

Министерство образования Республики Беларусь
УО «Полесский государственный университет»

Т. Л. ЛЕБЕДЬ, Н. В. ЖУР

АНАЛИТИЧЕСКАЯ БИОХИМИЯ

I часть

Учебно-методическое пособие

Пинск
ПолесГУ
2023

УДК 577.1(075.8)
ББК 28.072
ЛЗЗ

Р е ц е н з е н т ы:

доктор биологических наук, профессор С. Б. Мельнов;
кандидат сельскохозяйственных наук А. Г. Чернецкая

У т в е р ж д е н о

научно-методическим советом ПолесГУ

Лебедь, Т. Л.

ЛЗЗ Аналитическая биохимия : учебно-методическое пособие :
в 2 ч. / Т. Л. Лебедь, Н. В. Жур. – Пинск : ПолесГУ, 2023. –
70 с. – Ч. I.

ISBN 978-985-516-767-0 (Ч. I)

ISBN 978-985-516-766-3

Настоящее учебно-методическое пособие посвящено актуальной проблеме – оказание методической помощи студентам в систематизации учебного материала в процессе освоения дисциплины «Аналитическая биохимия», а также в подготовке к итоговой аттестации по данному курсу.

В пособии представлена информация о биометрических методах в биохимическом анализе, метрологических основах аналитической биохимии, общих лабораторных методах, особенностях применения физико-химических методов, комплексном использовании аналитических подходов, получении и подготовки биологических образцов, оценке результатов биохимического анализа.

Приведены правила работы с химической посудой, способы приготовления растворов для биохимических исследований, пути использования титриметрических, рН-метрических, фотометрических, хроматографических, электрофоретических методов анализа в биохимической практике.

Описанная теория полезна для освоения методов современной аналитической биохимии для студентов биотехнологического факультета, обучающихся по специальности 6-05-0511-02 «Биохимия».

УДК 577.1(075.8)
ББК 28.072

ISBN 978-985-516-767-0 (Ч. I)

ISBN 978-985-516-766-3

© «Полесский государственный университет», 2023.

СОДЕРЖАНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ.....	6
1. ВВЕДЕНИЕ.....	8
Предмет аналитической биохимии	8
Взаимосвязь аналитической биохимии с биохимией и аналитической химией	9
Общие принципы и составные части биохимического исследования. Место аналитических процедур в биохимических исследованиях.....	11
Аналитический процесс, уровни его реализации	12
Стадии проведения анализа.....	16
2. БИОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В БИОХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ	19
Особенности статистической обработки и анализа количественных данных.....	19
Источники ошибок и артефактов в биохимическом анализе, возможные способы их обнаружения и устранения	21
Систематические и случайные погрешности, способы их обнаружения и идентификации.....	23
Использование информационных технологий в сборе, фиксации, хранении и анализе экспериментальных данных	24
3. МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ АНАЛИТИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ	29
Общие понятия о метрологических характеристиках аналитической процедуры	29
Цель и задачи метрологического обеспечения в биохимическом анализе, основные метрологические характеристики	30

Аналитический сигнал и его взаимосвязь с количеством (содержанием) определяемого вещества	33
Калибровочная кривая и калибровочная функция.....	34
Предел обнаружения. Понятие о надежном обнаружении.....	37
Стандартизация подходов к выполнению анализа, принципы добросовестной лабораторной практики	38
Законодательная метрология	41
Управление качеством количественных измерений. Внутрिलाбораторный и внешний контроль качества	43
4. ОБЩИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ	
В БИОХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ	45
Особенности применения общих лабораторных методов в биохимическом эксперименте. Микро- и нанометоды.....	45
Лабораторная посуда: виды лабораторной посуды, выбор оптимального материала в зависимости от поставленной задачи биохимического эксперимента, способы подготовки лабораторной посуды для биохимического анализа	47
Реактивы: маркировка реактивов, особенности хранения реактивов для биохимического анализа, способы проверки качества и чистоты реактивов, методы дополнительной подготовки и очистки реактивов для биохимического анализа	53
Дозирование жидкостей, возможные источники погрешностей.....	56
Особенности приготовления растворов в аналитической биохимии: принципы приготовления, способы выражения, концентраций, растворимости.....	59
Буферные растворы для использования в биохимическом анализе.....	60

Проведение ряда биохимических анализов в специальных условиях: работа с реагентами, чувствительными к влаге, кислороду воздуха и свету	61
Барьерные методы (фильтрация, диализ, осмос на мембранах) в аналитической биохимии	61
Общие принципы осаждения веществ из растворов, особенности осаждения биомолекул, условия осаждения, препятствующие нарушению пространственной структуры биологических макромолекул. Высушивание осадков. Методы концентрирования растворов: ультрафильтрация, упаривание на роторном испарителе, распылительная сушка, лиофилизация, концентрирование диализом, осадительное концентрирование.....	65
ЛИТЕРАТУРА	69

ПРЕДИСЛОВИЕ

Сегодня при подготовке специалистов-биохимиков используются современные информационные и аналитические технологии с учетом мировых тенденций развития биологии, нанобиотехнологии, медицины, фармакологии и фармацевтической биотехнологии.

Наличие мощной биологической, биомедицинской и биотехнологической составляющей принципиально отличает подготовку специалистов биохимиков от других профильных специальностей, связанных с фармацевтикой или химией лекарственных соединений. С учетом специфики подготовки специалистов в области молекулярных механизмов действия лекарственных веществ, молекулярного дизайна биологически активных соединений, принципов использования биотехнологий в химико-фармацевтическом синтезе студенты биохимики осваивают не только химические, но и общебиологические, медико-биологические, фармакологические и биотехнологические дисциплины. Однако эффективная подготовка современного специалиста-биохимика в вузе предполагает освоение им практических методов и приемов, используемых в лабораторной практике, в биохимическом анализе.

Освоение современных физико-химических и биохимических методов исследований для анализа и контроля качества лекарственных средств, фитопрепаратов и продуктов биотехнологии, контроля допинга и наркотических веществ, мониторинга окружающей среды и оценки биобезопасности пищевых продуктов позволит выпускникам работать на должностях биохимика, биолога, эксперта, научного сотрудника в научно-исследовательских, научно-производственных учреждениях, на производственных предприятиях, в лабораториях сертификационных, экспертно-криминалистических, таможенных, санитарно-эпидемиологических, экологических служб и др.

Цель данного издания – ознакомить студентов-биохимиков с важнейшими принципами и методами экспериментальной биохимии, выработать умения и навыки, необходимые для работы в биохимической лаборатории.

Предлагаемое пособие «Аналитическая биохимия» составлено исходя из конкретных задач, стоящих перед биохимиком в ежедневной практической деятельности. Уровень методических приемов соответствует требованиям современной науки, регламентируется учебными программами и учитывает технические возможности проведения учебного процесса.

1. ВВЕДЕНИЕ

Предмет аналитической биохимии

В настоящее время наблюдается не только стремительное развитие теоретической биохимии, но и разработка новых биохимических методов анализа, усовершенствование уже имеющихся методов и активное внедрение достигнутых результатов в лабораторную и медицинскую практику, а также, наряду с этим, во многие другие отрасли деятельности человека – начиная от сельского хозяйства и заканчивая судебно-криминалистической экспертизой.

Многие методы аналитической биохимии используются в основном учеными-исследователями в лабораторной практике; вместе с этим, однако, все большее число методов применяется в рутинной клинической практике, при проведении экологической экспертизы, при анализе качества и подлинности пищевых продуктов и лекарственных препаратов.

Очевидно, что эффективное и рациональное использование современных аналитических и препаративных методов невозможно без знания теоретических основ этих методов, области и условий их применения, ограничений, возможных источников ошибок.

Таким образом, изучение теории и практики биохимического анализа является необходимым для формирования специалистов, обучающихся по специальности «Биохимия».

Аналитическая биохимия – раздел биохимии, предметом изучения которого являются принципы и методы обнаружения, идентификации и количественного определения химических соединений, входящих в состав живых организмов. Аналитической биохимией широко используются математические и статистические методы. В некоторых исследованиях доля математического анализа очень значительна.

Аналитическая биохимия раскрывает основные понятия «надлежащей лабораторной практики» (GLP), методы аналитической биохимии, характеристику аналитических методов исследования, особенности статистической обработки и анализа количественных данных в аналитической биохимии, осо-

бенности применения аналитических методов в изучении биологических образцов, принципы разработки методов аналитической биохимии. Биохимические технологии регулярно обогащаются новыми методами исследований. Повышение их чувствительности и специфичности способствует расширению объектов биохимического анализа.

Аналитическая биохимия – это биохимия, применяющая математические, статистические и другие методы, основанные на формальной логике, для построения или отбора оптимальных методов измерения и планов эксперимента, а также для извлечения наиболее важной информации при анализе экспериментальных данных.

Предметом изучения аналитической биохимии являются принципы и методы надежного обнаружения, идентификации и количественного определения химических соединений, которые могут присутствовать в биологических объектах.

Таким образом, объектом биохимического анализа могут быть не только естественные компоненты живых организмов, но и различные соединения, поступающие извне, например, загрязнители окружающей среды, компоненты продуктов питания или лекарственные препараты. Любое поступающее извне вещество, не являясь компонентом нормальных метаболических процессов, может оказаться способным влиять на те или иные биохимические реакции и на обмен веществ в организме в целом.

Взаимосвязь аналитической биохимии с биохимией и аналитической химией

Биохимия – наука о химическом составе живых клеток и организмов и о химических процессах, лежащих в основе их жизнедеятельности.

Аналитическая химия – раздел химии, изучающий химический состав и отчасти структуру веществ; имеет целью совершенствование существующих и разработку новых методов анализа, поиск возможностей их практического применения, исследование теоретических основ аналитических методов.

Аналитическая биохимия – научная дисциплина, которая рассматривает теоретические основы и практическое применение методов изучения химического состава биологических объектов и их составных частей и принципы идентификации химических соединений, обнаруживающихся в живых организмах.

Невозможно представить в настоящее время практически ни одной естественной науки, которая не использовала бы достижения биохимии. Биологическая химия имеет и чисто научное (теоретическое) и, что наиболее важно, практическое (прикладное) значение.

Сельскохозяйственная наука использует биохимию для борьбы с насекомыми-вредителями, для создания удобрений, для селекции сортов растений и пород животных.

Пищевая промышленность использует достижения биохимии для производства легко усваиваемого детского питания, для обработки продуктов, подлежащих консервированию, для производства кисломолочных продуктов (ферменты в производстве сыра).

Генетика очень тесно взаимодействует с биохимией. Только благодаря использованию биохимических процессов и реакций возможно выделение генов, расшифровка генетического кода, воздействие на патологические гены с целью борьбы с генетическими заболеваниями. Фармацевтическая промышленность использует результаты биохимических исследований для производства различных препаратов: витаминов, ферментов, кровоостанавливающих лекарств, антибиотиков и т. д.

Радиология и биохимия также имеют точки соприкосновения. Существует отдельная наука – радиационная биохимия, которая изучает изменения обмена веществ, возникающие в организме при действии на него ионизирующего излучения. Воздействие радиации на организм может инициировать биохимические процессы, которые приводят к развитию лучевой болезни, рака, лейкозов, врождённых пороков развития у детей, бесплодия и других заболеваний. Исходя из этого, конечно же, наиболее прикладной характер имеет биохимия в медицине. Современные врачи проводят биохимические

исследования крови, мочи, желудочного сока, спинномозговой жидкости и др. Имея результаты только биохимических исследований, можно установить диагнозы множества заболеваний (гепатита, почечной недостаточности, анемии, мочекаменной болезни, сахарного диабета и мн. др.). Ориентируясь на динамику изменения биохимических показателей, врачи назначают и корректируют дозы лекарственных средств и добиваются выздоровления.

Общие принципы и составные части биохимического исследования. Место аналитических процедур в биохимических исследованиях

Методы, используемые в биохимии:

- химические;
- физические;
- ферментативные методы – есть только в биохимии;
- молекулярно-генетические и др.

Материал для биохимических исследований – кровь, моча, желудочный сок, спинномозговая жидкость, синовиальная жидкость, слюна, биоптаты органов и любые другие биологические объекты. Среди химических методов преобладает определение кислотности среды и качественный и количественный анализ на те или иные функциональные группы или элементы.

Для использования в биохимии наиболее часто применяют количественный анализ. Под количественным анализом понимают совокупность методов и приемов, позволяющих с требуемой точностью определять количественное содержание компонентов в анализируемом образце, а также микропримесей в нем.

При проведении анализа используются следующие приемы: *пробоотбор → пробоподготовка → получение аналитического сигнала → обработка аналитического сигнала → социально-экономическое использование результата анализа.*

Прежде чем планировать ход анализа, аналитик должен знать, какую информацию требуется получить, для кого, с какой целью; какого рода пробу предстоит анализировать. Постановка задачи будет определять способ подготовки, необходимое количество пробы, требуемую чувствительность мето-

да, его точностные характеристики – правильность и воспроизводимость, и то, какие операции разделения могут потребоваться для устранения мешающих влияний.

Основными задачами биохимических исследований являются:

1. Формирование единого технологического процесса производства лабораторных анализов.
2. Непосредственное выполнение различных видов лабораторных исследований.
3. Разработка критериев качества для отдельных этапов единого технологического процесса выполнения анализов.
4. Участие в разработке и внедрении новых эффективных методов исследования.
5. Своевременная замена лабораторных тестов на новые, имеющие более высокие аналитические критерии (специфичность, чувствительность, устойчивость к интерференциям), одновременно являющиеся экономически целесообразными.
6. Составление диагностических программ, определение спектра и частоты выполнения лабораторных исследований при различных состояниях организмов.

Важными условиями в выборе метода являются:

1. Стоимость расходных материалов.
2. Вредность используемых реактивов для персонала.
3. Наличие и стоимость приборов.

Причем под стоимостью расходных материалов понимают не только стоимость реактивов, но и стоимость хроматографических колонок, фильтров и других компонентов, которые рассчитаны на определенное количество анализов. В настоящее время часто используется комбинаторика нескольких методов, которые могут относиться к различным видам анализа.

Аналитический процесс, уровни его реализации

Все клетки в организме находятся в состоянии динамической активности и подвергаются действию внутренних и внешних факторов, которые, в свою очередь, также постоянно изменяются. В процессе жизнедеятельности любая отдельно

взятая клетка взаимодействует с другими клетками, находящимися как в непосредственной близости от нее (межклеточные взаимодействия), так и на некотором расстоянии (гормональные эффекты). Функционирование органеллы внутри клетки также в значительной степени зависит от активности других органелл и окружающей цитоплазмы. Именно поэтому нельзя достаточно полно изучить живую клетку, если делать это в отрыве от целого организма. В свою очередь, изучение любой последовательности взаимосвязанных процессов, протекающих в какой-либо биологической системе, начинают, как правило, с изучения ее компонентов.

С целью получения полной и достоверной картины клеточного обмена необходимо произвести исследование:

- на целом организме;
- на изолированном органе;
- на уровне клетки;
- на уровне клеточной органеллы;
- на молекулярном и атомном уровнях.

Исследования на уровне целого организма

Биохимические эксперименты на животных могут быть предприняты с различными целями. Применяя в течение длительного времени специальную диету, лишенную определенных витаминов или микроэлементов, и одновременно регистрируя возникающие при этом физиологические и клинические изменения, можно исследовать метаболическую роль данного витамина или микроэлемента. Вместе с тем, вводя животному какое-либо экзогенное соединение, можно изучать как влияние этого соединения на организм животного (фармакологическая или патологическая ответная реакция), так и влияние организма на введенное соединение, т. е. его превращение и выведение.

В последнее время все большее внимание стали уделять вопросам о том, каким образом различные лекарственные вещества, пищевые добавки и красители накапливаются в пище и метаболизируются, где они локализуются, какое разрушающее действие оказывают на органы, ткани и какие канцеро-

генные побочные эффекты могут вызывать. Если эксперименты проводятся на лабораторных животных, то через некоторое время после введения экзогенных соединений их умерщвляют, а затем исследуют их органы. Единственным способом исследовать пути превращения введенных соединений у человека является определение содержания этих соединений и их метаболитов в крови, моче, фекалиях, желчи, выдыхаемом воздухе, поте и слюне. О поражении органа судят по изменению содержания в сыворотке крови таких ферментов, как аспартатаминотрансфераза и лактатдегидрогеназа.

Именно благодаря огромному многообразию переменных эксперименты всегда следует проводить не на одном животном, а на целых группах. Исследования нужно проводить на животных чистых линий, а получаемые экспериментальные данные подвергать тщательной статистической обработке.

Результаты анализа фармакологического действия введенных экспериментальным животным соединений необходимо сопоставлять с данными, получаемыми в группе контрольных животных, которым было введено плацебо, т. е. совершенно нейтральное вещество, например, лактоза. Одной из основных проблем, стоящих перед биохимиками и фармакологами, является экстраполяция результатов, полученных на лабораторных животных, к человеку. Исследование на уровне целых организмов не только не нарушает целостности тканей, но позволяет изучать отдельные органы и ткани, оставляя без изменения снабжение их питательными веществами, нервную и гормональную регуляцию.

Исследования на уровнях органа, тканей

Исследования на этом уровне организации проводят методом перфузии изолированных органов. Сущность этого метода заключается в том, что изучаемый орган (печень, почку или сердце) изолируют из организма животного и помещают в специальный термостатируемый прибор; затем к перфузионной жидкости, которая обычно вводится в орган через артерию, добавляют исследуемое соединение и анализируют жидкость, вытекающую из органа через вену, что позволяет проследить за превращениями введенного соединения. Пер-

фузионную жидкость можно пропускать через орган однократно или несколько раз, самотёком или с помощью небольшого насоса. В отдельных случаях жидкость прогоняют не при постоянном давлении, а импульсами, что позволяет приблизить условия опыта к ситуации *in vivo* и имитирует процесс перекачивания крови сердцем.

Для проведения перфузии не обязательно полностью изолировать орган; ее можно проводить и на органе вскрытого анестезированного животного. При этом удастся сохранить интактными нервные волокна и часть сосудистой системы. Действие какого-либо соединения на ткань или орган (например, гистамина на мышцу) можно изучать по механической ответной реакции изолированной ткани на данное соединение. Исследуемое соединение добавляют к омывающей ткань жидкости; в ответ на это ткань, закрепленная с одного конца, а другим концом связанная с пером самописца, начинает двигаться, и любое движение ткани постоянно регистрируется. Данный метод позволяет изучать ответную реакцию изолированных органов на введение очень небольших (порядка нескольких нанограмм) количеств активных соединений.

Преимущество изучения на уровне органа и тканей заключается в том, что при этом удастся избежать нежелательных эффектов, обусловленных изменением непосредственного тканевого окружения, как это имеет место, например, при фракционировании клеток.

Основным недостатком этих методов является отсутствие гормонального и нервного контроля, поэтому при экстраполяции всех полученных результатов к ситуации *in vivo* следует соблюдать осторожность.

Исследования на уровне клетки, клеточных органелл

Фракционирование (отделение) клеток состоит из двух последовательных стадий: гомогенизации и разделения. Большинство животных клеток разрушается сравнительно легко, однако при разрушении растительных и бактериальных клеток зачастую приходится сталкиваться со значительными трудностями, связанными с наличием клеточных стенок.

Выбор методов при изучении метаболизма у растений в основном определяется степенью организации растения. Одноклеточные и многоклеточные водоросли хорошо растут на простых, чаще всего неорганических питательных средах, при соответствующих внешних условиях. Такие водоросли можно рассматривать как интактные организмы. Они имеют относительно простое строение и являются удобным экспериментальным материалом для изучения фундаментальных биохимических процессов, которые трудно исследовать на высокоорганизованных растениях.

На более высоких уровнях организации – у высших растений – доставка экзогенных соединений в соответствующий участок внутри растения в значительной степени затруднена. Если растение растет в почве (растворе), исследуемое соединение в виде раствора вносят в эту почву (раствор), откуда оно затем всасывается корнями. Для изучения распределения соединения и его метаболитов внутри растительного организма исследуют отдельные его части – корни, побеги, листья, почки и цветы. Основная особенность изучения метаболизма у растений заключается в том, что растительные ткани, в отличие от тканей животных, не содержат достаточно крупных и сложных структур. Отдельные части растения можно изолировать, помещать в соответствующую среду, а затем изучать их метаболизм *in vitro*. Приготовление срезов, гомогенатов и выделение клеточных органелл из растительных тканей осуществляют такими же способами, как и из тканей животных. Подобно другим методам *in vitro*, применение тканевых и клеточных культур ставит перед исследователями проблему экстраполяции полученных результатов к целому организму, особенно в тех случаях, когда при культивировании растительные и животные клетки дифференцируются.

Стадии проведения анализа

Выделяют три основных этапа лабораторного исследования:

- преаналитический;
- аналитический;
- постаналитический.

Преаналитический этап – это время с момента направления биоматериала на лабораторное обследование до момента поступления биологического материала в лабораторию. Соблюдение необходимых условий на данном этапе обеспечивается совместными усилиями группы специалистов. При этом составляется запрос на анализ, обеспечивается правильное взятие биологического материала, а также своевременная и правильная транспортировка. Наиболее сложным в организационном плане и наиболее ответственным в плане влияния на полученные показатели в системе контроля качества является преаналитический этап – взятие биологического материала на исследование.

С момента поступления материала в лабораторию начинается лабораторная часть преаналитического этапа, которая включает:

- подготовку расходных материалов и оборудования;
- прием и регистрацию проб для исследования;
- подготовку биоматериалов для исследований (пробоподготовку).

Аналитический этап – время непосредственного выполнения аналитической процедуры по определению того или иного исследования, указанного в направлении врача.

Постаналитический этап, как и преаналитический, делится на внутрилабораторную и внелабораторную части. Внутрилабораторная часть подразумевает оценку исследователем достоверности полученного результата и выдачу заключения. Достоверность результата рассматривается с точки зрения соответствия предполагаемому физиологическому состоянию, динамики показателя и взаимосвязи с другими лабораторными параметрами. Кроме того, полученный результат сравнивается с референтным интервалом. При этом в ряде случаев необходимо установление в лаборатории собственных референтных интервалов для проведения адекватной оценки.

Последовательность этапов биохимического аналитического эксперимента:

1. Выбор цели эксперимента.
2. Анализ знаний по проблеме.

3. Выбор объекта анализа и постановка аналитической задачи.
4. Выбор адекватного аналитического метода.
5. Выбор способа отбора (приготовления) и подготовки пробы.
6. Планирование хода эксперимента.
7. Подготовка к экспериментальным операциям.
8. Выполнение аналитического эксперимента.
9. Анализ экспериментальных данных.
10. Формирование выводов и оценка успешности эксперимента.

На протяжении всех этапов исследования необходимо:

- корректно и полностью выполнять рутинные лабораторные процедуры;
- придерживаться инструкций по технике безопасности в лаборатории, распознавать потенциально опасные ситуации и действовать соответствующим образом;
- обнаруживать и устранять логические несоответствия в лабораторных протоколах;
- проводить измерения и описывать неопределённые величины с необходимой точностью переводить первичные экспериментальные данные в физически (биологически, клинически) значимую форму;
- эффективно планировать улучшение лабораторного процесса на основании прогресса современных технологий анализа и обработки данных;
- обобщать и применять полученный опыт учиться на своих и чужих ошибках;
- проявлять инициативу и самостоятельность в работе;
- эффективно работать в команде;
- находить компромиссы в планировании совместной или пересекающейся деятельности с другими людьми.

2. БИОМЕТРИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В БИОХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

Особенности статистической обработки и анализа количественных данных

В практических задачах обычно имеется совокупность наблюдений (десятки, сотни, а то и тысячи результатов измерений индивидуальных характеристик), в связи с этим возникает задача компактного описания имеющихся данных.

Для решения задач, связанных с анализом данных (выявление скрытых взаимосвязей внутри массивов данных) при наличии случайных и непредсказуемых воздействий, математиками и другими исследователями за последние двести лет был выработан мощный и гибкий арсенал методов, называемых в совокупности статистическими методами анализа данных. За это время накоплен большой опыт успешного применения этих методов в разных сферах человеческой деятельности, от экономики и биохимии до космических исследований. И при определенных условиях эти методы позволяют получать оптимальные решения. Статистические методы (методы, основанные на использовании математической статистики) являются эффективным инструментом сбора и анализа информации. Применение этих методов не требует больших затрат и позволяет с заданной степенью точности и достоверностью судить о состоянии исследуемых явлений (объектов, процессов), прогнозировать и регулировать проблемы на всех этапах их жизненного цикла и на основе этого вырабатывать оптимальные управленческие решения.

Условно все методы можно классифицировать по признаку общности на три основные группы: графические методы, методы анализа статистических совокупностей и экономико-математические методы.

Предложенная классификация не является ни универсальной, ни исчерпывающей, но она дает наглядное представление о разнообразии статистических методов и о тех потенциальных возможностях, которыми они располагают по части их использования при анализе данных.

Графические методы основаны на применении графических средств анализа статистических данных. В эту группу могут быть включены такие методы, как контрольный листок, диаграмма Парето, схема Исикавы, гистограмма, диаграмма разброса, расслоение, контрольная карта, график временного ряда и др. Данные методы не требуют сложных вычислений, могут использоваться как самостоятельно, так и в комплексе с другими методами.

Методы анализа статистических совокупностей служат для исследования информации, когда изменение анализируемого параметра носит случайный характер. Основными методами, включаемыми в данную группу, являются: регрессивный, дисперсионный и факторный виды анализа, метод сравнения средних, метод сравнения дисперсий и др. Эти методы позволяют установить зависимость изучаемых явлений от случайных факторов – как качественную (дисперсионный анализ), так и количественную (корреляционный анализ); исследовать связи между случайными и неслучайными величинами (регрессивный анализ); выявить роль отдельных факторов в изменении анализируемого параметра (факторный анализ) и т. д.

Анализ данных с помощью статистических методов может быть выполнен в несколько этапов (**Таблица 1**).

Таблица 1 – Этапы анализа данных и их статистические методы

№ п/п	Этапы анализа данных	Статистические методы исследования
1	Описание данных	Описательная статистика Определение необходимого объема выборки
2	Изучение сходств и различий	Статистические критерии: Крамера – Уэлча Вилкоксона – Манна – Уитни Хи-квадрат Фишера и др.
3	Исследование зависимостей	Корреляционный анализ Дисперсионный анализ Регрессионный анализ
4	Снижение размерности	Факторный анализ Метод главных компонент
5	Классификация и прогноз	Дискриминантный анализ Кластерный анализ Группировка

Для этого используют методы описательной статистики – описания результатов с помощью различных агрегированных показателей графиков. Кроме того, некоторые показатели описательной статистики используются и в других статистических методах. Для результатов измерений в шкале отношений показатели описательной статистики можно разбить на несколько групп:

- Показатели положения – описывают положение экспериментальных данных на числовой оси. Примеры таких данных – максимальный и минимальный элементы выборки, среднее значение, медиана, мода и др.
- Показатели разброса – описывают степень разброса данных относительно своего центра (среднего значения). К ним относятся: выборочная дисперсия, разность между минимальным и максимальными элементами (размах, интеграл) выборки и др.
- Показатели асимметрии (положение медианы относительно среднего) и др.
- Гистограмма и др.

Данные показатели используются для наглядного представления и первичного (визуального) анализа результатов измерений характеристик экспериментальной и контрольной групп.

Источники ошибок и артефактов в биохимическом анализе, возможные способы их обнаружения и устранения

Ошибки и артефакты в полученных данных могут являться следствием ошибки в ходе эксперимента, неправильной записи результата, сбоя измерительных приборов и т. д. Проверка на наличие выбросов желательна при предварительном анализе полученных данных, т. к. их наличие может существенно повлиять на конечные выводы об исследуемой совокупности. В принципе, если исследователь знает границы возможных результатов, и какие-то полученные значения сильно выбиваются из этих границ, он может исключить их из анализа, не проводя дополнительной проверки. Иногда исследователя могут интересовать и сами выбросы, как периодически возникающие аномальные явления, конечно, если они не являются следствием ошибки.

Артефакты (или выбросы) – такие записанные значения признака, которые резко отличаются от всех других значений признака в группе. Проверка артефактов должна проводиться всегда перед началом обработки полученных первичных данных. Если подтвердится, что резко выделяющееся значение (например, записанное значение роста: 263 см) действительно не может относиться к объектам данной группы, и попало в записи вследствие ошибок внимания, следует такой артефакт исключить из обработки.

Проверка артефактов может производиться по критерию (1), равному нормированному отклонению выпada:

$$T = \frac{X_i - \mu}{\sigma} \geq T_{st}, \quad (1)$$

где T – критерий выброса;

X_i – выделяющееся значение признака (или очень большое, или очень малое);

μ, σ – средняя и сигма, рассчитанные для группы, включающей артефакт;

T_{st} – стандартные значения критерия выбросов, определяемых по **Таблице 2**.

Таблица 2 – Стандартные значения критерия выпадов (T_{st})

n	T_{st}	n	T_{st}	n	T_{st}	n	T_{st}
2	2,0	16 – 20	2,4	47 – 66	2,8	125 – 174	3,2
3 – 4	2,1	21 – 28	2,5	67 – 84	2,9	175 – 349	3,3
5 – 9	2,2	29 – 34	2,6	85 – 104	3,0	350 – 599	3,4
10 – 15	2,3	35 – 46	2,7	105 – 124	3,1	600 – 1500	3,5

Если $T \geq T_{st}$, то анализируемое значение признака является выбросом. Альтернатива $T < T_{st}$ не позволяет исключить из анализа значение признака. В зависимости от причин возникновения различают ошибки регистрации и ошибки репрезентативности. Ошибки регистрации характерны как для сплошного, так и для несплошного наблюдения, а ошибки репрезентативности – только для несплошного наблюдения. Ошибки регистрации, как и ошибки репрезентативности, могут быть случайными и систематическими.

Ошибки регистрации – представляют собой отклонения между значением показателя, полученного в ходе статистического наблюдения, и его фактическим значением. Ошибки регистрации бывают случайными (результат действий случайных факторов – перепутаны строки, например) и систематическими (проявляются постоянно).

Ошибки репрезентативности – возникают, когда отобранная совокупность недостаточно точно воспроизводит исходную совокупность, характерны для несплошного наблюдения и заключаются в отклонении величины показателя исследуемой части совокупности от его величины в генеральной совокупности.

Систематические и случайные погрешности, способы их обнаружения и идентификации

Систематические погрешности – это погрешности, вызываемые факторами, действующими постоянно (т. е. систематически). Их можно обнаружить и измерить с помощью более точных приборов. Прибор, дающий систематическую погрешность, всегда завышает или всегда занижает свои показания, т. е. во всех измерениях значения абсолютной погрешности – это числа одного знака, но по модулю погрешность может быть от случая к случаю различной. Причины появления систематических погрешностей могут быть тривиальными (например, разрядилась батарейка), а могут быть и более коварными (непостоянство диаметра капилляра в термометре; несовершенство методики косвенных измерений). Количество возможных причин может исчисляться десятками. Единой методики выявления причин появления систематических погрешностей не существует.

Если систематическая погрешность обнаружена и оценена количественно, то возможны следующие варианты действий:

- устранение ее причины;
- коррекция показаний состоявшихся и будущих измерений на величину систематической погрешности;
- пренебрежение систематической погрешностью, если она достаточно мала.

Случайные погрешности – результат несогласованного действия группы факторов, среди которых нет доминирующих по влиянию на общий результат.

Случайные погрешности имеют следующие свойства:

1. Одинаковые по модулю положительные и отрицательные погрешности равновероятны.
2. Меньшие по модулю погрешности встречаются чаще, чем большие.
3. С увеличением числа измерений одной и той же величины среднее арифметическое значение случайных погрешностей, посчитанное с учетом их знаков, стремится к нулю. Это означает, что с ростом количества измерений среднеарифметическое значение результатов измерений стремится к истинному значению измеряемой величины.

Кардинальный способ уменьшения величины случайных погрешностей – увеличение количества измерений. Случайные и систематические погрешности могут спокойно сосуществовать друг с другом.

Использование информационных технологий в сборе, фиксации, хранении и анализе экспериментальных данных

Сегодня термин «большие данные» (англ. – *Big Data*) приобрел большую популярность и активно используется в различных сферах. Однозначного понимания содержания этого термина до сих пор не существует. Однако все определения сводятся к тому, что большие данные – это технология анализа данных, направленная на извлечение полезных новых знаний из таких объемов данных, с которыми не справляется человек.

Анализ литературы показывает, что большим данным, кроме их большого объема, присущи два основополагающих признака:

1. Объединение данных из разнообразных источников может быть осуществлено при интегрировании различных баз данных, наблюдений или измерений, цифровых архивов цитологических изображений, скрининга биохимических исследований, Интернета и т. п.
2. Появление необходимости использования для анализа таких данных сложных и принципиально новых методов.

В современной биохимии наблюдается постоянный рост размеров цифровых архивов лабораторий, что обусловлено большей доступностью сложного диагностического оборудования. Например, среднестатистическая лаборатория генетики в настоящее время производит несколько терабайтов данных в год, которые помещаются в соответствующие базы данных.

Вместе с тем, применение Big Data за рубежом не столь широко распространено, как может показаться. В частности, большинство публикаций в PubMed посвящено рассмотрению возможностей применения Big Data в аналитике и практически не касается проблематики сбора необходимых для проведения этой аналитики больших данных.

Широко используется термин «наука о данных» (англ. – *Data Science*), который обозначает дисциплину, изучающую проблемы анализа, обработки и представления информации в цифровой форме.

Таким образом, «добыча информации» (англ. – *Data Mining*) – это анализ данных с целью выявления закономерностей, включая «машинное обучение» (англ. – *Machine Learning*); т. е. методы выделения закономерностей в данных с помощью обучения по примерам оказываются подобластью *Data Science*.

Одним из первых примеров обработки больших данных в истории медицины считается расшифровка генома человека. Декодировать его начали в 2000 г., на расшифровку 3 млрд знаков ушло 10 лет. Уже в 2015 г. геном человека мог быть расшифрован компьютером за один день.

В Университете Джона Хопкинса (США) разработана система OncoSpace, в которой хранятся 3D-снимки опухолей и истории болезни нескольких тысяч пациентов, страдавших от рака шеи, головы, предстательной или поджелудочной желез.

В Минске на базе корпоративной телекоммуникационной сети медицинских учреждений функционирует распределенная телемедицинская система реального времени по цифровой флюорографии для раннего выявления заболеваний легкого (туберкулез, рак).

Калифорнийский университет для отделений интенсивной терапии местных больниц опробовал систему аналитики боль-

ших данных, которая в режиме реального времени отслеживает и агрегирует данные о жизненных показателях пациентов и предсказывает возможное развитие сепсиса у пациента.

Тормозом в применении Big Data, безусловно, являются неструктурированные и некачественно собранные данные. Экспериментальные исследования человека и других организмов в различных условиях среды предполагают обеспечение современной измерительной аппаратурой, средствами регистрации и хранения данных, фиксации используемых моделей, ведения протоколов экспериментов и визуализации самого испытуемого. Для эффективной работы с данными должны использоваться системы управления базами данных, обеспечивающие полноценный сбор, преобразование, хранение и анализ этих данных.

Блок анализа экспериментальных данных предполагает наличие и использование современных алгоритмов анализа данных различной природы: временных последовательностей, текстовых комментариев, записей в базе данных, многоканальных сигналов измерительной аппаратуры, изображений, результатов исследований и т. д.

Диагностика и прогнозирование должны быть основаны на достаточно широко применяемых и известных методах машинного обучения (как логических, так и статистических) и более широко – на методах Data Mining, включающих алгоритмы преобразования измерительных сигналов (оцифровывание, очистка от шумов, дискретизация, шкалирование, кластеризация, фильтрация и т. д.).

На сегодняшний день существует обширный ряд специализированного программного обеспечения, позволяющего фиксировать, хранить и анализировать экспериментальные данные. Далее приведен ряд наиболее распространенного ПО для обработки и анализа экспериментальных данных.

В программах из пакета Minitab можно визуализировать, анализировать, сравнивать данные.

Minitab прост в использовании и имеет широкий функционал в области визуализации полученных результатов и построении информативных аналитических отчетов. ПО имеет простой

и понятный интерфейс, что позволяет освоить программу за короткое время. Пакет Minitab включает огромный выбор статистических инструментов.

Основные преимущества программного пакета Minitab:

- Загрузка данных из других программ. Например, можно импортировать информацию из Excel, редактировать таблицы и пр.
- Удобство при работе с графиками и диаграммами. Каждое последующее внесение данных в графики предусматривает автоматическое обновление готового проекта.
- Встроенный интерактивный помощник Minitab Assistant, который предоставляет рекомендации по расшифровке показателей, помогает определить приоритетные значения.

StatSoft – программа, известная разработкой мощных программ для статистического, графического анализа STATISTICA. Набор инструментов позволит выполнять прогнозирование, Data Mining.

STATISTICA отличается удобством интерфейса и оригинальными опциями настройки. Интерфейс можно настроить согласно пользовательским задачам и потребностям. Процесс анализа проходит в интерактивном режиме с постепенным открытием диалоговых окон.

Первая вкладка всегда содержит наиболее часто используемые функции, а другие вкладки включают уже специализированные методы и функции. В графическом блоке имеется набор инструментов для визуализации, графического дизайна. В программе используются авторские технологии улучшения производительности.

Изначально продукты StatSoft разработаны с сохранением максимальной оптимизации при работе со сложными прогнозными моделями.

В STATISTICA реализована возможность осуществлять разведочный анализ данных, определения корреляций, построение диаграмм рассеяния, вычисление Т-критерия, создание таблиц частот, заголовков. В интерактивном калькуляторе возможно определение вероятностного распределения.

Microsoft Excel – самая популярная и универсальная программа для статистики. Ключевые отличительные особенности приложения – работа с электронными таблицами, формирование массивных списков, создание баз данных, расчеты разного уровня сложности, создание отчетов.

Несмотря на то, что в Excel преобладает работа с цифрами, в редакторе можно создавать текстовые отчеты и управлять ими, строить графики, диаграммы. Для автоматизации задач используется набор команд в виде макроса.

В Excel встроен язык программирования VBA, который легко позволяет повысить возможности приложения, создавая собственные пользовательские функции, надстройки.

3. МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ АНАЛИТИЧЕСКОЙ БИОХИМИИ

Общие понятия о метрологических характеристиках аналитической процедуры

Метрология – наука об измерениях, методах и средствах обеспечения их единства и способах достижения требуемой точности.

Метрология играет важную роль для прогресса технологий и должна развиваться темпами, опережающими другие области науки и техники, т. к. для каждой из них точные измерения являются одним из основных путей совершенствования. Предметом метрологии является извлечение количественной информации о свойствах объектов с заданной точностью и достоверностью. Средством метрологии является совокупность измерений и метрологических стандартов, обеспечивающих требуемую точность.

Любая методика химического анализа имеет своей задачей извлечение информации о веществе с использованием тех или иных средств измерений, изучением общих вопросов, связанных с измерением. Обработкой и интерпретацией результатов анализа занимается специальный раздел аналитической химии, называемый химической метрологией.

Одним из основных условий для реализации единства измерений является необходимость обеспечения единообразия средств измерений. Под ним понимают состояние средств измерений, когда они проградуированы в узаконенных единицах и их метрологические характеристики соответствуют установленным нормам.

Метрологическая характеристика средства измерений – характеристика одного из свойств средства измерений, влияющая на результат измерений и на его погрешность. Для каждого типа средств измерений устанавливают свои метрологические характеристики. Метрологические характеристики, устанавливаемые нормативно-техническими документами, называют нормируемыми, а определяемые экспериментально – действительными метрологическими характеристиками.

К метрологическим характеристикам относят функцию преобразования, погрешность средства измерений, чувствительность, цену деления шкалы, порог чувствительности, диапазон измерений, вариацию показаний и др.

Цель и задачи метрологического обеспечения в биохимическом анализе, основные метрологические характеристики

Для обеспечения единства измерений и взаимозаменяемости средств измерений их метрологические характеристики нормируют и регламентируют. Для этого используют нормированные значения погрешности.

Под нормированным значением понимают погрешность, являющуюся предельной для данного типа средств измерений. Правила предписания пределов допускаемых погрешностей и форма их записи устанавливаются системой стандартов, обеспечивающей единство измерений.

Нормируемые метрологические характеристики – это совокупность метрологических характеристик данного типа средств измерений, устанавливаемая нормативными документами на средства измерений.

При выборе метода анализа необходимо учитывать содержание обнаруживаемого или определяемого компонента. При этом важно не только оценить содержание компонента в образце, его концентрацию в анализируемом растворе, но и количество вещества, которое может быть взято для анализа.

Таким образом, выбор метода анализа обуславливается абсолютным содержанием компонента. Концентрация определяемого компонента и количество образца, предоставляемого для анализа, могут меняться в широких диапазонах.

Так, содержание меди, никеля, хрома может составлять десятки процентов в их сплавах, десятые и сотые доли процента в минералах, рудах, сплавах других металлов.

В то же время содержание этих металлов в растениях, живых организмах, пищевых продуктах может составлять уже 10^{-7} – 10^{-5} %, а в особо чистых веществах – 10^{-8} – 10^{-6} %. Количество образца, получаемое для анализа, в одних случаях может быть нелимитированным, а в других (анализ вкраплений

в минералах, анализ крови, биомасс, космических объектов и т. д.) строго ограничено (миллиграммы или даже доли миллиграмма). Чувствительность метода или методики определяется тем минимальным количеством (или минимальной концентрацией) вещества, которое можно обнаруживать или определять данным методом по данной методике. Нижняя граница определяемых содержаний компонента демонстрирует возможности метода и наилучший результат, достигаемый при определении ряда веществ. Сопоставляя чувствительности различных методов и оценивая примерное содержание компонента в образце, аналитик выбирает тот или иной метод анализа. Например, для определения содержания натрия в силикатных породах используют гравиметрический метод, позволяющий определять миллиграммовые и более высокие количества натрия, для определения микрограммовых количеств того же элемента в растениях и биологических образцах животного происхождения – метод пламенной фотометрии, для определения натрия в воде особой чистоты (нано- и пикограммовые количества) – метод лазерной спектроскопии.

Избирательность метода

При проведении анализа имеют дело с самыми разнообразными объектами – продуктами промышленного и сельскохозяйственного производства, объектами окружающей среды, космическими объектами, произведениями искусства и т. д. Естественно, что выбор метода и методики анализа при этом определяется не только задачей анализа, но также свойствами и особенностями образца. Необходимо учитывать физические свойства анализируемого объекта: его агрегатное состояние, летучесть, гигроскопичность, механическую прочность и т. д. Определяющими при выборе метода анализа являются химические свойства образца.

При этом важно знать и принимать во внимание:

- химические свойства основы образца, часто называемой матрицей анализируемого объекта;
- качественный химический состав образца;
- химические свойства определяемого компонента и сопутствующих ему примесей.

Зная химические свойства основы и компонентов анализируемого объекта, оценив возможные помехи, выбирают как можно более избирательный метод – метод, с помощью которого в данных условиях можно обнаружить или определить нужные компоненты без помех со стороны других присутствующих компонентов.

В литературе наряду с термином «избирательность» используют термин «селективность». Если методики или используемые реакции позволяют обнаруживать или определять только один компонент, то их называют специфичными. Можно говорить об избирательности метода, методики и отдельной реакции, положенной в основу обнаружения или определения компонента. Так, высокой избирательностью характеризуются такие методы, как ионометрия, атомно-абсорбционный и ферментативный методы.

Многие реакции, лежащие в основе методик, также высокоизбирательны; например, образование некоторых комплексных соединений с органическими реагентами, ферментативные и электрохимические реакции. Реакции же взаимодействия иода с крахмалом или аммоний-содержащих веществ со щелочами, используемые для обнаружения иона аммония, специфичны.

Точность анализа – это собирательная характеристика метода или методики, включающая их правильность и воспроизводимость. Когда говорят о высокой точности, предполагают, что результаты правильные и разброс данных анализа незначителен. Точность часто характеризуют относительной погрешностью (ошибкой) определения в процентах. Требования к точности анализа обычно определяются целью и задачами анализа, природой объекта. Необязательно всегда стремиться к высокой точности. Например, при текущем контроле многих металлургических и химических производств определение компонентов можно проводить с погрешностью 10–15 %. В случае, если важно более точно знать содержание основного компонента и вредных примесей (например, в фармацевтической и пищевой промышленности), погрешность не должна превышать 0,1–1,0 %.

Для полупроводников погрешность определения основных компонентов должна быть менее 0,1 %, а по возможности менее 0,01 %, т. к. физические свойства этих соединений в значительной степени зависят от постоянства их стехиометрического состава.

Достаточно точны гравиметрические и титриметрические методы, погрешность которых обычно составляет соответственно 0,05–0,2 % и 0,1–0,5 %.

Из современных методов наиболее точен кулонометрический метод, позволяющий проводить определение компонентов с погрешностью 0,001–0,01 %.

Аналитический сигнал и его взаимосвязь с количеством (содержанием) определяемого вещества

После этапа отбора и подготовки пробы наступает следующий этап химического анализа, на котором и проводят обнаружение компонента или определение его количества. С этой целью измеряют аналитический сигнал. В большинстве методов аналитическим сигналом на заключительной стадии анализа служит среднее из измерений физической величины, функционально связанной с содержанием определяемого компонента. Это может быть масса вещества, сила тока, электродвижущая сила системы, оптическая плотность, интенсивность излучения и т. д. В отдельных случаях возможно непосредственное определение содержания. Так, в гравиметрическом методе иногда измеряют массу непосредственно определяемого компонента, например, элементной серы или углерода.

В случае обнаружения какого-либо компонента обычно фиксируют появление аналитического сигнала – появление осадка, окраски, линии в спектре и т. д. Появление аналитического сигнала должно быть надежно зафиксировано.

При определении количества компонента измеряют количественную характеристику аналитического сигнала: массу осадка, силу тока, интенсивность линии спектра и т. д. Затем рассчитывают содержание компонента с использованием функциональной зависимости: аналитический сигнал – y , содержание компонента – x , $y = f(x)$, которая устанавливается расчетным или опытным путем и может быть представле-

на в виде формулы, таблицы или графика. Содержание компонента при этом может быть выражено как абсолютное количество определяемого компонента в молях, единицах массы или через соответствующие концентрации.

При измерении аналитического сигнала учитывают наличие полезного аналитического сигнала, являющегося функцией содержания определяемого компонента, и аналитического сигнала фона, обусловленного примесями определяемого компонента и мешающими компонентами в растворах, растворителях и матрице образца, а также шумами, возникающими в измерительных приборах, усилителях и другой аппаратуре. Эти шумы не имеют отношения к определяемому компоненту, но накладываются на его собственный аналитический сигнал. Задача аналитика состоит в том, чтобы максимально снизить аналитический сигнал фона и, главное, сделать минимальными его колебания. Обычно аналитический сигнал фона учитывают при проведении контрольного (холостого) опыта, когда через все стадии химического анализа проводят пробу, не содержащую определяемого компонента. Полезным сигналом при этом будет аналитический сигнал, равный разности измеренного аналитического сигнала и аналитического сигнала фона. На основании существующей зависимости между аналитическим сигналом и содержанием находят концентрацию определяемого компонента. Обычно при этом используют метод градуировочного графика, метод стандартов или метод добавок.

Описанные в литературе другие способы определения содержания компонента являются, как правило, модификацией этих трех основных методов.

Калибровочная кривая и калибровочная функция

Калибровка – это набор операций для установления соответствия между значением количественной величины, измеренной прибором (инструментом), и эталонным (стандартным) значением оцениваемой величины. Наиболее распространен метод градуировочного графика. При этом в координатах аналитический сигнал-содержание компонента строят график с использованием образцов сравнения с различным, точно известным содержанием определяемого компонента. Затем, из-

мерив аналитический сигнал анализируемой пробы, находят содержание определяемого компонента по градуировочному графику. В методе стандартов измеряют аналитический сигнал образца сравнения (эталонного образца) $y_{эт}$, с известным содержанием компонента $C_{эт}$, и аналитический сигнал y_x анализируемой пробы:

$$y_{эт} = S \cdot C_{эт}, \quad y_x = S \cdot C_x, \quad (2)$$

где S – коэффициент пропорциональности.

Если определенное в идентичных условиях значение S известно, то содержание компонента C_x в анализируемой пробе можно рассчитать по формуле:

$$C_x = y_x / S. \quad (3)$$

Обычно же применяют соотношение:

$$\frac{y_{эт}}{y_x} = \frac{C_{эт}}{C_x}. \quad (4)$$

Откуда:

$$C_x = \frac{y_x \cdot C_{эт}}{y_{эт}}. \quad (5)$$

Иногда используют два эталонных образца, в которых содержание компонента отличается от предполагаемого в анализируемой пробе, в одном случае в меньшую, в другом – в большую сторону. Этот вариант метода стандартов называют иногда методом ограничивающих растворов.

Содержание определяемого компонента рассчитывают по формуле (6):

$$C_x = C_{эт1} + \frac{(C_{эт2} - C_{эт1}) \cdot (y_x - y_{эт1})}{y_{эт2} - y_{эт1}}, \quad (6)$$

где индексами 1, 2 обозначены соответствующие характеристики 1-го и 2-го эталонных образцов.

В тех случаях, когда при определении малых количеств компонента нужно учесть влияние матрицы образца на аналитический сигнал, часто используют метод добавок – расчетный и графический. При определении содержания компонента расчетным методом добавок берут две аликвоты раствора

анализируемой пробы. В одну из них вводят известное количество определяемого компонента. Измеряют аналитический сигнал обеих проб: y_x и $y_{x + доб}$.

Неизвестную концентрацию определяемого компонента рассчитывают по формуле (7):

$$C_x = \frac{y_x \cdot V_{доб} \cdot C_{доб}}{y_{x + доб} \cdot V_{доб} + (y_{x + доб} - y_x) \cdot V} \quad (7)$$

где $V_{доб}$, $C_{доб}$ – соответственно объем и концентрация добавленного раствора определяемого компонента;

V – аликвота анализируемой пробы.

При определении графическим методом добавок берут n аликвот анализируемой пробы: 1, 2, 3, ..., n . В аликвоты 2, 3, ..., n вводят известные возрастающие количества определяемого компонента. Измеряют аналитический сигнал всех аликвот и строят график в координатах аналитический сигнал-содержание определяемого компонента, приняв за условный ноль содержание определяемого компонента в аликвоте без добавки (аликвота 1).

Экстраполяция полученной прямой до пересечения с осью абсцисс дает отрезок, расположенный влево от условного нуля координат, длина которого в выбранном масштабе и выбранных единицах измерения соответствует искомому содержанию C_x определяемого компонента.

Метод стандартов и метод добавок применимы для линейной градуировочной функции. Метод градуировочного графика допускает использование как линейной, так и нелинейной функции аналитический сигнал-содержание компонента. В последнем случае требуется большее число экспериментальных данных и результат определения содержания компонента бывает, как правило, менее точным. Для построения градуировочного графика, наилучшим образом удовлетворяющего экспериментальным данным, обычно используют метод наименьших квадратов. В биохимическом анализе чаще всего используют прямолинейные градуировочные графики, построенные для конкретного диапазона определяемых содержаний, т. е. для областей значений, предусмотренных данной методикой.

Предел обнаружения.

Понятие о надежном обнаружении

Характеристиками чувствительности метода или методики являются предел обнаружения и нижняя граница определяемых содержаний. Предел обнаружения (C_{min}, P) – наименьшее содержание, при котором по данной методике можно обнаружить присутствие компонента с заданной доверительной вероятностью. Таким образом, понятие предела обнаружения относится к области качественного анализа и определяет минимальную массу m_{min} (или концентрацию C_{min}) компонента, которая может быть обнаружена с достаточно высокой ($P = 0,95$ или $P = 0,99$) заданной вероятностью. Предел обнаружения может быть задан и минимальным аналитическим сигналом (y_{min}), который можно уверенно отличать от сигнала контрольного опыта ($y_{фон}$).

Минимальный аналитический сигнал должен быть выбран таким образом, чтобы не допустить ошибки «переоткрытия» или «недооткрытия» компонента.

Статистическими методами доказано, что количественно предел обнаружения можно определить, пользуясь выражением (8):

$$C_{min, P} = \frac{3 \cdot S_{фон}}{S}, \quad (8)$$

где $S_{фон}$ – стандартное отклонение аналитического сигнала фона;

S – коэффициент чувствительности.

Существуют и другие способы расчета предела обнаружения, но приведённое уравнение используют чаще всего. Обнаруживаемый минимальный аналитический сигнал – и, следовательно, предел обнаружения – определяются не средним уровнем фонового сигнала, а размахом колебаний этого сигнала относительно среднего значения ($S_{фон}$). Это значение желательно определять из достаточно большого ($n \geq 20$) числа параллельных определений.

В количественном биохимическом анализе обычно приводят диапазон определяемых содержаний – область содержаний, предусмотренная данной методикой и ограниченная нижней и

верхней границами. Верхняя граница определяемых содержаний ($m_в, C_в$) – наибольшее значение массы или концентрации компонента, определяемой по данной методике; оно ограничено, как правило, изученным интервалом либо возможностью измерения аналитического сигнала с достаточной точностью. Например, интенсивность почернения фотопластинки или скорость процесса могут быть настолько велики, что их уже трудно будет измерить с необходимой точностью.

Аналитика обычно больше интересуется нижней границей определяемых содержаний ($m_н, C_н$) – наименьшее значение массы или концентрации компонента, определяемой по данной методике. В области низких содержаний точность результатов анализа ухудшается. Иногда за нижнюю границу определяемых концентраций принимают значение, равное $k C_{min, P}$, где коэффициент k обычно выбирают равным 3, но в зависимости от решаемой задачи коэффициент k может изменяться от 2 до 10.

Стандартизация подходов к выполнению анализа, принципы добросовестной лабораторной практики

Межгосударственный стандарт МКС 71.040.50 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)» подготовлен в целях гармонизации отечественных норм и правил с международными документами и, в первую очередь, с документом Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)».

Неудовлетворенность качеством неклинических исследований, на результатах которых основывается оценка уровня опасности в отношении здоровья человека и окружающей среды, со стороны правительств и представителей промышленности разных государств привела к установлению государствами – членами ОЭСР критериев для проведения подобных исследований. Во избежание использования разных схем выполнения подобных исследований, что могло бы препятствовать международной торговле химическими веществами, государства-члены ОЭСР поставили задачу осуществить

международную гармонизацию методов испытаний и надлежащей лабораторной практики.

В 1979–1980 гг. международной группой экспертов, созданной согласно специальной программе по контролю химических веществ, при использовании организационных и научных методов и опыта, полученных из различных национальных и международных источников, был разработан документ «ОЭСР. Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)».

Данные «Принципы GLP» были приняты Советом ОЭСР в 1981 г. как приложение к решению Совета ОЭСР о взаимном признании данных при оценке химических веществ.

В 1995–1996 гг. была сформирована новая группа экспертов, которая осуществила пересмотр документа «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)».

На основе соглашений, достигнутых в ходе работы этой группы, была разработана обновленная версия документа. Данный документ отменяет и заменяет первоначальный документ «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP)», принятый в 1981 г.

Цель «Принципов надлежащей лабораторной практики (GLP)» состоит в том, чтобы обеспечить продвижение применения принципа оценки качества данных, полученных в результате испытаний.

Сопоставимость уровня качества данных, полученных в результате испытаний, формирует основание для взаимного признания данных в разных странах. Если отдельные страны могут доверять качеству данных испытаний других стран, можно избежать дублирования испытаний, сэкономив время и ресурсы таким образом.

Применение «Принципов надлежащей лабораторной практики (GLP)» позволит избежать создания технических барьеров в торговле и будет способствовать осуществлению защиты здоровья человека и охране окружающей среды.

Настоящий стандарт устанавливает Принципы надлежащей лабораторной практики, предназначенные для применения при проведении неклинических исследований безопасности объектов испытаний, содержащихся в лекарственных сред-

ствах, пестицидах, косметической продукции, ветеринарных препаратах, пищевых и кормовых добавках, а также химических веществах промышленного назначения.

Объектами испытания чаще всего являются синтетические вещества и их смеси, но также могут быть натурального или биогенного происхождения, а в отдельных случаях представлять собой живые организмы.

Цель испытаний состоит в том, чтобы получить данные о свойствах объектов испытаний и/или об их безопасности для здоровья человека и/или окружающей среды.

Принципы надлежащей лабораторной практики распространяются на неклинические исследования медицинской и экологической безопасности, которые включают в себя исследования, проводимые в лабораторных, тепличных и полевых условиях.

Принципы надлежащей лабораторной практики применимы для всех неклинических исследований медицинской и экологической безопасности, требуемых законодательством в целях регистрации или лицензирования лекарственных средств, пестицидов, пищевых и кормовых добавок, косметической продукции, ветеринарных препаратов и других подобных продуктов, а также химических веществ промышленного назначения, за исключением случаев, особо оговоренных в соответствии с национальным законодательством.

Назначение и применение принципов надлежащей лабораторной практики:

- предназначены для обеспечения согласованности и достоверности результатов неклинических исследований медицинской и экологической безопасности;
- определены как система обеспечения качества, касающаяся организации процесса исследований и условий, в которых неклинические исследования медицинской и экологической безопасности должны быть спланированы, выполнены, проконтролированы, оформлены и заархивированы;
- направлены на обеспечение приемлемости результатов научных исследований. Приемлемость в данном случае означает, с одной стороны, доказательность и надежность

данных, с другой – соблюдение принципов гуманного обращения с лабораторными животными.

Законодательная метрология

Метрология состоит из трех разделов:

- Теоретическая метрология – раздел метрологии, предметом которого является разработка фундаментальных основ метрологии.
- Законодательная метрология – раздел метрологии, предметом которого является установление обязательных технических и юридических требований по применению единиц физических величин, эталонов, методов и средств измерений, направленных на обеспечение единства и необходимости точности измерений в интересах общества.
- Практическая (прикладная) метрология – раздел метрологии, предметом которого являются вопросы практического применения разработок теоретической метрологии и положений законодательной метрологии.

Сфера законодательной метрологии – установленные законодательными актами сферы деятельности, в которых в целях обеспечения единства измерений осуществляется государственное регулирование, включая государственный метрологический надзор.

Сфера законодательной метрологии распространяется на измерения, выполняемые при:

- обеспечении защиты жизни и охраны здоровья человека;
- обеспечении промышленной безопасности опасных производственных объектов, пожарной, ядерной и радиационной безопасности;
- проведении испытаний и осуществлении контроля за соответствием продукции и сырья требованиям – законодательства Республики Беларусь;
- проведении экспертиз;
- обеспечении охраны окружающей среды;
- проведении лабораторно-диагностических исследований ветеринарной службой и т. д.

Обеспечение единства измерений – деятельность, направленная на достижение и поддержание единства измерений в соответствии с требованиями законодательства об обеспечении единства измерений, международными договорами Республики Беларусь, а также правом Евразийского экономического союза.

Система обеспечения единства измерений Республики Беларусь – совокупность субъектов обеспечения единства измерений, законодательства об обеспечении единства измерений, Государственного информационного фонда по обеспечению единства измерений, мер по государственному регулированию в области обеспечения единства измерений, включая государственный метрологический надзор, а также работ по метрологической оценке. Основной целью обеспечения единства измерений в Республике Беларусь является защита прав и законных интересов государства, юридических лиц, индивидуальных предпринимателей и иных физических лиц от последствий неточных и неправильно выполненных измерений.

Работы по обеспечению единства измерений в Республике Беларусь осуществляются на основе Закона Республики Беларусь «Об обеспечении единства измерений» от 5 сентября 1995 г. № 3848-ХІІ (в ред. от 11 ноября 2019 г. № 254-З, вступил в силу 27 ноября 2020 г.), постановлений Совета Министров Республики Беларусь и постановлений Госстандарта.

Для обеспечения единства измерений в Республике Беларусь Госстандартом создана государственная метрологическая служба. Государственная метрологическая служба включает национальный метрологический институт и другие юридические лица (центры стандартизации, метрологии и сертификации), подчиненные Госстандарту и уполномоченные им на проведение испытаний в целях утверждения типа средства измерений или утверждения типа стандартного образца, работ по метрологической оценке в сфере законодательной метрологии. В качестве национального метрологического института Госстандартом определено Республиканское унитарное предприятие «Белорусский государственный институт метрологии». Национальные эталоны единиц величин образуют эта-

лонную базу Республики Беларусь. Эталоны разрабатываются в рамках Государственной научно-технической программы «Национальные эталоны и высокотехнологичное исследовательское оборудование».

**Управление качеством количественных измерений.
Внутрилабораторный и внешний контроль качества**

Контроль качества в лаборатории – это статистический процесс, используемый для наблюдения и оценки аналитического процесса производства результатов исследования проб. Статистический процесс требует:

- регулярного исследования контрольных материалов вместе с анализируемыми пробами;
- сравнения результатов измерения контрольных материалов с рассчитанными статистическими пределами.

Контроль качества лабораторных исследований – это создание и регулярное осуществление системы мероприятий для выявления и предотвращения недопустимых погрешностей, которые могут проявиться в процессе выполнения лабораторных исследований.

Система контроля качества основана на принципах стандартизации всех этапов лабораторного исследования и анализе результатов внутрилабораторного контроля качества и внешней оценки качества. Важно понимать, что, как и в любой сфере человеческой деятельности, ошибки, совершаемые в клинико-диагностических лабораториях, неизбежны. Задача каждой лаборатории с помощью системы обеспечения качества создать надёжный набор инструментов, позволяющий выявлять ошибки и проводить целенаправленные мероприятия, сводящие их к минимуму. Под обеспечением качества понимается совокупность планируемых и систематически проводимых мероприятий, необходимых для создания уверенности, что диагностическая информация, содержащаяся в авторизованном отчёте, удовлетворяет определённым требованиям качества.

Внутрилабораторный контроль качества исследований имеет своей целью достижение максимально высокой точности измерений (минимальной погрешности измерения). Точность

измерений – это качество измерений, которое отражает близость результатов к истинному значению измеряемой величины. Высокая точность измерений соответствует малым погрешностям (отклонениям результатов измерения от истинного значения). Внутрिलाбораторный контроль качества исследований включает определение воспроизводимости и правильности исследований.

Воспроизводимость можно определить как совпадение лабораторных показателей при повторных исследованиях. Качество измерений, отражающее близость друг к другу результатов измерений, выполняемых в одной и той же аналитической серии, называется внутрисерийной воспроизводимостью. Внутрисерийную воспроизводимость иначе еще называют сходимостью результатов измерений. При этом необходимо определить понятие аналитической серии. Понятие «аналитическая серия» обозначает совокупность результатов измерений лабораторного показателя, которые выполнены в одно и то же время и в одних и тех же условиях. При этом настройка и калибровка аналитической системы не меняются. В том случае, когда рассматривается близость друг к другу результатов измерений, выполняемых в разных аналитических сериях (различные аналитические системы, калибровки, персонал), производится оценка качества измерений по межсерийной воспроизводимости.

При оценке качества измерений используется также понятие «общая воспроизводимость», которое отражает близость друг к другу результатов всех измерений. Определяется общая воспроизводимость внутрисерийной и межсерийной воспроизводимостью. Внешний контроль качества имеет целью проведение объективной оценки результатов лабораторных исследований в иных лабораториях, использующих данный метод исследования. Таким образом, обеспечение качества – это выполнение совокупности планируемых и систематически проводимых мероприятий, необходимых для создания уверенности в достоверности результатов лабораторного исследования.

4. ОБЩИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ В БИОХИМИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

Особенности применения общих лабораторных методов в биохимическом эксперименте.

Микро- и нанометоды

Биохимические исследования – обширный раздел лабораторных исследований, включающий определение содержания различных органических и неорганических веществ, образующихся в результате биохимических реакций, а также измерение активности ферментов в сыворотке, плазме, крови, моче, ликворе и других биологических жидкостях.

Методы, используемые в биохимии:

- химические;
- физические;
- ферментативные методы – есть только в биохимии;
- молекулярно-генетические и др.

Методы, использующие различные приборы, часто объединяют понятием «инструментальные». Условно их можно разделить на физические и физико-химические. При этом полагают, что физические методы основаны на переходах внутренних электронов или ядер, а физико-химические – на переходах валентных электронов.

Однако часто наблюдается смешанная картина, и метод трудно точно классифицировать. Размытые границы еще раз свидетельствуют о переплетении различных наук и об общем единстве всех подходов к поставленной цели – определению состава вещества.

Биологические и биохимические методы анализа основаны на изучении поведения более или менее организованных живых организмов.

Из всех известных методов анализа в биохимии практическую основу составляют физико-химические методы. Это методы, позволяющие изучать какой-либо биологический материал, полученный от пациента, во взаимосвязи между химическими, физическими и физико-химическими его свойствами.

В зависимости от свойств исследуемой системы физико-химические методы подразделяются следующим образом:

1. Оптические.
2. Электрохимические.
3. Хроматографические.
4. Кинетические и др.

В работе биохимических лабораторий чаще используются оптические методы анализа:

- 1) Рефрактометрия;
- 2) Поляриметрия;
- 3) фотометрия:
 - абсорбционная (спектрофотометрия, нефелометрия, атомно-абсорбционная фотометрия);
 - эмиссионная (флюориметрия, пламенная фотометрия, атомно-эмиссионный спектральный анализ).

Оптический количественный анализ основан на регистрации изменений, происходящих с лучом света при прохождении его через исследуемый раствор: интенсивности поглощения (абсорбционная фотометрия), свечения молекул и атомов вещества (флюориметрия, пламенная фотометрия), величины отклонения монохроматического светового потока от первоначального направления его распространения (рефрактометрия), изменения угла вращения плоскополяризованного света (поляриметрия).

В работе биохимических лабораторий используются следующие виды оптических измерительных приборов:

1. Фотометры и спектрофотометры.
2. Денситометры (сканирование разделенных на носителях фракций анализируемых веществ – белков, ЛП и др.).
3. Нефелометры и турбидиметры (определение содержания взвешенных в объеме жидкости частиц по интенсивности светорассеяния).
4. Флюориметры (определение концентрации сложных органических веществ (гормоны, витамины и др.) путем измерения интенсивности флюоресценции).
5. Пламенные фотометры (измерение светоизлучения внесенных в пламя ионов металла).

6. Люминометры (измерение количества излученного света).
7. Атомные абсорбциометры (измерение монохроматического светового потока атомами вещества, находящегося в раскаленном газе).

Помимо оптических методов анализа, в современных клиничко-диагностических лабораториях достаточно широко используются методы фракционирования компонентов биологических жидкостей и тканей (хроматография и электрофорез), а также иммунологические исследования (иммуноферментный, радиоиммунологический и иммунофлюоресцентный анализы). По количеству вещества, взятого для анализа, различают макро-, полумикро-, микро- и ультрамикрометоды.

В макрометодах масса пробы составляет обычно > 100 мг, объём раствора > 10 мл; в ультрамикрометодах $1-10^{-1}$ мг и $10^{-3}-10^{-6}$ мл соответственно.

Лабораторная посуда: виды лабораторной посуды, выбор оптимального материала в зависимости от поставленной задачи биохимического эксперимента, способы подготовки лабораторной посуды для биохимического анализа

Цели биохимических и молекулярно-биологических исследований сложны и разнообразны. Исследование химических реакций, происходящих в живых организмах и описывающих наиболее фундаментальные явления жизни, идентификация молекул, играющих роль в биохимических процессах, определение их структуры, функций и взаимодействий, исследование молекулярного фона метаболизма, потоков энергии и информации внутри организмов – все это является одной из общих целей биохимиков и молекулярных биологов.

В соответствии с этим многообразием задач для эффективного ответа на научные вопросы требуется большое количество оборудования, инструментов и методов. В этой и следующих статьях рассматриваются наиболее распространенные виды лабораторного оборудования и расходных материалов, которые применяются практически в каждой лаборатории.

Образцы тканей или клеток живого организма, различные клеточные культуры, выращенные в лабораторном инкубаторе в контролируемых условиях, гомогенаты или экстракты клеток и тканей, растворы изолированных и очищенных компонентов (например, белки, нуклеиновые кислоты) – все это можно назвать биологическими образцами. Поскольку среда жизни представляет собой воду, большинство биологических образцов можно определить как водные растворы с одним или несколькими компонентами, коллоидными системами или суспензиями на водной основе (например, бактериальные клетки, диспергированные в жидкой среде). Следовательно, большинство биохимических экспериментов также происходит в водных средах.

Для биохимических исследований также часто необходимы различные твердые вещества (например, синтетические олигонуклеотиды или пептиды). В большинстве случаев твердые вещества растворяют в воде (или иногда в других растворителях) до проведения экспериментов. Газы в лаборатории могут храниться в газовых баллонах (например, кислород), в сосудах Дьюара в жидком состоянии или растворяться в воде. Работая с газами, очень важно соблюдать все указания по технике безопасности, чтобы избежать пожаров, взрывов, обморожения или (в случае ингаляции) асфиксии или отравления.

Лабораторная посуда, изготовленная из пластика, широко используется для хранения жидкостей в различных условиях. Контейнеры, колбы и пробирки могут иметь завинчивающиеся и защелкивающиеся крышки. Кроме того, пластиковые контейнеры идеальны, потому что они сохраняют гибкость в широком диапазоне температур, в то время как стекло может быть более чувствительным к изменениям температуры и легко ломаться. Для хранения жидкостей, вероятно, самым важным критерием является воздухонепроницаемость сосудов. Воздухонепроницаемый колпачок может защитить образец от испарения растворителя. Он также защищает от пыли, бактерий, спор плесени или других примесей, находящихся в окружающей среде; блокирует растворение различных газов в образце. Растворенные газы могут вступать в реакцию и модифицировать биомолекулы непосредственно или косвенно (например, углекислый газ образует

углекислоту в воде, которая диссоциирует и снижает рН раствора, тем самым влияя на состояние протонирования и растворимость белков). У пластмасс есть и другие преимущества, одно из которых – инертность по отношению к большинству химических веществ, используемых в химических экспериментах. Однако иногда может потребоваться использование органических растворителей. В таких случаях перед экспериментом необходимо проверить совместимость данного растворителя с пластиковыми сосудами. Образцы жидкости объемом до 50 мл могут храниться в так называемых фальконах (центрифужные пробирки типа фалькон). Они изготавливаются с различными номинальными объемами (самыми распространенными являются 15 и 50 мл) и снабжены резьбовыми крышками. Коническое дно пробирки удобно в тех случаях, когда в ней остается небольшое количество жидкости: все капли могут быть легко собраны путем центрифугирования. Фальконы размещают в специальных штативах, но сегодня практически все производители также выпускают пробирки с юбкой устойчивости. Это удобно, однако свободно стоящие пробирки легко опрокидываются. Большинство фальконов изготавливается с градуировкой для быстрой оценки объема образца. Однако для более точных объемных измерений требуются другие лабораторные инструменты (например, мерные цилиндры). Во всех лабораториях важно однозначно помечать пробирки с образцом – для этого на фальконах имеется поле для записей (муаровая поверхность). Классические пробирки и более узкие пробирки Вассермана обычно изготавливаются из стекла и поставляются без колпачков. Они имеют U-образное основание и в основном используются для приготовления реакционных смесей, сбора фракций при хроматографическом разделении различных компонентов – т. е. не для длительного хранения. Основным преимуществом стекла является его высокая устойчивость к большинству химических веществ и растворителей, используемых в типичных биохимических экспериментах (за исключением концентрированных сильных оснований), а также к нагреву до относительно высоких температур. Если требуется длительное хранение образца, горлышко пробирки можно герметично закрыть кусочком парафильма.

Парафильм – это тонкий слой парафина, снабженный бумажной основой. Он пластичный, гибкий и прочный.

Открытие пробирки (или другой лабораторной посуды) можно закрыть, используя кусок парафильма соответствующего размера. Парафильм часто используется также для обеспечения дополнительной герметизации и тогда, когда емкость имеет крышку, для более эффективной защиты образца. Для образцов небольшого объема (от нескольких микролитров до нескольких миллилитров) используются пробирки эппендорфа (или микроцентрифужные пробирки типа «эппендорф»). Они доступны в разных номинальных объемах (например, 0.5, 1.5 мл, 2 мл и 5 мл). Наиболее распространенный объем – 1.5 мл.

Эппендорфы имеют коническую форму и всегда размещаются в специальных штативах. У всех таких пробирок есть защелкивающаяся пластиковая крышка. Соединение между защелкой и пробиркой является достаточно гибким, что позволяет открывать и закрывать ее много раз. Верхняя часть крышки и часть боковой поверхности обычно имеют область для записей и для удобной маркировки образцов.

Классификация по назначению и использованию:

1. **Мерная посуда.** Такая лабораторная посуда применяется преимущественно тогда, когда существует необходимость точного отделения объемов жидкостей и растворов. Распространенные виды: колбы с градуированными шкалами, мензурки, цилиндрические колбы, пипетки, бюретки и др.
2. **Немерная лабораторная посуда или посуда общего назначения.** Такая лабораторная посуда характеризуется обширным спектром применения. Она используется для нагревания веществ, их охлаждения, а также перемешивания и проведения всевозможных химических реакций. Наиболее распространенные виды: пробирки, стаканы, воронки, колбы, кристаллизаторы.
3. **Специальная лабораторная посуда.** Такой вид лабораторной посуды, как специальная, служит одной конкретной цели в зависимости от типа. Выделяются: дистилляторы, чаши Петри, капельницы, холодильники, дефлегматоры, тигли и т. п.

Для соблюдения точности поставленного эксперимента следует освоить технику лабораторных работ, правила обращения с посудой и приборами, правила безопасности при работе в химических лабораториях.

Особенно большое значение для лабораторных исследований имеет чистота химической посуды: без выполнения этого условия нельзя быть уверенным в точности результата.

При мытье посуды необходимо помнить о правилах безопасности в лаборатории, соблюдать большую осторожность при работе с концентрированными растворами щелочей, кислот, окислителей. В зависимости от степени загрязнения лабораторную посуду моют водой, паром, органическими растворителями (диэтиловый эфир, этанол, ацетон, бензин, четыреххлористый углерод и др.), хромовой смесью, другими моющими средствами.

Стеклянная посуда считается чистой, если при ополаскивании водой на стенках не образуется капель и вода стекает тонкой равномерной пленкой. Если посуда не загрязнена смолой, жирами и другими не растворяющимися в воде веществами, ее моют теплой водой, а для удаления остатков твердых загрязнений используют щетки, волосяные ерши, стеклянные палочки с кусочком резиновой трубки, надетой на ее нижний конец. После мытья водопроводной водой посуду обязательно 2–3 раза ополаскивают дистиллированной водой.

Длительным, но эффективным способом является мытье паром. Паром посуду обрабатывают также после предварительного мытья другими способами. В большую колбу (емкостью 3–5 л) на дно помещают стеклянные капилляры, до половины наливают ее водой, плотно закрывают пробкой, в которую вставлены высокая трубка для вывода пара и воронка для стекания конденсата. На трубку надевают (или укрепляют над пробкой в штативе) предназначенный к мытью сосуд.

К самым эффективным моющим средствам относится хромовая смесь, содержащая два сильных окислителя: H_2SO_4 и $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Хромовая смесь, или «хромпик», – это 5%-ный по массе раствор дихромата (бихромата) калия ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) в концентрированной серной кислоте.

Для приготовления хромовой смеси в концентрированную серную кислоту плотностью $1,84 \text{ кг/м}^3$ вносят измельченный порошок дихромата калия и осторожно нагревают в фарфоровой чашке (или фарфоровом стакане) при помешивании стеклянной палочкой до растворения дихромата. На 100 мл концентрированной серной кислоты необходимо 9,2 г кристаллического $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

Хромовую смесь хранят в фарфоровой посуде с крышкой. При мытье хромовой смесью посуду (колбы, стаканы больших размеров) сначала очищают с помощью горячей воды и ерша, затем в каждый сосуд вливают небольшой объем хромовой смеси и, осторожно вращая его, полностью смачивают внутренние стенки. Затем хромовую смесь выливают обратно в ту же емкость, в которой она хранится, посуду тщательно обмывают (7–9 раз) водопроводной водой и ополаскивают три раза дистиллированной водой.

Сильно загрязненную посуду моют хромовой смесью 2–3 раза или оставляют стоять с хромовой смесью на несколько часов. Мелкую посуду целиком помещают в фарфоровый сосуд с хромовой смесью и оставляют на 20–30 мин, затем вынимают тигельными щипцами, аккуратно складывают в фарфоровую или эмалированную емкость и ставят под струю теплой воды. После полного удаления остатков хромовой смеси еще раз тщательно ополаскивают отдельно каждый предмет.

Хромовую смесь в лаборатории используют длительное время – до изменения ее цвета из темно-оранжевого в темно-зеленый. С хромовой смесью нужно обращаться очень осторожно, при мытье пипеток и трубок следует пользоваться резиновой грушей. Для большего эффекта посуду моют подогретой до $45\text{--}50 \text{ }^\circ\text{C}$ хромовой смесью. Делают это очень осторожно на горячей водяной бане, или предварительно посуду ополаскивают горячей водой. Посуду после крови, молока, жира перед обработкой хромовой смесью моют в крепкой (до 40 %) щелочи.

В целях длительного сохранения окислительных свойств хромовой смеси широко применяют такой способ: химическую посуду моют синтетическими моющими смесями (стиральными порошками), затем каждый предмет не менее 15 раз обмывают

(наливая и выливая) водопроводной водой, после чего приступают к мытью хромовой смесью. Если посуда загрязнена воском, парафином, минеральными маслами, хромовую смесь не применяют, посуду моют паром или органическими растворителями.

Смолистые вещества удаляют также 40%-ными растворами щелочей. Хорошее моющее средство (например, для бюреток) – смесь концентрированной серной кислоты и пергидроля (30%-ный раствор H_2O_2) в объемном соотношении 5:1. Она служит также для многократного использования. Пластиковую посуду для взятия проб крови и других материалов моют синтетическими моющими смесями, затем промывают до 20 раз водопроводной водой и ополаскивают 2–3 раза дистиллированной водой. Одноразовую пластиковую посуду (пробирки и др.) после снятия упаковки используют без мытья. Для аналитических исследований пластиковую посуду использовать нельзя. После мытья посуду высушивают на воздухе (на специальной доске с кольшками) или в сушильном шкафу. Многие современные методики исследований содержат сведения о подготовке посуды к данному анализу, в том числе о моющих средствах.

Реактивы: маркировка реактивов, особенности хранения реактивов для биохимического анализа, способы проверки качества и чистоты реактивов, методы дополнительной подготовки и очистки реактивов для биохимического анализа

Реактивы для проведения лабораторных исследований должны обладать достаточной степенью химической чистоты.

Степень чистоты реактивов квалифицируется следующим образом:

- чистый (ч) – содержание примесей не превышает 0,1 %;
- чистый для анализа (чда) – содержание примесей не превышает 0,07 %;
- химически чистый (хч) – содержит примесей не более 0,03 %;
- особо чистый (осч) – минимальное содержание отдельных примесей (менее 0,00001 %).

При квалификации импортных реактивов наиболее часто встречаются следующие обозначения:

- 1) analytical grade, pro anal. – препараты высокой степени чистоты, используются для аналитических работ;
- 2) research grade, reinst. – лабораторные реагенты высокого качества для исследовательских и рутинных целей, а также коммерческие препараты, отвечающие фармакопейным требованиям;
- 3) pure, rein – очищенные коммерческие препараты с содержанием основного вещества около 95 %, широко используемые в лабораториях;
- 4) puriss. – реагенты с содержанием основного вещества около 99 %, предназначенные для проведения точных работ;
- 5) pract. – коммерческие препараты с содержанием основного вещества в пределах 90–95 %, предназначенные в основном для синтеза;
- 6) tech. – технические реагенты.

Квалификация реактива указывается на заводской этикетке вместе с его названием, химической формулой и массой. Там же указывают условия хранения, соблюдение которых обеспечивает неизменность качества реагентов в течение декларированного срока. Стабильность реагентов зависит от природы веществ, чистоты и условий хранения. Устойчивость твердых веществ в целом значительно больше, чем их растворов.

Правила хранения химических реактивов:

1. Реактивы должны содержаться в хорошо закрывающейся таре – как правило, в стеклянной. Исключение составляет плавиковая кислота и ее соли, которые разрушают стекло. Их хранят в полиэтиленовых сосудах. Укупоривать емкости лучше всего навинчивающимися пластиковыми крышками, можно корковыми либо резиновыми пробками. Следует иметь в виду, что резиновые пробки разрушаются галогенами и концентрированными кислотами, поэтому непригодны для сосудов, содержащих йод, бром и другие едкие вещества. Такие сосуды закрывают притертыми стеклянными пробками. Наоборот, для хранения растворов щелочей не-

- пригодны стеклянные пробки, лучше подходят резиновые. Иногда, если реактив гигроскопичен или дано очень точное его количество, которое может измениться при хранении с пробкой, или он легко испаряется, его невозможно сохранить, пользуясь пробкой. В таком случае реактив хранят в ампулах. В них реактив можно хранить очень долгое время.
2. Необходимо соблюдать температуру хранения, указанную на этикетке. Если температура хранения реактивов не оговаривается, то они хранятся при комнатной температуре в шкафах, специально для этого предназначенных. Емкости с реактивами обычно расставляют в шкафах в определенном порядке: по классам соединений (соли, кислоты, основания), в алфавитном порядке и т. д.
 3. Реактивы, чувствительные к действию света (перекись водорода, гипосульфит и др.), хранят в склянках из оранжевого стекла или обертывают темной бумагой.
 4. Яды и легко воспламеняющиеся реактивы требуют особых условий хранения. Яды содержат в сейфе, ключ от которого находится у ответственного лица. Огнеопасные вещества размещают в местах, удаленных от открытого пламени и мест возможного искрения электроприборов.
 5. В лаборатории должен быть налажен учет движения реактивов. Обычно это учет по каталожному принципу.

Контроль качества реактивов проводится лабораторией с целью проверки их пригодности для количественного химического анализа, выполняемого по конкретным стандартизованным или аттестованным методикам. Контроль реактивов основан на применении методик, изложенных в нормативных документах на реактивы, стандартных образцов состава и аттестованных смесей. Фасовка, упаковка и маркировка контролируемого реактива должны соответствовать требованиям ГОСТ-3885. Проверка качества реактивов может быть осуществлена в результате:

- проверки качества реактива на соответствие требованиям нормативной документации, устанавливающей показатели его качества (ГОСТ, технические условия на реактив),

- оценки качества реактива по процедуре контроля точности выполнения количественного химического анализа по методике выполнения измерений, в которой используется реактив с истекшим сроком хранения.

Реактивы с относительно низкой степенью чистоты (т. ч.) при использовании в лабораторной практике обычно подвергаются предварительной очистке. Разделение и очистка веществ являются операциями, тесно связанными между собой. Они основаны на различии в физических и химических свойствах разделяемых веществ.

Методы разделения и очистки веществ по своей природе подразделяются на физические (механические) и химические. К методам механического разделения относят также декантацию (сливание жидкости с осадка), центрифугирование (разделение неоднородных систем под действием центробежной силы), фильтрование и т. д.

Химические методы очистки основаны на переходах вещества из одной фазы в другую, сопровождающихся процессами как физическими (экстракция, дистилляция, зонная очистка), так и химическими (ионный обмен, электролиз, электрофорез и др.). К этому же классу методов можно отнести и отделение одного вещества от другого с помощью одного или ряда последующих химических превращений.

Для очистки твердых веществ в качестве наиболее простых и одновременно достаточно универсальных методов можно рекомендовать перекристаллизацию, реже – возгонку; для жидкостей – фильтрование и перегонку; для газов – связывание примесей при пропускании загрязненного газа через некоторые химические реагенты. Выбор метода очистки в каждом случае определяется природой вещества, задачами работы и возможностями лаборатории.

Дозирование жидкостей, возможные источники погрешностей

Отмеривание растворов является одной из наиболее часто выполняемых лабораторных процедур. При этом от точности дозирования существенно зависят результаты исследования.

В современных лабораториях для отмеривания растворов широко применяют разнообразные дозирующие устройства – дозаторы (пипетки), дилютеры и диспенсеры.

Дилютеры – дозирующие устройства с одновременным разбавлением дозируемых жидкостей. Диспенсеры – устройства, обеспечивающие многократную выдачу доз при однократном взятии дозируемого раствора.

Дозирующие устройства можно подразделить на несколько групп.

1. По способу забора и выдачи доз их подразделяют на пипеточные, клапанные и перистальтические дозаторы.

Пипеточные – это бесклапанные дозаторы, где взятие и выдача пробы осуществляются через один и тот же наконечник дозатора. Забор дозирующей жидкости осуществляется в съемную насадку – наконечник, что обеспечивает высокую чистоту при выполнении операции дозирования, практически исключает загрязнение последующей пробы предыдущей. Перемещение дозируемой жидкости в насадке осуществляется путем передачи через воздушный тракт разрежения или давления воздуха, создаваемого в поршневой или плунжерной паре пипетки. Многие пипеточные дозаторы имеют устройства для сброса наконечников. Для повышения точности дозирования в конструкции корпуса некоторых пипеток предусмотрены теплоизолирующие кожухи, уменьшающие влияние температуры руки оператора на воздушный тракт дозатора. Пипеточные дозаторы нашли самое массовое применение в лабораторной практике. Они наиболее часто используются в следующих режимах: прямое дозирование, обратное дозирование, многократное дозирование и режим разведения.

Прямое дозирование – наиболее распространенный режим дозирования, при котором весь забранный объем жидкости сбрасывается за один полный ход поршня. Этот режим в большей степени подходит для дозирования водных растворов. Обратное дозирование используется для дозирования очень малых объемов, а также при работе с вязкими и пенящимися жидкостями. При этом в наконечник набирается несколько больший, по сравнению с дозируемым, объем жидкости.

Остающийся в наконечнике некоторый объем жидкости нивелирует погрешность, связанную с образованием пены или мениска. Клапанный дозатор имеет входной канал, куда поступает дозируемая жидкость, и выходной канал, через который выдается доза. Перистальтические дозаторы применяются чаще всего в качестве дозатора-насоса подачи проб и реагентов в проточных анализаторах, как составная часть последних.

2. По способу установки дозы дозирующие устройства подразделяют на дозаторы с фиксированным объемом дозы и дозаторы с регулируемым переменными объемами дозы.
3. По количеству каналов дозирования дозаторы разделяются на одноканальные и многоканальные. Одноканальные дозаторы не привязаны к форме носителя проб и реакционной смеси, в связи с чем они универсальны. Многоканальные дозаторы ориентированы на специальные носители, т. к. имеют фиксированное количество каналов с определенным расстоянием между наконечниками. Они наиболее удобны при работе с микропланшетами и стрипами.
4. По способу управления дозирующие устройства можно разделить на дозаторы с ручным приводом, автоматическим приводом и автоматическим приводом с микропроцессорным управлением – электронные дозаторы, среди которых наибольшее распространение получили электронные пипетки.

Следует помнить, что дозаторы относятся к измерительным устройствам и, следовательно, должны подлежать метрологической проверке.

Основные источники ошибок при дозировании:

1. Техническое состояние дозатора (необходимо поддерживать дозаторы в работоспособном состоянии, проводя регулярное профилактическое обслуживание и калибровку; чистота оборудования – залог правильного результата).
2. Состояние наконечника (наконечник должен всегда полностью плотно прилегать к посадочному конусу дозатора, качество наконечников зависит от формы, размера и материала).

3. Условия окружающей среды (получать воспроизводимые и точные результаты, предотвращая повышение температуры вытесняющего жидкость воздуха – т. е., чем меньше разница в температурах дозатора, наконечника и дозируемой жидкости, тем более точным будет результат. Испарение жидкости можно предотвратить путём повышения влажности воздуха: чем ниже влажность воздуха, тем выше испарение жидкости. При калибровке дозатора необходимо учитывать атмосферное давление для расчёта Z-фактора. Чем ближе исследователь находится к уровню моря, тем ниже влияние атмосферного давления. Но чем выше он над уровнем моря, тем больше становится влияние атмосферного давления на результаты дозирования).
4. Навыки и опыт оператора (аккуратность работы оператора, точность дозирования, синдром лучезапястного канала повышает риск возникновения ошибок при дозировании).
5. Техники дозирования (подбор оптимальной техники в зависимости от свойств жидкости, защита от контаминации, предварительное промывание наконечника, угол наклона дозатора).

Особенности приготовления растворов в аналитической биохимии: принципы приготовления, способы выражения, концентраций, растворимости

В лабораторной диагностике применяются в основном растворы реагентов, приготовленные на дистиллированной воде. Для получения дистиллированной воды используют специальные приборы – аквадистилляторы. В ряде случаев используют бидистиллированную воду, т. е. перегнанную дважды, а также деионизированную воду. Для получения воды с заданными свойствами удобно использование специальных коммерческих систем. Для некоторых анализов требуется вода, не содержащая CO_2 (в частности, для рН-метрии). В этом случае бидистиллят кипятят в течение 5–10 минут, охлаждают без доступа воздуха и используют в течение нескольких часов. Приготовление раствора включает взвешивание необходимого количества реактива с последующим растворением в растворителе (чаще в воде). Количество растворителя отмеривается с по-

мощью специальной мерной посуды – цилиндров, мерных колб, а при малых количествах – автоматическими пипетками. Количественный состав раствора определяется его концентрацией. Концентрацию можно выразить как количество или массу (вес) вещества, содержащееся в определенном объеме жидкости. В лаборатории наиболее широко используют «процентные» и «молярные» растворы. Процентным принято называть раствор, в 100 мл которого содержится определенное количество грамм вещества. Например, 5 %-ный раствор хлористого натрия подразумевает, что в 100 мл раствора содержится 5 г NaCl.

Если раствор приготавливают из вещества с известной молекулярной массой, то для расчета концентрации используют единицу количества вещества (моль). Такие растворы называют «молярные» (молярность – число молей растворенного вещества, содержащихся в 1 л раствора). В ряде случаев возникает потребность в получении приблизительных растворов путем разбавления более концентрированных. Для этого удобно пользоваться способом, именуемым «правилом креста».

В случае, когда расходные материалы для исследований готовятся на основании двух растворов реактивов, обычно указывают, какое количество частей одного раствора (А) необходимо смешать с определенным количеством частей другого раствора (В). Такой подход, в частности, используют при приготовлении буферных растворов. Возможно также обозначать соотношение частей в растворе знаком «двоеточие» (:). Так, запись «спирт:эфир = 1 : 2» означает, что данная смесь получена путем смешивания одного объема спирта и двух объемов эфира. Мерой объема при этом может быть любая величина в зависимости от требуемого количества расходного материала (например, мл, л, т. д.).

Буферные растворы для использования в биохимическом анализе

Для приготовления многих растворов в качестве растворителя используются буферные растворы – водные растворы, сохраняющие определенную концентрацию ионов H^+ (рН) при добавлении небольших количеств сильных кислот и щелочей.

Буферные растворы представляют собой растворы слабой кислоты и ее соли, или слабого основания и его соли, взятых в определенном соотношении. Буферные растворы также можно составлять из смеси солей многоосновной кислоты, константы диссоциации которой сильно отличаются друг от друга, например, из смеси одно- и двузамещенных фосфатов.

Буферная емкость – число молей сильной кислоты или сильного основания, добавление которого к буферному раствору изменяет его рН на единицу. Фактически это характеристика способности раствора противостоять прибавлению кислоты или щелочи. Буферная емкость тем больше, чем концентрированнее раствор. Для приготовления буферных растворов необходимо использовать перекристаллизованные реактивы квалификации «хч» и бидистиллированную воду; значение рН – контролировать потенциометрически. Буферные растворы используются в тех случаях, когда анализ проводится при определенном значении рН, в частности, при определении активности ферментов.

**Проведение ряда биохимических анализов
в специальных условиях: работа с реагентами,
чувствительными к влаге, кислороду воздуха и свету**

Многие органические реагенты, промежуточные соединения и растворители легко взаимодействуют с водой, кислородом воздуха или углекислым газом. Это часто требует проведения исследований и реакций в абсолютно безводных условиях и без доступа кислорода воздуха. Растворители для таких процессов подвергают специальной дополнительной очистке, называемой абсолютированием.

**Барьерные методы (фильтрация, диализ, осмос
на мембранах) в аналитической биохимии**

Разделение, очистка и концентрирование в биохимическом анализе позволяют изолировать исследуемое вещество, удалить мешающее вещество. Данные методы основаны на различных свойствах веществ: полярность, ионизация, размер частиц, форма вещества. Фильтрованием называется отделение от жидкости находящихся в ней частиц при помощи фильтрующей перегородки. Жидкость, отделяемая при фильтровании, называется фильтратом. Существуют различные фильтрующие материалы,

различные способы фильтрования. В биохимических лабораториях наиболее часто используется фильтрование через бумажные фильтры. Такой вид фильтрования называют поверхностным. Частицы остаются на поверхности фильтра, если размеры превышают размер диаметра пор. Фильтровальная бумага, в отличие от обычной бумаги, более чиста по составу и волокниста, что и обуславливает ее фильтрующую способность. Фильтровальная бумага бывает обычная и беззольная. Фильтры, приготовленные из беззольной бумаги, при сжигании дают очень незначительное количество золы (оно указывается на фабричной этикетке на каждой пачке). Беззольную бумагу употребляют при точных аналитических работах, связанных со сжиганием осадка вместе с фильтром. Плотность фильтра обозначают определенным цветом бумажной ленты, которой оклеивают упаковку.

Приняты следующие обозначения:

1. Розовая или черная лента – быстро фильтрующая бумага. Предназначена для отделения студенистых осадков, например, гидроокисей металлов.
2. Белая лента – бумага средней проницаемости. Используется в лабораториях наиболее широко.
3. Синяя лента – плотные фильтры. Применяются для фильтрования мелкозернистых осадков. Фильтрование идет очень медленно.
4. Желтая лента – обезжиренные фильтры. Применяются при исследованиях липидов.

Обычно в методике, по которой проводится то или иное количественное определение, указано, какой плотности фильтр надо выбрать. В качестве фильтрующего материала могут быть использованы многослойные материалы – хлопок, стекловолоконно и другие. При этом частицы задерживаются как на поверхности, так и в глубине фильтра, поэтому такой вид фильтрования называют «глубоким». Обычное фильтрование происходит под влиянием силы тяжести. При этом скорость фильтрации, как правило, небольшая, и существенно зависит от характера фильтрующего материала, размера пор, размера частиц в растворе. Для фильтрования при комнатной температуре и атмосферном

давлении применяют стеклянные воронки. Воронку располагают так, чтобы ее носик немного входил в емкость для фильтрата и прикасался к его стенке. При этом конец трубки должен быть на достаточной высоте от дна емкости, чтобы при наполнении емкости фильтратом трубка воронки не была погружена в жидкость. В воронку вставляют фильтр такого размера, чтобы его края были ниже краев воронки на 0,5–1 см. Затем смачивают фильтр водой, прижимают пальцем плотно к стеклу и начинают фильтрование. Если жидкость проходит свободно через фильтр, надо лить раствор непрерывно. Если жидкость проходит через фильтр медленно, новую порцию доливают, когда большая часть жидкости пройдет через фильтр. Для увеличения скорости фильтрования можно использовать фильтрование под вакуумом. При этом к действию силы тяжести добавляется сила всасывания. Для вакуумной фильтрации применяют специальные фильтры с повышенной плотностью. В простейшем виде фильтрование под вакуумом можно реализовать с помощью водоструйного насоса, к которому присоединяют колбу Бунзена.

Одним из вариантов фильтрования является так называемая ультра-фильтрация. Она осуществляется через фильтры с чрезвычайно узкими порами, через которые проходят молекулы небольшого размера, но задерживаются крупные молекулы (например, белки). Использование таких фильтров помогает повысить концентрацию макромолекул (например, концентрацию белков в биологическом материале). В настоящее время широкое применение получают фильтры с заданным размером пор, изготовленные из полимерных материалов – целлюлозы, поливинилхлорида, полиамида, нейлона и др. Их называют мембранные фильтры. Выбор материала и размера пор зависит от цели применения фильтра. Наиболее широко используют фильтры с размером пор 0,45 и 0,2 для предстерилизации и стерилизации сред для культивирования и реактивов. Мембранные фильтры с размером пор, соизмеримым с размерами клеток (5–8 μm) могут использоваться для сепарации клеток.

Диализ – отделение низкомолекулярных примесей или изменение солевого состава среды за счёт низкомолекулярного растворителя и полупроницаемой мембраны.

Метод основан на том, что молекулы белка из-за своих размеров не могут проходить через полупроницаемые мембраны, в то время как низкомолекулярные вещества равномерно распределяются между объемом, ограниченным мембраной и окружающим раствором. После многократной замены внешнего раствора состав среды в диализном мешочке (концентрация солей, величина рН и др.) будет тот же, что и в окружающем растворе. Диализ используется для широкого спектра применений: обессоливание, буферный обмен, удаление меченых реагентов, исследования связывания лекарств, рост и кормление клеток, очистка вирусов и обработка крови.

Обратный осмос – процесс мембранного разделения, в котором осуществляется преимущественное проникновение через полупроницаемую мембрану растворителя и некоторых низкомолекулярных компонентов под действием давления, превышающего осмотическое давление раствора. Обратный осмос используют для выделения из раствора микромолекул и ионов, размеры которых имеют тот же порядок, что и молекулы растворителя. Обратным осмосом могут быть сконцентрированы частицы размером более $5 \cdot 10^{-4}$ мкм и вещества с молекулярной массой до 500 дальтон, к которым относятся гидратированные неорганические ионы, моно- и дисахара, соли, аминокислоты, антибиотики и т. п. При обратноосмотическом концентрировании растворов в концентратах может быть сохранено соотношение между растворенными компонентами. Рабочее давление в процессе обратного осмоса может достигать 10 МПа.

Наночистка – процесс мембранного разделения с применением промышленных ультрафильтрационных мембран, поверхностный слой которых химически модифицирован. Благодаря этому они обладают высокой селективностью по отношению к низкомолекулярным электролитам, сохранив, к тому же, высокую удельную производительность при относительно низких (до 1,5 МПа) рабочих давлениях, что выгодно отличает наночистку от традиционного обратного осмоса. Поэтому наночистку также называют низконапорным обратным осмосом.

Общие принципы осаждения веществ из растворов, особенности осаждения биомолекул, условия осаждения, препятствующие нарушению пространственной структуры биологических макромолекул. Высушивание осадков. Методы концентрирования растворов: ультрафильтрация, упаривание на роторном испарителе, распылительная сушка, лиофилизация, концентрирование диализом, осадительное концентрирование

Концентрирование – это операция, в результате которой повышается отношение концентрации или количества микрокомпонентов к концентрации или количеству макрокомпонентов. Концентрирование используют в том случае, когда предел обнаружения реакции не позволяет с необходимой точностью обнаружить искомый компонент. Различают абсолютное концентрирование – перевод микрокомпонента в меньший объём растворителя, и относительное концентрирование – отделение микрокомпонента от макрокомпонентов таким образом, что отношение концентрации микрокомпонента к концентрации макрокомпонентов повышается. Примером абсолютного концентрирования служит упаривание раствора при анализе природных и сточных вод.

Главная цель относительного концентрирования – замена матрицы (основного компонента), по тем или иным причинам затрудняющего анализ, на другую (органическую или неорганическую). Например, при определении тяжёлых металлов в растениях образцы растений сжигают, а оставшуюся золу растворяют в минеральных кислотах и проводят анализ. Количественно оценить эффективность концентрирования можно с помощью коэффициента концентрирования (9):

$$S_K = \frac{q_K}{Q_K} \cdot \frac{Q_{np}}{q_{np}}, \quad (9)$$

где q_K, q_{np} – количество микрокомпонента в концентрате и в пробе;

Q_K, Q_{np} – количество макрокомпонента в концентрате и в пробе.

Методы разделения и концентрирования основаны на использовании различий в свойствах компонентов анализируемой системы, таких как растворимость, температура кипения, скорость движения частиц в электрическом поле, сорбция и т. д.

Наиболее распространёнными методами разделения и концентрирования являются:

- 1) испарение (упаривание, выпаривание, перегонка, сублимация). Упаривание – испарение основы, при котором часть её остаётся после завершения процесса. Выпаривание – полное отделение растворителя в процессе испарения. Перегонка – разделение летучих жидких компонентов на основе разности в температурах кипения. Сублимация – перевод твердого компонента в парообразное состояние, минуя жидкое состояние;
- 2) озоление – метод, при котором исходный материал путём термической обработки на воздухе превращается в минеральный остаток – золу. Метод применяется, если определяемые компоненты распределены в большой массе сгораемой (органической) основы. При сухом озолении анализируемый образец помещают в термостойкий тигель, медленно нагревают, не допуская бурного удаления продуктов сгорания. После выгорания органической массы осторожно прокаливают при 500 °С до постоянной массы, охлаждают в эксикаторе до комнатной температуры перед каждым взвешиванием. При мокром озолении навеску анализируемого вещества смачивают небольшим количеством концентрированной серной кислоты, медленно нагревают для удаления летучих продуктов и растворителя, после чего остаток прокаливают до постоянной массы;
- 3) кристаллизация – метод, применяемый для концентрирования примесных веществ (например, зонная плавка или направленная кристаллизация);
- 4) экстракция – метод, основанный на использовании различной растворимости извлекаемого компонента в двух контактирующих несмешивающихся фазах. Обычно для выделения неорганического компонента из водной фазы добавляют органический реагент – экстрагент, который

- образует с выделяемым компонентом прочное соединение. Затем добавляют небольшое количество органического растворителя и хорошо перемешивают смесь. Соединение извлекаемого компонента с органическим реагентом – экстракт – переходит в органическую фазу. После отстаивания фазы разделяют в делительной воронке;
- 5) сорбция – эти методы основаны на различной способности компонентов поглощаться веществами – поглотителями. Различают абсорбцию – поглощение всем объёмом жидкой фазы – абсорбента, и адсорбция – удерживание компонентов на поверхности твердого пористого вещества – адсорбента. Разновидность адсорбции – хемосорбция основана на химической реакции, которая происходит на поверхности адсорбента. В качестве абсорбентов часто используют воду, водные растворы кислот, щелочей, аммиака, извести, реже – органические растворители. В качестве адсорбентов широко используют активированный уголь, кремнезём, силикагель, алюмогель и др.;
 - 6) электрохимические методы, например, электрофорез, основаны на использовании различий в скоростях движения заряженных частиц растворённого вещества во внешнем электрическом поле. К электрохимическим методам относятся и электролиз, при котором выделяемое вещество концентрируется на одном из электродов;
 - 7) хроматографические методы – совокупность различных методов, основанных на различии во взаимодействии разделяемых компонентов с подвижной и неподвижной фазами. В качестве подвижной фазы используют газ или легколетучую жидкость. Неподвижная фаза – это твердое пористое вещество или вязкая нелетучая жидкость. Неподвижная фаза наносится на стеклянную или полимерную пластинку либо помещается в тонкую стеклянную или металлическую трубку. Смесь, которую надо разделить, вместе с подвижной фазой перемещается через неподвижную фазу. Те компоненты, которые меньше взаимодействуют с неподвижной фазой, перемещаются быстрее. Если компоненты хорошо взаимодействуют с неподвижной фазой, они пере-

мещаются медленно. По агрегатному состоянию подвижной и неподвижной фаз различают газовую и жидкостную хроматографии. По механизму взаимодействия компонентов с неподвижной фазой – распределительная, ионообменная, адсорбционная и др. По технике выполнения – колоночная и плоскостная (бумажная и тонкослойная).

- 8) осаждение и соосаждение – методы, основанные на образовании нерастворимых соединений. Соосаждение – одновременное осаждение растворимого в обычных условиях компонента с выпадающим в осадок макрокомпонентом из одного и того же раствора вследствие образования смешанных кристаллов, адсорбции, окклюзии и т. п. Осадок макрокомпонента часто называют коллектором. Например, при образовании аморфного осадка гидроксида железа вместе с ним осаждаются ионы хрома и алюминия. В качестве коллекторов применяют гидроксиды, сульфиды, фосфаты, сульфаты, галогениды металлов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Обеспечение качества лабораторных исследований. Преаналитический этап : справочное пособие / под. ред. В. В. Меньшикова. – М. : ЛАБИНФОРМ, 1999. – 316 с.
2. Камышников, В. С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика : справочник : в 2 т. / В. С. Камышников. – Минск : Интерпрессервис; Книжный дом, 2003. – 495 с. – Т. 1.
3. Основы аналитической химии : в 2 т. / ред. Ю. А. Золотов. – 4-е изд., доп. и перераб. – М. : Академия, 2010. – 384 с. – Т. 1.
4. Мушкамбаров, Н. Н. Аналитическая биохимия [Электронный ресурс] : монография : в 3 т. / Н. Н. Мушкамбаров. – 2-е изд., стер. – М. : ФЛИНТА, 2015. – 1310 с.
5. Соколовский, А. Е. Физико-химические методы анализа : тексты лекций по дисциплине «Аналитическая химия и физико-химические методы анализа» для студентов химико-технологических специальностей заочной формы обучения / А. Е. Соколовский, Е. В. Радион. – Минск : БГТУ, 2007. – 128 с.
6. Физико-химические методы анализа в биохимии : тексты лекций по спецкурсу для студентов биологического факультета / авт.-сост.: Е. В. Воробьева. – Гомель : ГГУ им. Ф. Скорины, 2005. – 133 с.

Учебное издание

Татьяна Леонидовна Лебедь
Николай Владимирович Жур

Аналитическая биохимия

Учебно-методическое пособие

Ответственный за выпуск *Ю. В. Чечун*

Редактор *Т. И. Сакович*

Подписано в печать 17.05.2023 г. Формат 60×84/16.
Бумага офсетная. Гарнитура «Таймс». Ризография.
Усл. печ. л. 4,07. Уч.-изд. л. 2,94.
Тираж 57 экз. Заказ № 75.

Отпечатано в редакционно-издательском отделе
Полесского государственного университета.
225710, г. Пинск, ул. Днепровской флотилии, 23.