этом же принципе основан метод амперометрического титрования. Конечную точку титрования в данном случае определяют по изменению силы предельного диффузионного тока.

Имеется два основных класса полярографов: полярографы с ручным управлением и полярографы с автоматической записью вольтамперных кривых. Первый самопишущий полярограф был сконструирован автором метода, профессором Пражского университета Ярославом Гейровским. В настоящее время выпускаются в основном полностью автоматизированные полярографы (с собственным самописцем, автоматически регулируемым источником напряжения и т.д.).

Для всех вольтамперных кривых характерны три области. Первая (нижняя) характеризуется потенциалом, величина которого еще недостаточна для восстановления присутствующих в растворе ионов. Небольшой ток, который протекает в это время через раствор, называется *остаточным* и складывается из токов, возникающих вследствие восстановления примесей и так называемого зарядного тока (возникающего из-за того, что промежуточный слой между каплей ртути и раствором играет роль конденсатора с непрерывно возрастающей площадью).

При дальнейшем увеличении отрицательного потенциала происходит резкое увеличение силы тока (средняя область кривой), характеризующее начало восстановления ионов, находящихся в растворе (например, ионов кадмия). Средняя область кривой характеризует эффект насыщения, вы-

званный локальным уменьшением концентрации определяемых ионов (например, ионов кадмия), которые достигают электрода благодаря их диффузии через раствор и немедленно восстанавливаются. Величина ограничивающего тока в середине этой области, называемого диффузионным током, непосредственно зависит от концентрации растворенных веществ с учетом остаточного тока.

Полная кривая изменения тока называется полярограммой, а характеристические скачки, соответствующие восстановлению определяемых веществ – полярографическими волнами.

Поскольку потенциал полуволны является величиной, присущей данному веществу при его окислении или восстановлении на микроэлектроде, его можно использовать для определения этого вещества. Его количественный анализ базируется на уравнении Ильковича, которое связывает величину диффузионного тока с концентрацией восстановленных ионов в растворе. Для оценки результата приготавливают эталонный раствор нужных ионов и определяют его вольтамперные характеристики в тех же условиях, что и анализируемого раствора.

9.4. Амперметрическое титрование

Амперметрическое титрование является одним из физико-химических методов объемного анализа с электрическим установлением момента эквивалентности. В основу метода положено измерение силы диффузионного тока титруемого вещества или реагента, которым титруют. Поскольку величина тока пропорциональна концентрации вещества, дающего диффузионный ток, измерении концентрации производится по изменению диффузионного тока в процессе титрования. Так как величина диффузионного тока пропорциональна концентрации, кривая амперметрического титрования состоит из отрезков прямых, точка пересечения которых является конечной точкой титрования.

Титрование проводят в сосуде, в который опущен вращающийся платиновый электрод, соединенный через микроамперметр с электродом сравнения (каломелевым). Для выполнения анализа используют приборы для амперметрического титрования (ПАТ). Амперметрическое титрование с большим успехом может быть применено не только к реакциям осаждения, но также ко многим реакциям окисления–восстановления и комплексобразования.

Глава 10. ТЕХНОЛОГИИ ФРАКЦИОНИРОВАНИЯ КОМПОНЕНТОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ И ТКАНЕЙ

В настоящее время в клинико-лабораторной практике широко используются технологии предварительного выделения интересующих исследователя соединений, среди которых все большее применение находят способы электрофоретического и хроматографического фракционирования смеси веществ. Для количественного определения отдельных их компонентов (метаболитов) обычно применяются методы оптического анализа (абсорбционная фотометрия, флуориметрия, денситометрия и пр.).

10.1. Электрофорез

Электрофорез – процесс разделения заряженных частиц в электрическом поле. Явление электрофореза было открыто профессором Московского университета Фердинандом Фридрихом Рейссом в 1809 г. Исследователь наблюдал направленное движение к одному из электрических полюсов частичек глины, суспензия которой была помещена внутрь стеклянной трубки. В 1937 г. Арне Тизелиус сконструировал аппарат для электрофореза, позволявший разделять белки на фракции в водной фазе (электрофорез в ванне, или свободный электрофорез). Однако этот прибор был дорог и несовершенен (после снятия показателей подаваемого на электроды напряжения фракции вновь перемешивались), а все исследование – трудоемко и сложно; по этим причинам метод электрофореза по Тизелиусу не вошел в повседневную практическую деятельность КДЛ. Лишь в 1950-х гг. для электрофореза белков плазмы крови был применен введенный Е. Л. Даррумом, Г. О. Виландом и К. Фишером метод разделения на бумаге, получивший впоследствии весьма широкое распространение (зонный, или зональный, электрофорез, т.е. электрофорез на поддерживающих средах-носителях).

Зонный электрофорез можно осуществить с использованием смоченных буферным раствором (рН 8,6) полосок хроматографической бумаги, ацетатцеллюлозной пленки, агарового геля и других носителей.

Если на электроды электрофоретической камеры, в которой размещены полоски носителя, подать напряжение, то в созданном таким образом электрическом поле ионы буфера и частицы нанесенного на полосу субстрата (сыворотки или плазмы) придут в состояние направленного движения.

При нанесении рядом с катодом 20–100 мкл сыворотки содержащиеся в ней молекулы белков крови, будучи заряжены отрицательно, устремляются к аноду со скоростью, зависящей от величины приложенного к электродам напряжения, заряда белков, их молекулярной массы, рН и ионной силы буфера. Заряд белков при этом может быть образован первично или вторично (в результате взаимодействия с буфером).

Для характеристики процесса электрофореза на носителе принято использовать два основных понятия: падение напряжения на 1 см полосы (градиент потенциала, В/см) и сила тока, приходящаяся на 1 см поперечного сечения полосы (мА/см).

Под падением напряжения (градиентом потенциала) следует понимать распределение величины приложенного к электродам напряжения на всем расстоянии между электродами. Находится оно делением величины выходного напряжения (регистрируемого вольтметром источника постоянного напряжения) на расстояние между электродами, точнее, на величину того пути (в см), который преодолевают электрически заряженные частицы (ионы, электроны) от электрода к электроду. Так, если он составляет 30 см, а напряжение между электродами 150 В, то падение напряжения (градиент потенциала) окажется равным частному от деления 150 на 30, т.е. 5 В/см.

В зависимости от используемой величины падения напряжения различают: низко- (5–15), средне- (обычно 20–40) и высоковольтный (превышающий 50 В/см) электрофорез.

Для создания идентичных условий при проведении электрофореза на различных приборах о силе тока судят по его величине, приходящейся на 1 см поперечного сечения полосы. Находится эта величина посредством деления значений силы тока, измеренных миллиамперметром, на общую ширину всех полос носителя (ацетатцеллюлозной пленки, хроматографической бумаги).

Если бумага или другой носитель располагаются в электрофоретической камере горизонтально, говорят о горизонтальном электрофорезе, а если вертикально или под углом к вертикали (горизонтали) – то о вертикальном электрофорезе. Первый позволяет получить более точные результаты.

Помимо аналитического электрофореза используется электрофорез препаративный, предназначенный для получения отдельных белковых фракций с целью их последующего анализа.

В клинической лабораторной диагностике обычно используется зонный аналитический электрофорез, реализуемый с применением различных

электрофоретических систем (отечественного и зарубежного производства). Несмотря на различие в конструкции и природе носителей, общие требования к приборам и процессу проведения электрофореза во многом одинаковы.

Высоковольтный электрофорез используется для разделения низкомолекулярных веществ, таких как аминокислоты и их производные, например конечные продукты разрушения катехоламинов и серотонина – ванилилминдальная, гомованилиновая и 5-гидроксииндолуксусная кислоты. Различие в заряде и молекулярной массе подобных соединений слишком мало, чтобы при небольшом градиенте потенциала могло бы произойти эффективное разделение частиц. Однако высоковольтный электрофорез с выходным напряжением до 100 000 В делает возможным фракционирование и таких соединений. Вследствие отмечаемого при высоковольтном электрофорезе значительного разогревания полос он требует специальных устройств и приспособлений для охлаждения бумажных лент. В случае использования высоковольтного электрофореза необходимо применение летучих буферов (растворов муравьиной, уксусной кислот, гидроксида аммония, пиридина и др.), которые при испарении не дают остатков солей (выкристаллизовавшиеся соли способствуют сгоранию полос), а также систем охлаждения, достигаемого либо охлаждением пластины, на которой лежат полосы, либо погружением полос бумаги в органический растворитель. Важно также исключить реофорез, который наиболее выражен при данном виде электрофореза.

В клинической химии обычно используется зонный аналитический электрофорез. К настоящему времени предложено множество различных систем для электрофореза. Несмотря на различие в конструкции и используемых носителях, общие требования к приборам и процессу проведения электрофореза одни и те же: описание их приведено в разделе, посвященном электрофорезу белков сыворотки крови.

Низковольтный электрофорез, в отличие от высоковольтного, используется для разделения высокомолекулярных соединений (белков, липопротеинов, гликопротеинов и др.).

Основные требования к приборам для проведения низковольтного электрофореза на хроматографической бумаге и правила его осуществления

Блок питания должен давать стабилизированный ток силой 50–100 мА при напряжении 180–600 В.

Электрофоретическая камера. Для предохранения полосы носителя от высыхания в ней должны поддерживаться определенные температура и влажность воздуха. Нагревание материала бумаги приводит к усиленному испарению буферного раствора в середине полосы и с краев ленты, что обуславливает движение буферного раствора (реофорез) и вызванное этим изменение формы пятен фракций белков. По данной причине отдельные конструкции электрофоретических камер располагают системой охлаждения полосок носителя.

Уровень буферного раствора в разных отделах камеры должен быть одинаков. Это позволяет избежать его перелива через ленту в результате сифонного действия. Следует избегать погружения концов полосок носителя в буферный раствор, поскольку вследствие электролиза рН буфера, внесенного в эти отделы электрофоретической камеры, может быть изменен. Электрический контакт между лентами и электродами устанавливают посредством фитильков из бумажных полосок (ваты, марли), смоченных буферным раствором; этим во многом предотвращается передача изменений рН буфера в то пространство, в которое погружены концы лент.

Важно, чтобы полоска носителя (хроматографической бумаги, ацетатцеллюлозной пленки) была хорошо натянута. Желательно, чтобы она располагалась как бы в «подвешенном» состоянии, поддерживаемая вертикально расположенной перегородкой, системой натянутых капроновых нитей, с помощью острых концов конусовидных шипов, размещенных на пластине, связывающей обе ванны с буферным раствором. Все это предотвращает образование тонкого капиллярного слоя буферного раствора между полоской ацетатцеллюлозной пленки, хроматографической бумаги и пластиной; капиллярный слой буферного раствора в значительной мере ухудшает качество электрофоретического разделения. Большое значение имеют свойства материала носителя, используемого для электрофореза.

Перед проведением электрофореза камеру устанавливают строго горизонтально. Кюветы заполняют буферным раствором таким образом, чтобы уровень жидкости в них был одинаковым. Оба отделения каждой кюветы соединяют друг с другом полоской фильтровальной бумаги. Полоски носителя равномерно натягивают между кюветными отделениями. Необходимо, чтобы концы увлажненных буфером полос (мембран) были погружены в буферный раствор внутренних отделений (если таковые имеются) электродных кювет. Затем на заранее отмеченные у катода участки полосы носителя наносят сыворотку (иногда на расстоянии 2 см от середины полоски в сторону катода).

Наилучшие результаты дает метод пропитывания хроматографической бумаги буферным раствором. Однако на практике в целях экономии времени ленты обычно смачивают в буфере и слегка высушивают, отжимая между листами фильтровальной бумаги.

Нанесение на полоску носителя биологического материала производится с помощью аппликатора (специального или импровизированного) либо микропипетки (автоматической или обычной). Для реализации первого способа на узкий край шлифованного стекла (покровного, предметного) или полоски отмытой рентгеновской пленки 0,1 мм микропипеткой наносят 10 мкл свежеполученной (негемолизированной) сыворотки. Этот импровизированный аппликатор приставляют нижним ребром к увлажненной бумаге и после впитывания сыворотки сразу же отнимают (нужно следить за тем, чтобы между боковыми гранями аппликатора и краями полос оставался промежуток шириной 5–6 мм). Наносить сыворотку на бумагу можно и непосредственно из пипетки, таким образом, чтобы получилась поперечная (по отношению к длине полосы носителя) линия.

Допустимо окрашивание сыворотки перед ее нанесением на полосу носителя (например, хроматографической бумаги). Для этого к 0,5 мл сыворотки добавляют несколько крупинок (проще всего на кончике стеклянной иглы) порошка бромфенолового синего. По перемещению пятна красителя, связывающегося прежде всего с альбумином, можно визуальным образом следить за миграцией пятен. Затем крышку камеры плотно закрывают и включают прибор.

Электрофорез на ацетатцеллюлозной пленке проводится аналогично процедуре низковольтного электрофореза на бумаге. В настоящее время этот вид фракционирования (предложенный Эдвином Коном, 1958) достаточно широко используется для исследования белкового спектра сыворотки крови пациентов.

Ацетатцеллюлозная пленка как носитель обладает рядом существенных преимуществ перед хроматографической бумагой: она химически однородна, имеет равномерную пористость, лишена эндоосмоса, быстро и хорошо смачивается водными растворами; ее волокна, в отличие от хроматографической бумаги, не обладают способностью к адсорбции белковых молекул, что предотвращает появление «хвостов» и «размывание» промежутков между отдельными белковыми фракциями. Для постановки исследования достаточно 1–3 мкл сыворотки крови, время электрофореза по сравнению с фракционированием на хроматографической бумаге значительно сокращено.

Мембраны ацетатцеллюлозные размером 57×140 и 90×90 мм по 50 штук в упаковке вместе с гипсуратным буфером (рН 8,6) и красителем пунцовым С поставляются, в частности, фирмой «Sartorius» (Германия).

Электрофорез на агаре. Гель агара, обладая меньшими сорбционными свойствами по отношению к белкам плазмы, чем бумага, создает лучшие возможности для их передвижения и фракционирования. При электрофорезе на агаре отчетливо выделяется множество различных фракций. Впервые этот вид электрофореза был предложен А. Г. Гордоном и соавт. (1949). В настоящее время метод электрофореза на агаре широко применяется при фракционировании белков и липопротеинов.

С этой целью используют оборудование и расходные материалы производства, в частности, компаний «СОЛАР» (Белоруссия), «Beckman Coulter» (США), СП «Кормей-ДиАна» (Белоруссия, Польша), которое выпускает систему для электрофореза Sorma DS-2, и др.

Иммуноэлектрофорез. Иммуноэлектрофорез, введенный в практику клинической химии П. Грабаром и К. А. Вильямсом в 1953 г., представляет собой комбинацию электрофоретического и иммунологического фракционирования белков. После завершения процедуры электрофореза белков в геле агара в узкий желобок сформированной вблизи края его полосы (перпендикулярно разделенным фракциям) вносят антисыворотку к определенному виду белка и дают ей возможность диффундировать в геле агара. В месте контакта антисыворотки с электрофоретически разделенными белками образуются преципитационные дуги (вследствие образования

комплекса антиген–антитело), характерные для отдельных видов белков. При помощи этого метода удалось обнаружить более 25 различных фракций белков сыворотки крови.

В 1966 г. С.-В. Laurell разработал усовершенствованный *метод электроиммунодиффузии*, получивший также название «ракетного» электрофореза за форму, которую приобретает преципитат в результате реакции антиген–антитело, проходящей в геле.

Метод сходен с радиальной иммунодиффузией в том, что в нем также используют гель, содержащий антитела. Вдоль кромки слоя геля делают ряд лунок, в которые помещают исследуемый материал, например, диск из фильтровальной бумаги диаметром 4 мм, обильно пропитанный кровью, после чего проводят электрофорез. При этом в слое геля создается электрическое поле, благодаря которому антиген входит в гель. Поскольку антигены обычно движутся значительно быстрее, чем антитела, но в одном направлении, реактанты продвигаются в геле вместе. Это позволяет пренебречь различиями в относительной молекулярной массе веществ и конфигурации неправильной формы, подобно тому, что происходит в ходе радиальной иммунодиффузии. Высота «ракеты», образующейся в ходе такой реакции, прямо пропорциональна концентрации антигена, она измеряется от верхней границы лунки до высоты пика.

Метод электроиммунодиффузии зарекомендовал себя как удобная и надежная система для определения уровня α -фетопротеина в амниотической жидкости.

С помощью электроиммунодиффузии можно исследовать содержание разнообразных белков; однако одни из них требуют особых условий для вхождения в гель, другие – для образования видимого преципитата. Для усиления четкости проявления полос преципитации полоски геля помещают в растворы фосфорномолибденовой или фосфорновольфрамовой кислоты.

Методу электроиммунодиффузии присущи и некоторые недостатки, типичные для многих методик электрофоретического фракционирования, в том числе большая продолжительность процедуры (от 2 до 18 ч), малое количество исследований, выполняемых на полосе геля.

Капиллярный электрофорез. В настоящее время капиллярный электрофорез становится одним из наиболее распространенных аналитических инструментов фракционирования веществ в растворе. Используемое для этой цели оборудование производится фирмами «Applied Biosystems», «Spectrophysics», «Beckman Coulter», «BioRad Laboratories» (США), а также компаниями во Франции, Швеции, Японии и других странах. Выпуск системы капиллярного электрофореза «Капель-103» освоен НПФ «Льюмэкс» (Россия).

Процедура разделения веществ методом капиллярного электрофореза базируется на явлении миграции заряженных частиц в электрическом поле. Для ее выполнения используются заполненные электролитом (буфером) кварцевые капилляры с внутренним диаметром 25–200 мкм и дли-

ной от 10 до 100 см. К концам капилляров подается высокое напряжение (10–30 кВ). Так как сам кварц обладает положительно заряженными силанольными группами, в капилляре наблюдается некоторая поляризация электролита, при которой возле стенок капилляра преобладает отрицательное поле, а в середине – положительное. Под влиянием электростатического поля в капилляре создается электроосмотический поток, направленный к отрицательному электроду. К катоду перемещаются и компоненты смеси различных веществ, затягиваемые электроосмотическим потоком. В зависимости от величины заряда и природы вещества скорость их продвижения оказывается различной, на чем и основывается принцип электрофоретического фракционирования смеси на отдельные соединения. В одной из точек концевой части капилляра определяют разделенные компоненты с применением различного типа оптических детекторов (УФ-фотометра, флуориметра, лазерного или нелазерного рефрактометра).

Полученная электрофореграмма представляет собой последовательность пиков, по которым можно идентифицировать и количественно определять конкретное соединение.

Капиллярный электрофорез обеспечивает очень высокую эффективность разделения, поэтому он широко применяется не только для выявления близких по строению веществ (белков, пептидов, аминокислот, витаминов, наркотиков, ионов металлов и др.), но и для идентификации лекарственных препаратов. В отличие от ВЭЖХ он не требует использования прецизионных устройств (например, насосов высокого давления) и большого количества высокочистых растворителей. Отсутствие твердого сорбента в капилляре исключает возможность его «старения», химической и физической деструкции и любого неспецифического связывания с ним компонентов пробы.

Система капиллярного электрофореза «Капель-103» представляет собой прибор, в котором используется охлаждаемый потоком воздуха капилляр длиной от 50 до 100 см и диаметром 25, 50 и 75 мкм. Подаваемое на него напряжение достигает 30 тыс. В. Детектирование осуществляется при длине волны 254 нм с применением микролинзовой фокусирующей системы. Воспроизводимость амплитуды пика составляет 1%.

Управление этим малогабаритным прибором производится с лицевой панели или с помощью компьютера. Результаты анализа выводятся на внешний компьютер. Удобству в работе способствуют полуавтоматические ввод пробы и промывка капилляров.

10.2. Хроматография

Хроматографический метод разделения веществ, впервые примененный М. С. Цветом (1903), является одним из наиболее избирательных методов разделения близких по химической структуре веществ. Он основывается на различном распределении составных частей исходной смеси между

Таблица 10.1

Классификация хроматографического анализа

Подвижная фаза	Неподвижная фаза	Тип метода	Вид метода
Газ	Жидкость	Газовая хроматография	Газожидкостная хроматография
	Твердое вещество		Газоадсорбционная хроматография
Жидкость	Жидкость	Жидкостная хроматография	Жидкостно-жидкостная хроматография
	Твердое вещество		Жидкостно-адсорбционная хроматография

двумя фазами: подвижной и неподвижной. Весь процесс разделения складывается из многократных (повторяющихся сотни раз) актов перехода вещества из одной фазы в другую.

Хроматографическим разделением обычно называют процесс, при котором компоненты разделяемой смеси многократно распределяются между двумя несмешивающимися фазами: неподвижной (стационарной) и подвижной (мобильной). Разделение веществ происходит либо за счет их способности связываться с поверхностью сорбентов, либо за счет распределения между неподвижной фазой, которая может быть твердой или жидкой, и подвижной фазой – жидкой или газовой, либо за счет способности вещества образовывать гетерополярные связи с сорбентами, которые содержат ионы с зарядом, противоположным по знаку заряду иона анализируемого вещества.

Различные виды хроматографии классифицируются на основе природы атомно-молекулярного взаимодействия разделяемых веществ с той либо иной фазой.

Выделяют адсорбционную, ионообменную, распределительную, гель-хроматографию, аффинную хроматографию (нашедшую применение в иммуноферментных методах) и некоторые другие.

В зависимости от физического состояния применяемых фаз различают следующие типы хроматографического анализа (табл. 10.1).

Получивший в последнее время широкое распространение (особенно для фракционирования липидов) метод *хроматографии в тонких слоях* нельзя полностью отнести ни к одному из описанных способов разделения. Этот метод включает в себя элементы как распределительной, так и адсорбционной хроматографии.

В адсорбционной хроматографии разделение веществ основано на их различной сорбируемости на поверхности твердой фазы. Как правило, при этом адсорбируемость растворителя должна быть значительно меньше таковой анализируемой смеси. Это обеспечивает наиболее полное использование разделяющей способности адсорбента.

Процесс адсорбции зависит от свойств адсорбентов, адсорбируемых соединений и от растворителей. Он может иметь химический или фи-

зический характер (иногда трудно провести границу между этими видами адсорбции). Физическая адсорбция определяется многими физико-химическими факторами, связанными прежде всего с емкостью и типом сорбента; химическая адсорбция вызывается образованием лабильной химической связи между адсорбентом и хроматографируемым веществом.

Метод ионообменной хроматографии представляет собой аналитический метод определения ионов, основанный на способности некоторых твердых веществ (ионообменников) обменивать ионы при контакте с растворами электролитов. В качестве ионообменников (ионитов) используются нерастворимые высокомолекулярные вещества природного или синтетического происхождения, а также неорганические ионообменники. Они бывают двух типов: анионообменники (аниониты) и катионообменники (катиониты). Ионообменная хроматография используется для разделения органических и неорганических соединений, способных к диссоциации.

Ионообменная хроматография используется в аминокислотных анализаторах для определения отдельных аминокислот.

При *распределительной хроматографии* разделение происходит вследствие различной растворимости (распределения) растворяемых веществ в двух несмешивающихся фазах. Для осуществления ее необходима система, состоящая из неподвижной фазы (носителя) и подвижной фазы (растворителя). На неподвижную фазу наносится смесь веществ, и через нее пропускается ток растворителя. Чем лучше данное вещество растворимо в подвижной фазе, тем дальше оно продвинется по направлению тока растворителя по неподвижной фазе. Менее растворимые вещества распределяются ближе к точке нанесения.

Различают следующие виды распределительной хроматографии:

- колоночную;
- бумажную (лист бумаги рассматривают как сплюснутую колонку, где действуют законы и распределения, и адсорбции, и ионообмена);
- тонкослойную (на тонком слое адсорбента: силикагеля, окиси алюминия, ионообменной смолы);
- газовую, газожидкостную (подвижной фазой служит газ, и изучаемое вещество переводится в газообразную форму).

Химическая хроматография. Распределение происходит в результате установления прочной связи между разделяемым веществом и неподвижной фазой (комплексобразование, осадочная хроматография). Осадочная хроматография характеризуется многократным повторением процесса образования и растворения осадка, происходящего на поверхности высокодисперсного вещества.

Аффинная хроматография – биоспецифическая хроматография, которая находит применение в современных методах клинической химии.

Разделение компонентов анализируемой смеси методом *газовой хроматографии* основано на их многократном распределении между двумя различными фазами. Неподвижной фазой служит твердое вещество или жид-

кость, а подвижной всегда является газ. Если неподвижная фаза – твердое вещество (тип хроматографии – газ–твердое вещество), разделение компонентов смеси происходит за счет их различной способности связываться с адсорбентом. Если неподвижной фазой служит нелетучая жидкость (тип хроматографии – газ–жидкость), компоненты анализируемой смеси разделяются за счет их различной растворимости в неподвижной фазе.

Метод газовой хроматографии пригоден для анализа газов и других веществ, которые могут быть переведены в газообразное состояние без разложения (примером может служить образование летучих соединений метиловых эфиров жирных кислот).

Газовая хроматография является удобным методом разделения газов и смесей летучих веществ, молекулярная масса которых не превышает 300 Д.

Высокоэффективная жидкостная хроматография высокого давления (ВЭЖХ) – метод разделения веществ с использованием жидкости в качестве подвижной фазы. Разделение обусловлено тем, что одни компоненты разделяемой смеси сорбируются неподвижной фазой лучше, чем другие. Если компоненты разделяемой смеси лучше растворимы (сорбируются) в неподвижной фазе, то они перемещаются медленнее; если же их растворимость выше в подвижной фазе, они движутся быстрее.

ВЭЖХ находит применение для фракционирования, идентификации и количественного определения биологически важных органических соединений, в том числе белковой природы – белков, аминокислот и их производных. Одним из направлений применения технологий ВЭЖХ в клинической лабораторной диагностике является определение гемоглобинов, и прежде всего гликозилированного гемоглобина. С этой целью используются автоматизированная система для анализа гемоглобинов Variant, автоматический анализатор гемоглобина A Diastat, автоматический экспресс-анализатор гемоглобина A Diamat, анализатор гликированного гемоглобина D-10 («BioRad», США). Эти и другие аналогичные автоматические анализаторы, реализующие «золотой стандарт» в области выполнения исследований гликозилированного гемоглобина, характеризуются высокой производительностью: 10 проб на исследование гликозилированного гемоглобина исследуются на анализаторе D-10 в течение 30 мин. Для определения содержания гликозилированного гемоглобина используются наборы реагентов серии Микро («Pliva-Lachema», Чехия) и др.

Хроматографическое разделение является следствием разной скорости движения веществ по колонке и различий в скорости установления равновесия. ВЭЖХ под давлением осуществляется только в колоночном варианте (применяются узкие колонки диаметром 1–3 мм, размер частиц пористого носителя – не более 50 мкм, скорость протекания растворителя по колонке – около 5 мл/мин).

Для повышения чувствительности метода предпочтительно использовать флуориметрический детектор ВЭЖХ (например, анализатор Флуорат 02-2М производства НПФ «Люмэкс», Россия).

Жидкостная хроматография под давлением применяется для разделения смеси веществ с высокими температурами кипения. Этот метод используется для анализа веществ с большой молекулярной массой (1000–2000 Д и более).

НПП «Экотехника» и НПФ «Люмэкс» (Россия) разработаны аппаратура и методы ВЭЖХ для использования в области медицины. Они применяются для биохимической диагностики в кардиологии, неврологии, онкологии, гастроэнтерологии, наркологии, токсикологии, судебной медицине с целью определения содержания в биологических жидкостях и тканях: катехоламинов и их метаболитов (в том числе ванилилминдальной и гомованилиновой кислот), серотонина и его конечного метаболита 5-гидроксииндолуксусной кислоты, гистамина, простагландинов, нефропептидов, стероидов, аминокислот, полиаминов, моно- и дисахаридов, нуклеотидов, нуклеозидов, нуклеиновых кислот, спиртов, кетонов, гликолей, галогеноводородов, опиатов, белков, триглицеринов, ряда ксенобиотиков (барбитуратов, гербицидов и др.), активности ферментов.

Компанией «Biosystems» (Испания) поставляются очень удобные в применении «киты» (наборы реагентов с расходными материалами для определения катехоламинов, их метаболитов и других биологически важных веществ методом микроколоночной хроматографии). В последние годы в клинично-лабораторной практике все шире применяются методы тонкослойной хроматографии (ТСХ) на силикагеле. Разделение веществ в этом случае основывается на принципах адсорбционной и распределительной хроматографии. Для ТСХ удобно применять готовые к употреблению пластинки, поставляемые, например, компанией «Chemapol» (Чехия). В отдельных лабораториях Белоруссии находит употребление и выпускавшийся в СССР комплект оборудования для тонкослойной хроматографии КТХ-01.

При хроматографии в тонком слое применяют два основных типа пластинок: с закрепленным и незакрепленным (насыпным) слоем.

Пластинки с закрепленным слоем готовят, заливают суспензией мелко размолотого хроматографического материала в воде или органическом растворителе, к которой добавляют связующее вещество для закрепления слоя (например, крахмал). В некоторых случаях, когда присутствие связующего звена отрицательно сказывается на результатах анализа, его не добавляют в суспензию.

Пластинки с незакрепленным слоем готовят из одного сорбента, разравнивая его по стеклянной пластинке до получения слоя одинаковой толщины.

Пластинки с закрепленным (крахмалом) слоем силикагеля Silufol («Chemapol», Чехия) широко применяются для фракционирования липидов биологических жидкостей, гомогенатов тканей, других биосубстратов.

Техника фракционирования липидов на пластинках Silufol

Хроматографические пластинки Silufol перед применением рекомендуется активировать нагреванием в сушильном шкафу в течение 30 мин при тем-

пературе 100–110°C, но их можно применять и без активирования. В процессе активирования из слоя силикагеля удаляются пары воды, но они быстро проникают снова в сорбент, если активированные пластины не помещаются в эксикатор с серной кислотой (баланс с окружающей средой восстанавливается уже в первые минуты после удаления паров воды).

Перед хроматографией пластинки рекомендуется промыть (путем восхождения по ним фронта растворителей) с целью удаления примесей, случайно попавших в силикагель. После промывки пластинку сушат в токе теплого воздуха или в сушильном шкафу при 100–110°C в течение 30 мин. Нанесение вещества производится с помощью капилляров или тонко градуированных пипеток. Линии или точки нанесения диаметром примерно 3 мм должны быть на расстоянии 1,5–2,0 см от нижнего края пластинки, так, чтобы они не были погружены в разделяющую смесь.

В абсолютном большинстве случаев хроматографирования используется метод восходящего разделения в прямоугольных камерах шириной 90 мм, высотой и длиной 220 мм или камеры, в том числе импровизированные. В камеру наливается разделяющая смесь до высоты примерно 1 см и закрывается односторонне шлифованной крышкой для того, чтобы не происходила утечка паров растворителя. Пластинку в камере выдерживают до тех пор, пока фронт растворителя не достигнет верхнего края пластины. Разделительный путь – расстояние от места нанесения образцов (старта) до фронта растворителя – обычно равен 10 см. Если однократного восхождения растворителей недостаточно для фракционирования анализируемой смеси на компоненты, применяют ступенчатый метод разделения с применением двух, а иногда и большего количества разделяющих смесей друг за другом.

Смесь растворителей включает в себя полярную и неполярную жидкости. Полярный растворитель связывается с силикагелем и медленно перемещается по его поверхности, неполярный растворитель слабо связывается с силикагелем и как бы скользит по полярному растворителю. Вещества, хорошо растворимые в неполярной фазе («подобное растворяется в подобном»), перемещаются к верхнему краю пластины быстрее, чем полярные компоненты анализируемой смеси. На скорость перемещения веществ влияет и эффект различной сорбции их адсорбентом (силикагелем).

При подборе растворителя принимается во внимание то, что полярный растворитель сообщает веществу меньшую скорость перемещения, неполярный – большую. Полярность растворителей повышается в следующем ряду: гексан, циклогексан, четыреххлористый углерод, бензол, хлороформ, диэтиловый эфир, этилацетат, пиридин, ацетон, бутанол, пропанол, этанол, метанол, вода.

Обычно применяются смеси из двух и более составных частей, когда к неполярному растворителю добавляется определенное количество полярных составных частей, или кислота (уксусная, муравьиная), или аммиак.

Необходимо обратить внимание на то, что все растворители, применяемые в хроматографии, должны быть высокой степени чистоты. Некоторые

коммерческие растворители могут содержать стабилизированный, например добавкой 0,5–1,0% этанола, хлороформ; этот факт следует принимать во внимание, потому что такой вид хлороформа становится значительно более полярным и уже не соответствует своему месту в ряду полярности.

После окончания хроматографии пластинку вынимают из камеры, сушат в горизонтальном положении до полного испарения остатков растворителя.

Важным фактором, влияющим на процесс разделения, является степень насыщения хроматографических камер парами разделяющей смеси. Для хроматографии в насыщенной камере насыщение проводят следующим образом. Обе боковые и задняя стенки камеры обкладываются целой полоской фильтровальной бумаги, которая касается растворителя на дне камеры и пропитывается им. После этого атмосфера в закрытой камере насыщается в течение 2 ч. Только по истечении указанного периода на короткое время открывается крышка и в камеру быстро вставляется хроматографическая пластинка.

Универсальным методом обнаружения разделенных компонентов является просмотр хроматограмм при облучении коротковолновым (254 нм, «Silufol UV-254») или длинноволновым (366 нм, «Silufol UV-366») светом. Для этого в адсорбент вносится специальное флуоресцирующее вещество, проникающее в макроструктуру сорбента: в месте расположения пятна сорбент не светится. Это позволяет обвести тонкой иглой соответствующую фракцию для того, чтобы в дальнейшем произвести аналитическое исследование.

Крахмал, применяемый в качестве связующего звена, в отдельных случаях мешает определению компонентов анализируемой смеси. Это касается, прежде всего, метода обнаружения веществ с помощью йода либо серной кислоты.

Тонкослойная хроматография на пластинах Silufol нашла применение для качественного и количественного определения экзогенных и эндогенных веществ, в том числе гликозидов дигиталиса, стероидов (андрогенов, гестагенов, эстрогенов, кортикостероидов, синтетических стероидов, фракций 17-кетостероидов мочи, эстрогенов мочи беременных и небеременных женщин), фенотиазинов, психоаналептиков, тимолептиков мочи, барбитуратов мочи и промывных вод желудка, амидопирина, мепробамата, индолов, аскорбиновой кислоты и других водо- и жирорастворимых витаминов, сложных эфиров холестерина, фосфолипидов, глицеринов и других компонентов сыворотки крови, мочи и других биологических жидкостей.

Глава 11. САТУРАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ: ТЕХНОЛОГИЯ ВЫПОЛНЕНИЯ РАДИОНУКЛИДНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Сатурационный (насыщающий) анализ – вид исследования, основывающийся на конкурентном связывании некоторых веществ (лигандов) с анализируемым веществом биологического происхождения и его меченым аналогом, добавленным извне. Они конкурируют за лиганд, который используется в таком количестве, чтобы его связывающая способность была полностью насыщена. Очевидно, что чем больше в пробе определяемого вещества, тем меньше связывается меченое вещество. После этого отделяют комплекс от свободных ингредиентов и подсчитывают количество меченого вещества, определяемого как в составе комплекса, так и вне его.

В качестве лигандов используются три группы веществ биологического происхождения:

- антитела;
- специфические транспортные белки;
- рецепторные белки органов-мишеней.

Особенность метода конкурентного связывания (сатурационного анализа) состоит в том, что используемые в нем лиганды имеют исключительно биологическое происхождение; меченое же соединение получают из природного вещества, присоединяя к нему радиоактивную (или иную) метку в виде отдельного атома или химической группировки.

Важной разновидностью сатурационного анализа является радионуклидный, базирующийся на применении соединения с радиоактивной меткой.

В зависимости от природы связывающего акцептора принято различать:

- истинно радиоиммунологические методы, в которых в качестве связывающего компонента (лиганда) используются специфические к исследуемому веществу антитела;
- методы белково-конкурентного анализа, в которых связывающим реагентом являются специфические белки сыворотки крови (трансфертин, трансферрин, глобулин, связывающий тироксин; глобулин,

связывающий тестостерон, и т.д.). Их способность к комплексообразованию с транспортными белками сохраняется и в пробирке;

- методы радиорецепторного анализа, в которых в качестве акцепторов используются тканевые белки.

Различают следующие основные виды радионуклидного анализа: радиоиммунологический, иммунорадиометрический, радиоконкурентный, радиорецепторный.

Радиоиммунологический анализ

Этот метод анализа впервые предложен Р.С. Ялоу и С. Берсоном в 1960 г. для определения содержания эндогенного инсулина в плазме крови человека. Он основан на иммунохимической реакции антигена со специфическим антителом, проводится *in vitro* в присутствии меченого радионуклидом соединения. Определяемое вещество является антигеном, а радиоактивным индикатором служит меченый антиген. При оптимальном подборе концентрации основных реагентов и условий проведения реакции происходит конкурентная реакция меченого и немеченого антигена с определенным количеством специфического антитела. После достижения равновесия свободный антиген отделяется от антигена, связанного с антителом. Степень конкурентного ингибирования процесса связывания меченого антигена в опытных (неизвестных) образцах сравнивают с таковой в калибровочных растворах с известным количеством немеченого антигена и по калибровочной кривой определяют количественное содержание исследуемого вещества в анализируемой пробе. Большое сродство и высокая специфичность антител в сочетании с точностью и чувствительностью современных радиоиндикаторных методов служат гарантией надежности радиоиммунологического анализа.

Наряду с классическим радиоиммунологическим анализом, проводимым в гомогенной фазе (в растворе), в настоящее время применяются различные варианты так называемого твердофазного радиоиммунного анализа, при котором антитела фиксируются на твердой фазе (на иммуносорбентах).

Имунорадиометрический анализ

Этот метод отличается от радиоиммунологического тем, что в качестве меченого реагента используется антитело, а антиген (как калибровочный, так и анализируемый) является нерadioактивным компонентом реакции.

Радиоконкурентный анализ

Данный метод анализа базируется на конкурентном взаимодействии между исследуемым веществом, его меченым аналогом и связывающим компонентом, в качестве которого используются специфические белки плазмы (тироксинсвязывающий белок при определении тироксина и др.). Следует отметить, что по сравнению с радиоиммунологическим анализом радиоконкурентный (белково-конкурентный) обладает меньшей чувствительностью и более низкой специфичностью.

Радиорецепторный анализ

Это метод анализа, при котором в качестве специфически связывающего компонента реакции применяется тканевый рецептор (т.е. клеточный связывающий белок), а в качестве радиоиндикатора – меченый лиганд.

Большое практическое значение имеют «обратные» методы, состоящие в определении концентрации рецепторов в тканях, например, эстрогенных рецепторов в опухолевых тканях.

Преимуществом радиорецепторного анализа является то, что полученные результаты точно отражают биологическую активность исследуемых веществ.

Радиоферментный анализ

В качестве связывающего реагента для определяемого вещества и его меченого производного (радиоиндикатора) используется специфический фермент. Характерной особенностью радиоферментного анализа является его весьма высокая чувствительность.

Метки

В настоящее время в качестве радиоактивных меток применяют не только радиоактивные нуклиды, но и многие другие вещества, которые можно точно измерить в очень малых количествах и которые способны прочно связываться с молекулой лиганда, не вызывая заметных изменений его свойств. Кроме радиоактивных, используются следующие виды меток:

- *флуоресцентная метка* – менее чувствительна по сравнению с радионуклидной и поэтому позволяет проводить определение тех веществ, которые содержатся в биологических жидкостях в относительно больших концентрациях. Недостатком флуоресцентных меток является высокий уровень фона, обусловленный собственной флуоресценцией большинства биологических жидкостей организма, что может снижать точность определения;
- *ферментная метка* – метод основан на способности отдельных ферментов связываться (ковалентно) с другими молекулами, создавая тем самым основу для получения меченых соединений. Благодаря высокой каталитической способности ферментов одна их молекула вызывает превращение большого числа молекул субстрата. По степени разрушения фермента или образования новых продуктов можно определять активность фермента (а следовательно, содержания анализируемого вещества), используя для этого, например, метод колориметрии;
- *свободно-радикальная метка* – свободный радикал, т.е. молекула, содержащая неспаренный электрон, обладает магнитным моментом, который можно легко измерить с помощью метода электронного парамагнитного резонанса. При связывании со специфическим антителом свободный радикал иммобилизуется, что вызывает значительное изменение спектра электронного парамагнитного резонанса

са. Таким образом, для измерения содержания связанного и свободного меченых лигандов не нужно их разделять. Недостатком метода является его сравнительно низкая чувствительность.

Принцип сатурационного анализа представлен на рисунке 11.1.

При добавлении к биологической жидкости меченого гормона между ним и немеченым (анализируемым) гормоном происходит конкуренция за места связывания с антителом либо другим белком (например, транскортином) в реакции образования комплекса гормон-специфический белок. В случае, если в пробы биологической жидкости с различным содержанием анализируемого гормона добавляется всегда одинаковое количество меченого аналога, то его связывание с антителом во многом будет определяться исходной концентрацией гормона. Чем выше содержание в биологической жидкости исследуемого гормона, тем в большей мере он препятствует связыванию радиоактивного гормона (стандарта) со специфическим белком. Создаваемая свободным гормоном радиоактивность измеряется после отделения от него комплекса гормон-специфический белок. По предварительно построенной калибровочной кривой судят о концентрации анализируемого (меченого) гормона.

Таким образом, антиген и его меченый (например, тритием или йодом – ^{125}I) аналог, обладающие одинаковым родством к антителам, конкурируют за связывание с ними. В результате этого после непродолжительного инкубирования смеси антигена и его меченого аналога с антителами, необходимого для установления равновесия в системе, количество связанного с антителами меченого антигена будет находиться в обратной зависимости от концентрации антигена, внесенного в систему в составе анализируемой пробы. Для определения количества меченого антигена, связанного с антителами или оставшегося в свободном виде, проводится разделение связанной и свободной его форм. На заключительном этапе измеряют радиоак-

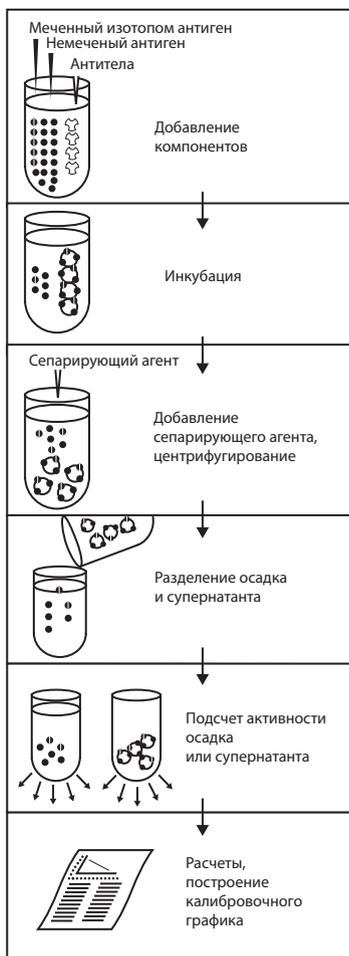


Рис. 11.1. Конкуренция между меченым и немеченым гормоном за места связывания на антителе.

тивность отдельного комплекса антигена с антителом или фракции, содержащей антиген в свободном виде.

Применение высокоспецифичных антител к анализируемому веществу в сочетании с изотопной меткой позволяет определять практически неограниченно широкий круг веществ с высоким уровнем чувствительности (10^{-15} г/л). Для исследования в ряде случаев требуется лишь несколько капель крови или другой биологической жидкости.

Преимущества радиоиммунологического анализа по сравнению с биохимическими методами исследования следующие:

- большая чувствительность, позволяющая определять ничтожно малые количества вещества (10^{-15} – 10^{-12} г/л), что обусловлено использованием радиометрических методов регистрации;
- высокая специфичность, связанная с применением принципа иммунологических (антиген–антитело) реакций;
- большая точность и удовлетворительная воспроизводимость метода;
- простота выполнения и значительная пропускная способность;
- отсутствие лучевой нагрузки на организм обследуемого, поскольку исследования проводятся *in vitro*.

Методы сатурационного анализа позволяют производить количественное определение в биологических жидкостях (плазме, сыворотке, моче, слюне и др.) любого химического вещества, к которому имеются специфические антитела.

Антигенами могут быть белковые и полипептидные гормоны молекулярной массой более 1000 Д. Степень антигенности возрастает с увеличением молекулярной массы частиц. Низкомолекулярные вещества обычно не обладают иммуногенными свойствами. Высокоспецифические антитела к антигенам с малой иммуногенностью образуются при химическом связывании последних с белковыми носителями (гаптенами), имеющими высокую молекулярную массу. Такими гаптенами являются сывороточные белки (альбумин или глобулины), синтетические пептиды (полизин), полимеры (поливинилпирролидон) и др.

В методах сатурационного (радионуклидного) анализа в качестве основных реагентов используют:

1. Выделенный из биологического материала и тщательно очищенный (или полученный путем химического синтеза) немеченый антиген (например, гормон). Он используется для построения калибровочной кривой, а также для получения меченого антигена и иммунизации животных с целью выделения специфических антисывороток.
2. Меченый (по йоду или водороду) антиген (гормон с высокой удельной активностью – 100 мкКи/мг).
3. Антисыворотку, содержащую специфические антитела (иммуноглобулины) к исследуемому антигену. Антисыворотку получают путем иммунизации животных (морских свинок, кроликов и др.) веществами, обладающими иммуногенными свойствами. Их вводят в организм животных с адьювантами, которые способны усиливать образование специфиче-

ских антител. Повторную иммунизацию производят с 3-недельным интервалом. Чтобы получить антисыворотку, кровь берут через 2–3 нед. после последней иммунизации. Для радиоиммунологического исследования необходимо использовать постоянное количество антисыворотки и меченого антигена, причем содержание антисыворотки всегда должно быть в дефиците, а меченого антигена – в избытке. Такие соотношения обеспечивают конкуренцию между неизвестным количеством определяемого антигена и меченым антигеном за ограниченное число мест связывания на антигенах.

4. Контрольную сыворотку.
5. Вспомогательные растворы.

В частности, при использовании твердофазной технологии выполнения исследований (например, пробирочной – для иммунорадиометрического определения лютеинизирующего гормона в плазме крови) в состав набора входят:

- ^{125}I -меченные моноклональные антитела к определяемому гормону;
- пробирки полистирольные с иммобилизованными моноклональными антителами к лютеинизирующему гормону (иммуносорбент);
- калибровочные пробы;
- контрольная сыворотка;
- промывочный раствор.

Этапы радиоиммунологического анализа

Радиоиммунологический анализ (РИА) состоит из четырех основных этапов: инкубации, разделения, радиометрического исследования и учета результатов.

1. Инкубация осуществляется при различных температурных режимах. Длительность ее зависит от молекулярной массы реагирующих антигенов и температуры, при которой происходит реакция. Для антигенов с малой молекулярной массой (тироксин, трийодтиронин, кортизол) время инкубации составляет от 30 мин до 2 ч; для антигенов с большой молекулярной массой (соматотропин, тиреотропин и др.) – 24 ч. Если инкубация проводится при комнатной температуре, этот процесс сокращается, а при низкой температуре (4°C) удлиняется. Из практических соображений часто отдают предпочтение инкубации с длительным сроком, так как при низкой температуре достигается большее равновесие между антигенами – свободными и связанными с антителами.
2. На втором этапе комплекс антиген–антитело отделяется от непрореагировавших компонентов. Чаще всего этот комплекс осаждают, добавляя в систему еще одну сыворотку, на этот раз с высоким титром антител против сыворотки того вида животных, который использовался для получения специфической антигормональной сыворотки. Образующийся преципитат отделяют центрифугированием или микрофльтрацией и подсчитывают радиоактивность надосадочной жидкости. Этот метод получил название метода двойных антител. Преципитат, осаж-

денный центрифугированием, остается в виде нежного хлопьевидного осадка на дне конусовидной пробирки. После повторного отмывания его подвергают радиометрическому исследованию. Разделение методом микрофльтрации значительно усложняет методику и увеличивает стоимость одного исследования. Чем больше в биологическом материале содержание анализируемого гормона, тем меньше может связаться с антисывороткой добавленного радиоактивного гормона.

Помимо метода двойных антител для отделения комплекса антитело–гормон применяются также адсорбция на угле, покрытом декстраном, фиксирование противогормональной сыворотки на иммуносорбенте (твердой основе, например, внутренней стенке пробирки), дезактивация протеолитическим ферментом (рицином).

Для разделения антигенов пептидной природы применяются активированный уголь, покрытый пленкой декстрана (молекулярной массой 100–250 000 Д), или ионообменная смола Амберлайт СС-400 («Rohm&Naas», США). Достаточно чувствительным и эффективным способом разделения комплекса антиген–антитело и свободного антигена является предварительное связывание этого комплекса веществом на твердой основе – иммуносорбентом. В качестве последнего используются различные нерастворимые полимеры: бромацетилцеллюлоза, сефадекс и сахароза. Свободный антиген отделяется декантацией (сливанием раствора) или низкоскоростным центрифугированием.

3. Радиометрическое исследование преципитата или надосадочной жидкости производят с использованием сцинтилляционных счетчиков. Гормоны белковой и пептидной природы, содержащие аминокислоты тирозин и гистидин, обычно метят ^{125}I , который обладает достаточно длительным периодом полураспада (60 сут.) и низкоэнергетическим γ -излучением. Антигены, не содержащие указанных аминокислот, обычно метят тритием, являющимся источником чистого β -излучения с очень низкой энергией и длительным периодом полураспада (12 лет). Преимущество метки ^{125}I заключается в простоте радиометрического исследования проб (для этого применяют рутинные колодезные счетчики). Метка антигена радиоактивным тритием позволяет длительно хранить меченые вещества (до 4 мес.), однако требует специальных жидкостных сцинтилляционных счетчиков для радиометрии. Для измерения радиоактивности антигенов, меченных ^{125}I или ^{75}Se , используются колодезные сцинтилляционные счетчики на радиодиагностических универсальных установках, например российские радиодиагностические универсальные установки УРУ-64 и УССМ или установки производства компании «Гамма» (Венгрия) и др. Радиометрическая оценка содержания антигенов, меченных тритием, осуществляется на жидкостных сцинтилляционных счетчиках типа УССМ, СБС-1 или автоматических сцинтилляционных системах, выпускаемых зарубежными фирмами, например, Cobra («Canberra Packard», США), в комплект которой, кроме γ -счетчика, вхо-

дит автоматический пробоотборник. Для этих целей можно использовать автоматический γ -счетчик «Wizard 1480» («Perkin Elmer», США), γ -счетчик производства компании «Immunotech» (Чехия) с базой для исследования иммунной системы; γ -счетчик производства компании «Beckman Coulter» (США).

4. Учет результатов. Наряду с оценкой радиоактивности опытных и стандартных проб проводят радиометрию контролей общей активности – Т (меченый антиген) и связывания – В (меченый антиген и разведенная антисыворотка). Затем выполняют расчет. Известно несколько систем выражения результатов:

- В/Ф – отношение радиоактивности фракции, связанной с антителом (В), к свободной фракции (Ф);
- В/Т – отношение радиоактивности фракции, связанной с антителами, к общей радиоактивности меченого антигена;
- В/В₀ – отношение радиоактивности фракции, связанной с антителами (В), к радиоактивности фракции, связанной с антителами при нулевой концентрации стабильного антигена (В₀).

Институтом биорганической химии Национальной академии наук Беларуси совместно с хозрасчетным опытным предприятием ИБОХ освоено выпуск широкого спектра наборов реагентов для радиоиммунологического и иммунорадиометрического исследования гормонов и других физиологически важных веществ, в том числе: РИА-Т3-СТ (трийодтиронин), РИА-Т4-СТ (тироксин), РИА-Т4-свободный, РИА-ТТГ-М (тироксинсвязывающий глобулин), РИА-ТГ-СТ (тиреоглобулин), РИА-АТ-ТГ (антитела к тиреоглобулину), ИРМА-Анти-ТГ-СТ (аутоантитела к тиреоглобулину), Стерон-К (кортизол), РИА-Кортизол-СТ, Стерон-Е-3 125, РИА-Стерон-Е (эстрадиол), РИА-Эстрадиол-СТ, РИА-Прогестерон-СТ, РИА-Пролактин-ПР, РИА-Тестостерон-ПР, РИА-Тестостерон-СТ, РИА- β -2-микроферритин, РИА-ПЛ (плацентарный лактоген), РИА-РЭА (раковый эмбриональный антиген), а также: ИРМА-ТТГ-СТ, ИРМА-АНТИ-ТПО, ИРМА-АНТИ-ТГ-СТ, ИРМА-ТГ-СТ, ИРМА-ЛГ-СТ, ИРМА-ФСГ-СТ, ИРМА-ПРОЛАКТИН-СТ, ИРМА-ПСА-СТ, ИРМА-ПСА-свободный СТ.

Набор реактивов для иммунорадиометрического определения специфического антигена предстательной железы в сыворотке крови человека (ИРМА-ПСА-СТ) позволяет выявлять как доброкачественные, так и злокачественные заболевания предстательной железы. Нормальные значения в диапазоне 0–4 мкг/л; диапазон значений 4–10 мкг/л характерен для доброкачественной гиперплазии и доброкачественной опухоли предстательной железы, выше 10 мкг/мл – для злокачественной опухоли предстательной железы.

Все эти тест-системы соответствуют конструкции *наборов двух поколений*.

Конструкция наборов первого поколения: жидкофазные гомогенные системы с неспецифическими адсорбентами (осадителями) комплекса антиген–антитело и отделением их центрифугированием.

Конструкция модифицированных наборов первого поколения: жидкофазные гомогенные системы с использованием специфических осадителей комплекса антиген–антитело и их удаления центрифугированием.

Конструкция наборов второго поколения: гетерогенные системы с использованием твердофазных специфических реагентов для связывания антигенов или антител без центрифугирования.

В настоящее время радиоиммунологический микроанализ широко используется для ранней диагностики эндокринных, онкологических, аллергических, инфекционных и других заболеваний, а также для контроля эффективности проводимого лечения.

Радиоиммунологическому микроанализу свойственны высокая информативность и достоверность. Его достоинством является и то, что он позволяет осуществлять в стандартно оборудованных лабораториях диагностику различных заболеваний и проводить среди населения массовые профилактические обследования, направленные на своевременное, раннее распознавание онкологических и других заболеваний.

Глава 12. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ

После появления первых сообщений о возможности присоединения молекул ферментов к обычным белкам (Nakane P.K., Pierce G.B., 1966; Avrameas S., 1969) усилия исследователей сконцентрировались на разработке таких методов количественного анализа, в которых бы индикатором реакции служила *способность энзимов вызывать разрушение субстрата с образованием в конечном итоге окрашенного продукта*. В 1971 г. стало возможно определение таким способом IgG и хорионического гонадотропина.

В настоящее время методы иммуноферментного анализа (ИФА) занимают важное место в арсенале лабораторий мира. Экологичность, высокая специфичность и воспроизводимость, возможность использования относительно простой, дешевой отечественной аппаратуры и доступных наборов реагентов открывают перспективы широкого использования данного метода в медицинской практике.

Материалом для иммунологических исследований могут служить различные биологические жидкости: сыворотка, плазма крови, спинномозговая, амниотическая жидкость, слюна и др.

Для количественного анализа применяют в основном *два варианта выполнения ИФА*. Первым этапом их осуществления является связывание моноспецифических антител (или антигена) на поверхности твердой фазы, затем проводятся реакции конкурентного или непрямого (сэндвич) типа.

При *первом варианте* метода антиген, меченный ферментом, конкурирует с немеченым исследуемым антигеном за содержащиеся на твердой фазе антитела, ферментативная активность в этом случае обратно пропорциональна количеству антигена в исследуемом образце.

При *втором варианте* метода конкурентные отношения отсутствуют, антигены исследуемой биологической жидкости реагируют с иммобилизованными на твердой фазе антителами, после чего избыток смеси удаляют и в реакцию вводят меченные ферментом антитела, которые связываются уже иммобилизованным антигеном. В этом случае ферментативная активность прямо пропорциональна количеству антигена в исследуемом биологическом материале.

В качестве ферментных меток используются пероксидаза хрена, щелочная фосфатаза, глюкозооксидаза и β -галактозидаза. При действии фер-

мента на хромоген образуется окрашенный продукт, о концентрации которого судят по оптической плотности фотометрируемого раствора.

Принцип твердофазного (плащечного, пробирочного, а также с использованием шариков и звездочек, вносимых в пробирки) *иммуноферментного анализа ELISA* (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) состоит в формировании комплекса, напоминающего собой слоеный пирог, в котором определяемое вещество составляет один из его «внутренних слоев», а индикаторный фермент – самый внешний.

12.1. Техника лабораторного исследования

При использовании метода плащечного твердофазного ИФА определение выполняют в лунках, стенки которых изготовлены из специального материала, эффективно адсорбирующего антитела, – полистирена. Сначала в них вносят первичные антитела (например, кроличьи антитела к человеческому альбумину). После их адсорбции на стенках и удаления избытка вносят исследуемую пробу. Содержащиеся в ней молекулы альбумина посредством первичных антител фиксируются на стенках лунки. После этого в лунки добавляют вторичные антитела (к человеческому альбумину), связывающиеся с альбуминовыми молекулами, которые адсорбированы на первичных антителах (ELISA – метод двойных антител). Четвертый слой иммунного «пирога» – фермент пероксидаза, фиксированный на антителах, связывающихся со вторичными антителами. При этом количество фиксированной пероксидазы прямо пропорционально содержанию альбумина в исследуемой пробе. После добавления каждого реагента и завершения реакции связывания избыток непрореагировавших белков тщательно удаляют, промывая реакционное поле буферным раствором. На конечном этапе определения проводят ферментативную реакцию, для чего в лунку добавляют о-фенилендиамин и перекись водорода. Благодаря присутствующей пероксидазе о-фенилендиамин окисляется, его окисленная форма является окрашенным соединением, и через некоторое время интенсивность окраски измеряется фотометрически (рис. 12.1).

Иммуноферментный тест типа ELISA в последние годы широко используется для определения разнообразных биологически важных веществ, в том числе липопроотеина(а) – ЛП(а). Реакция осуществляется в несколько этапов. Вначале в исследуемую сыворотку (плазму) крови добавляют антисыворотку, содержащую избыточное, но строго определенное количество анти-ЛП(а). В результате взаимодействия ЛП(а) и анти-ЛП(а) образуются иммунные комплексы, которые удаляются из раствора. Далее антисывороткой, содержащей остаток анти-ЛП(а), обрабатывается поверхность внутренних стенок лунок полистирольной плашки, в которых находится антиген ЛП(а). На следующем этапе антитело взаимодействует с конъюгатом – иммуноглобулином, связанным с ферментом пероксидаз. Под влиянием последней происходит разложение субстрата, что сопровож-

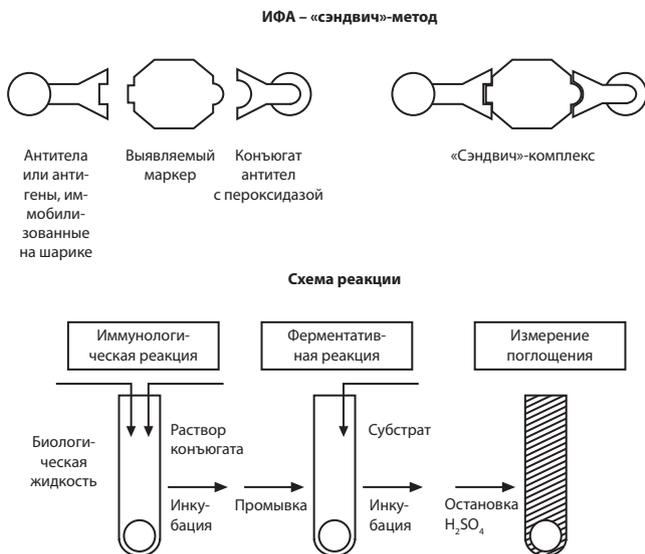


Рис. 12.1. Принцип осуществления твердофазного иммунного анализа.

ждается появлением окраски содержимого лунок, выраженность которой регистрируется специальным фотометром, позволяющим оценить концентрацию определяемого вещества.

Наряду с автоматизированными используются и мануальные (ручные) методы иммуноферментного анализа, основанные, в частности, на принципе иммунохроматографического исследования. Так, например, бесприборные иммунохроматографические экспресс-тесты Bioline («Standard Diagnostics, Inc.», Корея) используются для диагностики инфекций (гепатита, сифилиса, туберкулеза и др.), определения онкомаркеров (АФП, РЭА), скрытой крови в кале, диагностики беременности (определение хорионического гонадотропина).

Практические советы по постановке ИФА

1. Целесообразно составить схему расположения бланков, а также стандартов, контролей и образцов на планшете и убедиться в том, что все необходимые реагенты нагрелись до комнатной температуры.
2. Если допущена ошибка при внесении анализируемых образцов, нельзя, удалив сыворотку из этой лунки, вносить в нее новый образец.
3. Каждый из исследуемых образцов следует вносить, используя новый наконечник для пипетки.
4. Особое внимание следует обращать на точность пипетирования. Чтобы свести к минимуму возможные отклонения в результатах из-за разного времени инкубации, нужно вносить реагенты с одной и той же скоростью.

5. Необходимо оптимизировать и стандартизировать режимы работы с микропланшетами. Слишком интенсивное удаление жидкости во-шером может подсушить белковое покрытие в ячейке, инактивировав его, а слишком слабое – привести к тому, что останутся капельки жидкости. Не оставляйте ячейки микропланшета сухими между стадиями добавления реагентов. Если в ходе работы возникли непредвиденные задержки, нужно заполнить ячейки промывающим раствором.
6. Предпочтительно дублировать анализ образцов.
7. Одной из причин получения неудовлетворительных результатов при работе с твердофазными планшетами является использование шейкеров-инкубаторов, не обеспечивающих необходимую интенсивность встряхивания. Поэтому предпочтение следует отдавать тем наборам (например, производства фирмы «Pliva-Lachema», Чехия), которые не требуют использования шейкеров. При использовании этих тест-систем инкубация проводится без встряхивания при комнатной температуре или при 37°C в термостате.
8. Температурный режим в термостате также является фактором, оказывающим выраженное влияние на протекание иммунохимической реакции в лунке. Низкая температура воздуха в лаборатории (ниже 18°C) приводит к тому же результату, что и плохое встряхивание.
9. Во время инкубации необходимо заклеить микропланшет адгезивной пленкой или закрыть крышкой (за исключением стадии инкубации с субстратом, во время которой планшет закрывают только крышкой).
10. Инкубировать планшеты с субстратом следует в темноте, таким образом можно избежать краевых эффектов на планшете.
11. Следует регулярно проверять точность работы оборудования.
12. Необходимо постоянное проведение внутрилабораторного контроля качества анализов и участие лаборатории в системе внешнего контроля качества анализов.
13. При выборе фирмы-поставщика ИФА-реагентов и необходимого оборудования следует ориентироваться на тех производителей, которые овладели всеми тонкостями этого метода, гарантируют поставки качественной продукции, оказывают сервисную и методическую поддержку пользователям и хорошо зарекомендовали себя в России и странах СНГ.
14. Желательно, чтобы выбранные тест-системы были укомплектованы контролем 1–3 различных уровней или были совместимы с международными контрольными материалами.
15. Для лабораторий с небольшим объемом исследований важно, чтобы после вскрытия набора реагентов его компоненты оставались стабильными длительное время. Необходимо учитывать, что, как правило, после вскрытия они стабильны не более 1–2 мес.

12.2. Отдельные представители современных автоматических устройств для выполнения иммуноферментных исследований

- *Автоматический ИФА-анализатор Microlab SD STAR IVD ELISA («Hamilton», США)* является полным автоматическим иммуноферментным анализатором с блоками обработки образцов, инкубации, промывки и считывания результатов (фотометр). Этот комплекс позволяет проводить в полностью автоматическом режиме все процедуры, необходимые для обработки стандартных ELISA- и EIA-тестов (открытая система для обработки тест-систем в формате 96-луночных планшетов).

Прибор позволяет проводить автоматическое определение уровня гормонов, онкомаркеров, выполнять тесты на аллергены. Благодаря многочисленным и дублирующим друг друга контрольным функциям и системе документирования каждой автоматической операции, выполняемой роботом, этот прибор очень хорошо подходит для автоматизации скрининга крови на вирусы (ВИЧ, HCV, HBsAg и др.), регулярно проводимых на станциях переливания крови.

Модульная архитектура прибора позволяет при необходимости расширить возможности анализатора, обеспечив автоматическое взаимодействие с другим оборудованием в лаборатории. Кроме того, возможна интеграция с внешней информационной системой и возможность работы под ее управлением.

- *Планишетные иммуноферментные анализаторы открытой серии Freedom EVOlyzer («Tecan Group Ltd.», Швейцария)* используют единую технологию исследования, но обладают различной производительностью. Полная автоматизация иммуноферментного исследования позволяет избежать ошибок и обеспечить уверенность лаборатории в правильности получаемых результатов. Приборы данной серии характеризуются различным количеством (2, 4, 8) пипетирующих каналов. Технологический процесс исследования позволяет одновременно вносить образцы и реагенты в несколько планшетов одновременно в режиме мультипипетирования, что многократно увеличивает производительность анализатора.
- *Иммуноферментные автоматические анализаторы АИФ-М/340, АИФ-Ц-01С*, разработанные ООО «Системы анализа» и серийно выпускающиеся в Белоруссии на ПО «Витязь» и в России на ПО «Завод им. М.И.Калинина», в настоящее время широко используются в клинических лабораториях.
- *Микропланшетный анализатор Multiskan («Thermo Fisher Scientific», Финляндия)* представляет собой лабораторно-диагностическую систему, которая включает:
 - фотометр серии Multiskan: Ascent, Plus, Biclromatic, MCC/340 или Multisoft;

- промыватель (автоматический 8- или 12-канальный вошер) для 96-луночных планшетов, который легко калибруется для U-, V- или плоскодонных планшетов; оснащен 7 различными программами промывки;
- инкубатор/шейкер – устройство, сочетающее в себе свойства инкубатора и встряхивателя (интервал температуры 14–40°C, время прогревания до 24–37°C – менее 20 мин, 5 скоростей встряхивания, может работать сразу с 2 или 4 планшетами);
- 96-луночные планшеты и разборные микрострипы, позволяющие использовать только необходимое для анализа количество лунок;
- компьютер, к которому анализатор может быть подключен для сбора и обработки данных;
- одно- и многоканальные цифровые пипетки (на 4, 8, 12 наконечников); многоканальные пипетки с переменным объемом; многоканальные шаговые диспенсеры, наконечники одноразового пользования;
- комплект реактивов для ИФА.
- *Фотометры универсальные Ф300ТП и Ф300 (ПО «Витязь», Белоруссия) с вертикальным типом фотометрирования* позволяют использовать одноволновой и двухволновой методы измерения. Они предназначены для диагностики заболеваний методом ИФА при использовании отечественных и зарубежных тест-систем. Измерение производится в микрообъеме в 96-луночных стандартных планшетах или стрипах.
- *Фотометр иммуноферментный твердофазный планшетный «ЭФОС 9305» («Юнимед», Россия)* представляет собой восьмиканальный фотометр для вертикальной фотометрии с планшетами, состоящими из 96 ячеек (микрокувет). После установки оператором в прибор планшета последний автоматически, под управлением встроенного компьютера, перемещается таким образом, что в позиции измерения поочередно оказываются все его лунки. По окончании измерения планшет автоматически возвращается в исходную позицию. Обслуживание анализатора несложно и доступно среднему медицинскому персоналу. Легкость работы достигается использованием простого в работе интерфейса, клавиатура прибора эргономична и не вызывает утомления оператора. Требования к исследованиям и результаты измерений регистрируются печатающим устройством. Система встроенного контроля не допускает распечатывания недостоверных результатов при сбоях в работе прибора, ошибках оператора или ухудшении качества используемых тест-систем. Диагностическая достоверность результатов измерений дополнительно повышается за счет автоматической проверки прибора непосредственно перед измерением каждого планшета.

Приборы оснащены переключаемыми по определенной программе интерференционными светофильтрами и позволяют проводить измерения светопоглощения в следующих режимах работы:

- на одной длине волны (одноволновой принцип);
- на двух различных длинах волн (двухволновой принцип). Этот режим фотометрии позволяет устранить ошибки, возникающие за счет дефектов дна лунок;
- с «холостой» пробой.

Результаты измерений выражаются в единицах оптической плотности, концентрации, а также в единицах оптической плотности с качественной оценкой реакции («+», «–», «?») в зависимости от заданных оператором параметров.

- *Специальное оборудование для проведения плащечного ИФА* (спектрофотометры, промыватели микропланшет, инкубаторы) от простых полуавтоматических приборов до полностью автоматизированных комплексов-роботов («*Organon Teknika*», *Нидерланды*), в частности, полностью автоматизированный комплект модульного оборудования для ИФА-диагностики для лабораторий со средними объемами выполнения исследований, в состав которого входят *спектрофотометр «Reader 530»*, *промыватель «Washer 400»*, *инкубатор «Incubator 500»*, многоканальные пипетки и принтер. Комплект может дополняться программным обеспечением MIMS (Microplate Information Management Software), которое управляет аппаратным комплексом, позволяет производить учет и оценку результатов и поддерживает оперативную обработку базы данных. Фирма «*Organon Teknika*» также выпускает ИФА-системы для диагностики ВИЧ, вирусных гепатитов (А, В, С, D), сифилиса, цитомегаловирусной инфекции, краснухи, токсоплазмоза и др.
- Для отмывки иммунологических планшетов используются *автоматические микропланшетные промыватели (вошеры)*, например, *WellWash AC («Thermo Fisher Scientific»*, *Финляндия*) и другие аналогичные приборы мировых производителей лабораторного оборудования, а также разработанные и выпускаемые белорусскими предприятиями устройства, например, *MB-350 («СОЛАР»)*.
- *Наборы диагностических тестов* для осуществления плащечного твердофазного анализа предлагаются различными компаниями. В частности, «*Immunotech*» (*Чехия*) выпускает тест-системы для определения цитокинов (ИЛ-1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 13), факторов оценки тиреоидной функции, роста, аллергии, онкомаркеров. Используются в клинических лабораториях тест-системы *фирм «Eurogenetics» (Япония–Бельгия)*, «*Seratec*» (*Германия*), «*Trinity Biothech PLC*» и «*Bio-Rad*» (*США*). Все они базируются на использовании наиболее совершенного принципа аналитического определения ELISA (с применением двойных моноклональных антител). Могут быть использованы в различных областях медицины (нео-

натология, акушерство и гинекология, эндокринология, аллергология, ревматология, вирусология, инфекционные болезни, клиническая лабораторная диагностика). Наборы реагентов позволяют устанавливать содержание гормонов (щитовидной железы, гипофиза, коры надпочечников, плаценты), аномальных и специфических белков биологических жидкостей – маркеров онкологических, вирусных и инфекционных заболеваний, многочисленных факторов гуморального и клеточного иммунитета (включающих, в частности, ИЛ-1, 2, 6, 8, рецепторы к интерлейкинам, моноклональные антитела к Т- и В-лимфоцитам: CD3, 4, 8, 26), белков миелиновой оболочки нервных клеток; осуществлять диагностику туберкулеза, сифилиса, отдельных форм коллагенозов, инфаркта миокарда, физиологически и патологически протекающей беременности.

Адаптированные к наиболее широко используемым лабораторно-диагностическим устройствам тест-системы выпускаются в Белоруссии на базе Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси (ИБОХ НАН РБ) совместно с хозрасчетным опытным предприятием ИБОХ НАН РБ, в частности ИФА-наборы с использованием моноклональных антител и наиболее современной (стрептавидин-биотиновой) технологии их иммобилизации; наборы реактивов для ИФА ряда биологически важных веществ с использованием разборных микропланшетов, биоспецифически покрытых антителами или антигенами, адаптированных к аппаратно-измерительным комплексам белорусского производства (ИФА-Т4, ИФА-ТТГ, ИФА-ТГ, ИФА-Анти-ТГ, ИФА-ферритин, ИФА-тестостерон, ИФА-прогестерон, ИФА-эстрадиол, ИФА-кортизол и др.).

Глава 13. ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ И ПРОТОЧНАЯ ЦИТОФЛУОРИМЕТРИЯ

13.1. Иммунофлуоресцентный анализ

Метод иммунофлуоресценции разработан Н. Coons и соавт. (1941), показавшими возможность присоединения флуоресцентных красителей к молекулам иммуноглобулинов без нарушения их специфической активности. В этом виде анализа в качестве индикаторов при определении антигенов и антител используются флуоресцирующие вещества.

В настоящее время применяются разнообразные варианты иммунофлуоресцентного анализа: поляризационно-флуоресцентный (базирующийся на принципе как «тушения» флуоресценции, так и усиления ее), твердофазная флуоресценция, электрохемилюминесценция. Первые три методики предназначены для прямого определения флуоресцирующих веществ без их выделения из реакционной среды. При твердофазном иммуноферментном анализе возникает потребность в предварительном удалении продуктов реакции, создающих фоновые помехи.

Суть процедуры определения веществ методом твердофазной флуоресценции сводится к тому, что сначала осаждают антитела на твердом носителе, например, на стенках пластиковых пробирок или полистироловых шариках, вносимых в исследуемую сыворотку (определение α -фетопroteина). Затем пробу центрифугируют и сливают жидкость, содержащую все несвязанные компоненты реакции. После этого добавляют меченные флуоресцеином антитела, проводят реакцию связывания, избыток материала удаляют отмыванием и измеряют флуоресценцию.

Методы электрохемилюминесцентных исследований базируются на способности рутения, осмия, рения и других веществ образовывать высокореакционные соединения на поверхности электрода. Хемилюминесцентная реакция инициируется приложением электрического напряжения к содержащему рутений иммунному комплексу, связанному с покрытыми стрептавидином магнитными частицами. В состав иммунного комплекса входят определяемый антиген и два моноклональных антитела, одно из которых мечено рутением, а другое связано с биотином, обеспечивающим взаимодействие всего иммунного комплекса с магнитными микрочастицами, покрытыми стрептавидином. Благодаря возможности циклическо-

го усиления сигнала обеспечивается линейный режим измерения в весьма широком диапазоне, охватывающем изменения концентрации на 6–8 порядков. Это позволяет исключить разведение проб и значительно сократить время анализа (до 9–18 мин после пипетирования).

Аппаратура для регистрации флуоресценции выпускается компаниями «Thermo Fisher Scientific», Финляндия (Fluoroskan, Luminoskan); «Immunotech», Чехия (люминометрическая система Luminometric systems Liana), «BioMerieux», Франция (компактный автоматический экспресс-анализатор miniVidas для выполнения иммуноферментного анализа по технологии ELFA), «Abbott Laboratories», США (приборы Imx и TDx для флуоресцентно-поляризационного иммуноанализа).

В люминометрической системе Liana используется принцип иммунометрического исследования с регистрацией результатов по величине усиленной в ходе реакции люминесценции. Анализируемые образцы и стандарты инкубируют в непрозрачных (белых) лунках, покрытых специфическими моноклональными антителами. Конъюгат вторых моноклональных антител (ILMA) или антиген (LIA) с пероксидазой хрена инкубируют вместе с образцами. После этого ячейки планшета промывают, удаляя несвязанный конъюгат, и в лунки вносят сигнальный реагент. Световой сигнал регистрируют с использованием люминометра Liana или другого прибора, способного измерять интенсивность света, излучаемого лунками микропланшета (например, Amerlite производства «Amersham Radiochemical PLC», Великобритания). Результаты интерпретируют с помощью компьютерной программы Liana. Хемиллюминесцентные иммунодиагностические наборы для системы Liana, предназначенные для использования в области эндокринологии (определение гормонов щитовидной железы и др.), онкологии (онкомаркеры) и др., выпускаются фирмами «Immunotech» (Чехия) и «Abbott Laboratories» (США).

Особенностью анализатора miniVIDAS является введение калибровочных кривых при помощи штрих-кода, что значительно упрощает эксплуатацию автоанализатора. В двух секциях его могут быть одновременно размещены 12 пластинок, предназначенных для проведения исследований. В каждой из них имеются ячейки с уже готовыми к использованию реагентами. Реакция проводится после внесения в них исследуемой сыворотки (плазмы) и начала контакта со специальным конусом, содержащим моноклональные антитела (для чего нажимается кнопка «старт»). Результат может быть получен через 30–90 мин. Фирмой предлагаются диагностические наборы для проведения не только количественного, но и качественного (скринингового) определения, что удешевляет выполнение исследований.

Для проведения иммунного анализа по электрохемиллюминесцентной технологии используются автоматические анализаторы «Elecsys 1010», «Elecsys 2010» и наборы реагентов производства «F. Hoffman-La-Roche Ltd.» (Швейцария), позволяющие одновременно выполнять без постановки дублирующих проб до 6 (модель 1010) и 15 (модель 2010) исследований с производительностью 60 и 80 анализов в час соответственно. Идентифи-

кация реагентов, калибраторов и анализируемых образцов осуществляется с помощью штрих-кода. Все используемые тест-системы, разработанные на основе стрептавидин-биотиновой технологии с применением рутениевой метки, обладают весьма высокой стабильностью. Предназначаются для диагностики онкологических, инфекционных заболеваний, анемий, инфаркта миокарда, оценки репродуктивной функции, выявления гинекологических заболеваний и поражений щитовидной железы.

13.2. Проточная цитофлуориметрия

Основной принцип цитофлуориметрических исследований состоит в том, что клеточная суспензия, предварительно меченная флуоресцирующими моноклональными антителами или флуоресцентными красителями, попадает в поток жидкости, проходящий через проточную ячейку. Условия исследования подобраны таким образом, что клетки выстраиваются друг за другом за счет так называемого гидродинамического фокусирования струи в струе. В момент пересечения клеткой лазерного луча детекторы фиксируют рассеяние света под малыми углами ($1-10^\circ$) и рассеяние света под прямым углом, а также интенсивность флуоресценции по четырем каналам флуоресценции. Измерение этих характеристик позволяет определить размеры клеток, гранулярность их цитоплазмы, субпопуляционный состав клеточной суспензии (по наличию или отсутствию определяемых клеточных маркеров), а также многие другие параметры.

К числу проточных цитофлуориметров относятся *Epics XL* и *Epics XL-MCL* («Beckman Coulter», США). Это приборы нового поколения, которые позволяют проводить клеточные исследования так же легко и быстро, как рутинные клинические анализы крови. Используются такие цитофлуориметры в области иммунологии (иммунофенотипирование клеток периферической крови, исследование иммунного статуса, определение фагоцитарной активности, определение внутриклеточных цитокинов и т.д.), онкологии (исследование ДНК, стадий клеточного цикла, определение специфических маркеров и др.), цитологии (определение цитоморфологической принадлежности клетки, оценка активности внутриклеточных ферментов с помощью флуорогенных субстратов, определение экспрессии поверхностных антигенов, измерение физиологических параметров клетки и т.д.), гематологии (анализ субпопуляционного состава клеток периферической крови, в том числе подсчет ретикулоцитов, анализ тромбоцитов по специфическим маркерам), фармакологии (измерение экспрессии маркеров и активности внутриклеточных ферментов, определение стадии клеточного цикла в рамках изучения механизмов воздействия различных биологически активных веществ на клеточном уровне, в том числе иммуномодуляторов).

Производительность приборов составляет до 60 образцов в час. Она ограничивается в основном только временем подготовки клеток к исследованию.

В комплект цитофлуориметров входят O-Prep и DNA-Prep – станции автоматической пробоподготовки для лейкоцитарного фенотипирования и анализа ДНК.

Проточный цитофлуориметр *FACS Calibur* («Becton Dickinson», США) позволяет осуществлять иммунофенотипирование (диагностику гемобластозов, оценку клеточного иммунитета при различных иммунологических нарушениях), осуществлять подсчет абсолютного количества клеток, выполнять анализ стволовых клеток в соответствии с международными протоколами, осуществлять оценку функциональной активности клеток (по содержанию цитокинов, активационных маркеров), выраженность апоптоза, состояние неспецифического звена иммунитета (фагоцитоз), выполнять ДНК-анализ, проводить генетические исследования, исследования в области протеомики.

Технология проточной цитофлуориметрии используется также в гематологических автоанализаторах нового поколения, например, ХЕ-2100 («Sysmex Corp.», Япония).

13.3. Технологии электрохемилюминесцентных исследований

Базируются на способности рутения, осмия, рения и других веществ образовывать высокореакционные соединения на поверхности электрода. Хемилюминесцентная реакция инициируется приложением электрического напряжения к содержащему рутений иммунному комплексу, связанному с покрытыми стрептавидином магнитными частицами.

В состав иммунного комплекса входят определяемый антиген и 2 моноклональных антитела, одно из которых мечено рутением, а другое связано с биотином, обеспечивающим взаимодействие всего иммунного комплекса с магнитными микрочастицами, покрытыми стрептавидином.

Линейный режим измерения охватывает изменения концентрации на 6–8 порядков. Это позволяет исключить разведение проб и значительно сократить время анализа (до 9–18 мин после пипетирования).

Для проведения иммунного анализа по электрохемилюминесцентной технологии используются автоматические анализаторы «ELECSYS 1010», «ELECSYS 2010» и наборы реагентов фирмы «Рош Диагностика», позволяющие одновременно выполнять без постановки дублирующих проб до 6 (1010) и 15 (2010) исследований с производительностью 60 (1010) и 80 (2010) анализов в час.

Глава 14. МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР-ТЕХНОЛОГИЯ)

В настоящее время все большее внимание уделяется лабораторному методу исследования, основанному на полимеразной цепной реакции (ПЦР). *Благодаря применению ПЦР-технологии удастся выявить и воспроизвести миллионы копий (процесс амплификации) того участка ДНК, который принадлежит болезнетворному агенту, например, внедрившемуся в организм человека возбудителю вирусных и инфекционных заболеваний, т.е. осуществить анализ на генетическом уровне.* Нуклеотидная последовательность этого участка ДНК болезнетворного агента является *целевой* для ПЦР-анализа (см. рис. 14.1).

Если целевая последовательность нуклеотидов ДНК вируса, бактерии, другого возбудителя заболевания известна, то способом искусственного синтеза можно получить органическое вещество (праймер) с комплементарной последовательностью нуклеотидов, которая дает возможность праймеру прикрепляться к одной из нитей ДНК в строго определенном месте.

Такой праймер – копия небольшого (соответствующего 20–30 нуклеотидам) участка ДНК, являющаяся своеобразным «стартовым блоком», с которого под влиянием ДНК-полимеразы начинается удлинение цепи, комплементарной нуклеотидам нити материнской ДНК. Для удлинения цепи используются азотистые основания (нуклеотиды) и другие компоненты, вводимые в реакционную смесь.

Новообразованная цепь наполовину состоит из нативной (оригинальной) нити ДНК и наполовину – из новообразованной, комплементарной (обе нити составляют половинки «лестницы» ДНК).

Если свойственная праймеру последовательность азотистых оснований характерна только для вируса, находящегося в клетке человека, то, несмотря на огромное количество присущего человеку генетического материала и малое количество ДНК вируса (*«иголка в стоге сена»*), будет создан отрезок комплементарной цепи, характерный только для болезнет-

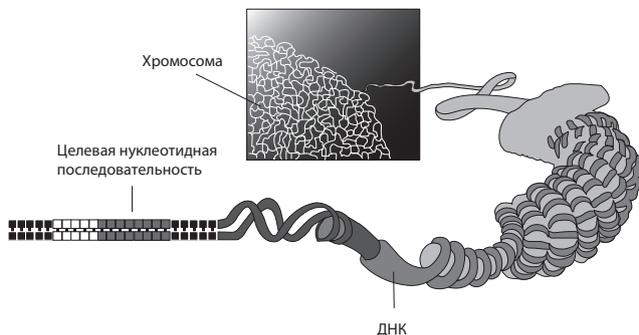


Рис. 14.1. Целевая последовательность нуклеотидов ДНК болезнетворного агента.

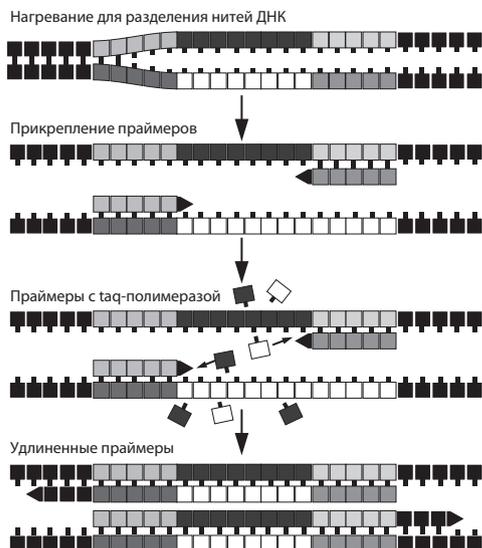
ворного агента. Для обнаружения, например, вируса достаточно, чтобы в пробе содержался участок ДНК возбудителя с 200 парами оснований. В дальнейшем создаются специальные условия, необходимые для разделения полученных новых спиралей ДНК на две нити.

В результате вместо одной ключевой последовательности получают две точно такие же. Данный процесс повторяется вновь и вновь. Во втором цикле количество нитей ДНК увеличивается до четырех, так как каждая из двух даст по две новые ключевые последовательности. За 25 повторяющихся циклов производится миллионы копий фрагментов ДНК. Таким образом осуществляется процесс умножения, или амплификации, фрагментов ДНК. Для развития реакции достаточно наличия в пробе 10–30 молекул болезнетворного агента, сама же цепная реакция стартует при наличии в пробе 3–5 дублей нитей.

Весь технологический процесс исследования с использованием ПЦР осуществляется в три этапа: подготовка образца; проведение самой полимеразной реакции, направленной на умножение (амплификацию) фрагментов ДНК биологического возбудителя заболевания; оценка результата. Рассмотрим этапы первого цикла ПЦР (рис. 14.2).

На *первом этапе* образец, содержащий ДНК болезнетворного агента, вносится в небольшую пробирку, содержащую компоненты, обеспечивающие протекание полимеразной реакции: два вида праймеров, два энзима (taq-полимераза и N-урацилгликолаза) и четыре вида нуклеотидов (А, С, G и Y).

На *втором этапе* для проведения полимеразной реакции используется специальное устройство (термоциклер, или циклотермостат, ДНК-амплификатор) с автоматическим изменением температурного режима в приборе. В первом цикле осуществления ПЦР анализируемый образец нагревается (примерно до 94°C) для разделения двух комплементарных нитей ДНК (денатурация). Затем температура опускается до 40–60°C, и праймеры прикрепляются к единичной цепи ДНК, после чего температура вновь поднимается, доходя до уровня 72°C (при этом наиболее выраже-

Рис. 14.2. Первый цикл ПЦР.

на активность полимеразы). Весь цикл, связанный с изменением температуры, продолжается менее 3 мин. Он повторяется 20–30 раз.

Результаты ПЦР анализируются с использованием метода иммуноферментного анализа, электрофореза в полиакриламидном, плоском агаровом геле.

В соответствии с методологией фирмы «F.Hoffman-La-Roche Ltd.» (Швейцария) содержимое пробирок, извлеченных из термоциклера, переносится в лунку специального планшета. На дне лунки содержится фиксированный к внутренней ее поверхности бычий сывороточный альбумин (БСА), способный связываться с копиями нитей ДНК. После инкубации неиспользованные компоненты реакции удаляются с водой. Для количественной оценки реакции добавляется авидин-энзимный комплекс. После дальнейшего отмывания и добавления определенных реагентов раствор принимает характерную окраску, интенсивность которой регистрируется фотометрически (см. рис. 14.3).

Основными преимуществами ПЦР являются быстрота выполнения анализа, высокая чувствительность и специфичность. ПЦР находит применение для выполнения как фундаментальных (генотипирование тканей), так и прикладных клинико-лабораторных исследований, в том числе для: диагностики ВИЧ-инфекции (ВИЧ-1/ВИЧ-2), гепатитов В и С; заболеваний, вызываемых бактериальной микрофлорой (туберкулез, атипичная пневмония, гонорея, сифилис, менингит, гастрит, дизентерия, тифоидная лихорадка), простейшими (амебная дизентерия, токсоплазмоз и др.), грибами (кандидоз и др.), а также для выявления Т-клеточной лейкемии, папиллом.

ПЦР может быть использована для обнаружения единичных, точечных мутаций (связанных с заменой одного азотистого основания на дру-

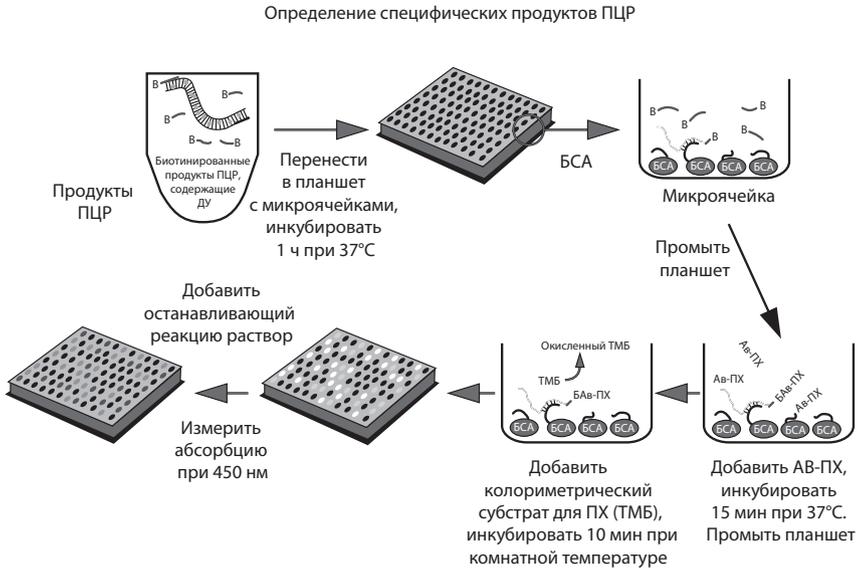


Рис. 14.3. Определение специфических продуктов ПЦР. Ав – авидин; ПХ – пероксидаза хрена; ДУ – дезоксиуридин; ТМБ – тетраметилбензидин; БСА – бычий сывороточный альбумин; БАв-ПХ – комплекс авидин–пероксидаза хрена–БАС.

гое). Весьма велико значение реализации этой новой технологии и в области осуществления проекта «Человеческий геном».

С 1991 г. ПЦР широко применяется в Белоруссии для контроля качества выпускаемых иммуноглобулиновых препаратов, диагностики ВИЧ, гемофилии, заболеваний, вызываемых ретровирусной, хламидийной, урогенитальной инфекцией и др. В настоящий период молекулярно-биологические исследования на основе ПЦР стремятся выполнять в режиме реального времени.

НПФ «Литех» (Россия) поставляет наборы реагентов для ПЦР-диагностики, оборудование для выполнения молекулярно-биологических исследований на основе ПЦР и соответствующие расходные материалы.

Компания «ДНК-технология» (Россия) поставляет полный комплект лабораторного оборудования для ПЦР, который включает в себя амплификатор ДНК многоканальный «Терцик», трансиллюминаторы и системы регистрации гелей, микроцентрифуги, дозаторы, оборудование для электрофореза, оборудование для регистрации результатов амплификации с гибридационной схемой детекции, оборудование для пробоподготовки и др. Оборудование и тест-системы для постановки ПЦР поставляются также рядом других фирм, например, «Интермедсервис» (Россия), предприятием «АмплиСенс», созданным на базе ФГУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора РФ.

Организация работ в клиничко-диагностических лабораториях при проведении ПЦР-исследований

Случайное загрязнение исследуемых проб нуклеиновыми кислотами или их амплификационными фрагментами (контаминация исходной ДНК или продуктами ПЦР) может происходить в результате воздействия пыли и аэрозолей. Вследствие этого организация рабочей зоны в лаборатории основывается на системной локализации по месту этапов метода, вовлеченных в получение результатов, и на принципе «поточности».

Для предупреждения контаминации необходимо территориально разделить различные этапы ПЦР-анализа и проводить их в отдельных помещениях: помещении для пробоподготовки (обработка клинического материала и выделение ДНК/РНК – пре-ПЦР; помещении для постановки реакции амплификации (подготовка реакционной смеси и постановка амплификации) – ПЦР-зона; помещении для анализа результатов (детекция продуктов амплификации) – пост-ПЦР.

Проведение других видов работ в данных помещениях лаборатории запрещается.

Транспортировка проб должна осуществляться в термосах или термоконтейнерах. Каждый образец для исключения взаимной контаминации хранят и транспортируют в отдельном полиэтиленовом пакете.

Планировка и размещение оборудования должны обеспечивать поточность движения исследуемого материала. Не допускается движение воздушных потоков из помещений пост-ПЦР в помещения пре-ПЦР и ПЦР.

Помещения на всех этапах ПЦР-анализа должны быть оборудованы бактерицидными лампами из расчета 2,5 Вт на кубический метр.

Для ежедневной уборки каждого из помещений необходимо использовать отдельный уборочный инвентарь.

Генеральная уборка помещений проводится 1 раз в неделю в 3 этапа с использованием растворов дезинфицирующих средств.

Для каждой стадии ПЦР-анализа следует использовать свой комплект лабораторной одежды, автоматических пипеток, расходных материалов, оборудования и холодильников. Чтобы исключить контаминацию, переносное оборудование в каждой рабочей зоне должно быть промаркировано. Перенос оборудования, автоматических пипеток и лабораторной одежды из одного помещения в другое запрещен.

Рабочие поверхности, оборудование и материалы следует обрабатывать после работы спиртосодержащим дезинфицирующим раствором с последующим облучением ультрафиолетом в течение 1 ч с максимумом излучения в области 260 нм. Обработка одежды из различных помещений должна проводиться отдельно.

Работа на всех этапах должна проводиться только с использованием одноразовых расходных материалов (пробирок, наконечников для автоматических пипеток, перчаток). При переходе от пробы к пробе наконечники должны использоваться однократно.

Использованные пробирки и наконечники подлежат дезинфекции, они должны сбрасываться в специальные контейнеры или емкости, содержащие дезинфицирующий раствор.

Подготовка пробы и выделение ДНК/РНК проводится в зоне пре-ПЦР. Выделение ДНК/РНК из клинического материала следует проводить в специальных ПЦР-боксах, имеющих встроенные бактерицидные лампы; для контроля за контаминацией объектов внешней среды продуктами амплификации следует 1 раз в неделю проводить смывы с рабочих поверхностей пре-ПЦР зоны с последующим выполнением ПЦР-анализа на наличие в них ампликонов определяемых микроорганизмов.

Амплификация ДНК проводится в помещении ПЦР-зоны. Приготовление амплификационной смеси необходимо проводить в специальных ПЦР-боксах, имеющих встроенные бактерицидные лампы; помещение ПЦР-зоны необходимо подвергать облучению ультрафиолетом с максимумом излучения в области 260 нм в течение 2 ч до начала работы и в течение 2 ч после окончания работы для инактивации продуктов амплификации. Рабочую поверхность ПЦР-бокса также следует подвергать облучению встроенной бактерицидной лампой в течение 2 ч до начала работы и в течение 2 ч после окончания работы; для контроля контаминации продуктами амплификации следует 1 раз в неделю проводить смывы с рабочих поверхностей данной зоны (поверхности рабочих столов, ручки дверей, подоконники) для выполнения последующего ПЦР-анализа в данных смывах на наличие в них ампликонов определяемых микроорганизмов.

Детекция и идентификация результатов ПЦР-исследований проводится в помещении для детекции и анализа результатов – пост-ПЦР.

Для инактивации продуктов амплификации, попавших в окружающую среду, следует проводить облучение помещения пост-ПЦР ультрафиолетом с максимумом излучения в области 260 нм в течение 2 ч до начала работы и в течение 2 ч после окончания выполнения исследований.

Глава 15. ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ И КАЧЕСТВА ВЫПОЛНЕНИЯ КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

15.1. Оценка результатов лабораторного исследования по оптической характеристике фотометрируемого раствора

Качество выполнения лабораторного исследования во многом определяется правильно выбранной и осуществленной методикой оценки полученных при работе с фотометрической аппаратурой результатов. Она базируется на использовании градуировочного графика (таблицы), факторов пересчета, а также формулы, учитывающей значения абсорбции (экстинкции) и концентрации стандартных проб, обрабатываемых параллельно с опытными в одинаковых с ними условиях.

15.1.1. Оценка результатов по калибровочной кривой

Градуировочная (калибровочная) кривая отражает тесную зависимость между абсорбцией (A), называемой также оптической плотностью (D) или экстинкцией (E), а в отдельных случаях, например в процессе осуществления пламенной фотометрии, флуориметрии – интенсивностью излучения света и концентрацией (C) вещества в сериях стандартных растворов (см. рис. 15.1).

К построению калибровочной кривой можно приступить лишь после того, как будет достигнута уверенность в том, что метод лабораторного исследования достаточно хорошо отработан. В противном случае точность расчета по калибровочной кривой оказывается неудовлетворительной из-за неадекватности условий и техники обработки стандартных и опытных проб.

При построении градуировочного графика следует стремиться к тому, чтобы калибровочные растворы помимо стандартного вещества содержали если не все, то основные (сказывающиеся на течении реакции) компоненты биологической жидкости. Это достигается применением стандартных сывороток и водных растворов, содержащих ингредиенты плазмы, способные интерферировать с определяемыми веществами, в количестве, примерно

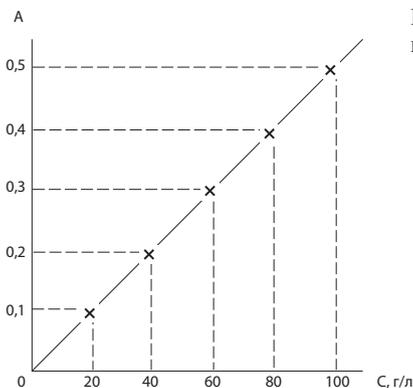


Рис. 15.1. Схема построения калибровочной кривой.

соответствующем таковому в исследуемой биологической жидкости. Так, например, при определении содержания билирубина в плазме (сыворотке) крови стандартные растворы должны содержать белок (альбумин), поскольку он не только предохраняет билирубин от окисления, но и усиливает интенсивность окраски получаемых в процессе реакции азопигментов. При определении концентрации ионов калия в плазме крови стандартные растворы должны заключать в себе также ионы натрия и кальция (в концентрации, соответствующей содержанию этих ионов в анализируемой биологической жидкости), так как они влияют на интенсивность свечения ионов калия в пламени газовой горелки пламенного фотометра.

Стандартные растворы должны готовиться с особой тщательностью, из навески, полученной на весах для очень точного взвешивания (аналитических и др.). При этом следует обратить внимание на то, чтобы стандартные вещества строго отвечали своей химической формуле, имели высокую степень чистоты и достаточную стабильность, не были гигроскопичны и не взаимодействовали с газами воздуха. Навеска должна быть достаточно большой для уменьшения технической ошибки взвешивания. Последнему способствует взвешивание стандартного вещества не в обычно тяжелом (массивном) бюксе, а на листочке целлофана (либо полиэтиленовой пленки) с последующим количественно полным перенесением вещества в соответствующую стеклянную мерную посуду. Как правило, вещество перед взвешиванием высушивают до постоянной массы в сушильном шкафу при 110°C .

Используемую для получения стандартных растворов градуировочную мерную посуду нужно предварительно тщательно обезжирить и вымыть. Не рекомендуется сушить мерную посуду (в частности, мерные колбы) в сушильном шкафу, так как при высокой температуре меняется ее объем и нарушается градуировка.

Построение калибровочной кривой начинается с приготовления арифметического ряда разведений с последующей обработкой стандартных растворов аналогично опытными пробам. В отдельных случаях стандартные вещества можно использовать на конечном этапе исследования, например,

путем их нанесения на электрофореграмму (либо хроматограмму), что несколько усложняет расчет результатов и привносит погрешность за счет неучтенных потерь анализируемого вещества в процессе его выделения (экстракции и других процедур).

Разведения стандартного вещества должны охватывать диапазон физиологических концентраций и выходить за пределы их минимальных и максимальных величин (до значений, могущих иметь место при разных формах патологии). Так, например, при исследовании содержания общего белка в сыворотке (плазме) крови концентрация альбумина в стандартных растворах должна быть в интервале от 40 до 120 г/л (при физиологической концентрации общего белка 65–85 г/л).

В большинстве случаев ряд калибровочных растворов получают путем разбавления основного, маточного раствора (как это имеет место, например, при определении содержания общего белка плазмы или сыворотки крови). Известно, что чем концентрированнее раствор стандартного вещества, тем оно дольше сохраняется в нем. Растворы многих низкомолекулярных соединений (гистамина, серотонина) можно хранить в замороженном состоянии. После оттаивания из основного раствора стандарта часто делают промежуточные разбавления (одно или несколько).

Для каждой рабочей концентрации стандартного вещества нужно сделать 3–5 фотометрических или других (например, денситометрических) определений. Всего исследуется 2–3 серии окрашенных растворов, при этом выполняется 6–12 определений каждого рабочего разведения стандарта.

Суть построения градуировочной (калибровочной) кривой сводится к тому, что определенные объемы растворов серии стандартных проб исследуются в условиях, полностью идентичных таковым при тестировании опытных образцов.

Измерения оптической плотности начинают со стандартного раствора наименьшей концентрации. Усредненные (соответствующие отдельным концентрациям) значения оптической плотности (абсорбции, экстинкции) наносят на миллиметровую (калибровочную) бумагу. На оси абсцисс (горизонтальной) с соблюдением одинаковых интервалов откладывают равномерно возрастающие показатели концентрации вещества в стандартном растворе, на оси ординат (вертикальной) – соответствующие им величины абсорбции (см. рис. 15.1). Зависимость между двумя сопоставляемыми величинами отражается линией, построенной уже по трем точкам. Однако строить калибровочный график следует не менее чем по пяти точкам. Калибровочная кривая рисуется тонко отточенным карандашом и желательнее с помощью прозрачной линейки таким образом, чтобы по возможности большее число точек (например, 3 из 5) лежало на линии, а остальные располагались рядом с ней, на примерно равном расстоянии от нее ниже и выше. Отдельные точки, располагающиеся на значительном расстоянии от калибровочной кривой, обычно являются результатом грубой ошибки определения, поэтому они исключаются из учета. Точки принято обозначать крестиками (точка не имеет ширины). Оси координат чертят в виде

отрезков прямой со стрелками (линии большой толщины), на их фоне калибровочная кривая должна представлять собой тонкую линию.

Кривая должна начинаться с нулевой точки и находиться под углом примерно 45° к осям координат, при этом достигается наибольшая точность измерений, чему способствует также выбор оптимального, достаточно крупного масштаба. В правом верхнем углу листа с калибровочным графиком указывают наименование калибровочной кривой, ссылку на метод исследования (например, «РАР» – метод определения содержания глюкозы в сыворотке крови), номер светофильтра (или его конкретную физическую характеристику – максимум пропускания), длину оптического пути кюветы (в миллиметрах), дату построения калибровочной (градуировочной) кривой. При этом учитывают, что у большинства обычных фотоэлектроколориметров наиболее благоприятная область измерений лежит в пределах значений абсорбции 0,1–0,3 (максимум до 0,7).

Чтобы правильно построить калибровочную кривую, необходимо знать, какие условия оказывают влияние на расположение линии в системе координат. Если абсорбция опытной пробы оказывается не скорректированной на экстинкцию контрольной, то часто не удается достичь совпадения нулевого значения оптической плотности с нулевым значением концентрации. Методы с таким построением калибровочного графика не рекомендуются для использования в КДЛ.

Ряд причин вызывает нарушение прямо пропорциональной зависимости между абсорбцией и концентрацией вещества в растворах:

- присутствие в среде посторонних электролитов, вызывающих деформацию молекул или комплексных ионов окрашенных веществ;
- гидратация (сольватация), сказывающаяся на поглощении раствором светового потока, так как с изменением концентрации раствора этот процесс протекает неравнозначно;
- неполное взаимодействие исследуемого вещества с реактивом при его разбавлении;
- изменение взаимовлияния частиц при разбавлении раствора;
- сдвиг рН раствора, влияющий на полноту образования и состав молекул окрашенного соединения;
- изменение степени диссоциации вещества в растворе при разбавлении.

Основное значение в нарушении прямо пропорциональной зависимости между абсорбцией и концентрацией имеет то, что сопровождающаяся образованием окрашенного соединения химическая реакция протекает не строго стехиометрично, т.е. не всегда бывает полной. Примером этому служит взаимодействие аммиака с реактивом Несслера.

Кроме причин, связанных с состоянием вещества в растворе, ряд физических факторов, в частности недостаточная монохроматизация светового потока, способны вызвать отклонения в прямо пропорциональной зависимости между оптической плотностью и концентрацией. В случае, если через абсорбируемый слой пропускается световой поток со значительным интервалом длин волн, то величина экстинкции может изменяться неравно-

мерно, с увеличением (уменьшением) толщины слоя раствора и концентрации вещества в нем, что приводит к искривлению калибровочной кривой.

15.1.2. Построение простой калибровочной кривой и ее проверка

Для построения простой калибровочной кривой готовят 5 разных разведений из концентрированного (основного) стандартного раствора. Абсорбцию каждой пробы, включая «холостую», определяют 3 раза. При этом в качестве раствора сравнения используют воду или соответствующий растворитель. Для каждого из 6 троекратных определений (5 исследований раствора стандарта и одно «холостой» пробы) вычисляют средние величины. Усредненный показатель «холостой» пробы вычитают из аналогичных величин стандартных проб.

Скорректированные таким образом средние значения абсорбции располагают на оси ординат калибровочного графика (величина экстинкции «холостой» пробы совпадает с нулевой точкой координат). Из соответствующих точек оси ординат проводят тонкие линии, параллельные горизонтальной оси абсцисс.

На ось абсцисс наносят значения концентрации. Из полученных точек восстанавливают перпендикуляры и через места их пересечений с перпендикулярами, восстановленными из соответствующих точек на оси ординат, проводят калибровочную кривую.

Для проверки простой калибровочной кривой третья (средняя) концентрация определяется 20 раз, и из 20 полученных величин вычисляют среднее арифметическое значение (\bar{X}) и среднеквадратичное, или стандартное, отклонение (S). После этого через нулевую точку и точку средней величины 20-кратного определения проводят прямую линию. Основные калибровочные точки должны быть расположены от этой прямой не дальше чем на $+1,2S$. Если это условие выполнено, то калибровочная кривая может считаться прямолинейной и достаточно точной.

15.1.3. Пример построения калибровочной кривой

Пусть требуется построить калибровочную кривую для определения в сыворотке (плазме) крови концентрации вещества А. Если она у практически здоровых людей равна 60–80 г/л, то для построения калибровочной кривой используют растворы стандарта с концентрациями в диапазоне физиологических значений и выходящими за его пределы. Выбирают, например, интервал значений 20–120 г/л. Поскольку стандартное вещество является, как правило, дорогостоящим реактивом, а со временем техника выполнения анализа совершенствуется, то для сохранения стандарта и соблюдения одинаковых условий определения на протяжении всего периода исследований строить калибровочную кривую можно лишь после того, как возникает уверенность в том, что техника аналитических определений достаточно хорошо отлажена и в дальнейшем не будет изменяться. Об этом свидетельствует хорошая воспроизводимость результатов в серии и изо дня в день.

Сначала готовят основной раствор. Чем он более концентрированный, тем дольше сохраняется в нем стандартное вещество. Даже если концентрация основного стандартного раствора является неточной (процентной), готовить его следует, пользуясь весами для очень точного взвешивания и точной мерной посудой. Иногда выполняют промежуточные разведения стандартного раствора (перед получением ряда рабочих растворов стандарта), но чаще всего из основного раствора сразу получают конечные разведения. Из каждого разведения основного раствора стандарта с концентрацией 20, 40, 60, 80, 100 и 120 г/л отбирают, к примеру, по 0,1 мл раствора (ровно столько, сколько берется сыворотки или другого биологического материала для исследования) и вносят в первые три пробирки каждого из трех рядов, размещенных в большом четырехрядном штативе. В последующем в каждую пробирку добавляют определенный объем (например, 5 или 4 мл) «цветного» реагента. Определяют экстинкцию каждого из растворов, содержащих одинаковое количество стандартного вещества, 3 раза и полученные значения абсорбции усредняют (если одно из трех значений значительно отличается от двух близких между собой, то его не учитывают, так как оно является результатом технической ошибки взвешивания). Допустимо отмечать (в виде крестика) каждое из трех значений в выбранной системе координат и в дальнейшем использовать среднее по расположению в ней.

На миллиметровой (калибровочной) бумаге вычерчивают оси координат. На оси ординат откладывают значения абсорбции, на оси абсцисс – концентрации. Чтобы калибровочная кривая была более точной, следует использовать достаточно крупный масштаб графика.

Опыт работы показывает, что длина осей абсцисс и ординат калибровочного графика должна быть 20 см и более. Для того чтобы кривая располагалась под углом примерно 45° к осям, берут максимальные значения концентрации и абсорбции, если между ними сохраняется прямо пропорциональная зависимость. В приведенном нами конкретном примере конечная точка отрезка из 20 крупных (1 см) клеток на оси абсцисс соответствует концентрации 120 г/л, а на оси ординат – максимальному из полученных для 6 определений значений абсорбции (0,6). На основании этих данных находят факторы калибровки по следующим формулам:

$$\frac{C_{\max}}{20} = \frac{120}{20} = 6 \text{ г/л};$$

$$\frac{A_{\max}}{20} = \frac{0,6}{20} = 0,03,$$

где 6 г/л и 0,03 – значения концентрации и абсорбции, соответствующие масштабу 1 см (одна крупная клетка). Разделив 6 г/л и 0,03 на 10, находят цену 1 мм деления на осях абсцисс и ординат.

Через точки, обозначенные крестиками, проводят линию, пользуясь прозрачной линейкой, так, чтобы она проходила через большинство точек. Точки, не попавшие на линию, должны располагаться рядом с ней по обе стороны на примерно одинаковом расстоянии.

Чтобы облегчить процедуру откладывания величины абсорбции стандартных и опытных проб на оси ординат, рекомендуется разделить величину экстинкции (например, 0,2) на 0,03 (0,2/0,03). Полученное число (в данном случае 6,67) показывает, на каком расстоянии (в см) от нулевой точки следует сделать отметку для восстановления из нее перпендикуляра (в данном случае следует отмерить отрезок из 6 крупных (1 см) клеток и 7 мм). Так же поступают со всеми остальными показателями при откладывании их на вертикальной оси. Из отложенных на осях значений восстанавливают перпендикуляры, в точках их пересечения ставят крестики, ориентируясь на которые, проводят калибровочную кривую.

Помимо нахождения факторов, отражающих цену деления большой и малой клетки на горизонтальной и вертикальной осях, рассчитывают фактор пересчета по формуле: $f = C/A$. При этом лучше всего найти соответствующий фактор для каждой из шести точек измерений и затем установить среднее значение этого показателя:

$$f = \frac{f_1 + f_2 + f_3 + f_4 + f_5 + f_6}{6}$$

С помощью калькулятора можно быстро определить концентрацию вещества в опытной пробе по формуле: $C = f \cdot A$, даже если f – не круглое число.

Цену деления на оси ординат можно найти и другим способом. Пусть $A_1 = 0,28$; $C_1 = 60$ г/л; $A_2 = 0,40$; $C_2 = 80$ г/л. Составляем пропорцию для A_1 и C_1 :

$$\begin{aligned} 0,28 &— 60 \text{ г/л} \\ 0,01 &— X \\ X &= \frac{0,01 \cdot 60}{0,28} = 2,14. \end{aligned}$$

Составляем пропорцию для A_2 и C_2 :

$$\begin{aligned} 0,40 &— 80 \text{ г/л} \\ 0,01 &— X \end{aligned}$$

Таблица 15.1

Градуировочная таблица для нахождения концентрации анализируемого вещества

A	C	A	C
0,02	20	0,08	80
0,04	40	0,10	100
0,06	60	0,12	120

$$X = \frac{0,01 \cdot 80}{0,40} = 2,00.$$

На осях координат отмеривают одинаковые отрезки для соответствующих показателей абсорбции и концентрации.

15.1.4. Расчет результатов по градуировочной кривой

Для облегчения расчетов рекомендуется на основании калибровочной кривой составлять калибровочную (градуировочную) таблицу. С этой целью только 1 раз находят концентрации вещества для каждого из значений абсорбции, взятого с интервалом 0,02 A (удобно пользоваться фактором пересчета). В подготовленной таблице против каждого значения абсорбции приводят соответствующее значение концентрации (табл. 15.1). При промежуточных значениях абсорбции берут примерно соответствующие им (ориентировочные) показатели концентрации.

Калибровку (градуировку) следует проверять не менее 2 раз в год. Но при переходе на реактивы иной серии (квалификации), изменении юстировки лампы, замене каких-либо деталей в приборе необходимо строить новую калибровочную кривую. Недопустимым является использование калибровочных факторов, выведенных при пользовании другими фотометрами, даже если они того же типа. Использование калибровочных факторов, прилагаемых к описанию фотометров, также не рекомендуется. Они могут быть приведены только для сравнения и исключения грубых ошибок.

15.2. Расчет результатов по формуле

Помимо расчета результатов по калибровочной кривой, можно применять способ расчета с помощью стандарта по формуле. В некоторых случаях этот способ расчета является единственно допустимым (например, при определении концентрации глюкозы ортотолуидиновым методом, поскольку даже небольшое изменение условий прогревания проб может существенно сказаться на результатах). Рекомендуется ставить не одну, а несколько стандартных проб, притом не только с одинаковой концентрацией стандарта (как, например, в случае определения содержания неорганического фосфора унифицированным методом), а с разной, в том числе более

высокой (например, при исследовании концентрации глюкозы у больных сахарным диабетом), поскольку результаты получаются более точными, если величины абсорбции сопоставляемых проб очень близки. Расчет производится по следующей формуле:

$$\frac{A_{\text{оп.}}}{A_{\text{ст.}}} = \frac{C_{\text{оп.}}}{C_{\text{ст.}}}$$

$$\frac{A_{\text{оп.}}}{A_{\text{ст.}}} = \frac{C_{\text{оп.}}}{C_{\text{ст.}}}$$

$$C_{\text{оп.}} = \frac{A_{\text{оп.}} \cdot C_{\text{ст.}}}{A_{\text{ст.}}}$$

Несмотря на то что вся процедура определения для стандартной пробы производится каждый раз параллельно с таковой опытных, наиболее точные результаты, как считается, дает способ расчета по калибровочной кривой, поскольку исследование лишь одной или даже нескольких стандартных проб может привести к появлению грубой ошибки измерения. К тому же концепция расчета по стандарту, основывающаяся на допущении о всегда имеющей место прямой пропорциональной зависимости между абсорбцией и концентрацией, на практике оказывается не всегда верной.

Расчет результатов по формуле при выполнении исследований в режиме фиксированного времени (или кинетическом режиме) приведен в главе 8 (см. раздел 8.3).

15.3. Расчет результатов в условных единицах

Расчет результатов в условных единицах осуществляется в единицах оптической плотности или в единицах абсорбции, умноженных на 100 или 1000, в зависимости от точности, с которой устанавливаются значения (до второго или третьего знака после запятой). Этим способом обычно пользуются при невозможности получить вещество в чистом виде путем синтеза или выделения его из биологических жидкостей и тканей, например, при определении содержания аполипопротеина В в сыворотке крови.

15.4. Выбор светофильтра

Если возникают сложности в выборе наиболее подходящего для проведения фотометрических измерений светофильтра, раствор наливают в кювету и измеряют абсорбцию при всех светофильтрах. По полученным дан-

Таблица 15.2

Подбор светофильтров

Цвет исследуемого раствора	Примерный диапазон длин волн, нм	Цвет подходящего светофильтра	Примерный диапазон длин волн, нм
Фиолетовый	400–450	Желто-зеленый	560–575
Синий	450–480	Желтый	575–590
Зелено-синий	480–490	Оранжевый	590–625
Сине-зеленый	490–500	Красный	625–750
Зеленый	500–560	Пурпурный	–
Желто-зеленый	560–575	Фиолетовый	400–450
Желтый	575–590	Синий	450–480
Оранжевый	590–625	Желто-зеленый	480–490
Красный	625–750	Сине-зеленый	490–500

ным (согласно описанным выше правилам) строят кривую, откладывая на оси абсцисс значения длины волны (нм), соответствующие максимальному коэффициенту пропускания светофильтров (они указаны в паспорте прибора), а на оси ординат – найденные при соответствующих значениях длины волны величины оптической плотности. Отмечают на графике участок линии, отражающий наибольшую величину абсорбции и располагающийся примерно параллельно оси абсцисс. Ориентируясь на него и выбирают нужный светофильтр.

Из двух примерно одинаковых (по области пропускания) светофильтров выбирают тот, при работе с которым чувствительность прибора (оцениваемая по максимальному значению A) оказывается наибольшей. Подбор светофильтра может быть облегчен использованием специальной таблицы (табл. 15.2).

15.5. Методология контроля качества лабораторных исследований

Неотъемлемой частью работы каждой КДЛ является постоянное осуществление контроля качества (КК) кинических лабораторных исследований, направленное на предупреждение и устранение возможных лабораторных ошибок, а следовательно, на повышение надежности клинического лабораторного исследования.

Контроль качества – это система мер, направленных на количественную оценку показателей надежности выполненных лабораторией лабораторных исследований, а именно точности, сходимости, воспроизводимости и правильности получаемых результатов. КК должен проводиться на всех этапах выполнения лабораторного исследования: от подготовки пациента к взятию биологического материала до выдачи результата и его интерпретации.

Система контроля качества включает в себя внутрилабораторный (внутренний) и межлабораторный (внешний) виды контроля.

Внутрилабораторный контроль качества

Внутрилабораторный КК, направленный прежде всего на выявление внутрилабораторных ошибок, является основной, ежедневно осуществляемой формой контроля выполнения всех видов лабораторных исследований.

Ошибки выполнения анализа (аналитические) могут быть подразделены на грубые, случайные и систематические.

Грубые ошибки – это ошибки одиночного значения, когда результаты исследования выходят за пределы диапазона как нормальных, так и патологических значений измеряемого показателя. Такие ошибки обычно заметны сразу. Они могут быть субъективными и объективными, зависящими от чистоты лабораторной посуды, реактивов, состояния приборов и др.

Случайные ошибки – это ошибки одиночного значения, в появлении которых нет закономерности. Случайные ошибки характеризуются тем, что при повторном исследовании одного и того же образца получают различающиеся между собой результаты. Количество случайных ошибок определяет воспроизводимость данных лабораторных исследований. Чем меньше случайных ошибок, тем лучше воспроизводимость данных. Характеристикой воспроизводимости является величина среднеквадратичного отклонения (S). Мерой воспроизводимости является отклонение показателей от средней величины в одну (+) либо в другую (–) сторону. Это отклонение не должно быть больше $2S$.

Систематические ошибки – это ошибки, одинаковые по знаку, т.е. результаты лабораторных исследований всегда отклоняются в одну и ту же сторону (либо завышения, либо занижения). Такие ошибки зависят от метода, выбранного для исследования; состояния измерительных приборов; чистоты реактивов; качества воды; обработки стандарта, его качества; правильности построения калибровочного графика; недостаточно тщательного выполнения аналитических операций и др. Систематические ошибки влияют на всю серию исследований.

Внутрилабораторный КК включает оценку воспроизводимости (для выявления случайных ошибок) и правильности (для выявления систематических ошибок).

Воспроизводимость – качество измерений, при котором параллельные пробы практически совпадают друг с другом. Правильность и точность – это такое качество измерений, при котором отсутствуют систематические ошибки и обнаруживается минимальное количество случайных ошибок.

Специальный контрольный материал

Для проведения КК используется специальный контрольный материал (контрольная сыворотка, контрольная моча, контрольные растворы гемоглобина и т.п.), предназначенный для проведения контроля правильности. Для проведения контроля воспроизводимости можно воспользоваться дру-

гими методами (метод параллельных проб, метод смешанных или случайных проб, оценка по средней арифметической величине нормальных результатов пациентов).

КК на аналитическом этапе исследований основывается на использовании контрольных материалов. Их анализ – так называемые контрольные измерения – дает возможность сделать заключение о достоверности и воспроизводимости получаемых в лаборатории результатов.

Контроль воспроизводимости

Контроль воспроизводимости выполняется для оценки качества работы лаборантов (и других специалистов клинической лабораторией диагностики). Он включает исследование параллельных, случайных, повторных и смешанных проб.

При проведении метода параллельных проб выбранный показатель исследуют дважды, т.е. ставят параллельно на протяжении не менее суток. Результаты таких дублированных анализов используют для характеристики качества исследований. Для этого строят контрольную карту, производят вычисление ранга различий по специальной формуле и вычисляют границы допустимого предела.

Метод случайных проб аналогичен методу параллельных проб. При его выполнении несколько случайно выбранных проб исследуются повторно. Сравнение соответствующих пар результатов дает объективные данные о качестве проведенных исследований.

Контроль правильности

Контроль правильности результатов лабораторных исследований состоит в исследовании контрольного материала с известным содержанием компонентов. Он может быть использован для быстрой ориентировочной оценки правильности результатов. Обязательным условием, ограничивающим возможности этого способа, является использование только того метода исследования, который указан в аннотации к контрольному материалу. Контроль правильности должен осуществляться по всем диапазонам прямолинейного хода калибровочного графика, охватывая области нормальных и патологических величин. Для проведения контроля правильности необходимо иметь контрольный материал с нормальными и патологическими концентрациями вещества в контрольной сыворотке.

Факторы, влияющие на качество

Факторы, влияющие на качество выполнения аналитического этапа исследования, включают в себя постоянные внешние факторы (определенные характеристики метода ограничения аналитического принципа, используемого оборудования, тест-систем, выбор производителя реагентов, а также прослеживаемость калибровки для количественных тестов) и переменные внешние факторы, во многом зависящие от серии реактивов, калибраторов, расходных материалов.

Внутренние факторы – это сами условия выполнения анализа, которые могут быть как постоянными (условия выполнения теста, калибровка пипеток, качество воды, качество отмывки, соблюдение температурных условий), так и переменными, связанными с конкретной реализацией метода исследования (неправильные действия оператора, связанные с недостаточной квалификацией, ошибки при внесении образцов и реагентов, не выполненное вовремя обслуживание прибора, отсутствие контроля процедуры исследования с ведением журнала ошибок и описанием проблем и т.д.).

Концентрация веществ в контрольных сыворотках зарубежного производства устанавливается референтной лабораторией страны-производителя. Если полученные в лаборатории результаты исследования укладываются в приводимые в инструкции к контрольной сыворотке пределы допустимых отклонений, то правильность выполненного лабораторного анализа расценивается как удовлетворительная.

Оценка правильности результатов исследования возможна с использованием статистического критерия Лорда (L). Для этих целей исследуют 10–20 параллельных проб контрольного материала, вычисляют среднюю арифметическую величину полученных значений, а затем сравнивают со средней величиной, указанной для контрольного материала (μ). Расчет осуществляется по соответствующей формуле.

Постоянные факторы определяют систематическую ошибку и контролируются внешней оценкой качества. Переменные факторы обуславливают случайную ошибку в исследовании, которая может быть зафиксирована внутрिलाбораторным контролем качества.

Глава 16. ОБОЗНАЧЕНИЯ РАЗМЕРНОСТЕЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЛАБОРАТОРНЫХ ТЕСТОВ

Принятое в настоящее время обозначение размерности показателей лабораторных тестов основывается на использовании международной системы единиц (Sistem International d'Unites – SI, русск. – СИ). Она представляет собой единую стройную систему, построенную на базе 7 основных единиц. Ими являются метр (м) – единица обозначения длины, секунда (с) – времени, килограмм (кг) – массы, ампер (А) – силы тока, кельвин (К) – температуры, кандела (кд) – силы света и моль (моль) – количества вещества. Наряду с ними применяются две дополнительные единицы: радиан (рад) – для плоского угла и стерадиан (ср) – для телесного. Система также включает вспомогательные единицы, которыми пользуются наравне с основными. Таковы единицы времени: минута (мин), час (ч), сутки (сут.); температуры: градус Цельсия (°С), ранее использовался практический градус, имеющий то же численное значение, что и градус по Кельвину; объема: литр (л), массы: тонна (т). Основные единицы используются для образования производных единиц, получаемых из определенного соотношения основных. Из основных единиц СИ в клинической лабораторной диагностике применяются главным образом четыре: м, кг, с, моль.

Производные единицы служат для обозначения молярной массы (кг/моль), концентрации количества вещества, или молярной концентрации (моль/кг), молярности компонента (моль/м³), активности фермента (моль/с), обозначаемой «катал» (кат.), скорости химической реакции моль/(с·м³), молярного расхода (моль/с), массовой концентрации (кг/м³), массового отношения (кг/кг), молярного отношения (моль/моль), объемного отношения (м³/м³).

В связи с тем, что в течение многих десятилетий в медицине для обозначения объема использовалась единица литр (и производные от нее величины), а для обозначения времени – минута, сутки, для удобства пользования системой СИ в число наиболее употребительных, или самостоятельных, были включены: кг – для обозначения массы, моль – для обозначения количества вещества; ч, с, мин, сут. – для обозначения времени, л – для обозначения объема. Производными от этих единиц являются: кг/л – плот-

Таблица 16.1

Множители и приставки, служащие для образования наименований десятичных и кратных дольных единиц

Множитель	Приставка	Кратность умножения или части	Обозначение (символ)
10 ¹⁸	экса	Триллионкратное умножение	Э
10 ¹⁵	пета	Биллиардкратное умножение	П
10 ¹²	тера	Биллионкратное умножение	Т
10 ⁹	гига	Миллиардкратное умножение	Г
10 ⁶	мега	Миллионкратное умножение	М
10 ³	кило	Тысячекратное умножение	к
10 ⁻³	милли	Тысячная часть	м
10 ⁻⁶	микро	Миллионная часть	мк
10 ⁻⁹	нано	Миллиардная часть	н
10 ⁻¹²	пико	Биллионная часть	п
10 ⁻¹⁵	фемто	Биллиардная часть	ф
10 ⁻¹⁸	атто	Триллионная часть	а

ность и массовая концентрация; моль/л – молярная концентрация; л/л – объемное отношение; моль/моль – молярное отношение; л/с – объемный расход (клиренс, очищение); моль/(с·л), или кат/л – скорость химической реакции (здесь «кат» – каталитическая активность, т.е. моль/с, а кат/л – концентрация каталитической активности, или каталитическая концентрация). Обозначать ферментативную активность в международных единицах (МЕ), т.е. в мкмоль/(мин·л) не рекомендуется, вместо этой единицы применяется нкат/л. 1 МЕ соответствует 16,67 нкат/л, или 16,67 нмоль/(с·л). Поскольку 1 ммоль/(ч·л) равен 278 нмоль/(с·л), для преобразования этих единиц друг в друга используют коэффициент пересчета (К): 278 или 0,0036 (1 : 278 = 0,0036).

При использовании самостоятельных и производных единиц иногда встречаются чрезмерно большие или слишком малые числовые значения. Работу с ними можно упростить, если десятичные кратные дольные единицы обозначить определенными приставками (табл. 16.1). Перед обозначением единицы можно поставить только одну приставку (например, нанометр, а не миллимикрометр). При выражении отношений единиц приставки рекомендуется сокращать, например, вместо мкг/мл употреблять мг/л. К тому же единица «л» в знаменателе не сокращается.

Вместо прежнего обозначения молярной концентрации (М) сейчас используется размерность моль/л. Одноименные величины моль/моль, кг/кг, л/л представляют собой молярные, массовые и объемные отношения. Понятие «массовое отношение», выражаемое в г/кг, мг/кг, мкг/кг, заменяет собой понятие «массовый процент» (в прошлом массовая процентная концентрация); понятие «объемное отношение» (мл/л, мкл/л) употребляется вместо понятия «объемный процент» (в прошлом объемная процентная концентрация); понятие «массовая концентрация» (г/л, мг/л и другие

аналогичные) используется вместо понятия «массо-объемный процент» (в прошлом массо-объемная процентная концентрация).

Таким образом, в настоящее время процентная концентрация применяется лишь для обозначения однородных величин, например, показателей распределения белковых фракций. Однако и в этом случае, согласно требованиям СИ, результат выражается в долях единицы, например, показатель гематокрита (0,46 вместо 46%), протромбиновый индекс (0,98 вместо 98%). Обозначение мг% должно быть исключено, поскольку оно предполагает отношение 1 мг не к 100 однородным частям (100 мг), а к 100 мл (или 100 г) раствора.

Единицы массовой концентрации следует применять лишь к веществам, молекулярная масса которых неизвестна или которые представляют собой смесь веществ (например, общий белок).

Стремление к более широкому использованию молярной концентрации вызвано тем, что химическое взаимодействие протекает не в массовых, а в молекулярных отношениях. Понятие «молярная концентрация» базируется на представлении о моле вещества. Эта основная единица СИ включает такие обозначения прежних единиц, как грамм-моль, грамм-молекула, грамм-атом, грамм-ион и грамм-эквивалент. Под термином «моль» понимают количество структурных элементов простого и сложного вещества (атомов, молекул, ионов или электронов), которое равно числу атомов в 12 г изотопа углерода ^{12}C , а именно: $6,022 \cdot 10^{23}$ (число Авогадро). Поэтому можно говорить о молях атомов, молекул, ионов, электронов. Один моль сложного вещества может содержать несколько молей простого вещества. Например, 1 моль CaCl_2 содержит 1 моль ионов кальция и 2 моля ионов хлора. Молекулярная масса выражается в дальтонах (Д), относительная молекулярная масса представляет собой безразмерную величину.

Для обозначения результатов отдельных лабораторных исследований (сулемовой, тимоловой проб, пробы Вельтмана и др.) допустимо использовать и внесистемные единицы. Если результат реакции ранее отмечался символами «-», «+», «++», «+++», «++++», то в настоящее время вместо этих знаков ставят цифры 0, 1, 2, 3, 4.

Глава 17. УСЛОВИЯ, ПРАВИЛА И ТЕХНИКА ВЗЯТИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА ИССЛЕДОВАНИЕ

Достоверность результатов выполнения лабораторного исследования во многом зависит от качества осуществления *преаналитического этапа* работы. Преаналитический этап исследования включает процедуры назначения анализа, подготовки пациента, сбора и транспортировки образцов, их регистрации, хранения, разделения и распределения по видам исследования.

17.1. Лабораторная часть преаналитического этапа (пробоподготовка)

Лабораторная часть преаналитического этапа (пробоподготовка) начинается с момента доставки образца вместе с заявкой в лабораторию и включает в себя организацию приема и регистрацию проб и заявок на выполнение исследований, отбраковку проб, не пригодных для анализа, хранение невыбраванных проб до выполнения лабораторных исследований и их распределение по видам лабораторного анализа, заполнение рабочих штативов и картирование (т.е. расположение образцов на микропланшете) в случае выполнения иммуноферментного анализа.

Пробоподготовка является первым этапом, который выполняется непосредственно в лаборатории. Как показывает опыт работы, основной ошибкой при его осуществлении является использование показателя скорости вращения ротора центрифуги вместо относительной центрифужной силы (ОЦС) при выборе режима центрифугирования. ОЦС зависит от радиуса ротора центрифуги и рассчитывается по формуле:

$$\text{ОЦС} = 1,118 \cdot 10^{-5} \cdot R \cdot N^2,$$

где R – радиус ротора от его центра до точки осаждения – дна центрифужной пробирки в рабочем положении (см), N – скорость вращения ротора (об./мин).

С целью предотвращения ошибок при центрифугировании проб также необходимо:

- убедиться в том, что пробирки, вставленные в ротор, не опираются на стенки стакана центрифуги;
- процедуру центрифугирования проводить по завершении периода времени, необходимого для осуществления полного свертывания крови;
- пробирки с разделительным гелем центрифугировать не позднее чем через 2 ч после взятия крови.

Другим источником ошибок на этапе пробоподготовки является аликвотирование проб – разлив биологической жидкости (сыворотки крови) из первичной пробирки в одну или несколько вторичных. Полная стандартизация этого этапа возможна только при наличии в лаборатории анализаторов, работающих с первичными пробирками.

Критерии выбраковки клинического материала должны быть определены заранее и зафиксированы в документах. Низкое качество образцов определяется по следующим критериям: превышение срока доставки, наличие сгустков в плазме или сыворотке крови, гемолиз, желтушность, высокое содержание липидов, мутность пробы. Присутствие в образцах биологической жидкости частиц фибрина, микросгустков, их бактериальная контаминация, проявления гемолиза, хилезный характер проб могут давать ложноположительные результаты. Образцы могут храниться при температуре 2–8°C в течение времени, указанного в инструкции по выполнению исследования. Чем больше срок хранения образца, тем ниже должна быть температура хранения. При хранении образцов при –70°C, чтобы избежать их вымораживания, рекомендуется использовать специальные криопробирки. Следует избегать многократного замораживания и оттаивания проб.

Очень часто источником ошибки является недостаточное перемешивание глубокомороженных проб после их оттаивания. После оттаивания пробирку с пробой следует перемешать несколько раз (можно с помощью вортекса), избегая при этом образования пены.

Хранить пробы после проведения анализа нужно таким образом, чтобы в случае необходимости можно было подтвердить ранее полученные результаты и, если необходимо, проверить идентичность проб либо провести дополнительные тесты по медицинским или правовым показаниям.

Процедура пробоподготовки

Для уменьшения количества ошибок на преаналитическом этапе уместно составление руководителем лаборатории совместно с лечащим врачом специальной инструкции, учитывающей сочетания стандартных процедур с особенностями работы лечебно-профилактического учреждения.

К стандартным процедурам относятся составление заявки, взятие и доставка пробы, ее регистрация, оценка качества, хранение пробы, пробоподготовка и распределение проб.

Преаналитический этап работы начинается с назначения лечащим врачом перечня необходимых конкретному пациенту лабораторно-диагностических исследований. Именно лечащий врач оформляет заявку на исследование, определяя условия подготовки пациента (например, натощак) и вид биологического материала (кровь, моча, ЦСЖ и др.).

Правильное назначение тестов и использование результатов анализов является составной частью обеспечения качества работы лаборатории. Поэтому необходимо информировать врачей-клиницистов о внедрении в деятельность КДЛ новых методов лабораторного исследования и их информативности. Врачи лабораторной диагностики должны консультировать лечащих врачей по применению лабораторно-диагностических тестов.

Неправильное выполнение процедуры подготовки пациента является одним из основных источников (до 20%) ошибок на преаналитическом этапе, поэтому процедура взятия крови либо других биологических жидкостей должна быть точно и всесторонне описана.

В направлении должны быть указаны фамилия, имя и отчество пациента, его пол и возраст, отделение, номер палаты (для стационарных больных), номер истории болезни, диагноз, вид направляемого на исследование биологического материала, необходимые лабораторно-диагностические исследования, дата и время сбора биологического материала, фамилия, имя и отчество лечащего врача, фамилия, имя и отчество специалиста, забиравшего биологический материал на исследование.

17.2. Факторы, влияющие на результат (надежность) клинико-лабораторного исследования. **Внелабораторные и лабораторные ошибки**

Отклонения результатов от истинных показателей содержания исследуемых веществ (либо активности ферментов) могут быть вызваны ошибками, возникающими на внелабораторном и лабораторном этапах исследования.

Внелабораторные ошибки

Внелабораторные (доаналитические) ошибки, составляющие до 20% от общей суммы ошибок, обуславливаются многими причинами. На результаты исследований влияют суточные и сезонные колебания концентрации метаболитов в биологических жидкостях (крови, моче и др.), индивидуальные, возрастные, половые, расовые особенности, характер питания, эмоциональная лабильность больных (во многом зависящая от состояния вегетативной нервной системы), стресс, физическая активность, послеоперационное состояние, постельный режим, беременность, а также *неправильная подготовка пациента к лабораторным исследованиям* (не натощак, проведение лечебно-диагностического вмешательства накануне взятия крови и др.).

На результаты лабораторного исследования влияют не только такие факторы, как возраст, раса, пол, беременность, но также изменение физического состояния пациента, обусловленное диетой, голоданием, физическими упражнениями, подъемом на большую высоту над уровнем моря, приемом психоактивных и лекарственных веществ, курением, употреблением алкоголя. Следует также учитывать влияние на лабораторные показатели циркадного ритма и фазы менструального цикла.

За сутки до взятия крови прием пищи может быть обычным (следует исключить употребление алкоголя). За 8–12 ч до взятия крови (а при определении триацилглицеринов – за 10–12 ч) следует воздержаться от еды.

Практически здоровым лицам и амбулаторным больным накануне (после 2 часов ночи) запрещаются курение, прием пищи и жидкости (разрешается выпить стакан воды между 22 и 5 часами).

Непосредственно перед взятием крови пациенту необходимо предоставить отдых в положении сидя в течение не менее 15–30 мин.

Положение тела оказывает достаточно выраженное влияние на концентрацию общего белка, альбумина, креатина, холестерина, триацилглицеринов, активность щелочной фосфатазы, аспартатаминотрансферазы и других компонентов плазмы.

Содержание этих веществ и активность ферментов значительно повышаются в вертикальном положении и уменьшаются в горизонтальном.

При пребывании человека в течение нескольких часов в горизонтальном положении объем плазмы в русле крови оказывается на 10–15% больше, чем у пациента, сохраняющего обычный двигательный режим. Поэтому концентрация веществ в крови человека, лежавшего более часа, всегда ниже.

Чрезмерно продолжительное наложение турникета, а следовательно, длительное пережатие в области плеча приводит к сгущению крови (гемоконцентрации) и увеличению содержания находящихся в ней компонентов (в частности, ионов кальция, связанных с белками плазмы).

При взятии крови путем венепункции период времени сдавления сосудов жгутом по возможности должен быть минимальным. Больному не следует сжимать и разжимать пальцы руки, поскольку это вызывает местный стаз и гипоксию.

Кровь рекомендуется брать утром, в одно и то же время (между 7 и 9 часами у стационаре, 8 и 10 часами у амбулаторных больных), до физической нагрузки и проведения диагностических процедур.

Задержка с доставкой в лабораторию исследуемого биологического материала также может привести к получению ложных результатов (например, снижению уровня глюкозы за счет продолжающихся в крови процессов метаболизма).

Необходимо следить за тем, чтобы правильно была осуществлена маркировка проб (с указанием фамилии и инициалов пациента, времени взятия крови и т.д.): несоблюдение этого правила приводит к существенным

ошибкам в определении показателей лабораторных тестов, относящихся к конкретному пациенту.

Для выполнения некоторых тестов требуется соблюдение специальных условий сбора и хранения проб (так, в случае определения газов крови пробы должны быть направлены в лабораторию «на льду», что предотвращает возникновение ошибок в процессе исследования).

Биологический материал, как правило, сохраняют до окончания выполнения всех анализов, что позволяет в случае необходимости повторить определение.

К внелабораторным ошибкам определения приводит прием *больными лекарственных веществ*, которые могут изменять интенсивность патологического процесса, оказывать побочное действие на функцию различных органов и систем, вызывать общий токсический эффект (при передозировке или вследствие кумулятивного действия препарата), интерферировать (взаимодействовать) с определяемым веществом в процессе лабораторного исследования. *Отсутствие сведений о характере проводившейся больному терапии и соответствующих знаний об особенностях влияния лекарственных веществ на отдельные лабораторные показатели затрудняет интерпретацию картины лабораторного исследования крови.*

Внелабораторные ошибки могут быть также следствием некорректного взятия проб (гемолиз пробы, грязные и влажные пробирки, длительное хранение биологического материала до доставки в лабораторию), ошибок в оформлении (перепутывание фамилий больных и их кодирующих номеров, бланков-заказов) и других причин.

Внутрилабораторные ошибки

Внутрилабораторные ошибки могут возникать на доприборном и инструментальном этапах выполнения исследования. Результаты лабораторного анализа во многом зависят от того, *насколько точно соблюдаются необходимые правила взятия биологической жидкости, подготовки проб к исследованию и хранения образцов.* Например, с целью предупреждения заражения гепатитом, ВИЧ и другими инфекциями взятие крови должно производиться специально используемой для этого системой взятия крови (либо, при ее отсутствии, другим индивидуальным стерильным набором).

Для хранения образцов биологических жидкостей требуются специальные контейнеры. Кровь, собранную в одну пробирку, не следует переливать в другую, поскольку связанное с этим дополнительное перемешивание может явиться источником новых ошибок. Уровень биологической жидкости, взятой в специальную пробирку, не должен быть выше нанесенной на ней линии, так как это может привести к ошибкам, связанным с подготовкой пробы. Для взятия капиллярной крови следует использовать специальные микропробирки с нанесенной особым способом на их внутреннюю поверхность калиевой солью ЭДТА (что предотвращает образование микросгустков и разбрызгивание крови). Распад (лизис) клеток, об-

условленный несоблюдением надлежащих условий сбора крови, приводит к появлению ложнозавышенных результатов.

Для этих целей можно использовать специальные пробирки для взятия капиллярной крови, в том числе микропробирки Юнивет («Юнимед», Россия) с ультразвуковым напыленным ЭДТА (уникальная технология), предназначенные для забора 200 мкл капиллярной крови. Защелкивающаяся крышка этих микропробирок имеет специальную конструкцию, легко открывается и сводит до минимума аэрозольный эффект. Калиевая соль ЭДТА нанесена на нижнюю часть пробирки в виде мелкодисперсного порошка, который мгновенно растворяется при контакте с кровью. Применение микропробирок «Юнивет» также предотвращает формирование микросгустков при взятии и хранении крови. Это позволяет избежать основной доли ошибок преаналитического этапа при выполнении клинического анализа крови, стабилизированной ЭДТА, на гематологическом анализаторе.

Фирмой «Симас» (Россия, Москва) поставляется широкий ассортимент изделий из полимерных и пластических материалов для выполнения вспомогательных лабораторных работ, в том числе специальные пробирки для сбора образцов крови (с крышками разного цвета в соответствии с европейским стандартом ISO 6710) и отделения сыворотки, пробирки для получения сыворотки (с гелем, с ускорителем, с гранулами), пробирки для получения плазмы с антикоагулянтом (ЭДТА, гепарином, цитратом натрия), пробирки педиатрические для получения плазмы, вакуумные пробирки с цитратом натрия для центрифугирования, пробки для бактериологических и др., колбы, аксессуары для пробирок и колб, включая встряхиватель, качающийся миксер, ершики нового поколения, ротационный миксер и др.

Для выполнения некоторых тестов требуется соблюдение специальных условий сбора и хранения проб (так, в случае определения газов крови пробы должны быть направлены в лабораторию на леду, что предотвращает возникновение ошибок в процессе исследования).

Задержка с доставкой в лабораторию исследуемого биологического материала также может привести к получению ложных результатов (например, снижению уровня глюкозы за счет продолжающихся в крови процессов метаболизма).

Необходимо следить за тем, чтобы маркировка проб была осуществлена правильно (с указанием фамилии и инициалов пациента, времени взятия крови и т.д.). Несоблюдение этого правила приводит к существенным ошибкам в определении показателей лабораторных тестов.

Ошибки на этапе выполнения исследований могут быть объективными и субъективными. Объективные ошибки часто связаны с некачественным стандартом, неправильным его приготовлением и калибровкой прибора, неправильными расчетами. Такие ошибки часто возникают при несоблюдении сроков хранения и неправильном приготовлении и загрязнении реагентов. К объективным ошибкам также могут привести неисправность

измерительной аппаратуры и сбой в ее энергообеспечении. Такие ошибки зависят от метода и техники исследования.

Субъективные ошибки связаны непосредственно с исполнителем, его квалификацией и вниманием. Исследование необходимо выполнять строго по инструкции, соблюдать все этапы с особой тщательностью. Приступать к измерениям на приборах следует только после изучения устройства прибора и правил его эксплуатации. Пробирки и измерительные кюветы должны быть чистыми и сухими. При выполнении исследования вручную большой процент ошибок связан с пипетированием, при этом работнику КДЛ нередко допускают индивидуальные ошибки при взятии как биологического материала, так и реагентов. Совокупность всех перечисленных ошибок обуславливает неточность конечного результата.

Влияние лекарственных веществ на показатели анализа периферической крови

Морфологический состав крови подвержен более или менее выраженному влиянию многих лекарственных средств, в том числе анальгетиков, сульфаниламидов, нейроимитиков, антидепрессантов, антибиотиков широкого спектра действия и др. Описаны тяжелые осложнения лекарственной терапии с молниеносным течением патологического процесса.

Установлено, что через 1–2 нед. после приема амидопирина в ряде случаев развивается агранулоцитоз вследствие угнетения препаратом процесса кроветворения. Индометацин может быть причиной возникновения апластической анемии, агранулоцитоза, гранулоцитопении, тромбоцитопении с угнетением агрегации тромбоцитов. При длительном приеме парацетамола и внутривенном введении гепарина наблюдаются лейкопения, агранулоцитоз и тромбоцитопения. Апластическая анемия зарегистрирована у 50% лиц, принимающих в течение длительного времени фенилбутазон. Прием противосудорожных средств может также привести к лейкопении и даже апластической анемии. Снотворные и седативные препараты способны вызвать тромбоцитопению, барбитураты – агрануло- и макроцитоз.

Гемолитическая анемия, вызываемая сульфаниламидами, а также другими лекарственными препаратами, может возникать вследствие чрезвычайно высокого содержания лекарственного вещества в крови (при передозировке или сниженной экскреции при патологии почек), повышенной чувствительности организма к препарату (чаще всего в результате дефицита глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы – Г6ФДГ), ряда других причин.

Вещества, способствующие окислению восстановленного глутатиона, содержание которого резко снижено при дефиците Г6ФДГ, вызывают гемолиз эритроцитов, нередко сопровождающийся гемолитическим кризом; при этом прямая проба Кумбса становится положительной. Такой эффект оказывают сульфаниламиды, нитрофураны, анальгетики, фенацетин, аспирин, противотуберкулезные средства (ПАСК, фтивазид и др.), антибиотики (левомецетин, амфотерицин В), синтетические аналоги витамина К и др.

Антибиотики связываются с мембранами эритроцитов, поэтому при лечении препаратами этой группы возможно образование специфических антител к эритроцитам с последующим развитием гемолитической анемии. Она может возникать, например, при лечении препаратами – производными цефалоспоринов. Кроме того, в ряде случаев может развиваться агранулоцитоз с нейтропенией и тромбоцитопенией.

Ибупрофен угнетает агрегацию тромбоцитов, при лечении этим препаратом иногда наблюдаются тромбоцитопения, агранулоцитоз, панцитопения с летальным исходом.

Ацетилсалициловая кислота (аспирин) влияет на гемостаз, угнетая агрегацию тромбоцитов, синтез витамина К-зависимых факторов и повышая активность фибринолитической системы крови; при этом удлиняется время капиллярного кровотечения. Изменения в системе крови: железодефицитные анемии, гемолитические анемии (особенно при дефиците ГбФДГ), макроцитарные и апластические анемии, тромбоцитопения, агранулоцитоз или панцитопения, наблюдаются у 15% лиц, принимающих ацетилсалициловую кислоту.

Развитию тромбоцитопении и эозинофилии способствует лечение дигитоксиком, леводопой, метилдопой, ингибиторами карбоангидразы (диакарб) и др. Прием больших доз витамина А может вызвать снижение стабильности эритроцитов, что приводит к гемолизу и анемии, а также нейтропении, лейкоцитозу, тромбоцитопении, повышению СОЭ.

Введение декстрановых кровезаменителей (гемодез, полиглюкин и др.) может привести к ошибке в определении групп крови и СОЭ. При применении 20% раствора глицерина описаны случаи гемолиза с гемоглобинурией.

17.3. Исследование крови. Общие правила

Кровь рекомендуется брать утром, в одно и то же время (утром в 7–9 ч в стационаре и в 8–10 ч у амбулаторных больных), до физической нагрузки и проведения диагностических процедур. У больных, которым prescribed строгий постельный режим, взятие крови осуществляется также в интервале 7–9 ч утра; при этом рука пациента, лежащего в постели, должна находиться в горизонтальном положении. Всегда следует отмечать точное время взятия пробы в соответствующих документах.

За сутки до взятия крови прием пищи может быть обычным (следует исключить употребление алкоголя, период воздержания от приема алкоголя должен быть не менее 24 ч до взятия крови на анализ). За 8–12 ч до взятия крови (а при определении триглицеридов – за 10–12 ч) следует воздержаться от еды. Практически здоровым лицам и амбулаторным больным накануне (после 2 ч ночи) запрещаются курение, прием пищи и большого количества жидкости (разрешается выпить стакан воды между 22 и 5 ч). За 8–12 ч до взятия крови должно быть прекращено выполнение диагностических и лечебных процедур.

Непосредственно перед взятием крови пациенту необходимо предоставить отдых в положении сидя в течение не менее 15–30 мин.

Положение тела оказывает достаточно выраженное влияние на концентрацию общего белка, альбумина, креатинина, холестерина, триглицеридов, активность щелочной фосфатазы, АСТ и других компонентов плазмы. *Содержание этих веществ и активность ферментов значительно повышаются в вертикальном положении и уменьшаются в горизонтальном.* Следует иметь в виду, что при пребывании человека в течение нескольких часов в горизонтальном положении объем плазмы в русле крови оказывается на 10–15% больше, чем у пациента, сохраняющего обычный двигательный режим. Поэтому *концентрация веществ в крови человека, лежавшего более часа, всегда ниже.* Для исключения влияния изменения положения тела обследуемый должен до момента взятия крови на анализ находиться в покое, сидеть или лежать не менее 5 мин. При динамическом наблюдении за пациентом взятие материала каждый раз нужно проводить при идентичном положении его тела.

Сдавление сосудов (вен) при наложении жгута (манжеты) при взятии крови должно быть минимальным, а его длительность не должна превышать 1 мин. Чрезмерно продолжительное наложение жгута, а следовательно, длительное пережатие в области плеча, приводит к сгущению крови (гемоконцентрации) и увеличению содержания находящихся в ней компонентов (в частности, ионов кальция, связанных с белками плазмы).

17.3.1. Процедура взятия крови

Для биохимических и иммунологических исследований чаще всего используют сыворотку (плазму) крови с добавлением или без добавления в анализируемые образцы антикоагулянтов. Использование венозной крови более предпочтительно, чем капиллярной, так как она лучше отражает состояние организма, при ее получении возникает меньше ошибок, она может быть получена в большем объеме.

Взятие венозной крови осуществляется процедурной медсестрой. Непосредственно перед взятием крови участок кожи обрабатывается ватным тампоном, пропитанным 70° спиртом (или хлоргексидином). Дезинфицирующее средство должно испариться с поверхности кожи до взятия крови.

При взятии крови путем венопункции период времени сдавления сосудов жгутом по возможности должен быть минимальным (не более 1 мин). Больному не следует сжимать и разжимать пальцы руки, поскольку это вызывает местный стаз и гипоксию, а также сдвиги в распределении некоторых веществ (холестерина, калия, натрия, кальция и др.) между форменными элементами крови и ее жидкой частью.

При взятии из венозного катетера первые 10 капель крови удаляются, в случае необходимости кровь можно получить из любой вены; у новорожденных можно брать пуповинную кровь. У грудных детей кровь обычно берут из лобной, височной или яремной вены.

Существует 3 метода получения крови после венепункции:

- кровь самостоятельно стекает в пробирку для сбора крови;
- кровь аспирируется шприцем;
- кровь забирается с помощью вакуумной технологии в специальные (вакуумные) пробирки с использованием стерильных систем забора крови.

Сравнительные характеристики различных методов взятия венозной крови представлены в таблице 17.1. Из приведенных в таблице сведений следует, что наилучшие результаты на преаналитическом этапе соответствуют использованию *закрытой вакуумной системы для взятия крови*.

В тех случаях, когда не используются вакуумные системы, взятие крови из локтевой вены должно осуществляться иглой с широким просветом (или при незначительном разрежении) в чистую сухую пробирку в количестве 5–6 мл. Для забора крови желательно использовать пластиковую посуду. Стеклонные пробирки часто несут на поверхности следы детергентов, а также обладают способностью обмениваться ионами с кровью. Пробирки, бывшие долгое время в употреблении, имеют поврежденную поверхность, что при транспортировке и центрифугировании травмирует клеточные элементы и может привести к гемолизу эритроцитов. Собранные образцы маркируют в соответствии с принятой в лаборатории системой идентификации образцов.

Таблица 17.1

Сравнительные характеристики различных методов взятия венозной крови

Взятие крови иглой	Взятие крови шприцем с иглой	Взятие крови одноразовой безопасной закрытой вакуумной системой
<ul style="list-style-type: none"> • Высока вероятность попадания крови пациента на руки медицинского персонала, что приводит к увеличению риска внутрибольничного инфицирования гемоконтактными инфекциями как пациентов, так и медицинского персонала • Невозможно сохранить стерильность крови в результате соприкосновения ее с окружающей средой в момент забора • Метод не может быть стандартизован 	<ul style="list-style-type: none"> • Недостаточно безопасен для медицинского персонала. При использовании этого метода увеличивается риск внутрибольничного инфицирования гемоконтактными инфекциями как пациентов, так и медицинского персонала • Невозможно исключить гемолиз при переносе крови под давлением в пробирку • Невозможно сохранить стерильность крови в результате соприкосновения ее с окружающей средой в момент забора и при переливании в пробирку • Метод не может быть стандартизован 	<ul style="list-style-type: none"> • Уменьшение риска внутрибольничного инфицирования гемоконтактными инфекциями как пациентов, так и медицинского персонала • Сохранение стерильности крови в результате исключения ее контакта с окружающей средой. • Удобно использовать для взятия крови у пациентов с труднодоступными венами • Современные технологии на уровне мировых стандартов • Экономическая целесообразность • Сокращение количества повторных анализов • Стандартизация условий взятия крови и процесса пробоподготовки

Для стандартизации процедуры взятия крови, с целью исключения ошибок рекомендуется использовать вакуумные пробирки с необходимым консервантом.

При вакуумной технологии забора венозной крови используются специальные системы, которые, как правило, состоят из трех элементов:

- стерильной двусторонней иглы;
- держателя пробирки;
- пластиковой пробирки с круглым дном и предохранительными заглушками, предотвращающими обратный ток крови и нарушение стерильности; ток крови прерывается, как только прекращается действие вакуума.

Вакуумные системы для взятия крови обладают рядом преимуществ. Они обеспечивают стандартизованное получение венозной крови в гарантированно стерильных условиях, визуальный контроль забираемого объема крови, исключают контакт персонала с кровью. Пробирки, в которые берется кровь на исследование, являются одновременно центрифужными и транспортными, так как представляют собой емкости (сосуды) для хранения и пересылки биологического материала в другие лаборатории.

Пробирки для получения сыворотки рассчитаны на различные объемы крови; они либо не содержат добавок, либо заключают внутри себя добавленные ускорители свертывания крови (в виде различных гранул, стеклянных или силикатных шариков). Для разделения сгустка сыворотки используется также инертный полимерный гель.

Для получения плазмы используют аналогичные устройства, но с добавлением различных антикоагулянтов; в зависимости от того, какие компоненты следует определять, они содержат тот или иной антикоагулянт с включением или без включения разделительных гелей и гранул из полистирола.

Крышки пробирок маркированы, сделаны из пластика или резины разных цветов, что помогает медсестре, берущей кровь на исследование, правильно выбрать пробирки, необходимые для выполнения соответствующих видов анализа.

Перед взятием крови *следует проверять серию и срок годности пробирок*, так как *при очень длительном хранении вакуум ослабевает* и эффективность вытекания крови из вены может уменьшаться. Отклонение объема пробы в заполненной пробирке не должно превышать $\pm 10\%$ от объема, указанного на этикетке.

Если нет возможности пользоваться специальными системами для взятия крови или одноразовыми шприцами, то обычный, многоразовый шприц нужно кипятить только в дистиллированной воде, нельзя промывать его изотоническим раствором натрия хлорида. Во избежание гемолиза кровь следует брать сухим шприцем, сухой иглой (одноразового пользования), в сухую пробирку, в стерильных условиях. Если набранная в шприц кровь переносится в пробирку, то эту процедуру осуществляют медленно (для предотвращения вспенивания крови). При исследовании системы гемостаза к процессу взятия крови предъявляют ряд дополнитель-

ных требований. В частности, рекомендуется использовать иглу с широким просветом, однако лучше всего взятие крови осуществлять без шприца (его применяют лишь для взятия крови у детей, а также у взрослых больных с явлениями гипотензии и находящихся в терминальном состоянии; при этом шприц должен быть полиэтиленовым или стеклянным силиконизированным). Дезинфекцию кожи осуществляют обработкой соответствующего ее участка над местом прокола (обычно в локтевом сгибе) тампоном, смоченным 70° этиловым спиртом. Поскольку при прохождении иглы через кожу в просвет иглы перемещаются тканевая жидкость и фрагменты тканей, которые в дальнейшем могут существенно повлиять на показатели системы свертывания крови, первые (после наложения жгута и прокола вены иглой) 0,5–1,0 мл крови нельзя использовать для коагулолограммы. Кровь должна стекать по стенке пробирки (целесообразно использовать специальные пробирки для взятия крови). Если требуется получить плазму, в пробирку заранее вливают или всыпают соответствующий антикоагулянт (цитрат натрия, оксалат натрия или калия и др.) для предохранения крови от свертывания. Кровь с антикоагулянтом осторожно перемешивают (без вспенивания), закрывают пробирку кусочком полиэтиленовой пленки и оставляют в штативе на 20–25 мин. Интенсивное встряхивание вызывает гемолиз эритроцитов, что искажает параметры коагулолограммы. Поэтому плазма с признаками гемолиза не пригодна для исследования.

Для выполнения *общего анализа крови* берется капиллярная кровь (желательно, с использованием специально выпускаемых для осуществления данной процедуры пробирок). Ее получают путем прокола кончика пальца, чаще IV пальца левой руки, предварительно протертого 70° этиловым спиртом. У маленьких детей местом прокола кожи служит мякоть большого пальца ноги или пятка. Прокол производят на глубину 2,5–3 мм специальной иглой (скарификатором) одноразового использования. Первую каплю крови удаляют сухой ватой, последующие используют для исследования. Для получения сыворотки крови антикоагулянт не добавляют.

Для взятия крови можно использовать, в частности, скарификаторы-копья производства компании «ГЕМ» (Россия), автоматические ланцеты производства «Kabe Labortechnik GmbH» (Германия), легкое нажатие при их использовании гарантирует абсолютно безболезненный прокол.

17.3.2. Стандартная процедура получения плазмы и сыворотки из цельной венозной крови

Сыворотку получают из спонтанно свернувшейся цельной крови. Она не содержит факторов свертывания, за исключением кальция. При получении сыворотки в стеклянных центрифужных пробирках объем ее составляет около 1/3 от всего взятого объема крови. Но при некоторых патологических состояниях он может быть меньшим. В нормальной крови сгусток образуется при комнатной температуре в течение 20–60 мин. *Если не соблюдать это время, то может иметь место латентное (запоздалое) свертывание, в результате которого происходит закупорка проточных*

элементов приборов (особенно при использовании анализаторов) сгустками и затрудняется пипетирование проб. Следует помнить, что в пробирках из пластика время свертывания крови удлиняется.

Плазму получают из крови путем отделения ее клеток при центрифугировании пробы крови. В отличие от сыворотки плазма содержит факторы свертывания.

Плазма и сыворотка примерно на 93% состоят из воды, а цельная кровь – примерно на 81%, в связи с этим концентрация компонентов в плазме на 12% выше, чем в цельной крови.

Преимуществами плазмы крови по сравнению с сывороткой являются:

- меньшая опасность возникновения гемолиза;
- больший выход жидкой части крови при центрифугировании (на 10–20%, а при использовании коммерческих пробирок с антикоагулянтом – на 30–40%), что особенно важно в педиатрии, у ослабленных и пожилых пациентов;
- более быстрое получение материала для исследования в связи с исключением этапа образования сгустка, что особенно важно при выполнении срочных анализов;
- исключение потери части метаболитов за счет их разрушения в период инкубации, необходимой для получения сгустка.

При взятии крови для получения плазмы важен правильный выбор необходимого антикоагулянта. Наиболее часто используют трикалиевую или динатриевую соли ЭДТА, тринатрийцитрат и гепарин. ЭДТА и тринатрийцитрат ингибирует коагуляцию путем удаления кальция из крови. Несоответствие концентрации коагулянта объему крови и недостаточно тщательное смешивание могут привести к значительным ошибкам.

Доставленные в лабораторию пробирки закрывают ватной пробкой и помещают на 10–15 мин в термостат для прогревания при температуре 37°C. Затем осторожно проводят проволокой или стеклянной (пластиковой) палочкой по внутренней стенке пробирки, чтобы ускорить получение сыворотки. Удерживая сгусток стеклянной палочкой, сыворотку сливают в центрифужную пробирку и центрифугируют. Пробирку с кровью допускается выдерживать при комнатной температуре (20–26°C) в течение 1–1,5 ч после взятия материала; сгусток отделяют от стенки пробирки стеклянной (пластиковой) палочкой. Сыворотку (дефибринизированную плазму) желательнее использовать для лабораторных исследований в день взятия крови. Если же исследование откладывается до следующего дня, пробирку с сывороткой закрывают пробкой и помещают в холодильник, в котором хранят при температуре 4°C.

Для взятия капиллярной крови следует использовать специальные микропробирки с нанесенной особым способом на их внутреннюю поверхность калиевой солью ЭДТА (что предотвращает образование микросгустков и разбрызгивание крови).

Распад (лизис) клеток, обусловленный несоблюдением надлежащих условий взятия крови, приводит к появлению ложнозавышенных результатов.

Кровь, собранную в одну пробирку, не следует переливать в другую, поскольку связанное с этим дополнительное перемешивание может явиться источником новых ошибок.

Уровень биологической жидкости, взятой в специальную пробирку, не должен превышать нанесенную на ней линию, так как это может привести к ошибкам, связанным с подготовкой пробы.

17.3.3. Транспортировка образцов. Влияние времени и температуры хранения пробы на результаты исследования

Полученная кровь должна быть своевременно доставлена в лабораторию. Согласно приказу Министерства здравоохранения и медицинской промышленности РФ №170 от 16.08.94 г. «О мерах по совершенствованию профилактики и лечению ВИЧ-инфекции в Российской Федерации» полученный материал (кровь) не рекомендуется хранить более 12 ч при комнатной температуре и более 1 сут. при температуре 4–8°C, так как гемолиз, который развивается при несоблюдении данных рекомендаций, может повлиять на результаты анализа.

Период времени от момента получения биологической жидкости до выполнения отдельных преаналитических процедур должен составлять:

- не более 1 ч после взятия крови до момента центрифугирования с целью получения сыворотки крови;
- 30–90 мин от момента взятия крови из холодильника до этапа центрифугирования;
- период центрифугирования в пробирках с ускорителем свертывания крови не должен превышать 5–15 мин;
- для получения плазмы допускается центрифугирование в пробирках с антикоагулянтом немедленно после взятия крови;
- взятие сыворотки из пробирки с гелевым барьером допускается не позднее чем через 48 ч после центрифугирования, а из пробирки с негелевым барьером – не позднее чем через 1 ч.

Если сыворотка или плазма крови не может быть использована в течение 5 ч, то их следует поместить в холодильник на 24 ч; обычно сыворотку крови хранят в холодильнике при 0–4°C. Допускается хранение образцов в течение месяца (и более) при условии их замораживания сразу после получения и однократного размораживания непосредственно перед определением. Если же данные об устойчивости определяемых соединений, в частности об изменении активности фермента в сыворотке (плазме) крови при хранении, отсутствуют, рекомендуется проводить биохимический анализ сразу после их получения из цельной крови, которое проводят тотчас после взятия крови на анализ. Для определения содержания лабильных (нестойких) соединений, активности некоторых ферментов (кислой фосфатазы и др.) необходимо использовать свежую или лиофилизированную сыворотку. Сыворотку, хранившуюся при 0–4°C, применять с этой целью нельзя.

С целью транспортировки и хранения проб можно использовать сумки термостатированные производства компании «ГЕМ» (Россия) объемом 6, 12, 24 и 48 л (в закрытом виде сумка сохраняет температуру внутреннего объема в течение 6 ч).

Рекомендации по условиям хранения и транспортировки биологического материала для выполнения биохимических и иммунологических исследований

1. Избегать хранения цельной крови. Быстрая транспортировка и короткий срок хранения улучшают достоверность результаты лабораторных исследований.
2. Сохранять образцы биологической жидкости при возможно более низкой температуре, так как чем ниже температура хранения, тем лучше сохраняются образцы проб.
3. Хранить аликвоты анализируемых биологических жидкостей в закрытых сосудах (чтобы избежать испарения и контаминации).
4. По возможности шире использовать одноразовые системы для сбора проб.
5. Использовать пробирки с разделительными гелями для более эффективного отделения сыворотки от сгустка.
6. Избегать встряхивания сосуда с пробами, поскольку при этом риск гемолиза увеличивается (использование технологии пневматической доставки пробирок в лабораторию).
7. Всегда хранить сосуды с кровью в вертикальном положении.
8. Избегать воздействия света на образцы биологических жидкостей.
9. С особой осторожностью обращаться с инфицированным биологическим материалом.

В случае возникновения гемолиза, который определяется как «высвобождение компонентов клеток крови (гемоглобина и др.) в плазму или сыворотку крови» и характеризуется более или менее выраженным красноватым окрашиванием образцов, гемолизированные образцы не должны учитываться либо подвергаться лабораторному исследованию (за исключением редких, «вынужденных» случаев). Гемолиз можно предупредить путем стандартизации преаналитического этапа. Использование стандартных игл, закрытых пробирок и калиброванных центрифуг существенно помогает уменьшить частоту случаев гемолиза.

Мутность пробы всегда должна быть оценена, документирована и отмечена в бланке лабораторного анализа. Гомогенная мутность может указывать на гипертриглицеринемию, обуславливающую повышенное содержание ЛПОНП. Отчетливый сливкообразный слой, плавающий над прозрачным слоем биологической жидкости после центрифугирования и хранения свыше 12 ч в холодильнике, указывает на наличие в образце хиломикронов.

Биологический материал, как правило, сохраняют до окончания выполнения всех анализов, что позволяет в случае необходимости повторить исследование.

Основным биологическим материалом для определения активности ферментов и содержания метаболитов является сыворотка крови. Необходимо отметить, что вследствие частичного разрушения эритроцитов, сопровождающего переход их содержимого в окружающую жидкость, а также выделения в процессе свертывания крови и ретракции сгустка находящихся в тромбоцитах биологически активных веществ, способных влиять на ферменты плазмы (сыворотки) крови, в большинстве случаев активность ферментов (энзимов) сыворотки превышает таковую плазмы крови.

При выполнении биохимических исследований обычно используется сыворотка крови. Однако следует иметь в виду, что при разрушении (лизисе) эритроцитов находящиеся в них ферменты переходят в сыворотку крови. Этим объясняется, в частности, более высокая активность энзимов (например, лактатдегидрогеназы, АЛТ и АСТ, фруктозодифосфатальдозазы, кислой фосфатазы, аргиназы, фосфогексоизомеразы и др.), содержащихся в тромбоцитах и эритроцитах и освобождающихся из них при свертывании крови, в сыворотке, чем в плазме крови. Поэтому для оценки активности перечисленных выше и некоторых других ферментов рекомендуется использовать плазму крови.

Содержание электролитов правильнее определять в плазме крови (при соответствующем подборе антикоагулянта). Поскольку концентрация ионов калия в эритроцитах намного превышает уровень этого катиона в плазме крови, они могут выходить из эритроцитов даже через неповрежденную оболочку (что обуславливается нарушениями метаболических процессов в плазматической мембране клетки, в частности, АТФазной активности, функциональной деятельности K^+Na^+ -насоса). Исходя из этого *определять уровень калия в плазме следует не позднее чем через 1 ч после взятия крови.*

17.4. Современные технологии взятия крови на лабораторное исследование

Установлено, что ошибки преаналитического этапа работы с венозной кровью могут составлять от 40 до 60% всех лабораторных погрешностей, приводящих в 12% случаев к явно ошибочному лабораторному заключению, прежде всего из-за низкого качества образцов исследуемого биологического материала.

Традиционный способ взятия крови с помощью иглы и/или шприца часто приводит к искажению результата анализа из-за гемолиза эритроцитов. К тому же, нарушения, допущенные при взятии крови, могут быть причиной возникновения гемоконтактных инфекций у медицинского и технического персонала лечебно-профилактических организаций, увеличения риска внутрибольничного инфицирования. По результатам одного из крупных исследований, выполненных в течение последних 10 лет, установлено, что ошибки при взятии проб венозной крови являются причиной инфици-

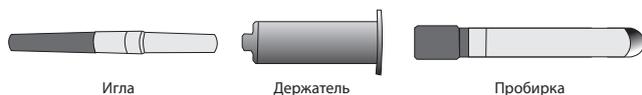


Рис. 17.1. Одноразовая закрытая вакуумная система для взятия крови.

рования медицинского персонала вирусами гепатита В и С в 23–25% случаев.

К тому же, точность и правильность результатов лабораторного исследования во многом зависят от техники взятия крови, используемых при этом инструментов, пробирок, реагентов и консервантов, условий хранения и транспортировки биологического материала, соблюдения необходимого соотношения добавляемых к крови ингредиентов.

Основным направлением снижения количества ошибок на преаналитическом и аналитическом этапах работы является максимальная стандартизация процедуры взятия проб крови и безукоснительное соблюдение профилактических и противоэпидемических мероприятий, регламентированных действующими нормативными правовыми актами.

17.4.1. Основные характеристики закрытых одноразовых вакуумных систем для взятия крови

Одноразовая безопасная закрытая вакуумная система для взятия крови является изделием медицинского назначения, обеспечивающим проведение манипуляций по взятию крови для лабораторных исследований. Она состоит из *трех основных элементов* (рис. 17.1), соединяющихся между собой в процессе взятия крови:

- стерильной одноразовой вакуумной пробирки с дозированным уровнем вакуума и различными наполнителями, с крышкой, защищенной пластиковым колпачком с цветовым кодом, соответствующим типу содержащегося реагента (антикоагулянта) по международной цветовой кодировке ISO 6710;
- стерильной одноразовой двусторонней иглы с мембраной, закрытой с обеих сторон защитными колпачками, предназначенной для взятия крови в несколько пробирок за одну венепункцию;
- одно- или многоразового держателя.

Под действием вакуума кровь всасывается из вены через иглу в пробирку и сразу же смешивается с химическим реактивом – антикоагулянтом. Тщательно дозированная величина вакуума обеспечивает достижение точного соотношения между кровью и реагентами в пробирке. Вакуумные системы выпускаются различными производителями: Vacutainer («Becton Dickinson», США); Monovette («Sarstadt AG», Германия); Vacuette («Greiner Bio-One», Австрия); Terumo Venosafe Venojet («Terumo Medical Corp.», США), Sanli Vacu Lab («Human Liuyang Medical Instrument Factory», Китай). Поставщиками систем взятия венозной (и капиллярной) крови являются российские фирмы НПФ «Абрис +», «Аналитика», «Дельрус», «Дикаит», «Эко-Сервис» и др.; компания «Неосептика» (Россия) осуществляет производство и поставку ва-

куумных систем для взятия крови, катетеров Минивен для взятия крови, пробирок с широким спектром антикоагулянтов, игл, иглодержателей.

Основными преимуществами использования безопасной вакуумной системы для взятия крови являются:

- исключение контакта с кровью, плазмой, сывороткой как в ходе выполнения процедуры взятия биологического материала и при работе с ним, так и при транспортировке;
- снижение риска внутрибольничного инфицирования;
- быстрота и удобство отбора проб;
- минимальное количество операций по подготовке образца крови для лабораторных исследований;
- безопасный процесс транспортирования и центрифугирования проб крови за счет применения небьющихся пластиковых пробирок;
- снижение ошибок на преаналитическом этапе исследования вследствие использования пробирок специальной конструкции, совместимость с широким спектром современных аналитических приборов;
- достижение четкого соотношения между количеством реагента и взятой крови;
- снижение болевых ощущений у пациента;
- невозможность повторного применения вакуумных систем (строго одноразовые);
- стандартизация условий взятия крови и процесса пробоподготовки;
- экономическая эффективность применения;
- современная технология на уровне мировых стандартов.

Описание типов пробирок, используемых при взятии венозной крови с помощью безопасной вакуумной системы, приведено в таблице 17.2.

Пробирки производятся из пластика и стекла различных объемов и размеров, они содержат специальные химические наполнители для проведения разных видов исследования, выпускаются стерильными, предназначены для одноразового применения.

Пробирки производятся стандартных размеров (1,8–10 мл) и совместимы с большинством центрифуг и анализаторов. Требуемый объем забираемой крови обеспечивается точно дозированной величиной вакуума, под действием которого кровь поступает в пробирку в процессе венепункции.

Пробирки выпускаются как с обычными, так и со специальными крышками, позволяющими при открывании пробирок полностью исключить контакт оператора (лаборанта) с кровью, которая может находиться в пробке и на внешнем крае пробирки.

Цвет крышки указывает на вид наполнителя и назначение пробирки. В качестве наполнителя используются активаторы свертывания (тромбин, кремнезем), антикоагулянты (ЭДТА, цитрат натрия, литий-гепарин, натрий-гепарин и т.д.), разделительные гели и другие химические реагенты.

Для обеспечения в пробе точного соотношения кровь/антикоагулянт количество наполнителя в пробирках строго соответствует заданному объему крови.

Таблица 17.2

Основные типы пробирок для закрытой одноразовой вакуумной системы взятия крови

Цвет крышки	Химические наполнители	Материал	Область применения	Число перемешиваний	Рекомендации по центрифугированию	Дополнительные рекомендации
Красный	Без наполнителя или с активатором свертывания (кремнезем)	Стекло, пластик	Клиническая химия, серология, иммунология	5–6	1300 g, 10 мин, при температуре воздуха 20–25°C	Рекомендуемое минимальное время свертывания – 60 мин
Голубой	Цитрат натрия 3,8% или 3,2%	Стекло, пластик	Коагулология: протромбин, тромбoplastин, фибриноген, факторы свертывания	5–6	2000–2500 g, 10–15 мин, при температуре воздуха 20–25°C	Пробирки должны быть заполнены полностью для выполнения соотношения реагент/кровь (1:9)
Черный	Цитрат натрия 3,8% (0,129 моль/л)	Стекло, пластик	Определение СОЭ по методу Вестергрена	8–10	–	Пробирки должны быть заполнены полностью для выполнения соотношения реагент/кровь (1:4) и предотвращения сморщивания эритроцитов
Желтый	Активатор свертывания (кремнезем) и разделительный гель	Стекло, пластик	Клиническая химия, серология, иммунология	5–6	1300–2000 g, 10 мин, при температуре воздуха 20–25°C	Рекомендуемое время свертывания – 20–30 мин
Оранжевый	Активатор свертывания (кремнезем) и тромбин 1,4 NIH для ускорения свертывания крови	Стекло, пластик	Экспресс-диагностика сыворотки в клинической химии, серологии, иммунологии	5–6	1300–1500 g, 10 мин, при температуре воздуха 20–25°C	Рекомендуемое время свертывания – 5 мин

Таблица 17.2 (окончание)

Цвет крышки	Химические наполнители	Материал	Область применения	Число перемешиваний	Рекомендации по центрифугированию	Дополнительные рекомендации
Зеленый	Лигий-гепарин, литий-гепарин и разделительный гель	Стекло, пластик	Исследование плазмы в клинической химии, иммунологии	8–10	1300 g, 10 мин, при температуре воздуха 20–25°C	
Светло-зеленый	Натрий-гепарин, гепарин и разделительный гель	Стекло, пластик	Исследование плазмы в клинической химии, иммунологии	8–10	1300–2000 g, 10 мин, при температуре воздуха 20–25°C	
Лиловый	K2-ЭДТА или K3-ЭДТА, K2-ЭДТА или K3-ЭДТА и разделительный гель	Стекло, пластик	Гематологические исследования цельной крови, RV, HBs-антиген, ВИЧ	8–10	1300 g, 10 мин, при температуре воздуха 20–25°C	
Серый	Фторид натрия, оксалат натрия, фторид натрия и ЭДТА	Стекло, пластик	Исследование глюкозы	6–8	1300 g, 10 мин, при температуре воздуха 20–25°C	Выдерживание пробы в пробирке с фторидом натрия/оксалатом натрия гарантирует стабильный уровень глюкозы до 24 ч при комнатной температуре. Перемешивать медленно и аккуратно

17.4.2. Техника взятия крови с помощью вакуумной закрытой системы

Прежде чем приступить к взятию крови, необходимо проверить срок годности и целостность упаковки системы (при истечении срока годности или при повреждении упаковки систему использовать нельзя). После осмотра системы с точки зрения ее пригодности для использования следует выполнить следующее:

1. Выбрать, осмотреть и пропальпировать место предполагаемой венопункции.
2. Наложить жгут.
3. Взять иглу, удерживая цветную часть защитного колпачка в одной руке, снять белую часть, закрывающую второй конец иглы с резиновым клапаном, другой рукой.
4. Ввернуть закрытый резиновым клапаном конец иглы в держатель.
5. Попросить пациента сжать руку в кулак, продезинфицировать место венопункции, дождаться полного высыхания антисептика или просушить место венопункции стерильным сухим тампоном.
6. Снять с иглы цветной колпачок.
7. Фиксируя вену левой рукой так, чтобы большой палец находился на 3–5 см ниже места венопункции, натянуть кожу.
8. Ввести иглу в вену, срезом вверх под углом 15°, правой рукой.
9. При использовании иглы с прозрачной камерой убедиться, что в индикаторную камеру поступает кровь. При использовании иглы с катетером кровь должна быть видна в катетере.
10. Вставить пробирку в держатель со стороны крышки пробирки. Большим пальцем правой руки надавить на дно пробирки, удерживая при этом ободок держателя указательным и средним пальцем левой руки.
11. Как только кровь начнет поступать в пробирку, снять (ослабить) жгут и попросить пациента разжать кулак.
12. Кровь поступает в пробирку под действием вакуума. Тщательно дозированный уровень вакуума обеспечит получение необходимого объема крови и достижение точного соотношения кровь/реагент.
13. При взятии пробы у одного пациента в несколько пробирок необходимо соблюдать правильную последовательность заполнения пробирок (см. табл. 17.3). Это необходимо для предотвращения возможной перекрестной контаминации пробы реагентами.
14. Извлечь пробирку после того, как в нее прекратила поступать кровь. Извлекать пробирку удобнее, упираясь большим пальцем в ободок держателя.
15. Перемешать содержимое наполненной пробирки путем ее переворачивания несколько раз до полного смешивания крови и наполнителя, необходимое число переворачиваний см. в таблице 17.2.
16. Извлечь иглу из вены, поместить, не разбирая, в специальный контейнер для острых предметов.

Таблица 17.3

Последовательность заполнения пробирок (1→8)

	1	2	3	4	5	6	7	8
Цвет крышки	Красный	Голубой	Черный	Красный	Желтый	Зеленый	Лиловый	Серый
Наполнитель	Без наполнителя	Цитрат натрия 3,8% или 3,2%	Цитрат натрия 3,8%	Активатор свертывания	Активатор свертывания (кремнезем) и разделительный гель	Литий-гепарин или литий-гепарин тельный гель	К2-ЭДТА или К3-КДТА и разделительный гель	Фторид натрия или оксалат натрия либо фторид натрия и ЭДТА
Число перемешиваний		5–6	8–10	5–6	5–6	8–10	8–10	6–8

17. Наложить давящую повязку или бактерицидный пластырь на место венопункции.

Транспортировать пробирки с кровью в лабораторию следует в специальных контейнерах с крышками в вертикальном положении в штативе, избегая встряхивания.

Особенности взятия крови с помощью венозных катетеров в вакуумные пробирки

- Если при взятии венозной крови используются вены тыльной стороны кисти, височные и другие труднодоступные вены, то лучше применять комплект для взятия крови с иглой-бабочкой и катетером. Игла со специальными «крылышками» позволяет лучше фиксировать иглу в вене, а гибкий катетер гарантирует удобную работу процедурной медицинской сестры.

Техника взятия крови такая же, как и при использовании стандартной иглы. Игла может быть закреплена в вене за «крылышки» обычным пластырем. Игла-бабочка с катетером рекомендуется для работы в отделениях интенсивной терапии и педиатрических отделениях.

- Взятие проб крови из постоянных катетеров может явиться причиной получения ошибочных результатов исследования вследствие контаминации лекарственными средствами, антикоагулянтами (гепариновый замок) и/или разбавления образца крови.

Катетеры обычно промываются физиологическим раствором для уменьшения риска тромбоза, их нужно промыть этим раствором еще раз перед взятием проб крови для диагностических исследований.

- *После и перед* взятием биологического материала на исследование нужно удалить из катетера достаточное количество крови, чтобы быть уверенным, что проба не контаминирована. Объем удаляемой крови зависит от объема «мертвого» пространства конкретного катетера. При проведении биохимических исследований рекомендуемый объем сливаемой крови перед взятием новых проб – 2 объема «мертвого» пространства (в среднем 2,0–2,5 мл), при выполнении коагулологических исследований – 6 (в среднем 5) мл.

При взятии крови из катетера с помощью вакуумной системы используют адаптер или держатель с адаптером. Техника взятия крови такая же, как и при использовании игл.

17.4.3. Основные причины ошибок при взятии крови с помощью закрытой вакуумной системы

Кровь не заполнила пробирку до необходимого объема

Причина 1: в пробирку попал воздух (это возможно, если игла с надетой пробиркой находилась вне вены)

Если кровь берется для исследования сыворотки и лаборанта устраивает объем уже набранной крови, то пробирку можно вынуть из держателя и отправить в лабораторию. Но если кровь набирается в пробирку

с антикоагулянтом, то при заборе меньшего количества крови соотношение кровь/реагент будет нарушено. Такой образец нельзя отправлять на анализ, и в таком случае необходимо повторно взять кровь в новую пробирку.

Причина 2: коллапс вены

В этом случае следует вынуть пробирку из держателя, подождать, пока вена наполнится, и снова вставить пробирку.

Игла введена в вену, пробирка находится в держателе, но кровь не поступает в пробирку

Причина 1: игла не находится в вене

Не извлекая иглу из-под кожи, нужно слегка ее вытянуть и снова ввести в вену.

Причина 2: прокол вены насквозь

Следует медленно вытягивать иглу до появления тока крови. Если ток крови не возобновился, венепункцию нужно повторить.

Причина 3: кончик иглы прижат к стенке сосуда

В таком случае следует вынуть пробирку из держателя (благодаря эластичности резиновой пробки вакуум в пробирке полностью сохранится). Фиксируя вену и не вынимая иглы, нужно изменить ее положение в вене. Если кровь по-прежнему не поступает в пробирку, венепункцию следует повторить.

17.4.4. Дезинфекция и утилизация вакуумных систем для взятия крови

Одноразовые вакуумные системы для взятия крови, используемые в учреждениях здравоохранения, после их использования переходят в категорию медицинских отходов, потенциально опасных с точки зрения возникновения и распространения инфекционных заболеваний, передаваемых с кровью, класса Б (опасные отходы) или В (чрезвычайно опасные отходы).

Мероприятия по обеззараживанию и утилизации одноразовых вакуумных систем для взятия крови должны проводиться в соответствии с действующими нормативными правовыми актами, по вирулицидному режиму.

Для безопасного и удобного хранения, транспортирования и последующего обеззараживания использованных игл и держателей рекомендуется применять устойчивые к прокалыванию, водостойкие безопасные контейнеры, разрешенные к применению для этих целей.

Для дезинфекции таких контейнеров используют физические методы (без предварительного обеззараживания игл химическим методом) с последующим удалением отходов вместе с контейнерами. Химический метод дезинфекции игл вакуумной системы для взятия крови не применяется, так как нет безопасного способа заполнения канала иглы дезинфицирующим раствором.

После взятия пробы иглу, не вынимая из держателя и не надевая на нее защитный колпачок, которым она была закрыта до начала процедуры, следует сбросить в контейнер для использованных острых предметов, относящихся к отходам класса Б или В.

Контейнер рекомендуется заполнять на три четверти объема. Затем его закрывают крышкой (контейнер не герметичен), опломбируют и маркируют: класс Б (B), название подразделения. Контейнер с отходами обеззараживают и удаляют в места временного хранения отходов для последующего вывоза и утилизации.

При использовании многоразовых держателей они отсоединяются от иглы с помощью иглосъемника либо путем фиксации иглы в специальном отверстии крышки контейнера. В этом случае игла откручивается от держателя, оставаясь в контейнере. В целях безопасности запрещается разбирать иглу и держатель руками. Контейнеры с иглами утилизируются, а держатели подвергаются обеззараживанию химическим методом согласно требованиям действующих нормативных правовых актов.

Поскольку повторное использование держателя требует отсоединения потенциально контаминированной иглы, медицинский персонал, проводящий манипуляцию, подвергается риску случайного укола и заражения гемоконтактными инфекциями. Вследствие этого в целях безопасности многоразовое применение держателей рекомендуется исключить.

Для обеззараживания вакуумных пробирок после окончания исследований следует отдавать предпочтение физическому методу. При этом вакуумные пробирки с оставшимся в них содержимым герметично закрывают пробками или крышками, с которыми они поставлялись, собирают в устойчивые к вытеканию жидкостей емкости (контейнеры, пластиковые пакеты), пригодные для физического метода обеззараживания. Контейнеры с отходами обеззараживают и удаляют в места временного хранения отходов для последующего вывоза и утилизации.

Одноразовая тара для сбора опасных отходов (безопасные контейнеры, одноразовые пакеты) должна отвечать медико-техническим требованиям к данной продукции и иметь свидетельство о государственной регистрации, разрешающее ее применение в медицинской практике.

К работам, связанным со сбором, обеззараживанием, временным хранением и транспортированием использованных одноразовых вакуумных систем для взятия крови не допускаются лица, не достигшие 18-летнего возраста и не прошедшие предварительного обучения.

Обучение персонала правилам безопасного обращения с использованными деталями одноразовых вакуумных систем для взятия крови организуют специалисты, ответственные за организацию обращения с отходами, назначенные приказом руководителя организации. За обучение персонала правилам безопасного обращения с медицинскими отходами несет ответственность руководитель организации здравоохранения.

Медицинскому персоналу, осуществляющему сбор, обеззараживание, временное хранение, транспортирование медицинских отходов, категорически запрещается:

- пересыпать собранные детали одноразовых вакуумных систем для взятия крови из одной тары в другую;

- размещать емкости для сбора деталей одноразовых вакуумных систем для взятия крови вблизи электронагревательных приборов;
- утилизировать руками использованные детали одноразовых вакуумных систем для взятия крови;
- осуществлять сбор медицинских отходов, в том числе деталей одноразовых вакуумных систем для взятия крови, без резиновых перчаток и санитарной одежды.

Персонал, занимающийся обеззараживанием, сбором и транспортированием использованных деталей одноразовых вакуумных систем для взятия крови, должен быть обеспечен санитарной одеждой (халатами, шапочками или косынками, масками, сменной обувью) и средствами индивидуальной защиты (респираторами, резиновыми перчатками, герметичными очками, непромокаемыми фартуками), которые применяют в соответствии с инструкциями.

При получении работником травмы при работе с медицинскими отходами классов Б и В по отношению к нему принимают меры экстренной профилактики в соответствии с действующими инструктивно-методическими документами.

На рабочем месте персонала, занимающегося сбором и транспортированием отходов, должна быть аптечка первой помощи при аварийной ситуации с биологическим материалом.

Контейнеры для утилизации использованных расходных материалов и другое оборудование для сбора, хранения и утилизации соответствующих внутрибольничных отходов поставляются компанией НПФ «Абрис +» (Россия) и др.

Обезвреживание медицинских инфицированных отходов классов Б и В можно осуществлять с помощью современной и надежной СВЧ-установки УОМО-01/150, которую производит «Обнинский центр науки и технологий» (Россия) и поставляет в лечебно-профилактические учреждения России, Белоруссии и стран СНГ компания «Мультилаб». Также для этих целей используется портативная система Sharps Blaster («Sefa Environmental Solutions Ltd.», Великобритания) – компактный и бесшумный прибор с предельно простым управлением, обеспечивающий полный цикл обеззараживания, со встроенной системой фильтрации испарений.

17.5. Исследование мочи и кала. Общие правила

17.5.1. Правила сбора утренней порции мочи для лабораторных исследований

Для общеклинического исследования мочи следует использовать «утреннюю» мочу, которая собирается в течение ночи в мочевом пузыре. Для получения достоверных результатов лабораторного исследования следует:

1. Осуществить тщательный туалет половых органов мыльным раствором с последующим обязательным обмыванием кипяченой водой или 0,02%

раствором фурацилина (5 табл. на 0,5 л кипяченой воды) или 0,02–0,1% раствором марганцовокислого калия (интенсивный сиреневый цвет).

2. Мужчины перед мочеиспусканием должны оттянуть кожную складку и освободить наружное отверстие мочеиспускательного канала, женщины – раздвинуть половые губы.
3. Собрать среднюю порцию мочи, для чего начать мочеиспускание в унитаз, через 2–3 с подставить контейнер для сбора мочи, после наполнения контейнера на 2/3–3/4 объема продолжить мочеиспускание в унитаз.
4. Закрыть контейнер завинчивающейся крышкой, разборчиво написать на нем свою фамилию и инициалы, дату и время анализа.

Используемый для сбора утренней порции мочи контейнер представляет собой широкогорлый градуированный полупрозрачный стаканчик емкостью 125 мл с герметично завинчивающейся крышкой. Контейнер стерилен и не требует предварительной обработки, он полностью готов к использованию.

Перед сбором мочи на исследование нежелательно принимать лекарственные вещества, витамины. Нельзя допускать замораживания мочи при транспортировке и не следует хранить ее более 2 ч до сдачи на анализ в лабораторию.

17.5.2. Правила сбора суточной мочи для лабораторных исследований

Утром перед сбором мочи необходимо провести туалет наружных половых органов, как описано выше. Первую утреннюю порцию мочи не собирают, но отмечают время мочеиспускания; в дальнейшем собирают всю мочу, выделяемую за 24 ч от отмеченного времени первого мочеиспускания до того же часа через сутки. Для сбора суточной мочи лучше всего использовать специализированный градуированный пластиковый контейнер на 2,7 л, имеющий широкую горловину и рельефную ручку (контейнер безопасен и удобен в обращении). По окончании сбора (последнее мочеиспускание производится через сутки в то же время, которое отмечено как время первого мочеиспускания) моча сдается в лабораторию либо в полном объеме (в контейнере для суточной мочи), либо в виде порции из суточного объема мочи (для этого весь суточный объем мочи в закрытом контейнере взбалтывается, после чего отливается порция объемом 100 мл в малый контейнер для клинического анализа мочи вместимостью 125 мл).

17.5.3. Правила сбора кала для лабораторных исследований

Собирать кал для исследования следует утром. Если это затруднительно, можно подготовить пробу заранее, но не более чем за 8 ч перед сдачей кала в лабораторию. В этом случае хранить пробу следует в холодильнике.

Для сбора кала на анализ необходимо:

1. Осуществить тщательный туалет наружных половых органов и области заднего прохода мыльным раствором с последующим обязательным об-

мыванием кипяченой водой или 0,02% раствором фурацилина (5 табл. на 0,5 л кипяченой воды) или 0,02–0,1% раствором марганцовокислого калия (интенсивный сиреневый цвет).

2. Предварительно помочиться.
3. Произвести дефекацию в сухую, чистую емкость – судно или ночную вазу.
4. Перенести пробу кала объемом 3–5 см³ в заранее подготовленный чистый сухой контейнер для хранения и транспортировки.
5. Если планируется исследование кала на наличие скрытой крови, то за 3 сут. следует исключить из рациона питания мясо, рыбу, зеленые овощи и помидоры.

При этом следует помнить о том, что нельзя:

1. Проводить исследование кала раньше чем через 2 сут. после клизмы, рентгенологического исследования желудка и кишечника, колоноскопии.
2. Накануне принимать лекарственные вещества, в том числе: слабительные, активированный уголь, препараты железа, меди, висмута, а также использовать ректальные свечи на жировой основе.
3. Допускать попадания в образец мочи или воды.
4. Проводить исследование кала у женщин во время менструации.

Контейнер для сбора кала представляет собой широкогорлый полупрозрачный стаканчик емкостью 60 мл с герметично завинчивающейся крышкой, в которую вмонтирована ложка-шпатель. Он стерилизован, не требует предварительной обработки и полностью готов к использованию.

Раздел 3

**ОБОРУДОВАНИЕ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ
АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ
ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Глава 18. СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ И АНАЛИЗАТОРЫ ДЛЯ ВЫПОЛНЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ В ПОЛУАВТОМАТИЧЕСКОМ И АВТОМАТИЧЕСКОМ РЕЖИМАХ

18.1. Общая характеристика технологических принципов работы автоматических клиничко-биохимических анализаторов

Технологии лабораторного исследования включают в себя:

- Абсорбционный фотометрический анализ
- Эмиссионный оптический анализ
- Ионметрический (потенциометрический) анализ
- Сатурационный анализ
- Иммуноферментный (иммунофлуоресцентный) анализ
- Исследование морфологического состава крови методами кондуктометрического, оптического анализа
- Генетический (молекулярно-биологический) анализ (в том числе на основе ПЦР)
- Химико-токсикологический анализ
- Бактериологические и вирусологические исследования
- Серологические исследования
- Исследования кислотно-основного состояния газов и крови (КОС)
- Способы фракционирования компонентов биологических жидкостей и тканей (электрофорез, хроматография)
- Некоторые другие виды исследования

Более 80% всех видов лабораторных исследований осуществляются с использованием методов оптического анализа (преимущественно абсорбционного).

Практикуемый во многих КДЛ ручной (мануальный) метод анализа базируется на непосредственном участии лаборанта в осуществлении всех основных этапов клинико-лабораторного исследования: взятии биологического материала, реагентов, их смешивании, инкубации, регистрации аналитического сигнала (на фотометре или другом приборе), расчете концентрации определяемого вещества. При этом даже незначительные отклонения в условиях выполнения анализа (неизбежно возникающие при постановке большого количества проб) способны существенно повлиять на конечный результат лабораторного исследования.

Стандартизация режимов определения, достигаемая автоматизацией всей процедуры анализа, естественно, повышает надежность его выполнения, притом за более короткий период времени и с использованием значительно меньшего (чем при мануальном исследовании) объема реагентов и биологического материала.

Совершенствование технологии биохимических исследований в мировой лабораторной практике началось с середины 1950-х гг. Первым этапом этого процесса было создание фотометров и спектрофотометров с контролируемой температурой кюветы, что позволило реализовать на практике принцип кинетического исследования субстратов, ферментов и других веществ. В дальнейшем фотометрическое оборудование стали оснащать электронной функцией автоматического перевода регистрируемых значений абсорбции в показатели концентрации веществ или активности ферментов.

Появление автоматических фотометров, исключаящих из практики оператора стадию расчетов, дало возможность проводить измерения не только в режиме конечной точки (когда реакция уже завершилась), но также в следующих режимах:

- фиксированного времени (измерение результата через определенный интервал времени после начала реакции);
- кинетическом (проведение ряда измерений через определенные интервалы времени), с последующим расчетом активности фермента по средней величине изменения абсорбции за интервал времени;
- дифференциальном (расчет концентрации по разности абсорбции образца и стандарта);
- бихроматическом (расчет концентрации по разности абсорбции, измеренной при двух длинах волн).

Дальнейшая автоматизация фотометров привела к появлению проточной кюветы, исключившей ошибки, связанные с постановкой кюветы в измерительный модуль и ее термостатированием, и позволяющей экономнее расходовать реактивы, поскольку при толщине поглощающего слоя 1 см объем кюветы составляет не более 100 мкл. С учетом объемов подводящих трубок и необходимости несколько раз менять реакционную смесь в кювете до начала измерения объем для проведения измерений составляет 0,5–1,0 мл.

Наряду с одно- и двухканальными появились и многоканальные фотометры, позволяющие анализировать одновременно большое количество проб, что существенно ускорило процесс исследования.

Главным отличием автоматических фотометров (спектрофотометров) от автоанализаторов является необходимость вручную смешивать образец с реактивами. Поэтому, если укомплектовать автоматический фотометр устройством, автоматически смешивающим определенный объем пробы с определенным объемом реактива, то такой комплекс может рассматриваться уже как автоматический анализатор.

Практически все автоматические фотометры снабжены программой внутреннего контроля (автоматически сообщают о возникших неисправностях) и соединены с персональным компьютером. Число каналов программирования у подавляющего большинства автоматических фотометров позволяет без перепрограммирования выполнять все биохимические исследования.

Отдельные модели использующихся в КДЛ фотометров

- *КФК-3* (ОАО «Загорский оптико-механический завод», Россия) – одноканальный фотометр без термостатирования кюветного отделения, позволяющий проводить простейшие (методом конечной точки) исследования;
- *PV 1251C* («СОЛАР», Белоруссия) – одноканальный спектрофотометр, укомплектованный современным компьютером и проточной кюветой; при работе на этом приборе можно использовать практически все современные реактивы и методы исследования;
- *RA-50* («Bayer Diagnostics», Германия) – одноканальный фотометр с проточной кюветой, который позволяет проводить все современные исследования;
- *Cormay Plus* и *Cormay Multi* («Cormay», Италия) – одноканальные фотометры с проточной кюветой, которая при необходимости легко снимается; измерения могут проводиться в пластиковых кюветах; может работать в режимах конечной точки (со стандартом или фактором), фиксированного времени и кинетическом;
- *Photometer 5010* («Boehringer Mannheim», Германия) – одноканальный фотометр с проточной кюветой, дает возможность выполнять все современные биохимические исследования;
- *FP 900, FP 901, FP 901 M* («Therumo Electron Corp.», Финляндия) – многоканальные фотометры, последние модификации которых снабжены компьютером; все модели оснащены не связанным с фотометром термостатом-встряхивателем, кюветами оригинальной конструкции по 9 штук в обойме; измерение вертикальное, поэтому очень важно иметь одинаковый объем раствора во всех кюветах.

Техника автоматического лабораторного анализа к настоящему времени достигла высокого уровня. Разработано несколько десятков вариантов конструкции автоматических анализаторов для осуществления биохими-



Рис. 18.1. Автоматический биохимический анализатор ChemWell (+).

ческих, гематологических и иммунохимических исследований. Существующие в настоящее время **биохимические автоматические анализаторы** могут быть условно подразделены на **три основных типа**:

- *одноцелевые биохимические автоанализаторы* позволяют определять в анализируемой пробе только один компонент биологической жидкости и ткани. К таким приборам можно отнести, например, анализатор «Glucose II» («Beckman Coulter», США);
- *автоматические анализаторы для определения так называемых родственных компонентов*, в частности, аминокислот или солей щелочных металлов, например, автоматический анализатор аминокислот, принцип действия которого основан на их разделении методом хроматографии (по Штейну и Муру), или автоматический атомно-абсорбционный пламенный спектрофотометр;
- *многоцелевые биохимические автоматические анализаторы*, предназначенные для установления содержания в биологических жидкостях большого количества различных по химической природе компонентов; такие приборы наиболее широко применяются в лечебно-профилактических учреждениях для выполнения ординарных и некоторых специальных клинико-лабораторных исследований. В качестве примера такого прибора можно привести анализатор ChemWell (+) («Awareness Technology», США) (рис. 18.1).

Все приборы данного типа:

- оснащены программным обеспечением на базе персональных компьютеров, а не микропроцессоров;
- осуществляют контрольные функции, обеспечиваемые автоматизированным слежением компьютерного устройства за работой отдельных блоков прибора и выполнением программы контроля качества проводимых лабораторных исследований;

- осуществляют автоматические пробоподготовку и дозирование. Если пробоотборник в автоматизированном устройстве отсутствует, прибор рассматривается как полуавтоматический анализатор, процесс эксплуатации которого требует постоянного участия оператора;
- экономичны за счет почти 10-кратного снижения расхода реактивов (350–500 мкл и менее на одну пробу вместо 3–4 мл реактива при работе на обычном фотоэлектроколориметре);
- используют для анализа небольшой объем биологической жидкости (3–7 мкл);
- обладают высокой производительностью (до 800 и более исследований в час);
- должны эксплуатироваться не менее 5–6 ч в сутки;
- характеризуются гибкостью в работе, так как они обеспечивают возможность использования разных режимов определения: по конечной точке, двух- или многоточечного кинетического, а также с применением технологии турбидиметрии (иммунонепелометрии), ионометрии, поляризационной флуориметрии и др. Например, в последнее время в клинико-диагностических исследованиях (в коагулологии) используется турбидиметрия с фиксированной абсорбцией. Особенностью этого технологического процесса является измерение времени прироста оптической плотности до заданного ее значения;
- конструкция многих приборов дает возможность программирования автоматического анализатора для использования реактивов разных производителей (открытость системы);
- оснащены небольшими (в том числе моющимися) измерительными кюветами;
- автоматические анализаторы дают возможность оценивать ход реакции, что позволяет, в частности, выявить фазу истощения субстрата, кофакторов (при работе в ручном режиме это невозможно);
- осуществляют контроль качества. В современных автоанализаторах для реализации этой функции заложено несколько программ;
- обеспечивают сохранение базы данных, в том числе и на сервере ЛПУ;
- обеспечивают возможность передачи данных по внутрибольничным электронным сетям и через сеть Интернет;
- обеспечивают возможность выполнения экстренных исследований (анализов *cito*);
- измерительные модули автоматических анализаторов позволяют регистрировать величину абсорбции (при условии соблюдения зависимости, определяемой законом Бугера–Ламберта–Бера) в пределах до 2,5 ед. опт. пл., в отличие от обычных фотоэлектроколориметров, которые измеряют оптическую плотность растворов в диапазоне 0,2–0,7 ед. опт. пл. Это достигается за счет использования мощного источника и более чувствительных приемников света;

Некоторые из современных биохимических автоанализаторов оснащены ионоселективным блоком, позволяющим, в частности, проводить определение содержания ионов с использованием валиномицинового электрода;

- ферментные наборы реагентов для автоматических анализаторов не содержат агрессивных жидкостей и практически не обладают токсическим эффектом;
- являются надежными устройствами, что обеспечивается использованием новейших технологий.

Современные клинико-лабораторные автоанализаторы также характеризуются:

- простотой идентификации проб и ввода данных о пациенте;
- термостатированием на каждом этапе выполнения анализа и в измеряемой ячейке;
- возможностью выполнения анализа непосредственно у постели больного в режиме POST (Point of Care Testing), а также в режиме STAT (Short Turn – Around Time), т.е. внеочередного проведения, с минимальным временем выполнения анализа с момента запроса до выдачи результата, необходимого для экстренного осуществления адекватных лечебных мер;
- использованием сенсорных дисплеев;
- диалоговой системой общения с оператором;
- одновременной индикацией нескольких измеряемых компонентов биологического материала (аналитов);
- стабильностью калибровок;
- автоматическим контролем за образованием микросгустков;
- наличием в ряде анализаторов режима экономной работы;
- длительным хранением идентификационных и демографических данных;
- встроенными программами контроля качества;
- встроенными современными информационными технологиями.

18.2. Классификация медицинских лабораторных анализаторов

Анализаторы лабораторные медицинские – технические средства, используемые в медицинских лабораториях для обнаружения и измерения аналитов. Единая классификация автоматических анализаторов к настоящему времени не установилась.

В зависимости от клинического назначения они подразделяются на биохимические, гематологические, иммунологические, анализаторы мочи, электролитов, рН и газов крови, анализаторы оценки параметров системы гемостаза и др. (в том числе многоцелевые).

В зависимости от принципа детекции аналитов выделяют устройства оптические (фотометрические, флуоресцентные, люминесцентные и др.), электрохимические, радиометрические и др.

По способу пробоподготовки анализаторы подразделяются на полуавтоматические (пробоподготовка, добавление реактивов, перенос проб от модуля к модулю в процессе анализа проводятся лаборантом вручную) и автоматические (все этапы анализа выполняются автоматически).

В зависимости от конструкции и состояния консолидации методов различают самостоятельно работающие анализаторы (не консолидированные с другими методами), а также комбинированные (объединенные) с другими анализаторами или модулями для одновременного исследования многими методами различных аналитов и выполнения различных видов лабораторных исследований.

В зависимости от физического состояния реактивов биохимические автоанализаторы подразделяют на жидкостные (используются растворы реактивов) и твердофазные (используются реактивы на различных носителях: тест-полосках, слайдах, кассетах, картриджах и т.д.).

По принципу действия жидкостные анализаторы подразделяются на:

- анализаторы дискретного типа, в которых аналитическая реакция осуществляется в отдельных (дискретных) для каждой пробы сосудах (пробирках, ячейках, кюветах и т.д.), в которые затем поступают необходимые реагенты, после чего емкость транспортируется к месту измерения;
- анализаторы центрифужного типа, в которых под действием центробежной силы в одном из отсеков кюветы специальной формы происходит смешивание проб, реагентов и формируется подлежащая в дальнейшем фотометрии реакционная смесь;
- анализаторы поточного (непрерывно-поточного) типа, в которых анализ выполняется в реакционных трубках в потоке проб и соответствующих реактивов; в этих приборах пробы, разделенные пузырьками воздуха, и реагенты с помощью перистальтического насоса подаются по гибким пластиковым трубкам в смеситель, откуда затем поступают в проточную кювету, где производится измерение.

В зависимости от способа регистрации содержания аналита автоматические анализаторы подразделяются на устройства, производящие измерения: в дискретно поступающих пробах и в биологических жидкостях (например, посредством специальных сенсоров, помещенных непосредственно в кровеносное русло или в систему экстракорпоральной циркуляции), инвазивным и неинвазивным способом.

В зависимости от используемых реактивов и их взаимозаменяемости автоматические анализаторы подразделяются на:

- анализаторы открытого типа, которые могут работать с сертифицированными наборами реагентов любых фирм-производителей;

- анализаторы закрытого типа, при работе с которыми можно использовать реагенты только одного конкретного производителя.

В зависимости от количества измеряемых аналитов различают моноцелевые (однопараметровые, одноканальные) и многоцелевые (многопараметровые, многоканальные) автоматические анализаторы.

В зависимости от габаритов и массы приборов различают:

- настольные (малогобаритные) приборы, не требующие дополнительной водоподготовки;
- напольные приборы с системой водоочистки, которые нужно в ряде случаев располагать в отдельной комнате, оснащенной кондиционером.

В зависимости от производительности выделяют:

- малые аналитические системы производительностью 100–120 анализов в час;
- средние аналитические системы производительностью 180–250 анализов в час;
- большие многоканальные биохимические автоанализаторы производительностью 400–500 и более анализов в час.

В зависимости от способов установки в КДЛ анализаторы подразделяются на стационарные и портативные (переносные, мобильные).

В зависимости от особенностей конструкции автоматические анализаторы могут быть подразделены на устройства следующих классов:

1-й класс. Автоанализаторы, реализующие принцип ВАСН-системы, т.е. выполнения исследований «по тестам». Характерной их особенностью является использование проточных кювет. Анализаторы этого типа предназначены для последовательного проведения отдельных серий исследований. Представляют собой открытые системы.

К этому классу относятся, в частности, Autolab («Boehringer Mannheim», Германия), Autohumalizer 900 S («Human GmbH», Германия), зарегистрированные МЗ Республики Беларусь, Vitalab Eclipse («WWR International» – бывшая «Merck», Германия) и др.

2-й класс. Анализаторы селективные, обеспечивающие режим выполнения работы по принципу random, т.е. «по пациентам», которые позволяют выполнять исследование различных биохимических тестов путем взятия (с использованием манипулятора) отдельных аликвот одной и той же пробы биологического материала. Как правило, регистрация оптической плотности производится не в проточной, а в отдельной реакционной кювете. Приборы этого типа допускают возможность проводить экспресс-анализы (STAT-режим).

Ряд автоматизированных устройств этого класса могут обеспечивать приоритет выполнения проб с наименьшим числом заказанных тестов – режим TANDEM.

3-й класс. Многофункциональные интеллектуальные системы, предназначенные для использования в диагностических центрах, централизованных клиничко-биохимических лабораториях. Укомплектованы ионоселективными блоками.

18.3. Этапы лабораторного анализа и функциональное назначение отдельных блоков (модулей) жидкостных автоматических биохимических анализаторов

1. Идентификация образца биоматериала – присвоение каждому образцу порядкового номера, кодируемого тем или иным способом.
2. Распределение (сортировка) образцов по виду исследований при помощи специальных приборов – сортеров.
3. Удаление белка и других интерферентов (в случае необходимости) с помощью диализа биоматериала через полупроницаемую мембрану или с использованием колоночной хроматографии, гель-фильтрации или ионообменников.
4. Отметривание пробы и реагентов с помощью дозирующих устройств типа шприцев, автоматических пипеток или трубок со строго определенным внутренним диаметром (в анализаторах непрерывно-поточного типа).
5. Перенос проб биологических жидкостей и реагентов с помощью специальных механизированных устройств по определенной программе.
6. Хранение реактивов в холодильных установках, встроенных в анализаторах.
7. Проведение химической реакции:
 - *в анализаторах проточного (поточного) типа* при прохождении жидкости через спиралевидный участок трубки, протяженность которого определяется скоростью протекания жидкости и временем, необходимым для завершения реакции (данный участок может находиться в водяной бане с требуемым уровнем температуры);
 - *в анализаторах дискретного типа* в специальной реакционной камере или сосуде, в который были помещены (дозированы) пробы и реагенты; нагрев и термостатирование смеси пробы и реагентов осуществляется с помощью водяной или суховоздушной бани либо специального нагревателя.
8. Измерение результата реакции том же сосуде, где проходит реакция, или в специальной измерительной камере, куда прореагировавшая смесь переносится током жидкости (в анализаторах непрерывно-поточного типа), при вращении (в анализаторах центрифужного типа) или в том сосуде, куда жидкость отбирается специальным устройством. Производится фотометрическая или электрохимическая детекция прореагировавшей смеси.
9. Обработка сигнала в микропроцессоре или компьютере, встроенном в анализатор либо соединенном с ним.

Микропроцессоры или компьютеры также осуществляют текущий контроль за функционированием отдельных блоков прибора, статистическую обработку результатов исследований, распечатку контрольных карт с одновременной интерпретацией результатов, хранение данных.

18.4. Отдельные модели современных автоматизированных устройств для выполнения клинико-биохимических исследований

- *Vitalit 1000* («Vital Diagnostics», Италия) – автоматический анализатор для биохимического и иммунотурбидиметрического анализа, который представляет собой малогабаритный настольный прибор (масса 45 кг) с производительностью до 120 тестов в час (с учетом выполнения исследований в кинетическом режиме) и до 200 тестов в час (по конечной точке). Автоанализатор допускает возможность работы в разных режимах: «по тестам» – с оптимизацией времени проведения цикла анализов; «по пациентам» – в режиме срочного анализа (возможность проведения срочного анализа с использованием нескольких компонентов). Измерения производятся в конечной точке реакции (моно- или бихроматические), в кинетическом режиме, дифференциальным методом (с двумя реагентами или холостой пробой), псевдокинетическим двухточечным методом по стандарту, методом иммунотурбидиметрии с расчетом значений по нелинейной калибровочной кривой. Допускается использование одного, двух или трех реагентов.
- *Vitalon 400* («Rayto Life and Analytical Science», Китай) – анализатор полуавтоматический для биохимических и иммунотурбидиметрических исследований.
- *Биалаб-100* (НПФ «Люмэкс», Россия) – полуавтоматический биохимический фотометр с проточной кюветой, который используется для определения содержания общего белка, билирубина, креатинина, мочевины, общего холестерина, общих триглицеридов, активности АЛТ, АСТ, лактатдегидрогеназы, α -амилазы, кислой фосфатазы, щелочной фосфатазы, уровня макроэлементов, электролитов, С-реактивного белка, гликозилированного гемоглобина и др. Кюветное отделение прибора используется для расположения в нем проточной кюветы и наливных кювет. Термостатирование образцов производится при 37°C, предусмотрен вывод информации о результатах измерений на печать.
- *Флуорат-02-АБЛФ-Т* (НПФ «Люмэкс», Россия) – универсальный биохимический анализатор (для выполнения исследований по методикам абсорбционной фотометрии, флуориметрии, хемилюминесценции).
- *ROKI-6T* («Ольвекс Диагностикум», Россия) – анализатор биохимический полуавтоматический.
- *ФБС-01-2* («Эйлитон», Россия) – фотометр биохимический специализированный, представляет собой недорогой удобный анализатор для небольших лабораторий. Прибор предназначен для определения концентрации:
 - гемоглобина в крови цианидным и гемихромным методами;

- глюкозы в сыворотке крови глюкозооксидазным методом;
- общего белка в сыворотке крови биуретовым методом;
- холестерина в сыворотке крови биуретовым методом;
- мочевой кислоты в сыворотке крови уриказным методом;
- мочевины в сыворотке крови ферментативным методом;
- триглицеридов в сыворотке крови по методу Триндера.

Для определения концентрации гемоглобина калибратор не требуется. При определении концентрации глюкозы, холестерина, общего белка, мочевой кислоты, мочевины и триглицеридов значение фактора устанавливается автоматически по концентрации калибратора и сохраняется в памяти прибора.

Прибор отличается высокой производительностью измерения, время фотометрирования не превышает 3 с, время выхода прибора на рабочий режим – не более 5 с после включения.

На рабочее табло прибора выводится значение измеряемой концентрации в г/л или моль/л. Для удобства пользования предусмотрена возможность фотометрирования в стеклянных кюветках 2 типов (с объемом реакционной смеси 1 и 5 мл). Кюветы первого типа используются при определении концентрации глюкозы, холестерина, общего белка, мочевой кислоты, мочевины и триглицеридов сыворотки крови. При определении концентрации гемоглобина удобнее использовать кюветы с объемом реакционной смеси 5 мл. Параметры эксплуатации: питание автономное (4 батарейки типа АА) или от сети (с использованием адаптера). Фотометр поставляется компанией «Юнимед» (Россия).

- *PV 1251 C* («СОЛАР», Белоруссия) – автоматический фотометр, который позволяет осуществлять конечноточечные, кинетические, бихроматические и лабораторные исследования с использованием современных наборов реагентов.
- *Dialab Autolyzer* («Dialab GmbH», Австрия) – настольный биохимический автоматический анализатор открытого типа, позволяет определять концентрацию субстратов и активность ферментов, является анализатором произвольного доступа (Random Access Clinical Analyser), имеет STAT-режим (немедленный доступ и срочное выполнение по составленному перечню заданий). Прибор может работать в режимах анализа по конечной точке, кинетическом (быстрый и двухточечный), кинетическом с фиксированным временем, иммунотурбидиметрическом, турбидиметрическом (время коагуляции турбидиметрически), по фактору или стандарту, проводится автоматическая калибровка (для построения калибровочной кривой используется до 10 стандартных проб).

Производительность анализатора составляет до 230 тестов в час. Расход воды – 1 л на 500 тестов (3,5 л/ч). Количество тестов – до 48. Штатив для проведения реакции включает 80 реакционных кювет с промывочной станцией, обеспечивающей 4-ступенчатую процедуру промывки. Имеется система охлаждения реактивов (штатив

для реагентов с 48 охлаждаемыми позициями), которая работает независимо от того, включен анализатор или нет.

Пробозаборная игла промывается между каждым отбором проб и реагентов, даже если это реагент, использующийся для анализа многих последовательно выполняемых проб. Температура предварительного нагревателя в дозаторе контролируется непрерывно. Постоянно контролируется уровень реагентов и проб. Идентификация проб осуществляется по идентификационному коду, дате, номеру образца, фамилии пациента, полу, возрасту, номеру карты, дате отбора, типу пробы, отделению.

Пипетирующая система состоит из шприца, иглы с наконечником, покрытым тефлоном, с датчиком уровня, устройством предварительного подогрева наливаемых жидкостей; она промывается снаружи и изнутри между каждым отбором проб и реагентов.

Имеется воздушный инкубатор, обеспечивающий поддержание комнатной температуры, температур 30 и 37°C.

Монохроматизация светового потока достигается за счет использования интерференционных фильтров с длиной волны 340, 405, 450, 505, 550, 590, 650, 700, 750 нм.

Прибор комплектуется персональным компьютером CDL-про класса Pentium IV. Принтер встроенный и внешний (опция).

- *Prestige 24i* («Hirose Electronic System Co.», Япония) – автоматический анализатор средней производительности, представляет собой малогабаритный прибор, рабочий стол которого обеспечивает размещение 45 проб в пластиковых или стеклянных пробирках и 24 либо 36 реагентов (по выбору пользователя) в пластиковых контейнерах объемом 15, 20, 25, 40, 60 мл. Штатив реакций включает 60 пластиковых кювет с длиной оптического пути 8 мм. *Prestige 24 i* имеет уникальную систему перемешивания реакционной смеси с помощью сжатого воздуха, которая исключает возможность перекрестного загрязнения реакционной смеси.

Биохимический автоанализатор обеспечивает охлаждение реагентов в штативе и автоматическую десятиступенчатую промывку реакционных кювет (расход воды составляет 3,5 л/ч). Охлаждаемый лоток под реактивы имеет 24 или 36 секторов (по выбору) для размещения 24 или 36 моно- либо биреактивов. Реагенты охлаждаются при помощи эффекта Пельтье до $10 \pm 2^\circ\text{C}$. Холодильник может оставаться включенным при выключенном анализаторе.

Количество тестов – 24 моно- или биреагентных (опция – 36), кроме того, 3 ионоселективных теста (для определения ионов натрия, калия, хлорида).

Биохимический анализатор является открытым, позволяет работать с наборами реагентов любых фирм-производителей с выполнением лабораторных исследований в области клинической химии, иммунологии, лекарственного мониторинга и токсикологии.

- *AU 400, AU 600, AU 2700, AU 5400* («Olympus», Япония) – автоматические биохимические анализаторы, представляют собой открытые системы, обеспечивающие полностью автоматизированный цикл исследований от момента подачи проб до распечатки результатов исследований с использованием реагентов, калибраторов и контрольного биологического материала различных фирм.

Предназначены для осуществления рутинных исследований (активности ферментов, содержания субстратов, электролитов – K^+ , Na^+ , Cl^-) и выполнения специальных анализов, таких как определение специфических белков (иммуноглобулинов, факторов свертывания крови, белков острой фазы и др.), гормонов, чужеродных веществ, в том числе лекарственных и наркотических.

Для замера абсорбции используется 13 длин волн в диапазоне 340–800 нм.

Приборы позволяют производить исследования в любых биологических жидкостях: сыворотке, плазме крови, моче, ЦСЖ и др., с использованием любых пробирок разных размеров (например, первичных, микропробирок, в том числе типа Эппендорф).

Стартовая загрузка базового прибора составляет 80 образцов. При этом имеется возможность постоянной дозагрузки по мере выполнения исследований. Анализатор позволяет выполнять срочные исследования (22 позиции в STAT-режиме). Минимальный объем образца составляет 1,6 мкл.

Реагенты находятся в охлаждаемом блоке прибора в течение всего периода исследований. Средний объем реактива на выполнение одного исследования составляет 150 мкл, минимальный – 25 мкл (концентрированные реактивы разводятся автоматически).

В автоанализаторах серии AU используется высокоточная пипетирующая система с функцией детекции сгустка.

Анализаторы обеспечивают выполнение исследований в нескольких режимах: по конечной точке, кинетическом, кинетическом двухточечном, бихроматическом, дифференциальном.

В приборах серии AU применяются многоцветные кварцевые реакционные кюветы с системами многократной процедуры их промывки и встроенной программой проверки качества очистки кювет. Один промывочный раствор используют для обработки кювет и очистки всей системы автоанализатора.

- *Konelab 30, Konelab Prime 60* («Thermo Electron Corporation», Финляндия) – биохимические автоанализаторы средней и высокой производительности соответственно, позволяют выполнять обычные и специальные биохимические исследования, включая определение специфических белков, электролитов ионометрическим методом (ионов натрия, калия, хлора, лития, кальция) и pH; осуществлять лекарственный мониторинг.

Производительность приборов зависит от загрузки и составляет в обычном режиме 300 тестов в час для Kopelab 30 и 600 тестов в час для Kopelab Prime 60. В приборах используются сменные кюветы однократного использования. Максимальная вместимость образцов (84 анализируемые пробы) определяется шестью сегментами по 14 позиций в каждом. К тому же используется 6 дополнительных позиций для STAT-образцов. Имеется дополнительный транспортный интерфейс (KUSTI).

Для анализа образцов (плазма, моча, ЦСЖ) наряду с обычными пробирками объемом 5, 7 и 10 мл используются микропробирки объемом 0,5 и 2,0 мл. При этом диапазон объемов образцов варьирует от 1 до 120 мкл, составляя обычно 2–15 мкл.

В охлаждаемой зоне прибора хранится 45 образцов.

Особенностью конструкции приборов является возможность внесения в реакционную кювету до четырех разных реагентов на тест (что создает уникальную возможность для проведения научных исследований).

При выполнении исследований используются сменные (однократного использования) кюветы на 12 ячеек. Вместимость Kopelab 30 составляет 50 кювет ($50 \cdot 12 = 600$ тестов), что обеспечивает время работы без дозагрузки 2 ч, вместимость Kopelab 60 значительно больше – 175 кювет с 12 реакционными кюветами (2100 тестов), что обеспечивает период работы без дозагрузки 4 ч. Окончательный объем реакционной смеси составляет 100–250 мкл.

Для оценки результатов применяются линейная, нелинейная калибровка и калибровка со смещением.

Используются технологии автоматического предварительного, последующего и вторичного разведения исследуемого образца.

Работа прибора обеспечивается использованием дистиллированной воды с расходом ее менее 2 л/ч (загружается в анализатор, внешнего подсоединения не требуется).

Глава 19. ВЫПОЛНЕНИЕ ЭКСТРЕННЫХ МАНУАЛЬНЫХ И АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

В настоящее время в клинико-лабораторной диагностике наряду с традиционной, связанной с применением для определения физиологических и патологических компонентов мочи и крови жидких реагентов, все шире используется методология с применением нанесенных на твердофазные носители (специальные полоски; многослойные аналитические пленки, или слайды; картриджи, колонки) сухих реагентов, которые способны воздействовать на определенные метаболиты биологических жидкостей с изменением окраски индикаторной зоны.

Если для качественного и полуколичественного определения биохимических компонентов биологических жидкостей достаточно визуальной оценки окраски индикаторной зоны твердофазного носителя после нанесения пробы биоматериала, то для количественного требуется использование специальных анализаторов, принцип действия которых основан на отражательной фотометрии, флуориметрии, кондуктометрии, потенциометрии, амперометрии и др.

Индикаторные тест-полоски применяются для полуколичественного и количественного определения диагностически значимых компонентов мочи, крови и других биологических жидкостей. Их использование незаменимо для неотложного анализа, выполняемого в присутствии больного (в приемном отделении, больничной палате или дома), профилактики и раннего распознавания заболеваний, а также для службы скорой помощи, массовых скрининговых обследований населения, с целью выявления и мониторинга некоторых заболеваний пациентами или их родственниками в домашних условиях.

Большинство предприятий изготавливают индикаторные тест-полоски для исследований, работа которых основана на использовании следующих реакций:

- изменение цвета кислотно-основного индикатора (тетрабромфенолового синего) в присутствии белка;

- образовании продукта розового цвета при взаимодействии конъюгированного билирубина с триазеном в кислой среде;
- появлении фиолетового окрашивания в процессе взаимодействия кетоновых тел с нитропруссидом натрия (реакция Легала);
- формировании продуктов, окрашенных в красный цвет, в ходе взаимодействия ферментов глюкозооксидазы и пероксидазы со специальной хромогенной смесью в присутствии глюкозы;
- образовании продуктов, окрашенных в интенсивный синий цвет, при окислении хромогена гидроперекисью в присутствии гемоглобина;
- изменении желтого цвета зоны индикации на светло-зеленый и даже зелено-синий при действии содержащейся в моче аскорбиновой кислоты на фосфорномолибденовую кислоту с образованием молибденового синего и т.д.

Возможно использование и других химических реакций, вызывающих изменение цвета зоны индикации сухой тест-полоски. В последние годы все более широко используются экспресс-тесты на основе иммунохроматографического анализа, сочетающие в себе высокую специфичность и чувствительность исследования, что позволяет анализировать не только сыворотку крови и мочу, но и слюну. Это допускает возможность выполнять исследование в условиях, когда взятие крови невозможно. Диагностика по слюне может быть наиболее востребованной в таких областях, как спортивная медицина, психология, педиатрия, геронтология, ветеринария и др.

Рядом фирм («HUMAN» и др.) поставляются иммунохроматографические экспресс-тесты для выявления наркотиков (каннабиноидов, марихуаны, кокаина, опиоидов, метамfetамина и др.) в моче.

В состав каждого набора, рассчитанного на выполнение 30 исследований, входят тестовые устройства и одноразовые пипетки. Время исследования составляет 5 мин (Humadrug Methamphetamine, «HUMAN», 30 тестов).

Поставляются также иммунохроматографические тест-системы для осуществления анализа мочи и кала на скрытую кровь: микроальбумин (M-Albu-Check-1), «VEDALAB», 20 тестов; анализ кала на скрытую кровь (Hexagon ОБТ), «HUMAN», 24 теста; *Clostridium difficile* (Toxin.A-Check), «VEDA.LAB», Франция, 20 тестов; хламидиоз (Hexagon Chlamydia), «HUMAN», 30 тестов, время исследования – 20 мин: экспресс-тест предназначен для качественного определения антигена хламидий в образцах из цервикального канала, уретры и в мужской моче (для взятия образцов биоматериала необходимы тампоны и пробирки с экстрагирующим раствором).

Иммунохроматографические экспресс-тесты используются также для определения кардиомаркеров в сыворотке, плазме, цельной крови: креатинкиназы МВ (СК-МВ-Check-1), VEDA.LAB, 20 тестов; миоглобина (MGL-Check-1): иммунохроматография, 5–10 мин (состав набора: тестовые устройства, одноразовые пипетки, буфер); тропонина I (Tropoin I Check-1): Тропонин I (состав набора: тестовые устройства, одноразовые

пипетки, разводящий раствор, VEDA.LAB, 20 тестов); белка, связывающего жирные кислоты, в сыворотке крови – БСЖК (*Fatty Acid Binding Protein, FABP*) – *один из новых маркеров ранней диагностики острого инфаркта миокарда* (используется в дополнение к тестам для определения содержания *тропонина I, миоглобина, креатинкиназы MB*).

Иммунохроматографический анализ нашел также использование для *определения онкомаркеров*, выявления паразитарной инфекции.

Иммунохроматографические и другие методы «сухой химии» лежат в основе все более широко применяемой в настоящее время во всех странах мира концепции выполнения лабораторных исследований «point of care testing (ПОСТ)» – «анализ по месту оказания медицинской помощи». Она перспективна для лечебно-профилактических учреждений, которые либо не располагают клинико-диагностической лабораторией, либо имеют только одного специалиста по лабораторной диагностике со средним образованием (амбулаторно-поликлинические учреждения, участковые больницы, санатории, диспансеры).

Может использоваться медицинскими сестрами и параклиническим персоналом в амбулаторных и домашних условиях. **Тест-системы обладают высокой аналитической и диагностической чувствительностью, избирательностью и специфичностью.**

В практике КДЛ используются иммунохимические экспресс-тесты, предназначенные для быстрого одноэтапного качественного определения наркотических средств, психотропных веществ и/или их метаболитов (героина, опийных алкалоидов, каннабиноидов, а также амфетамина и метамфетамина и их дериватов) в образцах мочи методом иммунохроматографического анализа. Экспресс-тесты применяют для выявления ряда возбудителей вирусной (в том числе гепатита С) и грибковой инфекции, а также *Helicobacter pylori*.

В Белоруссии освоено производство тест-полосок для определения компонентов мочи НТПК «Анализ-Х» и предприятием «Санд» на базе Белорусского государственного университета (БГУ). Сухие положительные контроли выпускает компания «Мультилаб» (Белоруссия).

Анализаторы мочи

Для контроля функциональности диагностических полосок при анализе мочи используются лиофилизированные препараты, моделирующие нативную мочу.

Правила пользования тест-полосками для анализа мочи следующие:

- быстро окунуть тест-полоску в мочу;
- вынуть ее и вытереть боковую кромку о край емкости (чтобы удалить излишнюю мочу);
- через 60 с сравнить реактивное поле с цветовой шкалой на этикетке упаковки.

Для более точного количественного определения содержания компонентов мочи используются специальные анализаторы, работаю-

щие по принципу отражательной фотометрии, например, Urotron RL 9 («Boehringer Mannheim», Германия), Miditron M, Miditron ST, Miditron Unior («Hoffmann-La Roche», Швейцария). Клинический анализатор мочи Uriscan Pro («YD Diagnostics», Корея) дает возможность одновременно определять 11 параметров: кровь, билирубин, уробилиноген, кетоновые тела, белок, нитриты, глюкозу, pH, специфическую плотность, лейкоциты, аскорбиновую кислоту; производительность – 360 тестов/ч, результаты исследований могут быть сохранены в памяти компьютера.

Принцип рефлексионной (отражательной) фотометрии также используется в экспресс-анализаторе мочи AM 2100 («СОЛАР», Белоруссия). Прибор предназначен для количественного и полуколичественного определения в пробах мочи одновременно до 11 параметров, в том числе: содержания лейкоцитов, эритроцитов, нитритов, билирубина, уробилиногена, белка, глюкозы, кислотности (pH), удельного веса – по регистрации изменения цвета окрашенной поверхности.

Карманные анализаторы глюкозы крови

В качестве карманных анализаторов глюкозы крови используются Reflolux SF и Accu Chek Easy («Hoffmann-La Roche», Швейцария), Glucometer GX («Bayer Diagnostica», Германия), Supreme и Supreme Plus («HypoGuard», Великобритания), One Touch Basic («Johnson&Johnson», США), Betachek-Lynx («NDP», Австралия).

Betachek-Lynx представляет собой компактный, почти миниатюрный, и легкий (массой всего лишь 60 г) карманный прибор, предназначенный для самоконтроля уровня глюкозы крови пациентами, страдающими сахарным диабетом. Результат количественной оценки содержания глюкозы может быть получен через 60 с после нанесения капли крови на тест-полоску. Повышенная точность определения обусловлена использованием технологии анализирования двух измерительных зон тест-полоски. Прибор позволяет запомнить 15 результатов определения концентрации глюкозы, чрезвычайно прост в обращении, стабилен в работе.

Портативные приборы для экспресс-анализа

В лабораториях экстренного анализа находят применение небольшие, компактные приборы, предназначенные для быстрого определения содержания гемоглобина, эритроцитов, глюкозы в моче, мочевины и общего белка крови, а также для подсчета количества форменных элементов крови. В частности, приборы фирмы «Eksma» (Литва): лазерный поляриметр глюкозы MP1010, гемоглобинометр MF1020, турбидиметр эритроцитов MF4020. При использовании этих приборов не требуется специальной предварительной обработки крови и мочи, все исследование может быть выполнено экстренно.

Анализатор белка в моче Микролаб 600 («Эйлитон», Россия) позволяет осуществлять точную диагностику протеинурии у детей и взрослых.

Автоматический анализатор мочи Uriscan Optima (Корея) позволяет выполнить исследование по 13 показателям в течение 90 с.

Биохимический анализатор HITACHI S40 обеспечивает возможность проводить тесты прямо на месте оказания медицинской помощи пациенту. Содержит одноразовый единый картридж для реагентов, реакционную камеру и фотометрическую кювету. Обеспечивает выполнение 23 видов исследований, максимальное количество проб – 40 позиций на постановку. Цикл анализа – 30 с на позицию.

Анализатор RAMP Clinical Reader (фирмы Response Biomedical Corp., Канада) позволяет проводить анализ крови на содержание тропонина I, миоглобина и креатинкиназы MB.

Портативный Анализатор Triage® MeterPlus использует принцип иммунофлуоресцентного анализа.

Принцип выполнения теста состоит в том, что образец крови наносится на определенное место панели, где форменные элементы отделяются от плазмы через фильтр. Плазма благодаря диффузии проникает в реакционную зону, где связывается с флуоресцентно мечеными антителами, формируя смесь. После инкубации эта смесь попадает в зону детекции, где и происходит ее анализ.

Концентрация анализируемого вещества прямо пропорциональна испускаемой флуоресценции, обнаруживаемой анализатором Triage® MeterPlus.

Благодаря использованию различных панелей анализаторы Triage® MeterPlus (Triage MeterPro) могут применяться в диагностике острого инфаркта миокарда, сердечной недостаточности, тромбоза легочной артерии и отравлений наркотиками.

Широкие возможности для выполнения экспресс-анализа предоставляет и экспресс-анализатор КОБАС Н 232. Алгоритм выполнения исследования на анализаторе состоит в помещении тест-полоски в прибор, нанесении образца крови на тест-полоску и измерении результата исследования, отображаемого на дисплее и отражающего количественное содержание тропонина Т, креатинкиназы MB (СК-MB), миоглобина, D-димера, предсердного натрийуретического пептида (NT-proBNP). Весь цикл исследования занимает не более 12 мин.

Приборы производства компании «Wescor Inc.» (США) незаменимы в практике выполнения неотложного анализа. Коллоидный осмометр (модель 4420) позволяет выполнять прямое измерение коллоидно-осмотического давления, а осмометр Varpo – осмометрию без артефактов.

Автоматический анализатор глюкозы Энзискан Ультра (НПФ «Лабовэй», Россия) позволяет осуществлять экстренное и точное определение содержания глюкозы при выполнении массовых исследований.

Трехкомпонентный кардиотест ImmunTech («YD Diagnostics», Корея) Предназначен для бесприборного определения тропонина I, миоглобина и креатинфосфокиназы MB.

Все более широкое применение находят безреагентные и неинвазивные лабораторно-диагностические приборы, к которым можно отнести Билимет К – безреагентный микроанализатор общего билирубина в крови новорожденных – и Билитест – неинвазивный чрескожный анализатор гипербилирубинемии (НПП «Техномедика», Россия), система контроля уровня глюкозы в крови iCheck («Diamedical Ltd», Великобритания). Хорошо зарекомендовало себя определение СОЭ по методу Вестгерна с применением систем для взятия крови производства «Kabe Labortechnik GmbH» (Германия). Преимущества этого метода состоят в его высокой чувствительности и в том, что он дает возможность использования венозной и капиллярной крови для измерения значений СОЭ до 100 мм/ч и выше.

Глава 20. ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АВТОМАТИЗИРОВАННЫХ УСТРОЙСТВ

В настоящее время в клинико-лабораторной практике наряду с полуавтоматическими и автоматическими биохимическими анализаторами все более широко используются автоматизированные устройства для определения морфологического состава крови.

Прототипом современных полуавтоматических и автоматических гематологических анализаторов явились появившиеся полвека тому назад автоматические счетчики биологических частиц. Они позволяли осуществлять подсчет форменных элементов крови (эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов), производить определение среднего объема эритроцитов и измерять величину гематокрита.

В современных автоматических устройствах для подсчета частиц используются в основном два технологических принципа исследования: кондуктометрический и оптический (фотоэлектрический). Применяется и технология компьютерного анализа клеточного изображения (преимущественно для анализа состава лейкоцитов крови). Гематологические приборы в зависимости от их технических характеристик, степени сложности и количества определяемых параметров можно условно разделить на 4 класса:

I класс – автоматические счетчики клеток крови, позволяющие определять до 8–10 параметров, без дифференцировки видов лейкоцитов;

II класс – автоматические анализаторы, определяющие до 20 параметров, включая рассчитываемые показатели красной крови и тромбоцитов, гистограммы распределения по объему лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов, а также проводящие частичную дифференцировку лейкоцитов на гранулоциты, лимфоциты и «средние клетки» (моноциты, эозинофилы и базофилы);

III класс – высокотехнологические гематологические анализаторы, позволяющие проводить развернутый анализ крови, включая полную дифференцировку лейкоцитов по 5 видам (нейтрофилы, эозинофилы, базофилы,

моноциты и лимфоциты), гистограммы распределения лейкоцитов, эритроцитов и тромбоцитов по объему, скатерограммы;

IV класс – высокотехнологические аналитические системы, которые, кроме развернутого анализа крови с дифференцировкой лейкоцитов на 5 популяций, выявляют незрелые формы гранулоцитов, а также выполняют подсчет и анализ ретикулоцитов, дифференциацию субпопуляций лимфоцитов.

Преимущества автоматизированного исследования клеток крови являются:

- высокая производительность (до 100–120 проб в час);
- анализ большого количества клеток;
- небольшой объем крови для анализа;
- высокая точность и воспроизводимость;
- возможность оценить 10–30 и более параметров одновременно;
- графическое представление результатов исследований в виде гистограмм, скатерграмм.

В основе работы анализаторов I и II классов лежит кондуктометрический метод. В анализаторах III и IV классов используются различные методы или их комбинация, многочисленные функции, которыми они оснащены, основаны на использовании новых технологий:

- трехмерного анализа дифференцировки лейкоцитов (одновременный компьютерный анализ клеток по объему, электропроводности, рассеяния лазерного луча);
- мультипараметрической системы лазерного светорассеяния;
- проточной цитометрии и цитофлуориметрии;
- гидродинамического фокусирования;
- оптической абсорбции.

В последние годы получили широкое распространение анализаторы гематологические с полной дифференцировкой лейкоцитарной формулы общего профиля. К их числу относятся: Cell Din 3700 («Abbot Laboratories», США), MEC-7222K («Nihon Kohden», Япония), Pentra 60 и Pentra 60 C+ («Horiba ABX SAS», Франция), Coulter AcT5Diff и Coulter HMX AL («Beckman Coulter», США). Перечисленные автоматические анализаторы позволяют анализировать 26 параметров цельной крови, имеют режим работы как с цельной венозной, так и с капиллярной кровью. Позволяют определять содержание эритроцитов, концентрацию гемоглобина, гематокрит, средний объем эритроцита, среднее содержание гемоглобина в эритроците, среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците, количество лейкоцитов, тромбоцитов, а также лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов, эозинофилов, базофилов в относительном и процентном выражении, устанавливать средний объем тромбоцитов, ширину распределения тромбоцитов по объему, тромбокрит. Они также могут выставлять «флаги предупреждения» о присутствии в пробе крови больших незрелых клеток, атипичных лимфоцитов, нормобластов, фрагментов эритроцитов, скоплений тромбоцитов; исследовать гистограммы распределения эритроцитов, лейкоцитов, тромбоци-

тов, субпопуляций лейкоцитов. Приборы оснащены двумя измерительными камерами с разным диаметром апертур – для лейкоцитов и эритроцитов с тромбоцитами. Производительность анализаторов – не менее 60 проб в час. В процессе работы сообщается о выходе результатов за установленные нормы, приборы имеют *встроенный интерпретатор гематологических исследований*, автоматически диагностирующий характер нарушений в исследуемой пробе крови. Повышению надежности исследования способствует автоматическая очистка иглы пробоотборника изнутри и снаружи, а также всей системы после каждого измерения и в конце работы обратным потоком через обе апертуры, автоматическая жидкостная и электрическая очистка апертуры, самоконтроль рабочих узлов системы с выводом сообщений на экран, встроенная программа автоматического контроля качества, предусматривающая 3 уровня качества контрольного материала (низкий, нормальный, высокий). Имеется возможность идентификации проб крови не менее чем по 8 исследуемым группам (мужчины, женщины, дети, новорожденные, пожилые, 3 свободно программируемые группы), архивирование данных контроля качества в течение не менее 3 мес.

20.1. Гематологические анализаторы, использующие в работе метод кондуктометрии

Наибольшее распространение получили анализаторы, использующие кондуктометрический принцип анализа, разработанный братьями J.Coulter и W.Coulter в 1947 г. в (1956 г. ими впервые в мире было освоено производство гематологических автоанализаторов). В основе технологии кондуктометрического анализа лежит измерение сопротивления клетки в постоянном электрическом поле.

Известно, что если через отверстие малого диаметра (апертуру), по обе стороны которого располагаются электроды с поданным на них напряжением, протекает раствор электролита, сопротивление в цепи низкое. Когда между электродами оказывается морфологический элемент крови, сопротивление в цепи резко повышается, так как биологические объекты проводят электрический ток хуже, чем раствор электролита. Импульсы напряжения в цепи, вызываемые скачкообразными изменениями сопротивления, регистрируются и подсчитываются электронным прибором. Этот вид регистрации параметров клеток получил название электрического импеданса.

Обязательной составной частью электронных счетчиков частиц является наличие устройства, пропускающего импульсы только определенной, заранее заданной амплитуды. Оно называется дискриминатором. По анализу амплитуды импульсов становится возможным оценить размеры микрообъектов.

Благодаря использованию дискриминатора возможна настройка прибора на регистрацию клеток в зависимости от их размера (при этом удается избавиться от импульсов, не имеющих значения для анализа, – «шумов»).

Проведение циклов исследования при разных порогах дискриминации позволяет построить кривую распределения клеток по их корпускулярному объему, т.е. получать гистограммы.

Гистограммы представляют собой графики, наглядно демонстрирующие распределение основных клеточных элементов – эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов – по объему клеток. Информативность гистограмм достаточно велика, но вместе с тем они не дают возможности четко дифференцировать субпопуляции клеток.

Для обеспечения работы гематологических автоанализаторов используются специальные растворы. Среди них:

Раствор депротенизирующий для гематологических анализаторов (жесткий промывочный раствор, предназначенный для растворения и удаления крови и других загрязнений из капилляров и трубопроводов гематологических анализаторов).

Детергент – мягкий промывочный раствор, предназначенный для удаления остатков крови и других загрязнений из капилляров и трубопроводов гематологических анализаторов.

Раствор лизирующий для гематологических анализаторов. Предназначен для гемолиза эритроцитов крови с целью последующего определения числа лейкоцитов и концентрации гемоглобина. Раствор лизирующий обеспечивает полный гемолиз эритроцитов в течение 1 мин и стабильность счета лейкоцитов в интервале от 1 до 5 мин от начала гемолиза, в пределах этого интервала максимальное отличие результатов подсчета лейкоцитов от среднего значения не более 5%. Раствор лизирующий, разрушая эритроциты и тромбоциты, обеспечивает трансформацию основных форм гемоглобина в единый конечный фотометрируемый продукт в течение 1 мин, стабильность оптической плотности гемолизата в интервале от 1 до 5 мин от начала гемолиза, в пределах этого интервала максимальное отличие результатов определения гемоглобина от среднего значения не превышает 5%. Основное преимущество – оптимальное соотношение цена–качество.

Раствор лизирующий для гематологического анализатора «Нemasom» является гемолитиком, используемым для определения концентрации гемоглобина, числа лейкоцитов в крови пациента.

Используется для осуществления полного лизиса эритроцитов, а также трансформации всех форм гемоглобина в одну – наиболее стабильную.

В гематологических анализаторах *на 8 параметров* лизирующий раствор предназначен для частичного лизиса лимфоцитов с целью их дифференцировки на лимфоциты, моноциты, гранулоциты.

Условия хранения: на рабочем столе при комнатной температуре; в холодильнике (допускается появление длинных иглообразных кристаллов, которые растворяются при нагревании в термостате при 37°C).

Раствор очищающий для гематологических анализаторов. Предназначен для полной очистки гематологического анализатора от белковых загрязнений. Используется согласно инструкции по эксплуатации гемато-

логического анализатора. Основное преимущество – оптимальное соотношение цена–качество.

Используется для удаления со стенок гидравлического тракта слоя белка (игла для всасывания пробы крови, клапаны в системе разведения крови дилуэнтном, петлевые микродозаторы).

Раствор содержит протеолитические ферменты, активаторы, стабилизаторы. В отдельных случаях растворы содержат гипохлорид натрия. Оптимум его действия – при температуре 20–25°C. Стабильность – 12 мес.

Раствор изотонический для гематологических анализаторов. Выполняет функцию фонового электролита при определении концентрации гемоглобина, числа эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов в крови человека при выполнении общего анализа крови на гематологическом анализаторе «открытого» типа. Основное преимущество – оптимальное соотношение цена–качество.

Используется для разведения пробы. Включает в себя:

- буферный раствор со строго определенными значениями рН и осмолярности; обеспечивает поддержание постоянного объема клетки;
- специальные добавки: при воздействии на мембраны клеток они дают возможности дифференцировать лейкоциты на 3 субпопуляции.

Качество дилуэнта во многом определяет воспроизводимость результатов исследования.

Раствор промывающий для гематологических анализаторов. Предназначен для удаления остатков крови и других загрязнений из капилляров и трубопроводов гематологических анализаторов перед началом работы, во время работы и после завершения работы. Используется согласно инструкции по эксплуатации гематологического анализатора.

Основу промывающего раствора составляет забуференный изотонический раствор, содержащий антикоагулянты, детергенты, поверхностно-активные вещества, биологически активные вещества антимикробного действия.

Раствор предназначен для предотвращения контаминации в трубках счетчика (попадания клетки одной пробы в другую), не участвует в измерении пробы и применяется только для промывки гидравлической системы прибора.

20.1.1. Краткая характеристика отдельных анализаторов

Среди приборов, функционирующих на основе принципа кондуктометрии (I и II классы), наиболее широко используются гематологические автоанализаторы фирм «Hoffmann-La Roche» (Швейцария), «Beckman Coulter» (США), «Abbott Laboratories» (США), «Merck Serono» (Германия), «Sysmex Europe GmbH» – подразделение «Toa Medical» (Япония) в Великобритании, и др. Все они аналогичны по технико-аналитическим параметрам: автоматически производят взятие цельной крови и ее разведение, позволяют анали-

зировать до 20 параметров крови с определением трех популяций лейкоцитов (гранулоциты, лимфоциты, моноциты), что достигается за счет использования лизирующего раствора, одновременно разрушающего эритроциты и сжимающего лейкоциты (при этом лимфоциты подвергаются большему сжатию, чем гранулоциты, моноциты, эозинофилы и базофилы).

Ставший классическим гематологический анализатор (модель S) производства «Beckman Coulter» (США) осуществляет в автоматическом режиме всасывание крови и ее разбавление, необходимое при подсчете эритроцитов и лейкоцитов. В лизате, используемом для определения лейкоцитов, колориметрически определяется содержание гемоглобина. Одной из особенностей прибора является то, что подсчет эритроцитов и лейкоцитов в пробе производится трехкратно, и лишь после этого рассчитывается усредненный результат (что повышает точность исследования). Модель прибора S-Plus позволяет наряду с определением эритроцитов и лейкоцитов устанавливать содержание тромбоцитов в крови. Важной особенностью прибора является использование в нем программы контроля качества, выставление «флагов» – индикаторов патологии. Производительность приборов последних модификаций достигает 140 проб в час при использовании 100 мкл крови на один цикл исследования.

К числу современных гематологических автоматических анализаторов, определяющих 8 параметров, относятся, в частности, КХ-21N («Sysmex Europe GmbH» – подразделение «Toa Medical» (Япония) в Великобритании) и МЕК-6410К («Nihon-Kohden», Корея). Приборы этих двух типов имеют сертификат IVD (in vitro diagnostic). Процесс исследования полностью автоматизирован от момента подачи пробы до распечатки результата. При работе с приборами используются пробирки для взятия цельной капиллярной и венозной крови с антикоагулянтом (на основе ЭДТА).

Анализаторы I и II классов имеют возможность выполнять исследования в режимах работы как с цельной венозной, так и с капиллярной кровью с определением в этих биологических жидкостях содержания эритроцитов, концентрации гемоглобина, гематокрита, среднего объема эритроцита, среднего содержания гемоглобина в эритроците, средней концентрации гемоглобина в эритроците, количества лейкоцитов, тромбоцитов, а также с выполнением исследований гистограмм распределения эритроцитов и лейкоцитов (имеется режим дифференцировки лейкоцитов).

Приборы оснащены двумя измерительными камерами с разным диаметром апертур – для лейкоцитов и эритроцитов с тромбоцитами. Для выполнения гематологических исследований используются пробирки для взятия крови двух объемов: не более 200 мкл для работы с капиллярной кровью и не более 500 мкл – с венозной. Приборы оснащены миксером для предварительного перемешивания проб крови.

Производительность анализаторов этих двух типов – не менее 60 проб в час. Их достоинством является использование не только жидкостной, но и электрической очистки апертуры. Они оснащены встроенной программой автоматического контроля качества, предусматривающей исполь-

зование 3 уровней качества контрольного материала (низкий, нормальный, высокий) с графическим представлением всех статистических кривых, обеспечивающей возможность архивирования данных по проведению контроля качества за период не менее 3 мес. Допускается эксплуатация анализаторов с реагентами различных фирм-производителей.

Возможно использование нетоксичной реагентной базы (бесцианидной, не требующей применения специальной технологии обезвреживания и утилизации отходов), в приборе Sysmex KX-21N применяется безшприцевая система дозирования, волнометрический принцип подсчета клеток крови; к тому же, этот гематологический анализатор допускает возможность проводить скрининг ВИЧ-инфицирования человека при наличии специальных реагентов.

В клинических лабораториях также широко используются аналогичные по своим технико-аналитическим свойствам гематологические автоматические анализаторы Cobas Micros 18 («Hoffmann-La Roche», Швейцария), MD-II 18 («Beckman Coulter», США), Cell-Dyn 1600 («Abbott Laboratories», США), System 9000/9020 и System 9120+ («Merck Serono», Германия), K-450 и K-1000 («Sysmex Europe GmbH» – подразделение «Toa Medical» (Япония) в Великобритании). Не будучи оснащены автоматическим пробоотборником, они автоматически производят взятие цельной крови и ее разведение. Для приборов данного типа характерно прежде всего то, что они позволяют анализировать до 18 параметров крови с определением трех популяций лейкоцитов (гранулоциты, лимфоциты, моноциты), что достигается за счет использования лизирующего раствора, одновременно разрушающего эритроциты, удаляющего значительную часть межклеточной жидкости и сжимающего лейкоциты. При этом лимфоциты подвергаются большему сжатию, чем гранулоциты, моноциты, эозинофилы и базофилы.

20.2. Гематологические анализаторы, использующие в работе метод проточной цитометрии

Гематологические анализаторы этого типа используют иной – оптический принцип детекции. Он состоит в том, что сфокусированный луч обычного или лазерного светового потока направляется на капилляр, через который проходит суспензия клеток. В результате происходит поглощение либо рассеяние света, во многом обусловленное размером, формой, структурой клетки. Рассеянный свет состоит из дифракционной, рефракционной и отражающей составляющих. По их выраженности можно судить о морфологическом составе крови.

Таким образом, в этих анализаторах используется технология, основанная на регистрации электрооптических импульсов, возникающих при прохождении клеток крови в луче лазера. Величина импульсов прямо пропорциональна размеру исследуемых частиц.

Измерение величины светопоглощения (абсорбции) используется, в частности, в гематологических автоанализаторах Technicon H-3 («Bayer Diagnostics», США), приборах производства компании «Hoffmann-La Roche» (Швейцария).

Применяемый в проточных цитометрах оптический принцип детекции может состоять не только в учете показателей отражения, рефракции, дифракции и поглощения света, но и флуоресценции. Для этого используются специальные флуоресцентные красители, избирательно связывающиеся с определенными клеточными структурами. Величина флуоресценции оказывается прямо пропорциональной содержанию специфических компонентов клетки. Такая цитофлуориметрия нашла наибольшее практическое применение в проточных цитометрах, использующихся для иммунофенотипирования (с применением флуоресцентной метки), оценки распределения клеток по содержанию нуклеиновых кислот. Этот принцип лежит в основе определения количества ретикулоцитов по интенсивности флуоресценции красителя, связанного с РНК (анализаторы Cobas Vega производства «Hoffmann-La Roche», Швейцария; R-2000 и R-3000 производства «Sysmex Europe GmbH» – подразделения «Toa Medical» (Япония) в Великобритании; оборудование компании «Abbott Laboratories», США).

20.2.1. Краткая характеристика отдельных моделей анализаторов

Достаточно широко в КДЛ используются гематологические анализаторы серии Technicon (H-1, H-2, H-3) производства «Bayer Diagnostics» (США). Из них Technicon H-3 может рассматриваться как референтный прибор. Его прототипом является Technicon H-6000.

- *Technicon H-3 (H-1, H-2)* – полностью автоматизированный гематологический анализатор, позволяющий определять 25 параметров морфологического состава крови. Принцип работы прибора состоит в регистрации поглощения света лейкоцитами, окрашенными при помощи пероксидазной реакции, и анализе светорассеяния. По оценке миелопероксидазной активности клеток и их размеров анализируются эозинофилы, нейтрофилы, моноциты, лимфоциты и атипичные клетки.

Анализаторы серии Technicon позволяют непосредственно измерять концентрацию гемоглобина в каждом отдельном эритроците и на основании этого строить *гистограммы распределения клеток* не только по объему, но и по концентрации гемоглобина. Среднюю концентрацию гемоглобина в клетке обозначают как CHCM (cellular hemoglobin concentration mean), а спектр распределения клеток по концентрации гемоглобина – HDW (hemoglobin distribution width). Приборы Technicon обладают высокой пропускной способностью, которая составляет 60 (H-1) или 100 (H-3) анализов в час.

- *Cobas Vega* («Hoffmann-La Roche», Швейцария) позволяет анализировать 26 гематологических параметров, включая выявление и ко-

личественное определение атипичных лимфоцитов и больших незрелых клеток. В приборе имеется четыре канала детекции сигналов, два из них (работающие с применением кондуктометрического принципа измерения объема) осуществляют анализ эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов, один регистрирует содержание базофилов (по принципу кондуктометрического измерения объема) и еще один используется для подсчета отдельных популяций лейкоцитов (лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов, эозинофилов, базофилов). Для этого наряду с кондуктометрическим измерением объема производится регистрация поглощения света.

В случае дооборудования анализатора дополнительным блоком, позволяющим дифференцировать клетки по величине флуоресценции тиазолового оранжевого, связанного с РНК, появляется возможность устанавливать содержание ретикулоцитов (модель Vega Reticulocyte). Для возбуждения флуоресценции служит аргоновый лазер с воздушным охлаждением.

Поляризация многоуглового светорассеяния используется в специальной технологии, реализуемой в гематологических анализаторах компании «Abbott Laboratories» (США) для дифференцировки эозинофилов и базофилов.

Показано, что точность приборов, использующих импеданс или электрооптическую регистрацию, сопоставима.

- *Sysmex XT-2000i* («Sysmex Europe GmbH» – подразделение «Toa Medical» (Япония) в Великобритании) является прибором III класса, сочетающим 2 принципа исследования – кондуктометрический и проточной цитометрии (фотоэлектрический). Этот прибор позволяет выполнять не только развернутый анализ крови с дифференцировкой лейкоцитов по 5 видам, но и производить подсчет и анализ ретикулоцитов. Всего он может определять 30 параметров исследуемого образца крови.

В основе работы Sysmex XT-2000i лежат следующие методы исследования:

- *проточная цитофлуориметрия*, которая используется для определения лейкоцитов, лейкоцитарной формулы, незрелых гранулоцитов, ретикулоцитов, тромбоцитов;
- *кондуктометрия*, которая применяется для определения эритроцитов, тромбоцитов, гематокрита;
- *бесциановый лаурилсульфатный (SLS) метод*, который используется для определения гемоглобина.

Метод проточной цитофлуориметрии базируется на применении флуоресцентного красителя полиметина. Этот краситель связывается с ДНК или РНК неизмененных клеток, что позволяет использовать его как для дифференцировки лейкоцитов по 5 видам, так и для подсчета ретикулоцитов.

Анализ клеток происходит в проточной кювете при пересечении ее лучом лазера с длиной волны 633 нм. После контакта лазерного луча с окра-

шенной клеткой происходят рассеяние луча под большим и малым углами и возбуждение флуоресцентного красителя. Данные сигналы улавливаются фотоумножителями и регистрируются в виде трех параметров:

- прямое светорассеяние (FSC) – отклонение лазерного луча под малым (до 10°) углом, которое зависит от размера и формы клетки;
- боковое светорассеяние (SSC) – отклонение лазерного луча под углом до 90° , которое зависит от рефрактерного индекса (плотности) клетки и характеризует сложность внутриклеточных структур;
- детекция специфического флуоресцентного сигнала (SFL), который регистрируется параллельно с боковым светорассеянием, позволяет судить о содержании РНК/ДНК в клетках.

На основании полученных сигналов все клетки распределяются по зонам (кластерам) в соответствии с их размером, структурой и количеством ДНК (строится скатерграмма).

Таким образом, в частности, происходит дифференцировка лейкоцитов на 4 популяции: нейтрофилы и базофилы, эозинофилы, моноциты, лимфоциты.

Гематологический анализатор Sysmex XT-2000i позволяет определить не только классические параметры ретикулоцитов (процентное и абсолютное количество ретикулоцитов), но и оценить параметры, характеризующие степень зрелости ретикулоцитов:

- LFR – популяция ретикулоцитов с низкой флуоресценцией (в норме 87–99%);
- MFR – популяция ретикулоцитов со средней флуоресценцией (в норме 2–12%);
- HFR – популяция ретикулоцитов с высокой флуоресценцией (в норме 1–2%);
- IRF – фракция незрелых ретикулоцитов, которая является суммой MFR и HFR (в норме 2–14%) и может служить индикатором активности эритропоэза, т.е. является наиболее чувствительным маркером в мониторинге за состоянием эритропоэтической активности костного мозга и эффективности лечения витамином B_{12} , фолиевой кислотой, препаратами железа и эритропоэтином.

20.3. Гематологические анализаторы, использующие в работе метод проточной цитофлуориметрии

Принцип проточной цитофлуориметрии состоит в том, что клеточная суспензия, предварительно меченная флуоресцирующими моноклональными антителами или флуоресцентными красителями, попадает в поток жидкости, проходящий через проточную ячейку. Условия исследования подобраны таким образом, что клетки выстраиваются друг за другом за счет так называемого гидродинамического фокусирования струи в струе. В момент пересечения клеткой лазерного луча детекторы фиксируют рассеяние света

под малыми углами ($1-10^\circ$) и рассеяние света под прямым углом, а также интенсивность флуоресценции по четырем каналам флуоресценции. Измерение этих характеристик позволяет определить размеры клеток, гранулярность их цитоплазмы, субпопуляционный состав клеточной суспензии (по наличию или отсутствию определяемых клеточных маркеров), а также многие другие параметры.

К числу проточных цитофлуориметров относятся гематологические анализаторы моделей Erics XL, Erics XL-MCL («Beckman Coulter», США). Они представляют собой проточные цитофлуориметры нового поколения, которые позволяют проводить клеточные исследования так же легко и быстро, как рутинные клинические анализы крови. Используются в области иммунологии (иммунофенотипирование клеток периферической крови, исследование иммунного статуса, определение фагоцитарной активности, внутриклеточных цитокинов и т.д.), онкологии (исследование ДНК, стадий клеточного цикла, определение специфических маркеров и др.), цитологии (определение цитоморфологической принадлежности клетки, оценка активности внутриклеточных ферментов с помощью флуорогенных субстратов, определение экспрессии поверхностных антигенов, измерение физиологических параметров клетки и т.д.), гематологии (анализ субпопуляционного состава клеток периферической крови, в том числе подсчет ретикулоцитов, анализ тромбоцитов по специфическим маркерам), фармакологии (измерение экспрессии маркеров и активности внутриклеточных ферментов, определение стадии клеточного цикла в рамках изучения механизмов воздействия различных биологически активных веществ на клеточном уровне, в том числе иммуномодуляторов).

Производительность приборов составляет до 60 образцов в час. Она ограничивается в основном только временем подготовки клеток к исследованию.

Проточный цитофлуориметр FACSCalibur («Becton Dickinson», США) позволяет осуществлять иммунофенотипирование (диагностику гемобластозов, оценку клеточного иммунитета при различных иммунологических нарушениях), подсчет абсолютного количества клеток, выполнять анализ стволовых клеток в соответствии с международными протоколами, осуществлять оценку функциональной активности клеток (по содержанию цитокинов, активационных маркеров), анализировать выраженность апоптоза, состояние неспецифического звена иммунитета (фагоцитоз), выполнять ДНК-тестирование, проводить генетические исследования, исследования в области протеомики.

20.4. Механические и электронные счетчики форменных элементов крови

Наряду с автоматизированными гематологическими анализаторами в деятельности КДЛ используются механические счетчики, в том числе:

- *Механический счетчик лейкоцитарной формулы крови L-BC9* («Unico», США) оснащен 8 клавишами с цветными изображениями клеток белой крови – для подсчета миелоцитов, незрелых клеток, моноцитов, сегментоядерных клеток, лимфоцитов, палочкоядерных клеток, базофилов, эозинофилов; после подсчета 100 клеток раздастся сигнальный звонок. Две ручки (расположенные справа и слева) используются для сброса данных.
- *Компактный электронный счетчик клеток F410N* со встроенным принтером («Epta», Япония).
- Счетчик форменных элементов крови *СФК Минилаб* («Элитон», Россия) предназначен для подсчета лейкоцитарной формулы, миелограммы, тромбоцитов, ретикулоцитов, а также расчета параметров контроля качества в соответствии с Приказом №45 МЗ РФ от 7.02.2000 «О системе мер по повышению качества клинических лабораторных исследований в учреждениях здравоохранения Российской Федерации». Этот прибор позволяет производить независимый подсчет клеток по 16 каналам, одновременный вывод на цифровое табло 8 значений лейкоцитарной формулы, а также оснащен специальными формулами для подсчета количества тромбоцитов и ретикулоцитов, поэтому результаты их подсчета могут быть представлены в виде общей суммы числа клеток, абсолютного и относительного (%) количества клеток каждого вида. В приборе предусмотрена возможность программирования подсчета от 50 до 950 клеток (с шагом 50 клеток) в соответствии со специальными программами контроля качества (Приказ №45 МЗ РФ). В счетчике есть эргономичная удобная клавиатура; большой цифровой дисплей и наличие звукового сигнала очень удобны при подсчете клеток мазка крови.
- Полуавтоматический счетчик форменных элементов крови *Пикосель ПС-4М* (НПФ «Лабовэй», Россия) используется для подсчета числа эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов.

20.5. Автоматические анализаторы оценки системы гемостаза

Для оценки системы гемостаза обычно практикуется определение протромбинового индекса (протромбинового времени), частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), тромбинового времени, антитромбина III, фибриногена, плазминогена, продуктов деградации фибриногена (ПДФ), активированного времени свертывания крови.

С этой целью используется автоматизированное оборудование, например полуавтоматические коагулометры КС-4А (Россия) и гемокоагулометр четырехканальный СТ 2410 (Беларусь). Они обеспечивают определение тромбинового времени, протромбинового времени, АПТВ, концентрации фибриногена и факторов II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII в плазме крови

с представлением результатов в секундах, процентах, единицах INR и величины R («Ratio»).

Все более широкое применение находят анализатор агрегации тромбоцитов AP 2110 (Беларусь), предназначенный для исследования *in vitro* агрегационных свойств тромбоцитов и эритроцитов, определение фактора Виллебранда турбидиметрическим методом, а также тромбоэластографы различных фирм-производителей. Одним из таковых является **TEG-5000** (тромбоэластограф, анализатор гемостаза). Он позволяет получить полную интегральную картину гемостаза, а следовательно, правильно назначить лечение. Стандартные тесты, такие как АЧТВ, МНО и подсчет тромбоцитов, не позволяют определить риск кровотечения, не дают они и полной оценки риска возникновения тромбоза. Преимуществом этой системы является то, что с ее помощью мы можем идентифицировать различные нарушения системы свертывания крови пациента при кровотечениях, избыточном тромбообразовании и фибринолизе, используя один универсальный тест. Тромбоэластограф позволяет выбрать оптимальную тактику ведения пациента и контролировать баланс свертывания крови.

Глава 21. СИСТЕМЫ КОМПЬЮТЕРНОГО АНАЛИЗА ИЗОБРАЖЕНИЯ КЛЕТОК

Используемые в клинично-лабораторной практике системы компьютерного анализа изображения клеток осуществляют распознавание клеток крови в автоматическом режиме на основе определенного программного обеспечения.

Исследованию подлежат мазки, окрашенные обычными методами, с применением движущегося микроскопного столика. Достоинством прибора является то, что он снабжен, как правило, телевизионным монитором. Это дает возможность идентифицировать клетки и визуально. Обычно просмотру подвергается 100 клеток. Анализаторы такого типа позволяют выявлять атипичные клетки и производить исследования в несколько раз быстрее по сравнению с традиционным способом (под микроскопом).

Следует, однако, отметить, что несмотря на предложенные в последние годы разнообразные автоматизированные электронные устройства, «золотым стандартом» в гематологии по-прежнему остается *визуальная оценка мазка крови*. Это особенно важно при обнаружении в крови аномальных, патологических клеток, поскольку *пока еще нет абсолютно надежного прибора, позволяющего дифференцировать все виды незрелых и/или патологических клеток*.

Глава 22. АВТОМАТИЗИРОВАННОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОЧИ

В настоящее время все более широкое применение в КДЛ находят автоматизированные устройства для исследования состава и свойств мочи. Хорошо зарекомендовали себя автоматические анализаторы Aution Max AX-4280 («Arkray», Япония), Uritek-720 («Teco Diagnostics», США), Uriscan Optima («YD Diagnostics», Япония), Clinitek Status («Bayer Diagnostics», США), скрининговый анализатор, обеспечивающий большой объем проводимых исследований, Cobas U411 («Hoffmann-La Roche», Швейцария), автоматический анализатор осадка мочи IQ 200 («Iris Diagnostics», США), а также полуавтоматические анализаторы Meditron Junior I и Junior II, компактный экспресс-анализатор мочи Urisys 1100 («Hoffmann-La Roche», Швейцария).

- *Aution Max AX-4280* – это автоматический анализатор для биохимического и микроскопического анализа мочи, который позволяет производить биохимический анализ тест-полосок на основе многоволновой рефракционной фотометрии (400, 500, 565, 635, 760 нм), прямое рефракционное измерение относительной плотности мочи, фотометрическое измерение цветности и степени мутности мочи, автоматическую коррекцию измеренных параметров по цвету мочи, а также относительной плотности мочи по значению рН и автоматическую детекцию аномального окрашивания полосок. Комплект включает штатив на 100 пробирок, обладает производительностью 225 полосок в час, сохраняет в памяти компьютера информацию о 1000 полосках.

В анализаторе используются первичные пробирки с мочой, процесс перемешивания и раскапывания мочи полностью автоматизирован. Процесс измерения стандартизирован. Имеется возможность интеграции с автоматическим анализатором осадка мочи IQ 200.

- *IQ 200* – автоматический анализатор осадка мочи, при работе с прибором не нужна специальная подготовка образцов. При работе значительно уменьшается время, необходимое для проведения микроскопического исследования, и при этом до минимума сокращается ручной труд лаборантов. Значительно повышается качество исследования за счет стандартизации самого метода, автоматического контроля процессов анализа и дополнительной возможности контроля со стороны оператора.

Анализатор используется для автоматического микроскопического исследования по 12 основным форменным элементам осадка мочи: эритроциты, лейкоциты, лейкоцитарные сгустки, гиалиновые цилиндры, патологические цилиндры, клетки эпителия, бактерии, грибы, кристаллы, мукус, сперматозоиды, артефакты.

- *Aution Max AX-4280* в комплексе с *IQ 200* – это автоматическая станция анализа мочи с производительностью 60 образцов в час (объем образца – 2 мл). Перечень последовательно осуществляемых операций включает:
 - загрузку штативов с пробирками;
 - аспирацию образцов мочи в проточную ячейку микроскопа;
 - фиксирование изображений объектов осадка мочи цифровой камерой;
 - классификацию всех объектов с использованием видеопроцессора;
 - оценку критериев, заданных оператором;
 - вывод всех полученных данных на экран монитора станции или во внутрिलाбораторную сеть.

Анализатор легко умещается на обычном лабораторном столе.

- *Uritek-720* – автоматический анализатор мочи, который обеспечивает быстрое и точное получение результатов. Производительность прибора составляет 500 тестов в час, память – до 2000 последних определений. Анализатор оснащен сенсорным экраном.

Контроль качества осуществляется с использованием контрольного биологического материала: 3-уровневого лиофилизированного и 2-уровневого жидкого, который также может быть использован при работе с мочевыми автоанализаторами *Urisys 1100*, *Meditron Junior*, *Cobas U411*, *Clinitek Status* и др. Срок годности контрольного биологического материала – 18 мес.

- *Uriscan Optima* – автоматический анализатор мочи, который позволяет осуществить анализ мочи по 12 показателям в течение 90 с; производительность прибора – 60 тестов в час в стандартном и 300 – в «быстром» режиме. Память – до 2000 последних тестов. Прибор оснащен такими функциями, как автоматическая корректировка цвета пробы, автоматический и ручной режим тестирования, предупреждение о патологических результатах, возможность подключения компьютера.

Глава 23. МИКРОСКОП И ТЕХНИКА МИКРОСКОПИРОВАНИЯ

Микроскопы – оптические приборы, используемые в медицинских лабораториях для визуального наблюдения за клеточными или иными корпускулярными компонентами биологических материалов. Для рассмотрения не видимых невооруженным глазом объектов (микроорганизмов, клеток, компонентов тканей, кристаллов солей и т.д.) обычно готовят специальные препараты, например, делают мазки на предметных стеклах и т.п.

23.1. Классификация микроскопов

В зависимости от конструктивных особенностей микроскопы можно подразделить на ряд групп. При этом классифицировать эти оптические приборы принято по 4 основным признакам: объекту исследования, конструкции осветительной системы, принципу построения изображения, способу наблюдения, документирования и анализа изображения.

23.1.1. Классификация в зависимости от объекта исследования

1. *Микроскопы плоского поля*, позволяющие получать двухмерное изображение. Объекты исследования – тонкие, в среднем, толщиной 0,1–1,0 мм, просматриваемый слой – от 0,001 до 1,0 мм. В таких микроскопах возможно наблюдение объемного изображения в пределах 100–200 мкм по высоте за счет особых способов освещения (эффекты косоугольного освещения, фазового контраста, дифференциально-интерференционного контраста).
2. *Стереоскопические микроскопы*, которые дают возможность получать объемное, трехмерное изображение. Объекты исследования – габаритные, в среднем, толщиной 1–100 мм, просматриваемый слой по высоте (глубине) – от 0,5 до 50 мм. В этих микроскопах можно наблюдать и плоские объекты.

Для удобства работы с объектами или в зависимости от условия их размещения (специальная посуда, термокамера) микроскопы конструктивно могут быть выполнены в двух вариантах:

- *прямые*, у которых оптическая система (бинокулярная насадка с окулярами) расположена выше объекта наблюдения (предметного столика);

- инвертированные, у которых оптическая система расположена ниже объекта наблюдения.

23.1.2. Классификация в зависимости от конструкции осветительной системы

В зависимости от *конструкции осветительной системы* все рассмотренные выше типы микроскопов можно разделить следующим образом:

1. *Микроскопы проходящего света* (классические микроскопы для медико-биологических исследований) – осветительная система сконструирована таким образом, что свет проходит через объект. С помощью микроскопов проходящего света плоского поля, которые могут быть как прямыми, так и инвертированными, а также стереоскопическими, можно рассматривать прозрачные и полупрозрачные объекты.
2. *Микроскопы отраженного света* – осветительная система сконструирована таким образом, что свет падает на объект и отражается от него. С помощью микроскопов отраженного света плоского поля, которые могут быть как прямыми, так и инвертированными, а также стереоскопическими, исследуются объекты непрозрачные, с различной степенью отражающей способности, и полупрозрачные. Существуют два вида микроскопов отраженного света:
 - *собственно микроскопы отраженного света*, в которых свет проходит через оптическую систему прибора (в том числе и объектив), отражается от объекта и вновь проходит через объектив как основной элемент, воспроизводящий увеличенное изображение объекта;
 - *микроскопы падающего света*, в которых свет падает на объект, минуя объектив, отражается от него и затем проходит через оптическую систему микроскопа (объектив). В основном микроскопы падающего света – это стереоскопические микроскопы. Правда, иногда люминесцентные микроскопы плоского поля с осветителем отраженного света относят к микроскопам, работающим в падающем свете.
3. *Микроскопы проходящего и отраженного света* – приборы, в которых обе основные осветительные системы конструктивно объединены; обычно это исследовательские или универсальные микроскопы.

23.1.3. Классификация в зависимости от принципа построения изображения

Физико-химические явления, которые возникают при исследовании объекта или препарата, приготовленного специальным способом, могут влиять на исходный световой поток. При этом он может изменяться, как по форме, так и по своим физическим свойствам. В зависимости от этих изменений микроскопы можно разделить на приборы светлого или темного поля, с методом косо́го освещения, фазового или дифференциально-интерференционного контраста, поляризационные, люминесцентные, ультрафиолетовые и инфракрасные. Такая классификация в одинаковой степени относится как к микроскопам плоского поля (прямым и инверти-

рованным), так и к стереоскопическим, а также к микроскопам проходящего и отраженного света.

1. *Микроскопы светлого поля* обеспечивают более темное изображение объекта на светлом фоне. Основные условия освещения – это обычный прямо проходящий световой поток, изменения в котором могут быть связаны только с длиной волны света, зависящей от используемых в осветительной системе широкополосных светофильтров из обычного цветного стекла. Редко используются узкополосные специальные светофильтры (интерференционные).
2. *Микроскопы темного поля* обеспечивают более светлое изображение или ярко блестящий контур объекта на темном фоне. Основные условия освещения при этом:
 - в микроскопах проходящего света – обычный прямо проходящий свет полностью перекрывается до того, как попадает на объект;
 - в микроскопах отраженного света – обычный свет, проходит через кольцевую диафрагму с непрозрачным диском, по размеру перекрывающим выходной зрачок объектива.
3. *Микроскопы с методом косоого освещения* обеспечивают контрастное изображение объекта с неровным по толщине контуром на сером фоне. Основные условия освещения – обычный прямо проходящий свет, частично перекрывающийся до того, как попадет на объект.
4. *Микроскопы фазового контраста* дают возможность с максимальной степенью визуализации и детализацией наблюдать на сером фоне более темное «объемное» изображение объекта, окруженное по контуру светлой полосой; при негативном (темного поля) фазовом контрасте картина обратная. Основные условия освещения – обычный прямо проходящий свет перекрывается, но в два этапа: до прохождения через объект и после него. При этом свет в виде светового кольца определенной площади вначале проходит через объект, а затем – через полупрозрачное кольцо в объективе.
5. *Микроскопы дифференциально-интерференционного контраста* обеспечивают яркое цветное «объемное» изображение или изображение того же цвета, что и фон, но с окантовкой другого цвета на однотонном цветном фоне. Основные условия освещения – обычный прямо проходящий свет с помощью поляризатора в осветительной системе превращается в линейно-поляризованный свет, после прохождения объекта с помощью специальной призмы (или другого специального элемента) и анализатора происходит создание объемного (в пределах глубины резкости объектива) цветного контрастного изображения независимо от того, является ли объект анизотропным или нет.
6. *Люминесцентные микроскопы* обеспечивают возможность наблюдения свечения объектов на темном фоне. Основные условия освещения – обычный прямо падающий свет определенной длины волны падает на объект, изображение объекта строится с использованием светового потока с другой длиной волны; выделение соответствующих областей

спектра происходит с помощью сложной системы блоков интерференционных светофильтров.

7. *Поляризационные микроскопы* обеспечивают цветное, четкое или контрастное изображение на сером или темном фоне. Основные условия освещения – обычный прямо проходящий свет с помощью поляризатора в осветительной системе превращается в линейно-поляризованный свет, после прохождения объекта с помощью анализатора происходит выделение из структуры изображения тех элементов, которые связаны с анизотропией объекта.
8. *Ультрафиолетовые и инфракрасные микроскопы* обеспечивают и наблюдение изображения объекта с помощью электронно-оптических преобразователей вне видимого спектрального диапазона: до 400 нм и свыше 700 нм.

23.1.4. Классификация в зависимости от способа наблюдения, документирования и анализа изображения

В зависимости от способа наблюдения, документирования и анализа изображения все микроскопы можно подразделить на обычные, фотомикроскопы, анализаторы изображения, проекционные, микроскопы сравнения, микроскопы-спектрофотометры.

1. *Обычные микроскопы*, в которых изображение фиксируется и анализируется глазами человека. Однако его можно вывести на телеэкран и монитор, на фотопленку с помощью дополнительных съемных приспособлений.
2. *Фотомикроскопы* оснащены сложной фотосистемой, встроенной в схему прибора, они работают с помощью полностью автоматизированной системы настройки, программное обеспечение позволяет осуществлять передачу изображения на телевизионный экран или производить видеозапись.
3. *Анализаторы изображения* оснащены аппаратно-программным комплексом, в котором изображение фиксируется, передается с помощью аналоговых или цифровых камер и анализируется с помощью специальной компьютерной программы.
4. *Проекционные микроскопы* характеризуются тем, что проекция изображения осуществляется непосредственно на специальный большой экран (система обычного наблюдения с помощью окуляров отсутствует), при этом разрешение элементов изображения объекта приближается к разрешению обычного микроскопа.
5. *Микроскопы сравнения* – это оптические системы, которые обеспечивают объединение в одном поле двух изображений, полученных с помощью двух разных микроскопов, при этом эти изображения могут накладываться друг на друга или располагаться рядом, занимая какую-либо часть поля.
6. *Микроскопы-спектрофотометры*, в которых производится измерение оптической плотности, светопропускания или светоотражения участка

объекта в заданном спектральном диапазоне (обычно 300–700 нм). Это происходит с помощью фотометрических насадок, включающих фотоэлектрические умножители и системы диафрагм, ограничивающих фотометрируемый (изучаемый) участок на объекте, а также специального монохроматора, выделяющего необходимую длину волны.

Развитие технологий микроскопирования приближает световые микроскопы по параметрам разрешения и создания изображения к электронным микроскопам. В настоящее время созданы лазерные сканирующие, конфокальные и туннельные микроскопы. В них используется принцип послойного сканирования изображения с различным шагом по глубине и площади с помощью лазерного луча или обычного пучка света минимального (точечного) размера. Шаг сканирования объекта по глубине может составлять доли микрона (чем он меньше, тем точнее воспроизводится объемный рельеф объекта). Такие оптические приборы используются главным образом для научных исследований.

23.2. Устройство микроскопа

Рассмотрим *принцип устройства микроскопов, общий для различных их типов* (см. рис. 23.1), на примере *монокулярного микроскопа МБИ 3* («ЛОМО», Россия).

Механическая часть прибора состоит из штатива, коробки с микромеханизмом, макрометрического винта, тубусодержателя, револьверной системы, предметного столика, винта и оправы конденсора, вилки для зеркала. Все эти детали служат для крепления и передвижения оптических частей микроскопа.

Основание штатива (подковообразной формы) придает микроскопу необходимую устойчивость. К смонтированной на штативе коробке микромеханизма, служащей для точной фокусировки изображения, крепится тубусодержатель, фиксирующий в определенном положении оптические части микроскопа. При помощи макровинтов, расположенных с обеих сторон тубусодержателя, приводится в действие механизм грубой подачи тубуса.

Тубус обычно укреплен наклонно, что создает большое удобство при работе с этим микроскопом. Револьвер имеет четыре отверстия с резьбой для ввинчивания объективов. Сферическая его часть вращается, что позволяет быстро заменять один объектив другим. Предметный столик микроскопа предназначен для помещения и закрепления на нем исследуемого препарата.

В микроскопе МБИ 3 верхняя часть предметного столика может вращаться при помощи двух небольших винтов, находящихся справа и слева, и пружины, скрытой в передней части столика. Это позволяет перемещать препарат относительно объектива в пределах 8 мм и переводить интересующую исследователя часть в центр поля зрения. В середине предметного столика имеется круглое сквозное отверстие, через которое проходят лучи света, освещающие препарат. В верхней поверхности столика сделано не-

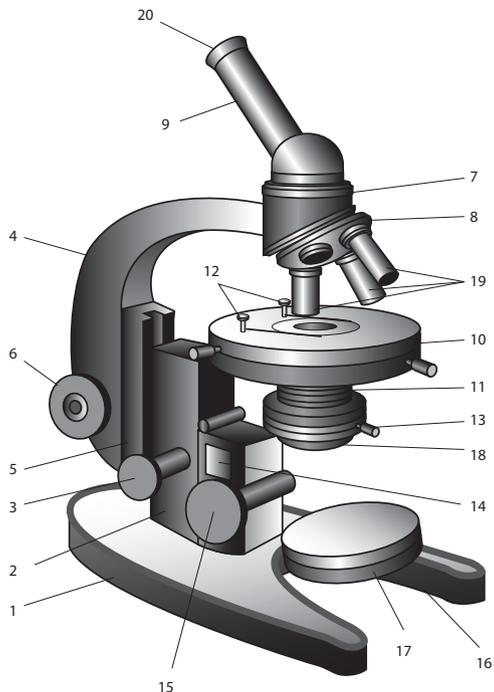


Рис. 23.1. Общий вид микроскопа: 1 – башмак; 2 – коробка микромеханизма; 3 – микровинт; 4 – тубусодержатель; 5 – механизм подачи тубуса; 6 – макро-винт; 7 – головка; 8 – револьверная система; 9 – тубус; 10 – предметный столик; 11 – винты предметного столика; 12 – клеммы; 13 – гильза конденсора; 14 – кронштейн; 15 – винт конденсора; 16 – вилка зеркала; 17 – зеркало; 18 – конденсатор; 19 – объективы; 20 – окуляр.

сколько мелких отверстий. Два из них служат для установки клемм металлических пружинящих пластинок, предназначенных для закрепления препарата на предметном столике. В других отверстиях можно укрепить препаратодователь, позволяющий перемещать препарат на точно определенное расстояние вправо, влево, вверх и вниз. Оправа (гильза) конденсора укреплена на кронштейне, расположенном на коробке микромеханизма под предметным столиком. Небольшой болтик удерживает конденсор в гильзе. При помощи винта конденсор может перемещаться вверх и вниз на 20 мм. Под гильзой конденсора крепится вилка зеркала.

Оптическая часть микроскопа состоит из осветительной и увеличивающей систем.

Осветительная система состоит из зеркала и конденсора с диафрагмой. Зеркало микроскопа МБИ 3 имеет две отражающие поверхности: плоскую и вогнутую. Вогнутое зеркало применяется при работе с искусственным освещением и объективами малых увеличений. При естественном освещении

лучше пользоваться зеркалом с плоской поверхностью. Зеркало вращается в полукруглой вилке, которая, в свою очередь, поворачивается справа налево, поэтому зеркало может перемещаться в двух взаимно перпендикулярных направлениях, что обеспечивает увеличение освещенности объекта.

Конденсор фокусирует лучи света, отраженные зеркалом, на препарате. Конденсор состоит из двух частей. Верхняя часть конусообразная, включает одну или несколько линз, верхняя из них обращена к отверстию в предметном столике микроскопа. Нижняя часть цилиндрическая, имеет одну линзу. В ее оправу вмонтирована диафрагма, которая состоит из отдельных изогнутых металлических пластинок. Пластинки смещаются, накладываются друг на друга благодаря движению связанного с ним рычажка. При этом отверстие диафрагмы суживается или расширяется. Степенью раскрытия диафрагмы регулируется светосила конденсора. При сужении отверстия диафрагмы через конденсор проходят только лучи, близкие к центру, чем достигается большая четкость изображения. На конденсоре снизу находится подвижная оправа (рамка) для светофильтра. Светофильтр матового или синего стекла служит для смягчения слишком яркого света.

Увеличивающая система микроскопа создает увеличенное обратное мнимое изображение объекта. Она состоит из окуляра, вставленного в тубус, и объектива. Объектив направлен на исследуемый объект (отсюда и его название). Он представляет собой короткую металлическую трубку, в которой монтируется система линз. Микроскопы типа МБИ снабжены обычно тремя объективами $\times 8$, $\times 40$ и $\times 90$, дающими соответственно малое, среднее и большое увеличение. Объектив $\times 90$ предназначен для рассматривания самых малых объектов с иммерсионной системой.

Объективы ввинчены в подвижный револьвер, поворотом которого один объектив легко заменить другим. Это важно, так как часто деталь, замеченную при малом увеличении объекта, необходимо изучить при большем увеличении. Объективы должны быть центрированы, т.е. точка препарата, установленная в центре поля зрения при слабом объективе, должна оставаться в поле зрения и более сильного объектива. Для этого линзы монтируются так, чтобы оптическая ось (прямая, проходящая через центры сферических поверхностей, ограничивающих линзу) каждого объектива совпадала с оптической осью тубуса.

В верхней части тубуса находится окуляр, состоящий из двух линз, вставленных в металлическую оправу. В окуляр направлен взгляд исследователя (от лат. *oculus* – глаз). Окуляры могут быть с различным увеличением. Для биологических микроскопов применяют окуляры с увеличением в 7, 10 и 15 раз. На каждом объективе и окуляре выгравирована цифра, указывающая увеличение. Таким образом, наименьшее увеличение микроскопов типа МБИ 3 – 56 раз (8 – увеличение объектива, умноженное на 7 – увеличение окуляра), а наибольшее – 1350 раз ($90 \cdot 15$).

Световые лучи от естественного или искусственного источника света падают на зеркало микроскопа, которое отражает их и направляет в конденсор, благодаря чему объект освещается равномерно и интенсивно.

В микроскопе сочетается увеличение объектива и окуляра, а глаз исследователя, как бы продолжая оптическую систему микроскопа, преломляет лучи, вышедшие из окуляра, и строит увеличенное изображение объекта на сетчатке.

В микроскопе типа МБИ 3, где тубус расположен по отношению к объекту под углом 45° , есть дополнительная призма, изменяющая ход лучей и направляющая их в окуляр.

Линзы микроскопа, увеличивающие объект, дают и отрицательные, мешающие исследованию явления. Боковые лучи, падающие на края линзы, преломляются сильнее остальных и делают изображение объекта расплывчатым, нечетким. Это явление называется *сферической аберрацией*. Кроме того, белый луч света, проходя через линзу, разлагается на составляющие его цвета. Изображение объекта получается окруженным радугой. Это явление называется *хроматической аберрацией*. Для устранения этих явлений в объективах микроскопа монтируют целую систему исправляющих линз.

23.3. Препараты для микроскопирования и их подготовка

Биологические препараты для микроскопирования готовят из крови, других биологических жидкостей (моча, кал) и многих других объектов.

Наиболее просто готовятся так называемые нативные препараты осадка мочи, мокроты, кала. Их наносят непосредственно на предметное стекло и покрывают тонким покровным стеклом (иногда биологический материал смешивают с физиологическим раствором или глицерином для разжижения, осветления и предохранения от высыхания). Но чаще всего мазки подвергают окрашиванию с использованием специальных красителей. Рядом предприятий и фирм (например, НТПК «Анализ X», Белоруссия) поставляются предназначенные для этой цели наборы реагентов, а отдельными предприятиями (например, «Юнимед», Россия) – специальные устройства для фиксации и окраски мазков (например, Минилаб 301 производства компании «Эйлитон», Россия), что позволяет оптимальным образом организовать рабочее место лаборанта для окраски мазков.

Окраска мазков с помощью устройства Минилаб 301 производится в штативе в просторных ванночках, которые закрываются крышками. Ванночки компактно размещены на удобном подносе, что исключает нежелательное разбрызгивание краски.

Вместо ручных манипуляций с каждым отдельным стеклом лаборант обрабатывает отдельный штатив, перенося его из ванночки в ванночку или сушильную камеру строго по звуковым сигналам таймеров. В результате сокращается время на окраску большой партии мазков. Установка таймеров на новое время окраски в зависимости от вида, состава и качества используемого красителя не вызывает никаких затруднений. Освоить прибор несложно благодаря простоте конструкции и инструкции по эксплуатации.

В состав прибора входят 4 независимых таймера и сушильная камера, через которую продувается горячий воздух, в комплект поставки входят 4 штатива для предметных стекол (на 25 стекол каждый) и 4 кюветы для красителей, фиксаторов, отмывочных растворов. Это позволяет проводить одновременное окрашивание до 100 мазков, параллельно окрашивать мазки по нескольким (до 4) различным методикам, в несколько раз ускорить процесс высушивания окрашенных препаратов (сушка мазков не более 3 мин). В сушильной камере температура воздушного потока составляет 100–120°C.

При использовании красителей отдельные части препарата окрашиваются по-разному, что делает их более четкими, позволяет дифференцировать структуру. Способ окраски зависит от особенностей исследуемого материала и цели исследования. Например, мазки крови красят азур-эозином для подсчета лейкоцитарной формулы, фуксином – для подсчета тромбоцитов, азуром II – для подсчета ретикулоцитов.

Для окраски мазков крови применяется специальное автоматизированное оборудование, обладающее высокой производительностью, например, автоматическая система карусельного типа Stainingmaster 2032 («MDS-Group», Германия), обеспечивающая наилучшее качество окрашивания в гематологии, гистологии, цитологии. Использование этой системы значительно сокращает время манипуляций, позволяя окрашивать до 1500 стекол в час. Система окрашивания Stainingmaster 2032 дает возможность использовать от 8 до 24 секций (габариты – 700×640 мм, масса – 40 кг).

Используется в КДЛ и российское программируемое автоматическое устройство для окрашивания мазков Эмкостейнер-авто («ЭМКО», Россия). Прибор позволяет осуществлять групповую обработку стекол в штативах, имеет замкнутую рабочую камеру с вентиляцией, возможность загрузки штативов со стеклами во время проведения окраски.

Ванны, штативы и поверхность стола рабочей камеры изготовлены из нержавеющей стали, что допускает возможность проведения специальной обработки поверхности прибора. Кинематическая система обеспечивает подъем и наклон штативов, предусмотрено программирование технологического процесса до 19 шагов. Габаритные размеры прибора – 600×535×320 мм).

При микроскопическом исследовании в микробиологии используются различные методы окрашивания, в частности, двумя и более красителями. Так, по окрашиванию генциановым фиолетовым с докраской фуксином по Граму все микроорганизмы делят на грамположительные (фиолетовый цвет) и грамотрицательные (красный цвет). Туберкулезные микобактерии окрашивают по Цилю–Нильсену карболовым фуксином в красный цвет, а все остальные части препарата докрашивают метиленовым синим.

Иногда применяется технология негативной окраски, когда окрашивается фон мазка и на нем отчетливо проявляются неокрашенные микроорганизмы, например, бледная спирохета.

Для приготовления гистологических препаратов тканей требуется использование довольно сложной технологии, включающей обработку спир-

тами, формалином или фиксирующими смесями, пропитывание целлоидином, парафином или желатином, нарезание тончайшими слоями при помощи специального прибора – микротомы. Полученные с помощью микротомы срезы окрашивают гематоксилином, суданом, сложными смесями красителей, серебром и т.д. Срезы закрепляют на предметных стеклах смесью белка с глицерином. Для сохранения препаратов срезы заливают канадским бальзамом и покрывают покровным стеклом. Бальзам засыхает, и в таком виде гистологический препарат сохраняется в течение многих лет.

23.4. Техника микроскопирования

Для микроскопирования прежде всего необходимо установить хорошую освещенность поля зрения. При работе с естественным освещением (свет направляют в конденсор плоским зеркалом) рабочий стол лаборанта должен стоять у окна, обращенного на север, так как прямые солнечные лучи создают излишнее освещение, слепящее глаза. Конденсор должен быть поднят, диафрагма открыта. При пользовании микроскопом МБИ 3 устанавливают объектив $\times 8$, окуляр $\times 7$ или $\times 10$. Под визуальным контролем поворачивают зеркало до тех пор, пока поле зрения не станет равномерно и интенсивно освещенным.

При искусственном освещении осветитель устанавливают так, чтобы пучок света был направлен на вогнутую поверхность зеркала микроскопа. Препарат помещают на предметный столик, прижимают клеммами и рассматривают сначала под малым увеличением (ориентировочный обзор). Для этого препарат устанавливают под объективом $\times 8$, конденсор опускают; при сильном свете закрывают и диафрагму. Поворачивая макровинт, нужно найти рабочее расстояние между объектом и линзой объектива, при котором будет получено изображение. Вращая макровинт от себя, опускают тубус, вращая на себя – поднимают. Макровинтом осторожно перемещают тубус до появления четкого изображения объекта в поле зрения. Вращая верхнюю часть предметного столика, винтами устанавливают в центре поля ту часть объекта, которую нужно рассматривать при большом увеличении. Затем, не поднимая тубуса, нужно повернуть револьвер, чтобы поместить над объектом объектив $\times 40$ и усилить освещенность, открыв диафрагму и приподняв конденсор до среднего положения.

Фокусировку производят очень осторожно, чтобы не допустить соприкосновения объектива с препаратом и повреждения того или другого, так как объектив почти касается препарата. Под визуальным контролем медленно поднимают тубус до получения изображения объекта. Вращением макровинта добиваются большей четкости изображения.

Иммерсионное микроскопирование применяют при необходимости большего увеличения. На препарат, а в некоторых случаях и на верхнюю линзу конденсора наносят каплю иммерсионного масла. Обычно для иммерсии применяют кедровое масло. Освещение должно быть сильным, т.е.

конденсор поднят до отказа и диафрагма открыта. Иммерсионное масло применяют для создания между препаратом и объективом однородной среды, преломляющей световые лучи так же, как и линзы объектива. Это способствует получению четкого изображения при большом увеличении.

Препарат помещают на предметный столик микроскопа МБИ 3 и прижимают к нему клеммами. Объектив $\times 90$ погружают в каплю иммерсионного масла до соприкосновения с препаратом. Затем, глядя в окуляр, поднимают тубус очень осторожными движениями макровинта, так как рабочее расстояние между объективом и объектом в этом случае равно 1–1,5 мм. При помощи макровинта получают четкое изображение и просматривают объект послойно. При работе с макровинтом следует поворачивать его медленно на неполный оборот. Ни в коем случае не следует свободно и много вращать макровинт, так как это расстраивает микромеханизм, что приводит к нарушению регулировки и уменьшению четкости изображения.

Микроскопию следует вести поочередно то левым, то правым глазом (при монокулярной насадке), не нагибаясь низко к окуляру. При этом оба глаза должны быть открыты, что предотвращает утомление. После каждого часа микроскопирования следует отдыхать в течение 10 мин.

23.5. Уход за микроскопом и его хранение

После работы микроскоп следует обтереть мягкой тряпочкой, с объектива и конденсора удалить иммерсионное масло, протереть оптические детали тряпочкой, смоченной бензином, ксилолом или толуолом. Делать это нужно осторожно, так как органические растворители разрушают и смолы, которыми склеены линзы объектива. Аналогичным способом удаляют иммерсионное масло с препарата.

При прикосновении пальцами к поверхности линз на них остаются жирные следы, нарушающие четкость изображения. При попадании пыли на линзу объектива или окуляра ее нужно очень осторожно удалить тряпочкой, слегка смоченной бензином.

Микроскоп следует периодически протирать сначала тряпочкой, пропитанной бескислотным вазелином, а затем сухой, мягкой, чистой тряпочкой.

В нерабочее время микроскоп нужно накрыть футляром или убирать в специальный ящик.

23.6. Отдельные модели микроскопов, используемых для выполнения клиничко-лабораторных исследований

В КДЛ лечебно-профилактических учреждений России, Белоруссии и других стран СНГ используются различные модели микроскопов, в том числе:

- Микроскопы торговой марки *Микромед* («Оптические приборы», Россия):
 - *Микромед-1 (вариант 2-20)* – бинокулярный микроскоп с 40–1600-кратным увеличением (рис. 23.2), который предназначен для морфологических исследований препаратов в проходящем свете по методам светлого и темного (с конденсором, поставляемым отдельно) поля. Прибор оснащен конденсором Аббе, наибольшая числовая апертура светлого поля – 1,25. Источник освещения – встроенная галогеновая лампа 6 В/20 Вт с регулирующей яркости. Предметный столик прямоугольный двухкоординатный, с коаксиальными ручками механизма перемещения. Источник питания – сеть переменного тока (220/110 В);
 - *Микромед-2 (вариант 3-20)* – тринокулярный микроскоп с 40–1600-кратным увеличением (рис. 23.3), который предназначен для морфологических исследований препаратов в проходящем свете по методам светлого и темного (с конденсором, поставляемым отдельно) поля, а также по методу фазового контраста (с фазово-контрастным устройством, поставляемым отдельно). Характеризуется модульным принципом конструкции, который дает возможность укомплектовать оптический прибор дополнительными устройствами для различных методов исследования, например, конденсором темного поля, фазово-контрастным устройством, видеоокулярном, программным обеспечением. Микроскоп оснащен коаксиальным механизмом грубой и точной фокусировки, двухкоординатным предметным столиком с коаксиальными ручками механизма перемещения. Источник освещения – встроенная галогене-



Рис. 23.2. Микроскоп Микромед-1 (вариант 2-20).



Рис. 23.3. Тринокулярный микроскоп Микромед-2 (вариант 3-20).

новая лампа 6 В/20 Вт с регулировкой яркости и регулируемой полевой диафрагмой, что позволяет легко настроить освещение по Келлеру. Блок питания встроен в основание. Прибор оснащен револьверным устройством на 4 объектива, конденсором Аббе, наибольшая числовая апертура конденсора светлого поля – 1,25;

- *Микромед-3 (вариант 2-20)* – бинокулярный микроскоп с 40–1000-кратным увеличением, который обеспечивает решение широкого круга задач и применяется для всех рутинных оптических лабораторных исследований, а также идеально подходит для проведения научно-исследовательских работ. Характеризуется модульным принципом конструкции. Оснащен «бесконечной» оптикой с высокой степенью коррекции. Объективы-планахроматы позволяют получить четкое ровное изображение по всему полю. Окуляры имеют поле зрения диаметром 22 мм, диоптрийную коррекцию зрения и «удаленный зрачок», что позволяет одинаково удобно работать как в очках, так и без них. Осветители с центрируемой галогеновой лампой мощностью 20 Вт, центрируемый конденсор Аббе и встроенные в штатив регулируемые полевые диафрагмы позволяют просто и удобно настроить равномерное освещение по Келлеру, добиться оптимального контраста и оптического разрешения. Центрируемый конденсор Аббе содержит ирисовую апертурную диафрагму, имеет откидную оправу для установки светофильтра. Микроскоп оснащен револьвером на 4 объектива, повернутым от наблюдателя. Все объективы, устанавливаемые в держателе – парфокальны, т.е. при смене объектива изображение объекта не теряет резкость и не требуется дополнительная фокусировка. Микроскоп оснащен коаксиальным механизмом грубой и точной фокусировки, двухкоординатным предметным столиком с коаксиальными ручками механизма перемещения.

- Микроскопы серии *Leica* («Leica Microsystems GmbH», Германия):
 - *Leica DM 1000* (бинокулярный) относится к классу рабочих микроскопов, предназначенных для использования в клинических лабораториях для выполнения рутинных анализов. Имеет комплектацию для работы с люминесценцией. Применяется в гематологии, гистологии, цитологии, патологической анатомии, цитогенетике.

Позволяет проводить исследования в отраженном и проходящем свете. В качестве источника света используется встроенный диодный (LED, с 3 вариантами освещения) или галогеновый (30 Вт) осветитель, возможна установка флуоресцентного осветителя и 3 блоков с флуоресцентными светофильтрами. Методы контрастирования: светлое поле, темное поле, фазовый контраст, поляризация.

Прибор оснащен новыми специально разработанными для применения в цитологии объективами *HI Plan 10x CY*, которые имеют плоское поле и большое рабочее расстояние, что позволяет легко маркировать нужные объекты. Револьверное устройство рассчита-

но на установку 5 объективов. Ручка перемещения стола и рукоятка фокусировки находятся на одной высоте, что вместе с эргономичной бинокулярной насадкой с изменяющимся углом наклона обеспечивает удобную работу без утомления. Микроскоп имеет фото/видеоход, что делает возможной установку на него цифровой фото или видеокамеры;

- *Leica DM 3000 B* – это лабораторный инвертированный (бинокулярный или тринокулярный, в зависимости от комплектации) микроскоп для работы как в проходящем, так и в люминесцентном свете. Турель для установки 5 наборов люминесцентных светофильтров позволяет работать с многоцветной флуоресцентной окраской, зеленым флуоресцентным белком и иммунофлуоресценцией. Специальный менеджер интенсивности свечения флуоресценции автоматически регулирует интенсивность свечения, апертурную и полевую диафрагмы для получения оптимального изображения. Имеется возможность установки в люминесцентный блок до 8 наборов люминесцентных фильтров. Для работы со слабосветящейся люминесценцией или быстро выгорающими объектами рекомендуется использовать цифровые цветные фотокамеры с охлаждением типа Progress CF cool («Jenoptik AG», Германия).

Прибор укомплектован 5 конденсорами, которые дают возможность работать по методам светлого и темного поля, дифференциально-интерференционного контраста, промежуточного модуляционного контраста (для неокрашенных объектов в пластиковой посуде), промежуточного фазового контраста (фазово-контрастные изображения с обычными светопольными объективами), поляризации.

Прибор оснащен револьверным устройством на 6 объективов, осветителями проходящего света (30 или 100 Вт), микроманипуляторами и микроинъекторами Narishige, нагревательной рамкой, которая позволяет поддерживать температуру до 60°C, может быть укомплектован различными климатическими камерами, имеет фото/видеоход, что позволяет установить на него цифровую фото или видеокамеру;

- *Leica EZA* – стереомикроскоп для специальных исследований объектов, имеющих значительный объем (непрозрачных, прозрачных и полупрозрачных). Позволяет получать объемное изображение контрастного однотонного или естественного цветного объекта.
- Микроскопы серии *Micros* («Micros», Австрия):
 - *Micros MC-10* – монокулярный микроскоп, предназначенный для выполнения рутинных исследований в области медицины и биологии. В конструкции прибора предусмотрены отдельные винты грубой и точной фокусировки, встроенный галогенный осветитель (6 В/15 Вт), диапазон увеличения – до $\times 1600$, револьвер на 3 объектива;

- *Micros MC 50* – экономичная модель лабораторного микроскопа, предназначенная для выполнения рутинных процедур микропирования мазков в лабораториях гематологии и цитологии с ограниченным количеством рабочих мест, а также для передвижных лабораторий;
- *Micros MC 50 (Bat Led)* – бинокулярный микроскоп, отличающийся от микроскопа *Micros MC 100* наличием встроенного аккумулятора, что делает его идеальным для применения в полевых условиях и районах с нестабильным электроснабжением;
- *Micros MC 100* – лабораторный микроскоп для использования в лабораториях гематологии, цитологии и гистологии. Наличие компенсационной бинокулярной головки обеспечивает существенное расширение поля зрения микроскопа за счет снижения эффекта «размазывания» изображения по краям. Принадлежности к *MC 100* включают в себя визуальные насадки: бинокулярную и тринокулярную головку, объект-микрометр 0,01, фазово-контрастный набор, фильтры (синий, зеленый, желтый, матовый), лампу (6/20 В/Вт), камеры для фото- и видеодокументации с программным обеспечением *Vision Microscopy*;
- *Micros MC 100 (S)* – лабораторный исследовательский бинокулярный микроскоп, позволяющий получать увеличение до $\times 1600$. Характеризуется облегченной процедурой замены лампы. Оснащен компенсационной бинокулярной головкой, револьвером на 4 объектива: 4 \times /10, 10 \times /25, 40 \times /65 (подпружиненный), 100 \times /1,25 (подпружиненный, масляная иммерсия). Располагает коаксильными винтами грубой и точной фокусировки, встроенным галогенным освещением (6 В/20 Вт) с регулировкой яркости свечения лампы;
- *Micros MC 300* – прибор, который с успехом используется для проведения рутинных процедур микропирования в гематологии, цитологии и гистологии, а также для исследований, требующих высокого качества изображения. Минимальный эффект «размазывания» изображения по краям. Исключительно высокая четкость изображения в поле зрения и точная передача цвета объекта. *Micros MC 300* – самый популярный микроскоп в Европе;
- *Micros MC 300 (FS)* – профессиональный микроскоп для флуоресцентной микропсии (рис. 23.4).



Рис. 23.4. Флуоресцентный микроскоп *MC 300 (FS)*.

- Микроскопы лабораторные *CX41* («Olympus», Япония) включают в себя серию биологических микроскопов на базе оптической системы UIS (оптика исследовательского класса, скорректированная на «бесконечность»). Микроскопы укомплектованы встроенной в основание галогеновой осветительной системой (осветитель мощностью 30 Вт с возможностью плавной регулировки яркости света); револьверная головка сконструирована таким образом, что при смене увеличения объективы удаляются от оператора, обеспечивая тем самым дополнительное пространство. Блок питания лампы оснащен системой мягкого выключения. Объективы новой серии – ахроматические фазовые. Тубус микроскопа – тринокулярный. Возможно проведение фазово-контрастных наблюдений.

Комплектация микроскопа *CX41* для исследований включает оборудование для флуоресцентного метода. Осветителем, используемым для флуоресценции, является ртутная лампа на 50 Вт с источником питания мощностью 50 Вт.

- Микроскопы серии *Axio* («Carl Zeiss», Германия) всех уровней сложности, высокого качества изображения и разрешения, проверенного годами надежного и гарантированного качества изготовления.
- В КДЛ используются также микроскопы серии Биолом («ЛОМО», Россия):
 - *Биолом P 11* – монокулярный микроскоп, предназначен для исследования прозрачных предметов в проходящем свете в светлом поле;
 - *Биолом P 15* – бинокулярный микроскоп с осветителями ОИ 32, ОИ 13 (конденсор темного поля) и окуляром АУ 12.
- Компьютеризированные микроскопы серии *Мекос* («Мекос», Россия):
 - *Мекос-Ц (стандарт)* предназначен для количественных цитологических, гистологических, денситоморфометрических исследований;
 - *Мекос-Ц1 (профи)* – автоматизированный компьютеризированный микроскоп для гематологических лабораторий, позволяет выполнять расширенный анализ крови, автоматическую микроскопию и анализ мазков крови, денситоморфометрию объектов размером от 1 мкм. Обладает повышенными характеристиками разрешения. Предусмотрена возможность подключения проточного гемоанализатора.
- Организовано производство новых моделей микроскопов на белорусских предприятиях «Белофо» и «Планар».

ПРИЛОЖЕНИЕ

Технологии определения основных физических констант

Определение основных физических констант проводится с помощью приборов, называемых барометрами, которые могут быть ртутными и металлическими (барометр-анероид); оценивается в миллиметрах ртутного столба (мм рт.ст.) и килопаскалях (кПа).

Определение плотности биологических жидкостей

В повседневной практике пользуются относительной плотностью, т.е. отношением плотности данного вещества к плотности дистиллированной воды при 4°C. Плотность раствора увеличивается с увеличением концентрации растворенного вещества.

Определять относительную плотность вещества можно с помощью ареометров (спиртометров, урометров, лактометров и др.). Ареометр – это стеклянная трубка с расширением книзу (в виде шарика), заполненным дробью или специальной массой. Наименьшее значение относительной плотности нанесено на шкале сверху, наибольшее – внизу. Для определения относительной плотности жидкостей с точностью до 4-го знака после запятой удобно пользоваться пикнометрами (это ареометры, которые позволяют определить плотность раствора с большой точностью).

Измерение температуры

Производится термометрами. Наиболее употребительными и распространенными являются ртутные трубчатые и палочковые термометры. По окончании работы термометр охлаждают, промывают, вытирают и убирают в футляр. Для установления максимальных и минимальных температур применяют специальные максимальные и минимальные термометры (максимальный термометр – ртутный, он сохраняет показания максимальной температуры после охлаждения; минимальный термометр – обычно спиртовой, внутри его капиллярной трубки, заполненной спиртом, находится небольшой подвижный штифт, изготовленный из темного стекла и имеющий на концах утолщения в виде булавочных головок). Находят применение комбинированные максимальный и минимальный термометры (типа Сигтса). Используются и термоэлектрические термометры.

В лечебно-профилактические учреждения поставляются термометры лабораторные ТЛ 1, ТЛ 2, ТЛ 3, ТЛ 4, ТЛ 50 с различными пределами измерений, а также термометры электроконтактные, карманные электронные термометры, термогигрометры, термооксиметры, используемые для опре-

деления температуры и концентрации растворенного кислорода, термоанемометры (используемые для измерения скорости воздушного потока и температуры).

Определение влажности

Производится с помощью психрометров. Принято различать абсолютную и относительную влажность. Абсолютная влажность – упругость водяных паров, выраженная в миллиметрах ртутного столба, или количество граммов водяных паров в 1 м^3 воздуха. Полное насыщение воздуха парами воды при данной температуре называется максимальной влажностью. Отношение абсолютной влажности к максимальной, выраженной в процентах, называется относительной влажностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За время, прошедшее с момента издания в Белоруссии учебника «Техника лабораторных работ» (2001 г.), произошли существенные изменения как в материально-техническом оснащении КДЛ лечебно-профилактических организаций, так и в самом содержании работы специалистов клинической лабораторной диагностики, перечне их функциональных обязанностей.

В течение последних лет в практику работы КДЛ внедрено большое количество новых, высоких технологий, базирующихся на использовании оптического, иммунологического, ионометрического, иммуноферментного, иммунофлуоресцентного, радиометрического, хроматографического, химико-токсикологического, молекулярно-биологического, генетического и других видов анализа, а также автоматизированных лабораторно-диагностических устройств для выполнения гематологических, биохимических, общеклинических, серологических, токсикологических и прочих исследований, анализаторов кислотно-основного состояния, газов крови и др. Это оборудование широко используется для исследования маркеров онкологических, сердечно-сосудистых заболеваний, вирусных и бактериальных инфекций и др.

Техническое перевооружение лабораторий привело к тому, что в России, странах ближнего и дальнего зарубежья в перечень должностей КДЛ включены также штатные единицы медицинского биолога, старшего аналитика, медицинского технолога, медицинского лабораторного техника, хорошо владеющих аналитическими методами исследования с использованием сложной компьютеризированной техники. Внедрение в практику работы КДЛ современных методов исследования требует соответствующих знаний и умений в области выполнения аналитических процедур на всех этапах лабораторного исследования. Именно этим обусловлено большое внимание, которое было уделено на страницах данной книги описанию современных технических, инструментальных устройств. С учетом того, что ошибки в лабораторном исследовании, как правило, возникают не только на аналитическом, но и на преаналитическом этапе, большое место в книге уделено правилам взятия, транспортировки и хранения биологического материала, особенностям подготовки пациента для различных лабораторных исследований.

Как известно, надежность получаемого результата лабораторного исследования во многом зависит от того, насколько хорошо владеют сотрудниками КДЛ (врачи лабораторной диагностики, медицинские биологи, аналитики, медицинские технологи, лабораторные техники, фельдшеры-лаборанты и лаборанты) конкретными методами анализа, а также от знания ими основных причин и условий возникновения преаналитических и аналитических погрешностей при проведении лабораторного исследования, технологий осуществления контроля качества.

Сведения, касающиеся этих областей клинической лабораторной диагностики, могут быть также почерпнуты из выпущенного издательством «МЕДпресс-информ» учебника «Методы клинической лабораторной диагностики» (М., 2009, 2011).

ЛИТЕРАТУРА

- Камышников В. С.* Техника лабораторных работ: учебник для учащихся медицинских училищ по специальности «Лабораторная диагностика». – Минск: Беларуская навука, 2000. – 286 с.
- Камышников В. С.* Технологические принципы автоматизации клинико-биохимических исследований с использованием методологии жидкой химии // Медицинские новости. – 2008. – №12. – С. 45–54.
- Камышников В. С.* Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. – 3-е издание. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 896 с.
- Камышников В. С., Василиу-Светлицкая С. Г., Дальнова Т. С.* и др. Технологические принципы и интерпретация результатов лабораторных гематологических исследований, выполняемых с использованием современных автоматизированных устройств // Медицинские новости. – 2009. – №3. – С. 38–48.
- Качество клинических лабораторных исследований (новые горизонты и ориентиры) / Под ред. В.В.Меньшикова. – М.: Аналитика, 2002. – 304 с.
- Лабораторная диагностика России 2008/2009. Ежегодный справочник. Мир медицины. – СПб.: Человек, 2008. – 316 с.
- Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / Под ред. проф. В.В.Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 365 с.
- Методы клинических лабораторных исследований: учебник / Под ред. В.С.Камышникова. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: МЕДпресс-информ, 2000. – 752 с.
- Памятка для пациентов о правилах подготовки к сдаче анализов мочи и кала. – М.: Департамент здравоохранения, 2005.
- Правила по технике безопасности и производственной санитарии при работе в химических лабораториях медицинских учебных заведений. – М.: Министерство здравоохранения СССР, 1982. – 67 с.
- Правила устройства, техники безопасности и производственной санитарии при работе в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений системы Министерства здравоохранения СССР. – М.: Министерство здравоохранения СССР, 1971. – 23 с.
- Санитарно-эпидемиологический режим в клинико-диагностических лабораториях: методические разработки. – М.: 1993. – 17 с.

Камышников Владимир Семенович

**ТЕХНИКА ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ
В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ**

Главный редактор: *В.Ю.Кульбакин*

Ответственный редактор: *Н.Ю.Соколова*

Корректор: *Е.В.Мышева*

Компьютерный набор и верстка: *И.А.Кобзев, Д.В.Давыдов*

ISBN 978-5-00030-279-8



Лицензия ИД №04317 от 20.04.01 г.
Подписано в печать 15.09.15. Формат 60×90/16.
Бумага офсетная. Печать офсетная. Усл. печ. л. 21,0.
Гарнитура Таймс. Тираж 1000 экз. Заказ №1021

Издательство «МЕДпресс-информ».
119992, Москва, Комсомольский пр-т, д. 42, стр. 3
E-mail: office@med-press.ru
www.med-press.ru
www.03book.ru