

**М.Є. КУЧЕРЕНКО, Ю.Д. БАБЕНЮК,
В.М. ВОЙЦЬКИЙ**

**СУЧАСНІ МЕТОДИ БІОХІМІЧНИХ
ДОСЛІДЖЕНЬ**

**КИЇВ
ФІТОСОЦІОЦЕНТР
2001**

ББК Е0*72

К 88

М.Є. КУЧЕРЕНКО, Ю.Д. БАБЕНЮК, В.М. ВОЙЦІЦЬКИЙ СУЧАСНІ МЕТОДИ БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ: Учбовий посібник. — К.: Фітосоціоцентр, 2001. — 424 с.

В учбовому посібнику розглянуті загальні питання проведення та організації біохімічних досліджень, які включають характеристики реактивів, розчинів, лабораторних тварин, математичну обробку експериментальних досліджень. Наведені сучасні фізико–хімічні та імунологічні методи, які найчастіше використовуються в біохімічних дослідженнях. У додатках підібрані найважливіші та необхідні для практичного використання відомості про фізико–хімічні параметри розчинів, прописи буферних сумішей, номограми та ін.

Посібник розрахований на студентів, аспірантів та молодих спеціалістів, які працюють у галузі практичної біохімії.

Табл. 19; рис. 137; бібліогр. 51 назв.

Рецензенти: д.м.н., професор, член–кор. АМН України, заслужений діяч науки і техніки України **Ю.І. Губський**;
д.б.н. **С.О. Костерін**

Затверджено Міністерством освіти і науки України як навчальний посібник для студентів біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів

ISBN 966–7938–21–2

© Кучеренко М.Є., Бабенюк Ю.Д.,
Войціцький В.М., 2001

© Український фітосоціологічний центр, 2001

ЗМІСТ

Вступ	6
ЗАГАЛЬНІ ПИТАННЯ ПРОВЕДЕННЯ ТА ОРГАНІЗАЦІЇ БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	9
1. Загальні правила роботи в біохімічній лабораторії	9
2. Обладнання біохімічної лабораторії	16
3. Реактиви: класифікація, правила користування і зберігання	31
4. Дисперсійні системи. Розчини	43
4.1. Розчинність та розчинення	44
4.2. Приготування розчинів	46
4.3. Способи вираження концентрації розчинів	49
4.4. Розрахунки для приготування розчинів	51
4.5. Визначення густини розчинів	59
4.6. Кількісне визначення речовин хімічними методами	62
4.7. Концентрування розчинів макромолекул	64
5. Лабораторні тварини	68
5.1. Групи лабораторних тварин та класифікація їхніх вікових періодів	68
5.2. Принципи вибору лабораторних тварин для експерименту та поводження з ними	72
5.3. Основні правила утримання лабораторних тварин	79
6. Загальна характеристика методів вивчення обміну речовин	82
6.1. Методи вивчення обміну речовин <i>in vitro</i>	82
6.2. Методи вивчення обміну речовин <i>in vivo</i>	87
7. Організація біохімічних досліджень	91
7.1. Планування наукових досліджень	92
7.2. Правила оформлення результатів досліджень	94
7.3. Похибки в біохімічних дослідженнях	104
8. Математична обробка результатів досліджень	109
8.1. Основні поняття біометрії	109
8.2. Основні типи розподілу величин, які використовуються в біохімічних дослідженнях	117
8.3. Репрезентативність вибірок	119
8.4. Вірогідність результатів досліджень	121
8.5. Кореляційний зв'язок	126
8.6. Дисперсійний аналіз	128
8.7. Метод багатofакторного аналізу обробки результатів	

експерименту	134
8.8. Графічний метод визначення числа експонент та їх параметрів	149
ФІЗИКО–ХІМІЧНІ Й ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	153
9. Гідродинамічні методи	153
9.1. В'язкість	153
9.2. Седиментація	158
9.3. Мембранна фільтрація та діаліз	172
10. Імуноферментний аналіз	175
10.1. Методи гетерогенного імуноферментного аналізу	179
10.2. Методи гомогенного імуноферментного аналізу	183
11. Оптичні методи	186
11.1. Основні принципи оптичних методів	186
11.2. Спектрометрія у видимій і ультрафіолетовій областях світла та її використання в біохімічних дослідженнях	191
11.3. Інфрачервона спектрометрія	207
11.4. Спектрофлуориметрія	212
11.5. Оптичні методи, які базуються на явищі розсіювання світла розчинами біополімерів	225
11.6. Рефрактометричний метод аналізу	232
11.7. Поляриметричний метод аналізу	237
11.8. Спектрометрія полум'я	243
11.9. Електронний парамагнітний резонанс	245
11.10. Ядерний магнітний резонанс	247
11.11. Мас–спектрометрія	253
12. Хроматографічні методи	257
12.1. Адсорбційна хроматографія	259
12.2. Розподільна хроматографія	266
12.3. Газова хроматографія	270
12.4. Іонообмінна хроматографія	273
12.5. Гель–проникаюча (гель–фільтрація або молекулярно–ситова) хроматографія	280
12.6. Афінна хроматографія (хроматографія спорідненості)	286
13. Електрофоретичні методи	293
13.1. Фронтальний електрофорез	297
13.2. Метод зонального електрофорезу	299
13.3. Ізоелектричне фокусування	306
13.4. Ізотахофорез	308
13.5. Імуноелектрофорез	312
14. Радіоізотопні методи	317
14.1. Природа радіоактивності та основні типи радіоактивних	

перетворень	318
14.2. Принципи використання радіоізотопів у біохімічних дослідженнях	328
14.3. Методи реєстрації радіоактивності, які ґрунтуються на іонізації газів	332
14.4. Реєстрація радіоактивності сцинтиляційними детекторами в біохімічних дослідженнях	335
14.5. Авторадіографія	354
14.6. Використання радіоізотопів в імунологічних дослідженнях	361
15. Електрохімічні методи	365
15.1. Полярографія	365
15.2. Потенціометрія	370
15.3. Кондуктометрія	380
ДОДАТКИ	385
1. Міжнародна система одиниць (СІ)	385
2. Співвідношення одиниць виміру	386
3. Приставки для утворення кратних та дільних одиниць вимірів	386
4. Грецькі та латинські назви чисел	387
5. Розчинність деяких солей у воді при різних температурах	387
6. Температура кипіння води за різних тисків	388
7. Густина води за різних температур	388
8. Приготування розчинів неорганічних кислот і лугів	389
9. Формули для перерахування концентрацій розчинів	390
10. Густина та концентрація водних розчинів	391
11. Концентрація і густина концентрованих кислот	392
12. Приготування розчинів сульфату амонію різної концентрації	393
13. Розчини для створення градієнту густини	394
14. Стандартні довжини зв'язків	397
15. Номограма для обчислення кількості сульфату амонію	398
16. Номограма для визначення відцентрового прискорення ...	399
17. Номограма для кількісного визначення білка за величиною оптичної щільності	400
18. Буферні розчини	401
19. Стандартні значення критерію Ст'юдента(t)	414
20. Стандартні значення критерію Фішера	415
21. Сорбенти для афінної хроматографії	419
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА	422

ВСТУП

Біохімія — це наука, що вивчає хімічний склад живих організмів, будову, властивості, локалізацію і роль наявних у них сполук, шляхи їх виникнення і перетворення, а також притаманні живій клітині хімічні процеси, котрі в сукупності забезпечують обмін речовин і перетворення енергії.

Для вирішення поставлених перед біохімією завдань залучається низка методів із суміжних галузей знань — хімії, фізики, математики тощо. Існуюча численна учбова література, в якій описані методи, що використовуються в біохімічних дослідженнях, має ряд недоліків. По-перше, у багатьох підручниках і учбових посібниках наведені розрізнені методи, які не систематизовані або перевантажені теоретичними викладками. По-друге, в цих підручниках і посібниках бракує новітніх відомостей та методичних підходів. По-третє, вони не орієнтовані на сучасні вимоги до вивчення біохімії.

В даному виданні автори намагалися уникнути зазначених недоліків. Зроблена спроба створити учбовий посібник, в якому наведені основні уявлення про планування, підготовку, проведення експериментальних біохімічних досліджень з використанням імунологічних і фізико-хімічних методів та обробку одержаних даних. На наш погляд у посібнику логічно викладена послідовність матеріалу з чітким визначенням понять і термінів. У ньому вміщений необхідний мінімум відомостей, без знання яких наукові дослідження з біохімії неможливі.

При написанні цього учбового посібника були широко використані учбові програми та результати досліджень, проведених на кафедрі біохімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка, його матеріали були апробовані авторами — викладачами цієї кафедри.

Посібник складається з трьох частин. У першій частині вміщені матеріали із загальних питань організації біохімічних досліджень, охарактеризовані методи вивчення обміну речовин *in vivo* та *in vitro*. Докладно розглядається методологія та планування наукових досліджень. У логічній послідовності викладені основні положення щодо організації роботи в біохімічній лабораторії, описані хімічний посуд та обладнання, наведена характеристика лабораторних тварин, реактивів, які використовуються в біохімічній практиці. Значна увага приділена приготуванню розчинів, вимірюванню об'ємів, розрахункам концентрацій речовин, розглядаються основні підходи до визначення та очищення речовин. Докладно описані методи систематизації та

обробки результатів, правила оформлення останніх та визначення **похибок** досліджень, особливо увага приділена математичним розрахункам (з наведенням прикладів).

У другій частині посібника описані основні методи, які застосовуються в сучасній біохімії. Розглянуті принципи кожного методу, його теоретичні основи, загальна будова приладів та пристроїв, типові експериментальні результати і методичні підходи до обчислення їх. Розгляд починається з опису методу імуноферментного аналізу, котрий останнім часом набув значного поширення. Імунологічні підходи наведені також при описанні хроматографічних, електрофоретичних і радіоізотопних методів.

Методи виділення, розділення й очищення біологічно важливих речовин наведені в главах, присвячених фізико–хімічним методам у біохімії, зокрема хроматографічним, електрофоретичним і гідродинамічним.

В цій же частині описані методи, за допомогою яких проводиться аналіз біологічно активних речовин — визначення їхньої кількості, структури, реакційної здатності тощо. Основні з них — оптичні, радіоізотопні та електрохімічні методи.

Третя частина даного посібника складається з додатків, у яких можна знайти відомості про основні одиниці виміру об'ємів, довжини, маси, часу, фізичні та хімічні параметри розчинів, прописи буферних сумішей, розрахунки складу речовин, різні номограми, таблиці для визначення вірогідності одержаних даних за критерієм Ст'юдента і Фішера.

У списку рекомендованої літератури наведені доступні видання наукових та учбових матеріалів, у яких містяться дані, котрі допоможуть доповнити наведені в цьому посібнику відомості.

Посібник розрахований на студентів та аспірантів біологічних, хімічних, медичних, ветеринарних, зоологічних та інших спеціальностей, які вивчають біохімію. Він може бути рекомендований також спеціалістам даних галузей як довідник.

Безпретензійно слід зауважити, що це була перша спроба осягнути все, що має відношення до практичної біохімії. Автори намагались дати якомога більше свідчень, інформації про основні засоби, підходи та методи, за допомогою яких можна проводити біохімічні дослідження.

Слушним, на погляд авторів є і те, що з метою кращого засвоєння, полегшеного сприйняття та усвідомлення важливості застосування фізико–хімічних методів у біохімічних дослідженнях у деяких випадках, особливо в другій частині посібника, свідомо

спрощується викладення матеріалу, який в інших виданнях поданий занадто складно, завантажений багатьма фізичними формулами та складним поясненням фізичних явищ.

Наскільки вдалим виявився учбовий посібник, судити студентам, аспірантам та науковцям, для яких і було власне зорієнтовано як за обсягом і стилем, так і за формою текстове його викладення.

Учбовий посібник, на думку авторів, не позбавлений недоліків, але вони будуть щиро вдячні усім, хто висловить будь-які побажання та пропозиції, які не залишаться без уваги і відома, з метою якісного покращення змісту учбового посібника при його перевиданні в майбутньому.

Автори висловлюють щире подяку всім, хто сприяв виданню учбового посібника.

ЗАГАЛЬНІ ПИТАННЯ ПРОВЕДЕННЯ ТА ОРГАНІЗАЦІЇ БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

1. ЗАГАЛЬНІ ПРАВИЛА РОБОТИ В БІОХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ

Точність і достовірність біохімічних досліджень залежить, звичайно, від високоточних сучасних приладів, спеціальних реактивів з відповідним ступенем кваліфікації очищення тощо. Однак існує багато чинників, які також значною мірою можуть вплинути на результати досліджень. Це, насамперед, якість підготовки посуду, правильність і точність відмірювання об'ємів і відважування реактивів, дбайливе ставлення до приладів та вміле користування ними, правильність обробки одержаного експериментального матеріалу та ін. Треба чітко усвідомлювати, що в основі техніки лабораторних робіт лежать певні наукові принципи.

Дослідник, який працює в біохімічній лабораторії, має бути максимально уважним, акуратним і відповідальним. Будь-яке порушення основних вимог щодо проведення досліджень може призвести до викривлення результатів, для одержання яких було витрачено багато праці, часу і коштів.

Практичні роботи з біохімії проводяться в спеціалізованих лабораторіях. Залежно від характеру та об'єму роботи біохімічні лабораторії можуть мати різне обладнання, але обов'язково повинні задовольняти санітарно-гігієнічним вимогам. Стіни лабораторії мають бути облицьовані кахелем або наполовину зафарбовані олійною фарбою, а підлога — застелена лінолеумом. Лабораторія повинна мати припливно-витяжну або, на крайній випадок, витяжну вентиляцію, протипожежне обладнання (пінний та вуглекислотний вогнегасники, ящик з піском, просякнуту вогнезахисною речовиною ковдру), засоби індивідуального захисту (окуляри, гумові рукавиці, протигази або респіратори), аптечку для надання першої допомоги при різних травмах. Лабораторія повинна бути забезпечена гарячою та холодною водою, електроенергією, природним газом. У спеціально відведеному місці під витяжкою обов'язково встановлюють окремі ємкості для зливання залишків кислот, лугів, органічних рідин, а також ящики для складання використаного посуду. В лабораторії робочим місцем є хімічний стіл, який повинен бути покритий кахельною плиткою або

кислототривким пластиком

Крім основного приміщення в кожній лабораторії повинні бути допоміжні кімнати — мийна вагова апаратна і підсобна

Робота в біохімічній лабораторії пов'язана з певними небезпечними та шкідливими факторами. Вона проводиться як правило з малою кількістю хімічних речовин, що знижує небезпеку і можливість нещасних випадків, але не виключає їх повністю. Категорично забороняється в лабораторії вживати їжу, пити воду з хімічного посуду, палити, користуватися косметикою. Забороняється пробувати на смак будь-які речовини, а також використовувати їх у роботі, якщо на посуді, де вони зберігаються, немає написів.

Виконуючий роботу повинен знати правила техніки безпеки і пожежної безпеки, а також місцезнаходження аптечки з медикаментами та засобів пожежегасіння, вміти надати першу допомогу при різних травмах. Необхідно знати властивості використовуваних речовин і тих, що утворилися внаслідок реакцій, і додержуватись правил безпеки при роботі з ними. При виконанні роботи обов'язково слід дотримуватись вказівок щодо використання всіх необхідних індивідуальних засобів захисту. Особливу увагу і обережність треба проявляти при роботі зі скляними приладами та посудом. Якщо, наприклад, необхідно вставити в скляну трубку термометр або піпетку в шланг чи корок, їх попередньо змочують водою або змащують глицерином, а потім прокручують при слабкому натискуванні, руки при цьому обмотують ганчіркою.

У біохімічних дослідженнях скляний посуд є найвживанішим, хоча часто його замінюють посудом з інших матеріалів, зокрема з полімерів. Скло належить до крихких матеріалів. Основна кількість нещасних випадків при роботі зі скляним посудом кваліфікується як мікротравми і легкі травми. В першу чергу, це порізи рук та їх опіки при необережному поводженні з нагрітим до високої температури скляним посудом.

Необхідно суворо стежити за тим, щоб марка скла відповідала характеру здійснюваної роботи — нагрівання можна проводити тільки в термостійкому посуді, а роботи під вакуумом або при підвищеному тиску — тільки в спеціально для цього призначених скляних приладах. При проведенні подібних робіт не можна користуватися скляним посудом, який має навіть ледь помітні дефекти.

Пробірки з розчином слід нагрівати поступово, безперервно обертаючи їх і час від часу струшуючи. При цьому пробірки повинні знаходитися в нахиленому положенні для того, щоб бризки розчину ударялися об стінки і не вихлюпувалися назовні. Ні в якому разі не

можна нагрівати рідини в закупореному посуді який не має сполучення з атмосферою. Не можна нахилятися над посудом з рідиною що підігривається спрямовувати отвір такого посуду на себе або інших працюючих. Взагалі при нагріванні хімічного скляного посуду треба уникати різких змін температури а також нерівномірного його нагрівання в різних частинах. Крім того нагрівати скляний посуд слід тільки на азбестовій сітці або азбестовому картоні і ні в якому разі — на полумі.

Скляний посуд великих розмірів і скляні прилади переносять тільки обома руками. Великі (більше 5 л) сулії з рідиною необхідно переносити вдвох у спеціальних кошиках або ящиках з ручками. Забороняється піднімати сулії за шийку. Роботу з їдкими, отруйними або різким запахом речовинами слід проводити у витяжній шафі. Визначати запах речовин треба обережно, спрямовуючи пару до себе легким рухом долоні і не вдихаючи повітря на повні груди. Затягувати їдкі рідини в піпетку треба тільки за допомогою гумової груші або спеціальних пристроїв і ні в якому разі не робити це ротом.

Забороняється виливати в раковину залишки кислот, лугів, легкозаймистих та горючих рідин, викидати туди тверді речовини (папір, пісок, сірники тощо).

З метою безпеки, забороняється працювати одному в приміщенні лабораторії, а також залишати без нагляду працюючі лабораторні пристрої, газові пальники та ввімкнуті електроприлади.

Не дозволяється зберігати в приміщенні лабораторії вогнебезпечні речовини масою більше 1 кг кожної і 3–4 кг загальною масою.

При використанні легкозаймистих рідин (ефіри, спирти, бензин, бензол, ацетон) необхідно стежити за тим, щоб на відстані до 2 м не було відкритого вогню. Нагрівати легкозаймисті рідини слід тільки на банях, заповнених відповідними теплоносіями. Забороняється нагрівати рідинні бані на відкритому вогні (запалені пальники, сірники тощо), а також на джерелах тепла з нерегульованим тепловим потоком. Зберігати легкозаймисті рідини слід у товстостінних склянках у місцях віддалених від відкритого вогню і джерел тепла в ящиках вкладених азбестом, і з написом "Вогнебезпечні речовини". Ці реактиви повинні бути надійно закупорені.

При виникненні в приміщенні локальної пожежі вогонь слід швидко накрити протипожежною ковдрою (шматком азбестової тканини). Якщо рідина (ефір, бензин тощо), що спалахнула, розтеклась, її гасять піском, якщо ж загорілись розчинні у воді речовини (спирти, ацетон тощо), їх гасять водою. Людину на якій зайнявся одяг, швидко і

цільно закутують у протипожежну ковдру, щоб загасити полум'я. Вуглекислотними вогнегасниками необхідно користуватися обережно, щоб від різкого перепаду температури не потріскалися скляні частини приладів і скляний посуд.

У сучасних біохімічних дослідженнях використовується велика кількість електроприладів різної потужності. Необхідний рівень електробезпеки може бути досягнутий за умови проведення комплексу заходів, спрямованих на удосконалення засобів з захисту, підвищенні надійності електрообладнання, глибокого засвоєння працівниками правил безпечної роботи з електроприладами.

При роботі з електроприладами необхідно постійно перевіряти стан заземлення, надійність ізоляції, проводити своєчасно профілактику пошкоджень. Всі струмопровідні частини приладів незалежно від напруги, під якою вони перебувають, повинні бути захищені.

В лабораторії можна одночасно вмикати таку кількість приладів, сумарна потужність яких не перевищує потужності електромережі або її відгалужень.

При гасінні полум'я пінним вогнегасником необхідно вимкнути електричний струм в усіх приміщеннях за допомогою загального рубильника. До розмикання електричного ланцюга забороняється торкатися голими руками (без гумових рукавиць тощо) оголених частин тіла потерпілого.

При роботі з вакуумними пристроями, в яких використовуються водострумні або масляні насоси (вакуум-ексикатори, вакуумне фільтрування тощо) вакуумний посуд обов'язково слід загорнути в ганчірку. Очі слід захистити окулярами або маскою, котру знімають тільки після охолодження приладу і впуску в нього повітря.

Необхідно ретельно стежити за станом газопровідної системи (сполучні муфти, крани) і не допускати несправностей. Після закінчення роботи всі крани треба закривати. В разі виявлення в приміщенні запаху газу, приміщення слід негайно провітрити, утворюючи в ньому протяг. При цьому ні в якому разі не можна запалювати вогонь або вмикати (чи вимикати) електричний струм. Для пошуку місця витoku газу треба користуватись мильною піною.

У разі використання стисненого або скрапленого газу насамперед необхідно пересвідчитись, що балон і редуктор знаходяться в справному стані і що термін придатності балона не закінчився. Балони треба оберегати від поштовхів, механічних пошкоджень та нагріву. Балони вміщуються в ящики, які знаходяться поза приміщенням, а газ підводиться в лабораторію спеціальним трубопроводом.

При роботі з лужними металами, карбідом кальцію та деякими

Іншими речовинами в присутності води може статися вибух. Зважаючи на це, треба працювати в захисних окулярах або масці, користуватися тільки сухим інструментом при цілковитій відсутності води.

Дуже небезпечним є необережне поводження з кислотами та лугами. Навіть слабкі кислоти (наприклад, оцтова) при високих концентраціях здатні спричинити хімічні опіки. Потрапляння розчинів кислот або лугів в очі може призвести до ураження рогівки і втрати зору. Особливо небезпечні луги та аміак. Тому всі роботи з кислотами та лугами проводяться у витяжній шафі, надягнувши захисні окуляри та гумові рукавиці, а при переливанні кислот з великої ємкості в малу слід надягати гумовий фартух і використовувати сифон або спеціальний штатив з нахилом. Для розведення кислоти вливають тоньким струменем у воду при постійному перемішуванні і таким чином не допускається перегрів. Нейтралізацію кислот або лугів необхідно проводити тільки після розведення їх.

При подрібненні твердих лугів великі грудки загортають у щільну тканину і розбивають молотком, а маленькі — розтирають у ступці, яку закривають ганчіркою. Причому цю роботу виконують у головному уборі, оскільки випадкове потрапляння твердого лугу у волосся може залишитись поза увагою і згодом спричинити його випадання.

Деякі органічні сполуки — ароматичні (анілін), аліфатичні аміни, ароматичні вуглеводні (бензол, толуол, диоксан тощо), похідні галогенних вуглеводневих сполук (хлорбензол, чотирихлористий вуглець та ін.) — токсичні, тому з цими речовинами слід поводитися обережно, запобігати потраплянню їх на шкіру і в очі і не вдихати їхньої пари. Пара бензилхлориду і бензальдегіду, а також деякі інші речовини виявляють подразнюючу дію на слизові оболонки очей і верхніх дихальних шляхів. Етиленгліколь може всмоктуватися крізь шкіру і є особливо небезпечним при пероральному надходженні в організм.

У біохімічній лабораторії слід працювати в халаті з бавовняної тканини.

Перша допомога при травмах і отруєннях. В лабораторії опіки можуть бути спричинені вогнем, паром, гарячими або розжареними речовинами, лугами, кислотами, а також речовинами, які мають дуже низьку температуру (рідкий кисень, рідка вуглекислота, рідкий азот тощо)

При термічних опіках не дозволяється змочувати обпечене місце водою. Ні в якому разі не можна проривати утворені пухирі і перер'язувати опік бинтом. На обпечені місця накладають складений декілька разів бинт або марлю, змочені 3% розчином перманганату

калію, 5% розчином таніну, етиловим спиртом або змащені спеціальним кремом від опіків. При складніших опіках слід накладати стерильну пов'язку і звернутися до лікаря.

При потрапленні кислоти (сірчаної, соляної, азотної, фосфорної) вражене місце промивають спочатку великою кількістю проточної води, потім 3–5% розчином гідрокарбонату натрію або 10% розчином вуглекислого амонію і знову промивають водою. При опіках лугами після промивання великою кількістю води шкіру змочують 2–3% розчином оцтової кислоти або 1–2% розчином соляної кислоти і потім знову промивають водою.

При опіках порожнини рота (або очей) лугами необхідно прополоскати (промийти) великою кількістю води, а потім прополоскати (промийти) 3% розчином оцтової кислоти або 2% розчином борної кислоти. При ураженні слизової оболонки рота або очей кислотою їх обробляють 3–5% розчином гідрокарбонату натрію.

В разі потраплення кислоти в дихальні шляхи треба дихати розпиленом за допомогою пульверизатора 10% розчином гідрокарбонату натрію, а при потрапленні лугу — розпиленом 3% розчином оцтової кислоти.

Якщо на тіло потрапили органічні речовини, які нерозчинні у воді, їх змивають великою кількістю розчинника цієї речовини, а потім промивають етиловим спиртом і змащують кремом. При опіках рідким фенолом необхідно розтирати уражене місце гліцерином доти, поки не відновиться нормальний колір шкіри. Після цього шкіру промивають водою і накладають на уражене місце серветку або марлевий тампон, змочений гліцерином.

При ударах, для зменшення болю і попередження підшкірного крововиливу біля забитого місця накладають стискаючу пов'язку, а поверх неї — лід.

При ураженні тканин (пораненні), особливо при порізах битим скляним лабораторним посудом, рану, насамперед, очищають від уламків скла стерильним пінцетом або стерильною марлею, зупиняють кровотечу, очищають поверхню шкіри навколо рани від бруду і обробляють краї рани антисептиком (наприклад, розчином йоду). При раптовому виникненні кровотечі заливають рану (безпосередньо) 3% розчином пероксиду водню або водним розчином хлориду заліза (III), а потім накладають стерильну серветку або марлевий тампон (ватою в даному випадку користуватися не слід, щоб її волокна не потрапили в рану), і щільно забинтовують, після чого потерпілого відправляють в медичну установу. У разі суттєвіших уражень і сильної кровотечі, накладають стискаючу пов'язку (джгут) вище рани

для припинення кровотечі, накривають рану стерильним перев'язувальним матеріалом і викликають лікаря.

При пораненнях із одночасним ураженням кислотою або лугом ретельно очищається рана від скалок, промивають її відповідно 3% розчином оцтової кислоти або 3–5% розчином гідрокарбонату натрію, потім обробляють краї рани антисептиком і забинтовують стерильним бинтом або марлею.

При отруєннях газом потерпілого треба негайно вивести на свіже повітря, напоїти великою кількістю молока (в деяких випадках слід напоїти його кавою) і надати спокій.

При електротравмах потерпілому до прибуття лікаря, забезпечують повний спокій і надходження свіжого повітря. Потерпілий не повинен робити зайвих рухів. Якщо порушене дихання і серцева діяльність, необхідно негайно вдатись до штучного дихання та непрямого масажу серця і не припиняти ці операції до повного відновлення функцій або до прибуття медичних працівників. Штучне дихання роблять тільки в тому випадку, якщо людина дихає не ритмічно або не дихає взагалі.

2. ОБЛАДНАННЯ БІОХІМІЧНОЇ ЛАБОРАТОРІЇ

До лабораторного обладнання належать: хімічний посуд та прилади, необхідні для проведення досліджень.

При роботі в біохімічній лабораторії користуються типовим для хімічних досліджень посудом. Хімічний посуд виготовляється із спеціальних сортів скла. Як правило, це жаростійке скло, що має порівняно незначний коефіцієнт розширення і є хімічно стійким. У деяких випадках замість скляного посуду використовується посуд з плавненого кварцу. Цей посуд надзвичайно стійкий до різких змін температури і плавиться за досить високих температур (біля 1700°C). Скляний хімічний посуд, на протигагу посуду, виготовленого зі звичайного скла, стійкий до дії різних розчинів. Проте деякі розчини, особливо, гарячі, руйнують і такий посуд. Найбільш агресивними агентами є лужні розчини.

В лабораторній практиці також використовується хімічний посуд, виготовлений з фарфору, різних вогнетривких матеріалів, а також із прозорих або напівпрозорих пластиків і продуктів полімеризації (поліетилен, фторопласт, вініпласт, поліакрилат тощо). Останні характеризуються механічною міцністю, хімічною стійкістю і не піддаються дії навіть таких реагентів, як плавикова кислота.

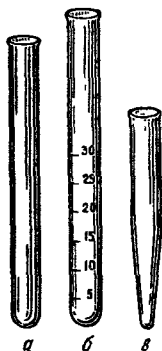


Рис. 2.1. Пробірки: а — хімічні; б — градуйовані; в — центрифужні

Пробірки являють собою запаяні з одного кінця відрізки скляної трубки різного діаметра, вони використовуються для проведення будь-яких досліджень з невеликим об'ємом рідини (рис. 2.1). Бувають також пробірки спеціального призначення: центрифужні, з притертою пробкою, градуйовані, для напівмікро- та мікроаналізу. Нині широко використовуються пробірки з пластмас (полістиролу, поліпропілену) з кришками та округлим або конусним дном, ємністю від 2 до 50 мл. Досить поширені в лабораторній практиці хімічно- і термостійкі *мікропробірки*

(мікротюбіки) з поліетилену або пропілену різного кольору, стандартизовані і кодовані за типом, ємністю та діаметром (рис. 2.2). Мікропробірки оснащені тонкими (0,3 мм) кришками, які забезпечують герметичність.

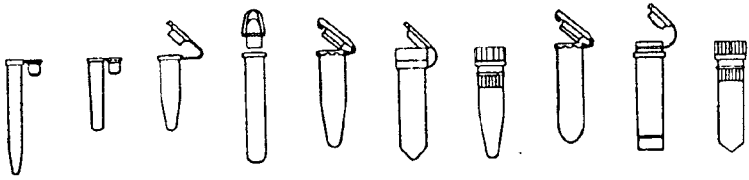


Рис. 2.2. Мікропіпетки з кришками

Для точного відмірювання об'ємів користуються *піпетками* (рис.2.3). Розрізняють піпетки звичайні та мікропіпетки — неградуйовані й градуйовані. Градуйовані піпетки мають поділки по всій довжині. Одним з різновидів піпеток є *піпетка Мора*, в котрій посередині є кулькове або циліндричне розширення з позначкою ємкості і температури, за якої проводилась калібровка піпетки. Звичайні градуйовані піпетки бувають ємкістю від 1 до 10 мл, а піпетки Мора — від 10 до 100 мл. Розрізняють піпетки кінцеві та некінцеві. В перших уся робоча ємкість разом зі звуженою кінцевою частиною піпетки відградуйована і розрахована на об'єм рідини, яку треба відміряти, а в других — звужена та прилегла до неї частина не градуйована і не входить до об'єму рідини, що відмірюється. Для відмірювання мікрокількостей рідини використовуються мікропіпетки, за допомогою яких можна відмірювати від 0,01 до 0,05 мл.

Крім скляних піпеток, є одноразові піпетки з поліетилену ємкістю від 1 до 25 мл, які мають кодуючу кольорову риску.

Для високоточного швидкісного маніпулювання широкого застосування в біохімічній практиці набули *автоматичні піпетки*. Вони являють собою пристрої з пневматичним механізмом. В таких піпетках рідина виштовхується за допомогою стиснутого повітря. Є два типи од- та багатоканальних автоматичних піпеток — механічні й елек-

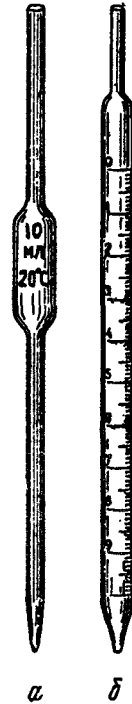


Рис. 2.3. Піпетки: а — Мора; б — градуйована

тронні, точність та відтворюваність яких досить висока (в межах від $\pm 0,5\%$ до $\pm 3\%$). Багатоканальні автопіпетки застосовуються найчастіше для імунологічних досліджень з використанням планшетів.

Як механічні, так і електронні автоматичні піпетки бувають з фіксованою (самплери) та змінною ємністю. Піпетками з фіксованим об'ємом можна відмірювати тільки певний об'єм рідини, тому для дозування кожного потрібного об'єму слід мати окрему піпетку. Автоматичні ж піпетки змінного об'єму дозволяють відмірювати рідину в широкому діапазоні об'ємів — від 5 мкл до 5000 мкл.

Механічні автопіпетки складаються з пневматичного механізму, вмонтованого в корпус, дозуючого пристрою (мікрометричного гвинта) та поздовжньої частини з прозорим поліпропіленовим наконечником. У варіанті автопіпетки зі змінним об'ємом за допомогою мікрометричного гвинта (плунжера) регулюється та фіксується певний об'єм рідини в мікролітрах, що зазначається в спеціальному віконці цифрової індикації.

В електронних автоматичних піпетках пневматичний механізм приводиться в рух за допомогою електродвигуна, яким керує мікрокомп'ютер з електроживленням. У корпусі цих піпеток вмонтований дисплей на рідких кристалах з двома реєстрами — лівим та правим. Лівий реєстр служить індикатором робочого стану піпетки і вказує на функціональні параметри програмування піпетки та кількість можливих доз, а правий — служить для програмування й індикації різних об'ємів, необхідних в різних режимах роботи піпетки.

Автоматичні дозатори — це пристрої, за допомогою яких вимірюються великі об'єми рідини. Вони бувають двох типів: ручні та стаціонарні. Ручні автодозатори складаються з резервуара (балончика), шприцевої насадки і дозатора. Дозатор являє собою поршневу пневматичну систему, яка приводиться в дію за допомогою пружинного механізму (механічні дозатори) або електродвигуном (електронні дозатори). Залежно від ємності резервуара об'єм дозованої рідини може становити від 1 мкл до 10 мл. Механічні автодозатори оснащені ручним регулятором вибору об'єму (доз) рідини для багаторазового дозування. Електронні автодозатори програмуються мікропроцесором, в якому задані параметри, а необхідна конкретна інформація фіксується на дисплеї з рідкими кристалами.

Стаціонарні автодозатори — це своєрідні насоси, здатні перекачувати рідину певними порціями з ємності з розчином реактиву в ємність з реакційною сумішшю. Безпосередньо з резервуара та за допомогою адаптора для дозування рідини використовуються так звані "флакони-диспенсери".

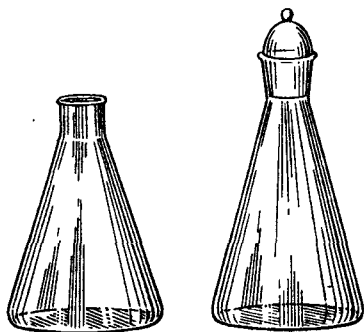


Рис. 2.4. Колби Ерленмейєра

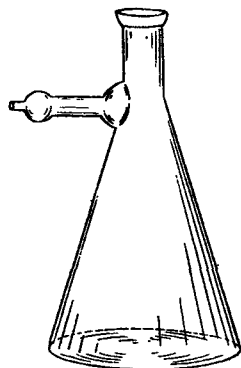


Рис. 2.5. Колба Бунзена

Колби, залежно від призначення, можуть бути різної ємкості та конфігурації: круглі (круглодонні і плоскодонні) та конічні. Є колби з однією шийкою різної ширини і довжини (з притертою пробкою або без неї), або декількома — для термометра, лійки, холодильника тощо. Конічні колби Ерленмейєра (рис. 2.4) використовуються переважно при титруванні. Товстостінні конічні колби Бунзена (рис. 2.5) призначені для роботи зі зниженим тиском, у верхній частині їх є відводка для сполучення з вакуумним пристроєм. Круглодонні тонкостінні колби Вюрца (рис. 2.6) використовуються для перегонки рідини з метою її очищення. Залежно від температури кипіння речовини, що підлягає очищенню, використовуються різні колби Вюрца з різним розташуванням у них відповідної трубки: чим нижче температура кипіння речовини, тим ближче до шийки колби має бути розташована трубка.

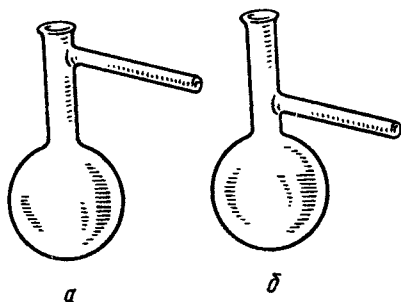


Рис. 2.6. Колби Вюрца: а — для рідини з низькою температурою кипіння; б — для рідини з високою температурою кипіння

Для виготовлення точних розчинів певної концентрації використовуються мірні колби різної ємкості — від 25 до 2000 мл; вони бувають з притертою пробкою і шліфом або без нього (рис. 2.7). На видовженій шийці мірних колб нанесена кільчаста риска, за нижнім



Рис. 2.7. Мірні колби
а — з притертою пробкою; б — без пробки

меніском рідини якої встановлюється рівень. Мірні колби бувають ємністю 25, 50, 100, 200, 250, 500, 1000 і 2000 мл.

При титруванні для відмірювання точних об'ємів розчинів та для виконання титрування використовуються градуйовані скляні трубки — бюретки, ємністю від 10 мл до 100 мл. Нижня частина бюретки звужена і сполучається з короткою гумовою трубкою, яка оснащена пружинним затискувачем Мора або скляною кулькою всередині: при натискуванні їх рідина витікає (рис. 2.8).

У випадках, коли розчин, який досліджують, може реагувати з гумовим матеріалом, користуються бюретками із звичайним скляним краном. При роботі з малим об'ємом розчинів користуються мікробюретками ємністю 1, 2 та 5 мл. Звичайними бюретками можна відмірювати об'єми з точністю до 0,03–0,05 мл, а мікробюретками — з точністю до 0,005 мл.

Лійки — це товстостінні пристрої, внутрішня розширена поверхня яких утворює кут в 60°, та вузькими короткими або довгими трубками на кінці. Як правило, внутрішня поверхня лійки гладенька, але бувають лійки із ребристими стінками (рис. 2.9). Лійки служать для пересипання в посуд порошкоподібних речовин, переливання та фільтрування рідини. З аналітичною метою (зокрема, для розділення двох або декількох рідин, що не змішуються та мають різну густину), а також

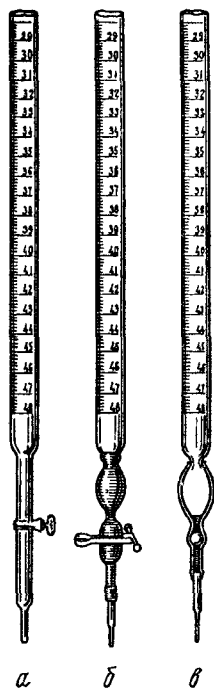


Рис. 2.8. Бюретки: а — з краном; б — із затискувачем Мора; в — зі скляною кулькою

для екстрагування речовин рідинами, використовуються ділильні лійки різної форми (рис. 2.10). Із застосуванням вакууму рідини фільтрують за допомогою фарфорових лійок Бюхнера, в яких у місці переходу розширеної частини у вузьку вплавлена дрібнопориста керамічна платівка. Для подачі невеликих кількостей розчинів у реакційне середовище користуються крапельними лійками. Цей тип лійок відрізняється від ділильних довжиною і зрізаним кінцем відводної трубки.

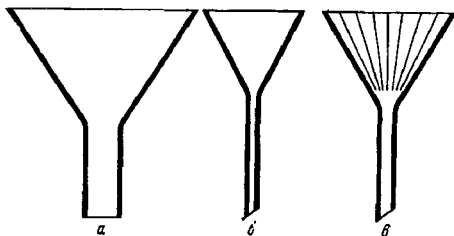


Рис. 2.9 Лійки хімічні: а — з короткою трубкою для пересипання порошкоподібних речовин; б — з довгою трубкою, в — з ребристими стінками (для прискорення процесу фільтрування)

Крапельниці — це переважно кулясті скляні балончики ємкістю від 25 до 50 мл з невеликим звуженим відростком у верхній частині (рис. 2.11). Як правило, крапельниці служать для зберігання і використання індикаторів та реактивів, які витрачаються в малих кількостях.

Для створення в будь-якій ємкості вакууму за допомогою водяного струменя, застосовуються *водяні вакуум-насоси* (рис. 2.12). Подібний насос прилаштовується до водопровідного крана; за його допомогою створюється розрідження, яке тим більше, чим нижча температура води у водопровідній мережі. Для утворення повітряного струменя невисокого тиску використовується *нагнітальний водоструминний насос*.

Водяні холодильники — це прилади, які складаються зі скляної трубки або охолоджуючого пристрою іншої форми та муфти, сполученої з трубкою, на протилежних кінцях якої є два відводки — один для впуску, а другий для випуску води (рис. 2.13).

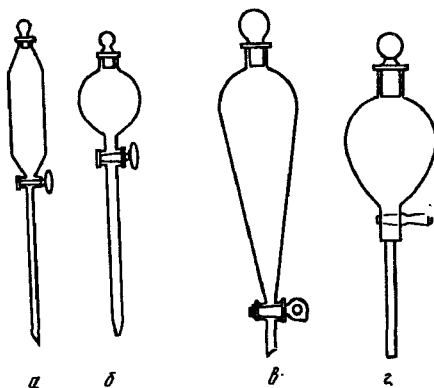


Рис. 2.10. Ділильні лійки: а — циліндрична; б — куляста, в, г — грушоподібні

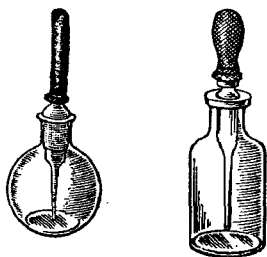


Рис. 2.11. Крапельниці

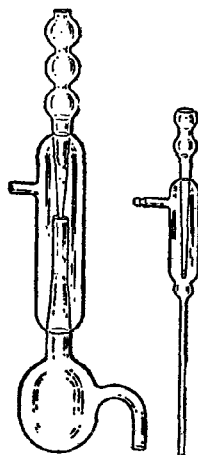
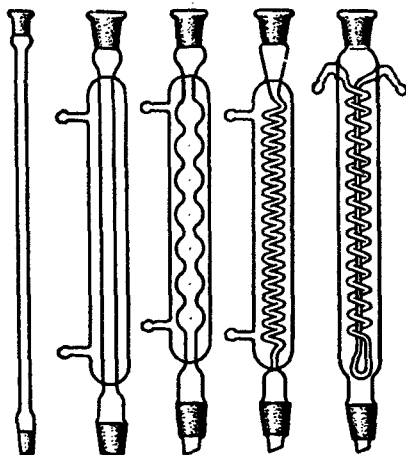


Рис. 2.12. Водоструминні насоси



а б в г д

Рис. 2.13. Холодильники: а — повітряний; б — Лібіха; в — кульковий; г — спіралевидний; д — зворотний з охолоджуючою спіраллю

Холодильники використовуються для охолодження та конденсації пари, яка утворюється під час кипіння або нагрівання рідини.

Для роботи з різними кількостями рідини (від 5 до 2000 мл) використовуються *циліндри*, *мензурки*, *хімічні склянки* (скляні та фарфорові) (рис. 2.14).

Для подрібнення твердих речовин застосовуються мідні, чавунні, агатові, фарфорові *ступки з товкачиком* (рис. 2.15). Слід, однак, пам'ятати, що речовини у фарфорових ступках можна тільки розтирати, а в мідних та чавунних — ще й товкти.

В тих випадках, коли розчини, які досліджуються, необхідно нагрівати і випарювати, використовують стійкий до дії високих температур посуд — *фарфорові кухлі*;

тиглі та човники (рис. 2.16). У куклях розчини випаровують, а в тиглях і човниках прокалюють та спалюють тверді речовини (озолюють органічні речовини й проводять неорганічний синтез тощо).

У біохімічних дослідженнях для відмірювання маси застосовуються *терези*. Терези — це прилади, за допомогою яких порівнюється маса будь-якої речовини (тіла) з масою еталона, яким є важки. Залежно від характеру здійснюваних робіт використовуються терези різної конструкції та з різним ступенем точності. Для точного зважування (з точністю $\pm 0,01$ г) застосовуються *технохімічні* терези (рис. 2.17), до яких додається набір важків від 0,01 г до 100 г. При максимальному зважуванні допустима похибка становить 0,1–0,3%. У біохімічній практиці часто виникає потреба в підвищеній точності зважування (до $\pm 0,0001$ г). В цьому випадку застосовуються *аналітичні терези* різної конструкції. Такі терези бувають періодичного коливання та

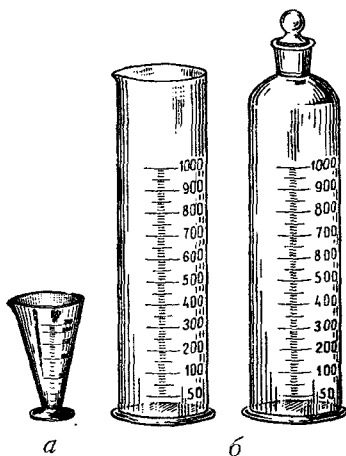


Рис. 2.14. Мірний посуд: а — мензурка конічна; б — циліндри

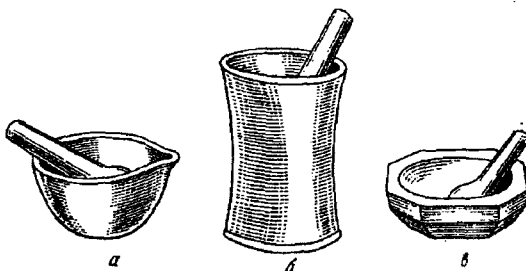


Рис. 2.15. Ступки: а — фарфорова; б — мідна; в — агатова



а



б

Рис. 2.16. Фарфорові тиглі (а) та куклі (б)

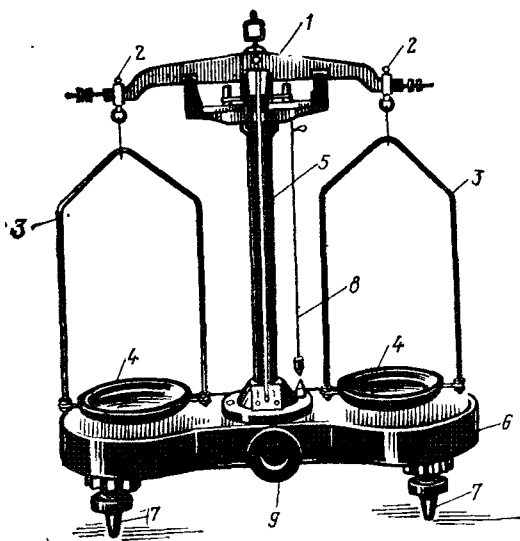


Рис. 2.17 Технохімічні терези 1 — коромисло; 2 — серги з призмами; 3 — підвіски; 4 — чашки; 5 — стрілка; 6 — підставка, 7 — регулюючі ніжки, 8 — висок, 9 — аретир

аперіодичного коливання або демпферні. Аналітичні терези мають тверді призми, котрі є опорами коливання коромисла і підвішених на ньому чашок. Спеціальний пристрій — аретир (запор) — дозволяє роз'єднувати призми й опори в неробоче положення терезів. Конструктивно деякі аналітичні терези обладнані демпферами (глушниками), які здатні швидко зменшувати розмах коливань коромисла (рис. 2.18). Стрілка демпферних терезів зв'язана з оптичним пристроєм (вайтографом), який дозволяє рахувати на шкалі, що світиться.

міліграми та десяті частки міліграмів. При зважуванні важки масою від 0,01 до 0,5 г навішують на спеціальну планку (рейтер) коромисла, а важки масою більше 1 г ставлять на чашку терезів.

Аналітичні терези встановлюють на столах з віброгасниками, на спеціальних підставках для терезів, або на кронштейнах, вмонтованих в стінку приміщення. Не дозволяється ставити аналітичні терези поблизу нагрівних пристроїв, працюючих апаратів, агрегатів, що спричиняють вібрацію стін або підлоги.

Широке застосування в практиці мають також *торсійні терези* (рис. 2.19). Це циферблатні терези, в яких під масою речовин, що зважуються, відповідно деформується спіральна пружина. На торсійних терезах можна зважувати речовини масою до 500 мг.

Для спеціальних визначень застосовуються *електронні аналітичні терези*, які забезпечують широкий діапазон можливостей зважування та високий ступінь точності останнього (рис. 2.20). Багатофункціональність сучасних електронних автоматичних терезів обумовлена технологією комп'ютерного програмування. За конструктив-

ними особливостями і призначенням електронні терези поділяються на три типи: мікротерези (з точністю до 0,1 мкг), аналітичні (з точністю до 0,1 мг), та прецизійні терези (з точністю до 1 мг). Незалежно від конструктивних та функціональних особливостей всі електронні терези складаються з двох головних систем — мікропроцесорної та системи зважування. Комп'ютерне програмування електронних терезів забезпечує: кероване за темпера-

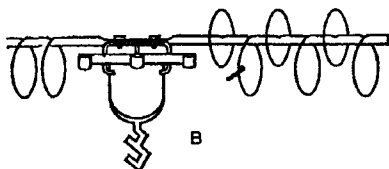
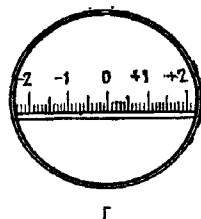
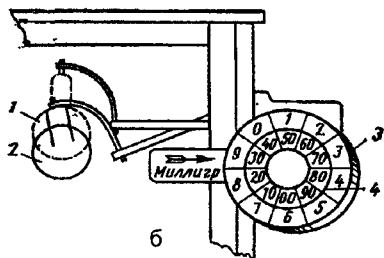
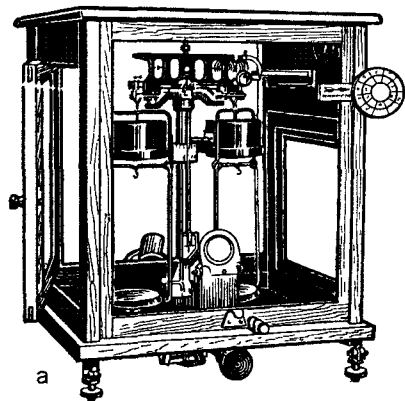


Рис.2.18. Аналітичні демпферні терези: а — загальний вигляд; б — механізм для навантаження кільцевих міліграмових важків; в — права серга з металічною планкою (рейтер); г — мікрошкала на екрані вайтографа

турою автоматичне внутрішнє калібрування та калібрування зовнішніми важелями в необхідному діапазоні зважування; можливість зважування як в абсолютних значеннях, так і у відсоткових від еталонного важеля; зважування в каратах та в двох різних системах одиниць; універсальний інтерфейс, що гарантує підключення до будь-якого зовнішнього пристрою; динамічне зважування; мож-

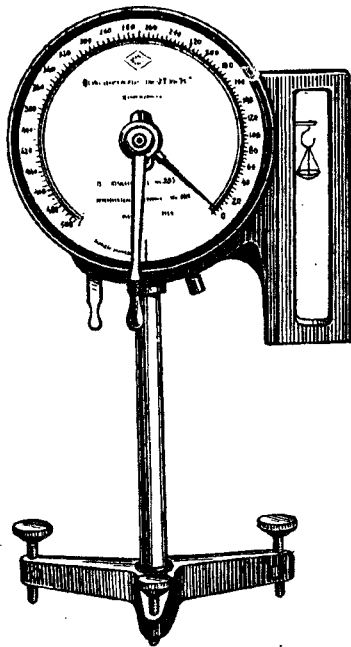
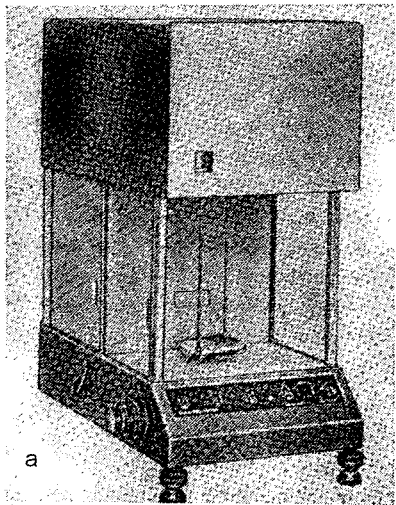


Рис. 2.19. Торсійні терези

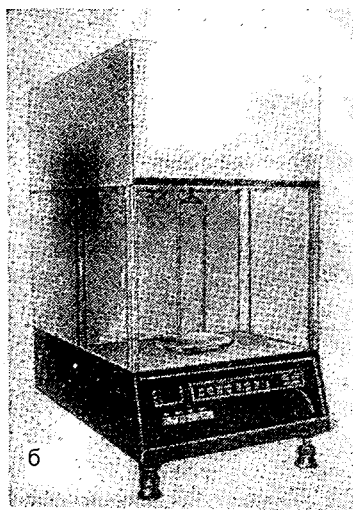
лівість зчитування штрихового коду тощо.

Для будь-якого нагрівання в біохімічній лабораторії використовують: 1) електронагрівальні прилади — електроплитки (із закритою або відкритою спіраллю, водяні, повітряні (розігрів до 100°C), піщані та масляні (розігрів до $180^{\circ}\text{--}270^{\circ}\text{C}$) бані, муфельні і тигельні печі (розігрів до $800^{\circ}\text{--}1200^{\circ}\text{C}$), лійки для гарячого фільтрування, колбонагрівачі, сушильні шафи тощо; 2) газові прилади — пальники Бунзена, Теклу, газові плити (настільні та побутові); 3) рідинні нагрівальні прилади — спиртові, газові (керосинові) тощо.

Хімічні термометри — це прилади, за допомогою яких вимірюється температура. Для досліджень найчастіше використовують дилатометричні та маномет-



а



б

Рис. 2.20. Електронні аналітичні терези: а — механічні; б — автоматичні.

ричні термометри. Дилатометричні термометри складаються зі скляної трубки з капіляром всередині і резервуара, заповненого різними рідинами. Сам капіляр розташований на поверхні фарфорової пластинки з відкаліброваною (в градусах) шкалою. Ртутним термометром можна вимірювати температуру від -30° до $+360^{\circ}$ С. Для вимірювання низьких температур робочими рідинами можуть бути спирт (до -65° С), толуол (до -90° С), пентан (до -180° С). Манометричні термометри за принципом дії поділяються на газові, рідинні та парові, які складаються з манометра, капілярної трубки і термометричного балона, в якому знаходиться будь-який робочий розчин (ртуть, спирт, ксилол, водно-гліцерінова суміш тощо). Манометричні термометри використовуються для вимірювання тиску, який змінюється зі зміною температури в замкнутому просторі.

Електричними термометрами вимірюють температуру різних приладів (термостати, печі) та реакційних сумішей. Залежно від мети і характеру досліджень використовуються різні види електротермометрів: термістори (провідники), термохімічні, термометри опору, оптичні, термоелектричні термометри (термопари), радіаційні пірометри тощо. Для автоматичного контролю температури застосовуються терморегулятори і контактні термометри.

З метою збереження сталої температури в невеликому об'ємі в біохімічній практиці застосовуються *термостати* (стала температура позитивна) та *кріостати* (стала температура від'ємна). Для одержання низьких температур застосовуються також різного складу охолоджуючі суміші та твердий оксид вуглецю (CO_2) і рідкий азот, які використовуються в спеціальних пристроях (посудина Д'юара) з подвійними стінками, між якими тиск мінімальний (за рахунок відкачаного повітря).

Калібрування посуду. З різних причин показники вимірювального посуду можуть не відповідати справжній місткості. При виконанні точних препаративних та аналітичних робіт увесь вимірювальний посуд необхідно калібрувати. Для цього бюретки, піпетки, мірні колби ємністю від 10 до 100 мл зважують на технічних терезах, а при менших ємностях — на аналітичних. Калібрування проводиться шляхом визначення маси дистильованої води, якою заповнюється відповідний об'єм або яка вилита з цього об'єму. Всі виміри об'ємів та зважування проводять при температурі 20° С, котра вважається стандартною. Слід пам'ятати, що помилка при вимірюванні на 1° С спричиняється до помилки у визначенні місткості мірного посуду приблизно на 0,02%.

Однак унаслідок неминучих похибок при калібруванні місткість

будь-якого вимірювального посуду навіть за нормальної температури неточно відповідає вказаній на ньому ємності, а дещо відхиляється від неї в той чи інший бік. Щоб уникнути цього треба враховувати такі поправки:

1. *На температурний коефіцієнт розширення води.* Ємкість посуду шляхом зважування в ньому води, визначають при температурі останньої $+3,98^{\circ}\text{C}$ (вода за такої температури має найбільшу густину). При калібруванні посуду користуються водою, яка має іншу температуру. Отже, якщо ємкість вимірювального посуду становить 1 л при температурі, відмінній від $+3,98^{\circ}\text{C}$, треба брати масу води меншу за 1000 г ($1000-1000\rho$, де ρ — густина води за даної температури). Наприклад, при 20°C маса 1л води дорівнює 998,23 г, а не 1000 г;

2. *На температурний коефіцієнт розширення скла.* При калібруванні посуду за температури, відмінної від $+3,98^{\circ}\text{C}$, розширюється не тільки вода, але й скло, внаслідок чого ємкість посуду збільшується. Подібна поправка розраховуються за формулою:

$$V(t_2-t_1) \cdot 0,000026,$$

де: V — ємкість посуду,

(t_2-t_1) — різниця температур,

0,000026 — коефіцієнт розширення скла.

3. *На зважування в повітрі.* Об'єм, який займає вода, що зважується, значно перевищує об'єм важків. Відповідно до закону Архімеда важки втрачають у своїй масі менше, ніж вода. Так, маса 1 л води буде менше дійсної (1000 г) на 1,21 г.

Для калібрування *мірної колби*, спочатку її зважують разом з пробкою, а потім — з дистильованою водою. Воду зливають і наливають до поділки нову порцію води, яку знову зважують. Перевірку повторюють 3 — 4 рази, визначають масу води і за її густиною при температурі вимірювання обчислюють об'єм колби.

Піпетку калібрують таким чином: піпетку наповнюють дистильованою водою до риски, потім воду зливають у попередньо зважений бюкс із кришкою і знову зважують його з точністю до 0,001 г. Визначення повторюють 3 — 4 рази, знаходять середню масу води і за її густиною при даній температурі вираховують об'єм піпетки.

Калібрування *бюретки* починають з перевірки повної її місткості, а потім відбирають по декілька разів по 1 — 5 мл води (залежно від потрібної точності), визначаючи щораз місткість бюретки за середнім від двох-трьох визначень і складають таблицю поправок.

У практичній роботі слід мати на увазі, що при одній і тій же аб-

солютній похибці відносна похибка буде тим більшою чим менша величина, яка вимірюється. До цього слід додати, що малі об'єми не слід відмірювати великим вимірювальним посудом.

Миття скляного посуду. Вибір способу миття посуду залежить у кожному конкретному випадку від того, якими речовинами забруднений посуд. Якщо посуд забруднений різними розчиненими у воді речовинами, його спочатку змочують водою, за допомогою щітки або йоржа з м'якою щетиною очищують зі стінок наліт, а потім відмивають гарячою водою або пропарюють посуд парою. Доцільно також застосувати деякі миючі засоби — синтетичні миючі порошки, мильні розчини, 10% розчин фосфату натрію або соди.

Якщо посуд забруднений органічними речовинами його обробляють різними органічними розчинниками — спиртами, ацетоном, діетиловим ефіром, хлороформом, тетрахлоридом вуглецю тощо. Миття органічними розчинниками, а також первісне ополіскування посуду, забрудненого легко леткими, шкідливими та смердючими речовинами, слід проводити у витяжній шафі або у відповідних приміщеннях, обладнаних витяжкою і віддалік від нагрівальних приладів. Використані при митті органічні розчинники зливають у спеціально відведений для цього посуд.

Промитий таким чином посуд потім обробляють водою, а потім якійми—небудь окислювачами. В біохімічних лабораторіях найвживанішою є *хромова суміш*, яка складається з концентрованої сірчаної кислоти та дихромату натрію (калію). Ця суміш є найкращим миючим засобом тому, що хромовокислі солі в кислому середовищі виявляють значні окислювальні властивості. Після змочування хромовою сумішшю (20–30 хв) посуд миють теплою водопровідною водою, а потім декілька разів ополіскують дистильованою водою. Після багаторазового використання колір хромової суміші змінюється з темно-оранжевого на темно-зелений. Такий миючий засіб вже не є ефективним через втрату окислювальних властивостей, тому використовувати його не слід. Хромову суміш не можна використовувати, якщо посуд забруднений мінеральними маслами, воском, парафіном, керосином тощо.

Не менш ефективними миючими засобами, ніж хромово суміш, є підкислений сірчаною кислотою 5% розчин перманганату калію, суміш рівних об'ємів 6н розчину HCl та 5% розчину пероксиду водню, суміш концентрованої азотної кислоти та дихромату калію.

Чистим вважається скляний посуд, на стінках якого не утворюються окремі краплини і вода залишає рівномірну тонку плівку. Вимитий посуд висушують, ставлять догори дном на сушильній дошці або

в сушильній шафі.

Чистота хімічного посуду залежить також від забруднення мікроорганізмами, що у свою чергу позначається на об'єктивності результатів біохімічних досліджень. Обробка, в результаті якої мікроорганізми повністю знищуються, називається *стерилізацією*. Для стерилізації посуду застосовується теплова стерилізація, при якій використовується сухий жар (за рахунок нагрівання в печі в атмосфері повітря) або вологий жар (за допомогою пари). Сухий жар використовується переважно для стерилізації скляного посуду та інших термостійких твердих матеріалів, а вологий — в основному для стерилізації водних розчинів у спеціальних апаратах — автоклавах.

3. РЕАКТИВИ: КЛАСИФІКАЦІЯ, ПРАВИЛА КОРИСТУВАННЯ І ЗБЕРІГАННЯ.

Реактиви — це високоочищені хімічні речовини, які використовуються для проведення хімічних реакцій.

Якість реактивів визначається ступенем їх чистоти, яка повинна відповідати певним вимогам. Незалежно від способу очищення всі реактиви мають певну частку домішок. Використання того чи іншого реактиву із відповідним ступенем чистоти залежить від мети та характеру експеримента. За вмістом домішок хімічні реактиви поділяють на кілька категорій (табл. 3.1).

Таблиця 3.1.

Кваліфікація реактиву	Символ	Вміст домішок, %
Технічний*	т	від 0,5
Чистий	ч	до 0,1
Чистий для аналізу	ч.д.а.	до 0,07
Хімічно чистий	х.ч.	до 0,03
Надчисті:		до 0,01
особливо чистий	о.с.ч.	
спектрально чистий	сп.ч.	
еталонної чистоти	р.с.ч.	

*Для біохімічної практики непридатні, але іноді використовуються для допоміжних робіт (наприклад, для миття хімічного посуду тощо)

Дослідник, який працює з певними реактивами, повинен добре знати їхні хімічні властивості, правила користування і зберігання та шкідливість для здоров'я.

Основна вимога до будь-якого реактиву — його чистота, тому слід захищати їх від забруднення. В лабораторію реактиви надходять здебільшого в скляних банках та бутелях із зазначенням назви (хімічної формули) реактиву, його кваліфікації, маси, часу випуску, заводу-виробника.

У повсякденній роботі при первісному розпаковуванні банки з реактивами слід насамперед старанно очистити кришку (корок) ззовні від бруду і парафіну (якщо вона ним залита), а потім обтерти кришку чистою ганчіркою. Суворо забороняється набирати реактив руками; для цього треба користуватися шпательями, лопатками, фарфоровими ложками тощо. При постійній роботі з реактивами паперова етикетка швидко псується. Тому бажано робити стійкі до агресивних агентів етикетки (наприклад, парафінувати паперову етикетку або закрити її прозорою універсальною клейкою стрічкою). На склі можна робити на-

писи восковим олівцем (склогграфом) або олійними фарбами.

Якщо реактив рідкий, відливати слід тільки потрібну кількість його. Невикористаний надлишок виливати назад не дозволяється. Після відливання реактиву шийку склянки старанно витирають фільтрувальним папером і закривають тією самою кришкою. Реактиви з різким запахом слід переливати під тягою. При відливанні рідкого реактиву з бутеля великого об'єму треба користуватися піпеткою або сифоном.

У випадку, коли необхідно використати реактив з ампули, спочатку на її вузькому кінці роблять надріз напилком, а потім обгортають руки ганчіркою і відламують кінець ампули, одночасно розтягуючи її, щоб не поранити руки склом.

Забороняється визначати реактиви за запахом безпосередньо з отвору, куштувати їх на смак.

- На робочому місці слід тримати тільки ті реактиви і розчини, які потрібні для виконання роботи в даний час. Усі інші реактиви повинні зберігатися в столах, шафах або спеціальному приміщенні. Розміщувати реактиви слід таким чином: серед неорганічних речовин спочатку прості речовини (метали і неметали), потім — оксиди, основи, солі. Кислоти зберігаються окремо. Органічні речовини розкладають за алфавітом. Для зручності користування і швидкого знаходження посуд з реактивами номерують та заносять до картотеки.

Для реактивів з особливими властивостями необхідно забезпечити спеціальні умови зберігання. Так, вогнебезпечні речовини треба розміщувати в металевих ящиках з азбестовою прокладкою подалі від відкритого вогню. Реактиви, які легко поглинають вологу з повітря, гігроскопічні або легко випаровуються, зберігають в ампулах. Реактиви, що досить чутливі до дії світла (бромід срібла, пероксид водню тощо), зберігають в емкостях з темного скла або обгортають темним папером і вміщують у непроникну для світла тару. Речовини, які утворюють отруйну пару, а також речовини, що мають різкий неприємний запах, треба зберігати у витяжній шафі. Отруйні речовини зберігають у вогнетривкій шафі. Реактиви, які швидко псуються при кімнатній температурі, слід зберігати в холодильниках, призначених для зберігання реактивів тільки при оптимальній для них температурі.

Необхідно попереджувати утворення вибухонебезпечних або займистих сумішей з тих чи інших речовин. Тому забороняється зберігати в одному місці або поруч перманганат калію, пероксид водню, концентровану хлорну кислоту та інші окислювачі з такими речовинами, як крохмаль, фосфор, сірка, вугілля тощо, для яких характерні відновлювальні властивості.

Забороняється залишати реактиви в тарі відкритими, не захищеними від потрапляння в них пилу, вологи. Всі реактиви мають бути щільно закриті пробками (скляними притертими або гумовими). Підбираючи пробки для тари, необхідно враховувати властивості реактиву, бо деякі речовини здатні вступати в реакцію з матеріалом пробки. Наприклад, під дією кислот, галогенів (бром, йод) гумові пробки втрачають еластичність, стають крихкими, а під дією деяких органічних речовин (ефір, бензол, ацетон, спирт) — дуже набрякають. Такі реактиви потрібно закупорювати скляними притертими пробками.

Луги та їхні розчини, навпаки, не можна закупорювати притертими пробками, бо при відливанні реактиву внутрішня поверхня шийки посуду змочується лугом і потім під впливом вуглекислого газу між шийкою і пробкою утворюються карбонати, які заклинюють пробку. Щоб уникнути цього, посуд з лугами та їхніми розчинами треба закривати гумовою пробкою, в яку вставляють хлоркальцієву трубку з твердим натронним (гашеним) вапном для поглинання вуглекислого газу.

Методи очищення реактивів. Зміна властивостей хімічних реактивів залежить від вмісту в них домішок. Якщо в лабораторії немає реактиву потрібного ступеню чистоти (кваліфікації), то вдаються до різних способів очищення. Вибір останнього визначається перш за все агрегатним станом основної речовини та домішок, їхньою хімічною природою і концентрацією.

Існує багато методів та прийомів очищення реактивів; це зокрема. фільтрація, ректифікація та дистиляція (перегонка), електроліз, сорбція, перекристалізація тощо.

При наявності в рідині часток твердої речовини, які необхідно відокремити, застосовується *фільтрація*. Вона базується на пропусканні суміші рідини з твердою фазою через пористий фільтр. Ступінь очищення та швидкість фільтрації залежать від розмірів пор фільтру та способу фільтрування. Фільтрують рідину при нормальному тиску, зменшеному (під вакуумом) або підвищеному, при нагріванні або охолодженні.

Як матеріали для фільтрів використовують пористі або волокнисті неорганічні й органічні речовини, кварцевий пісок, керамічні, неглазуровані фарфорові фільтри, скляне волокно (вата), різні текстильні матеріали, синтетичні волокна та тканини з них, фільтрувальний папір.

Найпоширенішим матеріалом, який використовується для фільтрування, є *фільтрувальний папір*. Від звичайного паперу він відрізняється чистотою складу, однорідністю та волокнистістю, що і обумовлює його фільтруючу здатність. Фільтрувальний папір буває звичай-

ний і беззолний. В паперових беззолних фільтрах маса золи становить не більше 0,01 мг і вони використовуються в аналітичних дослідженнях, які супроводжуються спалюванням осаду разом з фільтром.

Залежно від мети та характеру осадів у біохімічній практиці застосовуються паперові фільтри з різним ступенем щільності. Умовно їх позначають певним кольором паперової смужки, нанесеної на упаковку:

— синя смужка — щільні фільтри, які використовуються для відділення дрібнозернистих осадів;

— біла смужка — фільтри із середньою щільністю, які використовуються для відокремлення більшості осадів;

— чорна або рожева смужка — найменш щільні швидко фільтруючі фільтри, які використовуються для фільтрування драглистих осадів;

— жовта смужка — знежирені фільтри, які використовуються при роботі з ліпідами.

Для фільтрування концентрованих розчинів кислот та лугів застосовується скляне волокно, іноді — скляні фільтруючі лійки з пористою пластинкою (рис. 3.1).

Для відфільтрування великої кількості твердої речовини від рідини та для прискорення процесу проводять *фільтрування під вакуумом* (відсмоктування). Для цього використовуються колби Бунзена, лійки Бюхнера, спеціальні ексикатори та вакуумний насос (водяний або масляний) (рис. 3.2).

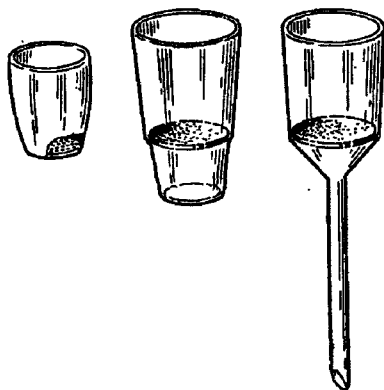


Рис. 3.1. Фільтруючі лійки

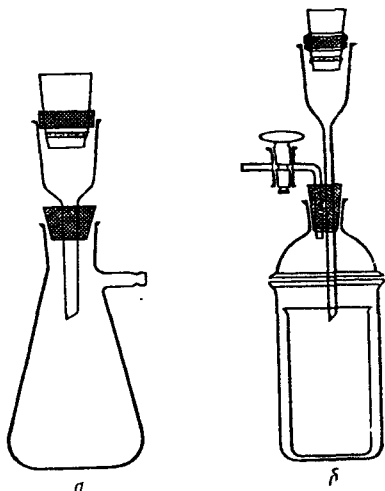


Рис. 3.2. Прилади для фільтрування під вакуумом: а — з колбою Бунзена; б — з ексикатором

При перекристалізації твердих речовин чи при фільтрації рідин, які мають високу в'язкість, застосовуються спеціальні *лійки* з *нагрівом* для гарячого фільтрування (рис. 3.3). Лійки з обігрівом мають різну конструкцію; в одних певна температура підтримується електричною спіраллю, впаяною в товщу фільтруючої пластинки, в інших — двостінна будова лійки дозволяє крізь її порожнину пропускати воду або іншу рідину із заданою температурою.

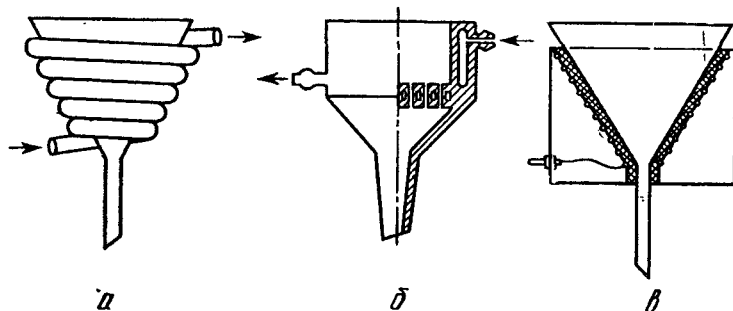


Рис. 3.3. Лійки для гарячого фільтрування: а — з паром; б — з гарячою водою; в — з електричним обігрівом

Очищення методом перекристалізації. Методом перекристалізації користуються, коли треба очистити тверді органічні та неорганічні речовини. *Перекристалізація* — це процес, при якому тверду речовину спочатку розчиняють при нагріванні в певному розчиннику і відфільтровують від нерозчинних домішок, а потім при охолодженні з неї викристалізовується речовина, яка очищається. При цьому розчинні в даному розчиннику домішки залишаються в розчині. У випадку, коли розчинність речовини в наявних розчинниках незначна навіть при нагріванні, для попередження кристалізації на фільтрі використовують лійки для гарячого фільтрування з водяним або електричним обігрівом.

При перекристалізації розчинником можуть бути вода, спирт, бензол тощо. Відбір того чи іншого розчинника, як правило, здійснюється експериментальним шляхом, але при цьому бажано, щоб температура плавлення основної речовини (яка очищається) була вища за температуру кипіння розчинника приблизно на 10°C . Крім того, розчинник повинен характеризуватись такими властивостями:

- бути хімічно інертним відносно основної речовини як при температурі кипіння розчину, так і при кімнатній температурі;
- добре розчиняти основну речовину при нагріванні до кипіння і погано — при кімнатній температурі;
- добре розчиняти домішки навіть при зниженій температурі, або

практично не розчиняти їх при кипінні;

— при охолодженні розчинена речовина повинна виділятися у вигляді добре сформованих кристалів;

— легко виводитися з поверхні кристалів при промиванні або вишуванні.

Якщо розчин непрозорий або треба позбутися забарвлених домішок, очищення проводять у присутності адсорбентів. Для цього розчин нагрівають до кипіння протягом декількох хвилин з активованим вугіллям до знебарвлення, після чого вугілля відфільтровують, і процес кристалізації продовжується.

Якщо до суміші входять дві або декілька речовин у порівняльних кількостях, їх розділяють шляхом систематичного та послідовного виділення невеликих фракцій кристалів. Одним із способів такої *роздільнової кристалізації* є поступове збільшення ступеня насиченості розчину, внаслідок чого випадають окремі фракції кристалів. Цього досягають поступово відгонкою розчинника чи поступовим охолодженням, або послідовним додаванням порцій осаджувача.

Багато органічних речовин, у тому числі й біомолекули, легко розчиняються у воді, але не розчиняються в концентрованих розчинах неорганічних солей. На цій властивості базуються *методи висолювання*. Для висолювання застосовуються хлорид натрію, сульфат магнію, сульфат амонію тощо.

У біохімічних дослідженнях метод висолювання досить часто використовується для фракціонування білкових сумішей. Різні білки здатні випадати в осад при різних концентраціях солей в розчині, тому при поступовому підвищенні концентрації солі одержують окремі фракції білків, котрі різняться між собою за структурою, властивостями та біологічною активністю. При цьому суттєве значення має підбір солі, величина рН і температура. Іноді метод висолювання застосовується при кристалізації, якщо потрібно домогтися більшої її ефективності, а також якщо розчинність речовини незначно змінюється зі зміною температури. При цьому до розчину основної речовини додається реактив, здатний знижувати розчинність і сприяти кристалізації цієї речовини. Наприклад, при перекристалізації хлориду натрію додається соляна кислота.

Для очищення деяких органічних та неорганічних твердих речовин користуються методом узгону. *Узгін* (сублімація) — це процес переходу речовини з кристалічного стану безпосередньо в газоподібний, минаючи рідку фазу. Узгін відбувається при більш низькій температурі, ніж температура плавлення сублімованої речовини. Сублімація і наступна кристалізація застосовуються для очищення

йоду, деяких солей амонію, нафталіну тощо від домішок.

Очищення методом перегонки (дистиляції). Це один з найуживаніших і найважливіших методів очищення рідини й відокремлення органічних речовин. Суть перегонки полягає в переведенні шляхом нагрівання рідини в пароподібний стан і конденсації останнього в рідину. При цьому всі леткі домішки з вищою температурою кипіння залишаються, а домішки з нижчою температурою кипіння відганяються раніше основної рідини. Перегонку рідини застосовують для відокремлення її від нелетких речовин або для розділення речовин з дуже великою різницею в температурі кипіння, (наприклад, дистиляція природної води, перегонка розчинника тощо).

Прилад для перегонки складається з колби Вюрца, алонжа, плоскодонного приймача, термометра і холодильника, в якому пара рідини, що конденсується, в трубці і вода в кожусі рухаються в протилежних напрямках (рис. 3.4). При перегонці речовин з температурою кипіння $120^{\circ}\text{--}160^{\circ}\text{C}$ охолодження проводиться непроточною водою або в холодильнику Лібіха без води. Перегонку речовин, температура кипіння яких вище 160°C , проводять з повітряним холодильником. Для попередження небажаного інтенсивного кипіння рідини і запобігання таким чином надходження рідини разом з домішками в приймач, в колбу вкидають тонкі капіляри, які забезпечують рівномірність кипіння.

Щоб досягти повнішого відокремлення з гомогенної суміші рідких речовин, які мають різну температуру кипіння, застосовується *дробова (фракційна) перегонка*. Цей метод ґрунтується на тому, що у двокомпонентній гетерогенній системі утворюється пара, відносно збагачена тим компонентом, від додавання якого в систему підвищується загальний тиск пари, внаслідок чого знижується температура кипіння рідини.

Суть методу така: суміш перегоняється на декілька фракцій в зазначеному інтервалі температур (виходячи з температур кипіння складників суміші речовин). Потім першу фракцію знову піддають пере-

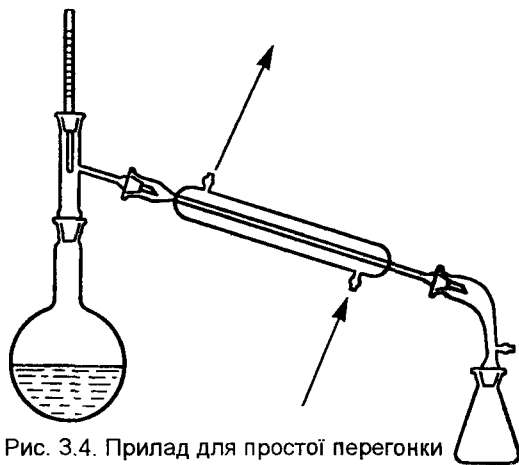


Рис. 3.4. Прилад для простої перегонки

гонці на окремі, більш вузькі фракції, при цьому перегонку ведуть доти, поки температура пари не досягне верхньої межі, яка спостерігалась при первісній перегонці цієї фракції. До залишку додають другу фракцію і перегонку продовжують. Подібна розгонка повторюється декілька разів при поступовому звуженні інтервалу температур.

Такий метод перегонки досить трудомісткий і супроводжується великими втратами речовин від випаровування. Значно краще відбувається фракціонування суміші шляхом *ректифікації*, різновидності дробової перегонки. Для цього використовуються ректифікаційні колонки, в яких створюється декілька послідовних фазових рівноваг між флегмою (конденсатом, що стікає назад), і парою, що піднімається вгору в умовах відомого температурного градієнта по всій довжині колонки. При цьому компонент з вищою температурою кипіння у весь час частково конденсується з парової фази, а компоненти з нижчою температурою кипіння частково випаровуються з флегми.

В лабораторних умовах замість ректифікаційних колонок часто використовуються *дефлегматори* різних типів (кулькові, ялинкові, з насадкою) ефективність яких тим вища, чим більша площа їхньої поверхні (рис. 3.5).

Перегонка може бути використана як засіб для очищення або розділення речовин, які мають різну стійкість до нагрівання. Якщо пе-

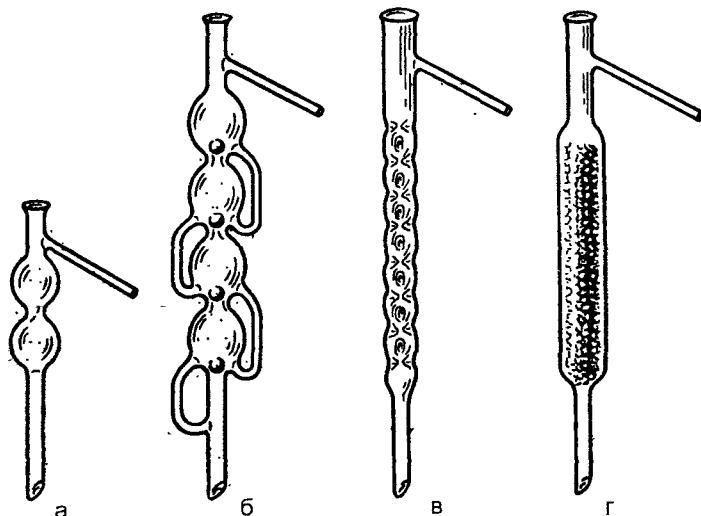


Рис. 3.5. Дефлегматори: а, б — кулькові; в — ялинкові; г — з насадкою

регоняють речовини, котрі не розкладаються від нагрівання, перегонку проводять при звичайному тиску, якщо ж речовини від нагрівання до точки кипіння розкладаються, проводять перегонку з водяною парою або перегонку при зниженому тиску (вакуумна перегонка).

Перегонку водяною парою проводять в тому разі, коли система складається з двох рідин, які не змішуються. В даному випадку використовується та обставина, що тиск пари кожного компонента над рідинною системою буде таким же, як і над відповідними чистими рідинами (рис. 3.6). Таким чином, загальний тиск дорівнюватиме атмосферному (умови кипіння рідини) при нижчій температурі, ніж тиск пари кожного компонента окремо.

Перевага в ефективності перегонки з водяною парою над звичайною перегонкою або перекристалізацією безсумнівна в тих випадках, коли продукт реакції забруднений значною кількістю смолистих речовин.

На практиці перегонку з водяною парою застосовують найчастіше для очищення нелетких рідин від залишків розчинника, відокремлення летких ізомерів від нелетких, виділення нелетких твердих речовин з їхніх розчинів у розчинниках з високою температурою кипіння тощо.

Очищені органічні речовини, які одержують після перегонки з водяною парою, висушують: тверді — між аркушами фільтрувального паперу, в сушильний шафі при певній температурі або в ексікаторі, а рідинні — відповідними висушувачами.

Перегонка у вакуумі здійснюється за допомогою пристрою, до складу якого входить спеціальна перегонна колба (Гарбузова, Фаворського або Клайзена), яка забезпечує рівномірне кипіння при зниженому тиску (рис. 3.7). Для підтримки рівномірного кипіння в колбу вставляється скляна трубка з дуже тонким капіляром на кінці, яка до-

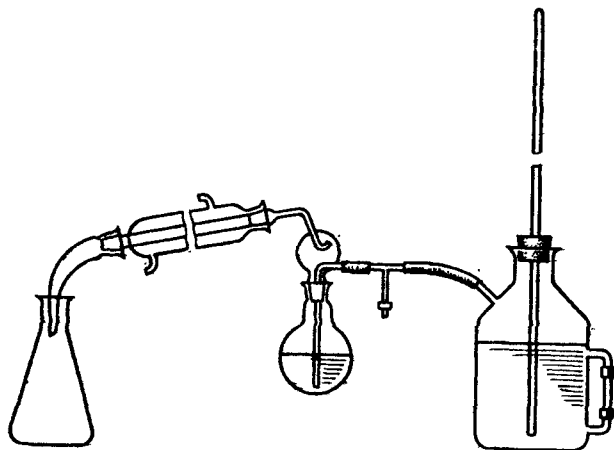


Рис.3.6. Прилад для перегонки з водяною парою

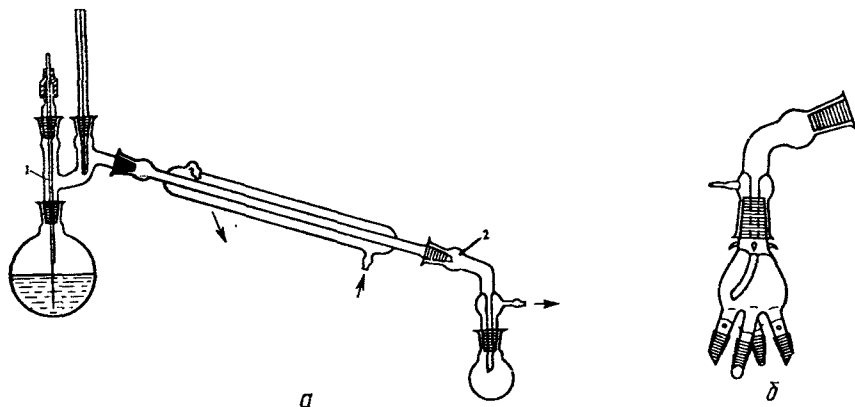


Рис. 3.7. Прилад для перегонки у вакуумі (а) та алонж типу "павук" для збирання фракцій у вакуумі (б): 1 — насадка Клайзена; 2 — алонж

ходить майже до дна колби. Бульбашки повітря, які входять крізь цей капіляр, забезпечують рівномірне кипіння. Вакуум забезпечується струминним або масляним насосом, а для одержання глибшого вакууму використовуються ртутний і дифузійний насоси.

Іноді дослідник стикається із випадками, коли при очищенні певні речовини (як правило, це речовини з великою молекулярною масою) розкладаються навіть при температурі кипіння в глибокому вакуумі. Щоб уникнути цього, застосовують *молекулярну перегонку*. Цей спосіб очищення речовин базується на створенні таких умов, при яких молекули речовини, котрі піддаються перегонці і відірвались від випаровуючої поверхні, досягають конденсуючої поверхні і при цьому не стикаються з іншими молекулами. Подібне може статися тільки тоді, коли відстань між випаровуючою і конденсуючою поверхнями менша від середньої довжини пробігу молекул, яка обернено пропорційна тиску і зменшується зі збільшенням молекулярної маси речовини.

У біохімічній практиці іноді використання органічних речовин не можливе через вміст у них певної кількості води (ацетон, спирти). При зберіганні цих речовин утворюються продукти окислення (прості ефіри, діоксан утворюють пероксиди) тощо. Тому залежно від вмісту можливих домішок та хімічних властивостей органічних розчинників у кожному конкретному випадку використовуються певні методичні підходи для очищення їх. Як правило, спирти (метиловий, етиловий, ізоаміловий, пропіловий та ін.) містять значну кількість води (не менше 4%). Вони часто використовуються, коли треба, щоб вміст основ-

ної речовини був не менше 99,5%, а тому їх висушують (зневоднюють); найчастіше для зневоднення розчинників застосовується щойнопрожарений оксид кальцію. Очищені таким чином спирти називаються "абсолютними". В кожному окремому випадку як засіб для зневоднення використовується концентрована сірчана кислота, прожарені в муфельних печах хлорид кальцію, сірчаноокисла мідь тощо.

Очищення води за допомогою іонообмінних смол. У біохімії для деяких аналітичних робіт використовується демінералізована вода, яку одержують шляхом пропускання звичайної води крізь колонки з іонообмінними смолами. Така вода за хімічним складом та іншими властивостями близька до дистильованої.

Таблиця 3.2. Характеристика водопровідної, дистильованої та демінералізованої води

Характеристика	Вода		
	водопровідна	дистильована	демінералізована
pH	6.9	6,3	6.7
Загальна кількість розчинених речовин. ч/млн. ч. H ₂ O	117.9	3.9	6,9
У тому числі:			
Леткі речовини	39.6	2.6	2.5
Неорганічні речовини	78.2	1.3	4.4
Залізо	0.25	0.07	0,01
Силіцій	2.0	0.25	2.0

Для знесолення (демінералізації) води використовують колонки з катіонітом і аніонітом, розміри зерен яких становлять 0,2–0,4 мм. Після промивання іонітів від пилу та набрякання у воді їх переводять у відповідні форми: катіоніти у H⁺-форму обробкою 2N розчином HCl, аніоніти — у OH⁻-форму шляхом змочування смоли 1N розчином NaOH. Потім колонки зі смолами промивають дистильованою водою до нейтральної реакції і сполучають так, щоб водопровідна вода спочатку проходила крізь колонку з катіонітом, а потім — з аніонітом (рис. 3.8).

Певні іоніти мають відповідну обмінну ємність. Тому після деякого терміну використання смол для відновлення іонообмінних властивостей їх піддають регенерації — катіоніти обробляють 2N розчином HCl, аніоніти — 1N розчином NaOH і промивають водою до нейтральної реакції.

Як метод очищення реактивів у біохімічній практиці використо-

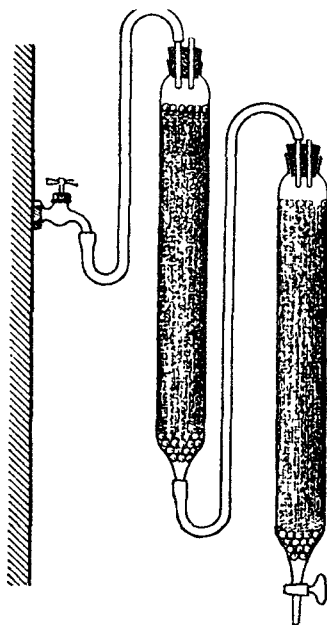


Рис 3.8 Іонообмінна колонка для очищення води

ується адсорбційна, розподільна та іонообмінна хроматографії. Однак, зважаючи на те, що хроматографічні методи широко застосовуються також для виділення, ідентифікації й аналізу макромолекул, принцип і особливості використання цих методів у біохімічних дослідженнях будуть викладені нижче (розділ 12).

Ідентифікація речовин. Хімічні реактиви, які в лабораторних умовах піддавались очищенню, слід перевірити на вміст домішок і відповідність їх складу та будови основної речовини. Для визначення вмісту залишених після очистки домішок вдаються до різних хіміко-аналітичних методів. Зокрема для ідентифікації речовин і визначення відповідності будови та складу основної речовини використовують такі показники, як температура кипіння і плавлення, оптичні, хроматографічні властивості

тощо, порівнюють фізико-хімічні константи з табличними значеннями для відповідної речовини.

4. ДИСПЕРСІЙНІ СИСТЕМИ. РОЗЧИНИ

Будь-яка система, в якій одна речовина розподілена у вигляді дуже дрібних часток в іншій речовині (дисперсійному середовищі), називається *дисперсійною*.

Залежно від агрегатного стану розподіленої речовини і середовища можливі такі типи дисперсійних систем (Г — газоподібний стан; Р — рідинний стан; Т — твердий стан):

		Розподілена речовина		
		Г	Р	Т
Середовище	Г	ГГ	ГР	ГТ
	Р	РГ	РР	РТ
	Т	ТГ	ТР	ТТ

Для біохімії найбільше практичне значення мають дисперсійні системи, в яких дисперсійним середовищем є рідина.

Властивості дисперсійних систем, насамперед, їхня стійкість, залежать від розмірів частинок розподіленої речовини. Якщо частинки розподіленої речовини порівняно з молекулами великі, то дисперсійна система буде нетривка, і розподілена речовина буде довільно осаджуватися донизу (або підніматися вгору, якщо її питома вага легша від питомої ваги середовища). Такі дисперсійні системи називаються *зависями*. Якщо в дисперсійному середовищі знаходяться частки твердої речовини, то такий розчин називається *суспензією*, а якщо крапельки рідини — *емульсією*.

Дисперсійне середовище, в якому частки розподіленої речовини невеликі і за розміром близькі до молекул розчинника (тобто воно гомогенне, а його частки не розділюються під дією сил тяжіння) є тривалим у часі, то така дисперсійна система називається *молекулярним (істинним) розчином*.

Нарешті, проміжне положення займають *колоїдні системи*. В них частки розподіленої речовини більші за молекули розчинника (в межах від 1 до 150 нм). Така система характеризується гетерогенністю, але її частки не розділяються під дією сил тяжіння. Розрізняють дві групи колоїдних розчинів — *золі* і *гелі*. *Золь* — це колоїдний розчин у рідкому стані; відносно води золі бувають гідрофільні (крохмальний клейстер, желатин, агар) і гідрофобні (глина у воді, білкові розчини). *Гелі* — це розчин, який втратив свою текучість унаслідок коагуляції (загущені золі). На перехід “золь-гель” впливають такі фактори, як в'язкість, іонний склад, рН, тиск, температура тощо. Прикладом тако-

го переходу є зсідання крові, при якому в стан геля переходить білок фібриноген.

4.1. РОЗЧИННІСТЬ ТА РОЗЧИНЕННЯ

Розчинність — це здатність речовин розчинятися в певному розчиннику. За величину розчинності речовини приймається та максимальна кількість речовини, яка може розчинитися в 100 мл розчинника за нормальних умов — при температурі 20⁰ С і атмосферному тиску 1013 гПа (760 мм рт.ст.). Величина розчинності визначається перш за все хімічною природою речовини. Іноді важко визначити яка речовина є розчинником, а яка розчиненою речовиною. Як правило, розчинником вважається той компонент, котрий у чистому вигляді має такий же агрегатний стан, що й одержаний розчин. Наприклад, у водних розчинах розчинником є звичайно вода. У випадку, коли обидва компоненти до розчинення перебували в однаковому агрегатному стані (наприклад, спирт і вода), розчинником вважається компонент, вміст якого в даному розчині більший.

Агрегатний стан розчиненої речовини і розчинника може бути різним, але в біохімічній практиці використовуються тільки розчини в рідинах, здебільшого у воді, а іноді — в органічних розчинниках.

При розчиненні рідин у рідинах можливі різні випадки. Наприклад, вода і бензол майже не розчиняються одне в одному, а спирт і вода змішуються у будь-яких співвідношеннях. Найбільш загальним є випадок обмеженої взаємної розчинності. Наприклад, для системи вода–ефір при підвищенні температури розчинність води в ефірі збільшується, а ефіру у воді, навпаки зменшується. Вцілому, з підвищенням температури взаємна розчинність рідин збільшується доти, поки не буде досягнута температура, при якій обидві рідини змішуються в будь-яких пропорціях.

Розчинність твердих речовин у рідинах залежить як від розчинника, так і від речовин, які розчиняються. Мірою розчинності речовини за даних умов є концентрація її насиченого розчину, однак з підвищенням температури середовища розчинність багатьох речовин, як правило, збільшується. Це твердження справедливе тільки для тих речовин, розчинення яких супроводжується поглинанням тепла. Якщо ж під час розчинення тепло виділяється, то додаткове нагрівання, навпаки, веде до зменшення величини розчинності речовини. Взагалі розчинність твердих речовин у рідинах з підвищенням температури має досить різноманітний характер. Графічне зображення розчинення різних солей (рис. 4.1) показує, що, наприклад, такі солі, як

CuSO_4 , NH_4Cl , KNO_3 тощо з підвищенням температури розчиняються краще, тимчасом як, розчинність NaCl з підвищенням температури змінюється лише незначною мірою. Більш складною є крива розчинності у воді кристалогідрату $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$. Спочатку розчинність цієї солі з підвищенням температури збільшується, а потім (при 32°C) навіть дещо зменшується. Різка зміна розчинності пов'язана з тим, що при температурі 32°C кристалогідрат сірчаноокислого натрію розпадається і переходить у безводну сіль. Подібний характер розчинності властивий майже всім кристалогідратам із різним вмістом води. Розчинність деяких солей у воді при різних температурах наведена в додатку 5.

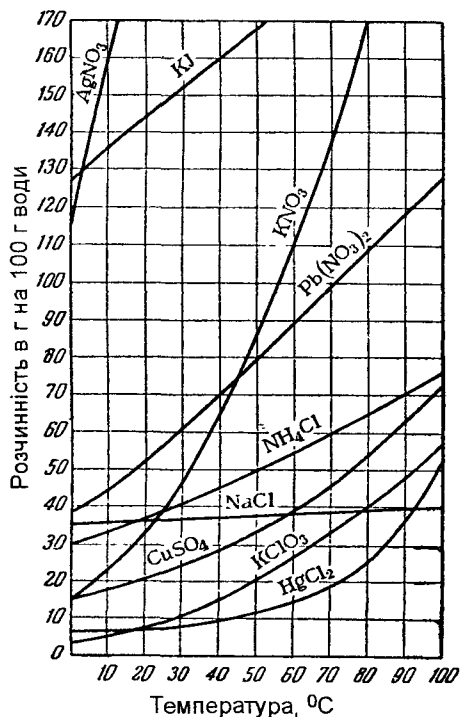


Рис. 4.1. Криві розчинності різних солей

Для багатьох твердих речовин характерне утворення *пересичених* розчинів, тобто таких розчинів, у яких вміст розчиненої речовини більший, ніж це впливає з її нормальної розчинності за даних умов. Такого стану розчину можна досягти, якщо обережно охолоджувати розчин, який був насичений при вищій температурі, або внести до розчину декілька кристалів речовини, що розчиняється. Пересичені розчини, на відміну від насичених, є системами нестійкими, вони здатні існувати тільки за відсутності стикування з ними твердої фази розчиненої речовини.

Для розчинення у відповідний посуд вносять за допомогою лійки наважку потрібної речовини і приливають таку кількість розчинника, яка необхідна для розчинення. Енергійним перемішуванням або збовтуванням досягається повне розчинення речовини, після чого додають решту розчинника за розрахунками і остаточно старанно перемішують. Щоб прискорити розчинення речовин у розчинниках, вдаються до підігріву. Підігрівати розчин можна на газовій горілці, електричній плитці, во-

дяній бані тощо, за умови суворого дотримання правил техніки безпеки. Під час підігріву розчин треба постійно перемішувати щоб запобігти викиду суміші з посуду. Звичайно, суміші при розчиненні речовин, не підігрівають, якщо останні при нагріванні розкладаються.

Виходячи з положення, що чим дрібніша речовина, тим краще вона розчиняється, то її попередньо можна подрібнити в порцеляновій (фарфоровій) ступці. Причому подрібнити речовину слід до зважування, оскільки частина її при подрібненні може загубитися. Треба мати на увазі, що гігроскопічні речовини подрібнювати не треба, тому що при цьому поверхня речовини збільшується, а це призводить до полегшення поглинання вологи.

Іноді дослідники стикаються з труднощами, обумовленими тим, що деякі речовини у вигляді порошку погано змочуються розчинником і плавають на його поверхні, утворюючи тонку плівку. В такому випадку речовину слід спочатку змочити етиловим або метиловим спиртом, а вже потім приливати розчинник. Ним може бути спирт, придатний для розчинення як органічних, так і неорганічних речовин, щоправда за умови, що він хімічно не впливає на речовину або на її розчин.

При розчиненні лугу користуються скляними стаканами або порцеляновими чашками. В такий стакан насипають відважену кількість твердого лугу і заливають його невеликою кількістю води. Слід, однак, мати на увазі, що при розчиненні лугу розчин дуже нагрівається, і скляний посуд може лопнути, тому краще брати порцелянову ємкість. Після розчинення лугу розчин охолоджують і відстоюють до прозорості. У разі необхідності, якщо в розчині є деякі нерозчинні домішки, його фільтрують. Приготовлений розчин лугу обережно вливають у мірний посуд і доводять його об'єм водою до потрібної поділки.

При приготуванні розчинів кислот розраховану кількість кислоти відмірюють вимірювальним циліндром і тонким струменем вливають у воду, а не навпаки. Кислоту вливають порціями, при постійному перемішуванні розчину. При цьому розчин дуже нагрівається. Категорично забороняється додавати воду до кислоти, бо вода легша за кислоту і, нагріваючись на поверхні останньої, може розбризкуватись, що спричиняється до тяжких ушкоджень.

4.2. ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ

Одним з найважливіших процесів практичної біохімії є приготування розчинів. Серед багатьох розчинників, які використовуються в біохімії, найважливішим є вода. Розчини готують тільки на дистильо-

ваній воді, а в деяких випадках на бідистильованій (двічі перегнаній). Треба мати на увазі, що за одиницю місткості в метричній системі (в СІ одиниця місткості не передбачена) приймається *літр* — об'єм, який займає маса чистої води, котра дорівнює 1 кг при температурі її найбільшої густини (3,98° С) та нормальному атмосферному тиску (760 мм рт. ст.). Температура кипіння води та її густина залежно від тиску та температури наведена в додатках 6, 7.

Як правило, розчини готуються з розрахункових кількостей окремих компонентів. При цьому тверді речовини беруться за масою, а рідкі — за об'ємом. Для приготування розчинів наближеної концентрації речовину відважують на технікохімічних терезах, а рідину відмірюють мірними циліндрами. Для розчинення наважки використовуються колби або хімічні стакани, в які спочатку наливають приблизно половину необхідної за розрахунком кількості розчинника, а після розчинення речовини додають решту розчинника. Умови приготування розчинів деяких неорганічних кислот та лугів наведені в додатку 8.

При користуванні піпетками треба пам'ятати, що та кількість рідини, яка залишається в кінчику піпетки після виливання, звичайно врахована в її об'єм. Треба також враховувати верхній рівень рідини в піпетці біля кільцевої риски (для прозорих рідин — за нижнім меніском, для темнозбарвлених — за верхнім). Вимірювальними колбами користуються для вимірювання певного об'єму рідин; звичайно ці колби градуйовані при 15° С, тому по можливості вимірювання треба проводити при тій же температурі. Вимірювальними циліндрами користуються тільки при грубих (неточних вимірюваннях), бо точність циліндричного посуду зменшується зі збільшенням поперечного перерізу. Для визначення кількості використаного в бюретці реактиву завжди беруть поділку, яка збігається з нижнім краєм меніска рідини, причому око має бути на висоті цього рівня. Точність обліку бюреткою становить біля 0,02–0,03 мл.

Залежно від точності роботи для зважування користуються технохімічними або аналітичними терезами. Перед зважуванням терези регулюють за допомогою установочних ніжок — гвинтів. При підніманні аретира стрілка повинна відхилитись від середньої точки шкали вліво чи вправо на однакову кількість поділок. Такі терези вважаються зрівноваженими.

Речовину, яку зважують, кладуть на фільтрувальний папір (кальку); подрібнені або порошкоподібні речовини зважують на годинниковому склі або в бюксі — спеціальній ваговій склянці з пришліфованою кришкою, маса якої попередньо визначається. На ліву шальку терезів кладуть речовину, на праву — важки, які ставлять пінцетом.

Точні розчини готують одним з наведених нижче способів:

Приготування з фіксаналів. Фіксанали — це точно відважена кількість реактиву або його розчину, який запаятий у скляну ампулу. На кожній ампулі є позначки формули речовини, яка міститься в ампулі, та її кількості — 0,1 або 0,01 г/екв. Усі точні розчини завжди готують у мірних колбах. Кількісне перенесення вмісту ампули у мірну колбу і розчинення його на 1 л дає точно 0,1 або 0,01 н розчин. З вмісту фіксаналу можна одержати нормальні розчини іншої концентрації, якщо варіювати об'єм розчинника.

Приготування за точно взятою наважкою. Цей спосіб приготування точних розчинів придатний тільки для солей, які не є гігроскопічними або не втрачають на повітрі кристалізаційну воду, а також для деяких кислот (щавлева, борна). Наважку речовини, яку треба розчинити, вміщують в бюкс або на годинникове скло, зважують на аналітичних терезах з точністю до четвертого десяткового знака і розчиняють у потрібному об'ємі води. Якщо відомі маса наважки та об'єм розчину, можна розрахувати точну концентрацію останнього.

За наважкою готують розчини точно відомої концентрації з речовин, склад яких відповідає певній хімічній формулі, або якщо відомий чи визначений точний вміст потрібної речовини в препараті.

Наприклад, необхідно приготувати 100 мл 0,1н розчину хлориду калію. Г.екв. КСІ дорівнює 74,551 г. Розраховано, що в 100 мл 0,1н розчину повинно міститись 0,7455 г солі.

Маса бюкса з наважкою складає 10,8608

Маса бюкса без наважки складає 10,1138

Наважка — 0,7470г

Складається пропорція:

0,7455 – 0,1н розчин

0,7470 – X

$$X = \frac{0,7470 \cdot 0,1}{0,7455} = 0,1002$$

Отже, якщо розчинити наважку в 0,7470 г КСІ у мірній колбі ємністю 100 мл, то точна концентрація розчину дорівнюватиме 0,1002 н.

Приготування за наближено взятою наважкою. Цей спосіб приготування розчинів використовується для більшості солей, кислот та лугів, які на повітрі здатні змінювати свій склад і концентрацію. Для цього розраховану наважку зважують на технохімічних терезах з

точністю до другого десяткового знака і розчиняють у потрібному об'ємі води. Точну концентрацію виготовленого розчину визначають об'ємним шляхом — титруванням.

4.3. СПОСОБИ ВИРАЖЕННЯ КОНЦЕНТРАЦІЇ І РОЗЧИНІВ

Кожний розчин має якісну і кількісну характеристику. Якісний склад розчину визначається видом розчинника і характером розчиненої речовини, а кількісний — кількісним співвідношенням розчинника та розчиненої речовини і виражається кількістю або концентрацією розчинених речовин в одиниці об'єму. Концентрація розчинів виражається найчастіше у відсотках — вагових, об'ємно-вагових або об'ємних, у грам-молях на 1 л розчину, грам-еквівалентах на 1 л розчину та титром.

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

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

де: m_b — маса розчиненої речовини ; m_a — маса розчинника.

Молярні розчини (C_M або M) — це розчини, в 1 л яких міститься певне число грам-молекул розчиненої речовини:

$$C_M = m/(VM),$$

де: m — маса розчиненої речовини, г; V — об'єм розчину, л; M — молекулярна маса речовини.

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

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

Нормальні розчини — це розчини, в 1 л яких міститься грам-еквівалент розчиненої речовини:

$$C_H = m/(VE).$$

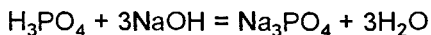
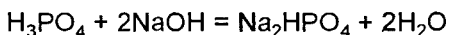
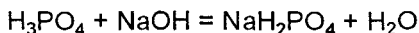
Нормальність позначається літерою "н" (в тексті) або N (у формулах).

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

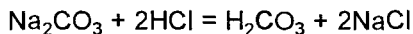
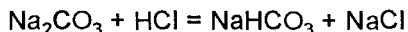
Грам-еквівалент розраховується шляхом ділення молекулярної маси речовини (M) на число зарядів або електронів (n), які беруть участь у відповідній реакції:

$$E = M/n.$$

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



або:



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

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

$$V_1/V_2=N_2/N_1 \text{ або } N_1V_1=N_2V_2$$

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

$$T = m/V.$$

Титр розчину за його нормальністю розраховують за формулою:

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

де: N — нормальність розчину, E — еквівалент розчиненої речовини.

Титр розчину за його відсотковою концентрацією розраховують за формулою:

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

де: $C_{\%}$ —концентрація у відсотках; ρ — густина розчину, г/мл.

За точністю вираження концентрації розчини поділяють на точні й наближені. *Точними* розчинами вважаються молярні, нормальні і титровані; вони використовуються переважно для аналітичних досліджень. До *наближених* належать розчини, концентрація яких виражена у вагових або об'ємних відсотках. Формули для перерахування концентрацій розчинів наведені в додатку 9.

4.4. РОЗРАХУНКИ ДЛЯ ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ

Приготування відсоткових розчинів. Для приготування певної кількості розчину відповідної відсоткової концентрації масу речовини, яка розчиняється, розраховують за формулами:

$$m_b=C_{\%}m/100 \text{ чи } m_b=C_{\%}\cdot V\cdot\rho/100,$$

де: m — маса розчину, г, V — об'єм розчину, мл; ρ — густина розчину, г/мл.

Якщо для розчинення використовується тверда речовина, яка містить кристалізаційну воду, масу речовини знаходять за формулою:

$$m_b=C_{\%}\cdot V\cdot\rho M_1/(100\cdot M_2),$$

де: M_1 і M_2 — молекулярні маси кристалогідрату і безводної речовини відповідно.

Для приготування відсоткових розчинів наважку необхідної речовини відважують на техніхімічних терезах, а об'єм відмірюють вимірювальними циліндрами.

Відсоткові розчини готують декількома способами, приклади яких наведено нижче.

- Необхідно одержати 80 г 30% розчину азотнокислого амонію (NH_4NO_3).

Розв'язання: в 100 г розчину повинно міститись 30 г NH_4NO_3 , а у 80 г розчину — X г NH_4NO_3 :

$$X = \frac{30 \cdot 80}{100} = \frac{2400}{100} = 24 \text{ г } \text{NH}_4\text{NO}_3$$

Для визначення необхідної кількості води із загальної маси розчину вираховується знайдена маса NH_4NO_3 : $80 - 24 = 56$ г.

- Необхідно одержати 0,8 кг 10% розчину сірчаної кислоти міді з кристалогідрату $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ з розрахунку на безводну сіль.

Розв'язання: для приготування 0,8 кг 10% розчину потрібно 80 г безводної солі. Молекулярна маса безводної CuSO_4 дорівнює 159,6, а молекулярна маса кристалогідрату $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 249,7. Отже, 159,6 г безводної CuSO_4 міститься в 249,7 г кристалогідрату, а 80 г безводної солі — в X г кристалогідрату:

$$X = \frac{249,7 \cdot 80}{159,6} = 125,2 \text{ г.}$$

Отже, щоб одержати 0,8 кг розчину, необхідно 125,2 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, і 674,8 мл води ($800 - 125,2$).

- Знайти масу води і мідного купоросу $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, необхідну для приготування 1 л розчину, який містив би 8% (мас) безводної солі. Густина 8% розчину CuSO_4 — 1,084 г/мл. Молекулярна маса $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ — 249,7 г/моль, а безводної солі — 159,6 г/моль.

Розв'язання: маса 1 л одержаного розчину становить $1,084 \cdot 100 = 108,4$ г.

У цьому розчині повинно міститися 8% безводної солі — $108,4 \cdot 0,08 = 8,67$ г.

Масу $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ знаходимо з пропорції: $249,7 : 159,6 = X : 8,67$.

$$X = \frac{249,7 \cdot 86,7}{159,6} = 135,6 \text{ г.}$$

Отже, маса води становить 948,4 г (1084 г–135,6 г), CuSO_4 — 135,6 г.

● Який об'єм води треба додати до 200 мл 30% розчину NaOH ($\rho=1,33$ г/мл) щоб одержати 10% розчин луку?

Розв'язання: маса розчину NaOH — $200 \cdot 1,33=266$ г.

У цьому розчині повинно міститися 30% NaOH — $266 \cdot 0,3=79,8$ г

Маса одержаного розчину становить: $(79,8/10) \cdot 100=798$ г.

Отже, до вихідного розчину необхідно додати $798-266=532$ г (води).

● Скільки треба взяти 34% HCl ($\rho=1,169$), щоб приготувати 2000 мл 10% розчину цієї кислоти з питомою вагою 1,047?

Розв'язання: маса 10% розчину HCl становить: $2000 \cdot 1,047=2094$ г.

У цьому розчині повинно міститися:

$$X = \frac{2094 \cdot 10}{100} = 209,4 \text{ г HCl.}$$

Масу HCl знаходимо з пропорції:

$$X = \frac{100 \cdot 209,4}{34} = 616 \text{ г HCl,}$$

або $616:1,169=527,8$ мл 34% розчину HCl . Отже, щоб приготувати 2000 мл 10% розчину HCl , треба 527,8 мл її 34% розчину.

● При охолодженні 300 г 15% розчину частина розчиненої речовини випала в осад, і концентрація розчину стала дорівнювати 8%. Яка маса речовини, що випала в осад?

Розв'язання: в 300 г 15% розчину міститься 45 г розчиненої речовини та 255 г розчинника. При охолодженні кількість розчинника не змінилась. Вміст розчиненої речовини в 255 г розчинника знаходимо з пропорції:

92 г розчинника містить 8 г речовини (8% розчин)

255 г розчинника містить X г речовини

$$X = \frac{8 \cdot 255}{92} = 22,2 \text{ г}$$

При охолодженні розчину в осад випадає $45 - 22,2 = 22,8$ г розчиненої речовини.

● Знайти концентрацію розчину HCl , питома вага якого дорівнює $1,0690$ г/моль (20°C).

Розв'язання: найближче значення густини розчину HCl знаходимо з таблиці: $1,0559$ — для 8% і $1,0707$ — для 10% розчину.

Підставляємо чисельні величини у формулу:

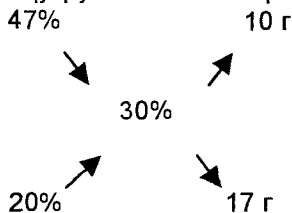
$$C_x = C_1 + (C_2 - C_1) \frac{\rho_x - \rho_1}{\rho_2 - \rho_1},$$

де: ρ_x , ρ_1 і ρ_2 — виміряна та найближчі табличні значення питомої ваги, C_x , C_1 і C_2 — відповідні їм концентрації.

$$C = 8 + 2 \frac{1,0690 - 1,0559}{1,0707 - 1,0559} = 9,77\% .$$

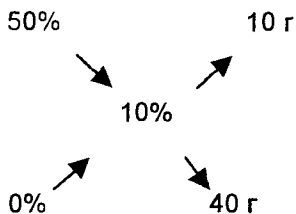
Якщо виникає потреба приготувати розчин певної концентрації розведенням більш концентрованого розчину або змішуванням розчинів більшої і меншої концентрації, користуються правилом розведення (змішування) за діагональною схемою.

● Є два розчини цукру: 47% і 20% . Треба виготовити 30% розчин:



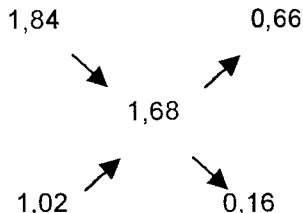
Отже, треба взяти 10 г 47% розчину і 17 г 20% розчину цукру.

● З 50% розчину луѓу, який вже є, треба приготувати 10% його розчин:



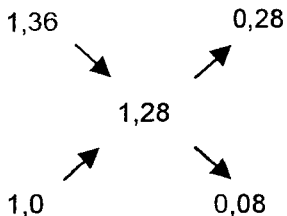
Отже, треба взяти 40 г води і 10 г 50% розчину лугу.

• Треба приготувати розчин H_2SO_4 з питомою вагою 1,68. Є два розчини H_2SO_4 : перший — з питомою вагою 1,84, другий — 1,02.



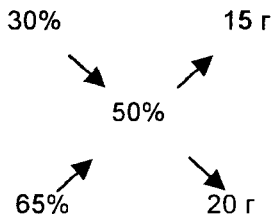
Отже, треба взяти 66 частин H_2SO_4 з питомою вагою 1,84 і 16 частин з питомою вагою 1,02.

• З розчину з питомою вагою 1,36 треба приготувати розчин з питомою вагою 1,28. Питома вага води дорівнює 1,0.



Отже, треба взяти 28 частин розчину з питомою вагою 1,36 і додати 8 частин води.

• Є розчин лугу з концентрацією 30%. Треба приготувати 50% розчин лугу додаванням твердого лугу. Чистота твердого лугу приймається за 65%.



Отже, на кожні 15 г 30% розчину лугу треба додати 20 г 65% твердого лугу.

Приготування нормальних і молярних розчинів. Для приготування нормального розчину необхідно знати молекулярну масу речовин, основність сильної кислоти або лугу, а для реакцій окислення і відновлення — беребіг реакції. Розрахунки проводяться за формулою:

$$C_H = \frac{m \cdot 1000}{E \cdot V} \text{ моль/л,}$$

де: m — маса речовини;
 E — еквівалентна маса речовини;
 V — об'єм, мл.

Для приготування молярного розчину користуються формулою:

$$C_M = \frac{m \cdot 1000}{M \cdot V},$$

де: m — маса речовини;
 M — молекулярна маса речовини;
 V — об'єм, мл.

Розглянемо деякі приклади:

● Яка маса H_2SO_4 необхідна для приготування 1 л 0,1 н розчину?

Молекулярна маса H_2SO_4 — 98 г/моль.

Розв'язання:

$$E_{H_2SO_4} = 98/2 = 49 \text{ г/моль}$$

$$\text{Маса } H_2SO_4 = C_H \cdot E \cdot V,$$

де: V — об'єм, л.

$$m_{H_2SO_4} = 0,1 \cdot 49 \cdot 1 = 4,9 \text{ г.}$$

Отже, для приготування 1 л 0,1 н розчину потрібно 4,9 г H_2SO_4 .

● Приготувати 100 мл 0,5 н розчину з 3 н розчину.

Розв'язання: виходячи зі співвідношення $V_1 N_1 = V_2 N_2$, знаходимо X , а саме: $X = 0,15 \cdot 100/3 = 5$ мл.

Отже, для приготування 100 мл 0,5 н розчину треба взяти 5 мл 3 н розчину та 95 мл розчинника.

● 250 мл розчину містить 7 г КОН. Яка молярна концентрація розчину?
 $M_{KOH} = 56$ г/моль.

Розв'язання: $C_M = \frac{7 \cdot 1000}{56 \cdot 250} = 0,5 \text{ моль/л.}$

Отже, молярна концентрація розчину КОН становить 0,5 моль/л.

● 1,966 г NaCl розчинили у воді в мірній колбі ємністю 200 мл та розвели водою до риски. Яка молярна концентрація розчину? Молекулярна маса NaCl — 58,45 г.

Розв'язання: в 1 л розчину NaCl міститься $1,966 \cdot 1000/200 = 9,830$ г.
Звідси: $C_M = 9,830/58,45 = 0,1682$.

Отже, молярна концентрація розчину NaCl становить 0,1682.

● Яку масу H_2SO_4 необхідно взяти для приготування 2 л 2 М розчину?

$M_{H_2SO_4} = 98$ г/моль.

Розв'язання:

$$m_{H_2SO_4} = C_M \cdot M \cdot V,$$

де: V — об'єм, л, $m_{H_2SO_4} = 2 \cdot 98 \cdot 2 = 392$ г.

Отже, для приготування 2 л розчину потрібно 392 г H_2SO_4 .

● Для нейтралізації 42 мл H_2SO_4 треба додати 14 мл 0,3 М лугу. Визначити молярність розчину H_2SO_4 .

Розв'язання: виходячи з того, що речовини взаємодіють у еквівалентних кількостях $V_1 N_1 = V_2 N_2$, знаходимо:

$X \cdot 42 = 14 \cdot 0,3$.

$$X = \frac{14 \cdot 0,3}{42} = 0,1 \text{ н } H_2SO_4 \text{ (1/2 } H_2SO_4)$$

Еквівалент H_2SO_4 дорівнює 0,5 моль. Звідси молярність H_2SO_4 становить $0,1 \cdot 0,5 = 0,05$ моль/л.

Приготування нормальних і молярних розчинів з відсоткових.

● Знайти нормальність і молярність 15% розчину H_2SO_4 ($\rho = 1,10$ г/мл). Молярна маса H_2SO_4 — 98 г/моль, еквівалентна — 49 г/моль.

Розв'язання: масу H_2SO_4 , яка міститься в 1000 мл ($1000 \cdot 1,1 = 1100$ г) розчину, знаходимо з пропорції: $1100 : 100 = X : 15$.

$$X = \frac{1100 \cdot 15}{100} = 165 \text{ г.}$$

$C_H = 165/49 = 3,37$ н.

$C_M = 165/98 = 1,68$ моль/л.

● Необхідно приготувати 1 л 0,1 н H_2SO_4 з 90% розчину H_2SO_4 з питомою вагою 1,82 г/мл.

Розв'язання: для приготування 1 л 0,1 н H_2SO_4 необхідно:

$98 : 2 : 10 = 4,9$ г H_2SO_4 ; ця кількість міститься в X об'ємі 90% роз-

чину H_2SO_4 :

90 — 100/1,82;

4,9 — X

$$X = \frac{100 \cdot 4,9}{90 \cdot 1,82} = \sim 3,0 \text{ мл.}$$

Отже, треба взяти 3 мл 90% розчину H_2SO_4 і довести об'єм до 1 л.

●Знайти молярну концентрацію 8% розчину AgNO_3 з питомою вагою 1,064 г/мл. Молекулярна маса AgNO_3 — 169,87 г.

Розв'язання: $C_M = \frac{80 \cdot 1,064}{169,87} = 0,5011 \text{ моль/л}$

Отже, молярна концентрація 8% розчину AgNO_3 становить 0,5011 моль/л

●Знайти нормальність розчину HCl , якщо 7 мл концентрованої HCl (питома вага = 1,185 г/мл) розведені водою до риски в колбі ємністю 250 мл.

Розв'язання: концентрована HCl містить 37,3% HCl , $E_{\text{HCl}}=36,46$.

7 мл концентрованої HCl важать ~~7~~ $7 \cdot 1,185 = 8,295 \text{ г}$ і містять:

37,3 — 100

X — 8,295.

$$X = \frac{37,3 \cdot 8,295}{100} = 3,094 \text{ г HCl.}$$

Нормальність розчину HCl становить:

36,46 — 1000.

~~3,094~~ — 250

$$X = \frac{3,094 \cdot 1000}{36,46 \cdot 250} = 0,34$$

●Яка молярна концентрація 15,20% розчину Na_2CO_3 з питомою вагою 1,16?

Молекулярна маса Na_2CO_3 — 105,99 г.

Розв'язання: вага 1 л розчину Na_2CO_3 дорівнює $1 \cdot 1,16 = 1,16 \text{ кг} = 1160 \text{ г}$; у ньому міститься Na_2CO_3 :

$$\frac{1160 \cdot 15,20}{100} = 176,3 \text{ г.}$$

$$\text{Звідси } C_M = \frac{176,3}{105,99} = 1,663$$

Отже, молярна концентрація 15,20% розчину Na_2CO_3 становить 1,663.

4.5. ВИЗНАЧЕННЯ ГУСТИНИ РОЗЧИНІВ

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

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

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

де: ρ — густина речовини, г/см^3 ; m — маса речовини, г ; V — об'єм тіла, см^3 .

Розрізняють абсолютну та відносну густину. *Абсолютна густина* виражається в кілограмах на кубічний метр (кг/м^3). *Відносна густина* — це відношення густини досліджуваної речовини до густини дистильованої води при 4°C (іноді — іншої сполуки):

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

У повсякденній практиці звичайно користуються відносною густиною.

Густина розчину залежить від концентрації: вона збільшується зі збільшенням концентрації розчиненої речовини (див. додатки 10, 11). Однак це твердження не є абсолютним, оскільки подібна залежність для деяких речовин має певну межу, після якої зі збільшенням концентрації зменшується густина розчину. Наприклад, максимальна густина оцтової кислоти при концентрації 80% становить $1,0700 \text{ г/см}^3$, а при концентрації 100% — $1,0488 \text{ г/см}^3$, що майже відповідає густині 40% розчину кислоти.

Густина розчину також залежить і від температури: при зниженні температури відносна густина звичайно збільшується, а при підвищенні — зменшується. Тому всі виміри густини розчинів слід впро-

дити при постійній температурі.

Визначати відносну густину рідин можна за допомогою *ареометрів* (рис. 4.2). Ці вимірювальні прилади являють собою скляну трубку, яка розширюється донизу і заповнена свинцевим дробом, ртуттю або іншим важким матеріалом. У верхній, тоншій частині є шкала з поділками, яка показує густину рідини. При визначенні густини

ареометр занурюється в розчин тим глибше, чим менша густина розчину. Іноді ареометри оснащені термометрами, що дозволяє одночасно вимірювати температуру, за якої визначається густина розчину.

Принцип будови ареометрів застосовується в різних галузях для визначення необхідної характеристики будь-якої біоорганічної рідини. Наприклад, лактометрами визначають вміст ліпідів у молоці; урометрами — відносну густину сечі; спиртометрами — відсотковий вміст спирту тощо.

Якщо дослідник має можливість користуватися набором ареометрів, це дозволяє йому визначати густину рідин у широкому інтервалі з точністю до третього десяткового знаку. Якщо виникає потреба визначати густину рідин з точністю до четвертого десяткового знаку, користуються *пікнометрами*. Для цього на аналітичних терезах з точністю до 0,0001 г, спочатку зважують порожній пікнометр, потім — з водою і, нарешті, з досліджуваною рідиною. Відносну густину розраховують за формулою:

$$d = \frac{m_1 - m_0}{m_{H_2O} - m_0},$$

де: m_0 — маса порожнього пікнометра; m_1 — маса пікнометра з рідиною, що досліджується; m_{H_2O} — маса пікнометра з дистильованою водою.

Дослідник має у своєму розпорядженні пікнометри різних конструкцій — Рейшауера, Оствальда, Рен'є, Менделєєва, з капілярною пробкою тощо (рис. 4.3).

Для вимірювання щільності розчинів використовується також *щільномер*. Це сучасний автоматичний аналізатор, оснащений електронними датчиками і мікропроцесорною системою з

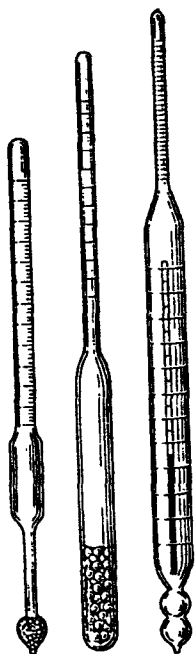


Рис. 4.2. Ареометри різних видів

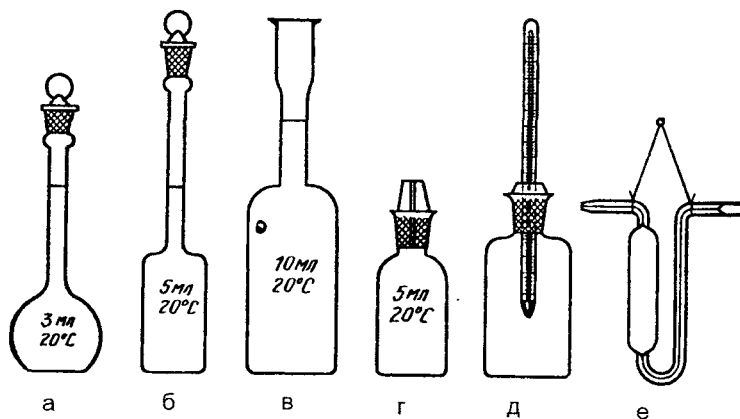


Рис 4.3 Пікнометри. а,б — Рейшауера; в — Рен'є; г — з капілярною пробкою; д — Менделєєва; е — Оствальда

пам'яттю до 100 визначень; він також має автоматичну калібровку та температурну компенсацію. Щільнометри дають можливість проводити вимірювання в діапазоні від 0 до 3 г/кг з точністю $1 \cdot 10^{-4}$ — $1 \cdot 10^{-5}$ г/см³.

Оскільки густина розчинів залежить від концентрації, на практиці після визначення ареометром густини будь-якого розчину, можна за табличними даними знайти його концентрацію. У випадку, коли визначена густина розчину має проміжне значення і в таблиці не зазначена, відсотковий вміст розчиненої речовини вираховують методом інтерполяції за двома зазначеними в таблиці найближчими величинами.

Наприклад, визначена ареометром густина розчину сірчаної кислоти становить 1,2095. Щоб визначити відсотковий вміст H₂SO₄ в розчині, за таблицею знаходять близькі (більші і менші) значення густини та відсотковий вміст H₂SO₄ і визначають різницю:

$$\begin{array}{r} 1,2185 \text{ — } 30\% \\ \underline{1,2023 \text{ — } 28\%} \\ 0,0162 \text{ — } 2\% \end{array}$$

Таким чином, при збільшенні густини розчину на 0,0162 відсотковий вміст H₂SO₄ збільшується на 2%. Знайдена густина менша найбільшої табличної величини на 1,2185 — 1,2095 = 0,0090.

За пропорцією розраховуємо:

$$\begin{array}{l} 0,0162 : 2 = 0,0090 : x, \text{ де} \\ x = 2 \cdot 0,0090 / 0,0162 = 1,111\% \end{array}$$

Отже, відсотковий вміст H₂SO₄, котрий відповідає 0,0090 значенню густини, становить 1,111%. Якщо відрахувати цю величину від

відсоткового вмісту H_2SO_4 найбільшого табличного значення, то невідомий відсотковий вміст розчину H_2SO_4 становитиме: $30\% - 1,111\% = 28,89\%$. Знайдено, що розчин сірчаної кислоти з густиною 1,2095 містить 28,89 % розчинної речовини.

Подібну інтерполяцію роблять тільки тоді, коли розчини не занадто концентровані і відсотковий вміст речовини в розчині змінюється прямо пропорційно зміні густини. Для досить концентрованих розчинів слід користуватися докладнішими таблицями, в яких вміщені вужчі інтервали значень густини.

4.6. КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ РЕЧОВИН ХІМІЧНИМИ МЕТОДАМИ

Для визначення вмісту й обміну тих чи інших компонентів у біохімії широко використовується кількісний аналіз хімічними методами. Розрізняють такі основні методи: гравіметричний (ваговий) та об'ємний (титриметричний) аналіз.

При ваговому аналізі досліджувану речовину, повністю (кількісно) вилучають із зразка, що аналізується, потім точно зважують на аналітичних терезах. У деяких випадках складова частина, що аналізується, може бути повністю вилучена, а залишок зважений. І, нарешті, при виконанні вагових визначень складову частину, що аналізується, кількісно зв'язують у таку хімічну сполуку, у вигляді якої вона може бути вилучена і зважена. Цей метод дає точні результати, але він дуже трудомісткий і тривалий, тому значно частіше застосовують *титриметричний (об'ємний) аналіз*, за яким масу визначають шляхом виміру об'ємів. Інакше кажучи, це процес приливання одного розчину до іншого з метою визначення кількості речовини в одному з них, іноді — концентрації. Сутність методу полягає в тому, що до розчину з аналізованою речовиною поступово приливають розчин з точно відомою концентрацією речовини (титрант) доти, поки речовини не будуть знаходитись в еквівалентних кількостях. Після цього вираховують вміст у розчині складової частини, яка визначається. В процесі титрування настає точка еквівалентності, коли кількість реагуючих речовин у суміші стає еквівалентною.

При виконанні кількісного аналізу методом титрування треба, щоб склад речовин, які використовуються для одержання титрованих розчинів, відповідав їхнім хімічним формулам. Ці речовини не повинні містити будь-яких домішок і мають бути стійкими при зберіганні. Виходячи з положення, що чим більша наважка речовини, тим менша

відносна похибка зважування, бажано, щоб речовина мала якомога більшу еквівалентну масу. Якщо речовина не відповідає цим вимогам, то спочатку готують розчин потрібної наближеної концентрації, а її титр визначають за допомогою відповідної речовини шляхом титрування. Для цього титр розчину попередньо перекристалізованої хімічно чистої речовини встановлюється шляхом ділення точної її наважки на об'єм розчину. Отже, один розчин з відомим титром може бути використаний для встановлення титру іншого розчину.

Взагалі титр розчину визначається двома способами — за робочою речовиною та за речовиною, що визначається. *Титр за робочою речовиною* — це кількість грамів робочої речовини, яка міститься в 1 мл його розчину. Добуток значення титру за робочою речовиною на його об'єм, який витрачений на титрування аналізованого розчину показує, скільки грамів робочої речовини вступає в реакцію з речовиною, що визначається. *Титр за речовиною, що визначається* — це маса речовини, яка еквівалентна масі робочої речовини, що міститься в 1 мл робочого розчину, або кількість речовини, що визначається, яка відтитровується 1 мл робочого розчину.

Якщо концентрація титрованих розчинів виражається через нормальність, користуються *коефіцієнтом нормальності* (K), або поправочним коефіцієнтом, який дозволяє визначити, наскільки нормальність певного розчину більша за його теоретичну нормальність. Коефіцієнт нормальності визначають декількома способами: 1) діленням титру даного розчину на титр точно заданої нормальності цього розчину; 2) діленням нормальності титрованого розчину на точно задану нормальність; 3) діленням об'єму розчину точної нормальності на об'єм, витрачений на титрування розчину з даною нормальністю.

Якщо коефіцієнт нормальності більше одиниці, це означає, що нормальність даного розчину більша за ту, відносно якої вона знайдена; якщо коефіцієнт нормальності менший одиниці — нормальність менша вказаної.

Реакції, що використовуються при титруванні, повинні задовольняти таким вимогам:

1. Взаємодія повинна відбуватися у певних стехіометричних співвідношеннях.
2. Має бути спосіб фіксування точки еквівалентності, тобто в точці еквівалентності повинне змінюватись забарвлення або речовин, що беруть участь у реакції, або сторонніх речовин — індикаторів, які попередньо вносяться до досліджуваного розчину.
3. Реакції між робочим розчином і тим, що аналізують, повинні проходити з достатньою повнотою, тобто реакція має бути практично

незворотною з великою величиною константи рівноваги.

4. Реакція повинна проходити з достатньою швидкістю, практично миттєво; в протилежному випадку (якщо реакція проходить повільно) точку еквівалентності визначити не можливо.

5. Хімічна реакція між робочим розчином і тим, що аналізується, не повинна супроводжуватися будь-якими другорядними реакціями; зміна зовнішніх умов не повинна впливати на хід реакції і на властивості кінцевих продуктів.

За способом проведення об'ємно-аналітичного визначення розрізняють такі методи:

· *метод прямого титрування*, в якому до розчину, що його аналізують, безпосередньо додається робочий розчин, концентрація якого відома і точна;

· *метод зворотного титрування*, в якому речовина, що її аналізують, спочатку реагує з реагентом, кількість якого точно відома і взята з надлишком; надлишок, що не прореагував, титрується робочим розчином;

· *метод заміщення* використовується у випадках, коли необхідно визначити нестійкі речовини; при цьому проводиться заміщення речовини, що аналізують, з іншою в еквімолярній кількості, яку потім і визначають.

До об'ємних (титриметричних) методів аналізу належать:

1. Методи нейтралізації, в яких використовуються реакції нейтралізації.

2. Методи оксидиметрії (редоксиметрії), які базуються на окисно-відновних реакціях.

3. Методи осадження, які ґрунтуються на кількісному осадженні іону, що його визначають.

4. Методи комплексонометрії, які базуються на реакції утворення розчинених комплексних сполук іонів металів з органічними речовинами (комплексонами).

4.7. КОНЦЕНТРУВАННЯ РОЗЧИНІВ МАКРОМОЛЕКУЛ

У ході наукових досліджень нерідко виникає потреба в тому, щоб концентрувати одержані розведені розчини. Для цього існує багато методів і способів, серед яких найчастіше використовуються такі:

1) *Випарювання на роторному випарнику.* Досліджуваний розчин вміщують в колбу, що швидко обертається, і з якої відкачують повітря (рис. 4.4). При цьому рідина утворює відносно тонку плівку, що спричиняється до значного збільшення відношення поверхні до об'єму рідини, яка випаровується, внаслідок чого різко зростає швидкість цього процесу. Вакуум забезпечує умови, за яких уся система випарника заповнюється тільки паром води, що й обумовлює інтенсивне випарювання розчину (навіть при кімнатній температурі). Пара води конденсується на холодильнику і надходить до колби-приймача.

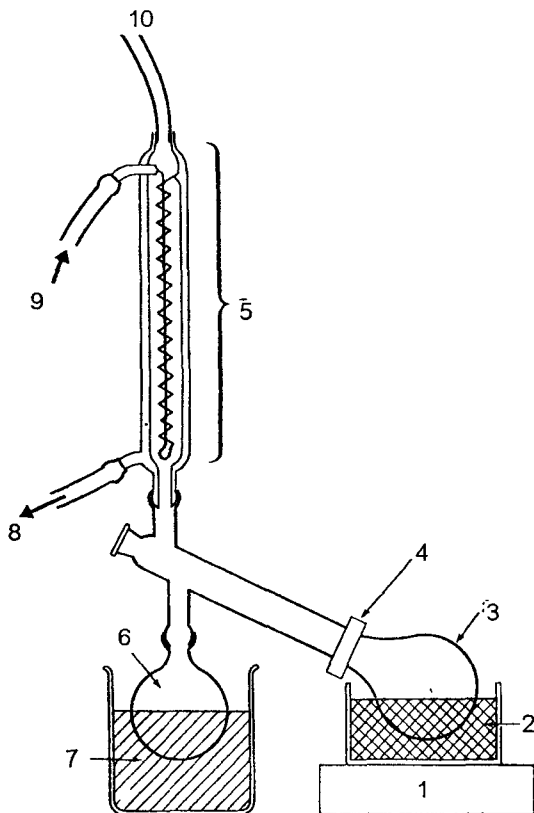


Рис. 4.4. Будава роторного випарника:

- 1 - нагрівач; 2 - водяна баня; 3 - колба; 4 - ротор, 5 - холодильник;
- 6 - пастка; 7 - охолоджуюча суміш (ацетон - сухий лід);
- 8 - виведена вода; 9 - введена вода; 10 - вакуум

Таким чином, у процесі виділення й очищення макромолекул методом випарювання на роторному випарнику можна вилучити потрібну кількість розчинника і при цьому не піддавати молекули дії тих температур, які здатні викликати денатурацію їх або дисоціацію.

2) *Ліофілізація*. Відомо, що при достатньо низькому тискові лід здатний інтенсивно сублимуватися. На цій властивості льоду базується метод ліофілізації. Досліджуваний розчин в колбі заморожується і відкачується повітря. В цих умовах водяна фракція у вигляді льоду сублимується, і таким чином розчин концентрується.

3) *Висолювання за допомогою сульфату амонію*. Для більшості білків існує гранична концентрація сульфату амонію, вище якої білок випадає в осад. Для кожного білка гранична кількість сульфату амонію різна, що дозволяє експериментатору розділити суміш білків у розчині. Після осадження осад білка одержують шляхом центрифугування, а потім знову осад розчиняють, але в меншому об'ємі будь-якого потрібного буфера. Приготування розчинів сульфату амонію різного ступеня насичення наведені в додатку 12.

4) *Мембрани з порожнистих волокон*. Концентрування розчинів можна досягти за допомогою спеціальних пристроїв (наприклад, Bio-Fiber), в яких на вході і виході прикріплені пучки напівпроникних порожнистих волокон. Якщо у волокні створити відповідний тиск, то розчинник буде проходити крізь стінки волокон, а розчин макромолекул концентруватися.

5) *Концентрування розчинів макромолекул методом діалізу*. Якщо розчин помістити в камеру, одна зі стін якої являє собою напівпроникливу перегородку-мембрану (наприклад, Diaflo або Pellicon), то швидкість проходження малих молекул й розчинника крізь неї буде зростати зі збільшенням тиску, який при цьому задається. Макромолекули за цих умов крізь мембрану не проходять, а, отже, концентруються (рис. 4.5).

У деяких випадках вдаються до заходу — діалізний мішок з досліджуваним розчином залишається на повітрі. При цьому розчинник з нього випаровується, а розчин концентрується. Для прискорення процесу випаровування діалізний мі-

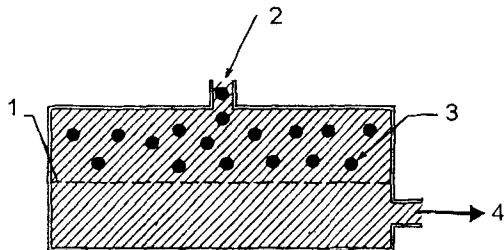


Рис. 4.5. Концентрування макромолекул з використанням мембран Diaflo або Pellicon: 1 - мембрана; 2 - розчин; 3 - макромолекули; 4 - розчинник

шок обкладають сухими високорозчинними полімерами (наприклад, поліетиленгліколем); у такому разі розчинник з мішка буде прагнути до полімеру. Аналогічно можна використовувати сахарозу, але при вилученні води вона здатна проникати в мішок, бо легко діалізується.

Нарешті, для концентрування розчинів можна використовувати спеціальні концентратори Minicon (рис. 4.6). Це пристрої, в яких проникна мембрана підтримується прокладкою абсорбенту. Роз-

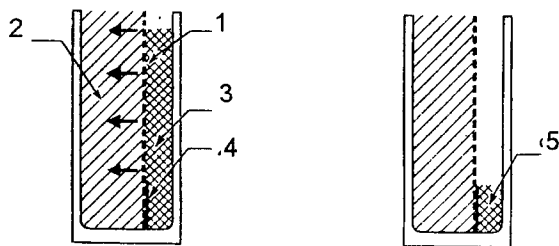


Рис. 4.6. Будова концентратора Minicon

1 - мембрана; 2 - абсорбент; 3 - розчин; 4 - непрониклива мембрана;
5 - зконцентрований розчин

чинник та інші малі молекули здатні проходити крізь мембрану і поглинатися абсорбентом. Коли рівень рідини досягає непроникної перетинки, концентрування закінчується.

5. ЛАБОРАТОРНІ ТВАРИНИ

5.1. ГРУПИ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН ТА КЛАСИФІКАЦІЯ ЇХНІХ ВІКОВИХ ПЕРІОДІВ

Розробка ефективних засобів і методів профілактики та лікування захворювань людини й тварин, а також вивчення механізмів захисту та підвищення стійкості організмів до дії несприятливих факторів довкілля, проблем спадковості тощо не можливі без проведення складних біохімічних досліджень на лабораторних тваринах.

У цій главі будуть наведені дані, найбільш необхідні для експериментальних досліджень в біохімії. Докладні відомості про анатомо-фізіологічні особливості, специфіку утримання, розведення тощо окремих видів тварин викладені в спеціальних виданнях.

При виконанні наукових досліджень з використанням лабораторних тварин необхідно керуватися цілями і завданнями досліджень, анатомічними, фізіологічними, морфологічними, біохімічними та іншими особливостями тварин, а також економічною стороною експерименту. Крім того, необхідно знати і враховувати видові, вікові, статеві, добові і сезонні особливості реакцій цих тварин на фізіологічні, патогенні, фармакологічні та інші впливи. Врахування цих особливостей дозволить правильно добрати лабораторних тварин, уникнути елементів випадковості в дослідженнях та похибок в аналізі одержаних даних.

Кожний вид тварин може бути використаний як об'єкт для різного роду наукових досліджень. Нині для експериментальних біохімічних досліджень використовується близько 250 видів тварин. Традиційно це ссавці, особливо домашні і сільськогосподарські тварини (собаки, кішки, кролі, кози, вівці, свині, велика рогата худоба, коні тощо), дикі тварини (мавпи, вовки, лисиці, гризуни та ін.), домашні птахи (кури, гуси, качки тощо), дикі птахи (горобці, синиці, канарки та ін.), земноводні (жаби), риби, плазуни, деякі кишковопорожнинні, комахи.

З навчальною (експериментальною) метою в біохімічних дослідженнях найчастіше використовуються миші, щурі, морські свинки і кролі, оскільки вони порівняно дешеві, їх легко утримувати, а при роботі з ними запезпечується достатньо високий ступінь пізнання біохімічних процесів у життєво важливих органах.

В наукових дослідженнях використовуються, як правило, тварини, які були розведені та утримувалися в спеціальних господарствах

(розплідниках) або віваріях. Створення міцної бази лабораторного тваринництва є запорукою нових відкриттів та значних досягнень у галузі біології, медицини, ветеринарії.

За ініціативою ЮНЕСКО в 1956р. при ООН був створений Міжнародний комітет по лабораторних тваринах (International Comitee of Laboratory Animals, ICLA). Ця організація разом з іншими міжнародними науковими товариствами і організаціями в галузі біології, медицини, ветеринарії координує співробітництво між різними країнами світу з лабораторного тваринництва, удосконалює методи стандартизації лабораторних тварин, передає певні лінії тварин із однієї країни в іншу, розробляє методи утримання лабораторних тварин та догляду за ними, правила гуманного поводження з ними.

Лабораторні тварини умовно можна розділити на такі групи:

1. *Традиційні (звичайні, конвенційні) лабораторні тварини.* В цю групу входять тварини, які вже протягом 50 — 100 років використовуються для проведення науково-дослідної роботи (безпородні білі миші і щури, собаки, кішки, кролі, морські свинки, жаби тощо).

2. *Домашні і сільськогосподарські тварини,* котрі використовуються як лабораторні (кози, свині, вівці (барани), телята, коні, кури, гуси, качки та ін.).

3. *Генетично контрольовані тварини,* використання яких дає можливість отримувати однорідні результати (інбредні та конгенні лінії, гібриди різних ліній, мутанти).

До цієї ж групи належать *лінійні тварини* — гомозиготні тварини однієї породи, яка походить від одного самця — родоначальника лінії, який має господарські або інші цінні якості. Інбредні лінійні тварини одержують методом тісного безперервного інбридингу, тобто внаслідок близького внутрішньородинного спаровування. Інбредні лінії лабораторних тварин, які носять у собі додатковий чужерідний ген, називаються *конгенними (коізогенними) лініями.*

Дигібридних тварин отримують шляхом схрещування двох чистих ліній, які різняться між собою лише за однією парою ознак. Тригібриди — це складні гібриди, одержані на основі схрещування двох комбінацій дигібридів першого покоління.

Спадкові зміни, спричинені геномними, хромосомними та генними мутаціями, виникають у окремих тварин. Мутантні стоки (від англ. — stock, мутант) — це спадково змінені нащадки лабораторних тварин, в яких спонтанно або під дією хімічних речовин чи певних зовнішніх причин сталися зміни ознак, що передаються спадково.

4. *Гнотобіоти ("стерильні" лабораторні тварини)* — це тварини, в організмі яких немає мікроорганізмів, гельмінтів, членистоногих

тощо; такі тварини контролюються щодо мікрофлори.

Розрізняють такі види гнотобіотів: повністю позбавлені мікроорганізмів (безмікробні, монобіоти) та гнотоформні тварини, тобто заражені одним (диобіоти) або декількома видами (полібіоти) мікробів.

До безмікробних відносяться також безвірусні тварини. Ще одна група "стерильних" тварин — це безантигенні. У випадках, коли безмікробних тварин переносять у мікробне середовище (тобто проводять конвенціоналізацію), отримують лабораторних ексбезмікробних тварин.

Тварини, вільні від специфічних патогенних збудників інфекційних та інвазійних захворювань, займають в певному розумінні проміжне становище між гнотобіотами і звичайними лабораторними тваринами (СПВ—тварини або SPF—тварини, що означає Specific pathogen free).

Найширше використовуваними в дослідках безмікробними ("стерильними") і СПВ—тваринами є миші, щури, морські свинки, меншою мірою використовуються собаки, мініатюрні свині, телята, а кури і перепілки — безлейкозними тваринами.

5. *Нові види лабораторних тварин.* До цієї групи входять такі дрібні лабораторні тварини гризуни, як золотистий, сірий і джунгарський хом'ячки, пісчана монгольська, звичайна, руда, темна, степова полівки, білки, бабаки, ховрашки; морські тварини: дельфіни, морські їжаки та зайці, восьминоги; сумчасті: кенгуру, опосуми; плазуни: ящірки, крокодили; деякі представники риб, земноводних, комах; деякі види мавп.

Ці види тварин необхідні для моделювання найбільш адекватних захворювань людини і тварин, для вирішення питань трансплантації тощо. Такими тваринами, зокрема, є мініатюрні свині, яких використовують у дослідках для вирішення питань патогенезу, профілактики і лікування захворювань серцево—судинної системи.

З урахуванням анатомо—фізіологічних особливостей тварин, інтенсивності їхнього росту, змін у статевій системі тощо розроблена класифікація вікових періодів індивідуального розвитку таких ссавців: білих мишей і щурів, морських свинок, кролів, собак, кішок, золотистих хом'ячків.

Постнатальний розвиток тварин поділено умовно на чотири періоди (I—IV): молочного годування, статевого дозрівання, репродуктивний і виражених старечих змін. У свою чергу періоди за віком поділяються на дев'ять підперіодів (1—9). В узагальненому вигляді класифікація вікових періодів така:

I. Період молочного годування. В цей період тварини спожива-

ють молоко матері. З'являється шерстний покрив, прорізаються молочні зуби. Відбувається інтенсивний ріст — щодобовий приріст маси тіла на 5–15%, довжини тіла — на 2–8%.

1. *Вік новонароджений*. Шерстного покриву немає. Годівля тварини молочивом, зубів немає (морські свинки народжуються з шерстним покривом, мають усі зуби; кроленята при народженні мають 16 зубів).

2. *Вік підсисний (сисуні)*. З'являється пігментація шкіри і шерстний покрив. Відкриваються очі та вуха, реалізовується поза сидіння. Тварини пересуваються по гнізду (місцю мешкання).

II. Період статевого дозрівання. Самостійна годівля. Тварини залишають місце мешкання. Добре розвиваються рухові акти. З'являються вторинні статеві ознаки. Молочні зуби змінюються постійними. Відбувається інтенсивний ріст тварин: щодобовий приріст маси тіла на 1–8%, довжини тіла — на 0,5–2%.

3. *Вік нестатевозрілий (інфантильні тварини)*. Тварини здатні жити без матері. Розвиваються рухові акти, з'являються вторинні статеві ознаки.

4. *Вік передоспарювання (ювенільні тварини)*. Добре виражені вторинні статеві ознаки, з'являється потяг до статевому акту. У собак змінюються різці, з'являється 6-й зуб, а в кішок закінчується зміна зубів.

III. Період репродуктивний. Завершується розвиток статевих органів, диференціюються вторинні статеві ознаки. В самок встановлюються статеві цикли. Відбувається інтенсивне розмноження. Знижується лінійний ріст тварин, тварини фізично добре розвинуті.

5. *Вік молодий*. Відбувається спаровування тварин. Приплід численний. Зуби без ознак стирання.

6. *Вік зрілий*. Інтенсивність розмноження знижується. З'являються перші ознаки стирання зубів. Зокрема, репродуктивний період триває в білих мишей 3–10 міс.; білих щурів — 5–18 міс.; морських свинок — 6–31 міс.; кролів (шиншила) — 9–28 міс.; золотистих хом'ячків — 3–12 міс.; кішок — 7–36 міс.; собак (німецька вівчарка) — 1–5 років.

IV. Період виражених старечих змін. Різде зниження з подальшим припиненням репродуктивної функції. Настання менопаузи. Ріст тіла гальмується і припиняється. Рухова активність знижена. Поверхня зубів стерта. Виникає атрофія м'язів, шерсть втрачає блиск, стає рідкою.

7. *Вік передстаречий*. Знижується інтенсивність розмноження, приплід нечисленний і часто нежиттєздатний. У самок порушуються статеві цикли.

8. *Вік старечий*. Розмноження різко знижене або відсутнє. В

більшості самок настає менопауза. Шерстяний покрив рідкий. На зубах коричневий наліт, їхня поверхня стерта.

9. *Вік гранично старечий.* Статева функція припинена. Значне облісіння. Маса тіла знижена. Зуби стерті. Загальне одряхління організму.

5.2. ПРИНЦИПИ ВИБОРУ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН ДЛЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ ТА ПОВОДЖЕННЯ З НИМИ

Вид вибраних для експерименту лабораторних тварин, якість їхнього здоров'я, відсутність прихованих збудників інфекційних і паразитарних захворювань, генетична однорідність тощо, а також умови утримання, догляду та годівля суттєво впливають на результати досліджень.

Експериментальні дослідження з лабораторними тваринами ґрунтуються також на даних порівняльного вивчення біохімічних, анатомо—фізіологічних, функціональних, морфологічних та інших особливостей тварин різних видів, які дозволяють створювати біологічні моделі різних станів і захворювань людей та сільськогосподарських тварин.

Піддослідних тварин доцільно підбирати однорідними за статтю, віком, масою тіла, генетичними характеристиками. При плануванні наукової роботи необхідно вивчити питання який вид або лінія лабораторних тварин найбільш придатні для досліджень, зважити на реальну можливість придбання даних тварин і врахувати економічний бік експерименту (вартість утримання та догляду за тваринами, витрати на реактиви й експлуатацію обладнання тощо). Для вирішення конкретних наукових завдань важливо підібрати найбільш відповідні моделі і таких лабораторних тварин, які відповідатимуть досягненням поставленої мети. При цьому чисто економічні розрахунки не повинні домінувати над науковими планами.

Відібраних для досліджень тварин необхідно ретельно оглянути і вибракувати хворих або підозрюваних на захворювання.

У дослідженнях слід зважити на сезонні й добові коливання функціонального стану центральної нервової та ендокринної системи, а також коливання атмосферного тиску, рівень іонізації повітря тощо. Це дозволить уникнути похибок в експерименті.

При підборі лабораторних тварин для проведення довготривалих досліджень, (у тому числі для вивчення хронічної дії різних чинників довкілля, а також харчових, лікарських та інших речовин) необхідно

враховувати таке: 1) стійкість відібраних тварин до інфекційних хвороб; 2) дані про середню тривалість життя тварин; 3) дані про каріотип, особливості вікової зміни імунного статусу, анатомо-фізіологічних, біохімічних, морфологічних та інших ознак; 4) особливості живлення і діяльності органів травлення; 5) особливості утримання піддослідних тварин та догляду за ними відповідно їхнього життя на волі.

З врахуванням цих вимог для проведення довготривалих досліджень найчастіше використовуються дрібні лабораторні гризуни — миші, щурі, морські свинки, хом'ячки тощо, а також собаки, мініатюрні свині.

При виборі лабораторних тварин для експерименту слід враховувати, що нелінійних тварин у дослідах використовується значно більше, ніж лінійних. Відбувається це тому, що результати дослідів на нелінійних тваринах часто вказують на виражену індивідуальну реакцію тварин в умовах проведення досліду, і саме тому одержані результати часто значною мірою відрізняються між собою. Дослідження на інбредних тваринах дають більш однорідні результати. Певним чином на вибір лабораторних тварин впливають традиції, які склалися щодо використання піддослідних тварин у генетиці, фізіології, імунології, токсикології, ендокринології, онкології, фармакології, гігієні та інших галузях науки.

Першими піддослідними тваринами в генетиці були дрозофіли і миші; у фізіології та фармакології — собаки і кішки; класичній імунології — морські свинки і кролі; токсикології — миші; онкології — лінійні миші.

Для проведення досліджень у біохімії, фізіології, імунології доцільно використовувати велике число різних генотипів, тобто проводити досліди на тваринах (мишах, щурах) декількох ліній і гібридів.

Науковим дослідженням з використанням лабораторних тварин повинен передувати період введення їх у дослід. Тривалість цього періоду визначається завданнями досліджень, вибором об'єкта експерименту, обставинами досліду тощо і продовжується, як правило, від декількох тижнів до декількох місяців.

За час періоду підготовки тварин до початку наукових досліджень вони повинні звикнути до нових умов експерименту, обслуговуючого персоналу і дослідника. Якщо тварина упирається або виявляє агресивність, то не бажано вдаватися до больових заходів, а необхідно лагідно заспокоїти її і привчити до себе.

Протягом введення тварин у дослід за ними проводиться ретельний ветеринарний нагляд, і тварини з підозрою на захворювання ви-

бракуюються.

З метою додержання принципів наукового проведення експериментальних досліджень на лабораторних тваринах і гуманного ставлення до піддослідних тварин у ряді міністерств України (Міністерстві охорони здоров'я, Міністерстві освіти і науки та ін.), Академії наук України, Українській аграрній академії наук створені комісії по експериментальній роботі з тваринами. Україна є членом Міжнародної федерації по захисту тварин (створена в 1967 р.), яка прийняла спеціальні постанови щодо обмеження використання тварин для експериментів, а також правила поводження з ними. Для виконання експериментальних досліджень на тваринах допускаються лише особи, які мають відповідну вищу освіту (біологічну, медичну, ветеринарну, зоотехнічну), причому після того, як ними будуть засвоєні правила поводження з лабораторними тваринами і отримані практичні навички.

Особи, які мають відповідну середню освіту, лаборанти і студенти, можуть виконувати нескладні і безболісні процедури на тваринах тільки і лише після ознайомлення з правилами поводження з лабораторними тваринами і оволодіння певними навичками під контролем наукового співробітника.

При догляді за лабораторними тваринами та проведенні на них експерименту необхідно керуватися правовими й етичними принципами, які передбачають гуманне ставлення до тварин і дозволяють завершити дослідження без заподіяння болі, страждань і каліцтва. Процедури на тваринах, які супроводжуються больовими подразненнями або травмами, треба проводити під місцевою анестезією або наркозом (за винятком спеціальних експериментів). Необхідно пам'ятати що м'язеві релаксанти позбавляють рухомості, але не болю, і тому застосування їх обов'язково має поєднуватися з призначенням препаратів, що усувають біль.

Забороняється повторно використовувати тварин, на яких проводилися контрольні спостереження по оцінці біологічних препаратів, а також тих, що використовувалися як донори та для імунізації. Піддослідним тваринам, яким були зроблені різні операції, необхідно забезпечити кваліфікований післяопераційний догляд.

При проведенні певних досліджень лабораторних тварин необхідно фіксувати в потрібному положенні. При цьому недопустиме грубе ставлення до них, а також завдання їм больових відчужень. Для кожного виду тварин існують індивідуальні способи фіксації, які включають ряд загальних елементів.

Фіксація на короткий час дрібних тварин проводиться руками. Так, фіксацію мишей можна провести таким чином: великим і

вказівним пальцями руки захоплюється шкіра в області спини, а іншими пальцями утримуються задні кінцівки і хвіст. Щурів короткочасно можна фіксувати так: однією рукою беруть щура за шкіру в області потилиці (цим фіксуються голова і передні кінцівки) а другою рукою утримують задні кінцівки і хвіст. Можна фіксувати щурів за допомогою двох корнцангів, одним з яких захоплюють шкіру на потилиці, а другим — біля хвоста. На кінцівки корнцангів натягуються гумові насадки, щоб не завдати болю тваринам при захопленні шкіри.

Морські свинки при короткочасній фіксації утримуються, як правило, таким чином: однією рукою утримують тварин за спину і під груди так, щоб великий і вказівний пальці охоплювали шию, а інші пальці обмежували рух голови і кінцівок; другою рукою знизу утримують задню частину тіла і обмежують рух задніх кінцівок.

Кішок короткочасно фіксують таким чином: однією рукою беруть кішку за шкіру в області потилиці, а другою — за шкіру в області крижів або за обидві задні кінцівки.

При короткочасній фіксації собак одягають лямки на їхні передні і задні (або тільки на задні) кінцівки і кладуть собаку на стіл. Якщо собака невеликий за розмірами і приручений, то можна покласти його на стіл і утримувати лапи руками, а ліктями притиснути тулуб і голову до столу. Щоб уникнути укусів, собаці доцільно надіти намордник або зав'язати щелепи (морду) міцною мотузкою. В середній частині цієї мотузки робиться петля, яку надягають на морду собаки так, щоб ця петля не могла зсунутись, затягують її під нижньою щелепою, а кінці мотузки закріплюють на потилиці подвійним вузлом.

Для фіксації на відносно довготривалий час мишей, щурів, кролів, кішок, хом'ячків та інших невеликих за розміром тварин їх обгортають куском матерії або клейонки. Для фіксації дрібних тварин у дослідах при нанесенні препаратів на шкіру, рекомендується використовувати спеціальні жилети, які виготовляють з щільної матерії або тонкої гуми. В жилетах передбачені отвори для задніх кінцівок тварин, а також віконця для нанесення на шкіру досліджуваних препаратів.

Довготривала фіксація відносно невеликих тварин (мишей, щурів, морських свинок, кролів та ін.) виконується за допомогою спеціальних камер (ящиків) або іммобілізаційних станків, конструкція яких залежить від виду тварин і мети досліджень. Для повної і надійної фіксації тварин прив'язують спеціальними способами в необхідному положенні (на боці), черевом донизу чи вгору до операційного столу, станка або лежачка (собак, кішок, кролів).

У певних випадках виникає потреба ввести в організм лабораторних тварин досліджувані препарати, а також взяти кров для

аналізу. Так, деякі речовини можна вводити в організм їжею і питною водою. Тверді речовини у вигляді пігулок або капсул вводяться, наприклад, собакам через рот. Якщо тварина відмовляється ковтати введену в рот речовину, необхідно викликати ковтальні рухи, для чого тварині закривають ніздрі або роблять легкий масаж глотки.

Оральне введення розчинів, а також нерозчинних речовин, які приготовлені у вигляді водних зважок, великим тваринам здійснюються за допомогою шлункового гумового зонда (собакам, кішкам, кролям тощо), а дрібнішим (щурам, мишам та ін.) — металевим зондом, виготовленим з голки шприца, при цьому тварина фіксується методом короткочасної фіксації.

Інтраназальне введення проводиться таким чином: голова тварини піднімається носом догори і за допомогою шприца, на кінець якого насаджена гумова трубочка або невеликий катетер, вводиться необхідна рідина. Трубочка (катетер) вводиться в один з носових ходів. Таким способом собакам і кішкам можна вводити 1–4 мл рідини, кролям — до 1 мл, щурам і мишам — 0,1–0,4 мл.

Ректальне введення проводиться після очисної клізми. За допомогою гумової трубочки або невеликого катетера, з'єданого зі шприцем, у порожнину прямої кишки вводиться підігріта до температури тіла рідина. Собакам вводиться 200–300 мл рідини, кішкам і кролям — 3–8, морським свинкам — до 4, щурам — до 1, мишам — до 0,5 мл.

Шкірне введення проводиться на позбавленій шерсті ділянці шкіри, на якій скарифікаційною голкою або наждачним папером порушується епідерміс (до появи крові). На цю підготовлену ділянку і наноситься препарат.

Підшкірне введення проводиться на вистриженій ділянці спини, стегна або потилиці. Для цього пальцями однієї руки береться шкіра в складку, біля основи цієї складки робиться прокол і вводиться рідина. Собакам можна ввести 5–20 мл, кішкам — до 10, кролям — до 20, морським свинкам — до 15, дорослим щурам — до 10, мишам — до 1 мл.

Внутрішньошкірне введення проводиться після ретельного вибривання волосся або видалення його депілятором. Найкраще місце — спина. Тонкою голкою у вибраній ділянці робиться прокол, голка вводиться паралельно поверхні шкіри. При правильному введенні виникає здуття. Собакам вводять 2–3 мл, кішкам — до 1, кролям і морським свинкам — до 0,2, щурам і мишам — 0,02–0,05 мл.

Внутрішньом'язове введення рекомендується проводити у м'язи стегна. Шкіра притискається до прилеглих тканин і голка одночасно вводиться залежно від розміру тварини на глибину 1–5 см. Собакам

дозволяється вводити 10–12 мл рідини, кішкам — до 5, кролям — 5–10, морським свинкам — до 1, щурам — до 5, мишам — до 0,5 мл.

Внутрішньочеревне введення проводиться таким чином: однією рукою береться стінка черева в складку і в основу цієї складки робиться прокол. Після цього голка проводиться вздовж складки, проколюється черевна стінка і вводиться рідина в черево. Собакам вводиться 10–20 мл рідини, кішкам — 5–10, кролям — до 20, морським свинкам — до 2, щурам — до 5, мишам — до 2 мл.

Внутрішньовенне введення проводиться тваринам, які міцно фіксуються. Собакам можна ввести 10–20 мл рідини в підшкірну вену гомілки, стопи або передпліччя, кішкам — в ці ж вени до 5 мл, кролям — в крайову вушну вену або підшкірну вену гомілки до 20 мл, морським свинкам — у підшкірну вену гомілки до 4 мл, щурам і мишам — у вену хвоста відповідно до 5 і 0,5 мл.

Внутрішньосерцеве введення проводиться під наркозом тварині, яка фіксована черевом догори. Місце уколу вистригають, дезинфікують розчином спирту або йоду. В третьому міжреберному проміжку шприцем роблять прокол, вводять кінчик голки в серце. Собакам (залежно від розміру тварини) внутрішньосерцево можна вводити 2–10 мл рідини, кішкам — 1–2, кролям — до 5, морським свинкам — до 1, щурам — до 1, мишам — до 0,1 мл.

Існують ще інші способи введення речовин, зокрема внутрішньомозкове і субоципітальне.

Кров лабораторних тварин беруть декількома способами. Перед взяттям крові місце надрізу чи уколу дезинфікують розчином спирту або йоду. Кров можна брати з краю мочки вуха після надрізу. У відносно великій кількості кров беруть з вен: у собак — до 20 мл з вен гомілки або зовнішньої яремної вени; у кішок — з тих же вен до 2–5 мл; у кролів — з крайової вени вуха, стегнової і зовнішньої яремної вен, а також з печеристого синуса (у внутрішній кут ока, між орбітою і очним яблуком, голка вводиться вздовж кістки в горизонтальному напрямку) шприцем відбирається до 10 мл крові, а в деяких випадках — до 50 мл; у морських свинок кров береться, як правило, при проколі ступні або (як і в кролів) з печеристого синуса — до 4 мл; у щурів кров береться з вушної раковини, ретробульбарного венозного сплетіння, з хвостової вени, а також при обрізуванні кінчика хвоста — до 5 мл; у мишей кров беруть, як правило, з ретробульбарного венозного сплетіння або при обрізанні кінчика хвоста — до 0,5 мл.

Існують також інші способи забору крові в лабораторних тварин. Один з них — пункція серця. Тварину після наркозу фіксують черевом догори і у вибраному місці в неї вистригають шерсть, дезинфікують

це місце розчином спирту або йоду. Голка вводиться в серце, і кров набирається у шприц. У собак при пункції серця можна взяти до 250 мл крові, кішок — до 20, кролів — 25–30, морських свинок — до 10, щурів — до 8, мишей — до 0,5 мл.

Тварини, в яких унаслідок експерименту знизилася життєздатність, підлягають умертвінню (евтаназії) гуманним методом. Умертвіння тварин не повинно виконуватись у приміщенні, де знаходяться інші тварини.

Умертвіння тварин зі зниженою життєдіяльністю, а також для вилучення досліджуваних органів і тканин рекомендується проводити декількома методами. Дрібних тварин (мишей, щурів, птахів, жаб та ін.) умертвляють часто шляхом декапітації, при цьому доцільно використовувати спеціальні гільйотини. Більші тварини (морські свинки, хом'ячки, кролики, кішки, собаки та ін.) умертвляються, як правило, шляхом передозування (в 2–3 рази) наркотичних речовин (ефіру, хлороформу, барбітуратів та ін.). Свиней, великих собак та інших великих тварин умертвляють, пропускаючи електричний струм при накладанні електродів у області довгастого мозку і крижів.

Менш ефективним способом умертвіння є відтворення множинної повітряної емболії внутрішньовенним введенням повітря або повним обезкровлюванням при використанні різних методів обезболювання.

В дослідах на тваринах з використанням наркозу, міорелаксантів і штучного дихання умертвіння можна проводити шляхом відключення штучного дихання.

При необхідності дослідження ультраструктури органів дрібних тварин, (зокрема мозку), використовується метод миттєвого умертвіння шляхом замороження в рідкому азоті.

Знищувати трупи лабораторних тварин можна лише після констатації смерті тварини особою, яка відповідала за проведення експерименту.

Порушення вимог проведення експерименту і правил гуманного ставлення до тварин бере під сумнів наукову цінність досліджень, тягне за собою дисциплінарне покарання, а також заборону наукових публікацій і захист дисертацій.

5.3. ОСНОВНІ ПРАВИЛА УТРИМАННЯ ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН

Багато видів диких тварин, яких спеціально стали вирощувати в неволі для використання в експериментах, успішно адаптовуються і добре розмножуються в створених людиною розплідниках. Особливістю утримання лабораторних тварин є обмеження рухомості і пересування по невеликих площах помешкання. Тому для таких тварин насамперед необхідно створити належний мікроклімат.

Крім розплідників лабораторні тварини утримуються у віваріях (від лат. *vivus* — живий). *Віварій* — це приміщення для утримання тварин з метою проведення науково-дослідної роботи. В них під контролем спеціалістів утримується відносно невелика кількість тварин. В окремих випадках, при наявності спеціалістів і можливостей, у віварії може бути організоване розведення певних тварин (мишей, щурів, морських свинок тощо). Структура віварію залежить від завдань, які стоять перед ним, а також видів тварин, які повинні в ньому утримуватися. Влітку для утримання деяких тварин бажано обладнати вольєри.

Умови утримання лабораторних тварин передбачають необхідність добре вентильованих, світлих і теплих приміщень, забезпечення повноцінним харчуванням і свіжою водою в необхідній кількості, виконання зоогігієнічних вимог.

Клітки для утримання лабораторних тварин повинні забезпечувати їм певну свободу пересування і бути легкими, стійкими до дії дезинфікуючих речовин. Крім того, вони мають бути виготовлені із такого матеріалу, який тварини не змогли би пошкодити. На кожній клітці, як у боксі віварію, так і у вольєрі, повинні бути етикетки, на яких вказані основні відомості про тварин (вид, лінія, стать, вік, маса тіла, дата початку експерименту, назва лабораторії (відділу), прізвище співробітника, який відповідає за дослід тощо). Лабораторних тварин необхідно забезпечити сухою і чистою підстилкою. Це можуть бути тирса, дрібна солома, сухе листя та ін.

Важливою умовою утримання здорових лабораторних тварин є організація повноцінного нормованого харчування. В усіх клітках необхідно встановлювати постійні автоматичні або які не перекидаються, поїлки та годівниці. Годувати лабораторних тварин треба відповідно до науково розроблених кормових норм і раціонів. *Кормові норми* — загальна кількість поживних речовин, які необхідно дати тварині на добу. Вони виражаються в кормових одиницях і кількості білка. На основі кормових норм для кожної групи тварин складаються

ся кормові раціони на той чи інший період утримання.

Використання лабораторних тварин в експерименті передбачає наявність у кожної тварини свого номера. Великим тваринам (мавпам, собакам, козам та ін.), які утримуються у віварії в невеликих кількостях і яких можна відрізнити за зовнішніми ознаками, присвоюють клички. Якщо великих тварин багато, їх мітять шляхом нанесення індивідуального номера на внутрішній поверхні стегна, яка має слабкий волосяний покрив. Собакам номер наносять на ошийник.

Існує цілий ряд способів мічення лабораторних тварин. Основні з них такі: 1) *татування вух* у тварин, які мають великі непігментовані вуха (мініатюрні свині, кролі, морські свинки та ін.); татування проводять спеціальними щипцями або звичайною голкою, використовуючи для цього спеціальні барвники; 2) *клеювання* — нанесення надрізів на вушні раковини ножицями або проколів компостерними щипцями із застосуванням обезболюючих і протиінфекційних засобів; 3) *мічення мишей, щурів, морських свинок* — нанесенням фарби (насиченого розчину пікринової кислоти тощо) у вигляді крапок або смужок на спину або боки; 4) *вистригування шерсті* (таке мічення зберігається не більше одного тижня); 5) *ампутація* під наркозом у певному порядку кінцевих фаланг на лапках.

Можна мітити лабораторних тварин, (у тому числі й новонароджених), за допомогою кілець, бляшанок, жетончиків з м'якої бляхи, які прикріплюються на вухах або лапках і на яких нанесено номер.

Для запобігання захворювання лабораторних тварин, які особливо чутливі до інфекційних хвороб, слід вживати всіх попереджувальних заходів. Цього можна досягнути тільки при дотриманні правил зоогієни, забезпеченні необхідного ветеринарного обслуговування, високій кваліфікації обслуговуючого персоналу. Робітники розплідників і віваріїв повинні особливо увагу приділяти дотриманню правил особистої гієни, обов'язково користуватися спецодягом і спецвзуттям.

Необхідно суворо дотримуватися чистоти посуду, кліток і приміщень, постійно вживати заходи щодо ліквідації переносників інфекційних захворювань лабораторних тварин (бліх, клопів, кліщів, вошей, мух).

Профілактична дезинфекція приміщень віварію, стелажів для кліток, іншого обладнання проводиться не менше як два рази на рік (весною і восени), вона полягає в обробці після їх старанного миття 3% розчином лугу, 2% розчином хлораміну та ін. Годівниці, поїлки і клітки дезинфікують щодня 3–5% розчином карбонату натрію (соди), а раз на тиждень автоклавуванням, кип'ятінням тощо.

Отримувати лабораторних тварин треба тільки із спеціальних розплідників. Проте їх можна закуповувати у сільськогосподарських підприємствах, а собак і кішок — у населення, але за умови висновку ветслужби про стан здоров'я тварин.

Необхідною умовою утримування тварин для експериментальних досліджень є проходження карантину (утримання в ізольованому відділенні). Якщо тварини придбані в тому ж місті (районі) із спеціального розплідника, достатньо тридобової ізоляції їх для адаптації до нових умов утримання. В разі отримання тварин не зі спеціалізованого розплідника доцільно витримати в умовах карантину мишей і щурів — 10 днів; собак і кішок — 30; морських свинок, кролів, птахів та інших лабораторних тварин — 21 день.

Термін карантину може бути скорочений при проведенні короткотривалих експериментів, а також на вагітних самках, новонароджених або нестатевозрілих тваринах за умови їх повної ізоляції

6. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДІВ ВИВЧЕННЯ ОБМІНУ РЕЧОВИН

У біохімічній практиці особливості обміну речовин вивчаються або поза цілісним організмом (*in vitro*), або в умовах цілісного організму (*in vivo*).

6.1. МЕТОДИ ВИВЧЕННЯ ОБМІНУ РЕЧОВИН IN VITRO

Ці методи поділяються на аналітично–дизинтегруючі та синтезуючі. В основі перших лежить поетапне спрощення (дизинтеграція) складної біологічної системи. До них належать наведені нижче методи.

Метод ізольованих органів дає можливість вивчати окремі метаболічні системи в окремих органах, тканини яких не пошкоджені. Для цього ізольований орган (серце, печінка тощо) вміщується в прилад, який підтримує певну температуру, і через артерію вводиться рідина, котра містить сполуку, що досліджується. Аналіз рідини, яка витікає з вени, дозволяє прослідкувати за перетвореннями вказаної сполуки. Залежно від завдань та характеру дослідження перфузійну рідину можна вводити імпульсивно, одно– та багаторазово, самопливом або примусово.

Метод тканинних зрізів дозволяє вивчати газовий обмін та різноманітні зміни, які відбуваються з речовинами, що додаються до зрізів. Звичайно зрізи тканин завтовшки 0,2–5 мм одержують за допомогою бритви або мікротома. В таких зрізах співвідношення між зруйнованими та інтактними клітинами повинно залишатися не значним. Крім того, подібна товщина забезпечує вільний доступ кисню у найглибші шари зрізу та повне виведення продуктів розпаду за рахунок дифузії.

Для вивчення метаболізму в тканинах і дії введених сполук на обмінні процеси, зрізи, як правило, занурюють у відповідне середовище суспендування і створюють аеробні умови.

Методи досліджень на гомогенатах. *Гомогенізація* (від грец. *homogenes* — однорідність) — це спосіб надання однорідної структури, зокрема, біологічним речовинам, тканинам, клітинам та клітинним органодам з метою подальшого фракціонування або виділення потрібної субстанції. Гомогенати одержують механічним шляхом (розтиранням тканин у ступках, або в спеціальних апаратах — гомо-

генізаторах). Серед останніх найпоширенішим є гомогенізатор Поттера. Це витягнутий циліндр зі скла, в якому рухається тefлоновий поршень. Залежно від заданої величини зазора подрібнюються окремі органіди, мембрани, макромолекули.

Іноді для гомогенізації використовують височастотні ультразвукові коливання, під дією яких у середовищі утворюються порожнини, тобто порушується його суцільність під час руху відносно інших тіл. Таке явище називається *кавітацією* (від латинського *cavitas* — порожнява). Вона викликається розчиненими газами, які виходять у вигляді пухирців з розчину. Інтенсивне руйнування цих пухирців спричиняється до руйнування клітин, агрегатів молекул або макромолекул.

Крім наведеного вище способу гомогенізації, існують й інші методи подрібнення біологічних структур. Це, зокрема, заморожування–розморожування, автоліз, переварювання клітинних стінок ферментами (наприклад, лізоцимом, ліпазою тощо), обробка органічними розчинниками (ацетоном, толуолом, етилацетатом).

В кожному конкретному випадку при руйнуванні тканин і клітин треба враховувати різні параметри, зокрема температуру, тривалість та швидкість руйнування клітин, а також робочий тиск, який використовується при цьому. Ідеальним вважається такий гомогенат, який легко піддається подальшому фракціонуванню.

Досить важливим при гомогенізації, а також при проведенні експериментів на ізольованих органах, тканинних зрізах та органелах клітин є підбір відповідного середовища суспендування. Як правило, спочатку він носить довільний характер, а вже вибір того чи іншого середовища залежить від результатів попередніх дослідів; визначається, виходячи з рекомендацій науково–методичної літератури.

Треба мати на увазі, що середовище для суспендування повинне бути з відповідним рН та іонним складом. Головна вимога до середовища полягає в тому, щоб осмотичний тиск у ньому збігався з осмотичним тиском всередині клітини або клітинній органелі, щоб їхня метаболічна цілісність не порушувалась.

Існує багато індивідуальних прописів щодо збереження цілісності біологічних структур та захисту ферментів від інактивації. У більшості випадків для того, щоб запобігти набряканню й розриву біологічних структур і відповідно до цього створити в середовищі необхідний осмотичний тиск, використовується сахароза (маніт) різної концентрації з додаванням різних речовин (ЕДТА, β –меркаптоетанол тощо).

В біохімічних експериментах часто використовуються ізотонічні сольові розчини. Серед них найвживанішими є фосфатні та бікарбонатні розчини Кребса–Рінгера, які містять у різних кількостях

NaHCO_3 , CaCl_2 , KH_2PO_4 , MgSO_4 , KCl , NaCl , а також — глюкозу, фумарат, оксалоацетат, піруват; деякі розчини, насичені сумішшю газів — кисню та вуглекислого газу. Для дослідження культур тканин тварин використовуються розчини Хенкса та Гей–Ерля.

Метод одержання клітинних фракцій. Клітинні фракції можна одержати шляхом диференціального центрифугування. Цей метод заснований на розділенні речовин, які мають різну молекулярну масу та щільність, під дією відцентрової сили, що створюється під час обертання зразка. В центрифугах, унаслідок швидкого обертання пробірок із зразками розділення відбувається під дією сили, котра в тисячі разів перевищує силу земного тяжіння. Особливо ефективним є центрифугування із застосуванням водних розчинів, густина яких у пробірці зменшується знизу вгору (центрифугування в градієнті густини). Для створення градієнта густини використовують солі важких металів (рубідію, цезію), а також розчини сахарози. Якщо умови досліду потребують створення градієнта з певною густиною і низьким осмотичним тиском, застосовують фікол (співполімер сахарози та епіхлоргідрину), перевага якого полягає в тому, що він не проникає крізь клітинні мембрани.

Шляхом диференціального центрифугування можна одержати окремі субклітинні структури — ядра, мітохондрії, лізосоми, пероксисоми, рибосоми та ін.

Опис застосування методу центрифугування в біохімічній практиці детальніше розглядається в розділі 9.2.

При використанні клітинних фракцій вивчаються окремі біохімічні процеси, котрі протікають в різних ділянках клітини. Чистота активних фракцій підтверджується активністю ферментів, властивих тільки певним субстанціям (маркерні ферменти).

Методи дослідження екстрактів. *Екстракція (вилучення)* — це один із ефективних методів розділення та концентрування речовин. У поєднанні з іншими методами і прийомами екстракція є надійним ме-

тодом ідентифікації компонентів складних систем.

Метод екстракції ґрунтується на використанні різниці в розчинності речовин, що входять до суміші. Речовину, яку треба відокремити, можна екстрагувати як із суміші твердих речовин, так і з розчинів.

В екстракційному методі використовується така термінологія: *екстракт* — відокремлена органічна фаза, яка містить екстраговану речовину; *екстрагент* — органічний розчинник, який вилучає речовину, що досліджується, з водної фази; *реекстракт* — відокремлена водна фаза, яка містить вилучену з екстракту речовину; *реекстракція* — процес зворотного вилучення екстрагованої речовини з екстракту у водну фазу.

Речовини, які легко розчиняються у воді, екстрагують з суміші твердих речовин шляхом струшування або тільки промивання суміші розчинником на фільтрі. Якщо речовина малорозчинна, використовується апарат для екстракції (апарат Сокслета). При екстрагуванні органічних речовин, які містяться в розчині, застосовуються ділильні лійки будь-якої форми (циліндричні, кулясті, грушоподібні) та ємкості.

Якщо речовина значно краще розчиняється у воді, ніж в органічних розчинниках, екстракція проводиться у безперервно діючому екстракційному апараті, що дозволяє досить повно вилучити речовину невеликим об'ємом розчинника.

Існує декілька способів отримання екстрактів з тканин. Це, зокрема водяна або сольова екстракція; обробка тканини органічним розчинником з подальшим висушуванням; висушений порошок тканини надалі використовується для одержання водяних екстрактів і вивчення певних процесів обміну речовин даної тканини.

Методи фракціонування екстрактів тканин Для дослідження окремих речовин у тканинних екстрактах використовуються різні методи фракціонування. Вони базуються на різниці в розчинності екстрагованих речовин (білки, ферменти тощо) при дії концентрованих солей, органічних розчинників тощо.

— *Фракціонування шляхом підкислення.* З метою осадження певного ферменту або переведення в осад баластних білків до екстракту додається розчин відповідного буферу або кислоти. Якщо розчин екстракту має занадто кислу реакцію, то використовується розчин луґу для зменшення кислотності.

— *Фракціонування шляхом термічної обробки.* Органічні речовини, які знаходяться в екстракті, дуже чутливі до зміни температури. Особливо це відноситься до білків. Денатурація різних білків при зміні температури має досить обмежений характер. Навіть незначне підвищення температури може спричинитися до денатурації частини супутних білків.

— *Фракціонування солями.* При поступовому підвищенні концентрації солей білки (ферменти) внаслідок денатурації та нейтралізації заряду макромолекул випадають в осад. При цьому чутливість різних білків до певної концентрації солі різна, що дозволяє розділити їх на окремі фракції.

Концентрація солей, при якій білок випадає в осад, залежить від багатьох факторів, зокрема таких як природа солі, величина рН, температура, наявність супутних речовин у розчині, кількісний вміст білка тощо. Все це може впливати на ефективність фракціонування, і тому для кращого відтворення результатів слід враховувати кожний з перерахованих факторів.

Для фракціонування білкових сумішей використовуються нейтральні солі (NaCl , Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$). В біохімічній практиці найчастіше користуються сульфатом амонію, перевага якого полягає в тому, що його розчинність мало залежить від коливань температури і порівняно слабо впливає на фізико-хімічні характеристики та властивості одержаних фракцій.

Залежно від умов і завдань досліджень сульфат амонію використовується в сухому або розчиненому вигляді. Якщо в досліді не бажане збільшення об'єму розчину білка, що підлягає фракціонуванню, використовується суха подрібнена сіль. Проте слід мати на увазі, що сульфат амонію має кислу реакцію, тому під час фракціонування треба постійно підтримувати незмінним рН середовища. В цьому випадку краще використовувати насичений розчин солі, рН якого попередньо доводиться до потрібного значення. Щоб запобігти локальному підвищенню концентрації сульфату амонію вище потрібної, сіль додають окремими порціями і старанно перемішують.

Для визначення кількості сульфату амонію з відповідним ступенем насичення ним розчину користуються номограмою (див. додаток 15). Кількість сульфату амонію можна також розрахувати. Залежно від агрегатного стану солі використовуються різні формули:

а) для одержання певного ступеня насичення кількість сухої солі розраховується за формулою:

$$X = \frac{0,515 \cdot V(C_2 - C_1)}{1 - 0,272 \cdot C_2},$$

де: V — об'єм вихідного розчину з концентрацією сульфату амонію; C_1 — насичення; C_2 — потрібний ступінь насичення;

б) кількість насиченого розчину сульфату амонію, яку треба додати до 100 мл розчину, що досліджується, розраховується за формулою:

$$V = \frac{100 \cdot (C_2 - C_1)}{1 - C_2},$$

де: C_1 — вихідний, а C_2 — потрібний ступінь насичення білкового розчину сульфатом амонію.

Фракціонування речовин у тканинних екстрактах можна досягти також дією солей важких металів (свинцю, міді, ртуті, срібла та ін.). Солі важких металів здатні адсорбувати біомолекули і утворювати солеподібні та комплексні сполуки, які розчиняються в надлишку цих солей, але не розчиняються у воді. Подібне явище використовується при фракціонуванні біомолекул, якщо треба позбутися значних кількостей баластних (супутніх) речовин в екстрактах тканин.

Використання синтезуючих (комплексних) методів у вивченні обміну речовин *in vitro* дає можливість підтвердити єдність частин організму, його взаємозв'язок із середовищем, єдність різнобічних обмінних процесів. Для цього одержують моделі, в яких відтворюють частини цілого організму (штучні мембрани, комплекси ферментів тощо).

6.2. МЕТОДИ ВИВЧЕННЯ ОБМІНУ РЕЧОВИН *IN VIVO*

При вивченні обміну речовин *in vivo* слід враховувати багато взаємопов'язаних факторів. Першорядне значення мають вік, стать, режим харчування, умови утримання піддослідних тварин. Результати досліджень залежать також від способу введення речовин — перорально чи шляхом ін'єкцій (внутрішньовенно, внутрішньом'язово, підшкірно або внутрішньочеревно). Треба враховувати також швидкість всмоктування сполук у кровотік, здатність проходження їх крізь мембрани та розподілення в міжклітинних і внутрішньоклітинних рідинах, швидкість метаболізму та виведення з організму.

Вивчення обміну речовин *in vivo* поділяють на дослідження зовнішнього обміну, при якому досліджують сполуки, що потрапляють в організм та виділяються з нього, а також досліджують проміжний обмін, який охоплює перетворення речовин в органах і тканинах організму.

Метод вивчення зовнішнього обміну (метод балансу). Вивчення проводиться шляхом дослідження балансу — різниці між надходженням і витратою речовини. Для цього проводять хімічний аналіз речовин, які надходять в організм і виділяються із сечею, калом, потом. За різницею між ними визначають баланс позитивним (частина речовини затримується в організмі) чи негативним (речовини виділя-

ються більше, ніж надійшло до організму, тобто частина речовини виділяється за рахунок розпаду тканин).

Методи вивчення проміжного обміну. Підходи до вивчення проміжного обміну є досить різноманітними. Найпоширенішими є такі:

а) *принцип навантаження*, який передбачає введення в організм речовини, котра є попередником в серії перетворень за певного обміну речовин; потім аналізується кількість виведеного з організму кінцевого продукту цього обміну і оцінюється ефективність функціонування органа або системи;

б) *використання природжених порушень метаболізму* дозволяє виявити наявність проміжних продуктів обміну, які накопичуються в біологічних рідинах унаслідок порушень метаболізму;

в) *використання штучних порушень метаболізму*. При цьому підході блокують дію певних ферментів з тим, щоб припинити перебіг реакції на відповідному етапі та пов'язане з цим накопичення проміжних продуктів реакції;

г) *ангі- та синусостомія*. Цей спосіб полягає у вставленні в кровоносні судини спеціальних канюль, що дозволяє вивчати біохімічні функції органу цілісного організму шляхом порівняння складу крові, яка притікає до органу та відтікає від нього;

д) *органостомія* полягає в застосуванні канюль на органі цілісного організму, що дозволяє аналізувати біохімічні процеси, які здійснюються в цьому органі за різних умов експерименту;

е) *метод ізотопної індикації* застосовують, коли буває необхідно визначати невеликі (10^{-4} – 10^{-6} моля) кількості речовин. Метод ізотопної індикації і створення чутливих детекторів радіоактивності дозволяє надійно визначати багато речовин у кількостях 10^{-12} моля. На сучасному етапі це найчутливіший і найефективніший метод вивчення співвідношень швидкостей процесів синтезу в умовах, адекватних тим, які мають місце в інтактному організмі. Для цього в організм тварини вводиться потрібна кількість речовини з ізотопною міткою (^3H , ^{14}C тощо). Через певний проміжок часу тварину забивають, беруть у неї певну наважку тканини і простежують радіоактивну мітку в різних сполуках за допомогою відповідних приладів для визначення радіоактивності.

Крім того, метод ізотопної індикації дозволяє одночасно, спостерігати за двома сполуками або розпізнавати дві ідентичні речовини, які синтезуються в різний час (метод подвійного мічення); використання методу імпульсного мічення дає можливість спостерігати за сполукою після її утворення без перешкод з боку речовини, що конкурентно синтезується.

Таким чином, метод радіоактивного мічення є найбільш плідним експериментальним підходом до пошуку відповідей на різноманітні біохімічні та молекулярні питання.

Природа радіоактивності, принципи використання ізотопів та методи реєстрації їхньої активності розглядаються в розділі 14.

Метод вивчення обміну речовин на культурі тканин та клітин. Вивчення метаболізму на рівні організму ускладнюється багатьма фізичними, фізіологічними та біохімічними обмеженнями, які обумовлені складною будовою організму. При вирощуванні тканин і клітин *in vitro* ці труднощі частково або повністю можна подолати. За допомогою методу культури тканини можна одержувати гомогенну популяцію клітин, які в спеціальних умовах здатні рости, розмножуватися і навіть диференціюватися. Це дає можливість вивчати різні біохімічні процеси, не доступні при роботі з інтактними тканинами.

Як правило, клітини одержують шляхом дисоціації тканин і вирощують у клітинній суспензії (позаклітинний матрикс) на скляних або пластикових культуральних чашках (контейнерах). Для культивування клітин ссавців різних типів застосовуються рідинні поживні середовища, які містять повний набір амінокислот, вітамінів, неорганічних солей, глюкозу, антибіотики (пеніцилін, стрептоміцин тощо) та нерозведenu сироватку (теляти, лошаги) або екстракт з курячих ембріонів. Якщо виникає потреба у вивченні біохімічних процесів, пов'язаних з ростом та диференціацією певних клітин, до поживних середовищ додаються також різні ростові препарати (фактори росту).

Більшість клітин ссавців у культурі мають обмежену кількість поділів і через деякий час гинуть. Але іноді в культурі клітин випадково з'являються мутантні клітини, здатні розмножуватись нескінченно довго й утворювати *клітинну лінію*. В практиці найбільшого застосування набули такі клітинні лінії: Hela — епітеліальна клітина (людини), РТК — епітеліальна клітина (кенгурового пацюка), L6 — міобласт (пацюка), РС12 — хромафінна клітина (пацюка), ВНК21 — фібробласт (сірійського хом'яка), 3Т3 — фібробласт (миші), SP2 — плазматична клітина (миші).

Для дослідження клітин також використовуються *неопластично трансформовані клітинні лінії* (ракові клітини), здатні до неперервного поділу в умовах *in vitro* та *in vivo*; вони є джерелом для одержання великої кількості клітин одного типу. Для одержання однорідних клітинних ліній нині застосовується *клонування* (клон — це нащадки однієї клітини). Клонування клітин використовується, як правило, для одержання мутантних клітинних ліній, в яких спадкові зміни відбувались у специфічних генах хромосом. Наприклад, одержання мутант-

них клітин, дефектних за одним специфічним білком, може дати цінну інформацію про функцію білка в інтактних (нормальних) клітинах.

Досить інформативним є метод штучного утворення *гібридних клітин*. Суть його така: спочатку створюються умови для злиття двох окремих клітин, для чого дією певних чинників (поліетиленгліколь, інактивовані віруси тощо) пошкоджується плазматична мембрана клітин. При цьому утворюється *гетерокаріон* (клітина з двома ядрами), який потім переходить до мітотичного поділу й утворює гібридну клітину. В цій клітині ядерна оболонка руйнується, а всі хромосоми об'єднуються в одне велике ядро.

Гібридні клітини використовуються при дослідженні взаємодії між компонентами двох різних клітин (наприклад, клітин людини і миші). Численні аналізи гібридних ліній дозволяють проводити картування (локалізацію) генів у хромосомах людини і, зокрема, з'ясувати, які конкретні хромосоми людини відповідають за ті чи інші біохімічні функції.

7. ОРГАНІЗАЦІЯ БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Біолог-дослідник, який планує проведення будь-якої наукової роботи, повинен ставити питання про будову та функціонування живих організмів і знаходити вірні відповіді. Саме це є запорукою успіху наукового пошуку.

Само собою розуміється, що наукові припущення мають бути підтвердженими або спростованими. Для цього проведені наукові досліді мають бути повністю та виразно описані і бути доступними для перевірки та відтворення їх іншими дослідниками. Якщо при повторних дослідіах за аналогічних умов будуть одержані подібні результати, то їх можна визнати вірогідними (за умови відповідної статистичної обробки).

Схематично хід біохімічного дослідження можна представити таким чином (за Н. Грінном та ін., 1990):

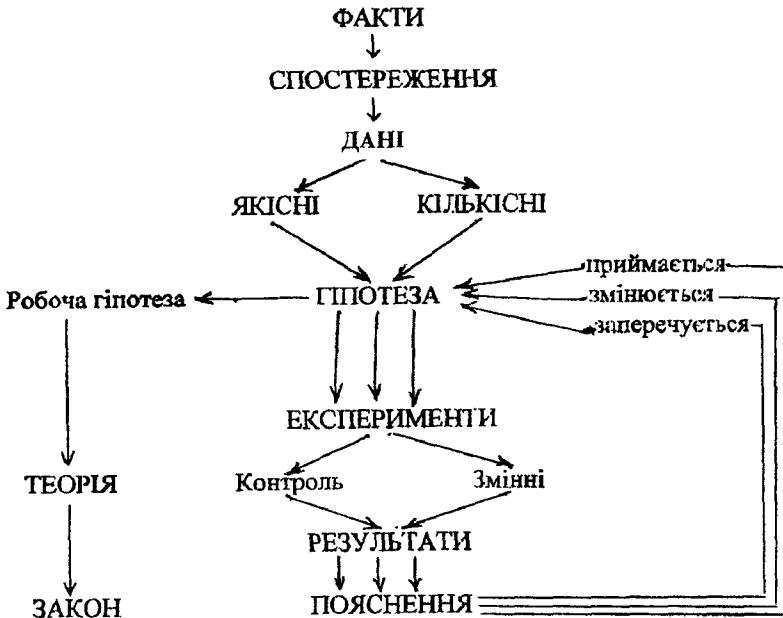


Рис 7.1 Схематичне зображення наукового методу

Як правило, факти базуються на прямих або опосередкованих спостереженнях, шляхом чуттєвого сприйняття або за допомогою спеціальних приладів, що діють як підсилювачі наших почуттів. На-

укові спостереження можуть бути якісними (опис зовнішнього вигляду, поведінки, форм тощо) або кількісними (вимірювання величин та кількостей). За результатами спостережень і одержаними попередніми даними формулюється гіпотеза. *Гіпотеза* — це наукове припущення, яке висувається для пояснення певних явищ дійсності, да-них, що спостерігаються.

З метою оцінки обґрунтованості й об'єктивності гіпотези проводяться серії експериментів з використанням деяких факторів (змінних) для одержання нових даних, які б підтвердили або спростували гіпотезу. Об'єктивно перевірити гіпотезу можна також шляхом постановки серії експериментів (контроль), під час яких по чергово виключають по одній з припущених змінних, котрі впливають на результати спостережень. До подібної тактики вдаються для того, щоб у кожному випадку перевірити вплив тільки одного фактора.

Якщо подібна робоча гіпотеза отримує нові експериментальні підтвердження, а також достатньо пояснює факти, котрі раніше спостерігались, та взаємозв'язки між ними, вона може стати *теорією*.

В тих випадках, коли теорію не здатні змінити ніякі факти, а відхилення, які трапляються, носять регулярний і завбачений характер, вона (теорія) підводиться до рівня закону.

Звичайно, як гіпотези, так і усталені теорії з часом і в міру того, як збільшується сукупність знань та удосконалюються методи наукових досліджень, піддаються сумнівам, видозмінюються, заперечуються і навіть відхиляються.

Таким чином, накопичена за допомогою наукового методу сукупність фактичної інформації трансформується в наукові знання. За своєю сутністю наукові знання є динамічними, вони створюються в процесі полеміки, а вірогідність наукових методів постійно піддається сумніву.

В цілому науково–дослідницька робота складається з трьох основних етапів:

- планування наукових досліджень;
- безпосереднє проведення експериментів;
- обробка одержаних результатів та теоретичний аналіз їх.

7.1. ПЛАНУВАННЯ НАУКОВИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Планування наукової роботи має надзвичайно велике значення для раціональної організації досліджень. При плануванні науково–дослідної роботи потрібно врахувати все, що можна заздалегідь

передбачити, з метою забезпечення високої якості роботи і недопущення затримки або зриву її в будь-чому. Робота за недосконалим планом може призвести до одержання експериментальних результатів сумнівної якості.

Системність у роботі, зосередженість і наполегливість у вирішенні поставлених завдань, критична і скромна оцінка одержаних результатів — запорука успіху науково-дослідної роботи. Тільки плановість, чітка послідовність виконання завдань, регулярний самоконтроль і перевірка виконання забезпечать належну продуктивність будь-якої роботи.

Дуже важливо усвідомлювати логічну черговість виконання запланованих завдань, навчитися вирізняти головне, вирішальне те, на чому слід зосередити на даному етапі всі зусилля та увагу. Але при цьому не можна нехтувати побічними, додатковими, менш важливими роботами й деталями. Саме спостережливість та уважність до другорядних, на перший погляд, деталей може привести до важливих висновків, а іноді й до нових, неочікуваних результатів. Дослідник повинен примічати важливі деталі і при цьому не відхилятися від накресленої основної лінії дослідження.

При плануванні наукових досліджень необхідно:

- чітко визначити мету досліджень і усвідомити, наскільки обсяг цієї роботи знаходиться в межах можливого;
- виходячи з положень біостатистики та завдань дослідницької роботи, намітити кількість спостережень (дослідів);
- згідно з правилами випадкового добору, без будь-якої упередженості підготувати експериментальну та контрольну групи тварин і передбачити послідовність їх поповнення;
- з'ясувати можливості використання автоматичного контролю;
- виявити наявність додаткових та другорядних факторів, які поряд з основними впливають на об'єм досліджуваних явищ;
- передбачити методи дослідження, які дозволяють кількісно визначити вплив другорядних факторів;
- згідно з характером біохімічного дослідження підібрати найбільш адекватні методи статистичної обробки одержаних результатів з метою підтвердження або спростування гіпотези про наявність певних закономірностей;
- скласти таку схему досліджень, яка б дозволила порівняти одержані результати між собою та з результатами інших дослідників;
- вивчити і врахувати обставини, за яких під час накопичення основних результатів, можна одержати і деякі інші дані без додаткових витрат часу, зусиль, матеріалів та коштів;

— передбачити можливість обробки результатів досліджень безпосередньо після досвідів з використанням електронно-обчислювальних машин;

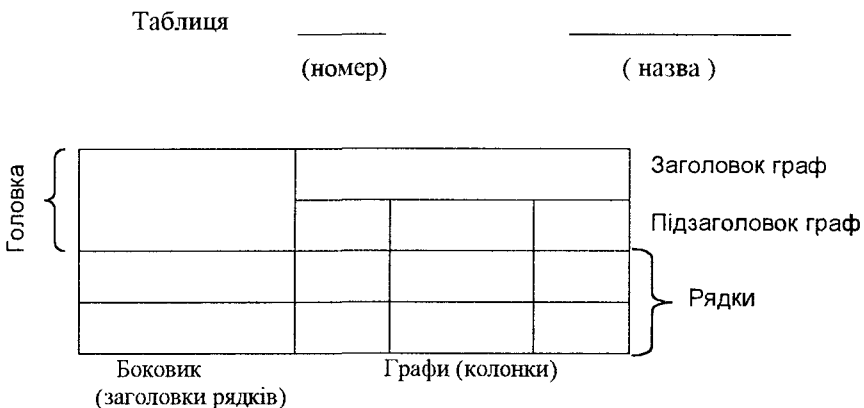
— відповідно до обсягу досліджень визначитись у часі, а також врахувати грошові витрати, матеріальну базу тощо.

7.2. ПРАВИЛА ОФОРМЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Згідно з Державним стандартом України "Документація. Звіти у сфері науки і техніки. Структура і правила оформлення" (1995), результати статистичної обробки наукових досліджень чи спостережень вносяться в таблиці або ілюстрації (графіки, рисунки, схеми, діаграми, фотознімки тощо).

Зведення результатів досліджень у таблицю. Перевагою таблиць перед іншими видами ілюстрацій є компактність при великому обсязі цифрового матеріалу.

Приклад побудови таблиці:



Слово "Таблиця____" пишеться без скорочення і розміщується зліва. Кожна таблиця повинна мати назву, яку розміщують над таблицею після слова "Таблиця____"; во на друкується малими літерами (крім першої великої) без підкреслення. Назва має бути стислою і відбивати зміст таблиці.

Цифрова інформація, яка вміщується в таблиці повинна відрізнятися компактністю і заноситися з однаковим ступенем точності. При

цьому числа, що мають більшу точність, округлюються до розряду чисел з найменшою точністю. Кількість знаків після коми в таблиці має бути однаковою. Якщо цифрові або інші дані в якому-небудь рядку таблиці не подаються, в ньому ставиться прочерк. Елементи статистичної обробки ($M \pm m$, P та ін.), проставляються або під таблицею або включаються в таблицю окремою графою чи без неї. В разі необхідності вміщуються примітки, які розташовуються безпосередньо під таблицею у вигляді виноски.

Розрізняють: таблиці функцій, якісних ознак і статистичні таблиці, а за змістом—аналітичні і неаналітичні таблиці. Аналітичні таблиці є результатом обробки та аналізу цифрових показників, де поряд з абсолютними даними, одержаними шляхом експерименту, можуть бути наведені і похідні показники. В неаналітичних таблицях розміщуються, як правило, необроблені статистично дані, необхідні лише для інформації або констатації.

Таблиці функцій використовуються для порівняння процесів, які зображуються у вигляді незалежної (аргументу) і залежних перемінних (функцій):

Таблиця 7.1. Вплив кофеїну на зв'язування $^{45}\text{Ca}^{2+}$ фрагментами саркоплазматичного ретикулула скелетних м'язів кроля*

№ п/п	Зв'язування $^{45}\text{Ca}^{2+}$, нмоль $^{45}\text{Ca}^{2+}$ /мг білка за 1хв.	
	Контроль	Кофеїн, 10 ммоль/л
1.	7,7	6,9
2.	27,0	25,0
3.	16,0	15,5
4.	31,9	31,0
5.	10,3	10,1
6.	26,0	23,8
M	19,8	19,2
$\pm m$	4,02	2,94
P		>0,05

* час інкубації фрагментів саркоплазматичного ретикулулу з $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 2 хв.

В таблицях якісних ознак показується зв'язок явищ і процесів, котрі не мають чітких цифрових характеристик:

Таблиця 7.2. Типи грубих та колоїдних дисперсій (за Я. Мусилом, 1984)

Дисперсійне середовище	Дисперговані частки		
	Газоподібні	Рідкі	Тверді
Газоподібне грубе колоїдне	- -	Дощ, туман Аерозоль	Дим, пил Аерозоль
Рідке грубе колоїдне	Піна Піна	Емульсія Емульсія	Суспензія Ліозоль(золь)
Тверде грубе колоїдне	Тверді піни Тверді піни	Включення -	Суміші твёрдих речовин Тверді золі

У тих випадках, коли необхідно використати обширний та різноманітний цифровий матеріал і коли немає потреби в зосередженні уваги на функціональній залежності процесів, застосовуються *статистичні таблиці*:

Таблиця 7.3. Фосфоліпідний склад мембран різних клітинних органел печінки * (за Ю.А. Владимировим, А.Ф. Поглазовим, 1973)

Фосфоліпід	Мембрана			
	Плазматична	Ядерна	Мітохондріальна	Мікросомальна
Кардіоліпіни	1,0	3,1	14,6	Следи
Фосфатидилетаноламіни	24,7	24,7	35,5	26,9
Фосфатидилхоліни	46,1	53,7	48,1	54,3
Сфінгомієліни	16,8	5,4	-	7,2
Фосфатидилсерини	4,2	3,4	1,3	2,0
Фосфатидилінозитолі	6,7	7,4	0,5	8,8
Лізофосфатидилхоліни	0,5	2,3	-	0,8

* % загального вмісту фосфора фосфоліпідів.

Зведення результатів досліджень в ілюстрації

Якщо необхідно підкреслити характер перебігу процесу і показати співвідношення компонентів будь-якої системи, вдаються до побудови графіків, діаграм, схем тощо. *Ілюстрація* — це наочне графічне зображення, яке служить додатковим поясненням чи доповненням текстуальних положень науково-дослідної роботи. Всі ілюстрації (без винятку) супроводжуються підписом, який розкриває їхній зміст. Позначення "рис." розміщується під ілюстрацією і після номера дається

тематичний заголовок, а при необхідності й пояснення чи вказівки (підрисунковий текст).

Графік — це геометричне наочне зображення, висвітлення функціональної залежності за допомогою лінії на площині; він служить для знаходження значень функцій за значеннями аргументу. Залежно від вибору системи координат графіки будуються найчастіше в декартових координатах з однаковою ціною поділки, рідше в полярних — для зображення функцій кутового аргументу. Якщо графік повинен містити великий діапазон значень, користуються логарифмічною координатною сіткою з наростаючою ціною поділок.

Графіки виконуються в системі координат (ординати, абсциси). На ординатах (вертикальна вісь) відкладаються величини залежної перемінної (змінної), тобто функції; це "невідома кількість", або перемінна, значення якої не вибирається дослідником. Горизонтальна вісь (абсцис) несе значення, які показують величину незалежної змінної; це "відома кількість", або перемінна, значення якої вибираються дослідником. При кресленні графіків значення величин, зв'язаних функціональною залежністю, слід відкладати на осях координат у вигляді шкал у лінійному або нелінійному (логарифмічному) масштабах зображення. Числові значення координат наносяться за межами рисунка, а відрахунки не обов'язково повинні починатися з нульових значень. Допускається розрив осі ординат, якщо числові значення надто великі, а тенденція зміни параметра є відомою і незмінною. Для цього на осі робляться позначки про розрив у вигляді знака $\frac{|}{|}$. При нанесенні фактичних результатів на графік їх необхідно позначати кружком, хрестиком або крапкою в кружку, а не просто крапкою.

При побудові графіка з невеликим масивом цифрових даних, і якщо експериментальні точки віддалені одна від одної, їх сполучають суцільною ламаною лінією. Якщо в досліді було одержано велику кількість даних і точок, які розміщуються в явній функціональній залежності, їх сполучають плавною кривою лінією. У випадку значного розкиду експериментальних точок лінію проводять згідно існуючих методів математичної обробки результатів досліджень (метод середніх квадратів та інші).

При накресленні на графіку невеликої кількості кривих, вони зображуються різними лініями — суцільною, точковою, штриховою тощо. Якщо на графіку багато кривих, вони нумеруються. Іноді для виділення окремих дослідних точок застосовуються спеціальні позначки — кружки, трикутники, квадрати, ромби тощо.

З побудованого на основі фактичних даних графіка можна знайти

інші проміжні значення. Для цього треба виміряти координати будь-якої точки, яка лежить на лінії. Цей метод називається *інтерполяцією*. Подібним чином, якщо продовжити лінію, можна визначити координати крайніх точок графіка. Цей метод називається *екстраполяцією*.

У разі необхідності на графіках зображуються результати статистичної обробки, причому ціна поділок шкали має бути вищою за можливу похибку вимірювань у досліді. Достовірність одержаних результатів наводиться у вигляді вертикальних ліній з обмеженнями, довжина яких розрахована за законами імовірнісної статистики меж їхніх максимально можливих змін. У підпису до графіка вказується, яка величина наводиться як межа змін даних: $\pm m$ — середньоквадратична помилка середньої арифметичної величини, або $\pm 2\sigma$ — подвоєне значення середньоарифметичної величини.

З метою більшої інформативності, а також для ефективнішого використання координатного поля, до графіка іноді вноситься декілька вертикальних осей із позначками кількох величин у різних масштабах. Подібні складні графіки можна будувати у випадку багатофакторних дослідів. При введенні додаткової (третьої) осі і за сучасних можливостей моделювання та сканування за допомогою ЕОМ результати багатофакторних дослідів можна ілюструвати у вигляді перспективних, об'ємних графіків (та інших видів ілюстрацій), що значно краще уявляють їх порівняно з традиційними одноплосковими графіками. Як приклад, нижче зображено декілька графіків, побудованих з урахуванням усіх вимог і правил (рис. 7.2.–7.4.):

Як різновидність координатних рисунків для графічного та наочного зображення залежності між величинами і аналізу масиву даних

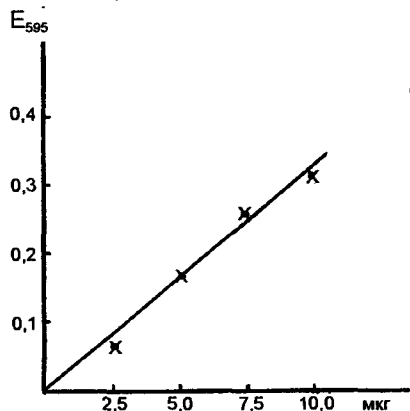


Рис.7.2. Калібрувальний графік для визначення концентрації білка

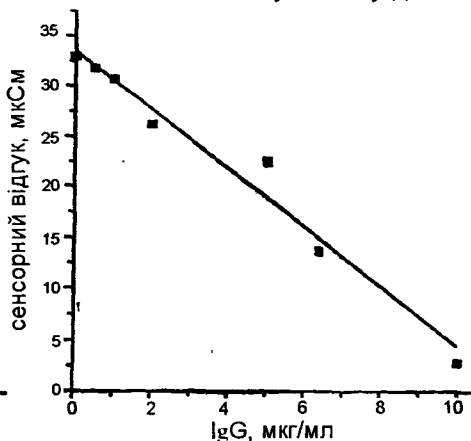


Рис.7.3. Калібрувальний графік для визначення концентрації імуноглобуліну G

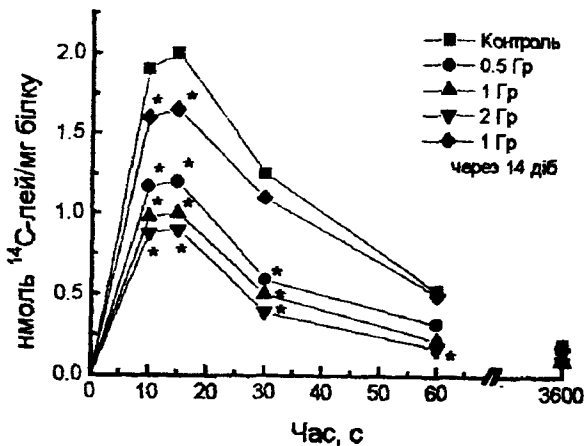


Рис. 7.4. Кінетика Na^+ -залежного накопичення L-[^{14}C]-лейцину препаратами апікальної мембрани в контролі та після опромінення (за С.В. Хижняк, 1997)
* — $p < 0,05$ по відношенню до контролю

у біохімічній практиці часто використовуються *діаграми*. Характерною особливістю всіх видів діаграм є висока наочність та інформативність, завдяки чому їх можна зрозуміти навіть не звертаючись до тексту. За характером цифрового матеріалу діаграми поділяють на лінійні, стовпкові (стовпчикові), секторні, площинні тощо.

Секторні діаграми являють собою коло, розділене на сектори, площі яких знаходяться в прямій залежності від величин (відсоткових або абсолютних) досліджуваного явища або об'єкта. Як приклад, можна навести діаграму, котра відображає склад ліпідів у мембранах еритроцитів ссавців (рис. 7.5).

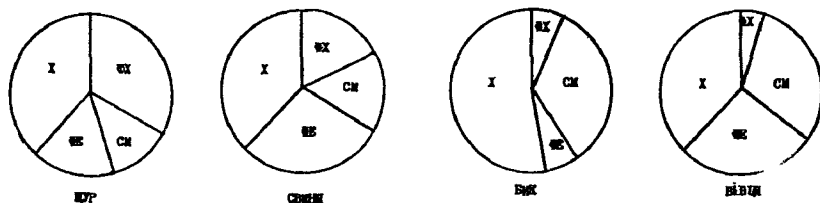


Рис. 7.5. Склад ліпідів у мембранах еритроцитів ссавців (за А. Ленінджером, 1971): Х-холестерол; ФЕ-фосфатидилетаноламін; ФХ-фосфатидилхолін; СМ-сфінгомієлін

Лінійні діаграми будуються на координатній сітці, де на осі абсцис відкладається час або факторальні ознаки, а на осі ординат —

розміри результативної незалежної ознаки чи показники на певний момент або період часу (рис. 7.6). Після нанесення всіх даних вершини ординат сполучають відрізками і одержують ламану лінію.

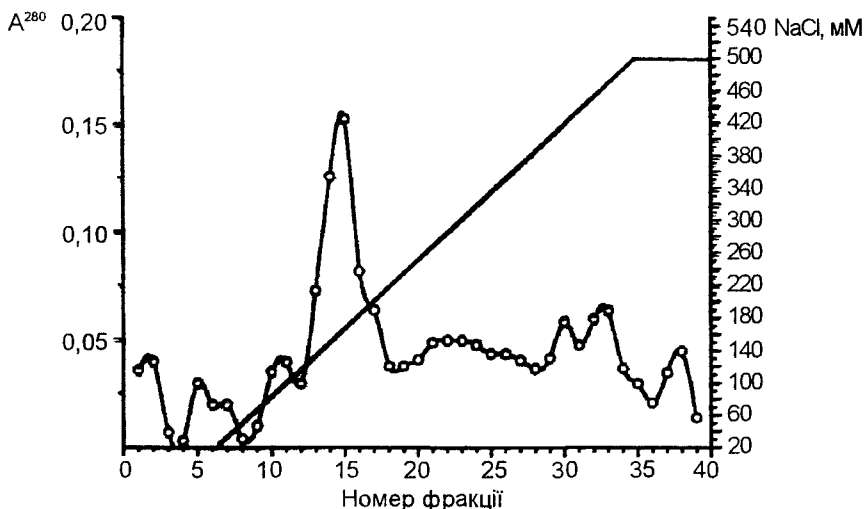


Рис. 7.6. Профіль елюції білка p70^{S6k} з колонки з ДЕАЕ-целюлозою (за І.О. Немазанім, 2000)

Експериментальний матеріал може бути представлений також у вигляді стьожок (шпальт). Подібні діаграми будуються у вигляді прямокутників однакової ширини, а довжина (висота) їх пропорційна значенням величин. Якщо потрібно показати кількість взаємозалежних величин, а також межі розходження середніх числових значень варіантів, будують діаграми у вигляді вертикальних шпальт (рис. 7.7). У тому випадку, коли потрібно показати співвідношення між безперервно залежною перемінною, діаграми будуються у вигляді горизонтальних стьожок (рис. 7.8).

Як різновид горизонтальних діаграм можуть бути застосовані кайт-діаграми (від англ. kite — паперовий змій), які наочно відбивають зміни частот незліченних перемінних, безперервно розподілених у межах певної площі. Кайт-діаграми будуються шляхом нанесення частот кожної перемінної у вигляді паралельних відрізків, перпендикулярних осі абсцис. Після нанесення частот сусідні кінці відрізків можуть бути сполучені прямими лініями (рис. 7.9).

На відміну від одноплощинних діаграм, добре враження залишають також об'ємні координатні діаграми, які найчастіше використовуються для зображення результатів багатофакторних дослідів (рис. 7.10,

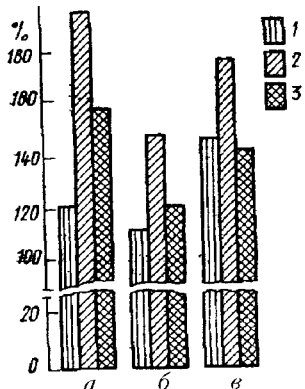


Рис. 7.7. Вміст загального серотоніну в тканинах щурів в умовах радіопротективного захисту (у відсотках до контролю) (за Е.Н. Гончаренко, 1980): а — тонка кишка; б — шлунок; в — печінка; 1 — опромінення; 2 — введення цистаміну; 3 — введення протектора і опромінення

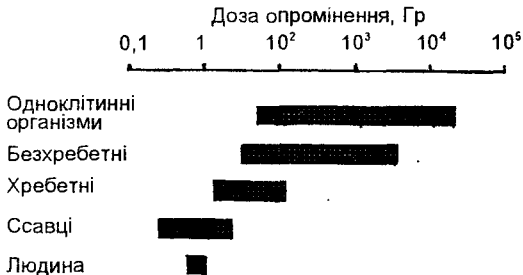


Рис. 7.8. Радіочутливість (LD_{100}) різних організмів (за Ю.Б. Кудряшовим, 1982)

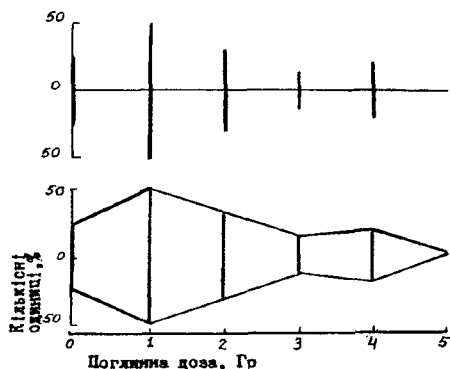


Рис. 7.9. Спосіб побудови кайт-діаграми

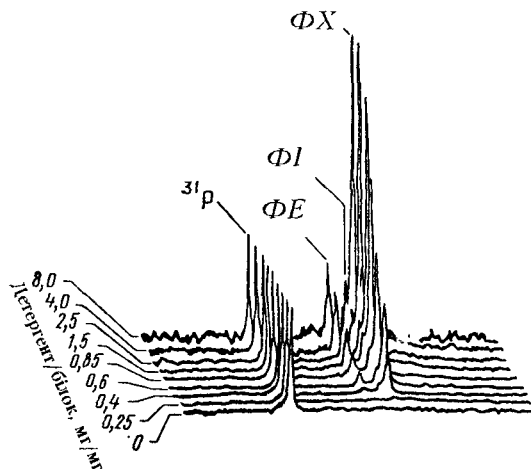


Рис. 7.10. ^{31}P -ЯМР спектр мембран саркоплазматичного ретикулуму в присутності детергенту, який нарощується (за М. Roux, Ph. Champel, 1984): ФЕ — фосфатидилетаноламін; ФІ — фосфатиділінозит; ФХ — фосфатидилхолін; пік, який відповідає ^{31}P , вміщений для порівняння концентрації суспензії везикул ретикулума

7.11) і звичайно мають більшу ілюстративність та інформативність

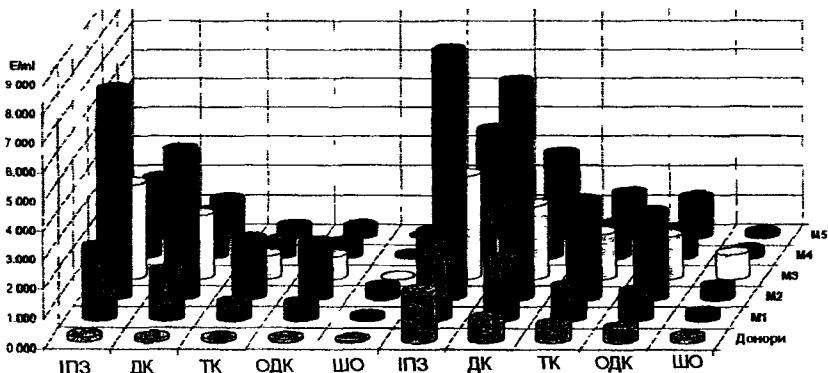


Рис 7.11 Вміст продуктів перекисного окислення ліпідів та ізолюваних подвійних зв'язків у плазмі крові хворих на лейкемію (за Л М Исаковой і др , 1999) М₁ - М₅ — форми лейкемії, ІПЗ — ізолювані подвійні зв'язки, ДК — дієнові кон'югати, ТК — трієнові кон'югати, ОДК — оксодієнові кон'югати, ШО — шифові основи

Схема — це умовне безмасштабне зображення, за допомогою якого передається основна ідея будь-якого процесу (механізму), предмету, пристрою тощо і взаємозв'язок їхніх головних елементів. Використання схем у біохімічних дослідженнях має на меті надати інформацію про складові частини, компоненти будь-якої системи. Схеми складаються з окремих елементів системи і зображуються у вигляді геометричних фігур з позначеннями всіх зв'язків між ними. Підписи, цифри або літери (аббревіатурні скорочення) вміщуються всередині фігур, а їх розшифрування виводиться в підпис до ілюстрації або наводиться в тексті

Залежно від характеру викладеного матеріалу схеми можуть різнитися за призначенням. Схеми бувають структурні, функціональні, принципіві, блок-схеми установок тощо. Як приклад, нижче наведена схема формування індукованого радіацією апоптогенного сигналу в лімфоцитах селезінки щурів (рис. 7.12)

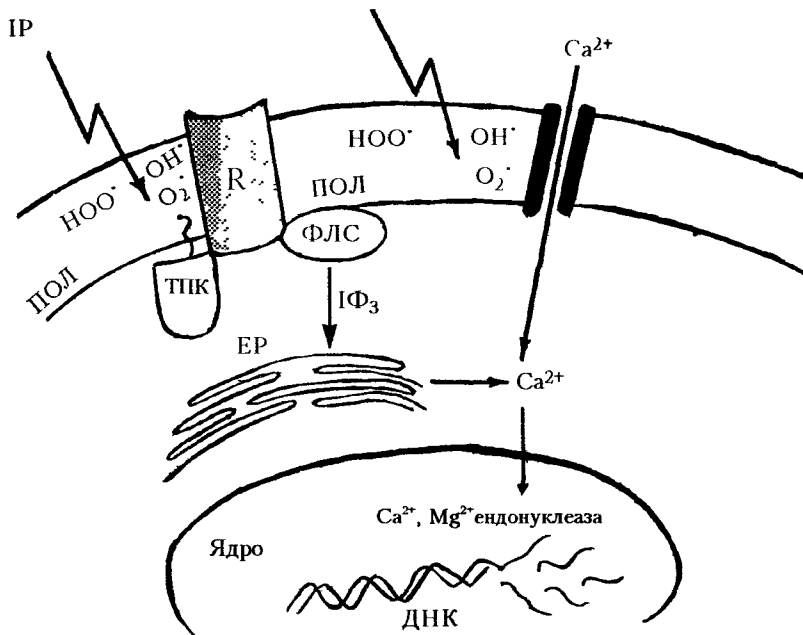


Рис 7.12 Схема Ca²⁺-залежних сигнальних шляхів розвитку індукованої радіацією інтерфазної загибелі лімфоцитів селезінки щурів за участю компонентів фосфоліпідних трансдукційних систем (за О.П. Матишевською, 1999)

R — рецептор, ПОЛ — перекисне окислення ліпідів, ТПК — тирозинові протеїнкінази, ФЛС — фосфоліпаза С, ЕР — ендоплазматичний ретикулум, ІФ₃ — інозитол-1,4,5-трифосфат, ІР — іонізуюча радіація

Специфіка деяких біохімічних досліджень потребує такого документально-ілюстративного матеріалу, як *фотографія, діапозитиви, негативні плівки* тощо. Вони можуть виконувати роль наукової, технічної та хронічно-інформаційної ілюстрації. В біохімічній практиці фотографії та інші ілюстративні матеріали найчастіше використовуються при гістологічних, електрофоретичних або електронноскопічних дослідженнях для доказу чистоти препарату або наявності (розподілу) певних метаболітів тощо (рис. 7.13, 7.14).

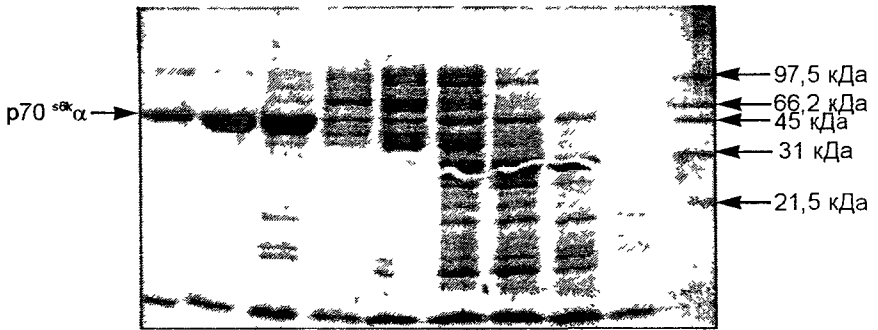


Рис 7 13 Електрофореграма суміш білків з лізованих бактеріальних клітин (за І О Немазаним, 2000)

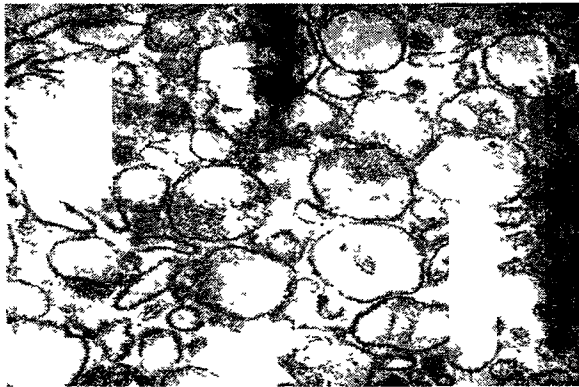


Рис 7 14 Електронна мікрофотограма везикульованих препаратів апікальної мембрани ентероцитів тонкої кишки (збільшення в 3300 раз)

7.3. ПОХИБКИ В БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

Об'єктом біохімічних досліджень здебільшого є багатокомпонентні середовища — рідини і тканини організму. За цих умов відхилення результатів вимірювання від дійсних значень відповідних величин неминучі. Результат експерименту, для якого не відома величина похибки, є неповним, і практичне значення його досить сумнівне і невелике. Тому складовою частиною кожної наукової роботи повинні бути розрахунки похибок.

Похибкою вимірювання називають різницю між результатом вимірювання та дійсним значенням вимірюваної величини. Абсолютна похибка дорівнює результату вимірювання мінус дійсне значення вимірюваної величини. Дійсна величина дорівнює різниці між визначеною величиною та можливою похибкою вимірювання. Похибка вимірювання вказує на його точність

Для більшості досліджень треба знати похибку вимірювання не в абсолютних одиницях, а у відносних. Відносна похибка дорівнює відношенню абсолютної похибки до дійсного значення вимірюваної величини. Отримане значення помножується на 100 і одержують відносну похибку у відсотках. Результати експерименту звичайно наводяться у відсотках вихідної речовини. Абсолютна похибка досліду є похибкою методу і наводиться у відношенні до 100 г вихідної речовини. Якщо перерахувати цю похибку не на 100 г вихідної речовини, а на 100 г аналізованого компонента, то одержать відносну похибку досліду. Ця відносна похибка вказує на точність методу

Власне чисельні вирази вимірюваних величин містять відомості про точність виміру. Їх записують таким чином, щоб передостання цифра була абсолютною надійною, а остання може бути неточною. Наприклад, якщо одержаний результат має значення 1,1814 г, то це означає, що абсолютна похибка становить менше 0,0005 г, а відносна — 0,04%

Знання похибки окремого вимірювання не має самостійного значення, і тому біохімічний дослід не зводиться до одного вимірювання, а передбачає проведення ряду операцій і вимірювань, кожне з яких має свої похибки. І в цьому відношенні важливо те, що відносна похибка остаточного результату не може бути меншою відносною похибки найменш точного виміру. Треба мати на увазі головне — результат обчислення повинен містити не більше значущих величин, ніж їх містилося в найменш точно визначеній вихідній величині. Під поняттям "значущі величини" розуміють усі цифри, відмінні від нуля. Але нуль теж може бути значущою величиною, якщо він стоїть між значущих цифр, або після них. Наприклад, у величині 0,06020 перші два нулі незначущі, а решта — значущі.

Загалом усі похибки поділяють на дві групи певні (систематичні і сталі) та випадкові.

Систематичні похибки виникають під впливом яких-небудь постійних причин, пов'язаних з методом вимірювання. В біохімічному досліді причинами систематичних похибок можуть бути: прилади, якими користуються; домішки, що їх мають реактиви; метод, за допомогою якого одержуються результати, та його чутливість і, нарешті, — неминучі втрати та забруднення.

До систематичних похибок треба віднести також суб'єктивні похибки. Слід також уникати похибок попередності, коли дослідник, знаючи результати попередніх визначень, намагається одержати дані, близькі до них.

Систематичні похибки можна звести до мінімуму, шляхом удосконалення методу вимірювання, старанної настройки приладів, а також завдяки майстерності досліджувача тощо.

Випадкові похибки (шуми) зумовлюються причинами, які змінюються у величині і напрямі. Джерелом цих похибок можуть бути: випадкові похибки важків, зміна температури під час вимірювання, випадкові втрати тощо.

Щоб зменшити вплив випадкових похибок, аналіз повторюють кілька разів і беруть середнє арифметичне від окремих результатів. Середня арифметична величина є найкращим наближенням до істинного значення величин. Результати, які різко відрізняються від результатів серії, треба відкидати.

Про розміри випадкових похибок у біохімічному аналізі можна судити на підставі величини розбіжностей між окремими визначеннями. При аналізі звичайно здійснюється декілька вимірювань, тому до результатів аналізу входять похибки кожного з них. У багатьох випадках похибки окремих вимірювань повністю або частково компенсуються одне одним, і результати можуть бути точнішими, ніж точність окремих вимірювань.

Точність методів біохімічного аналізу різна і залежить як від методу, так і від відносної кількості досліджуваного компонента. Для перевірки точності та виключення можливих систематичних похибок у методі того чи іншого аналізу користуються різними підходами. Так, для визначення можливих похибок, котрі можуть бути внесені реактивами, робиться так звана "сліпа" проба, яка полягає в тому, що паралельно з аналізом проводяться всі операції з використанням всіх реактивів, але без досліджуваної речовини. Але треба мати на увазі, що велика поправка на "сліпу" пробу не бажана тому, що вона викликає сумніви щодо точності аналізу. Крім того, не всі визначення потребують проведення "сліпої" проби.

Основним прийомом перевірки точності одержаних результатів є правило, за яким у біохімічному аналізі завжди роблять кілька паралельних визначень, причому результати їх повинні добре збігатися один з одним. Якщо паралельні дані не збігаються, це свідчить про похибки в самому аналізі.

На кожному етапі науково-дослідних робіт можливі характерні похибки (рис. 7.15). З огляду на це на етапі планування експеримен-

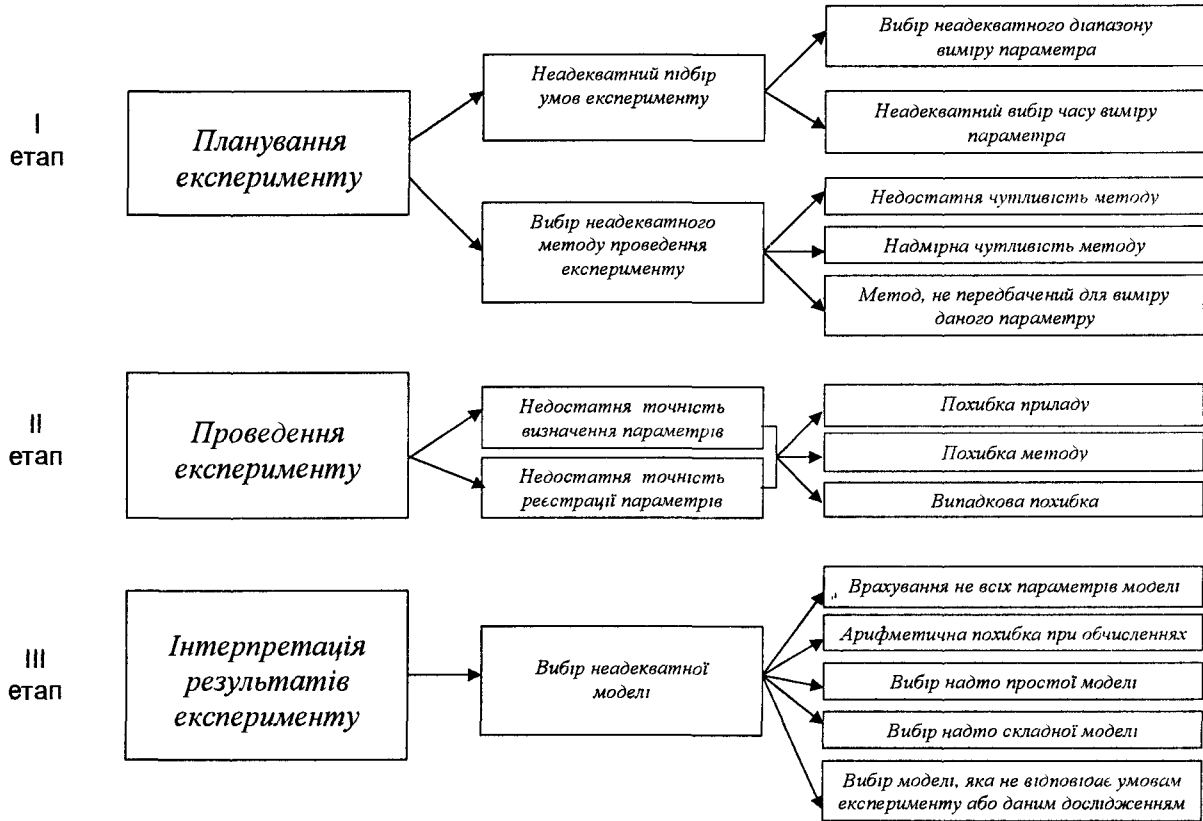


Рис. 7.15. Основні похибки при біохімічних дослідженнях

ту виникнення похибок пов'язане з недостатньо повним опануванням умов досліджень, неадекватним вибором методів. При виборі методу одним з критеріїв повинен бути діапазон змін параметра, що вивчається, і точність виміру. Похибки на етапі проведення експерименту обумовлюються, в першу чергу, недостатньою точністю задання величин досліджуваних параметрів і недостатньою точністю реєстрації цих параметрів. Виходячи з цього, похибки, пов'язані з вимірами, можуть бути спричинені приладами, похибками методу, а також можуть бути випадковими. Виникнення похибок приладу пов'язане з недостатньою точністю вимірів, які проводяться за допомогою приладів, а також з їх несправністю. Крім того, слід зауважити, що більшість приладів у певних діапазонах має нелінійний вид залежності між числом сигналів, які потрапили на прилад, і показниками на його шкалі (числом реєстрації). Через це необхідно переконатись в тому, що дослідження проводяться на лінійній ділянці залежності "число сигналів — число реєстрацій".

Треба також пам'ятати, що будь-який прилад має певну інерційність, тобто для того, щоб відбулася та чи інша реєстрація, необхідний певний час. Може статися так, що цей час буде більш тривалим, ніж час, за який у системі спостережень відбудуться суттєві зміни.

Похибка методу залежить від похибок приладів, об'єкта досліджень, діапазону вимірювання параметра, що вивчається. Наприклад, похибки радіоімунологічних методів становлять 1–5%, залежно від об'єкта дослідження. Точність зважування на аналітичних терезах становить 0,1–0,3% для речовин з масою більше 0,01г, приблизно 1% — для речовин з масою від 0,001 до 0,01г і більше 1% — для речовин з меншою масою.

Похибки на етапі інтерпретації результатів можуть проявлятися внаслідок вибору неадекватної моделі обробки результатів експериментів. Поява похибок на цьому етапі пов'язана із залученням не всієї інформації щодо моделі, а також арифметичні похибки при обчисленнях.

8. МАТЕМАТИЧНА ОБРОБКА РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

У біології (зокрема, в біохімії) використовується як класична математика, так і методи прикладної математики. Сукупність прийомів планування й обробки даних біологічних досліджень методами математичної статистики називається *біометрією*. У свою чергу, математична статистика — це розділ прикладної математики, присвячений математичним методам збирання, систематизації, обробки і використання статистичних даних для наукових та практичних висновків.

На відміну від інших видів інформації, статистичні дані є систематичними. Їх отримують у результаті повторних спостережень над об'єктами або явищами одного і того ж роду. В біохімії, як і в інших природничих науках, використовується цей прийом, тобто проводять багаторазові експерименти для отримання закономірностей, котрі описують об'єкти досліджень. Саме для планування й аналізу таких експериментів використовуються методи математичної статистики.

Значно спрощуються всі розрахунки у разі використання обчислювальної техніки — електронно-обчислювальних машин (ЕОМ). Вони використовуються як на стадії реєстрації експериментальних даних, так і при обробці інформації. У багатьох випадках обчислювальна техніка може значно полегшити працю дослідника, позбавити його від рутинної, одноманітної роботи, легко і швидко побудувати наочні графіки, швидко перевірити моделі тощо. Однак слід пам'ятати, що обчислювальна техніка не здатна вирішити всі поставлені завдання, замінити людський інтелект. Для правильної інтерпретації отриманих результатів, розуміння знайдених взаємозв'язків тощо необхідно мати хоча б загальні уявлення про методи, які використовуються в конкретній програмі.

8.1. ОСНОВНІ ПОНЯТТЯ БІОМЕТРІЇ

З метою отримання певної характеристики об'єкта дослідження на основі окремих систематичних вимірювань визначають *середню величину* ознаки.

Існує декілька середніх величин: середня арифметична (M), середня геометрична (G), середня квадратична (S), середня гармонійна (H), медіанна (Me) та ін. Використання конкретної середньої величини залежить від об'єкта дослідження, поставленої

мети, завдань тощо. В біохімічних дослідженнях використовують, як правило, *середню арифметичну величину*. В усіх випадках її обчислюють за формулою:

$$M = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n},$$

де: $\sum_{i=1}^n x_i$ - сума конкретних величин, що вимірюються, x_i ;

n — число вимірів.

Приклад:

Середня арифметична для п'яти вимірів ($n=5$) величин, чисельні значення яких є 2, 3, 6, 8 і 10 дорівнює:

$$M = \frac{2 + 3 + 6 + 8 + 10}{5} = \frac{29}{5} = 5,8.$$

Похибка середньої арифметичної величини обчислюється за формулою:

$$m_M = \pm \frac{M}{\sqrt{n}}.$$

При обчисленні середньої арифметичної кожне значення величини, що вимірюється, входить у суму однаковим способом, а саме збільшує суму на свою величину. Однак не завжди це можливо. В деяких випадках значення величин, що вимірюють, входять у суму з неоднаковою поправкою. Ця поправка, яка виражається певним множником, називається *математичною вагою значення*. Середня арифметична, яка обчислюється для значень величин з *неоднаковою математичною вагою*, називається *зваженою середньою арифметичною*. Вона обчислюється за формулою:

$$M_{\text{звж}} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i p_i}{\sum_{i=1}^n p_i} = \frac{x_1 p_1 + x_2 p_2 + \dots + x_n p_n}{p_1 + p_2 + \dots + p_n},$$

де: x_i — значення величин, що вимірюються;

p_i — математична вага величин, що вимірюються;

n — число вимірів.

Для обчислювання зваженої середньої арифметичної необхідно кожне значення величин, що вимірюються, помножити на їхню вагу, всі ці добутки скласти і отриману суму поділити на суму математичних ваг.

Приклад:

У досліджуваних 100 мкг протеїдів міститься така кількість окремих складних білків:

— хромопротеїди — 10 мкг з вмістом метіоніну 1%;

— фосфопротеїди — 50 мкг з вмістом метіоніну 3%;

— ліпопротеїди — 20 мкг з вмістом метіоніну 11%;

— глікопротеїди — 20 мкг з вмістом метіоніну 33%.

Завдання: визначити вміст метіоніну в суміші.

Для вирішення цієї задачі необхідно розрахувати зважену середню арифметичну величину. Значення величин, що вимірюються, визначається вмістом метіоніну в кожному зі складних білків: 1, 3, 11 та 33%, а їхня математична вага становить відповідно — 10, 50, 20 та 20 мкг. Вміст метіоніну в суміші білків буде:

$$M_{\text{зваж}} = \frac{1 \cdot 10 + 3 \cdot 50 + 11 \cdot 20 + 33 \cdot 20}{10 + 50 + 20 + 20} = \frac{1040}{100} = 10,4 (\%).$$

Таким чином, у кожному, наприклад, 1 г протеїдів, що досліджуються, міститься 104 мг метіоніну.

Середні величини характеризують усю групу величин, що вимірюються, і не враховують *різноманітність* об'єктів дослідження за ознакою вивчення. Використовується декілька показників різноманітності: *ліміт і розмах, середнє квадратичне відхилення, коефіцієнт варіації*.

Ліміти (lim) — це значення найменшого (*min*) і найбільшого (*max*) значення величини, що вимірюється, серед усієї групи:

$$\text{lim} = (\text{min} \div \text{max}) .$$

Розмах (ρ) — це різниця між найбільшим (*max*) і найменшим (*min*) значеннями величини, що вимірюється:

$$\rho = (\text{max} - \text{min}) .$$

Сума квадратів центральних відхилень (звичайно сума квадратів) визначається за формулою:

$$C = \sum_{i=1}^n (x_i - M)^2,$$

де: x_i — значення величин, що вимірюються;

M — середня арифметична величина.

Для отримання суми квадратів необхідно від кожного значення величини, що вимірюється, відняти середню арифметичну величину; таким чином отримують центральне відхилення, яке потрібно звести в квадрат, і всі квадрати центральних відхилень скласти. Цей показник обчислюють для розрахунку середнього квадрата і середньоквадратичного відхилення, а також використовують у дисперсійному аналізі.

Середній квадрат обчислюється за формулою:

$$\sigma^2 = \frac{C}{v} = \frac{C}{n-1},$$

де: C — сума квадратів центральних відхилень;

v — число ступенів свободи і у найпростішому випадку $v=n-1$ (n — число вимірів).

У загальному випадку *число ступенів свободи* дорівнює числу елементів вільного різноманіття, інакше кажучи, дорівнює числу всіх елементів вивчення без числа обмежень різноманіття: для n вимірювань при k обмеженнях маємо $n-k$ ступенів свободи.

Існує багато формул, за якими можна розрахувати *середнє квадратичне відхилення*. Всі вони дають практично однакові результати, а використання тієї чи іншої з них обумовлене технічною зручністю розрахунків.

Усі формули обчислення середнього квадратичного відхилення виходять з основної:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{C}{n-1}},$$

де: C — сума квадратів центральних відхилень;

n — число вимірів.

Якщо підставити значення суми квадратів центральних відхилень у це рівняння, то отримаємо:

$$\sigma = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - M)^2}{n - 1}}$$

де: x_i — значення величин, що вимірюються;

M — середня арифметична величина;

n — число вимірів.

Похибка середнього квадратичного відхилення обчислюється за формулою:

$$m_{\sigma} = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{2n}}$$

При обчисленні середнього квадратичного відхилення є одне обмеження: цей показник розраховується для групи, яка має певну середню арифметичну величину. Тому різноманітність елементів, які утворюють середнє квадратичне відхилення, обмежена цією однією умовою, і в даному випадку число ступенів свободи дорівнює числу вимірів без одного: $\nu = n - 1$.

Середнє квадратичне відхилення є основним показником різноманітності значень величин, що вимірюються, в групі. Воно використовується для визначення коефіцієнтів варіації, кореляції та регресії, різних показників розподілення, похибок репрезентативності тощо.

Середнє квадратичне відхилення може бути використане для порівняння різноманітності груп тільки при дотриманні таких умов:

1) порівнюються однакові величини (ознаки);

2) середнє арифметичне груп, які порівнюються, не дуже сильно відрізняється.

Ці труднощі знімаються при використанні коефіцієнта варіації.

Коефіцієнт варіації обчислюється за формулою:

$$C_v = \frac{100\sigma}{M}$$

де: σ — середнє квадратичне відхилення;

M — середня арифметична величина.

Варіація (від лат. variatio — зміна) в широкому розумінні — це видозміна вторинних елементів, часток чогось при збереженні того, що є основою. В математиці варіація характеризує зміну *функції* при її лінеаризації, мале прирощення *аргументу* або *функції*.

Коефіцієнт варіації — величина абстрагована, вона тому зручна для порівняння мінливості найрізноманітніших ознак. Його зручно використовувати також при порівнянні мінливості однакових ознак у різних груп, якщо різниця між середніми величинами (M_1-M_2) цих ознак велика.

Похибка коефіцієнта варіації обчислюється за формулою:

$$m_{C_v} = \pm \frac{C_v}{\sqrt{2n}} .$$

При дослідженні численних груп об'єктів, які вивчаються за певною ознакою, різні значення цієї ознаки можуть зустрічатися неоднакову кількість разів. Таке явище називається *розподілом ознаки*.

Є три типи розподілу ознаки: розподілення значень величини, що вимірюється; розподілення груп за наявністю в них ознак, які досліджуються; розподілення вибірових показників для великого числа вибірок.

Розподіл значень величини, що вимірюється, можна зобразити різними способами: варіаційним рядом, варіаційною кривою, гістограмою, кумулятою. В біохімічних дослідженнях використовуються варіаційний ряд і варіаційна крива.

Варіаційний ряд — це впорядковане зображення існуючого розподілення в групі за величиною значень величини, що вимірюється. Він включає в себе весь первинний матеріал щодо вимірювання досліджуваної величини, в усіх представників груп. Цей матеріал наведений у певному порядку: як подвійний ряд чисел, що складається з позначення класів і відповідних частот. *Класи (варіації)* — це виділені із загальної кількості величин групи (частки), в яких ці величини мають близькі значення. *Частоти* — це число варіант кожного класу.

Однією з важливих характеристик класу є *класовий проміжок (K)*, який дорівнює різниці розмаху між максимальним і мінімальним значенням величини, що вимірюється, поділений на кількість класів:

$$K = \frac{\rho}{N},$$

де: ρ — розмах;

N — кількість класів.

Для прикладу складемо варіаційний ряд за наступними даними вимірів загальної кількості ліпідів у плазмі крові людини (мг/100 мл):

597, 673, 598, 670, 657, 647, 588, 646, 555, 692, 635, 610, 614, 659,

629, 602, 584, 630, 607, 652, 654, 569, 669, 503, 665, 552, 685, 599, 628, 655, 584, 672, 550, 605, 625, 645, 545, 570, 644, 591, 595, 664, 565, 678, 540, 715, 568, 688, 612, 530, 660, 538, 708, 535, 695, 596, 675, 618, 547, 638, 655, 562, 571, 653, 564, 648, 582, 642, 559, 580, 627, 567, 630, 590, 576, 630, 576, 630, 574, 614, 586, 580, 635, 610, 567, 619, 633, 608, 625, 522, 612, 636, 604, 625, 522, 612, 636, 604, 625, 644, 565, 617, 585, 620, 658, 572, 618, 634, 596, 612, 603, 626, 626, 635, 611, 578, 605, 595, 615, 652, 615, 637, 587, 601, 590, 610, 592, 621, 575, 606, 639, 585, 612, 582, 604, 594, 615, 617, 618, 622, 614, 615.

Максимальне значення величини, що вимірюється, серед наведених вище чисел дорівнює 715, а мінімальне — 503. Таким чином розмах (ρ) дорівнює:

$$\rho = 715 - 503 = 212.$$

Прийнято вибирати кількість класів у межах 10–12. Виберемо для наведеного ряду чисел 11 класів. Тоді величина класового проміжку дорівнюватиме:

$$K = \frac{\rho}{11} = \frac{212}{11} \approx 19,3 \approx 20.$$

При встановленні початку межі першого класу необхідно виходити з того, що числове значення цієї межі має бути цілим числом, близьким до мінімального значення, але не більшим за нього: крім того, бажано, щоб числове значення межі ділилося без залишку на величину класового проміжку.

З урахуванням цього для наведених вище результатів вимірювання початком першого класу може бути 500. У подальшому проводиться розбивка (розподіл) величин, що вимірюються, на класи з встановленням меж класів (враховують значення класового проміжку). Для зазначеного вище ряду вимірювань класи (а їх вибрано 11) будуть містити такі значення: I — 500–519; II — 520–539; III — 540–559; IV — 560–579; V — 580–599; VI — 600–619; VII — 620–639; VIII — 640–659; IX — 660–679; X — 680–699; XI — 700–719.

Аналіз результатів розподілу величин, що досліджуються, на класи показує, що кількість класів (частота) буде такою: I — 1; II — 5; III — 8; IV — 14; V — 26; VI — 35; VII — 25; VIII — 16; IX — 9; X — 4; XI — 2.

У даному випадку варіаційний ряд має вигляд:

Класи	500-	520-	540-	560-	580-	600-	620-	640-	660-	680-	700-
	519	589	559	579	599	619	639	659	679	699	719
Частота (F)	1	5	8	14	26	35	25	16	9	4	2

Однією з характеристик класів є їхня середина (W). У наведеному вище прикладі значення середини класів такі: I — 510; II — 530; III — 550; IV — 570; V — 590; VI — 610; VII — 630; VIII — 650; IX — 670; X — 690; XI — 710.

Варіаційні ряди частот у певних випадках складають і для середини класу:

Середина класу	510	530	550	570	590	610	630	650	670	690	710
Частота (F)	1	5	8	14	26	35	25	16	9	4	2

Зручним і наочним способом зображення варіаційного ряду є *варіаційна крива* (діаграма частот) — представлення варіаційного ряду у вигляді кривої. Для її побудови на осі абсцис у певному масштабі розміщують класи (їхні середини), а на осі ординат — частоти класів; у подальшому точки перетину цих ліній з'єднують кривою. Наприклад, наведений вище варіаційний ряд відповідає варіаційній кривій представлений на рисунку 8.1.

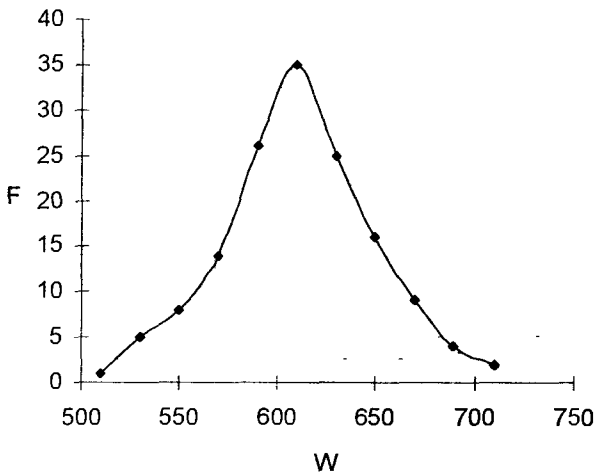


Рис. 8.1. Варіаційна крива загальної кількості лігандів у плазмі крові людини.

8.2. ОСНОВНІ ТИПИ РОЗПОДІЛУ ВЕЛИЧИН, ЯКІ ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ В БІОХІМІХЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

У більшості розподілів величин, які вимірюються в біохімічних дослідженнях, виявляється певна закономірність: найменше і найбільше значення величини спостерігаються рідко; чим ближче значення величини, що вимірюється, до середньоарифметичної, тим частіше воно трапляється; в центрі розподілу знаходяться значення, які трапляються найчастіше. Такий розподіл величин, що вимірюються, характерний для більшості досліджень з багатьох галузей науки, тому його прийняли за норму для будь-якого випадкового розподілу і відповідно до цього назвали *нормальним розподілом*.

Нині нормальним називається розподіл, який підпорядковується закону Муавра–Гауса–Лапласа:

$$F = \frac{nK}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{x^2}{2}\right),$$

де: F — теоретичні частоти;

K — класовий проміжок;

σ — середньо квадратичне відхилення;

$\pi = 3,1416$, \exp — $E = 2,71828$;

$$x = \frac{W - M}{\sigma}$$

де: W — чисельні значення середин класів, M — середньо-арифметична величина.

Реальні експериментальні дані відповідають нормальному розподілу лише наближено. Проте певним варіюванням параметрів можна отримати варіаційну криву, яка відповідає йому найточніше.

У ході вирівнювання емпіричної кривої до відповідності нормальному розподілу можна визначити вірогідність такого значення вимірюваної величини, котра відрізняється на певну кількість середньоквадратичних відхилень (σ) від середньоарифметичної величини (M) або ж не відрізняється за своїм значенням від цієї заданої величини.

Так, наприклад, при будь-якому нормальному розподілі число вимірюваних величин, які не відрізняються від значень середньо-арифметичної величини на 2σ , становить 95,45%, а на 3σ — 99,73%.

Це означає, що при нормальному розподілі можна визначити відповідність (β) появи такого значення досліджуваної ознаки, яке знаходиться в певних межах, тобто відстоїть від середньоарифметичної величини на певну кількість (t) середньоквадратичних відхилень: при $t = 2$ ця вірогідність дорівнює $\beta_1 = 0,9545$; при $t = 3$, $\beta_2 = 0,9973$.

Можна вирішити і зворотну задачу: при якому максимальному t вірогідність прояву ознаки, що досліджується, буде дорівнювати необхідній величині? Наприклад, при $\beta_1 = 0,950$ і $\beta_2 = 0,999$ відповідні межі повинні відстояти від середньої арифметичної величини по обидва боки на таку кількість σ : $t_1 = 1,96$; $t_2 = 3,29$. Це співвідношення проілюстровано на рис.8.2.

Іншим універсальним розподілом, який трапляється в задачах різноманітності, є *розподіл Пуассона*. Основна схема його зводиться до наступного: нехай ми маємо послідовність випадкових подій, які

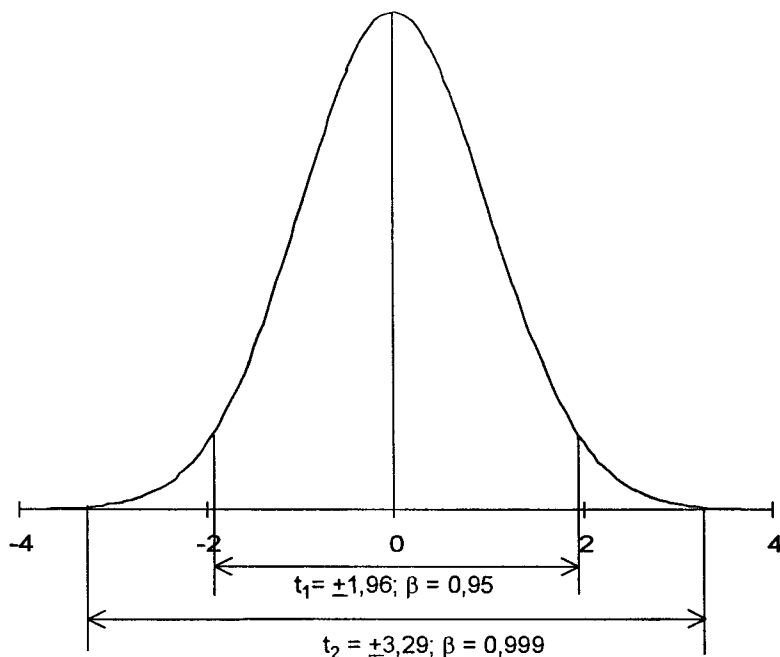


Рис. 8.2. Нормальний розподіл:

t — число σ , на яке відповідні межі повинні відстояти від середньоарифметичної величини по обидва боки ($M \pm t\sigma$), щоб вірогідність прояву досліджуваної ознаки дорівнювала 0,95 і 0,999

виникають у часі (наприклад, процес радіоактивного розпаду чи виникнення мутацій під дією різних мутагенів). Якщо за умовами експерименту ці події можна вважати взаємно незалежними в часі у тому розумінні, що число подій в одному інтервалі часу не дає жодної інформації про це число в іншому інтервалі, то виявляється, що імовірність отримати точно n подій в інтервалі T описується певним законом:

$$P(n) = \frac{\bar{n}^n}{n!} \exp(-\bar{n}),$$

де: $P(n)$ — вірогідність спостереження n подій ; $\bar{n} = \eta T$ — середнє число подій в інтервалі T , η — середня швидкість виникнення подій. Цей закон називається *розподілом Пуассона*.

8.3. РЕПРЕЗЕНТАТИВНІСТЬ ВИБІРОК

Вся кількість вимірюваних величин, (весь масив об'єктів дослідження) однієї категорії називається *генеральною сукупністю*. Числові характеристики, які розраховані на основі вимірів (M , σ , тощо) і належать до всієї генеральної сукупності, називаються *генеральними параметрами*.

Як правило, генеральна сукупність містить дуже багато об'єктів (наприклад, всі еритроцити людини, всі представники штаму бактерії, тощо). В деяких випадках може бути невелика за об'ємом генеральна сукупність (наприклад, рослини в певній колекції). У більшості випадків, у тому числі в біохімічних дослідженнях, звичайно вивчають невелику частину генеральної сукупності, яка називається *вибіркою*. *Вибірка* — це така група досліджуваних величин, котра, по-перше, є частиною генеральної сукупності; по-друге, доступна для вивчення і її чисельність визначається завданнями дослідження; по-третє, вона складеться з досліджуваних величин генеральної сукупності, вибраних довільно, тобто кожна з них мала однакову ймовірність потрапити у вибірку.

Числові характеристики, розраховані на основі вимірів величин вибірки (M , σ і т.п.), називаються *вибірковими показниками*.

Основною властивістю вибірок для характеристики відповідної генеральної сукупності з певною точністю і надійністю є їх репрезентативність (від франц. representation — представництво), тобто відповідність характеристик, одержаних у результаті

вибіркового обстеження даного об'єкта, характеристикам цього об'єкта в цілому, що дозволяє поширити висновки, одержані в результаті вивчення частини об'єкта на весь досліджуваний об'єкт. Цей показник необхідно встановлювати тільки тоді, коли необхідно дати характеристику всього можливого матеріалу, що досліджується, на основі вивчення тільки певної його частини (вибірки). Відповідно не треба встановлювати репрезентативність у тих випадках, коли не стоїть завдання вивчити ціле за однією з його частин.

Похибку репрезентативності визначають, як правило, шляхом визначення довірчих меж, надійності та точності. Крайні значення (мінімально та максимально можливі), в межах яких може знаходитися значення величини генерального параметра, що досліджується, називаються *довірчими межами*. Їх визначають, керуючись таким правилом: генеральний параметр може відрізнятись від вибіркового показника не більше як на величину t -кратної похибки репрезентативності вибіркового показника. Це можна зобразити формулами:

$$\bar{A} = \tilde{A} \pm \Delta; \quad \bar{A} \in \left[\left(\tilde{A} - \Delta \right) \div \left(\tilde{A} + \Delta \right) \right]; \quad \Delta = t m_{\tilde{A}}$$

де: \bar{A} - генеральний параметр;

\tilde{A} - вибіркового показник;

t — критерій надійності — показник вірогідності того, що величина генерального параметру буде всередині довірчих меж і не вийде за ці межі;

$m_{\tilde{A}}$ — показник точності оцінки генерального параметра (похибка репрезентативного вибіркового показника);

Δ — максимально можлива абсолютна похибка оцінки генерального параметра за даної точності та надійності.

Надійність — це вірогідність того, що генеральний параметр дійсно лежить всередині довірчих меж. *Критерій надійності* визначається при плануванні досліджень. При цьому виходять з уявлень про те, що даний показник визначає безпомилковість прогнозів. Біологічні дослідження (в тому числі біохімічні), проводяться з наступними порогоми (рівнями) вірогідності безпомилкових прогнозів: $\beta_1=0,90$ ($t_1=1,6$, мінімальний об'єм вибірок $n_1=20$); $\beta_2=0,95$ ($t_2=2,0$, $n_2=30$); $\beta_3=0,99$ ($t_3=2,6$, $n_3=100$); $\beta_4=0,999$ ($t_4=3,3$, $n_4=200$).

Для вибірок, об'єм яких менше вказаних вище, значення для кожного порога вірогідності визначається за таблицею критерію Стьюдента (додаток 19).

У деяких випадках замість вірогідності безпомилкових прогнозів $\beta_1, \beta_2, \beta_3,$ і β_4 використовується вірогідність помилкових прогнозів — $p_1, p_2, p_3, p_4,$ кожна з яких має величину:

$$p = 1 - \beta .$$

Точність — це ступінь наближення вибіркового показника до генерального параметра при певній надійності оцінки останнього.

Показник точності (похибка репрезентативності вибіркового показника — m) визначається за відповідними формулами. Основними з них є дві формули: для визначення похибки середньої величини при нескінченній генеральній сукупності для вибірки об'ємом n :

$$m = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

та

$$m = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \sqrt{\frac{N-n}{N-1}}$$

для визначення похибки середньої величини при скінченній генеральній сукупності, якщо об'єм вибірки n становить не менше 1/5 об'єму генеральної сукупності N .

8.4. ВІРОГІДНІСТЬ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

У біології (в тому числі й біохімії), для оцінки одержаних результатів дослідження особливе значення має різниця двох величин. За цим параметром порівнюють результати, одержані в контрольних і дослідних групах при постановці численних досліджень.

На основі різнобічного аналізу результатів вибірових досліджень була встановлена така властивість різниці вибірових показників: різниця між двома будь-якими вибіровими показниками у певних випадках відповідає різниці між двома відповідними генеральними параметрами:

$$\left(\tilde{M}_1 > \tilde{M}_2 \right) \rightarrow \left(\bar{M}_1 > \bar{M}_2 \right) .$$

Інше кажучи якщо у вибірці перша середня арифметична

величина більша за другу, то це матиме місце й у відповідних середніх генеральної сукупності.

Цю властивість (відповідність із заданою надійністю двох різних вибірових показників генеральним параметрам) характеризують поняттям *вірогідність вибіркової різниці*.

Вибіркова різниця може бути вірогідною або невірогідною. Різниця вірогідна, коли у вибірових дослідженнях різниця між вибіровими показниками відповідає за знаком різниці між відповідними генеральними параметрами. У цьому випадку висновки, зроблені при вивченні різних вибірових груп на основі порівняння одержаних результатів, можуть бути перенесені на відповідну генеральну сукупність.

У випадку одержання невірогідної різниці між вибіровими показниками дати точну відповідь про різницю між відповідними генеральними параметрами не можна. Слід пам'ятати: є помилковим погляд на те, що наявність у вибірках невірогідної різниці свідчить про брак різниці між генеральними параметрами. Наявність між двома вибіровими середніми показниками невірогідної різниці лише означає, що між відповідними генеральними середніми параметрами можуть бути будь-які співвідношення, але які — невідомо.

Сказане вище можна проілюструвати наступним чином:

$$(\tilde{M}_1 > \tilde{M}_2) \rightarrow \left\{ \begin{array}{l} \overline{M}_1 > \overline{M}_2 \\ \overline{M}_1 = \overline{M}_2 \\ \overline{M}_1 < \overline{M}_2 \end{array} \right\}$$

Вірогідність вибіркової різниці, якщо вона оцінюється для різниці відповідних генеральних параметрів, визначається за *критерієм достовірності різниці, t_d* , який визначається за формулою:

$$t_d = \frac{d}{m_d},$$

де: d — різниця між двома вибіровими показниками ($\tilde{M}_1 - \tilde{M}_2$);

m_d — похибка вибіркової різниці ($m_d = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$ або інший вираз

залежно від об'єму генеральної сукупності, її частки тощо).

У біології, як уже відзначалося, прийняті пороги вірогідності $\beta_1=0,90$; $\beta_2=0,95$; $\beta_3=0,99$; $\beta_4=0,999$. У більшості біохімічних

досліджень прийнятий поріг вірогідності безпомилкових прогнозів $\beta_2=0,95$.

Розглянемо тепер деякі стандартні критерії вірогідності середніх значень досліджуваних величин, а саме критерії Стьюдента і Фішера.

Вірогідність різниці середніх значень за критерієм Стьюдента. Вірогідність різниці середніх значень за критерієм Стьюдента (t_d) визначають за рівнянням

$$t_d = \frac{d}{m_d} = \frac{|M_1 - M_2|}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}} \geq t_{st} \{v_d = n_1 + n_2 - 2\},$$

де: d — різниця між двома вибірковими середніми величинами ($M_1 - M_2$);

m_d — похибка різниці, яка дорівнює кореню квадратному із суми квадратів похибок середніх величин, що порівнюються;

t_{st} — стандартне значення критерію Стьюдента, яке визначається за спеціальною таблицею (додаток 19) залежно від числа ступенів свободи і згідно з прийнятим при плануванні досліджень порогом вірогідності безпомилкового прогнозу;

$v_d = n_1 + n_2 - 2$ — число ступенів свободи для різниці, яке дорівнює сумі вимірів (об'єму) кожної вибірки (n_1 і n_2) мінус 2.

У біохімічних дослідженнях для оцінки вірогідності різниці середніх значень за критерієм Стьюдента використовують вірогідність помилкових прогнозів — параметр $p = 1 - \beta$. Цей параметр для значень $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$, дорівнює відповідно p_1, p_2, p_3, p_4 . Як уже зазначалося, в біохімічних дослідженнях прийнятий поріг вірогідності $\beta_2=0,95$, тобто вірогідною вважається різниця, коли $\beta \geq 0,95$, що відповідає значенню параметра $p \leq 0,05$. Вищі числові значення вірогідності $\beta \geq 0,99$ ($p \leq 0,01$) і $\beta \geq 0,999$ ($p \leq 0,001$) відповідають підвищеним вимогам надійності при певних (як правило, повторних) дослідженнях.

При порівнянні значень критерію вірогідності зі стандартними значеннями критерію Стьюдента можливі два випадки: $t_d \geq t_{st}$ або $t_d < t_{st}$.

У випадку, коли $t_d \geq t_{st}$, різниця вибіркових середніх величин вірогідна з певною надійністю, тобто відповідає вірогідності різниці між відповідними середніми генеральними параметрами. Якщо ж $t_d < t_{st}$, то одержаний критерій вірогідності різниці менше стандартного значення для необхідного порога вірогідності. В цьому випадку різниця середніх значень невірогідна.

Розглянемо декілька прикладів визначення вірогідності різниці середніх значень за критерієм Стьюдента.

Приклад 1. При визначенні вмісту аланіну в сироватковому альбуміні людини встановлено 1) в контрольній групі, яка складалася з 20 здорових осіб ($n_1=20$), у сироватковому альбуміні в середньому 3 залишки амінокислоти припадало на 1 молекулу білка: $M_1 \pm m_1 = 3,0 \pm 0,3$; 2) у дослідній групі, до якої входило 25 хворих на діабет ($n_2=25$), — 3,6 залишка амінокислоти; відповідні показники були такі: $M_2 \pm m_2 = 3,6 \pm 0,4$

Необхідно розрахувати вірогідність одержаної вибіркової різниці. Згідно з розрахунками одержуємо:

$$d = |M_1 - M_2| = 0,6; m_d = \sqrt{m_1^2 + m_2^2} = \sqrt{0,3^2 + 0,4^2} = 0,5;$$

$$t_{dst} = \frac{0,6}{0,5} = 1,2; \nu = 20 + 25 - 2 = 43.$$

За додатком 19 знаходимо, що для $\beta_2=0,95$ вірогідними будуть результати при значенні не менше $t_{st}=2,0$, а вища надійність вірогідності (для $\beta_3=0,99$ і $\beta_4=0,999$) підтверджується ще більшим значенням t_{st} (відповідно 2,7 і 3,5).

Таким чином, одержана різниця виявилась невірогідною, але цей висновок не можна поширити на всіх представників контрольної і дослідної груп.

Приклад 2. Попередні дослідження були повторені на більшій кількості людей, що дало нові показники:

$$n_1 = 80; M_1 \pm m_1 = 3,1 \pm 0,1.$$

$$n_2 = 80; M_2 \pm m_2 = 3,7 \pm 0,1.$$

Розрахунки показали:

$$d = 0,6; m_d = 0,14; t_{dst} = \frac{0,6}{0,14} = 4,3; \nu = 80 + 80 - 2 = 158$$

Згідно з додатком 19 одержуємо:

для $\beta_2 = 0,95$ відповідно $t_{st2} = 2,0$; для $\beta_3 = 0,99$ — $t_{st3} = 2,6$;

для $\beta_4 = 0,999$ — $t_{st4} = 3,4$.

Таким чином, одержана різниця середніх величин виявилася вірогідною з високою надійністю. В цьому дослідженні одна і та ж за величиною різниця ($d=0,6$) виявилася вірогідною внаслідок збільшення чисельності досліджених вибірок (зменшилися похибки середніх значень).

Вірогідність різниці середніх значень за критерієм Фішера.
 Вірогідність різниці середніх значень за критерієм Фішера (F_d) визначають за рівнянням

$$F_d = \frac{d^2}{\sigma_z^2} \cdot \frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2} \geq F_{st} \left\{ \begin{array}{l} \nu_1 = 1 \\ \nu_2 = n_1 + n_2 - 2 \end{array} \right\},$$

де: d^2 — квадрат різниці середніх значень величин, що досліджуються $(M_1 - M_2)^2$;

σ_z^2 — середній квадрат варіанта (середня квадрата), який може бути визначений на основі обох квадратів похибок середніх величин за формулою:

$$\sigma_z^2 = \frac{n_1(n_1 - 1)m_1^2 + n_2(n_2 - 1)m_2^2}{n_1 + n_2 - 2} = \frac{(n_1 - 1)\sigma_1^2 + (n_2 - 1)\sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2},$$

де: n_1 і n_2 — число вимірів в обох вибірках, що порівнюються,

F_{st} — стандартне значення критерію Фішера при двох указаних ступенях свободи (ν_1 і ν_2), що визначається за додатком 20.

Наведемо приклад використання критерію Фішера для оцінки вірогідності різниці. Візьмемо експериментальні результати, наведені в прикладі 1 для критерію Стьюдента.

$$n_1 = 20; M_1 \pm m_1 = 3,0 \pm 0,3; \sigma_1 = 1,34;$$

$$n_2 = 25; M_2 \pm m_2 = 3,6 \pm 0,4; \sigma_2 = 2,00;$$

$$\sigma_z^2 = \frac{n_1(n_1 - 1)m_1^2 + n_2(n_2 - 1)m_2^2}{n_1 + n_2 - 2} = \frac{20 \cdot 19 \cdot 0,9 + 25 \cdot 24 \cdot 0,16}{20 + 25 - 2} = 3,03;$$

$$\sigma_z^2 = \frac{(n_1 - 1)\sigma_1^2 + (n_2 - 1)\sigma_2^2}{n_1 + n_2 - 2} = \frac{19 \cdot 1,34^2 + 24 \cdot 2,00^2}{20 + 25 - 2} = 3,03;$$

$$F_d = \frac{(M_1 - M_2)^2}{\sigma_z^2} \cdot \frac{n_1 n_2}{n_1 + n_2} = \frac{0,6^2}{3,03} \cdot \frac{20 \cdot 25}{20 + 25} = 2,2;$$

$$\nu_1 = 1; \nu_2 = 20 + 25 - 2 = 43;$$

За додатком 20 знаходимо, що для $\beta_2 = 0,95$ вірогідними будуть результати при значенні не менше $F_{st} = 4,1$; для $\beta_3 = 0,99 - F_{st} = 7,2$

для $\beta_4 = 0,999 - F_{st} = 12,5$.

Таким чином, різниця середніх величин, що досліджуються, в статистичному розумінні виявилася невірогідною. Цей висновок зроблений також і за критерієм Стьюдента.

8.5. КОРЕЛЯЦІЙНИЙ ЗВ'ЯЗОК

У природі багато явищ, властивостей і ознак взаємозумовлені і здатні взаємодіяти. Це знаходить своє відображення в науках про неї (зокрема, в біохімії). У більшості випадків кожному значенню однієї з ознак відповідає певний розподіл значень іншої ознаки при встановленні основних показників цієї іншої ознаки. Такий зв'язок називається *кореляційним* або просто *кореляцією* (від лат. *correlati* — відношення). Такий зв'язок між явищами має місце, коли одне з них входить у число причин, які визначають інші явища, або якщо існують загальні причини, котрі впливають на ці явища.

Кореляційні зв'язки за формою бувають прямолінійні і криволінійні, а за напрямком — прямі і зворотні. Прямолінійні кореляційні зв'язки — це такі зв'язки, при яких рівномірним змінам однієї ознаки відповідає така ж зміна іншої ознаки; непрямолінійні — такі, при яких рівномірним змінам однієї ознаки відповідають нерівномірні зміни іншої, і ця нерівномірність має певну закономірність.

Прямі (позитивні) зв'язки — це такі зв'язки, при яких зі збільшенням однієї ознаки збільшується інша; зворотні (негативні) — такі, при яких зі збільшенням однієї ознаки зменшується інша.

Як прямі, так і зворотні кореляційні зв'язки можуть бути тисними (коефіцієнт кореляції наближається до одиниці) або слабкими (коефіцієнт кореляції наближається до нуля).

Про наявність або брак кореляційного зв'язку між окремими ознаками, його характер і ступінь судять за значенням *коефіцієнта кореляції* (r) і *кореляційним відношенням* (n).

Як правило, коефіцієнт кореляції вираховується за допомогою кореляційної ґратки (решітки). Для її складання наносять експериментальні виміри першої ознаки (класи) по крайній лівій грані кореляційної ґратки зверху вниз, а другої — по верхньому рядку справа наліво. Числові значення ознак (класів) розділяють лініями, які для першої ознаки продовжуються направо до кінця значень (класів) другої ознаки, а для другої — продовжуються вниз до кінця значень (класів) першої ознаки. Горизонтальні та вертикальні лінії перетинають одна одну і утворюють клітинки, або комірки,

кореляційної ґратки. Однак часто варіанти розміщуються по клітинках кореляційної ґратки розкидано, і тоді важко визначити характер і ступінь зв'язку. У цьому випадку краще кореляційний зв'язок подавати конкретною числовою величиною, для чого коефіцієнт кореляції вираховують за певними формулами. В біологічних дослідженнях, зокрема в біохімічних, для вираховування коефіцієнту кореляції (r) найчастіше використовують формулу:

$$r = \frac{\sum x_1 x_2 - \frac{\sum x_1 \sum x_2}{n}}{\sqrt{C_1 C_2}},$$

де: x_1 і x_2 — конкретні виміри першої і другої ознаки;

$$C_1 \text{ і } C_2 \text{ — відповідні суми квадратів } \left(C = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right);$$

n — число пар вимірів, які порівнюються між собою.

Використовувати складніші формули, наведені в рекомендованій літературі, слід тоді, коли безпосередньо важко або не можна одержати суми конкретних вимірів та квадратів. У такому випадку доцільно обчислити коефіцієнт кореляції за допомогою кореляційної ґратки. Коефіцієнт кореляції, як кожна вибіркова величина, має свою похибку репрезентативності (m_r), котра для відносно нечисленних вибірок ($n < 100$) визначається за формулою:

$$m_r = \pm \sqrt{\frac{1 - \tilde{r}^2}{n - 2}},$$

а для численних вибірок ($n > 100$) — за формулою

$$m_r = \pm \frac{1 - \tilde{r}^2}{\sqrt{n}},$$

де: \tilde{r}^2 — вибіркове значення квадрата коефіцієнта кореляції;
 n — число пар значень параметрів, які порівнюються.

Критерій вірогідності вибіркового коефіцієнта кореляції (t_r) визначається за формулою:

$$t_r = \frac{\tilde{r}}{m_r} \geq t_{st} \{v = n - 2\},$$

де: \tilde{r} — вибірковий коефіцієнт кореляції;

m_r — похибка репрезентативності вибіркового коефіцієнта кореляції;

t_{st} — стандартне значення критерію Стьюдента, яке знаходять за додатком 19;

v — число ступенів свободи;

n — число пар значень параметрів, які порівнюються.

Вірогідність кореляційного зв'язку визначають, як правило, за критерієм Стьюдента. Коефіцієнт кореляції вірогідний, якщо $t_r \geq t_{st}$. У цьому випадку з певною вірогідністю (залежно від значення порога вірогідності) можна вважати, що між ознаками, які порівнюються, в генеральній сукупності має місце такий же зв'язок, як і у вибірці.

8.6. ДИСПЕРСНИЙ АНАЛІЗ

Дисперсія (від лат. *dispersio* — розсіяння) характеризує варіювання (мінливість) ознаки, яке виникає під впливом різних факторів. Ці фактори діють незалежно один від одного і з різною силою, а іноді навіть і в різних напрямках. Вплив різних факторів, що діють одночасно неоднаковий, і часто буває потрібно виявити частку впливу кожного фактора на мінливість ознаки.

При дисперсному аналізі обробляються ті вибіркові дані, які утворюють дисперсні комплекси. Вибірка може бути нечисленною і численною, однофакторною, двофакторною і з більшим числом факторів. Комплекси можуть бути рівномірними, пропорційними та нерівномірними.

Ступені інтенсивності фактора називаються градаціями фактора. Окремі групи, підібрані для кожної *градації фактора*, називаються *градаціями комплексу*.

У дисперсному аналізі використовують дві моделі дисперсних комплексів. Перша модель — з фіксованими градаціями фактора. Її характеризують таким чином:

$$N = \infty; \quad \bar{g} = \tilde{g} \quad n = \infty,$$

де: \bar{g} — число градацій у вибіркового комплексу, \tilde{g} — в генеральному комплексі;

$N = gn$ — об'єм комплексу.

В цій моделі в генеральному комплексі число градацій таке ж, як і у вибірковому комплексі, але об'єми градацій нескінченні.

Висновки дисперсного аналізу в першій моделі поширюються тільки на ті градації, які вивчалися у вибірковому комплексі.

Друга модель дисперсних комплексів — з випадковими градаціями. Її характеризують наступним чином:

$$N = \infty; \quad g = \infty; \quad n = \infty .$$

У генеральному комплексі цієї моделі число градацій і об'єм градацій нескінченно великі.

Вибірковий комплекс у другій моделі утворюється шляхом випадкового набору об'єктів в градаціях з різних зон генеральної сукупності. Результати дисперсного аналізу в цій моделі поширюють на весь дисперсний комплекс.

Опанування дисперсійного аналізу треба починати із засвоєння принципів розрахунків основних показників, сили і вірогідності впливу одного фактора, потім декількох і вже потім переходити до оволодіння багатофакторним дисперсним аналізом.

Розглянемо основні поняття і показники дисперсного аналізу. В ньому поняття "сума квадратів центральних відхилень" для стислості замінено терміном "дисперсія". При дисперсному аналізі вираховують величину *загальної дисперсії* (C_y), яка характеризує мінливість, спричинену всіма одночасно діючими факторами. Вона дорівнює сумі квадратів центральних відхилень конкретних значень вимірюваних величин, від загальної середньої по всьому комплексу. Загальна дисперсія обчислюється за формулою:

$$C_y = \sum x_i^2 - H ,$$

де: x_i — конкретна величина, що вимірюється; .

H — загальна проміжна (допоміжна) величина, яка визначається за формулою

$$H = \frac{\sum x_i^2}{n} .$$

n — число вимірів.

Загальна дисперсія може бути розкладена на факторну і випадкову (залишкову) дисперсію.

Факторна дисперсія (C_x) характеризує мінливість, що виникає під впливом різних врахованих факторів. Вона дорівнює сумі зважених квадратів центральних відхилень випадкових середніх за градаціями (або за групами) від загальної середньої по всьому

комплексу. Факторну дисперсію обчислюють за формулою:

$$C_x = \sum H_i - H,$$

де: $H_i = \frac{(\sum x_i)^2}{n_i}$ — випадкова проміжна (підсобна) величина, яка розраховується по кожній градації — це квадрат суми конкретних вимірів по градації, поділений на число вимірів у цій градації;

$$H = \frac{\sum x_i^2}{n} \text{ — загальна проміжна величина.}$$

Факторна дисперсія може бути розділена на дисперсію кожного фактора і спільну дисперсію декількох факторів.

Випадкова дисперсія (C_z) характеризує мінливість, яка виникає під впливом різних випадкових (неврахованих) факторів. Вона дорівнює сумі квадратів центральних відхилень конкретних значень величин, що вимірюються, від своєї випадкової середньої. Випадкову дисперсію обраховують за формулою (позначення вказані вище):

$$C_z = \sum x_i^2 - \sum H_i.$$

Для кожного типу дисперсії можна розрахувати середній квадрат. Так, загальний середній квадрат дорівнює значенню загальної дисперсії (C_y), поділений на число ступенів свободи (об'єм комплексу мінус 1):

$$\sigma_y^2 = \frac{C_y}{N-1}.$$

Факторний середній квадрат дорівнює факторній дисперсії (C_x), поділений на число ступенів свободи, яке відповідає числу градацій (g) мінус 1:

$$\sigma_x^2 = \frac{C_x}{g-1}.$$

Випадковий середній квадрат дорівнює випадковій дисперсії (C_z), поділений на число ступенів свободи, яке в даному випадку відповідає об'єму комплексу мінус число градацій (g).

$$\sigma_z^2 = \frac{C_z}{N-g}.$$

Одним з показників дисперсійного аналізу є *показник сили впливу* (η), який дорівнює відношенню факторної (або випадкової) дисперсії до загальної і обчислюється за формулою:

$$\eta_x^2 = \frac{C_x}{C_y}; \quad \eta_z^2 = \frac{C_z}{C_y}$$

Показник сили впливу визначає частку впливу фактора, який вивчається, в загальній кількості впливів усіх факторів.

Показник вірогідності впливу визначають, як правило, за перетвореним критерієм Фішера. У випадку, коли $\sigma_x^2 > \sigma_z^2$:

$$F_1 = \frac{\sigma_x^2}{\sigma_y^2} \geq F_{st} \left\{ \begin{array}{l} v_1 = g - 1 \\ v_2 = N - g \end{array} \right\},$$

де: F_1 — експериментальний критерій вірогідності сили впливу;

σ_x і σ_y — факторний і загальний середні квадрати;

F_{st} — стандартне значення критерію Фішера (додаток 20);

v_1 і v_2 — перший і другий ступені свободи, за якими в додатку 20 знаходять стандартне значення критерію Фішера.

У випадку, коли $\sigma_x^2 < \sigma_z^2$, буде зворотний критерій Фішера:

$$F_2 = \frac{\sigma_z^2}{\sigma_x^2} \geq F_{st} \left\{ \begin{array}{l} v_1 = N - g \\ v_2 = g - 1 \end{array} \right\}.$$

Якщо $F_1 \geq F_{st}$, то вплив вірогідний. У цьому випадку можливий наступний прогноз: різноманітність генеральних середніх за градаціями комплексу подібна тому, що спостерігається у вибірковому комплексі. Це також означає, що досліджуваний фактор, за даних умов і певних градацій буде впливати на результативну ознаку з вірогідністю, яка була знайдена при оцінці вірогідності сили впливу.

У випадку, коли $F_2 \geq F_{st}$, можна зробити висновок про те, що з певною вірогідністю має місце малий вплив фактора або вірогідною є подібність градації за результативною ознакою.

Якщо експериментально знайдений критерій менше стандартного, знайденого за додатком 20, то вплив невірогідний. Це означає, що при потрібній вірогідності не можна зробити висновок як про рівність, так і про різницю відповідних окремих генеральних середніх, оскільки мала різноманітність цих середніх може бути при будь-якій різноманітності генеральних середніх, за градаціями комплексу.

Розглянемо тепер дисперсний аналіз однофакторного комплексу на конкретному прикладі: визначити вплив низьких доз іонізуючої радіації на вміст в еритроцитах людини діоксіацетонфосфату

(проміжного продукту процесу гліколізу).

Доцільно у вигляді таблиці навести основні показники, експериментальні дані, результати розрахунків (табл. 8.1).

Таблиця 8.1. Основні дані для дисперійного аналізу однофакторного комплексу

Показники	Еквівалентна доза, бер/рік			Σ
	5	10	15	
x (вміст диоксиацетанфосфату еритроцитах людини, мкМ)	35, 37, 30, 31, 32	38, 32, 40, 34, 35, 31	35, 36, 40, 38, 43, 42	Σ x =609
x^2	1225, 1369, 900, 961, 1024	1444, 1024, 1600, 1156, 1225, 961	1225, 1296, 1600, 1444, 1849, 1764	Σ x^2 = =22067
n	5	6	6	Σ n =17
Σ x_i (по кожній градації)	165	210	234	Σ x_i =609
$(\sum x_i)^2$	27225	44100	54765	-
$H = \frac{(\sum x)^2}{n}$	5445	7350	9126	Σ H_i = =21921
$M = \frac{\sum x}{n}$	33	35	39	-

Спочатку обраховують значення загальної проміжної величини H :

$$H = \frac{(\sum x)^2}{n} = \frac{609^2}{17} = 21817.$$

Потім визначають величину дисперсії:

$$\text{загальну: } C_y = \sum x^2 - H = 22067 - 21817 = 250 ;$$

$$\text{факторіальну: } C_x = \sum H_i - H = 21921 - 21817 = 104 ;$$

$$\text{випадкову: } C_z = \sum x^2 - \sum H_i = 22067 - 21921 = 146 .$$

Правильність підрахунків перевіряється підсумовуванням:

$C_y = C_x + C_z$, тобто $104 + 146 = 250$. В даному випадку обчислення зроблені правильно.

Далі обраховують показник сили впливу (η) з метою встановлення ступеня (частки) впливу різних факторів на ознаку, зданту до мінливості. Для цього визначають співвідношення між дисперсіями C_x і C_y , C_z і C_y :

$$\eta_x^2 = \frac{C_x}{C_y} = \frac{104}{250} = 0,415 \text{ або } 41,5\% ;$$

$$\eta_z^2 = \frac{C_z}{C_y} = \frac{146}{250} = 0,585 \text{ або } 58,5\% .$$

Показник вірогідності факторної дисперсії (тобто чи вірогідний вплив і частка впливу фактора на мінливість досліджуваної ознаки) визначається за критерієм Фішера. У нашому випадку число ступенів свободи для факторної дисперсії (C_x) дорівнює числу градацій за фактором мінус 1:

$$v_x = 3 - 1 = 2 .$$

Для випадкової дисперсії (C_z) число ступенів свободи дорівнює чисельності вибірки (n) мінус число градацій:

$$v_z = 17 - 3 = 14 .$$

Значення факторного середнього квадрата (σ_x^2) дорівнює:

$$\sigma_x^2 = \frac{C_x}{v_x} = \frac{104}{2} = 52 .$$

Випадковий середній квадрат має значення:

$$\sigma_z^2 = \frac{C_z}{v_z} = \frac{146}{14} = 10,4 .$$

Показник вірогідності впливу дорівнює:

$$F_1 = \frac{\sigma_x^2}{\sigma_z^2} = 5,1 .$$

Обчислене значення F_1 порівнюють зі стандартним значенням F_{st} (додаток 19), яке для розглянутого прикладу дорівнює: для $\beta=0,95$ значення $F_{st}=3,7$; для $\beta=0,99$ – $F_{st}=6,5$; для $\beta=0,999$ – $F_{st}=11,8$.

У нашому прикладі $F_1=5,1$, отже, вплив досліджених доз

іонізуючої радіації на вміст діоксацетонфосфату в еритроцитах людини вірогідний при порозі вірогідності $\beta=0,95$.

Наведений приклад однофакторного дисперсного аналізу і проведені розрахунки справедливі для випадку нечисленної вибірки. При численних вибірках використовують децю інші принципи обчислення необхідних величин, які викладені в рекомендованій літературі.

8.7. МЕТОД БАГАТОФАКТОРНОГО АНАЛІЗУ ОБРОБКИ РЕЗУЛЬТАТІВ ЕКСПЕРИМЕНТУ

Для визначення ступеня взаємного впливу різних параметрів досліджуваних процесів та виявлення об'єктивно існуючих закономірностей використовують метод *багатофакторного аналізу*.

Модель факторного аналізу заснована на тому, що змінну x_j подають у вигляді лінійної комбінації декількох уявних перемінних (факторів або головних компонентів), які найбільш повно відбивають існуючі кореляції між змінними. Інакше кажучи, кожна змінна x_j записується у вигляді:

$$x_j = \sum_{r=1}^m w_{jr} z_r,$$

де: z_r — r -ий фактор; w_{jr} — постійні коефіцієнти, які визначають внесок r -того фактора в j -ту змінну і називаються факторами навантаження; m — мірний вектор, який визначає повну статистичну характеристику досліджуваного об'єкту, в рамках спостережень.

На початку роблять вибірку таких перетворених змінних z_r (факторів), які б забезпечували максимально повний опис кореляцій між величинами, котрі спостерігаються, при мінімальному числі використаних при цьому перемінних. Інакше кажучи, неявно передбачається, що за всіма статистичними зв'язками, які спостерігаються, між характеристиками, що вивчаються, приховується невелике число "суттєвих" параметрів, зміни яких і описують у дійсності стан об'єкта.

Як варіант методу факторного аналізу, як правило, використовують модель компонентного аналізу (метод головних компонент), в котрій реалізовано такий підхід: при відносно повному об'ємі експериментальних даних їх обробляють статистичними методами, і після цього виділяються приховані закономірності між

Параметрами, що спостерігаються.

В даному методі головних компонент до змінних x_j застосовують ортогональне перетворення U :

$$x^{(i)} = Uz^{(i)}; z^{(i)} = U^+ x^{(i)},$$

яке забезпечує некорельованість змінних z_r , тобто

$$\langle z_r z_s \rangle_{\{i\}} = \lambda_r \delta_{rs},$$

де кутова дужка $\langle \dots \rangle_{\{i\}}$ означає усереднення по заданій вибірці об'єктів.

З урахуванням вищенаведеного маємо:

$$\langle z_r z_s \rangle_{\{i\}} = \langle (u_r^+ x) \cdot (x + u_s) \rangle_{\{i\}} = u_r^+ G u_s = \lambda_r \delta_{rs}$$

або у векторній формі:

$$\langle z \otimes z^+ \rangle_{\{i\}} = U^+ G U = \Lambda,$$

де: \otimes — символ прямого добутку; $G = \langle x^{(i)} \otimes x^{(i)+} \rangle_{\{i\}}$ — вибіркова кореляційна матриця змінних, які спостерігаються; U_r — r -тий стовпчик матриці U ($U^+ r$ — рядок транспонованої матриці U^+); Λ — діагональна матриця ($\Lambda_{rs} = \lambda_r \delta_{rs}$).

З останнього виразу безпосередньо маємо:

$$G u_r = \lambda_r u_r$$

тобто базовий вектор є власним вектором кореляційної матриці змінних G . Якщо провести упорядкування їх в послідовність λ_r , яка зменшується за власним значенням, можна показати, що таке перетворення найімовірніше вичерпує дисперсію даних:

$$\sum_{r=1}^p \langle z_r^2 \rangle_{\{i\}} = \sum_{r=1}^p \lambda_r = \max_{\{U\}} p \leq m.$$

Таким чином, для оцінки стану об'єкта дослідження можна обмежитись визначенням декількох основних факторів, що значно спрощує процедуру класифікації за значущістю факторів.

Фактор називається *генеральним*, якщо всі його навантаження суттєво відрізняються від нуля, тобто практично всі змінні, що спостерігаються, дають приблизно однаковий внесок в його значення. Фактор називається *загальним*, якщо хоча б дві змінні є суттєвими для його формування. Нарешті, фактор називається *характерним*, якщо на його формування його впливає практично одна індивідуальна змінна. Характерні фактори практично збігаються із відповідними змінними, властивості, які описуються ними,

можна вивчати індивідуально, не використовуючи для побудови узагальнюючих гіпотез.

Визначення факторних навантажень і складності змінних дає можливість планувати проведення експериментів для ідентифікації об'єктів.

Результати факторного аналізу можна подати в геометричній інтерпретації. Для цього на основі початкової вибірки (статистичного набору одержаних значень змінних, класифікованого за приналежністю до певної підмножини об'єктів) формується вибіркова кореляційна матриця і будується модель головних компонентів. З цих компонентів відбирають відносно невелике число їх (p); тих компонентів, котрі є найбільш значущими за власним значенням. У подальшому будують p -мірний простір, координатами якого є коефіцієнти розкладання $\alpha_k^{(j)}$ вектора даних кожного j -того тестового об'єкта за відповідним факторами:

$$a_k^{(j)} = \sum_{j=1}^m u_{kj} x_j, \quad k = 1, 2, \dots, p.$$

Кожний об'єкт, що досліджується в цьому p -мірному просторі, подається крапкою. Об'єкти, близькі за сукупністю характеристик, будуть групуватися в побудованому таким чином просторі і утворювати область, яка належить до виділеного класу (рис. 8.3). Центр ваги кожної такої групи, який називається *центроїдом*, характеризує середнє значення коефіцієнтів розкладання для об'єктів з подібними характеристиками. Визначивши в подальшому

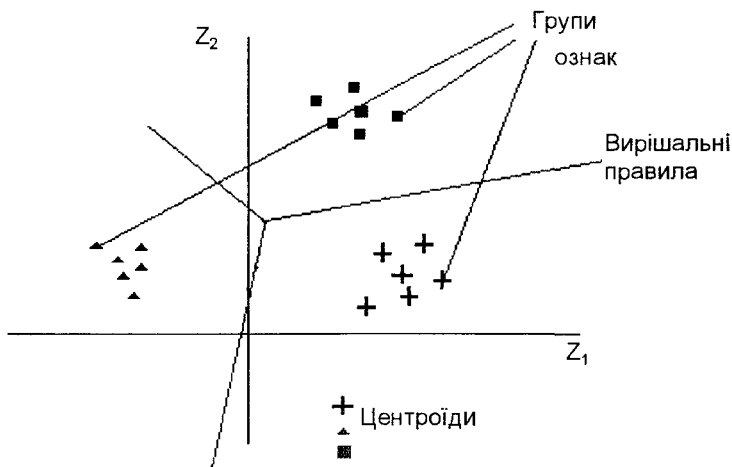


Рис. 8.3. Простір ознак для перших двох факторів

просторові області, всі крапки яких найближче розміщені до відповідного центроїда, розбивають весь побудований простір на підпростори, кожний з яких відповідає даній групі об'єктів, тобто проводять класифікацію за досліджуваним значенням головних факторів. Побудований таким чином підпростір називається *простором ознак*, а межі між областями при належності до кожного з класів — *вирішальним правилом класифікації*.

Цей метод дозволяє визначати приховані, неявні закономірності, котрі об'єктивно існують в явищах, які ми вивчаємо, але не піддаються безпосередньому спостереженню.

В дослідженнях методами факторного аналізу вирішуються наступні завдання:

1) відшукування прихованих закономірностей, які визначаються впливом зовнішніх і внутрішніх причин та механізмів, котрі регулюють перебіг процесу в досліджуваних системах;

2) ущільнення інформації шляхом описання процесу за допомогою мінімального числа загальних факторів, кількість яких часто суттєво менше кількості первинно вибраних параметрів;

3) виявлення і вивчення статистичного зв'язку параметрів з факторами, на основі чого роблять обґрунтовані висновки про ефективність тих чи інших впливів на систему, прогнозується хід розвитку процесу;

4) класифікація об'єктів, тобто віднесення їх до тієї чи іншої визначеної групи, що характеризується компактним розміщенням точок в n -мірному геометричному просторі, координатами якого є значення головних факторів.

Розглянемо основні принципи і можливості багатфакторного аналізу на прикладі його використання при дослідженні сумісної дії іонізуючої радіації та кадмію на клітини печінки і тонкого кишечника щурів. Експериментальні дослідження проводилися в лабораторії фізико-хімічної біології кафедри біохімії, а їх факторний аналіз — за участю співробітників кафедри кріогенної та мікроелектроніки Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Безпорідних щурів-самців, залежно від мети експерименту розподілили на шість груп і проводили дослідження за такою схемою:

- контрольні тварини;
- вводили перорально одноразово хлорид кадмію у дозі 1,0 мг/кг маси тіла (в переліку на іон кадмію);
- рентгенівське опромінення в дозі 1,0 Гр;
- рентгенівське опромінення в дозі 2,0 Гр;
- сумісна дія кадмію та опромінення в дозі 1,0 Гр;

— сумісна дія кадмію та опромінення в дозі 2,0 Гр;

При обробці результатів дані попередньо нормували, оскільки змінні, що спостерігаються, вимірюються в різних одиницях і мають суттєво різні значення. Ця операція неоднозначна, тому що нормування еквівалентне добутку вектора вихідних даних на деяку діагональну матрицю, тобто виконується операція, котра не комутує з операцією ортогонального розкладання, що утворює головні фактори аналізу. Інакше кажучи, зміна нормування призведе до деяких відмінностей у групуванні даних у просторі ознак. Можливе використання різних за змістом нормувань, які відрізняються апріорним вибором "цінної" функції оброблених даних. Наприклад, для двох найпростіших нормувань — значення змінної в контрольній групі та середнє значення її за всіма групами — відмінності функції "цінності" можна описати таким чином. При нормуванні на контроль більш суттєво виявляються відмінності відхилень, що спостерігаються, у піддослідних груп від контрольної, тимчасом як нормування на середнє значення виявляє ступінь розкиду даних усередині одного вимірювання параметра, залежно від умов експерименту, тобто забезпечує визначення міри достовірності відхилень за одним із стандартних критеріїв. Всі подальші результати одержані при нормуванні на контроль, оскільки мета дослідження передбачала саме виявлення відхилень стану досліджуваних об'єктів від контрольної групи при зміні зовнішніх умов. Наданий масив даних охоплював спостереження 48 параметрів, що вимірюються (табл. 8.2)

Для всіх цих параметрів спочатку була обрахована повна матриця коефіцієнтів кореляції. Слід відмітити, що згідно з методикою обробки (усереднення проводилося не за вибіркою всередині однієї групи тварин, а за варіаціями відповідних параметрів між різними групами) високе значення коефіцієнта кореляції для якої-небудь пари величин, що спостерігаються, не треба розглядати як твердження на користь існування визначеної біологічної залежності відповідних параметрів, а тільки як свідчення специфічного впливу на це умов проведення експерименту.

Аналіз кореляційної матриці показав, що між визначеними параметрами достовірно існують як позитивні, так і негативні кореляції щодо змін умов експерименту. При цьому враховували, що точність визначення коефіцієнта кореляції при малих об'ємах вибірки ($n = 6$) різко падає і що може викликати сумнів у дійсній кореляції величин, які спостерігаються. Для випадку $n \leq 10$ дисперсія оцінки коефіцієнта кореляції $\hat{\gamma}$ визначається за формулою:

Таблиця 8 2 Параметри, які вимірюються в дослідженнях

№ параметра, x	Орган і назва параметра	№ параметра, x	Орган і назва параметра
	Висота ентероцитів		Вміст продуктів перекисного окислення ліпідів
1	дванадцятипала кишка		Дієнові конг'югати
2	порожня кишка	25	печінка
	Площа ядер ентероцитів	26	порожня кишка
3	дванадцятиперсна кишка		Шиффові основи
4	порожня кишка	27	печінка
5	діаметр ядер (печінка)	28	порожня кишка
	Мітогічний індекс (1 доба)		Вміст малонового діальдегіду
6	дванадцятипала кишка	29	печінка
7	порожня кишка	30	печінка (через 90 хв інкубації)
	Мітогічний індекс (2 год)	31	порожня кишка
8	дванадцятипала кишка	32	порожня кишка (через 90 хв інкубації)
9	порожня кишка		Кількість ліпідів
	Загальна кількість клітин у крипті (1 доба)	33	триацилгліцеролн (печінка)
10	дванадцятипала кишка	34	фосфоліпиди (печінка)
11	порожня кишка	35	холестерол (печінка)
	Загальна кількість клітин у крипті (2 доби)	36	триацилгліцеролн (порожня кишка)
12	дванадцятипала кишка	37	фосфоліпиди (порожня кишка)
13	порожня кишка	38	холестерол (порожня кишка)
	Активність ферментів печінки	39	триацилгліцеролн (апикальна мембрана)
14	лужна фосфатаза	40	фосфоліпідн (апикальна мембрана)
15	γ-глутамілтрансфераза	41	холестерол (апикальна мембрана)
16	аланінамінотрансфераза	42	активність Ca ²⁺ -АТФази в препаратах порожньої кишки
	Активність ферментів порожньої кишки		Активність Na ⁺ , K ⁺ -АТФази в препаратах
17	лужна фосфатаза	43	препарати порожньої кишки
18	γ-глутамілтрансфераза	44	препарати печінки
19	аланінамінотрансфераза		Активність Mg ²⁺ -АТФази в препаратах
	Активність ферментів у сироватці крові	45	порожньої кишки
20	лужна фосфатаза	46	печінки
21	γ-глутамілтрансфераза		Антиокисна активність.
22	аланінамінотрансфераза	47	порожня кишка
	Вміст полових груп	48	печінка
23	печінка		
24	порожня кишка		

$$\sigma_{\tilde{\gamma}}^2 = \frac{(1 - \tilde{\gamma}^2)^2}{n} + O\left(\frac{1}{n^{2/3}}\right).$$

При $n=6$ і $\tilde{\gamma} < 0,5$ середньоквадратичного відхилення від середнього значення $\tilde{\gamma}$ визначається в основному першим членом у вищенаведеній формулі, звідки відносна помилка дорівнює:

$$\delta\gamma = \frac{\sigma_{\tilde{\gamma}}}{\tilde{\gamma}} \approx \frac{1}{\sqrt{n}} \left(\frac{1}{\tilde{\gamma}} - \tilde{\gamma} \right).$$

Відповідно до цього співвідношення відносна помилка визначення коефіцієнта кореляції при $\tilde{\gamma} \leq 0,4$ перевищує 100%, тобто припущення про наявність кореляції між величинами, що спостерігаються в даному випадку повинна бути відкинута (простіше кажучи, немає підстав вважати змінні кореляційними).

Для $\tilde{\gamma} > 0,5$ припущення про кореляцію відповідних змінних може бути перевірене наступним чином. Нехай з припущенням H_0 — брак кореляції ($\gamma = 0$) — конкурує тільки одне альтернативне припущення H_1 — кореляційні змінні ($\gamma \neq 0$). Нехай в дійсності змінні некореляційні, тобто дійсне значення коефіцієнта кореляції $\gamma_r = 0$. Тоді припущення H_0 відкидається з рівнем значущості α (за визначенням $\alpha \in$ гранична допустима ймовірність помилково відкинутого припущення), якщо вибіркоче значення $\tilde{\gamma}$ попадає в недоступний інтервал, який визначається за умовою:

$$\text{Prob}\{\tilde{\gamma} \geq \gamma_0 | \gamma_r = 0\} = \alpha.$$

Функція ймовірності в лівій частині цієї формули залежить від статистики вибірових значень коефіцієнта кореляції $\tilde{\gamma}$. Можна показати, що для вибірки з нормальної сукупності при індивідуальному значенні $\gamma_r = 0$ щільність розподілу $\tilde{\gamma}$ має вигляд:

$$p(\tilde{\gamma}) = \frac{1}{\sqrt{\pi}} \cdot \frac{\Gamma[0,5(n-1)]}{\Gamma[0,5(n-2)]} \cdot (1 - \tilde{\gamma}^2)^{0,5(n-4)}.$$

При $n = 6$ (що відповідає вибірці, яку розглядаємо) вищенаведене рівняння зводиться до кубічного рівняння для порогового рівня коефіцієнта кореляції γ_0 :

$$\gamma_0^3 - 3\gamma_0 = 2(1 - 2\alpha).$$

Розв'язок цього рівняння дає $\gamma_0 = 0,73$ при $\alpha = 0,05$ і $\gamma_0 = 0,61$ при $\alpha = 0,1$. Таким чином, гіпотеза про кореляцію змінних повинна бути прийнята, якщо вибіркове значення коефіцієнту кореляції перевищує $0,73$ при рівні значимості $0,05$ і $0,61$ при $\alpha = 0,1$. Саме так слід розуміти зроблене вище твердження про корельованість ряду змінних, які аналізуються, при довірчій ймовірності $p_\gamma = 1 - \alpha$. Повністю аналогічне твердження може бути зроблене і для антикореляційних змінних ($\hat{\gamma} < 0$).

При проведенні факторного аналізу спочатку виконувалась діагоналізація повної кореляційної матриці всіх 48 спостережуваних параметрів з метою виявлення загального числа головних факторів, які описують стан об'єкту з повною вимогою. Сингулярні числа кореляційної матриці λ_r наведені в табл. 8.3.

Таблиця 8.3. Власні значення кореляційної матриці

Фактор	z_1	z_2	z_3	z_4	z_5	z_6
λ_r	53.8641	1.5976	0.4081	0.0889	0.0534	0.0399

За своїм змістом власні значення матриці визначають середній внесок кожного фактора в сумарні кореляції всіх змінних. Як видно з даних, наведених у табл. 8.3, середнє значення квадратів величин, які спостерігаються, вичерпується в основному першим фактором, тимчасом як інші описують розкид даних об'єктів, які належать різним групам вибірки. Очевидно, що реальний внесок, який визначає специфіку даних, дають тільки перших три фактори, а інші фактично описують випадкові відхилення — "статистичний шум". Таким чином, повний аналіз усієї сукупності даних може бути проведений на основі обліку перших трьох головних факторів. Відзначимо, що наведені дані свідчать про перевагу методу головних компонентів порівнянно з класичним факторним аналізом, оскільки питання про кількість врахованих факторів вирішується автоматично.

Значення факторних навантажень для головних факторів ілюструє табл. 8.4. Зважаючи на те, що повне число змінних дуже велике, при її аналізі були відібрані тільки ті з них (їх виявилось 18), навантаження яких на один або декілька з трьох головних факторів становить не менше 0,2.

Аналіз наведених даних свідчить, що навантаження всіх змінних на перший (генеральний) фактор коливається у невеликих межах (для всієї сукупності 48 змінних — від $x_{\min} = 0,09$ до $x_{\max} = 0,27$, тобто відрізняється не більш як у 3 рази). Оскільки всі змінні попередньо нормовані на контрольні значення, а навантаження на перший

Таблиця 8.4. Навантаження загальних факторів на шість перших головних факторів

№ фактора	1	2	3	4	5	6
№ змінної						
2	-0.1414	0.0180	-0.0805	0.2231	-0.1700	0.1233
5	-0.1297	0.0498	-0.0477	-0.0225	-0.2099	-0.1911
6	-0.1293	0.2327	0.1784	-0.1748	-0.4320	0.0466
7	-0.1615	0.1772	0.4024	-0.0191	-0.2039	0.0682
9	-0.1175	0.1090	-0.0001	-0.3669	0.4079	-0.1360
10	-0.1215	-0.0498	-0.2865	0.0042	0.0515	0.0965
11	-0.1111	-0.0339	-0.2751	-0.1900	0.0238	0.0379
12	-0.0901	0.0381	-0.3292	-0.0984	-0.2464	0.1044
13	-0.0911	0.0733	-0.2488	-0.2632	0.0523	0.0120
26	-0.1259	0.1243	-0.1129	0.2744	0.2606	0.0646
27	-0.1831	-0.0183	0.2081	0.1039	-0.0884	-0.1934
29	-0.1889	-0.0989	0.2397	-0.2143	0.0396	-0.0217
30	-0.1882	-0.1224	0.2191	-0.1657	0.1101	0.5053
31	-0.2702	-0.7068	-0.1210	0.0674	0.0767	-0.0037
32	-0.2141	-0.2980	0.0877	-0.0862	-0.0869	-0.4277
40	-0.1069	0.2174	-0.0834	-0.1948	-0.0194	-0.1582
44	-0.1198	0.1562	-0.1383	0.3863	-0.0145	-0.2884
47	-0.1691	0.0721	0.1580	0.2497	0.2813	0.1684

фактор мають однаковий знак, значення цього фактора наближено пропорційне числу змінних, які враховуються в середньому значенні всіх нормованих параметрів для даної групи тварин.

Найбільше навантаження на другий головний фактор (z_2) мають змінні:

x_6 — мітотичний індекс в дванадцятипалій кишці;

x_{31} , x_{32} — вміст малонового діальдегіду в препаратах слизової оболонки тонкої кишки;

x_{40} — кількість ліпідів у мембрані щіткової кайми ентероцитів, тобто його значення залежить в основному від реакції кишечника. При цьому змінні (x_6 , x_{40}) відповідають позитивним навантаженням, а змінні (x_{31} , x_{32}) — негативним. Отже, збільшення значення фактора z_2 відповідає збільшенню параметрів (x_6 , x_{40}) та зменшенню (x_{31} , x_{32}) і навпаки. Таким чином, групування даних у проєкції на фактор z_2 визначає конкуренцію відповідних процесів.

Аналогічний аналіз для фактора z_3 дозволяє виділити групи "позитивних" (x_7 — мітотичний індекс в порожній кишці; x_{27} — вміст шифових основи в печінці; x_{29} , x_{30} — вміст малонового діальдегіду в

препаратах печінки) і "негативних" (x_{10} , x_{11} , x_{12} , x_{13} — загальна кількість клітин у крипті різних відділів тонкої кишки) змінних.

Як бачимо, значення даного фактора визначається конкуренцією відповідних процесів у кишечнику та печінці. Це відображає групування даних у проекції z_2 .

Відповідний аналіз можна було б провести і для останніх факторів, але, як відмічалось, вони практично не є характерними змінними стану. Змінні, які не ввійшли до табл. 8.4, майже не впливають на очікувані результати. Це підтверджується особливостями групування досліджуваних об'єктів у просторі ознак, що обговорюється нижче.

Одержані результати в подальшому відображали в просторі ознак, які визначаються найбільш суттєвими головними факторами.

Як відмічалось раніше, аналіз проводився як за всім набором змінних, так і зменшеним набором вихідних даних. Остані формувались або зі змінних з максимальними факторними навантаженнями, або відповідали певному органу тварин (кишечник, печінка). Як і припускалося, якісний аналіз адекватно характеризується першими трьома факторами, котрі описують як групування даних, так і тенденції їхніх змін зі зміною зовнішніх умов.

На рис. 8.4 наведені результати, одержані для факторів (z_1 , z_2 , z_3) з урахуванням усіх вимірюваних змінних параметрів.

В результаті аналізу результатів, представлених на рис.8.4, зроблено такі висновки:

1. Спостерігається чітке виділення області локалізації груп об'єктів 5 і 6, що відповідають групам тварин, які піддавались сумісній дії опромінення та іонів кадмію. Взагалі це групування відрізняється різким зменшенням фактора z_2 , що узгоджується з наведеним вище висновком про роль змінних (x_6 , x_{40}) і (x_{31} , x_{32}). Одержані дані свідчать (див. табл. 8.4) про різке (в 1,5–2 рази) зменшення першої групи параметрів та збільшення (до 3 раз) другої групи при сумісній дії кадмію та опромінення;

2. Конкуренцію процесів у печінці та кишечнику ілюструє зміна фактора z_3 . Зі збільшенням дози опромінення підвищується значення змінних, пов'язаних з підвищенням мітотичного індексу клітин слизової оболонки порожньої кишки x_7 , вмісту шиффових основ та малонового діальдегіду в печінці (x_{27} , x_{29} , x_{30}), та зменшується кількість клітин у криптах різних відділів тонкої кишки (x_{10} , x_{11} , x_{12} , x_{13}). Під впливом тільки іонів кадмію теж підвищується мітотичний індекс клітин слизової оболонки порожньої кишки (x_7) та зменшується кількість клітин у криптах різних відділів тонкої кишки (x_{10} , x_{11} , x_{12} , x_{13}).

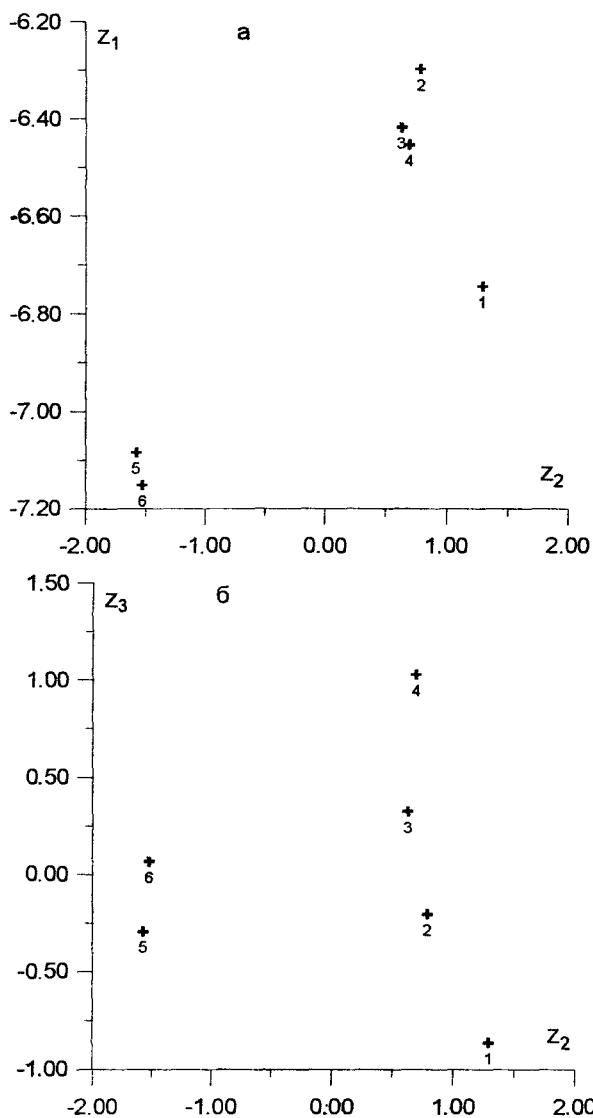


Рис. 8.4. Групування ознак у просторі а – (z_1, z_2) та б – (z_2, z_3) з урахуванням усіх 48 змінних (тут і далі номери відповідають групам підслідних тварин)

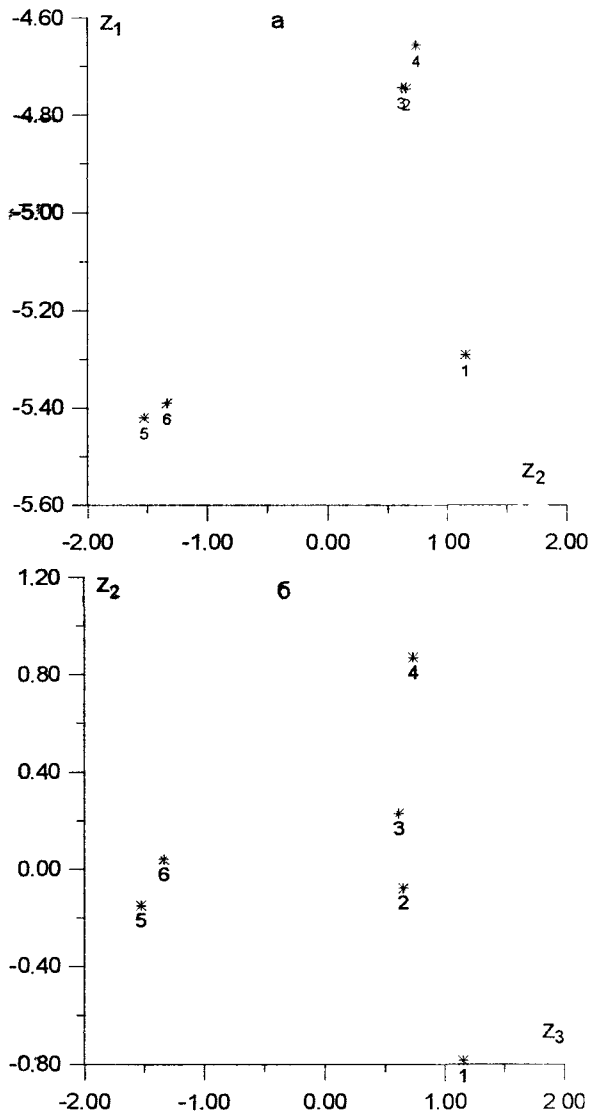


Рис. 8.5. Групування ознак у підпросторі: а – (z_1, z_2) ; б – (z_2, z_3) для параметрів стану тонкого кишечника

В той же час сумісна дія опромінення та іонів кадмію спричиняється до протилежних процесів — різкого зменшення параметра x_7 при збільшенні параметрів x_{10} , x_{11} , x_{12} , x_{13} .

На рис. 8.5 і 8.6 наведені результати аналізу змінних (табл. 8.2), які відносяться тільки до кишечника (30 змінних) та печінки (18 змінних).

У цих випадках немає впливу конкуренції даних для різних органів. Тому можна прослідкувати зміни, які спостерігаються при різних зовнішніх впливах.

Насамперед, порівняння результатів, наведених на рис. 8.4 і 8.5, вказує на якісну подібність їх. Мабуть, це свідчить про те, що досліджувані параметри стану кишечника найбільшою мірою змінюються при дії зовнішніх чинників, і це дає основний внесок у зміну сукупності всіх опрацьованих параметрів.

Аналіз даних для змінних, які відповідають стану печінки (рис. 8.6), свідчить про те, що їхня реакція на зовнішній вплив є більш диференційованою, ніж реакція кишечника.

Значення факторних навантажень для трьох головних факторів у випадку дослідження печінки наведені в табл. 8.5.

Таблиця 8.5. Факторні навантаження основних змінних для печінки

№ фактора	1	2	3
№ змінної			
14	-0.2144	0.2490	0.0515
16	-0.2298	0.2099	0.2212
25	-0.2910	-0.1877	-0.4399
29	-0.3244	-0.4416	0.1064
30	-0.3227	-0.5092	-0.1215
34	-0.2344	0.1557	-0.2053
44	-0.2063	0.5161	-0.1850
46	-0.2538	0.1199	0.4338
48	-0.2649	0.0381	0.5898

Основні особливості прояву дії чинників, що досліджуються, на параметри, які вивчалися в печінці, такі:

1. Спостерігається суттєва відмінність для стану тварин, які належать до 5 і 6-ї груп. Ці зміни виявляються за всіма трьома факторами (z_1 , z_2 , z_3) — групування цих об'єктів у просторі ознак менше, ніж у випадку дослідження кишечника;

2. З другого боку, значно меншими є відмінності між 1 і 2-ю групами, тобто контрольною і тією, в якій тварин піддавали дії тільки іонів кадмію (особливо чітко це показано для факторів z_3 , z_2);

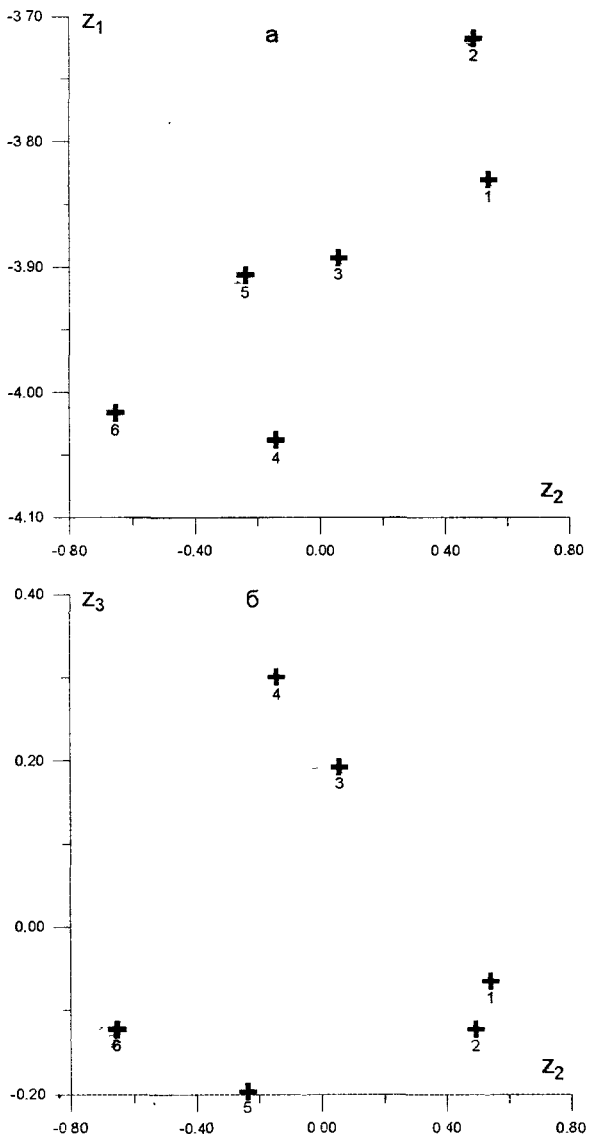


Рис. 8.6. Групування ознак у підпросторі: а - (z_1, z_2) ; б - (z_3, z_2) для параметрів стану печінки

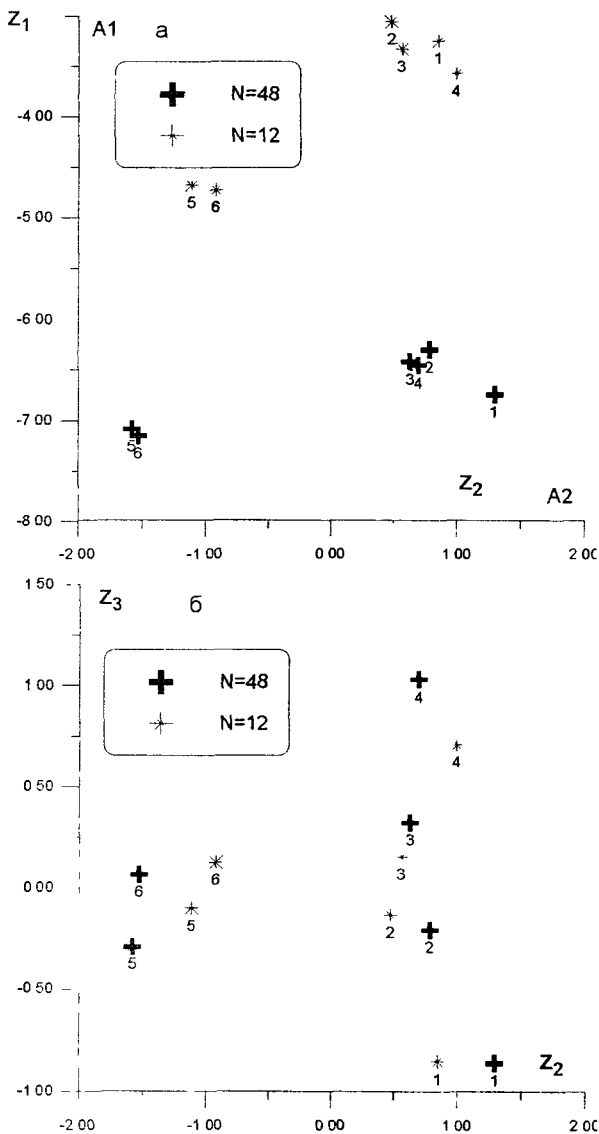


Рис. 8.7. Групування ознак у підпросторах: а - (z_1, z_2); б - (z_3, z_2) для 12 основних параметрів стану

3. Зміни стану печінки при опроміненні і при дії кадмію за всіма трьома факторами суттєво відмінні — опромінення супроводжується зменшенням факторів z_1 , z_2 і збільшенням фактора z_3 . В той же час дія іонів кадмію — протилежна;

4. Сумісна дія опромінення та іонів кадмію характеризується зменшенням факторів z_1 , z_2 (як при дії тільки опромінення) і збільшенням фактора z_3 (як при дії тільки іонів кадмію). Більше того, практично збігаються кількісні значення фактора z_1 для груп з однаковим дозовим навантаженням (немає різниці — в присутності кадмію або без нього), а також фактора z_3 для груп, де діяв кадмій (незалежно від опромінення). Таким чином, для змінних, які описують стан печінки, можна вважати фактор z_1 індикатором дії опромінення, фактор z_3 — іонів кадмію і фактор z_2 — їхнього сумісного впливу.

На завершення проаналізуємо можливість зменшення кількості параметрів при проведенні факторного аналізу. Як показав аналіз факторних навантажень, лише невелика кількість змінних дає значний внесок в три основні фактори, тому можливість суттєво зменшити кількість змінних цілком вірогідна. Для перевірки цього припущення була виконана аналогічна обробка за множиною змінних, які включають лише ті 12 змінних, які мають максимальні навантаження а саме (x_6 , x_7 , x_{10} , x_{11} , x_{12} , x_{13} , x_{27} , x_{29} , x_{30} , x_{31} , x_{32} , x_{40}). Результати цієї обробки наведені на рис. 8.7.

Як бачимо, порівнянню з результатами, одержаними із повного набору змінних, групування ознак змінюється незначно, за винятком фактора z_1 , котрий, як було відмічено вище, збільшується пропорційно числу вимірюваних змінних і зберігає загальну структуру простору ознак.

Результатом багатofакторного аналізу є те, що чітко встановлено ефект підсилення сумісного впливу іонізуючої радіації та кадмію в умовах проведення дослідів на структурно-функціональний стан клітин тонкої кишки та печінки. Крім того, встановлені найхарактерніші параметри, які дозволяють визначити особливості сумісної дії радіації та низьких доз хлориду кадмію на об'єкти досліджень.

8.8. ГРАФІЧНИЙ МЕТОД ВИЗНАЧЕННЯ ЧИСЛА ЕКСПОНЕНТ ТА ЇХ ПАРАМЕТРІВ

У біохімії, особливо при проведенні біокінетичних досліджень, часто буває потрібно визначити число експонент, котрі найкраще описують експериментальні результати, а також визначити параметри

цих експонент. Така постановка завдання не випадкова, вона пов'язана з тим, що більшість кінетичних залежностей у біохімічних дослідженнях описується експонентою або сумою експонент. Так, число експонент відповідає числу проміжних сполук у реакціях утворення продуктів ферментативних реакцій тощо.

В даний час розроблено багато методів визначення числа експонент та їхніх параметрів. Одним з найпростіших наочних і таких, що широко використовуються в біохімії, є *графічний метод*.

Якщо експериментальні дані описуються однією експонентою (рис. 8.8.), то їх можна подати в такому вигляді:

$$C = A \exp(-\beta t),$$

якщо C спадає,

$$C = A[1 - \exp(-\beta t)],$$

якщо C зростає.

Величину A називають *передекспоненційним множником*, а β — *показником експоненти*. Якщо з часом значення величини C спадають, то $A = C_0$, тоді:

$$\frac{C}{A} = \frac{C}{C_0} = \exp(-\beta t); \quad \ln \frac{C}{C_0} = -\beta t.$$

Таким чином, у випадку, коли C спадає, параметр β визначається за тангенсом кута нахилу в координатах $[\ln(C/C_0), t]$ (рис. 8.9а).

У випадку, коли значення величини C з часом зростають, то $A = C_\infty$, тоді:

$$\frac{C}{A} = \frac{C}{C_\infty} = 1 - \exp(-\beta t);$$

$$1 - \frac{C}{C_\infty} = \exp(-\beta t);$$

$$\ln \left[1 - \frac{C}{C_\infty} \right] = -\beta t.$$

Отже, коли C зростає, то параметр β визначається за тангенсом кута нахилу в координатах $[\ln(1 - C/C_\infty), t]$ (рис. 8.9б).

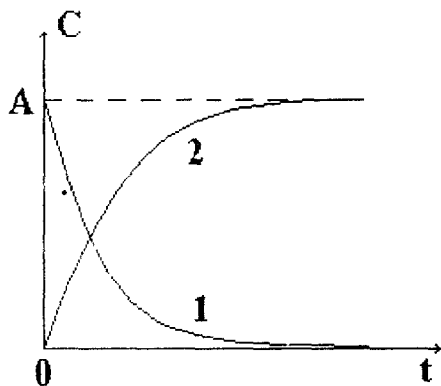


Рис. 8.8 Опис експериментальних даних однією експонентою: 1 - випадок спадання, 2 - випадок зростання

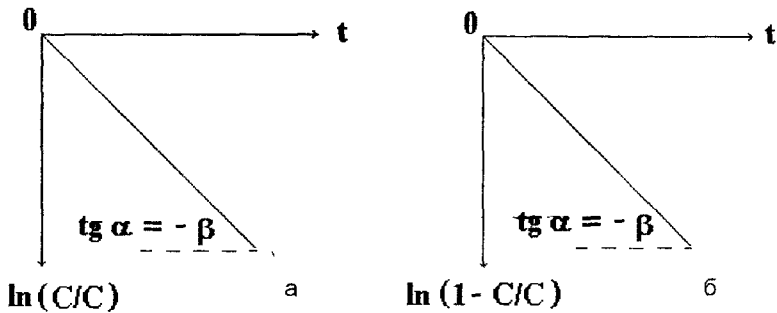


Рис. 8.9. Визначення параметрів експоненційних залежностей: а - якщо C спадає; б - якщо C зростає

Складнішим для аналізу графічним методом є випадок, коли C описується декількома експонентами. Розглянемо випадок, коли C є сумою двох експонент (при більшій кількості їх підхід до розв'язування задачі такий же).

У випадку, коли C описується двома експонентами, величину C можна подати наступним чином (рис. 8.10):

$$C = A_1 \exp(-\beta_1 t) + A_2 \exp(-\beta_2 t), \text{ якщо } C \text{ спадає;}$$

$$C = A_1 [1 - \exp(-\beta_1 t)] + A_2 [1 - \exp(-\beta_2 t)], \text{ якщо } C \text{ зростає;}$$

$$C = A_1 \exp(-\beta_1 t) + A_2 [1 - \exp(-\beta_2 t)], \text{ якщо } C \text{ спадає і зростає,}$$

При графічному методі визначення параметрів експонент вважається, що значення $\beta_1 > \beta_2$ (достатньо в 10 разів). Якщо показники експонент різняться у менше число разів, то похибка розрахунку їх цим методом є великою.

Експоненти, в яких за реально малий час спостереження величина C змінюється незначно, називаються "повільними". Якщо ж величина C значно змінюється, то такі експоненти називаються "швидкими". При тривалому часі спостереження "швидкі" експоненти досягають практично рівноваги, і ними можна знехтувати. Слід зазначити, що вибір відносно короткого і тривалого часу спостереження за величиною C є

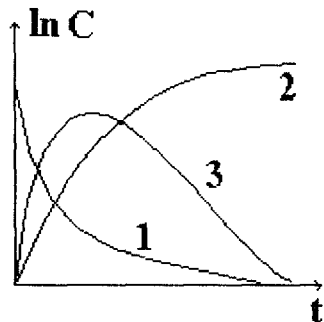


Рис. 8.10. Двохекспоненційні залежності: 1 - випадок спадання; 2 - випадок зростання; 3 - випадок зростання і спадання

умовним. Певним орієнтиром є точка перетину в напівлогарифмічних координатах $(\ln C, t)$.

Визначення параметрів експоненти починають з "повільної" (рис. 8.11). При цьому для спадаючої експоненти розглядають процес спочатку при відносно тривалому часі його протікання. Здійснюють це таким же чином, як і для однокоекспоненційної залежності в напівлогарифмічних координатах $(\ln C/A, t)$. Після цього розраховують C_n (для "повільної" експоненти) для коротшого часу спостереження за величиною C : $C_n = A_2 \exp(-\beta_2 t)$.

У подальшому розраховують $C_{ш}$ (для "швидкої" експоненти) для кожного короткого часу спостереження: $C_{ш} = C - C_n$. Величина $C_{ш}$ містить інформацію тільки про "швидку" експоненту. Із значень $C_{ш}$ розраховують параметри "швидкої" експоненти відповідно до вже вказаних методик.

Для випадку, коли величина C зростає і описується двома експонентами, визначають величину $C' = C_{max} - C$, де C_{max} — максимальне значення C . Параметри C' визначають таким же чином, як і для випадку, коли C спадає і описується двома експонентами.

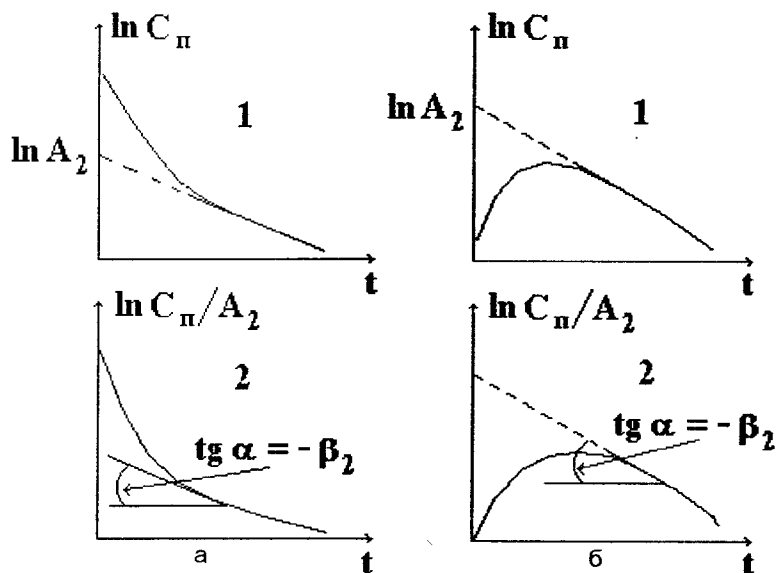


Рис. 8.11. Визначення параметрів "повільної" експоненти: а - випадок складання експоненційної залежності; б - випадок зростання і спадання; 1 - визначення передекспоненційного множника; 2 - визначення показника експоненти

ФІЗИКО–ХІМІЧНІ Й ІМУНОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

9. ГІДРОДИНАМІЧНІ МЕТОДИ

9.1. В'ЯЗКІСТЬ

В'язкість — це фізико–хімічна характеристика рідини, в якій відбувається рух молекул під дією сил механічного зрушення. Одна з властивостей рідини — чинити опір при відносному зміщенні її шарів. Опір, якого зазнає рідина при русі одного прошарку рідини, відносно інших, називається *динамічною в'язкістю* (η). Опір, що виникає за рахунок внутрішнього тертя між прошарками рідини призводить до появи градієнта швидкості (dx/dt). Подібний вид деформації рідини, спричинений градієнтом швидкості, називається *зрушенням*. Відповідно до закону Ньютона для в'язких рідин сила тертя (опору) між прошарками F пропорційна площі шарів A та градієнту швидкості між ними (швидкість поступального руху одного прошарку відносно іншого):

$$F = \eta A \left(\frac{dx}{dt} \right).$$

Рідина, величина η якої є постійною, не залежить від напруження (F/A) і швидкості (градієнта) зрушення (dx/dt), називається *ньютонною*. Для неньютонної рідини η залежить від вищезгаданих величин, а також від їхніх співвідношень.

Рух рідини, при якому сусідні прошарки рухаються за паралельними траєкторіями, називається *ламінарним* (від лат. *Lamina* — пластинка, смужка). Ламінарний характер руху рідини має місце тільки при невеликих швидкостях і зберігається доти, поки величина градієнта зрушення не є занадто великою. При збільшенні швидкості потоку в рідині виникають вихори, які змішують усі прошарки рідини. При таких значеннях градієнта зрушення виникає *турбуленція* (від лат. *turbulentia* — вирування, неспокій), що спричиняє певні труднощі в інтерпретації як в теоретичних, так і в експериментальних дослідженнях.

Розчини, що містять макромолекули, мають більшу в'язкість (η) ніж чистий розчинник (η_0). Це обумовлене декількома параметрами, зокрема об'ємом розчину, який займає молекула; відношенням довжини молекули до її ширини та жорсткістю молекули. Для більшості макромолекул молекулярний об'єм пов'язаний з молекулярною масою.

При визначенні в'язкості речовин використовуються такі вирази:

— відносна в'язкість ($\eta_{\text{відн.}}$) — відношення в'язкості досліджуваної рідини до в'язкості розчинника: $\eta_{\text{відн.}} = \eta/\eta_0$ і є функцією як розмірів, так і форми макромолекул;

— питома в'язкість ($\eta_{\text{пит.}}$) — частка зміни в'язкості розчину, спричинена тільки додаванням розчиненої речовини: $\eta_{\text{пит.}} = \eta_{\text{відн.}} - 1$, або

$$\eta_{\text{пит.}} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0};$$

— приведена в'язкість ($\eta_{\text{прив.}}$) — збільшення в'язкості розчину, яка віднесена до одиниці концентрації розчиненої речовини:

$$\eta_{\text{прив.}} = \frac{\eta_{\text{пит.}}}{c}.$$

Зауважимо побічно, що визначення приведеної в'язкості особливо доцільне при дослідженнях процесів денатурації різних білків — при дії на глобулярний білок фізичних або хімічних факторів, що викликають перехід його в статистичний клубок. приведена в'язкість білка в розчині зростає, а при денатурації неглобулярних білків (колаген, міозин), які мають витягнуту форму, внаслідок чого зменшується ступінь асиметрії молекул, вказана в'язкість спадає.

— внаслідок різних міжмолекулярних взаємодій у розчині, пов'язаних з характеристичними властивостями (форма та об'єм) розчинених речовин, часто користуються характеристичною (граничною) в'язкістю:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \frac{\eta_{\text{пит.}}}{c}$$

де: c — концентрація розчиненої речовини.

Ця величина екстрапольована до нескінченності розведення та до нульового градієнта швидкості або до нульового напруження зрушення (для виключення турбуленції).

При цьому треба зважати на можливу неньютонову залежність $[\eta]$ від градієнта зрушення, як це має місце при дослідженнях розчинів деяких несферичних макромолекул (наприклад, ДНК), котрі мають велике осьове відношення (довгі та тонкі). Подібні видовжені молекули при високих швидкостях зрушення здатні орієнтуватися довгою віссю паралельно лініям потоку. Це зумовлює зниження відносної в'язкості, а ступінь залежності $\eta_{\text{відн.}}$ від градієнта зрушення збільшується зі збільшенням осьового відношення. З цього випливає, що чим більше осьове відношення молекул (відповідно — молекулярна маса), тим менша $[\eta]$ для даного значення градієнта зрушення.

Щоб уникнути вищезгаданих труднощів, треба мати на увазі таке: а) якщо відносна в'язкість мала при високих концентраціях, молекула

повинна бути більш–менш компактною, якщо ж $\eta_{\text{відн}}$ велика при низьких концентраціях, макромолекула повинна мати високе осьове відношення; б) у випадку значного зменшення відносної в'язкості зі збільшенням градієнта зрушення осьове відношення повинно бути високим.

Визначення в'язкості дозволяє описувати поведінку потоку рідини в паралельних пластинках або в трубках; вивчення подібного потоку є найпростішим способом виміру в'язкості різних розчинів біополімерів. Прилади, якими користуються для визначення коефіцієнта внутрішнього тертя, називаються *віскозиметрами*. Існує два типи таких приладів: капілярні і ротаційні. Більшість віскозиметрів базуються на принципі капіляра. Найпростішим є віскозиметр Оствальда, котрий являє собою U–подібну скляну трубку з двома розширеннями, з'єднану капіляром, через який витікає певний об'єм рідини з розширення одного коліна в розташоване нижче розширене коліно (рис. 9.1).

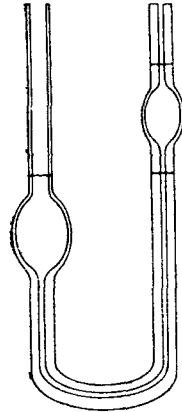


Рис. 9.1. Віскозиметр Оствальда

Різниця тиску визначається різницею рівнів рідин у двох колінах трубки. Вона залежить як від густини рідини, так і від різниці рівнів. Загальна швидкість витікання прямо пропорційна густині і обернено пропорційна в'язкості: час витікання = $K(\eta/\rho)$, де K — постійна приладу, яка визначається за допомогою рідини відомої в'язкості та густини.

На практиці в'язкість визначається відношенням часу проходження у віскозиметрі досліджуваної рідини та рідини з відомою в'язкістю:

$$\eta_{\text{зразок}} = \eta_{\text{стандарт}} \frac{\rho_{\text{зразок}} \cdot t_{\text{зразок}}}{\rho_{\text{стандарт}} \cdot t_{\text{стандарт}}}$$

У більшості випадків віскозиметр Оствальда використовується для вимірювання в'язкості ньютонових рідин — розчинів білків та низькомолекулярних зразків нуклеїнових кислот. Головним недоліком віскозиметра Оствальда є неможливість змінювати градієнт зрушення.

Конструкція капілярного віскозиметра Уббелодє (рис. 9.2) має деякі переваги над віскозиметром Оствальда, які полягають перш за все в тому, що розведення досліджуваного розчину, певним об'ємом розчинника можна здійснювати безпосередньо у віскозиметрі. Завдяки цьому значно спрощується вивчення концентраційної залежності. Крім того, у віскозиметрі Уббелодє немає меніска, що має суттєве значення

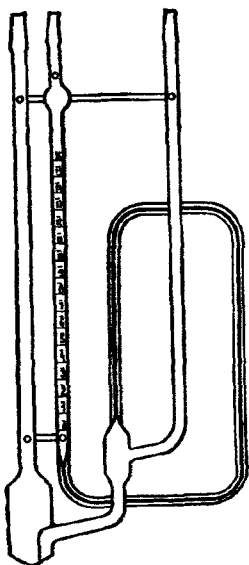


Рис. 9.2. Капілярний віскозиметр Уббелодє

при вимірюванні в'язкості рідин з низьким гідростатичним тиском.

В ротаційних віскозиметрах можна змінювати градієнт швидкості, задавати різні кутові швидкості обертання ротора. Це дозволяє вимірювати в'язкості при різних градієнтах зрушення, що характерно для неньютонових рідин. Одним з таких віскозиметрів є віскозиметр Зимма-Крозерса з плаваючим ротором та його модифікація із зануреним ротором (рис. 9.3). У віскозиметрі цього типу досліджувана рідина вміщується в зазор між двома співвісними тілами (циліндрами). Один з циліндрів (ротор) обертається, а другий — нерухомий. В'язкість вимірюється за кутовою швидкістю ротора, який створює певний момент сили на нерухомому циліндрі, або за моментом сили, що діє на нерухомий циліндр при заданій кутовій швидкості обертання ротора.

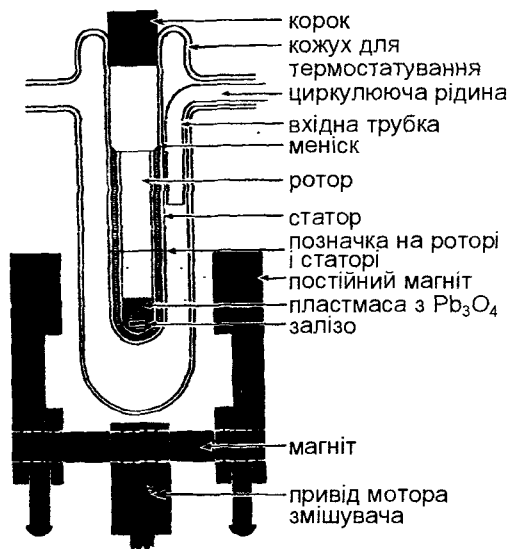


Рис. 9.3. Ротаційний віскозиметр Зимма-Крозерса

В'язкість рідин значною мірою залежить від температури — в межах 2% на 1°C при 20°C. Це пов'язане з тим, що при підвищенні температури збільшується середня відстань між молекулами, а отже, зменшується зчеплення між ними. Тому в процесі віскозиметрії потрібний дуже точний контроль температури ($\pm 0,01^\circ\text{C}$).

До інтерпретації віскозиметричних результатів слід підходити з певною обережністю, навіть тоді, коли теоретичні викладки добре розроблені. При визначенні в'язкості розчинів макромолекул треба враховувати прояв таких усклад-

нюючих факторів, як зарядові ефекти, агрегація, дезорганізація молекул тощо.

За допомогою віскозиметричного методу можна визначати співвідношення кільцевих та лінійних форм у молекулах ДНК, особливості конформаційних комплексів ДНК з гістонами, інтеркаляційні процеси в ДНК, утворення ДНК при ферментативній полімеризації мононуклеотидів тощо. Вимірювання в'язкості дозволяє також оцінювати ступінь зшивання в полімерах, зокрема виявляти внутрішньоланцюгові дисульфідні містки в білках. В'язкість розчинів визначають при вивченні перебігу деяких ферментативних реакцій, в яких відбувається розщеплення макромолекулярних субстратів.

Гідродинамічне зрушення. Відомо, що при інтенсивному змішуванні, струшуванні або пропусканні крізь капіляр чи при турбулентному русі розчинів видовжених (лінійних) молекул (наприклад, ДНК) відбувається зниження в'язкості та коефіцієнта седиментації цих розчинів під дією гідродинамічних сил зрушення. Однак при цьому, якщо враховувати кількість розчину, що протікає за одиницю часу, або швидкість чи інтенсивність змішування розчину, то цей процес можна контролювати і кількісно оцінювати ступінь руйнування молекули в розчині. Відомо також і те, що величина критичної зрушувальної сили, тобто найменшого напруження зрушення, при якому молекула розривається, знижується зі збільшенням молекулярної маси.

Величину критичного напруження зрушення можна вимірювати для напівкількісних аналітичних визначень. Якщо, наприклад, відомо, що досліджувана молекула лінійна, то за напруженням зрушення, яке потрібне для розриву молекули навпіл (50%), можна визначити її молекулярну масу. Для цього серію розчинів цієї речовини з відомою молекулярною масою піддають гідродинамічному впливу з різною інтенсивністю (швидкістю) і будують графік залежності найнижчої сили впливу, необхідної для розриву молекули на 50%, від молекулярної маси. За допомогою стандартної калібрувальної кривої можна оцінювати молекулярну масу молекули, що досліджується, шляхом вимірювання для неї критичних гідродинамічних факторів.

Для наукових досліджень гідродинамічне зрушення може бути використане не тільки для окремих макромолекул, але й для руйнування значно більших структур і навіть клітин. Для цього найчастіше застосовується дія звукового поля високої інтенсивності, для чого розчин вміщують в об'ємний резонатор, або вводять у розчин джерело коливань. При цьому в розчині швидко утворюються та лопаються мікропухирці (*кавітація*), що обумовлюється розчи-

неними газами, котрі виходять у вигляді пухирців з розчину. Саме інтенсивність лопання цих пухирців і спричиняє руйнацію клітин, агрегатів молекул або макромолекул.

9.2. СЕДИМЕНТАЦІЯ

Седиментація (осадження) — загальний термін для позначення процесу розділення неоднорідних систем (суспензій, емульсій) в полі відцентрової сили. Вимірювання руху молекул уздовж напрямку дії відцентрової сили (швидкість седиментації) дає можливість одержувати інформацію про молекулярну масу, щільність і форму часток. Якщо седиментаційний аналіз проводиться з використанням центрифуги, то цей процес називається *центрифугуванням*. Розділення речовин за допомогою центрифугування базується на різниці в швидкості седиментації часток у відцентровому полі, яка обумовлена різною щільністю, формою або розмірами часток. Швидкість седиментації залежить від відцентрового прискорення (G), яке прямопропорційне кутовій швидкості ротора (ω) і відстані між часткою та віссю обертання (R): $G = \omega^2 \cdot R$. Подібна залежність свідчить про те, що швидкість руху частки пропорційна величині відцентрової сили.

Відношення величини відцентрового прискорення ($\omega^2 \cdot R$) до прискорення сили тяжіння (g), називається *відносним відцентровим прискоренням* і виражається формулою

$$G = \frac{\omega^2 R}{g} = \frac{(2\pi n)^2 \cdot R}{g},$$

де: ω — кутова швидкість (рад/сек); R — радіус ротора (см); g — гравітаційна стала (980 см·сек⁻²); π — константа (3,14); n — число обертів за секунду.

Залежно від розмірів ротора і швидкості обертання величина G може бути визначена за номограмою (див. додаток 16).

На практиці також користуються визначенням *коефіцієнта седиментації* (S), що зумовлюється відношенням величини швидкості до відцентрового прискорення:

$$S = \frac{V}{\omega^2 R}$$

Коефіцієнт седиментації дає інформацію про форму, розміри та ступінь гідратації макромолекул і залежить від концентрації речовин, швидкості центрифугування та іонної сили розчинника, які пов'язані з наявністю в молекулах зарядів, залежністю форми молекул

від складу розчинника, деформацією молекул під час руху тощо.

Для кількісного визначення часток (розмірів та щільності) методом центрифугування користуються *константою седиментації*, величина якої не залежить від умов її визначення, має універсальний характер, і може бути співставлена в різних експериментальних дослідженнях. Константа седиментації визначається за коефіцієнтом седиментації часток при центрифугуванні в стандартному середовищі. Таким середовищем є вода при температурі 20°C, в'язкість і густина якої при цьому стала. Стандартним середовищем можуть бути й інші рідини, але за умови, що відома їхня в'язкість і густина та визначений коефіцієнт седиментації. Константу седиментації частки знаходять шляхом визначення швидкості осадження її в момент, коли вона перебуває на певній відстані від осі ротора, який обертається з певною кутовою швидкістю. При цьому попередньо визначають густину частки та щільність і в'язкість середовища саме в тому місці, де розташована частка. Константа седиментації виражається в одиницях Сведберга. *Сведберг (S)* — одиниця коефіцієнта седиментації, який пропорційний швидкості седиментації молекули при даному відцентровому прискоренні. Один *Сведберг* дорівнює 10^{-13} с.

У методі седиментації, крім вищезгаданих залежностей, існують і інші важливі положення, основними з яких є:

1. При однаковій щільності частки (молекули) більшого розміру осаджуються швидше, ніж дрібніші;
2. Чим більша в'язкість середовища та коефіцієнт тертя, тим повільніший рух часток;
3. Швидкість седиментації пропорційна щільності часток, тобто частки, які мають малий парціальний питомий об'єм (більш щільний), рухаються швидше.

Необхідно також зауважити, що швидкість осадження сферичних молекул залежить не тільки від відцентрового прискорення, але й від щільності, радіуса цих часток, а також від в'язкості середовища суспендування. В той же час, несферичні молекули однакової маси, але різної форми, осаджуються при різних швидкостях. Пояснюється це тим, що видовжені напівжорсткі молекули (наприклад, молекули ДНК) чинять більший опір, і в певній густині середовища зростає коефіцієнт їхнього тертя.

Принципово в дослідженнях з використанням седиментації можуть існувати два типи початкових умов: при осадженні рівномірно розподілених часток у розчині вони рухаються таким чином, що залишають за собою зону чистого розчинника (швидкісна седиментація), а результати отримують з параметрів межі між

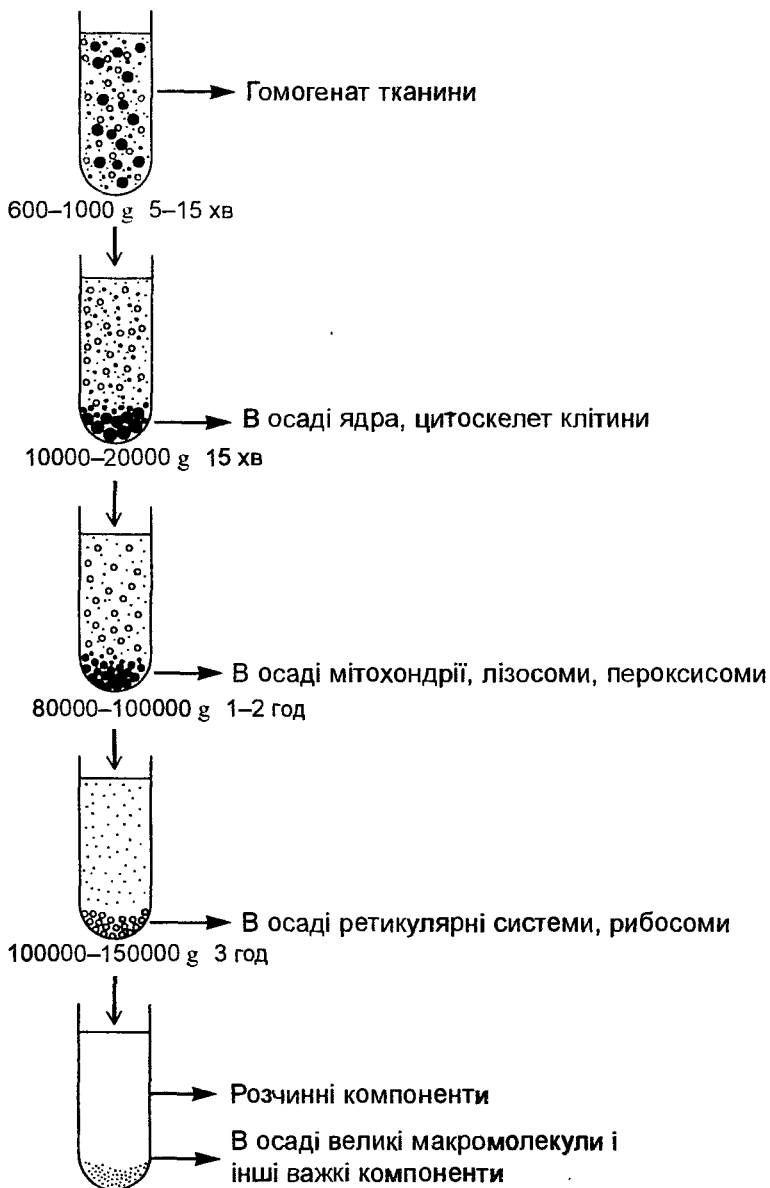


Рис. 9.4. Схематичне зображення процесу препаративного центрифугування

розчинником та розчином; другий тип початкових умов характеризується тим, що зразок наноситься у вигляді шару на розчинник з більшою густиною (зональна седиментація).

Розрізняють препаративне й аналітичне центрифугування.

Препаративне центрифугування

В біохімічних дослідженнях препаративне центрифугування використовується для очищення і фракціонування біологічного матеріалу — субклітинних органел, окремих макромолекул (ДНК, білків тощо) з метою вивчення їхньої структури та біологічної активності (рис. 9.4).

Основними видами препаративного центрифугування є диференційне, зонально-швидкісне та ізопікнічне (рівноважне).

1. Диференційне (роздільне) центрифугування

Суть цього виду центрифугування є почергове, роздільне осадження часток; воно базується на різниці в швидкостях седиментації часток у суміші, які відрізняються одна від одної розмірами та щільністю.

Роздільне осадження суспензії біологічного матеріалу досягається шляхом ступінчастого збільшення відцентрового прискорення. Суспензія біологічного матеріалу, в якій рівномірно розподілені складові суміші, піддається первісному центрифугуванню, в результаті чого отримують фракцію (осад) важких часток (рис. 9.5). Одержаний осад знову суспендується в розчині і центрифугується при більшому, ніж попереднє, відцентровому прискоренні. При цьому забруднення осаду великих часток дрібнішими, значно зменшується. Одержати досить чистий препарат великих часток можна лише за декілька (2–3 рази) поетапних прийомів суспендування та центрифугування. В свою чергу, центрифугування первісної надосадової



Рис. 9.5. Роздільне центрифугування

рідини (супернатант) при більших швидкостях або протягом тривалішого часу приводить до осадження часток середніх розмірів та щільності, а потім і до осадження найдрібніших часток, які мають найменшу щільність.

Диференційне центрифугування використовується при препаративному розділенні і визначенні молекулярних мас білків, для характеристики розмірів та форм нуклеїнових кислот, для розділення компонентів біологічних мембран тощо.

2. Зонально-швидкісне центрифугування

Особливості цього типу центрифугування полягають у тому, що частки, щільність яких значно більша за густину середовища, розділяються за швидкістю седиментації. При цьому осад не утворюється, а частки різних розмірів зосереджуються розмежованими (зональними), дискретними шарами або смугами. Для того, щоб шари під час центрифугування виходили вузькими і не змішувались один з одним внаслідок локального переміщення рідини (конвекція), створюється градієнт густини середовища вздовж радіуса обертання в напрямку від центра до периферії.

Для створення градієнта густини розчинів при зонально-швидкісному центрифугуванні використовуються розчини сахарози, гліцеролу, метризаміду, фіколу, градієнти H_2O-D_2O та ін. Вибір того чи іншого градієнта визначається конкретними задачами фракціонування. Для одержання градієнта найчастіше використовується сахароза з фіксованим рН (у буферному розчині), оскільки вона не взаємодіє з більшістю хімічних реагентів і дає можливість застосовувати оптичні методи аналізу (додаток 13). В тих випадках, коли речовина, що досліджується, не є стабільною (білок, фермент), для створення градієнта використовується гліцерол, в якому більшість білків та активність ферментів стабільні. Для речовин, чутливих до перепаду осмотичного тиску, використовується градієнт H_2O-D_2O . Використання метризаміду (похідне трийодбензойної кислоти) обумовлене його хімічною інертністю: він взаємодіє з біополімерами і не впливає на ступінь їхньої гідратації в розчині, стійкий в діапазоні рН 2,5–12, добре розчиняється у воді, а наявність у структурі трьох атомів йоду забезпечує високу власну густину (2,17 г/см³). Градієнт метризаміду використовується для дослідження біомакромолекул (нуклеїнових кислот та білків). Фікол (співполімер сахарози і епіхлоргідрину) добре розчиняється у воді, стійкий у широкому діапазоні рН. Розчини фіколу мають значну, порівняно з сахарозою, в'язкість і низький осмотичний тиск. Крім того, зважаючи на те, що великі розміри молекул фіколу не дозволяють проходити

крізь клітинні мембрани, його застосовують для створення градієнтів густини при центрифугуванні клітин, клітинних органел і часток, зв'язаних з мембранами.

Профіль градієнта густини розчину створюється двома способами — ступінчасто і лінійно. При створенні ступінчастого градієнта густини в центрифужну пробірку за допомогою піпетки вносять декілька розчинів з послідовно зменшуваною концентрацією (густиною). В лінійному градієнті концентрація (густина) розчину плавно збільшується від меніска до дна пробірки. Як правило, для створення лінійного градієнта розчину користуються спеціальним пристроєм (рис. 9.6). Він складається з двох циліндричних резервуарів однакового діаметра, котрі сполучаються між собою в нижній частині каналом з краном або затискачем, що дозволяє регулювати пропорції, в яких змішується вміст обох ємкостей. Один з резервуарів

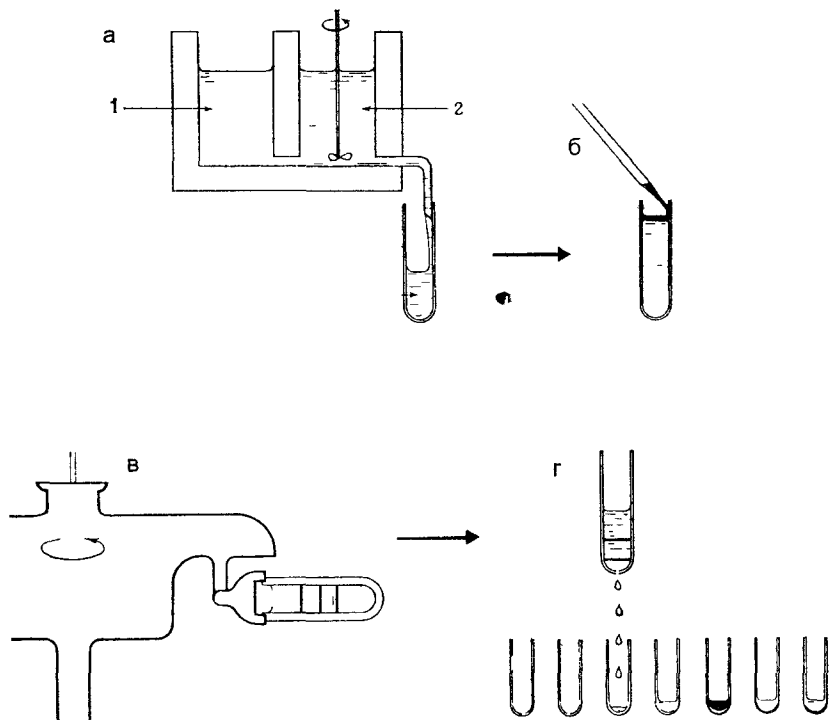


Рис 9.6 Послідовність операцій при зонально-швидкісному центрифугуванні: а – одержання лінійного градієнта, б – нанесення зразка, в – центрифугування, г – фракціонування градієнта, 1 – розчин з низькою густиною; 2 – розчин з високою густиною

(змішувач) має мішалку і вихідний отвір, крізь який рідина подається в центрифужну пробірку. При створенні лінійного градієнта розчин з більшою густиною поступово випускається зі змішувача в центрифужні пробірки і одночасно заміщується однаковим об'ємом розчину з меншою густиною, який надходить у змішувач з другого резервуара через канал з краном. При необхідності формування градієнтів густини різної крутості використовується система з двох механічно керованих шприців, які заповнюються розчинами різної густини.

Нелінійні градієнти можна створювати завдяки системі, в якій обидва резервуари неоднакові, а відхилення від лінійності будуть тим значнішими, чим більша різниця в діаметрах резервуара і змішувача.

На сформований градієнт обережно наносять невеликий об'єм розчину, що досліджується, у вигляді шару. Важливо, щоб розчин, який наноситься, завжди мав густину меншу ніж густина верхнього шару градієнта.

При визначенні коефіцієнта седиментації тієї чи іншої речовини (молекули), як правило, використовуються стандартні зразки (маркери), значення коефіцієнтів седиментації яких попередньо визначається методом аналітичного ультрацентрифугування.

Після закінчення центрифугування і розділення часток у вигляді серії зон або смуг, вміст пробірки фракціонується. Існує декілька способів фракціонування градієнта, проте найчастіше використовується метод збору фракцій краплинами крізь отвір на дні пробірки (див. рис. 9.6). Інший поширений спосіб полягає у відсмоктуванні градієнта з дна пробірки опущеною зверху порожнистою голкою з рівно обрізаним кінцем. І, нарешті, досить надійний спосіб фракціонування градієнта забезпечується пристроєм для відсмоктування градієнта в напрямку від меніска до дна пробірки крізь плаваючий нейлоновий корок з трубкою всередині.

Окремі фракції, одержані при центрифугуванні і фракціонуванні вмісту пробірок, потім аналізують за радіоактивністю, ферментативною активністю, флуоресценцією, адсорбцією, детектують за допомогою хімічних тестів тощо.

3. Ізопікнічне (рівноважне) центрифугування

Ізопікнічне центрифугування передбачає створення такого градієнта по довжині пробірки, де густина розчину на дні була більшою, ніж у найщільніших місцях його, а в меніска — найменша, ніж у найменш щільних часток суміші, що фракціонується. В цих умовах частки, що досліджуються, будуть мігрувати вздовж градієнта рідини доти, поки не досягнуть положення, в якому густина

середовища зрівняється з їхньою плавучою щільністю; частки з різною щільністю розташовуються в різних ділянках градієнта. Слід зауважити, що при ізопікнічному центрифугуванні вирішальним є не форма, розміри, а отже, й маса часток, що аналізується, а тільки плавуча щільність, швидкість обертання ротора, геометрія ротора і пробірок. На величину густини, при якій частки утворюють ізопікнічні смуги, впливає перш за все природа середовища суспендування.

В зоні рівноваги частки суміші розташовуються окремими смугами, ширина яких визначається співвідношенням процесу концентрування за рахунок седиментації — флотації (впливання) і процесу дифузії. Ширина смуги буде тим меншою, чим крутішим виявиться градієнт густини середовища і чим більшою буде маса часток — зі збільшенням маси часток зменшується схильність їх до дифузії.

Для створення градієнтів густини в ізопікнічному методі центрифугування використовуються солі важких металів — цезію та рубідію (Cs_2SO_4 , CsCl , трихлорацетати — CCl_3COOCs , CCl_3COORb), а також метризамід, та NaI або KI , густина концентрованих (насичених) розчинів яких досить висока. Для створення градієнта густини найпоширенішим у практиці досліджень є хлорид цезію (додаток 13). Вибір тієї чи іншої солі визначається в першу чергу співвідношенням густини її концентрованих розчинів і плавучої щільності в них біополімерів (нуклеїнових кислот, білків, субклітинних органел тощо).

Основним недоліком вищезазначених речовин є те, що їх іони сольватуються (зв'язують воду) і тим самим обезводнюють біополімери, що аналізуються. В цьому відношенні найпридатнішим є метризамід, який практично не зв'язує воду. Крім того, солі важких металів виявляють активність як дисоціюючі агенти. Зокрема, при рівноважному центрифугуванні білкових комплексів (мультиферментів), нуклеопротеїдів останні можуть дисоціювати і випадати в осад. Щоб уникнути подібних негативних явищ, попередньо, перед центрифугуванням у сольових розчинах, ці речовини обробляються (зшиваються) глутаровим альдегідом або формальдегідом. Якщо ж необхідно денатурувати і зруйнувати вторинну структуру білків або нуклеїнових кислот, сольові градієнти використовуються в поєднанні з сечовиною, формамідом, гуанідинхлоридом або диметилсульфоксидом.

Якщо ізопікнічне центрифугування проводиться з досить великим значенням коефіцієнта седиментації часток і з метою прискорення формування рівноважного градієнта концентрації солей важких металів, застосовується так зване *преформування градієнта* в центрифужних пробірках. Для цього готують три-п'ятиступінчастий градієнт з різною густиною солі цезію (рубідію) і рівні об'єми цих

розчинів нашаровують один за одним в центрифужні пробірки. Подібне ступінчасте преформування ділянок з наростаючою до дна пробірки густиною розчинів у декілька разів скорочує час формування пологого рівноважного градієнта по всій довжині пробірки.

Ізопікнічне (рівноважне) центрифугування можна застосовувати і без створення градієнта густини середовища. Для цього суміш речовин, що досліджується, спочатку піддаються центрифугуванню, під час якого повинні осісти частки, молекулярна маса яких більша, ніж у часток, що аналізуються. Одержаний осад відкидається, а зразок суспендується в середовищі, густина якого має дорівнювати густині фракції, що досліджується. Центрифугування повторюють доти, поки частки, що досліджуються, не опиняться на дні пробірки, а частки з меншою густиною не піднімуться на поверхню середовища.

Ізопікнічне центрифугування дозволяє визначати абсолютні величини молекулярних мас макромолекул і служить для оцінки гетерогенності суміші. Цей метод застосовується для розділення молекул ДНК різної щільності, ліпопротеїдів плазми крові, білків та їхніх комплексів (мультиферментів).

Для препаративного седиментаційного аналізу використовуються центрифуги — прилади, які застосовуються для "посилення" гравітаційної складової швидкості руху часток (молекул). Треба зауважити, що при всій конструктивній різноманітності центрифуг, головними вузлами їх є ротор та електродвигун, котрий забезпечує обертання ротора.

Ротори виготовляють з алюмінієвих або титанових сплавів. Вони бувають двох типів — кутові та горизонтальні з підвісними стаканами. *Кутові ротори* зроблені у вигляді суцільнометалевої конусовидної насадки з комітками для пробірок, які розташовані в роторі під кутом (20–35°) до осі обертання. Як правило, кутові ротори призначені для осадження біоматеріалу при диференційному центрифугуванні і для фракціонування часток при ізопікнічному центрифугуванні. Вони досить ефективні при зазначених методах центрифугування тому, що речовини швидко проходять коротку відстань до стінки центрифужної пробірки, а потім сповзають униз і утворюють на дні пробірки осад.

Для кутових роторів використовуються тонкостінні і товстостінні пробірки, виготовлені на основі нітроцелюлози, поліаломеру (співполімер стилєну і пропілену), полікарбонату та з нержавіючої сталі (що правда, останні використовуються дуже рідко). Тонкостінні (іноді й товстостінні) центрифужні пробірки оснащені ущільнювальними кришками, які захищають рідини в пробірках від дії вакууму в робочій камері та перешкоджають деформації пробірок під дією відцентрових сил.

У роторах з вільнопідвішеними стаканами (металеві гільзи)

пробірки встановлюються вертикально, а при обертанні ротора переходять у горизонтальне положення, в якому кут нахилу до осі обертання становить 90° . У більшості випадків ротори з підвісними стаканами використовуються при зонально-швидкісному та аналітичному рівноважному центрифугуванні.

Для швидкого й ефективного формування градієнта густини середовища при зонально-швидкісному та рівноважному центрифугуванні часто застосовуються *ротори з вертикально стоячими пробірками*. Порівняно з кутовими та горизонтальними роторами вони мають певні переваги: перш за все при розгоні ротора в центрифугу відбувається переорієнтація градієнта — його шари розміщуються вертикально, внаслідок чого частки, що досліджуються, виявляються розташованими вздовж найближчої до осі ротора стінки пробірки. При цьому товщина шару біоматеріалу зменшується в декілька разів, що призводить до покращення розділення зон. Для того, щоб уникнути попадання важких часток на дальшу від осі обертання стінку пробірки, де вони можуть утворити осад і не піднятися при переорієнтації градієнта, дно вертикальної пробірки слід попередньо заповнити концентрованим розчином сахарози або максиденсу. Це дає можливість важким часткам зосереджуватись саме на цьому місці.

За призначенням розрізняють ротори безперервної дії та зональні. Конструктивна особливість ротора безперервної дії та робочої камери центрифуги така, що під час центрифугування біоматеріал подається безперервно. Це дає можливість одержувати при швидкісному фракціонуванні відносно невеликі кількості твердих часток із суміші великих об'ємів. У зональних роторах замість пробірок використовується хрестовина з лопатями, котра розділяє порожнину ротора на чотири сектори (рис. 9.7). Всередині лопатей хрестовини проходять радіальні канали, які сполучають центральну і периферійну області ротора з перехідним пристроєм, розташованим у верхній частині ротора. Хрестовина забезпечує обертання рідини разом з

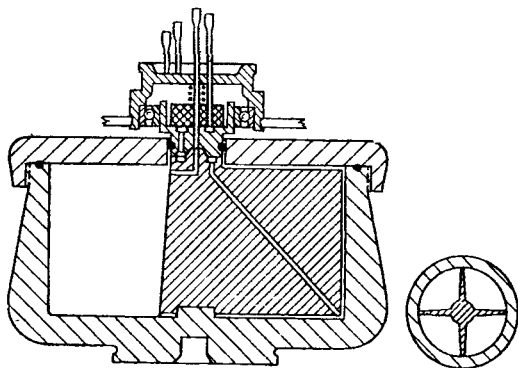


Рис. 9.7. Схема зонального ротора

ротором і виникнення відцентрової сили, що приводить до руху часток від периферії ротора по всій висоті його порожнини. Ротор заповнюється градієнтом густини середовища під час його обертання з невеликою швидкістю. Заповнення градієнтом проводиться через систему каналів до периферії ротора насосом (ступінчасто або плавно) і воно починається з градієнта з найменшою густиною, а потім ротор заповнюється щільнішим градієнтом, який відтискує первісний градієнт з меншою густиною до центра ротора. Коли весь розрахунковий об'єм градієнта (біля 60–70% повного об'єму ротора) увійде в ротор, градієнт з найбільшою густиною підкачують до повного об'єму ротора. За допомогою зональних роторів можна вести зонально–швидкісне або ізоплікнічне фракціонування для виділення й очищення макромолекул та клітинних органел.

Розрізняють центрифуги загального призначення, швидкісні та препаративні. Доречно зазначити, що термін "препаративна центрифуга" не зовсім точний, оскільки ці прилади використовуються як для одержання та очищення різних макромолекул і клітинних органел, так і для кількісних (аналітичних) досліджень сумішей.

Центрифуги загального призначення дають граничну швидкість з відносним відцентровим прискоренням до 6000 g і дозволяють центрифугувати великі об'єми розчинів. Центрифуги цього типу мають декілька змінних роторів — кутових і горизонтальних, які жорстко закріплюються на валу приладу. Ротор обертається в робочій камері, яка являє собою захисний металічний або пластиковий кожух, що закривається кришкою. Перед центрифугуванням у центрифугах загального призначення пробірки (стакани) разом з їхнім вмістом урівноважують за масою з точністю $\pm 0,25$ г.

Швидкісні центрифуги дають максимальну швидкість до 89 000 g і теж оснащені змінними кутовими і горизонтальними роторами, робоча камера опоряджена системою охолодження, яка попереджає її нагрів, котрий виникає під час тертя при обертанні ротора.

Препаративні центрифуги дають максимальне відцентрове прискорення до 500 000 g. Зважаючи на великі швидкості обертання і для зменшення вібрації ротори прилаштовані до гнучкого валу центрифуги. Для попередження перегріву ротора внаслідок повітряного тертя, центрифуги цього типу опоряджені холодильником і вакуумним пристроєм. Перед центрифугуванням заповнені пробірки слід старанно зрівноважити з точністю до 0,1 г.

Аналітичне центрифугування. Аналітичне центрифугування використовується для розділення емульсій та тонкодисперсних суспензій при вивченні седиментацій-

них властивостей макромолекул і інших очищених препаратів клітинних органел. Для цього застосовуються ультрацентрифуги, які дозволяють розвивати прискорення відцентрового поля від 500000 g і більше.

Аналітичні центрифуги оснащені системою електронного управління функціями: швидкості та часу центрифугування, підтримки певної температури в робочій камері та зупинки роботи центрифуги (рис. 9.8).

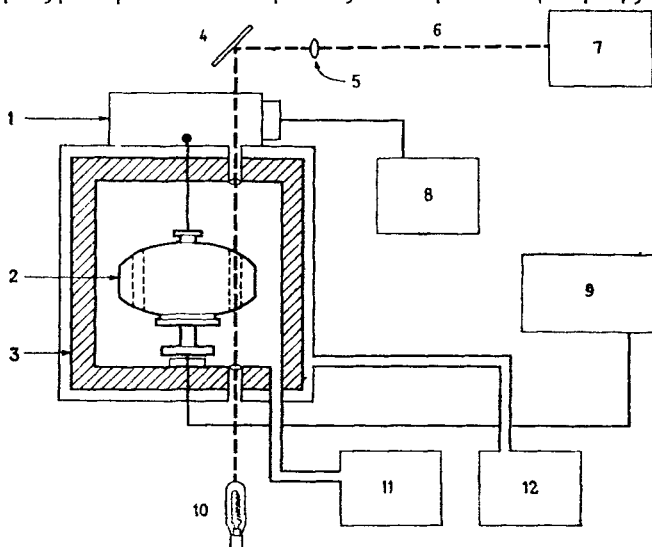


Рис. 9.8. Схематичне зображення аналітичної ультрацентрифуги:

1 - електродвигун; 2 - ротор, 3 - броньована камера, 4 - дзеркало; 5 - камерна лінза; 6 - шлях світла; 7 - утримувач плівки, 8 - панель контролю швидкості; 9 - контроль температури; 10 - джерело світла; 11 - вакуумний насос; 12 - охолодження

Для центрифуг цього типу характерна особлива конструкція ротора. Він має еліпсоподібну форму і вільно насаджується на вал електродвигуна за допомогою струни, що дозволяє змінювати швидке обертання ротора. Будова ротора така, що в одному з отворів в його тілі є центрифужна (аналітична) комірка, а в другому — противага (балансуюча комірка), які розташовані в центрифугі точно вертикально, паралельно осі обертання. Відстань від центра обертання визначають за так званим індексним отвором, розташованим на певній відстані від осі обертання ротора. Стінки аналітичної комірки мають секторіальну форму, і при старанній орієнтації в роторі вони встановлюються паралельно силовим лініям

відцентрового поля, що не дає можливості матеріалу осаджуватися на стінках, створюються оптимальні умови седиментації. На торцевих частинах аналітичної комірки є віконця з кварцу або сапфіру.

Під час ультрацентрифугування ротор обертається у вакуумній броньованій камері, оснащентій холодильним пристроєм. Аналітичні центрифуги також оснащені оптичною системою, яка дозволяє вести спостереження за розподілом часток (концентрацій) на протязі всього процесу центрифугування, та фотографічною системою або електронно-скануючим пристроєм для реєстрації і розподілу концентрації зразка в комірці ротора.

Для спеціальних видів досліджень, зокрема, при порівняльному вивченні розчинника та розчиненої речовини, в аналітичних центрифугах використовуються двосекторні комірки, які дозволяють одержувати базову лінію для оптичної системи.

При аналізі розподілення молекул під час ультрацентрифугування в сучасних ультрацентрифугах застосовуються такі оптичні системи: шліренівська, інтерференційна та абсорбційна. Для визначення коефіцієнтів седиментації білків використовується *шліренівська оптична система*, яка дає можливість визначати залежність показника заломлення світла від відстані вздовж комірки. Шліренівська система базується на тому, що промінь світла відхиляється при проходженні його крізь ділянку з концентраціями, що змінюються під час седиментації, а це, у свою чергу, призводить до зміни показника заломлення світла, значення якого залежить від концентрацій компонентів зразка.

Більш чутлива до змін концентрацій речовин має *інтерференційна оптична система*, в якій використовується двосекторна комірка. При проходженні світла крізь обидва сектори, в одному з яких міститься розчинник, а в другому — розчин, утворюються оптичні інтерференційні смуги. Положення цих смуг є функцією показника заломлення світла в кожній комірці.

У тих випадках, коли залежність коефіцієнта седиментації від концентрації досліджуваної речовини, досить велика, використовується *абсорбційна оптична система*. Найбільшою мірою це стоується дослідження нуклеїнових кислот, молекулярний коефіцієнт поглинання яких при довжині хвилі в 260 нм значно великий. Для вибору довжини хвилі сучасні аналітичні ультрацентрифуги оснащені монохроматорами, що дозволяє реєструвати молекули за довжиною хвилі, яка відповідає максимуму поглинання. Особливо суттєво це при дослідженні незначних концентрацій тих білків, яким властиве сильне поглинання (гемоглобін, цитохром С тощо).

У біохімічних дослідженнях аналітичне ультрацентрифугування застосовується для визначення молекулярних мас макромолекул, дослідження конформаційних змін в них та для оцінки чистоти зразків, одержаних під час ультрацентрифугування.

При визначенні молекулярних мас макромолекул застосовуються три методи аналітичного ультрацентрифугування:

1) Метод визначення молекулярних мас макромолекул за швидкістю седиментації. Базується цей метод на тому, що при ультрацентрифугуванні молекул, які спочатку були рівномірно розподілені по всьому об'єму, переміщуються по радіусу від центра обертання. З часом утворюється межа розділу між розчинником, вільним від молекул, та розчином, який містить їх. Переміщення межі розділення при центрифугуванні дає можливість визначати та реєструвати швидкість седиментації молекул. Молекулярна маса речовин розраховується за формулою Сведберга:

$$M = \frac{S \cdot RT}{D(1 - \bar{v}\rho)},$$

де: S — коефіцієнт седиментації; R — газова стала; T — абсолютна температура; D — коефіцієнт дифузії молекули; \bar{v} — парціальний питомий об'єм (об'єм, що займає 1 г розчиненої речовини); ρ — густина розчинника;

2) Метод седиментаційної рівноваги. Суть методу полягає в тому, щоб при порівняно невеликих швидкостях центрифугування домогтись стану, коли під дією відцентрових та дифузійних сил встановиться рівновага, при якій молекули перестають переміщуватися в аналітичній комірці. Відповідно до градієнта концентрації, який при цьому утворюється, розраховується молекулярна маса молекул за формулою:

$$M = \frac{2RT \ln(C_2 / C_1)}{\omega^2 (1 - \bar{v}\rho)(r_2^2 - r_1^2)},$$

де: R — газова стала; T — абсолютна температура; C_1 та C_2 — концентрації молекул розчиненої речовини; ω — кутова швидкість; \bar{v} — парціальний питомий об'єм; ρ — густина розчинника; r_1 та r_2 — відстані від осі обертання;

3) Метод наближення до седиментаційної рівноваги. За цим методом молекулярна маса молекул визначається в стані наближеної рівноваги, коли при ультрацентрифугуванні спочатку молекули розподілюються по всьому об'єму аналітичної комірки рівномірно, а потім осаджуються, і густина розчину в області меніска поступово

зменшується. За зміною густини, яка при цьому реєструється, молекулярна маса молекул розраховується за формулами:

$$M_m = \frac{RT}{(1 - \nu\rho)} \frac{(dc/dr)_m}{w^2 c_m r_m}, \quad M_d = \frac{RT}{(1 - \nu\rho)} \frac{(dc/dr)_d}{w^2 c_d r_d},$$

де: M_m та M_d — величини молекулярних мас, визначені за розподіленням концентрації речовини біля меніска і дна пробірки відповідно; R — газова стала; T — абсолютна температура; ν — парціальний питомий об'єм; ρ — густина розчинника; dc/dr — градієнт концентрації молекул; c_m та c_d — концентрація молекул біля меніска та дна пробірки відповідно.

При аналітичному ультрацентрифугуванні за зміною швидкості седиментації макромолекул можна досліджувати конформаційні перетворення в них. Відомо, що при дії різних фізичних та хімічних чинників макромолекули (ДНК, білки тощо) зазнають певних оборотних та необоротних конформаційних змін. існує також положення, при якому коефіцієнт тертя компактної молекули в розчині значно менший, ніж у менш компактної молекули, а, отже, вона і швидше седиментує при ультрацентрифугуванні. Таким чином, різниця в швидкості седиментації молекул до і після дії різних факторів на них, дає можливість виявити конформаційні зміни, що відбуваються в молекулах.

На практиці аналітичне ультрацентрифугування може бути застосоване для оцінки ступеня чистоти макромолекул та іншого біологічного матеріалу. Це особливо важливо в тих випадках, коли дослідження проводиться з метою визначення молекулярної маси молекули. При визначенні швидкості седиментації ступінь чистоти макромолекул оцінюється за характером осадження — домішки розподіляються окремо від аналізованих макромолекул, і проявляються у вигляді додаткового піка або обумовлюють асиметрію основного піка.

9.3. МЕМБРАННА ФІЛЬТРАЦІЯ ТА ДІАЛІЗ

Поряд з центрифугуванням, електрофорезом, хроматографією та іншими сучасними методами розділення речовин у практичній біохімії досить часто використовуються методи фільтрації та діалізу.

Для мембранної фільтрації застосовуються фільтри, виготовлені на основі нітро- та ацетату целюлози, нейлону, полівінілхлориду та скловолокна. Фільтри з цих матеріалів здатні не тільки фільтрувати різні за розміром речовини, але й мають адсорбційні властивості, зокрема нітроцелюлозні мембрани можуть зв'язувати макромолекули (білки, одноланцюгові ДНК), розміри яких менші, ніж розміри пор самих фільтрів.

Фільтри з нітроцелюлози виробляються фірмами Millipor, Schleicher — Schuell та Gelman з діаметром пор від 0,01 до 8,0 мкм, вони мають товщину достатню для того, щоб речовини, які утримуються, не проходили крізь фільтр і в той же час легко змивались із поверхні.

Щоб полегшити проходження рідини крізь фільтри, фільтрування проводять під тиском або створюють розрідження. На практиці частіше користуються водоструминним насосом, який дозволяє успішно проводити процес фільтрації (рис. 9.9).

На відміну від нітроцелюлозних фільтрів, використання фільтрів зі скловолкна має ряд суттєвих переваг: більш висока швидкість протікання рідини, більша ємність до заповнення, стійкість до будь-яких розчинників, можливість нагрівання до високої температури тощо.

Фільтрація з використанням фільтрів з нітроцелюлози та скловолкна застосовується тоді, коли треба з розчину вилучити певну речовину; для адсорбції деяких білків, вірусів та бактеріофагів; для вилучення радіоактивних сполук або певних компонентів із середовища з бактеріями, що ростуть; для визначення радіоактивності макромолекул які необхідно відокремити від малих радіоактивних молекул шляхом осадження, із наступним концентруванням зразка до невеликого об'єму.

Зв'язуючі властивості нітроцелюлозних фільтрів застосовуються також для очищення ковалентно замкнених кільцевих ДНК, для аналізу й очищення інформаційних РНК, для аналізу комплементарності одностанцюгових ДНК, для аналізу білків, здатних зв'язуватися з дволанцюговою ДНК тощо.

Діаліз — це зміна складу розчину всередині целофанового діалізного мішка шляхом промивання останнього в зовнішньому розчині, який часто замінюється. Подібне розділення розчинених молекул можливе завдяки тому, що малі молекули з розчину (за винятком сильно заряджених) вільно проходять крізь напівпроникну мембрану, і цей процес продовжується до встановлення концентраційної рівноваги всередині та зовні діалізного мішка (рис. 9.10).

Під час діалізу вода також вільно проходить крізь стінку ді-

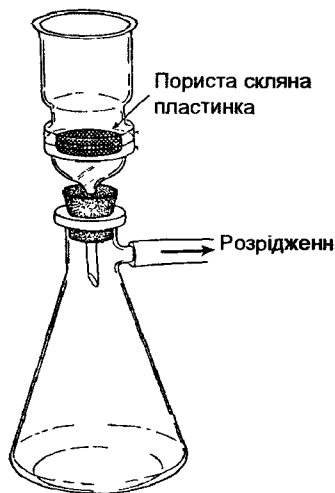


Рис. 9.9 Пристрій для фільтрування з розрідженням

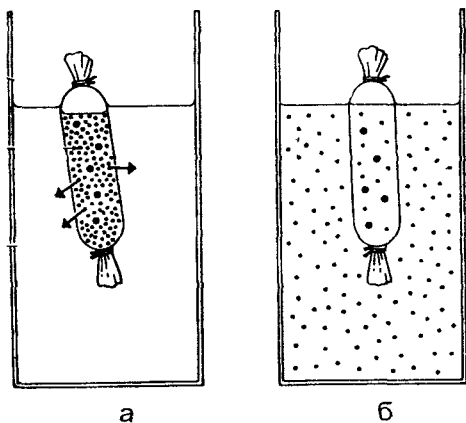


Рис. 9.10. Діаліз: а - початок діалізу; б - рівноважний стан

лізного мішка, що веде до концентрування або розведення, залежно від того, який розчин має більшу концентрацію — внутрішній чи зовнішній (осмотичний ефект).

Варіант, що називається *рівноважним діалізом*, застосовується для вивчення наявності та зв'язування малих молекул з макромолекулами. Для цього діалізний мішок з розчином макромолекул вміщують у середовище, в якому в певній концентрації містяться малі молекули, здатні зв'язуватися з макромолекулами. При цьому малі молекули, які вільно проходять крізь целофанову мембрану, дифундують всередину мішка (рис. 9.11). Якщо макромолекул немає, концентрація малих молекул буде однаковою всередині і зовні діалізного мішка, а за наявності макромолекул концентрація малих молекул всередині мішка буде більшою внаслідок того, що частина їх зв'язується з макромолекулами.

Діаліз також є ефективним засобом для зміни рН, при зміні буфера або концентрації солі в розчині з біополімерами.

Аналогічним чином, молекулярну фільтрацію можна проводити, використовуючи трубки Spectrolog.

Існує три типи подібних трубок, які здатні пропускати речовини з молекулярною масою від 6000 до 14000. Для розділення розчинених молекул за їхнім розміром також можна застосовувати мембрани Pellicon або Diaflo (див. рис. 4.5), які здатні пропускати речовини з діапазоном молекулярних мас у межах 500–100000. Подібні мембрани особливо придатні при концентруванні речовин, знесолюванні (під час підготовки зразків для хроматографії) і фракціонуванні за молекулярною масою.

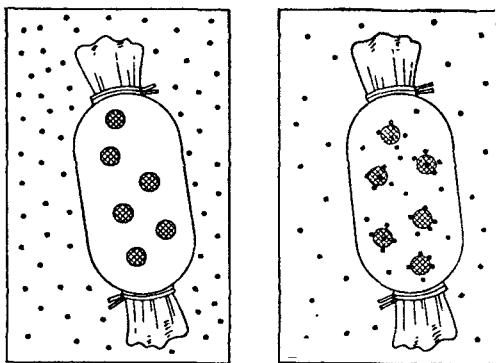


Рис. 9.11 Рівноважний діаліз

10. ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ

Імунологія, бурхливий розвиток якої відбувся в останні десятиріччя, перетворилася з вузької медичної дисципліни, котра вивчала способи захисту організму від збудників інфекційних хвороб, у загальнобіологічну науку.

Серед численних імунологічних методів певне місце займають класичні методи. В біохімічних дослідженнях залежно від їхньої мети і завдань використовується багато з них, а саме: метод розеток — фіксування еритроцитів на поверхні імунізованих лейкоцитів; різні реакції аглютинації (від лат. *agglutinatio* — склеювання), такі як гемаглютинація — аглютинація еритроцитів при взаємодії з антиеритроцитарними антитілами, аглютинація лейкоцитів — аглютинація для виявлення специфічних антигенів лейкоцитів і тромбоцитів тощо; реакція лімфоцитолізу — для оцінки гітосумісності; реакція зв'язаного комплементу — для визначення комплексів антиген–антитіло, які зв'язують комплемент; реакція бласт–трансформації лімфоцитів — для стимуляції проліферації лімфоцитів; тощо. Принципи всіх цих методів та реакцій, загальна оцінка, методика проведення їх викладені у відповідній науковій та навчальній літературі, в тому числі й у рекомендованій літературі до даного учбового посібника, тому в цьому розділі не розглядаються. Зауважимо побіжно, що безпосередньо в біохімічних дослідженнях ці методи є, в певному розумінні, допоміжними. Широко використовуються в біохімії методи, які поєднують імунні реакції з іншими фізико–хімічними методами — хроматографічні методи в імунології, імунофлуоресцентний аналіз, імуноелектрофорез і радіоімунний аналіз. Опис цих методів наведений у відповідних розділах даного учбового посібника.

Одне з провідних місць в імунологічних дослідженнях належить *імуноферментному аналізу (ІФА)*. Це метод, який поєднує в собі високу специфічність імунологічних реакцій з чутливою каталітичною дією ферментів. Нині ІФА використовується для вивчення будови і функції білків, їхнього біосинтезу і катаболізму, для визначення широкого класу речовин — гормонів, онкомаркерів, серцевих алкалоїдів, антибіотиків, наркотиків та інших фармакологічних речовин, а також вірусів, бактерій і антитіл проти них тощо.

Для всіх варіантів методу ІФА загальним є те, що в них як реагент використовуються антитіла або антигени, ковалентно зв'язані з ферментами–маркерами. Цей метод має надзвичайно високу

чутливість, він дозволяє визначати речовини в кількості до 10^{-12} моля в зразку об'ємом не більше 0,1 мл. Ще одна особливість методу ІФА — його висока специфічність, котра взагалі характерна для імунологічних методів. Об'єднання в методі ІФА імунологічних і ферментативних реакцій створює особливості, які не властиві кожній з цих реакцій, якщо вони проходять нарізно. Методу ІФА притаманна висока здатність до автоматизації майже всіх етапів, що дозволяє проводити експрес-аналіз з високим ступенем відтворення.

Основними компонентами методу ІФА є антиген, антитіло і фермент-маркер.

Антигени — це чужорідні для реципієнта речовини, які при введенні в організм або культуру лімфоїдних клітин здатні викликати імунну відповідь — продукувати антитіла, спричиняти появу клітин-ефекторів тимчасового походження, клітин імунологічної пам'яті, здатних при контакті з антигеном швидко перетворюватися в клітини, які продукують антитіла. До антигенів належать білки, полісахариди, нуклеїнові кислоти та їхні комплекси. Антитіла, які з'являються в процесі імунної відповіді, специфічно взаємодіють з антигеном або хімічними речовинами подібної будови. Ці речовини, які називають *гаптенами*, самі по собі не мають імуногенних властивостей, але є потенційно активними в імунологічних реакціях. Гаптени індують імунну відповідь в організмі тільки після зв'язування з повним антигеном, як правило, білкової природи. Гаптенами можуть бути різні низькомолекулярні речовини, зокрема лікарські препарати (антибіотики, протипухлинні засоби тощо), які можуть спричиняти алергічні реакції.

Змінюючи шляхом хімічної модифікації природні біополімери або синтетичні аналоги антигенів, можна одержати кон'юговані антигени. Вони можуть бути отримані на основі білків, які належать самому реципієнту. Аутологічні білки, денатуровані різними методами, також стають антигенами.

В класичній імунології до антигенів відносять віруси, бактерії, мікроскопічні гриби, цілі клітини тваринного походження. З хімічної точки зору це не правильно, оскільки до складу клітин входять білки, нуклеїнові кислоти, полісахариди. Кожен з цих біополімерів може бути використаний для індукції імунної відповіді, специфічної для даної речовини.

Антигенам притаманна *імуногенність* — здатність викликати імунну відповідь, а також специфічність (антигенність), яка характеризує специфічну взаємодію їх з продуктами імунної відповіді (антитілами, сенсibiliзованими лімфоцитами).

Молекули антигена несуть так звані детермінантні групи — ділянки молекул антигена, які "розпізнаються" антигензв'язуючими центрами В-лімофцитів і антитілами. В молекулі антигена, як правило, міститься декілька різних за будовою детермінантних груп, кожна з яких може повторюватися декілька разів.

Антитіла — це речовини білкової природи, які синтезуються під впливом антигенів і здатні специфічно взаємодіяти з даним антигеном. Антитіла прийнято також називати імуноглобулінами (Ig), оскільки вони належать до білків плазми крові — γ -глобулінів. В даній час обидва терміни використовуються як синоніми.

Специфічність антитіл, тобто здатність реагувати тільки з певними антигенами, обумовлена їхньою хімічною природою. Для них характерні всі особливості структури, притаманні білкам. Четвертинна структура утворює комплекс, який складається з чотирьох поліпептидних ланцюгів, зв'язаних дисульфідними зв'язками. Кожних два таких ланцюги ідентичні між собою і складають два однакових легких (L-ланцюги) і два однакових важких ланцюги (H-ланцюги). Легкі ланцюги розділяються на κ - і λ -типи, вони входять до складу всіх імуноглобулінів, не виявляють специфічності. Існує п'ять типів важких ланцюгів (γ , μ , α , δ , ϵ), що надають антитілам специфічних особливостей. З сироватки крові людини виділяють п'ять типів антитіл: імуноглобуліни G (IgG) (на них припадає до 75% усіх імуноглобулінів), імуноглобуліни M (IgM), імуноглобуліни A (IgA), імуноглобуліни D (IgD) імуноглобуліни E (IgE). Вони відрізняються молекулярною масою, хімічними властивостями і біологічними функціями.

Ферменти-маркери в методі ІФА виконують роль індикаторів імунологічних реакцій. Концентрація речовин, що реагують, пропорційна інтенсивності забарвлення, флуоресценції або хемілюмінесценції, за якими визначають ферментативну активність.

Ферменти-мітки вводяться до складу кон'югатів — сполук, в яких ферменти ковалентно зв'язані, залежно від мети досліджень з антитілами або антигенами.

В методі ІФА використовується широке коло ферментів: пероксидаза, лужна фосфатаза, галактозидаза, глюкозидаза, уреаза, пірофосфатаза, лактомаза та ін. Найпоширенішими серед них є пероксидаза (зокрема, пероксидаза хрому) та лужна фосфатаза в комплексі з антитілами.

Чутливість методу ІФА визначається ферментативною активністю кон'югату, а також хімічним складом субстрату або продукту реакції, який визначає метод реєстрації результату дії ферменту — забарвлення, флуоресценція або хемілюмінесценція.

Реалізацію специфічних реакцій імунітету забезпечують лімфоцити і макрофаги. Вони дозрівають в органах імунної системи. Основним типом клітин у лімфоїдних органах є лімфоцити, їхні попередники та нащадки. Оскільки саме лімфоцити відповідають за специфічну імунореактивність, органи лімфатичної системи в певному розумінні можна ототожнювати за морфологічними ознаками з органами імунітету.

Зрілі лімфоцити підрозділяються на В- і Т-лімфоцити. У фабриці сумці у птахів (у задній стінці клоаки) або в її аналогу у ссавців (в стінці товстого кишечника) при диференціюванні стовбурних клітин утворюються В-лімфоцити, а Т-лімфоцити з'являються в тимусі. За морфологічними показниками В- і Т-лімфоцити не відрізняються, але мають суттєві відмінності в метаболізмі. Це позначається на їхніх фізичних властивостях, будові асоційованих з цитоплазматичною мембраною рецепторів, які включають також рецептори для антигенів.

Тільки В-лімфоцити здатні перетворюватися в клітини, які продукують антитіла (імуноглобуліни). В той же час Т-лімфоцити під дією антигена перетворюються в клітини, котрі відповідають за реакції клітинно-опосередкованого імунітету. Крім того, В-лімфоцити осідають в основному в селезінці та лімфовузлах, а значна частина Т-лімфоцитів циркулює в крові.

При надходженні антигена в кров він контактує, здебільшого, з Т-лімфоцитами, а при надходженні в лімфатичний вузол — ще й з В-лімфоцитами. За межами лімфоїдних органів антигени реагують також з фагоцитами, зокрема макрофагами. Вони фіксуються на поверхні макрофагів, більша частина яких локалізована в печінці, селезінці, нирках і легенях. Тільки той антиген, що був захоплений макрофагами і через їхнє посередництво взаємодіє з лімфоцитами, здатний викликати імунну відповідь.

Макрофаги взаємодіють з антигенами неспецифічно — один і той же макрофаг зв'язує різні антигени. Останні певним чином перетворюються.

Макрофаги з перетвореними антигенами вступають у контакт з Т-лімфоцитами, що є необхідною умовою диференціювання В- і Т-лімфоцитів.

Одним з перших проявів реакції на антигени є зменшення числа лімфоцитів, які залишають лімфатичні вузли, і поява лімфобластів — нащадків лімфоцитів з високою метаболічною активністю. Лімфобласти, котрі є нащадками В-лімфоцитів, стимулюють синтез антитіл (імуноглобулінів), які екскретуються клітинами.

Деференціювання В-лімфоцитів у більшості випадків потребує участі крім макрофагів, ще й певного типу Т-лімфоцитів (Т-хелперів). До числа Т-лімфоцитів, які регулюють і модулюють імунну відповідь, крім Т-хелперів, відносяться Т-супресори (пригнічують реакції імунітету) та ті, які відмінюють або модулюють функції Т-супресорів.

Методи ІФА можна розділити на — гетерогенні і гомогенні.

10.1. МЕТОДИ ГЕТЕРОГЕННОГО ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

Методи гетерогенного ІФА застосовують для розділення вільних і зв'язаних з ферментом—міткою антигенів або антитіл, що досліджуються. Для розділення використовують процедури, які дозволяють зберегти активність ферменту—мітки — імунопреципітацію та сорбцію на імуносорбентах з наступною реєстрацією зв'язаної або вільної мітки (активності ферменту).

Серед гетерогенних методів найпоширенішим є *метод твердофазного ІФА*, або *метод ELISA* (від англ. Enzyme Linked Immunosorbent Assay), в основі якого лежить приєднання до утворених на твердій фазі імунних комплексів антигенів або антитіл, ковалентно зв'язаних з ферментами (кон'югатами). Як тверду фазу для проведення ІФА використовують скляні або нейлонові кульки, полістеролові або керамічні пробірки, мікропанелі. Найбільше поширені полістеролові мікропанелі для титрування з ямками, які мають плоске прозоре дно і зручні для вимірювання оптичної щільності продуктів ферментативної реакції на спеціальних приладах — ІФА-ридерах (від англ. to read — читати).

Імуноферментний аналіз можна проводити не тільки з використанням стандартних мікропанелей з ямками, а на листках або вузьких смужках нітроцелюлозних мембран, що використовуються як тверда фаза. У так званому методі "до" — ELISA^а антиген у невеликому об'ємі (до 1 мкл) адсорбують у вигляді плям або дисків на нітроцелюлозній мембрані, котра здатна активно сорбувати білки. Мембрани служать твердою фазою і в методі "індикаторної смужки", де антитіла зв'язані з мембраною.

Твердофазний ІФА базується на таких принципах:

1. Ферменти, серед яких найпоширенішим є пероксидаза хрому та лужна фосфатаза, ковалентно приєднуються до антигенів або антитіл різними хімічними методами зі збереженням обома компонентами кон'югата своєї біологічної активності (здатності

взаємодіяти з субстратами, антигенності тощо).

2. Антигени або антитіла, ковалентно зв'язані з ферментом, самовільно сорбуються на твердій фазі (зокрема, на поверхні полістеролу). Адсорбовані на твердій фазі антигени і антитіла вже не змиваються буфером, який містить детергент, тимчасом як ті реагенти, що не сорбувалися, легко вилучаються відмиванням;

3 Після сорбції на твердій фазі антигенів або антитіл, зв'язаних з ферментом, на поверхні цієї фази формують імунний комплекс із зразка, що досліджується, стандартних реагентів з одного або декількох шарів. Ті компоненти, що не зв'язалися, вилучаються відмиванням:

4. При зв'язуванні кон'югата — антиген–фермент, або антитіло–фермент з іммобілізованим імунним комплексом — активний центр ферменту залишається доступним для взаємодії із субстратом ферментативної реакції. Після інкубації імунного комплексу з даним субстратом, розвивається, як правило, кольорова реакція, котру оцінюють за стандартами або за значенням оптичної щільності.

В деяких модифікаціях (наприклад, метод "дот"–ELISA або "індикаторної смужки") забарвлюється власне тверда фаза внаслідок іммобілізації на її поверхні нерозчинних забарвлених продуктів субстратів.

Найпростішою модифікацією твердофазного ІФА є метод, в якому на поверхню ямок мікропанелей сорбують антигени або антитіла, а потім їх інкубують з кон'югатом антитіло–фермент чи антиген–фермент відповідно. Зв'язування кон'югата, який містить фермент, з твердою фазою відбувається тільки тоді, коли обидва компоненти системи взаємно комплементарні. Після інкубації з кон'югатом ямку відмивають і вносять до неї субстрат, специфічний для використаного ферменту. За інтенсивністю розвитку забарвлення в ході реакції роблять висновок про кількість кон'югата, який приєднався до твердої фази. Реакцію зупиняють при досягненні оптимального забарвлення.

В *методі прямого ELISA* (рис. 10.1) для виявлення антигена, який міститься у досліджуваному зразку, використовують кон'югати, які одержують з антитіл (виділяють зі специфічної сироватки) та фермент. Після утворення комплексу антиген–антитіло, міченого ферментом, додають субстрат. Під дією ферменту із субстрату утворюються забарвлені продукти.

В *методі непрямого ELISA* (рис. 10.2) в ямках мікропанелі адсорбують антиген (як правило, екстракти з бактерій або вірусів) та інкубують у цих ямках розчин, який містить зразок з антитілом.

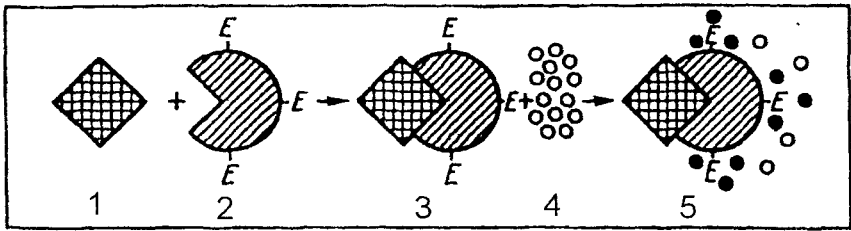


Рис 10 1. Схема прямого методу твердофазного ІФА

1 – антиген, що міститься у зразку, 2 – антитіла, мічені ферментом (E), 3 – комплекс антиген+антитіло+фермент; 4 – субстрат, 5 – комплекс антиген+антитіло+фермент, який утворив продукт субстрату

У методі непрямого твердофазного ІФА для виявлення комплексу антиген–антитіло використовують антивидові або вторинні антитіла, які мітяться ферментом. У результаті утворюється комплекс антиген–антитіло — вторинне антитіло–фермент. Одержаний комплекс виявляють додаванням субстрату, який під дією ферменту перетворюється в забарвлений продукт. Залежно від мети досліджень використовують різні антивидові глобулінові реагенти — з широким спектром специфічності або вузькоспецифічні.

Широкого розповсюдження завдяки простоті, високій специфічності й чутливості набув метод, який називають "сандвіч" — варіант ELISA або "визначення антигена методом подвійних антитіл". Відповідно до схеми даного варіанта твердофазного ІФА (рис.10.3) антитіла, які адсорбують на твердій фазі, інкубують з досліджуваним зразком, який містить антигени.

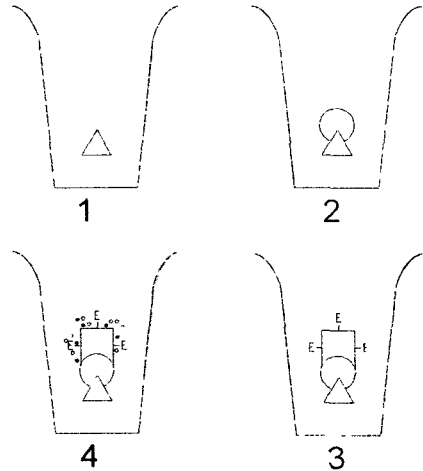


Рис. 10 2. Схема визначення антитіл непрямым методом твердофазного ІФА

1 – адсорбція в ямках антигена; 2 – внесення розчину зразка, який містить антитіла, і фіксація антитіла на антигені; 3 – внесення ферментативного антиглобулінового кон'югату, який фіксується на антитілах, 4 – внесення субстрату і поява кольорового продукту ферментативної реакції, E – фермент

Після відмивання в ямки вносять мічені ферментом антитіла до того ж антигена та відмивають від кон'югатів фермент-антитіло, які не зв'язувалися з іммобілізованим антигеном. Потім додають

субстрат і фіксують розвиток кольорової реакції.

В одній із модифікацій "сандвіч"-варіанта ELISA фермент-мітку приєднують не до антитіл, які взаємодіють з антигенами, а до антиглобулінового реагента, який зв'язується з антитілами імунних комплексів.

Різновидністю твердофазного ІФА є методи, де активність ферменту-мітки реєструють не за інтенсивністю забарвлення продукту реакції, а за тепловим ефектом або з використанням імуноферментного електрода (електрохімічно). Головна перевага цих методів — можливість проведення

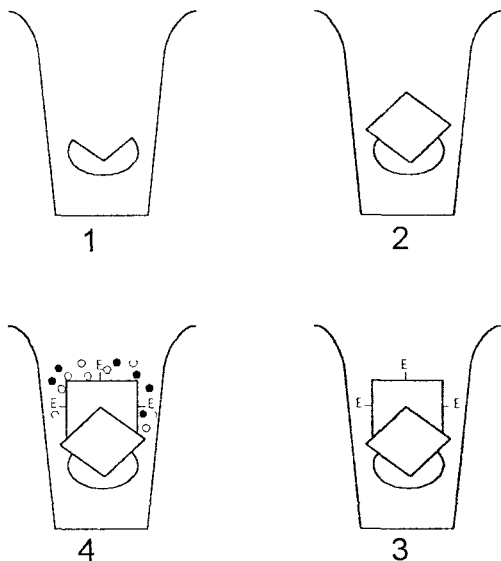


Рис. 10 3 Схема визначення антигена методом подвійних антитіл ("сандвіч") у твердофазному ІФА: 1 – адсорбція в ямках специфічних антитіл, 2 – внесення розчину, який містить зразок, що з'єднується з антитілами; 3 – додавання кон'югатів фермент-антитіла; 4 – внесення субстрату і поява забарвленого продукту реакції; E – фермент

неперервних у часі досліджень.

Імуноферментний термістр дозволяє реєструвати в процесі дії ферменту на субстрат тепловий ефект, величина якого пропорційна кількості кон'югату, зв'язаного з імуносорбентом. У свою чергу, кількість цього кон'югату відповідає початковій концентрації антигена або антитіла, яке досліджується.

При використанні імуноферментного електрода імуносорбентом для антитіл служить мембрана, котра оточує кисневий електрод. Після додавання субстрату ферментний кон'югат, який зв'язується з антитілами, "запускає" ферментативну реакцію (пероксидазну або глюкозооксидазну) з поглинанням кисню. Пропорційно концентрації кисню змінюється сила струму, який може бути зареєстрований.

Метод рідинного ІФА заснований на розшаруванні у двофазній системі антигена, не зв'язаного з антитілами (в одній фазі), та комплексу антиген–антитіло (в другій фазі). Фази розподіляються в пробірці, в якій проводять аналіз. При відборі проб з верхнього або нижнього шару розчину можна визначити концентрацію зв'язаного з антитілами або вільного антигена.

У комбінованому методі ІФА на основі зворотнорозчинних полімерів добре розчинна у воді поліметакрилова кислота служить сорбентом для антитіл. Під дією ряду полікатионів (зокрема, полі–N–етил–4–вінілпіридину броміду) поліметакрилова кислота випадає в осад з утворенням нерозчинного полікомплексу, який може знову бути розчинним в 0,05 NaCl. У ході аналізу до розчину іммобілізованих на поліметакриловій кислоті антитіл додають досліджуваний антиген, мічений ферментом, та проводять реакцію конкурентного зв'язування. Потім для розділення компонентів додають полікатион і в осаді та в надосадовій рідині визначають активність ферменту, що дозволяє визначити початкову концентрацію антигена.

В комбінованому методі ІФА з використанням ліпосом фермент заключають у ліпосоми (мікропухирці), на поверхні яких знаходиться іммобілізований антиген. В присутності антитіл виникає лізис ліпосом, і фермент переходить у розчин, в якому відбувається ферментативна реакція.

10.2. МЕТОДИ ГОМОГЕННОГО ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

Гомогенний ІФА, або метод *EMIT* (від. англ. Enzyme Multiplid Imunoassay Technique), базується головним чином на ефекті модуляції антитілами активності ферменту–мітки. Крім того, на відміну від гетерогенних методів ІФА в гомогенному ІФА як маркери можуть бути використані не тільки ферменти, але й їхні комплекси (кофактори, окремі простетичні групи тощо) та інгібітори і активатори активності ферментів. У цьому методі реєструється не утворений комплекс антиген–антитіло, а замкнені вільні центри специфічного зв'язування.

Основні механізми модуляції активності ферментів у гомогенному ІФА такі:

1. Стеричні зміни, які роблять недосяжним активний центр ферменту для субстрату внаслідок утворення імунохімічного комплексу антиген–антитіло;

2. Індукція тільки антитілами конформаційних змін структури ферменту–мітки;

3. Модуляція антитілами здатності субстратів, кофакторів, простетичних груп, активаторів, інгібіторів тощо брати участь у ферментативній реакції.

У більшості методів гомогенного ІФА фермент–мітка вводиться в антиген, а в реакційній суміші одночасно містяться досліджуваний антиген та мічений антиген, який вступає в конкурентну взаємодію з антитілами.

Найпоширенішим є метод гомогенного ІФА для аналізу антигена на основі використання міченого ферментом антигена зі стеричним виключенням субстрату. Кон'югат одержують з низькомолекулярного антигена (гаптена), ковалентно зв'язаного з ферментом біля активного центра. При утворенні комплексу з антитілами активний центр ферменту стає стерично недосяжним для субстрату. Зі збільшенням концентрації досліджуваного антигена, все більше антитіл з реакційної суміші буде задіяно на утворення з ним специфічного зв'язку, а отже, все менше його буде зв'язуватися з кон'югатом, що містить фермент. Як наслідок цього процесу буде знижуватися ступінь інгібування ферменту, що викликає підвищення ферментативної активності, яке пропорційне концентрації досліджуваного антигена.

Такий же механізм реакції лежить в основі методів, які базуються на індукції антитілами зміни активності ферменту–мітки внаслідок порушення конформації.

Як уже відзначалося, в методі гомогенного ІФА можливе використання неферментних міток — кофакторів (АТФ, НАДН тощо), інгібіторів та активаторів ферментів, простетичних груп (ФМН, ФАД та ін.). Однак для всіх цих методів характерна загальна схема проведення досліджень, яка вміщується в рамки методу гомогенного ІФА: кон'югати антигена з неферментними мітками впливають на каталітичну активність ферменту в інкубаційній суміші. При зв'язуванні кон'югату з антитілами цей вплив втрачається через те, що при збільшенні концентрації досліджуваного антигена, в розчині він зв'яже частину антитіл. У цьому випадку частка вільного кон'югату підвищується, що спричинює пропорційне збільшення або зменшення (пои використанні інгібіторів) активності ферменту–мітки.

В деяких випадках фермент–мітка вводиться не в антиген, а в антитіло, тому можливий не тільки конкурентний, але й неконкурентний механізм реакції.

В одному із варіантів методу гомогенного ІФА використовується імунокапілярна міграція досліджуваного антигена. Імобілізовані на

смужці мембрани з нітроцелюлози антитіла гальмують міграцію антигена. З підвищенням концентрації антигена з ним зв'язується все більша кількість іммобілізованих антитіл. Тому частина молекул антигена просувається все далі, поки міграція їх не зупиниться внаслідок повного комплексоутворення з іммобілізованими антитілами. Таким чином, відстань міграції антигена пропорційна вмісту його в пробі. Для виявлення області, в якій міститься антиген, смужку мембрани, що містить антиген, обробляють специфічними до нього антитілами з ферментною або іншою мітками.

Метод гомогенного ІФА широко застосовується для діагностики інфекційних хвороб (зокрема СНІДу), для контролю за прийомом ліків і наркотиків, для виявлення у ранні строки білків, пов'язаних з вагітністю та ін. Головні його переваги — короткий час аналізу (2–15 хв), можливість використання малих об'ємів проби (5–50 мкл) та аналіз широкого спектра антигенів. До недоліків цього методу можна віднести меншу чутливість порівнянно з методами гетерогенного ІФА.

11. ОПТИЧНІ МЕТОДИ

Оптичні методи дослідження належать до найпоширеніших методів, які використовуються в біохімії. Це пов'язано з можливістю одержати різнобічну інформацію, і в першу чергу — ідентифікувати речовини, визначити їхню кількість, встановити структуру біологічно активних сполук, а також вивчити механізм біохімічних реакцій. Ці методи відносно легко можна модифікувати й автоматизувати, що є певною перевагою перед іншими аналітичними методами.

Молекули речовин здатні взаємодіяти з випромінюванням у широкому діапазоні довжини хвиль, тому їхні спектри лежать у різних областях:

- 10^{-5} нм — 5 нм — рентгенівські і γ -промені;
- 5 нм — 200 нм — далека (вакуумна) ультрафіолетова область;
- 200 нм — 400 нм — ближня ультрафіолетова область;
- 400 нм — 800 нм — видима область;
- 800 нм — 2 мкм — ближня інфрачервона область;
- 2 мкм — 25 мкм — безпосередньо інфрачервона область;
- 25 мкм — 600 мкм — далека інфрачервона область;
- 600 мкм — 30 см — область надвисоких частот;
- 30 см — $3 \cdot 10^3$ см — радіохвилі.

Розглянемо послідовно основні оптичні методи, які використовуються в біохімічних дослідженнях та принципи, які лежать в основі цих методів.

11.1. ОСНОВНІ ПРИНЦИПИ ОПТИЧНИХ МЕТОДІВ

Електромагнітне випромінювання являє собою потік *квантів* (фотонів) електромагнітного поля. Енергія кожного кванта визначається довжиною хвилі випромінювання.

Електрони в атомі мають певну енергію, що визначає їхній енергетичний рівень. На рис. 11.1 наведена схема, яка ілюструє енергетичні рівні атома натрію, що містить 11 електронів.

В основному енергетичному стані електрони в атомі займають найнижчі енергетичні рівні. При поглинанні кванта енергії електрон з основного стану переходить на вищий стан, який називається *збудженим*; при цьому енергія кванта точно відповідає різниці енергетичних рівнів. У випадку переходу електрона зі збудженого стану в основний або з вищого рівня на нижчий відбувається

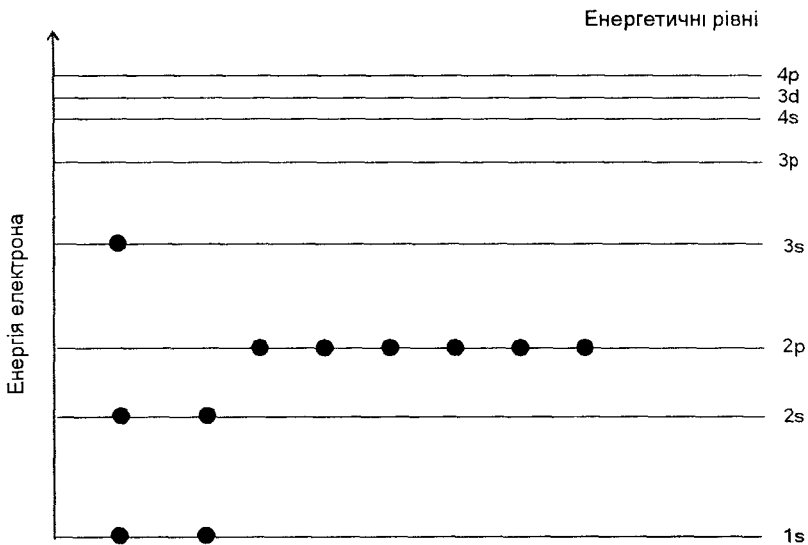


Рис. 11. 1. Енергетичні рівні електронів в атомі натрію

випромінювання світла певної довжини хвилі.

При утворенні молекул певні електрони атомів взаємодіють із сусідніми атомами, що спричиняється до виникнення хімічних зв'язків. При цьому у зв'язаних електронів з'являються нові енергетичні рівні. Атоми в молекулі можуть коливатися і обертатися навколо виниклих зв'язків, і це призводить до виникнення *коливальних* і *обертальних рівнів*. Звичайно кожному електронному енергетичному рівню відповідає декілька коливальних, кожному з яких, в свою чергу, відповідає декілька обертальних енергетичних рівнів.

Кожний електрон у молекулі, як і в атомі, займає найнижчий енергетичний рівень, якщо молекула перебуває в основному стані. Коли відбувається поглинання кванта енергії електроном, він переходить на вищий енергетичний рівень, інакше кажучи, молекула переходить у збуджений стан. (рис. 11.2А).

Як і в атомах, у молекулах перехід електрона з одного енергетичного рівня на інший супроводжується поглинанням або випромінюванням кванта енергії. У першому випадку виникає спектр поглинання молекули, а в другому — спектр випромінювання. Енергетичний спектр являє собою залежність кількості поглиненої або випроміненої системою енергії від довжини хвилі або залежного

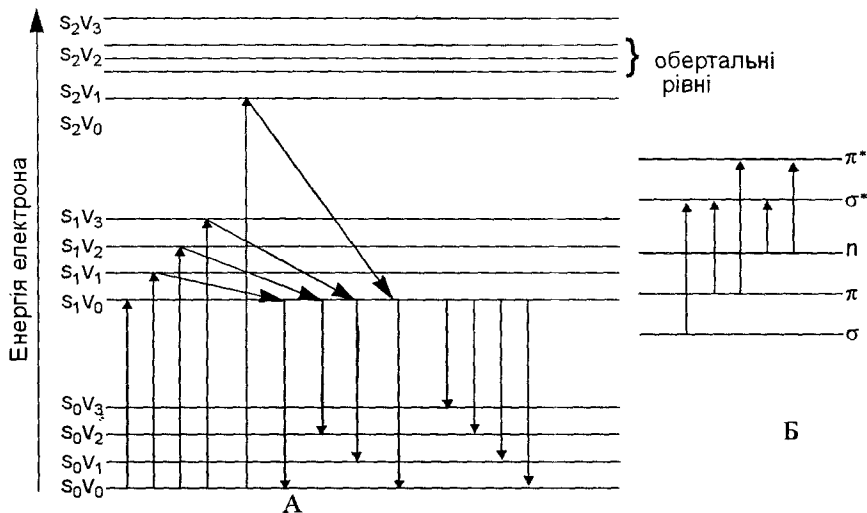


Рис. 11.2. Енергетичні рівні та електронні переходи в молекулі (А) і схема переходів між основним і збудженим станами σ -, π -, n -електронів (Б): S_0, S_1, S_2 – основний, перший збуджений і другий збуджений електронні рівні відповідно; V_0, V_1, V_2, V_3 – коливальні рівні відповідних електронних енергетичних рівнів; обертальні рівні вказані тільки для коливального рівня S_2V_2 ; спрямовані вгору стрілки відповідають поглинанню енергії, спрямовані вниз – випромінненню; косими стрілками показано втрату енергії за рахунок зіткнення

від неї хвильового числа.

Зміна енергетичного стану молекули визначається рівнянням

$$E = E_1 - E_2 = h\nu,$$

де: E — поглинена або випромінена молекулою енергія; E_1 і E_2 відповідно початкова і кінцева енергія електрона; h — постійна Планка; ν — частота коливань в Гц, яка дорівнює $\nu = c/\lambda$, де c — швидкість світла — $c = 3 \cdot 10^8$ м·с⁻¹; λ — довжина хвилі випромінювання, яка дорівнює $\lambda = 1/\nu$, де ν — хвильове число.

Як уже відзначалося, електрони в молекулі, крім енергетичних рівнів, можуть мати коливальні і обертальні рівні. В загальному вигляді внутрішня енергія молекули (E) дорівнює:

$$E = E_{\text{ел.}} + E_{\text{кол.}} + E_{\text{об.}}$$

де: $E_{\text{ел.}}$, $E_{\text{кол.}}$, $E_{\text{об.}}$ — електронна, коливальна і обертальна енергія відповідно.

Різниця енергії між двома найближчими енергетичними станами визначається за рівнянням:

$$\Delta E = \Delta E_{\text{ел.}} + \Delta E_{\text{кол.}} + \Delta E_{\text{об.}}$$

Звичайно $E_{\text{ел.}} > E_{\text{кол.}} > E_{\text{об.}}$, а отже й переходи між відповідними енергетичними рівнями лежать у різних діапазонах довжини хвиль електромагнітного випромінювання.

Електрони в молекулі за їхніми енергетичними рівнями можуть бути розподілені на три типи: σ -, π -, p -електрони (рис. 11.2Б).

Хвильова функція, яка характеризує результат зв'язування електронів у молекулі, називається *молекулярною орбіталлю*. У складних молекулах зустрічаються орбіталі двох типів: локалізовані, які належать тільки двом атомам (σ -орбіталі, утворені σ -електронами), і делокалізовані, котрі охоплюють більше двох атомів; у деяких випадках вони належать усій молекулі (π -орбіталі, утворені π -електронами).

Простий одинарний зв'язок σ , як правило, σ -зв'язком, що утворюється за рахунок перекривання атомних s -орбіталей. Цей зв'язок розміщений вздовж осі, яка зв'язує атоми молекули. Подвійний і потрійний зв'язки виникають за рахунок σ -зв'язку і одного або двох π -зв'язків. У свою чергу, π -зв'язки утворюються за рахунок перекривання атомних p -орбіталей. Ще одним типом орбіталей є p -орбіталь, яка належить в основному одному атому, інші атоми на неї практично не впливають. Таким чином, p -орбіталь є незв'язуючою орбіталлю.

При поглинанні кванта енергії, як уже відзначалося, електрони молекули переходять на вищі енергетичні рівні й утворюють збуджені орбіталі — σ^* , π^* (рис.11.2Б). Переходи $\pi \rightarrow \pi^*$, і $p \rightarrow \pi^*$ визначають поглинання молекул у видимій та ближній ультрафіолетовій (УФ) областях спектра, що становить найбільший інтерес для дослідження біологічно активних молекул. У той же час переходи на σ^* енергетичний рівень ($\sigma \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \sigma^*$ і $p \rightarrow \sigma^*$) можливі тільки при поглинанні квантів з високою енергією, яка відповідає далекій (вакуумній) УФ-області ($\lambda < 200$ нм).

Хімічна група атомів у молекулі, яка дає внесок у спектр її поглинання, тобто здатна поглинати електромагнітне випромінювання, називається *хромофором*. Такими групами є, наприклад, карбонільна група $=C=O$, у молекулі фенілаланіну — бензолъне

кільце тощо. При утворенні в молекулі спрощених зв'язків енергія збудженого стану електронів зменшується, що призводить до поглинання світла хромофором більшої довжини хвилі. Такий зсув в довгохвильовій області спектра поглинання називається *батохромним ефектом*, а зсув спектра поглинання в короткохвильову область називається *гіпохромним ефектом*. Ці два ефекти обумовлюють зміни поглинання енергії — її збільшення (*гіперхромний ефект*), та зменшення (*гіпохромний ефект*).

Розглянемо деякі кількісні закономірності поглинання електромагнітного випромінювання при його проходженні крізь рівномірно поглинаюче середовище.

Нехай інтенсивність падаючого світла дорівнює I_0 . При проходженні крізь поглинаюче середовище вона зменшується до значення I . Відношення інтенсивності світла, яке пройшло через середовище, і падаючого (I/I_0) називається *пропусканням* і позначається, як правило, літерою T . Величина поглинання, або *екстинкція* (E , тобто ослаблення світла від лат. *extinctio* — гасіння) розраховується за рівнянням:

$$E = \lg 1/T = \lg I_0/I.$$

Згідно із *законом Бугера–Ламберта–Бера*, (основним законом фотометрії), і який описує поглинання світла в ультрафіолетовій, видимій та інфрачервоній областях спектра, маємо:

$$E = \epsilon c l,$$

де: E — екстинкція; c — молярна концентрація розчину речовини; l — оптичний шлях (см), який дорівнює товщині зразка (довжина кювети, в яку поміщають розчин речовини); ϵ — коефіцієнт молярної екстинкції речовини, що поглинає світло, при певній довжині хвилі падаючого світла, фізичний зміст якого дорівнює значенню екстинкції E речовини з концентрацією 1 моль/л при довжині оптичного шляху 1 см.

Оскільки коефіцієнт молярної екстинкції ϵ , як правило, має великі значення, то в довідковій літературі для певних довжин хвиль λ наводять іншу величину — поглинання світла зразком завтовшки 1 см, який містить 1%-ний розчин досліджуваної речовини — $E_{1\%}^{1\text{ см}}$.

Закон Бугера–Ламберта–Бера лежить в основі визначення концентрації речовин за величиною їх екстинкції. Однак його можна використовувати не в усіх випадках. Часто спостерігається нелінійна залежність між екстинкцією E і молярною концентрацією c . Зважаючи

на те, що основною причиною цього є взаємодія молекул речовини між собою та розчинником, необхідно використовувати розведені розчини. Однією з причин також може бути іонізація молекул речовини падаючим світлом. Певним обмеженням щодо використання основного фотометричного закону є можлива зміна чутливості і точності вимірювань залежно від довжини хвилі. Для спектрометричних досліджень можна вибрати будь-яку довжину хвилі в спектрі поглинання досліджуваної речовини, але чутливість і точність вимірів буде різною.

Перед початком досліджень необхідно підібрати умови виконання закону Бугера–Ламберта–Бера, перевірити відповідність чутливості і точності заданим параметрам.

11.2. СПЕКТРОМЕТРИЯ У ВИДИМІЙ І УЛЬТРАФІОЛЕТОВІЙ ОБЛАСТЯХ СВІТЛА ТА ЇЇ ВИКОРИСТАННЯ В БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

Електронні спектри, обумовлені переходами електронів зовнішніх оболонок атомів з одного енергетичного рівня на інший, займають видиму (400–800 нм) та УФ-області (200–400 нм). Ці спектри відображають переходи як зв'язаних, так і незв'язаних електронів. Це, як правило, делокалізовані π -електрони подвійних $C=C$ -зв'язків і неподілені пари π -електронів азоту та кисню.

Для визначення яскравості світла в окремих ділянках спектра користуються приладом, який називається *спектрофотометром*. Блок-схема однопроменевого найпростішого спектрофотометра наведена на рис. 11.3.

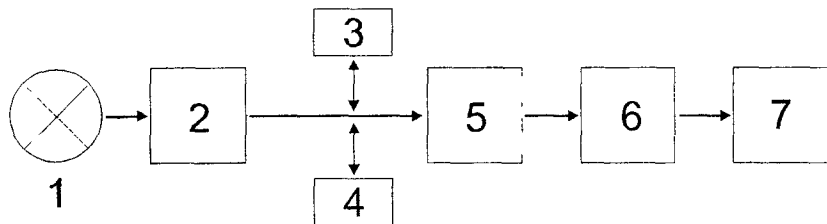


Рис. 11.3. Блок-схема однопроменевого спектрофотометра 1 – джерело випромінювання; 2 – світлофільтр або монохроматор, 3, 4 – блок з експериментальною (вимірювальною) і порівняльною (контрольною) кюветами; 5 – приймач випромінювання (детектор), 6 – помножувач; 7 – реєструючий пристрій

У спектрофотометрах, як правило, джерелом випромінювання є газорозрядні джерела світла ультрафіолетового і видимого діапазонів. Таким джерелом випромінювання, зокрема, є *лампи розжарювання*. Відомо, що всі нагріті тіла здатні до електромагнітного випромінювання, спектральний розподіл якого залежить від температури нагрівання. Як правило, матеріалом для таких джерел обирають вольфрам. Максимум спектра випромінювання ламп розжарювання лежить у ближній інфрачервоній області, але значна частина енергії випромінюється також у видимій і навіть у УФ-області спектра (до 300 нм).

Водневі лампи мають спектральну область випромінювання в діапазоні 165–500 нм, причому найбільшою енергія випромінювання буде при довжині хвиль менше 300 нм. Суттєвим недоліком цих джерел випромінювання є їхня мала потужність. Тому частіше використовують *дейтерієві лампи*, які ефективніші, ніж водневі в області спектра 250–290 нм.

Газорозрядні лампи надвисокого тиску, заповнені інертним газом (як правило, ксеноном), при електричному розряді дають майже рівномірний спектр, котрий у видимій та УФ-області близький до випромінювання Сонця. В УФ-області спектра краще використовувати газорозрядні лампи, заповнені не ксеноном, а спеціальними сумішами інертних газів.

Для одержання лінійного спектра в ультрафіолетовій, видимій і ближній інфрачервоній областях використовують *ртутні лампи*.

Основним оптичним елементом спектральних приладів є світлофільтри або монохроматори.

Світлофільтри — це оптичні пристрої, які змінюють спектральний склад світла або енергію світлових хвиль. Вони бувають декількох типів. Найдоступнішими і широко розповсюдженими є адсорбційні фільтри, які послаблюють світло за рахунок поглинання світлового потоку з певною довжиною хвилі речовиною фільтра.

Дисперсні фільтри послаблюють світло за рахунок зміни показника заломлення речовини. Є ще інтерференційні фільтри, дія яких заснована на явищі інтерференції паралельного променя, котрий відбивається двома дзеркалами, розміщеними на відстані довжини хвилі або на явищі інтерференції поляризованого світла. Крім того, користуються відбиваючими фільтрами, дія яких заснована на вибіркового відбиванні світла з певною довжиною хвилі.

Як світлофільтр, можна використовувати також розчини деяких речовин, здатних пропускати світло тільки певного спектрального

діапазону. Так, розчин $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (57 г/л води) пропускає світло в діапазоні 280–380 нм; K_2CrO_4 (135 г/л води) починає пропускати світло з довжиною хвилі більше 400 нм, HNO_3 (0,3 н. розчин) — в діапазоні 250–280 нм з максимумом при 260 нм).

Монохроматори — це оптичні системи, які виділяють вузькі ділянки частот чи довжин хвиль світлового спектра.

Важливою характеристикою монохроматорів є *ширина смуги* ($\Delta\lambda$)—діапазон довжин хвиль, в якому інтенсивність світла, котре пройшло крізь монохроматор, більше половини інтенсивності світла при довжині хвилі максимального піка. Іншим важливим параметром монохроматора є *ширина щілини* (S) — діапазон довжин хвиль, які попадають у монохроматор (вхідна щілина) і які виходять з нього і попадають на зразок (вихідна щілина). Для отримання надійних результатів необхідно вести дослідження при мінімально вузьких щілинах для даних умов експерименту з урахуванням заданої чутливості і роздільної здатності (здатності спектрофотометра розрізнати дві близькорозміщені смуги поглинання).

В серійних спектрофотометрах використовують призмени монохроматори та з дифракційною ґраткою або комбінацію їх.

В *призматичних монохроматорах* елементом, який розкладає світло за довжинами хвиль, є призма зі звичайного скла (для видимої області спектра) або кварцева (для УФ—області спектра). Недоліком таких монохроматорів є нерівномірність дисперсії, оскільки показник заломлення скла або кварцу є різним для світла різної довжини хвиль. Роздільна здатність призматичного монохроматора зі збільшенням довжини хвилі зменшується.

Як монохроматори використовуються також *дифракційні ґратки*, котрі являють собою плоскопаралельні пластинки з нанесеними на них паралельними штрихами (борознами). Біле світло через дифракцію на цих паралельних лініях розкладається у спектр за довжинами хвиль. Залежно від спектральної області використання монохроматора застосовують дифракційні ґратки з різною кількістю нанесених штрихів. Від цього залежить також роздільна здатність монохроматора, яка пропорційна густині штрихів. У серійних спектрофотометрах використовують монохроматори зі змінними дифракційними ґратками, які мають 1200 і 2400 штрихів/мм.

Для підвищення роздільної здатності спектрофотометра звичайно в монохроматорах спочатку виділяють певний діапазон спектра за допомогою призми, а потім вже розкладають його дифракційною ґраткою, що дозволяє одержати монохроматичне світло. Суттєво підвищується роздільна здатність спектрофотометра

при використанні подвійного монохроматора: коли в одному приладі розміщують два послідовно з'єднаних монохроматори, в яких вихідна щілина першого служить вхідною щілиною другого. Це дає змогу суттєво послабити розсіяне світло.

Кювети — це посудини, які виготовляються з оптично прозорого матеріалу для певного діапазона довжин хвиль і в які заливають розчин речовини, яка вивчається. Для роботи у видимій області спектра використовують скляні кювети, у ближній УФ-області — кварцеві (кварц починає поглинати світло з довжиною хвилі <190 нм), у далекій УФ-області — кювети з фтористого літію (прозорий до 110 нм).

При роботі з хімічно активними речовинами або такими, що здатні випаровуватися, кювети закривають пробками. Для безперервного аналізу розчинів, котрі, наприклад, витікають з колонок хроматографа, використовують спеціальні проточні кювети.

Для визначення поглинання досліджуваної речовини, використовують *порівняльну кювету* (контрольну), ідентичну кюветі зі зразком, з тією лише різницею, що вона тільки не містить речовину, яка вивчається.

Розчини, які заливаються в кювети, повинні бути гомогенними, некаламутними, не містити бульбашок повітря, які дуже посилюють розсіювання. Не дозволяється наливати в кювети сильно охолоджені розчини, оскільки в цьому випадку на зовнішньому боці стінок кювет буде конденсуватися пара води з повітря, і стінки стануть непрозорими.

Забруднення стінок кювет, подряпини на них сприяють розсіюванню і поглинанню світла, що призводить до викривлення результатів дослідження. Зважаючи на це, забороняється торкатися руками оптичних стінок кювети. Її треба брати руками тільки за ребра.

У спектрофотометрі кювети розміщуються в *кюветотримачі*, який має 2–4 комірки. Розчини в кювети краще заливати тоді, коли останні вставлені у витягнутий зі спектрофотометра кюветотримач. Треба пам'ятати, що кювети виготовлені з крихкого матеріалу, тому заповнювати їх треба так, щоб піпетка не торкалася стінок.

Як правило, для роботи використовуються кювети з оптичним шляхом 1 см (поперечний переріз являє собою квадрат з довжиною боку 1 см), які можуть вмістити 4–5 мл рідини. Але заливати їх повністю треба тільки тоді, коли це необхідно. Звичайно в такі кювети заливають 2,5–3,0 мл рідини. Існують також інші кювети з оптичним шляхом 100, 20, 5, 2 і 1 мм.

Як приймач випромінювання (детектор) в спектрофотометрах використовуються пристрої, які перетворюють світлову енергію в електричні сигнали.

До простих таких пристроїв, заснованих на внутрішньому фотоелефекті, належать фоторезистори, фотодіоди і фототранзистори.

Більшого поширення набули пристрої на основі зовнішнього фотоелефекту: *фотоелементи*, а особливо — *фотоелектронні помножувачі (ФЕП)*.

Кванти світла, які попадають на поверхню фотоелемента (фотокатод), вибивають з нього електрони, кількість яких пропорційна інтенсивності світла. Ці електрони летять до позитивно зарядженого електрода (фотоанода). В результаті цього в замкненому електричному ланцюгу виникає електричний струм, який після підсилення реєструється.

Звичайні фотоелементи найчутливіші до світла з довжиною хвилі 400 нм і майже нечутливі при $\lambda=550$ нм. Тому для досліджень у довгохвильовій видимій області необхідні спеціальні фотоелементи. Слід відзначити, що прості фотоелементи мають відносно малу чутливість. Значно більшу за них чутливість мають ФЕП, котрі, як правило, і є приймачами випромінювання в сучасних спектрофотометрах.

На відміну від фотоелементів, які мають два електроди (фоточутливий шар і позитивно заряджений електрод), ФЕП містять багатоелектродну систему. До неї прикладена різниця електричних потенціалів, яка забезпечує вторинну електронну емісію з поверхневого шару електродів, за рахунок чого підсилюється фотострум.

Електромагнітне випромінювання, яке попадає на фоточутливий шар (фотокатод), вибиває з нього первинні електрони, кількість яких за одиницю часу пропорційна числу квантів світла, яке падає на цей шар. Між фоточутливим шаром і першим електродом розміщені електростатичні лінзи, які фокусують на першому електроді електрони, вибиті з фоточутливого шару. Ці електрони викликають вторинну електронну емісію, оскільки поверхня цього (та інших електродів) вкрита спеціальним шаром, з якого електрони здатні вибивати значну кількість вторинних електронів (ця кількість електронів визначається коефіцієнтом вторинної емісії). Між електродами ФЕП прикладена різниця електричних потенціалів, яка прискорює потік електронів у напрямку наступного електрода, де знову відбувається вторинна емісія електронів і т.д. Серійні ФЕП для видимої області спектра містять 8–13 каскадів підсилення, що забезпечує коефіцієнт

помноження ФЕП у декілька мільйонів.

Сигнал на виході ФЕП при низьких світлових потоках потребує подальшого підсилення і перетворення, що виконується помножувачами постійного і змінного струму. Після підсилення цей сигнал потрапляє на реєструючий пристрій, котрим, як правило, є самописець. Якщо необхідно реєструвати кількість імпульсів струму, для цього використовують лічильник імпульсів.

Описані пристрої спектрофотометра (джерела випромінювання, реєструючий пристрій) містять більшість спектрофотометрів. Сучасні спектрофотометри ще мають ряд додаткових пристроїв, котрі значно полегшують як реєстрацію спектрів поглинання, так і обробку одержаних результатів. До таких спектрофотометрів, насамперед в першу чергу, належать реєструючі спектрофотометри, здатні реєструвати як зміну поглинання речовини залежно від довжини хвилі, так і зміну поглинання в часі при постійній довжині хвилі.

У двопроменевих спектрофотометрах, на відміну від однопроменевих, промінь від джерела випромінювання за допомогою системи дзеркал спрямовується чи то в кювету зі зразком, чи то в кювету порівняння. Різниця в світлових потоках, які пройшли ці кювети, вираховується автоматично і відповідає значенню поглинання речовини, яка досліджується.

Багатопроменеві реєструючі спектрофотометри фіксують зміну поглинання одночасно при двох вибраних довжинах хвиль і навіть більшій їх кількості.

Спектрофотометри, які враховують відбивання, вловлюють світло, що розсіюється зразком у всі боки (наприклад, коли об'єктом дослідження є суспензія мітохондрій). В цьому випадку поглинання вираховують після вимірювання всього розсіяного світла і тієї частини, яка проникла крізь зразок.

Існують також інші модифікації спектрофотометрів, які використовуються зі спеціальною метою.

Найчастіше спектрофотометри в біохімічних дослідженнях використовуються для *колориметрії* (від лат. color — колір і метрія) — порівняння якісних і кількісних змін світлових потоків при проходженні їх крізь розчини речовин з метою визначення кількості останніх.

Багато речовин, як правило, слабо поглинають випромінювання у видимій області спектра, але після реакції з іншою сполукою дають забарвлені продукти, кількість яких відповідає концентрації вихідних речовин. Таку кольорову реакцію використовують для виявлення цих речовин. Так, α -амінокислоти (як вільні, так і в складі білків) при нагріванні з нінгідрином забарвлюються залежно від радикала, в

жовтий, синій або червоний колір; циклічні амінокислоти при нагріванні з азотною кислотою — в жовтий колір, а після охолодження в лужному середовищі — в оранжевий (ксантопротеїнова реакція). При нагріванні тирозину (або білків, які містять цю амінокислоту) з реактивом Міллона (суміш азотнокислих і азотисто-кислих солей закису ртуті в концентрованої азотній кислоті) утворюється осад, який має червоний колір, а при нагріванні сірковмісних амінокислот у лужному середовищі з ацетатом свинцю утворюється осад сульфід свинцю чорного кольору. При додаванні до лужного розчину білка CuSO_4 з'являється червоно-фіолетове або синьо-фіолетове забарвлення (біуретова реакція на наявність пептидних зв'язків).

Кольорові реакції притаманні також вуглеводам, вітамінам, нуклеїновим кислотам. Так, при нагріванні розчину гексоз (глюкози та ін.) у лужному середовищі з сульфатом міді утворюється жовтий осад гідроксиду міді (реакція Троммера). Вітамін B_1 (тіамін) у лужному середовищі при взаємодії з діазореактивом утворює складну сполуку оранжевого або червоного кольору, а вітамін С (аскорбінова кислота) в реакції з гексоціано-(III) фератом калію в присутності хлористого заліза дає сполуку темносинього кольору.

Виявлення нуклеїнових кислот в сумішах проводять з використанням кольорових реакцій на залишки фосфорної кислоти (з молібденовою рідиною — амонійна сіль фосфорномолібденової гетерополікислоти цитрино-жовтого кольору), на пентози (з орцином рибоза утворює сполуку синьо-зеленого кольору, а дезоксирибоза з фуксинсірчистою кислотою — сполуку фіолетового кольору).

Існує також ще ряд специфічних кольорових реакцій на амінокислоти, білки, прості та складні вуглеводи, вітаміни, нуклеїнові кислоти. Спочатку за допомогою порівняльного (контрольного) зразка, який містить ту ж суміш, що й експериментальний, але без досліджуваної речовини, і шляхом зміни ширини щілини виставляють нульове значення екстинкції. Потім будують калібрувальний графік. З цією метою за певних стандартних умов проводять кольорову реакцію для проб (стандартів), які містять різну, але відому концентрацію речовини, що досліджується (від мінімально можливої в експериментальному зразку до максимально можливої). Після ряду вимірювань будують графік залежності поглинання зразка (екстинкції, E) від концентрації досліджуваної речовини (C) (калібрувальний графік). У подальшому вимірюють екстинкції експериментального зразка в тих же стандартних умовах і за калібрувальною кривою визначають концентрацію досліджуваної речовини в цьому зразку.

На рис. 11.4 наведений калібрувальний графік для сироваткового альбуміну людини і процедура визначення концентрації цього білка в експериментальному зразку. В цьому прикладі значення екстинкції (E) експериментального зразка було 0,55, що відповідає згідно з калібрувальним графіком, концентрації сироваткового альбуміну людини в цьому зразку 1,87 мг/л.

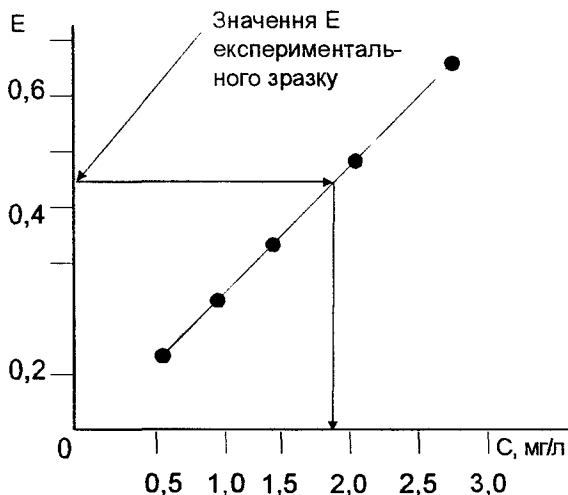


Рис. 11.4. Визначення концентрації сироваткового альбуміну людини за калібрувальним графіком (реагент — біурет, $\lambda = 540$ нм)

людини в цьому зразку 1,87 мг/л.

При проведенні спектрометричних досліджень з визначення концентрації речовин за кольоровою реакцією з відповідним реагентом слід керуватися такими правилами:

1. В порівняльній коветі повинні бути обов'язково всі компоненти розчину, крім речовини, що досліджується;

2. Вимірювання необхідно проводити в максимумі поглинання, оскільки цим досягається найбільша чутливість. Якщо положення макси-

муму невідоме, його необхідно визначити;

3. При побудові калібрувальної кривої вимірювання екстинкції для однієї концентрації необхідно проводити декілька разів (не менше двох) і на криву наносити всі одержані значення, а не їхнє середнє значення. Даний спосіб побудови калібрувальної кривої наочно показує точність визначення концентрації таким шляхом;

4. Якщо калібрувальна крива являє собою лінійну залежність, для її побудови необхідно не менше п'яти точок (вимірювань еталонних зразків з різною концентрацією). Для побудови нелінійної калібрувальної кривої їх потрібно значно більше;

5. Калібрувальні криві, одержані з реагентами різних партій, як правило, не співпадають, тому при зміні партії реагента необхідно знову отримати цю криву;

6. Калібрувальна крива не обов'язково повинна проходити через нуль осі координат; обумовлене це тим, що для розчину порівняння

рідко вдається одержати таке ж співвідношення всіх компонентів, що і для зразка;

7. Не слід екстраполювати калібрувальну криву до значень екстинкції, які лежать вище останніх експериментально одержаних даних. Якщо не потрібно вимірювати екстинкції при її значеннях, близьких до 1,0, то всі вимірювання доцільно проводити в інтервалі 0,1 — 0,6, оскільки в цьому інтервалі результати будуть найточнішими, тому що шкала спектрофотометра для значень екстинкції логарифмічна;

8. У випадку, коли значення екстинкції експериментального зразка лежить за межами калібрувальної кривої, для її побудови необхідно приготувати розчин такої концентрації, щоб значення екстинкції експериментального зразка попали на калібрувальну криву. Можна також розвести експериментальний зразок тим же розчином, який міститься в порівняльній пробі. Однак слід пам'ятати, що розведення можна проводити тільки у випадку, коли поглинання зразка підпорядковується закону Бугера–Ламберта–Бера. Зважаючи на це, краще не розводити розчини, а скористатися тоншими кюветами з меншим оптичним шляхом;

9. Домогтися ідентичних результатів у повторних вимірюваннях можна лише тоді, коли дослідження проводять на справній апаратурі, суворо дотримуватись умов експерименту, тобто ретельно визначають об'єми розчинів, контролюють температуру, вологість повітря, час тощо.

Однією з можливих цілей використання спектрометрії у видимій і УФ областях може бути ідентифікація речовин за еталонним спектром поглинання як у чистому вигляді так і в складі біологічних препаратів. Крім того, цей метод можна застосувати для визначення хімічної структури сполук, однак для точнішого аналізу необхідно використовувати й інші методи — інфрачервону спектрометрію, електронний і магнітний резонанси, мас–спектрометрію тощо.

Спектрометрія у видимій та УФ–областях широко використовується для якісного і кількісного аналізу біологічних речовин (зокрема, білків і нуклеїнових кислот), які через наявність у них хромофорів здатні поглинати світло.

Спектрометрія білків. Хромофорними групами білків, які визначають поглинання їх у видимій та УФ–областях спектра є наявність пептидного зв'язку та залишків ароматичних амінокислот.

Пептидний зв'язок є частково подвійним, оскільки π -орбіталі локалізовані по трьох атомах — С, О і N. Наявність цього зв'язку у білках викликає поглинання світла при 190 нм (УФ–область спектра).

При конформаційних перебудовах білків атоми, які утворюють пептидний зв'язок, змінюють свою взаємодію, що спричиняються до зміни спектра поглинання, виникнення гіпохромного ефекту. На рис. 11.5 наведені спектри поглинання полі-L-глутамінової кислоти, молекули якої при рН 4,9 мають α -спіральну будову, а при рН 8 — глобулярну:

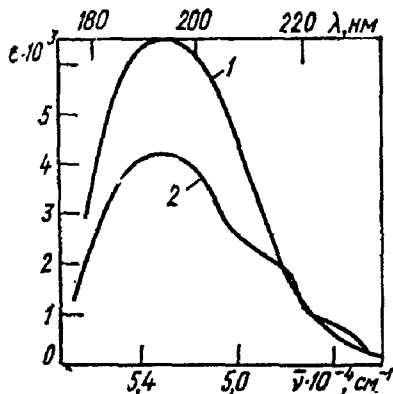
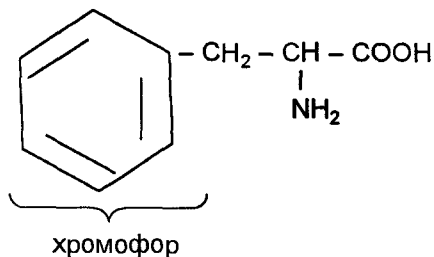


Рис. 11.5. Спектр поглинання глобулярної (1) і α -спіральної (2) полі-L-глутамінової кислоти (за Р.П.Виноградовою та ін., 1983)

Ароматичні амінокислоти (триптофан, тирозин і фенілаланін) є основними структурними компонентами білків, які визначають поглинання їх при довжині хвилі більше 220 нм. Крім того, певний внесок у поглинання білків роблять гістидин і сірковмісні амінокислоти (метіонін та цистеїн).

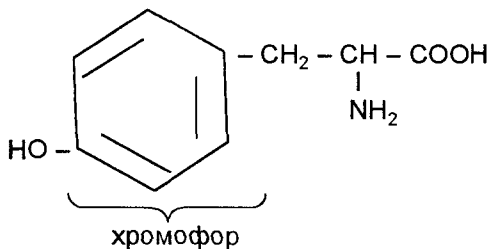
Поглинання світла фенілаланіном обумовлене тільки наявністю бензольного хромофора:



Цей хромофор має три смуги поглинання, які пояснюються $\pi \rightarrow \pi^*$ переходами. З них в області спектра понад 200 нм виявляється тільки одна низькоінтенсивна смуга при 258 нм (так звана "бен-

зольна смуга") з коливними рівнями. Коефіцієнт молярної екстинкції $\epsilon_{\max} = 195$ ($\lambda_{\max} = 258$ нм).

Тирозин, на відміну від фенілаланіну, містить гідроксильну групу, неподілена пара електронів якої включається в загальну електронну систему молекули:



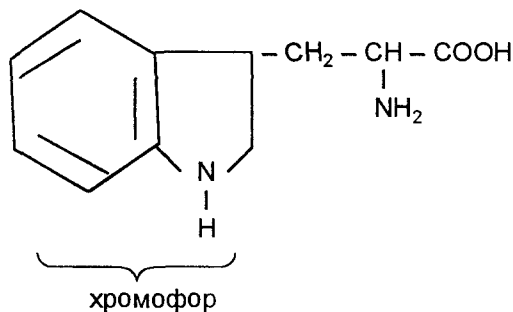
Коефіцієнти молярної екстинкції в екстремальних точках тирозину в області спектра понад 200 нм мають значення:

$$\epsilon_{\max} \text{ (при } \lambda_{\max} = 277 \text{ нм)} = 1,34 \cdot 10^3$$

$$\epsilon_{\min} \text{ (при } \lambda_{\min} = 245 \text{ нм)} = 170$$

$$\epsilon_{\max} \text{ (при } \lambda_{\max} = 222 \text{ нм)} = 8 \cdot 10^3.$$

У молекулі триптофану з бензольним кільцем спряжений ще один хромофор — ароматичне пірольне кільце:



Коефіцієнти молярної екстинкції в екстремальних точках триптофану в області спектра понад 200 нм мають значення:

$$\epsilon_{\max} \text{ (при } \lambda_{\max} = 280 \text{ нм)} = 5,4 \cdot 10^3$$

$$\epsilon_{\min} \text{ (при } \lambda_{\min} = 243 \text{ нм)} = 1,9 \cdot 10^3$$

$$\epsilon_{\max} \text{ (при } \lambda_{\max} = 218 \text{ нм)} = 33,5 \cdot 10^3.$$

На рис. 11.6 наведені спектри поглинання фенілаланіну, тирозину і триптофану в області спектра понад 230 нм.

Спектр поглинання білка можна зобразити у вигляді деякої інтегральної кривої, внесок в яку забезпечують, в основному,

наявність пептидних зв'язків і залишків ароматичних амінокислот. Однак їхній внесок при різній довжині хвиль буде неоднаковим. Так, в

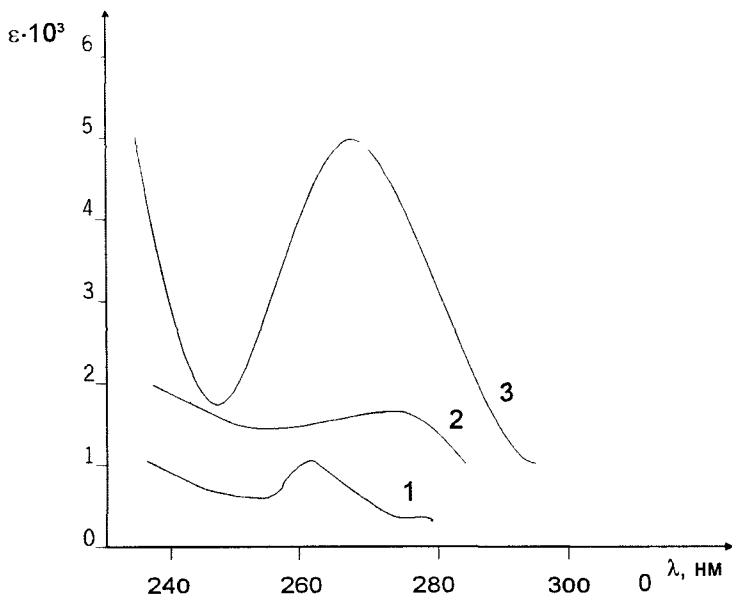


Рис. 11.6. Спектри поглинання фенілаланіну (1), тирозину (2) і триптофану (3)

області 180–200 нм — це наявність пептидних зв'язків, а в області 280 нм — триптофану і тирозину. Це дає можливість виділити декілька областей дослідження білків спектроскопічним методом, а саме:

1. Визначення концентрації білка і вмісту в ньому окремих хромофорів;

2. Встановлення вмісту амінокислотних залишків у спіральних областях молекули білка по гіпохромному ефекту в області 190 нм;

3. Оцінка стану хромофора в складі білкової молекули ("доступний" розчиннику чи "схований" всередині глобули).

Розглянемо детальніше ці області вивчення білків.

Як уже відмічалось, поглинання білків при 280 нм визначається вмістом у них триптофану і тирозину, тому значення екстинкції при 280 нм для білків, які містять різну кількість цих амінокислот, будуть різні. Це свідчить про те, що для визначення вмісту кожного з них необхідна індивідуальна калібрувальна крива. В біохімії, як правило, мають справу із сумішшю білків. У цьому випадку користуються

градувальною кривою, яку одержують для білка (наприклад, сироваткового альбуміну) або суміші білків з середнім вмістом триптофану і тирозину.

Для кількісного визначення білку спектрофотометричним методом зручно користуватися номограмою (додаток 17).

Метод спектрометричного титрування заснований на різниці в спектрах поглинання хромофорів у нейтральному та іонізованому станах, які задаються різними значеннями рН. Цей метод використовують, зокрема, для визначення локалізації тирозину в молекулі. Тирозин, як відомо, в кислому і нейтральному середовищі має максимум поглинання при 277 нм ($\epsilon = 1,34 \cdot 10^3$, рН 7,0), а в лужному — при 245 нм ($\epsilon = 2,35 \cdot 10^3$, рН 12,0).

Для залишків тирозину всередині білкової глобули зміна екстинкції (ΔE) щодо екстинкції вільного тирозину буде залежати від співвідношення "доступних" і "прихованих" залишків тирозину. Таким чином, частка іонізованих ("прихованих") залишків тирозину ($N_{\text{юн тир}}$) дорівнюватиме:

$$N_{\text{юн тир}} = \frac{\Delta E_{\frac{\beta}{295}}}{\Delta E_{\frac{\text{тир}}{295}}},$$

де: $\Delta E_{\frac{\beta}{295}}$ і $\Delta E_{\frac{\text{тир}}{295}}$ — зміна екстинкції при 295 нм білка (β) і вільного тирозину (тир) відповідно.

На рис.11.7 наведені криві спектрофотометричного титрування рибонуклеази.

За характерними перегинами, які є на кривих титрування, можна оцінити кількість іонізованих залишків тирозину, які знаходяться всередині глобули рибонуклеази і недосяжні для розчинника. Після денатурації перегини зникають і всі залишки тирозину титруються з рК 9,8–10, що відповідає вільному тирозину.

За методом диференційної спектрометрії екстинкцію білка, що досліджується, вимірюють відносно такого ж білка в еталонних умовах. Основна перевага цього методу полягає в тому, що він дає можливість вивчати невеликі зміни поглинання системи з великим значенням екстинкції. Крім того, стає можливим безпосередньо вивчати дію речовин, котрі не змінюють структуру білка, але впливають на поглинання пертурбантів—хромофорів, які безпосередньо контактують з розчинником. Хромофори, які занурені всередину білка, здатні до взаємодії з пертурбантом тільки тоді, коли в білку відбуваються структурні зміни, котрі спричиняють "вихід" цих хромофорів на поверхню.

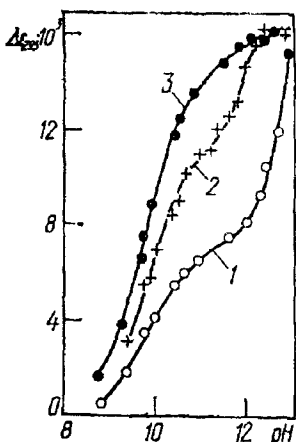


Рис. 11.7. Криві спектрофотометричного титрування нативної (1), частково денатурованої (2) і повністю денатурованої (3) рибонуклеази (за Г.А.Коганом, 1973)

Як пертурбанти звичайно використовуються розчини метанолу, етиленгліколю, диметилсульфоксиду тощо. Метод, в якому використовуються хімічні речовини-пертурбанти, називається *методом сольвентної* (від лат. *solvens* — розчиняючий) *пертурбації*. Метод, в якому фактором, що збурює електронні рівні "доступних" розчиннику хромофорів, є температура, називається *методом температурної пертурбації*. В цьому випадку створюється постійна різниця температур і виключається можливий вплив хімічних пертурбантів на структурні зміни досліджуваної молекули.

Описані вище методи та ряд їхніх модифікацій для спектрометрії білків широко застосовуються також при дослідженні інших біологічних речовин, зокрема нуклеїнових кислот.

Спектрометрія нуклеотидів та нуклеїнових кислот. Азотисті основи, нуклеозиди, нуклеотиди і нуклеїнові кислоти поглинають ультрафіолетове світло. Азотисті основи (пурини і піримідини) містять систему делокалізованих π -електронів, а також мають у складі своїх кілець атоми азоту, в яких є неподілена пара π -електронів. Слід відзначити, що спектри поглинання азотистих основ залежать також від їхньої таутомерної форми, іонізації груп, які входять до цих основ.

Спектри поглинання нуклеотидів обумовлені в основному $\pi \rightarrow \pi^*$ і $\pi \rightarrow \pi^*$ — переходами, котрі різняться між собою за інтенсивністю: $\pi \rightarrow \pi^*$ — переходи більш інтенсивні, а $\pi \rightarrow \pi^*$ — переходи менш інтенсивні. Основний внесок у характерну смугу поглинання нуклеотидів, з максимумом при 260 нм дають $\pi \rightarrow \pi^*$ — переходи, а $\pi \rightarrow \pi^*$ проявляються лише у вигляді невеликого плеча в більш довгохвильовій області спектра поглинання (на рис. 11.8 наведені спектри поглинання п'яти нуклеотидів).

При утворенні з нуклеотидів нуклеїнових кислот спектр поглинання останніх якісно дорівнює сумі спектрів поглинання складових нуклеотидів, але молярний коефіцієнт екстинкції мономерів зменшується при їхній полімеризації. При виникненні двоспінральних структур нуклеїнових кислот цей коефіцієнт ще більше зменшується —

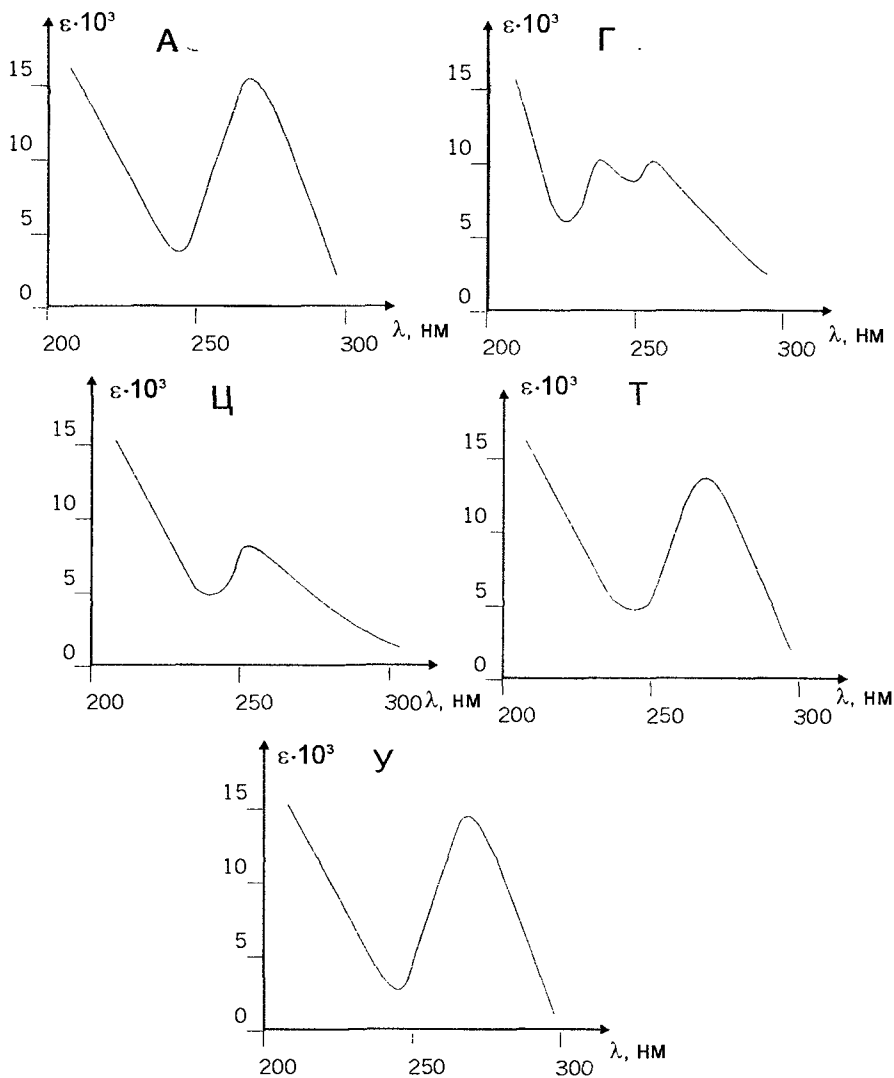


Рис. 11.8. Спектри поглинання нейтральних форм аденіну (А), гуаніну (Г), цитозин, (Ц), тиміну (Т) й урацилу (У)

виникає гіпохромний ефект (Н). Весь внесок у цей гіпохромний ефект дають $\pi \rightarrow \pi^*$ -переходи, оскільки вони, як вже відзначалося, орієнтовані вздовж площини нуклеотидів. Величину гіпохромного ефекту (Н)

звичайно виражають у відсотках і розраховують за формулою:

$$H = \frac{E_c - E_{н.к.}}{E_c} \cdot 100\%$$

де: E_c — екстинкція суміші нуклеотидів, еквівалентна досліджуваній нуклеїновій кислоті, $E_{н.к.}$ — екстинкція нуклеїнової кислоти.

На рис. 11.9 наведені спектри нативної ДНК та утвореної суміші складових її нуклеотидів після гідролізу цієї ДНК.

Залежність величини гіпохромного ефекту від температури характеризує ефект порушення внутрішньомолекулярних зв'язків біополімеру. Цей процес описується кривою плавлення.

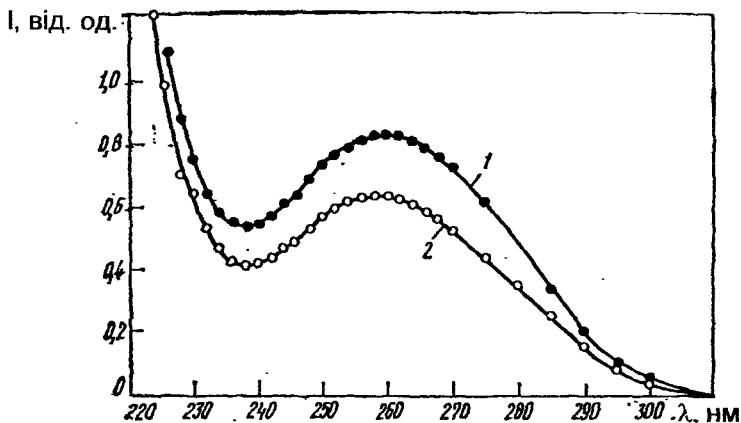


Рис. 11.9. Зміна спектра поглинання ДНК при її гідролізі дезоксирибонуклеазою: 1 — ДНК після гідролізу, 2 — нативна ДНК (за Р.П.Виноградовою та ін., 1983)

Аналіз кривих плавлення, наприклад ДНК хроматину тимусу теляти (рис. 11.10), який передбачає визначення місця перегину, температури плавлення, характеризує певною мірою склад нуклеотидний склад нуклеїнових кислот. Зокрема, встановлено, що зі збільшенням вмісту в ДНК пар аденін–тимін температура плавлення підвищується.

Інформативність кривих плавлення значно підвищується, якщо використовувати диференційні криві плавлення. Вони описують залежність похідної гіпохромного ефекту (H) по температурі (dH/dt) від температури (t) (рис. 11.10Б). Замість незначних перегинів на кривій плавлення її диференціальна форма має виражені піки.

Використання спектрометрії у видимій та УФ — областях спектра для біохімічних досліджень значно ширше, ніж наведене вище. Подібно білкам і нуклеїновим кислотам вивчаються вуглеводи, ліпіди, вітаміни та їхні похідні. Широко застосовують спектрометричні

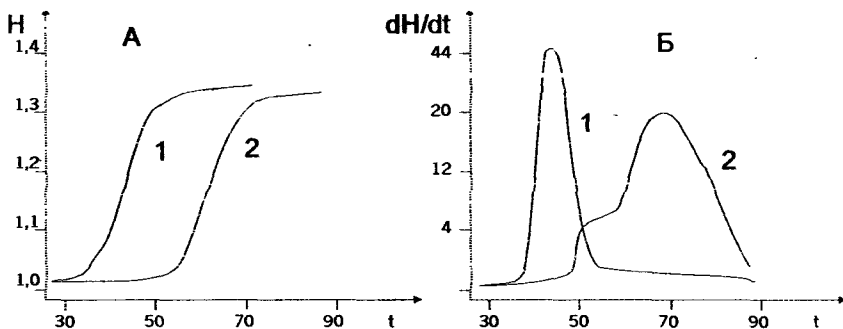


Рис. 11.10. Крива плавлення (А) і диференційна крива плавлення (Б) ДНК (1) та хроматину в 2М розчині сечовини (2) тимусу теляти (за А.Т. Ансевиним та ін., 1971)

методи для визначення вмісту й активності ферментів. У випадку, коли субстрат або продукт ферментативної реакції має характерний спектр поглинання, можна визначити кількість ферменту в суміші, а за спектральними змінами хромофору в ході реакції дослідити кінетику цієї ферментативної реакції.

11.3. ІНФРАЧЕРВОНА СПЕКТРОМЕТРІЯ

Для асиметричних молекул, які складаються з n атомів, згідно з теорією молекулярних коливань може бути $3n-6$ нормальних коливань (рух атомів молекули, при якому вони одночасно проходять положення рівноваги), з яких $n-1$ спричиняє розтягування зв'язків між атомами молекули, а $2n-5$ деформацію цих зв'язків (рис. 11.11).

Коливання атомів у складі молекули, які супроводжуються

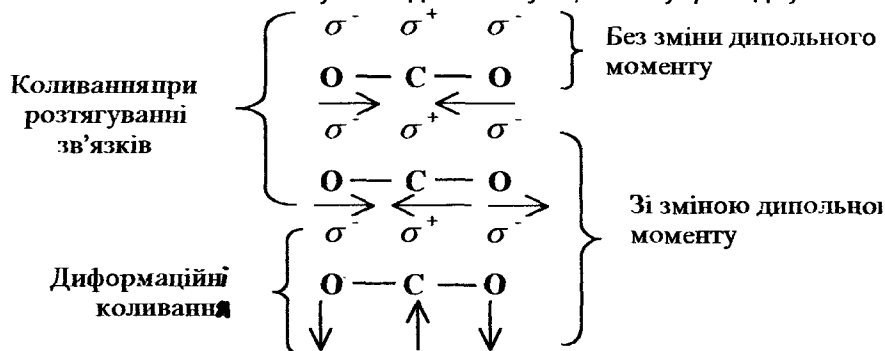


Рис. 11.11. Можливі типи коливань атомів у молекулі CO_2

зміною дипольного моменту (зміна заряду), мають особисті резонансні частоти поглинання в інфрачервоній області (ІЧ — області).

У біохімічних дослідженнях найпоширеніша ІЧ-область в діапазоні довжин хвиль 1–25 мкм. В ІЧ-спектрометрії, як правило, використовують хвильові числа ν , величини яких, обернені довжинам хвиль ($\nu = 1/\lambda$). Діапазон хвиль 1–25 мкм відповідає хвильовим числам 10000 — 400 см^{-1} .

Слід зазначити, що молекули, які складаються з багатьох атомів, мають велику кількість коливань, що утруднює інтерпретацію ІЧ-спектрів. Так, молекула, яка складається з 50 атомів, має 144 коливання в ІЧ-області спектра. Завдяки тому, що положення смуг поглинання в ІЧ-області однакових груп різних молекулах ідентичне, розшифрування ІЧ-спектрів значно полегшується. Значення має й те, що поглинання груп атомів у молекулі залежить від їхнього оточення, що викликає зміщення в той чи інший бік частоти поглинання. Це дозволяє розпізнавати різні групи з однаковими зв'язками (наприклад, групи $=\text{CH}_2$ і $-\text{CH}_3$ з $\text{C}-\text{H}$ -зв'язком).

У біохімічних дослідженнях ІЧ-спектрометрію використовують, здебільшого для визначення структурних формул речовин, аналізу структурних ізомерів та виявлення просторової конформації молекул.

Спектрофотометри, які використовуються для реєстрації ІЧ-спектрів, мають таку ж будову, як і спектрофотометри для видимої і УФ-спектрометрії (рис. 11.3). Відмінності полягають лише в конструкції окремих пристроїв. Крім того, в ІЧ-спектрометрії використовують, як правило, двопроменеві спектрофотометри, котрі дозволяють автоматично зрівноважити всі небажані ефекти, обумовлені розчинником і домішками, а також сильним поглинанням ІЧ-випромінювання CO_2 та парю H_2O повітря.

Як джерело ІЧ-випромінювання використовують такі випромінювачі:

1. Лампи розжарювання з вольфрамовою ниткою, спектральна область яких 5000–25000 см^{-1} , причому максимум у спектрі випромінювання припадає на короткохвильову частину цього діапазона. Лампи з ніхромовою ниткою можуть випромінювати промені з більшою довжиною хвилі, ніж лампи з вольфрамовою ниткою, але вони менш потужні;

2. Силітові стрижні (стрижень з SiC, глобар) зі спектральним діапазоном 300–5000 см^{-1} ;

3. Штифт Нернста (спресована суміш ZrO_2 , GeO_2 , Y_2O_3 , ThO_2), зі спектральним діапазоном яких 300–5000 см^{-1} .

Як монохроматор використовують призми або дифракційні

гратки. Призми роблять переважно з бромистого калію (KBr) або хлористого натрію (NaCl) межа прозорості яких становить відповідно до 300 см^{-1} та до 500 см^{-1} .

У деяких випадках замість дорогих і неміцних призм з KBr та NaCl використовують дзеркала з полірованого алюмінію, але вони мають низьку роздільну здатність.

Економічнішими, з кращою роздільною здатністю і лінійною залежністю дисперсії від довжини хвилі є дифракційні ґратки. На відміну від дифракційних ґраток, які використовуються у видимій та УФ-областях і мають, як правило, 1200 або 2400 штрихів/мм, в ІЧ-області використовуються дифракційні ґратки з 300 або 600 штрихами/мм.

Зразки для ІЧ-спектрометрії не рекомендується готувати у воді або органічних розчинниках, оскільки останні сильно поглинають в ІЧ-області. Для подолання труднощів, пов'язаних з поглинанням ІЧ-випромінення H_2O , ІЧ-спектри біологічних речовин знімають як в H_2O , так і D_2O . У певних діапазонах ці спектри не співпадають, тому при поєднанні їх можна одержати ІЧ-спектр досліджуваної речовини.

У деяких випадках як розчинник в ІЧ-спектрометрії використовують сполуки, котрі слабо поглинають в ІЧ-області (хлороформ, метанол, чотирихлористий вуглець, спеціальні багатокомпонентні суміші, які містять сірку, соляну, оцтову, мурашину та інші кислоти). В одному розчиннику не вдається зафіксувати весь ІЧ-спектр, тому виникає потреба розчиняти досліджувану речовину в декількох розчинниках і визначати для кожного розчинника спектри в тих діапазонах, де даний розчинник "прозорий".

Однак використання цих всіх розчинників для ІЧ-спектрометрії обмежене, оскільки вони самі здатні (хоч і не дуже сильно) поглинати в ІЧ-області, а також через те, що в них розчиняються лише жири і стероїди. Тому існує декілька ефективних методів приготування зразків для ІЧ-спектрометрії. Один з них — *метод приготування суспензії зразка в імерсійному середовищі*. Згідно з цим методом зразок розтирають з краплиною вазелінової олії у співвідношенні 1:100 до одержання однорідної пасти, яку розмазують між двома пластинками з KBr або NaCl. Замість вазелінової олії можна взяти парафін. Недоліками цього методу є нерівномірність товщини шару пасти і неможливість впливати на зразок.

Метод пресованих пігулок (пресованих дисків) полягає в тому, що досліджувану речовину, змішують з KBr у співвідношенні 1:300 і пресують під тиском приблизно $5 \cdot 10^8$ Па. Недоліком даного методу є те, що при пресуванні можна порушити кристалічну структуру речовини, частково зруйнувати складні молекули та ін.

Для приготування зразків *методом тонких плівок* розчин з досліджуваною речовиною наносять на підкладку і розчинник випаровують. Недоліком цього методу є зміна складу середовища (іонної сили, рН тощо) при випаровуванні. Найкраще готувати зразки на дистильованій воді, але деякі полімери розчиняються при певному значенні рН та іонної сили.

Всі наведені вище перераховані методи приготування зразків для ІЧ-спектрометрії мають ряд недоліків, які обмежують певною мірою використання ІЧ-спектрометрії в біохімічних дослідженнях. Нині набув значного поширення метод визначення ІЧ-спектрів, який дозволяє зменшити загальне відбиття світла. Цей метод ґрунтується на законах відбиття світла на поверхні розділу речовин з дуже відмінними коефіцієнтами заломлення.

Приймачем ІЧ-випромінювання служать, як правило, термопари, котрі розміщують у балончику з відкачаним повітрям, який має прозоре для ІЧ-світла вікно. Широко розповсюджений також болометр — прилад, сконструйований на базі терморезистора (змінює електричний опір при зміні температури). Іноді використовують елемент Голея — чутливий до тиску прилад, котрий складається з запаяного резервуара з газом, який розширюється при нагріванні ІЧ-випромінюванням.

Реєстрацію ІЧ-спектрів проводять, як правило, за допомогою самописця.

При розшифруванні ІЧ-спектрів необхідно знати таке:

1. За допомогою таблиць характеристичних частот (хвильових чисел) визначають в ІЧ-спектрі досліджувані речовини, наявність характеристичних груп і діапазони частот їхніх смуг поглинання. Для груп, здатних утворювати водневі зв'язки (ОН, NH тощо), необхідно враховувати умови, за яких одержані ІЧ-спектри. В концентрованих розчинах, суспензіях у маслах, пресованих пігулках броміду калію, рідких плівках і розплавах ОН- і NH-групи зв'язані міжмолекулярними водневими зв'язками. Внаслідок цього смуги валентних коливань розширюються порівнянно зі смугами вільних груп, які спостерігаються у розведених розчинах та газовій фазі;

2. При порівнянні табличних значень смуг поглинання характеристичних груп зі смугами експериментального ІЧ-спектра треба пам'ятати, що: інтерпретувати можна тільки деяку частину смуг, яка виявляється в спектрі досліджуваної речовини, оскільки не завжди теоретично передбачені смуги виявляються в експериментальному ІЧ-спектрі. Окремі смуги можуть перекриватися, зміщуватися за межі вказаних частот під впливом розчинника і сусідніх груп.

Розглянемо як приклад інтерпретацію ІЧ-спектра розплавленого фенолу (рис. 11.12).

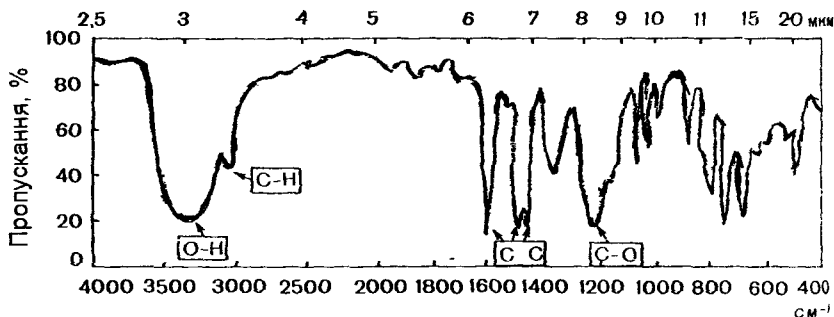


Рис. 11.12. Інфрачервоний спектр розплавленого фенолу (за Н Н Артемьевою та ін., 1985)

За табличними даними у спектрі фенолу виділяють групи атомів, які мають характеристичні частоти (смуги): О — Н —; С — О —; С — Н — і С — С — зв'язки. Коливання О — Н-зв'язку знаходиться в інтервалі 3500–3200 см^{-1} , С — Н-зв'язку — в інтервалі 3100–3000 см^{-1} , С — С-зв'язку — у вигляді чотирьох смуг при 1600, 1580, 1500 і 1450 см^{-1} , С — О-зв'язку — в інтервалі 1270 — 1000 см^{-1} .

Потім порівнюють теоретичні значення смуг поглинання з експериментальним ІЧ-спектром. Широка смуга при 3333 см^{-1} обумовлена коливаннями ОН-груп зв'язаних межмолекулярними водневими зв'язками, а частково перекриття смуги при 3045 см^{-1} спричинене коливаннями С — Н-зв'язку. В ІЧ-спектрі фенолу коливання С — С-зв'язку представлені трьома смугами при 1580, 1495, 1468 см^{-1} . Наявність цих трьох смуг обумовлена різною природою замісників в ароматичному кільці. Коливання С — О-зв'язку представлені широкою смугою при 1233 см^{-1} . Таким чином, в ІЧ-спектрі фенолу шість смуг обумовлені коливаннями О — Н-, С — Н-, С — С-, С — О-зв'язків.

Інфрачервона спектроскопія білків та нуклеїнових кислот.

До складу білків входять пептидні групи, зв'язані між собою системою зв'язків С — С і С — N, навколо яких можливе обертання.

Внаслідок утворення внутрішньомолекулярних зв'язків можуть утворитися декілька стійких форм поліпептидів: α -спіралі, паралельна і антипаралельна β -конформації, невпорядкований клубок тощо. Утворення цих структур пов'язане з виникненням водневих зв'язків між атомами О і N, які входять до складу пептидної групи. Внаслідок цього змінюються частота коливань цих атомів, що

позначається на ІЧ–спектрах білків. Таким чином, ІЧ–спектроскопія білків може дати інформацію про їхню структуру, спосіб упакування молекули, кількість радикалів, укладених у відповідну структуру. Однак для одержання такої інформації важливо виділити відповідні коливання, які б відносилися до атомів, що входять у пептидну групу.

Характерними смугами в ІЧ–спектрах білків вважають амідні смуги. Серед них існує так звана смуга "Амід І" (частота 1643 см^{-1} , обумовлена $\text{C}=\text{O}$ і $\text{C}-\text{N}$ -зв'язками), інтенсивність якої суттєво відмінна для різних конформацій білків. Крім того, при дейтеризації (досліджуваний білок, витримують тривалий час у важкій воді D_2O) смуга "Амід І" не змінює свого положення, тимчасом як інші амідні смуги зсуваються в бік низьких частот.

На практиці при ІЧ–спектрометрії білків виконують такі дії:

1) знімають ІЧ–спектри еталонних зразків, які мають переважно структури α -спіралі, β -конформації або неупорядкованого стану. Визначають для смуги "Амід І" її положення (частоту) в ІЧ–спектрі, напівширину цієї смуги, величину молярного коефіцієнта екстинкції;

2) порівнюють ІЧ–спектри досліджуваного білка, з еталонними зразками і визначають у цьому білку вміст α -спіральних ланок, β - і неупорядкованої конформації.

При вивченні глобулярних білків необхідно пам'ятати, що, по-перше, поглинання бокових груп дає внесок в ІЧ–спектр, який важко врахувати; по-друге, дослідження необхідно проводити у водних розчинах; по-третє, протони, які знаходяться всередині білкової глобули дуже важко заміщуються на дейтерій.

Вивчення методом ІЧ–спектрометрії нуклеїнових кислот дає меншу інформацію, ніж дослідження цим методом білків. Пов'язане це з тим, що більшість коливань атомів у молекулах нуклеїнових кислот проходить без зміни дипольного моменту, тобто без поглинання в ІЧ–області. Крім того, будова азотистих основ значно складніша, ніж будова пептидної групи. Це спричиняє появу в ІЧ–спектрі нуклеїнових кислот смуг, які перекриваються.

11.4. СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРІЯ

При кімнатній температурі більшість органічних молекул перебуває в основному стані (на рис. 11.2 і рис. 11.13 вони позначені символом S_0). Поглинання фотона, яке здійснюється за час 10^{-15} с, супроводжується переходом електрона на вищий рівень (молекула збуджується). Час життя збуджених $\pi \rightarrow \pi^*$ і $n \rightarrow \pi^*$ — переходів станів становить приблизно 10^{-9} — 10^{-6} с. Після поглинання кванта енергії

молекула через тепловий рух і зіткнення з іншими молекулами витрачає частину енергії і переходить на нижній коливальний рівень першого збудженого стану (S_1) — це переходи без випромінювання. Енергія в цьому випадку переходить у внутрішню коливальну енергію молекули. Можливі також переходи без випромінювання між рівнями однієї мультиплетності (синглет \rightarrow синглет, триплет \rightarrow триплет) — *внутрішня конверсія* (ВК), а також між рівнями різної мультиплетності (синглет \rightarrow триплет, триплет \rightarrow синглет) — *інтеркомбінаційна конверсія* (ІКК) (рис. 11.13).

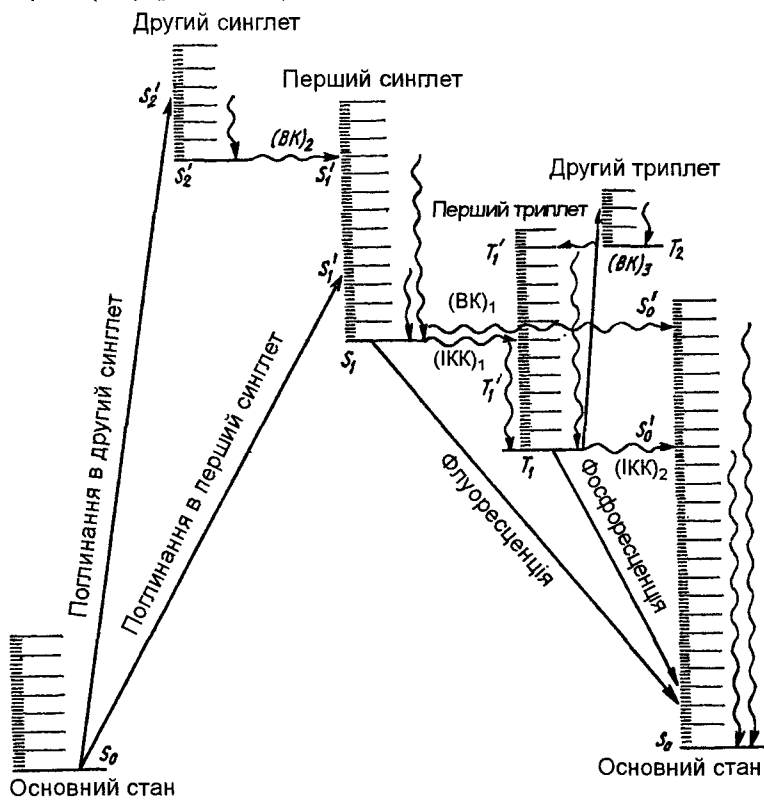
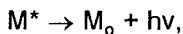


Рис. 11.13. Схема виникнення люмінесценції (за А.П. Головиною та ін., 1978): S_0, S_1, S_2 — синглетні стани; T_1, T_2 — триплетні стани; S_1', S_2' — коливальні рівні синглетних станів; T_1', T_2' — коливальні рівні триплетних станів; ВК — внутрішня конверсія; ІКК — інтеркомбінаційна конверсія; хвилястими стрілками показані переходи без випромінювання

Інший спосіб використання молекулою в збудженому стані енергії поглинання — це випромінювання кванта світла:



де: M^* і M_0 — молекула в збудженому і основному стані; $h\nu$ — квант енергії випромінювання.

Воно відбувається внаслідок переходу молекули з першого збудженого стану (S_1) в основний (S_0). Цей процес проходить за 10^{-9} — 10^{-8} с.

В загальному вигляді явище випромінювання квантів енергії збудженою молекулою отримало назву *люмінесценція* (від лат. lumen — світло і суфікс *escentia*, який означає слабку дію). Цим терміном позначають випромінювання світла речовиною, що збуджується будь-яким джерелом енергії (зовнішнім випромінюванням), і це свічення не пов'язане з нагріванням. У випадку, коли молекула збуджується світлом, говорять про явище *флуоресценції* або *флюоресценції* (від лат. fluor — потік та суфікса *escentia* — що означає слабку дію) — один з видів люмінесценції.

Енергія кванта, яка випромінюється збудженою молекулою, менша, ніж енергія поглинутого кванта. Внаслідок цього спектр флуоресценції зсунутий у довгохвильову область відносно спектра поглинання — це так званий *стоксовий зсув*.

Оскільки переходи з першого збудженого стану в основний можливі на різні коливальні та обертальні рівні, спектр флуоресценції має вигляд смуг, які не залежать від довжини хвилі світла збудження і є дзеркально симетричними спектрам поглинання.

Більшість макромолекул (у тому числі білки та нуклеїнові кислоти) мають систему триплетних енергетичних рівнів. За час життя збудженого стану можливі переходи, як уже зазначалося, з синглетного на триплетний рівень, і навпаки (інтеркомбінаційна конверсія). Вірогідність переходів з триплетного рівня (T_1) в основний стан (S_0) дуже мала, і ці переходи заборонені відповідно до правил відбору квантової механіки. Однак вони відбуваються. Час життя першого триплетного рівня (T_1) через малу вірогідність переходів з нього в основний стан великий — від 10^{-3} с до одиниць секунд. Випромінювання, обумовлене переходом з першого триплетного рівня в основний стан ($T_1 \rightarrow S_0$), називається *фосфоресценцією*.

Існує також *уповільнена флуоресценція*, обумовлена тим, що за рахунок інтеркомбінаційної конверсії молекула може перейти в триплетний енергетичний рівень і перебувати на цьому рівні відносно довго оскільки вірогідність переходу з нього в основний стан дуже мала.

За цей час збуджена молекула може поглинути ще один квант і завдяки цьому перейти на синглетний рівень, а з нього — в основний стан.

Одна з класифікацій люмінесценції заснована на способі переходу молекул в збуджений стан при поглинанні ними кванта енергії. Так, якщо перехід здійснюється за рахунок поглинання світла у видимій і УФ — областях, то відбувається *фотолюмінесценція*, а якщо за рахунок енергії, виділеної в процесі хімічних реакцій, то відбувається *хемілюмінесценція* тощо.

Крім зазначених вище механізмів використання молекулою поглиненої енергії, існує ще декілька. Так, енергія електронного збудження може піти на енергозабезпечення хімічних перетворень, а також мігрувати на сусідні молекули, де може використовуватися одним з наведених вище способів.

Основною характеристикою флуоресценції є *спектр випромінювання* — залежність інтенсивності випромінювання від довжини хвилі. До параметрів спектра випромінювання належать: λ_{\max} — довжина хвилі, при якій спостерігається максимальна інтенсивність випромінювання; $\Delta\lambda_{1/2}$ — напівширина спектра $\Delta\lambda_{1/2} = \lambda_1 - \lambda_2$, де: λ_1 і λ_2 — довжина хвиль, при яких інтенсивність флуоресценції дорівнює половині максимальної з одного та з другого краю спектру.

Поміж характеристик флуоресценції є *енергетичний вихід* — відношення випромінюваної енергії до поглиненої протягом певного часу ($\eta = E_{\text{вип.}}/E_{\text{погл.}}$), а також *квантовий вихід* — відношення числа випромінених за одиницю часу квантів до числа поглинутих ($Q = n_{\text{вип.}}/n_{\text{погл.}}$).

Встановлено, що кількість молекул, збуджених внаслідок випромінювання, зменшується, як правило, за законом:

$$n = n_0 e^{-t/\tau_0},$$

де: n і n_0 — число збуджених молекул у даний час і в початковий час відповідно; t — час спостереження (в початковий момент $t=0$); τ_0 — час життя збудженого стану, тобто час, за який число збуджених молекул зменшується в e (2,72) разів. Значення величини τ_0 теж є однією з характеристик флуоресценції.

Відомо, що електромагнітне випромінювання являє собою поперечну хвилю, яка описується двома взаємно перпендикулярними векторами напруженості електричного і магнітного полів, котрі змінюються синфазно і спрямовані перпендикулярно до напрямку розповсюдження хвилі.

Якщо при розповсюдженні світла будь-який напрям електричного вектора в площині, перпендикулярній напрямку розповсюдження світлової хвилі, є однаково вірогідним, то таке світло називається

неполяризованим. Якщо ж синфазні коливання електричного вектора проєктуються на одну лінію, перпендикулярну напрямку розповсюдження хвилі площини, то таке світло називають *лінійно поляризованим*. Ступінь поляризації флуоресценції теж є однією з характеристик цього явища.

Блок-схема простого спектрофлуориметра наведена на рис. 11.14.

Як правило, в серійних спектрофлуориметрах використовують джерела світла з широким спектральним діапазоном (наприклад, ртутні або ксенонові лампи). Монохроматор збудження виділяє світло певної довжини хвилі для переведення молекул досліджуваної речовини в збуджений стан, а за допомогою монохроматора випромінювання визначають спектр флуоресценції при постійній довжині хвилі збудження. Як монохроматор використовують призми або дифракційні ґратки, аналогічні таким, що використовуються в спектрофотометрах (див. розділ 11.2).

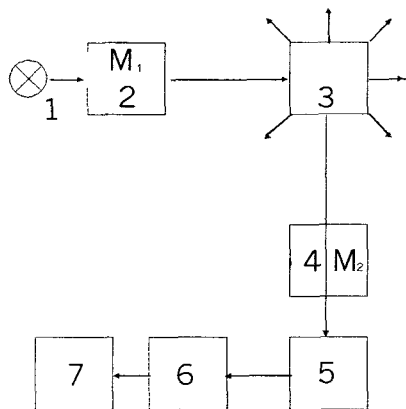


Рис. 11.14 Будова спектрофлуориметра 1 – джерело випромінювання, 2 – монохроматор збудження; 3 – кювета зі зразком; 4 – монохроматор випромінювання; 5 – приймач випромінювання (детектор); 6 – підсилювач; 7 – реєструючий пристрій (самописець)

Детектором у спектрофлуориметрі є фотоелемент або, як правило, фотоелектронний помножувач. Сигнал з детектора в режимі виміру постійного струму подається на підсилювач постійного струму, а потім на самописець. В імпульсному режимі виміру сигнал з детектора подається на імпульсний підсилювач, потім на інтегруючий пристрій і вже з нього — на самописець або на ЕОМ без додаткового перетворення.

У біохімічних дослідженнях спектрофлуориметрія широко використовується, зважаючи на те, що вона забезпечує високу точність, чутливість і відтворення результатів.

Основними напрямками її застосування є:

1. Якісний аналіз досліджуваних речовин, одержання і порівняння спектрів флуоресценції дозволяє вивчати структуру і просторову організацію молекул та їхніх комплексів, а також ідентифікувати сполуки;

2. Кількісний аналіз — визначення вмісту досліджуваних сполук у складі молекул, надмолекулярних утворах тощо;

3. Дослідження механізмів ферментативних реакцій.

У складі біополімерів виділяють три типи хромофорів, здатних випромінювати:

1) власні хромофори; 2) флуоресцентні хромофори, приєднані до молекули, що вивчається, за допомогою ковалентних зв'язків — так звана *флуоресцентна мітка*; 3) флуоресцентні хромофори, які приєднуються до об'єкта дослідження нековалентними зв'язками — *флуоресцентні зонди*.

Спектрофлуориметрія амінокислот і білків. Як уже зазначалося (див. розділ 11.2) основними хромофорами, що поглинають світло у видимій та УФ-областях, є ароматичні амінокислоти триптофан, тирозин і фенілаланін. Флуоресценція білків, в основному, обумовлена цими амінокислотами. На рис. 11.15 наведені спектри флуоресценції водних розчинів триптофану, тирозину і фенілаланіну:

1, від. од.

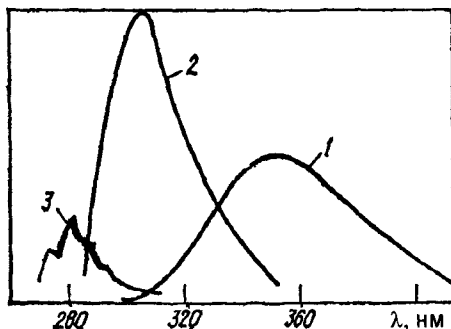


Рис. 11.15. Спектри флуоресценції водних розчинів триптофану(1), тирозину (2) і фенілаланіну (3)

При кімнатній температурі спектр флуоресценції триптофану має такі характеристики:

$$\lambda_{\max} = 350 \text{ нм}, \quad \Delta\lambda_{1/2} \cong 60 \text{ нм}, \quad Q = 0,2 \text{ (рН } 7,0\text{)}.$$

Тирозин при кімнатній температурі має спектри флуоресценції з характеристиками:

$$\lambda_{\max} = 303\text{--}304 \text{ нм}, \quad \Delta\lambda_{1/2} = 34 \text{ нм}, \quad Q = 0,42 \text{ (рН } 7,0\text{)}.$$

Фенілаланін характеризується спектром флуоресценції з максимумами при 275, 289 і 304 нм та квантовим виходом (Q) у межах 0,038–0,045.

Та обставина, що флуоресценція білків визначається, переважно названими вище амінокислотами, а не всією молекулою, дає

можливість досліджувати просторову організацію білків. Так, якщо відомий вплив умов оточення білка на параметри флуоресценції, то за зміною величин цих параметрів можна виявити локальні конформаційні перебудови в молекулі білка, полімеризацію білків, вивчати зв'язування білків з іншими сполуками.

Крім зміни мікрооточення, на флуоресценцію білкових хромофорів суттєво впливає також міжхромофорна міграція енергії. Найефективніша така міграція в напрямку:

фенілаланін → тирозин → триптофан.

Один із методичних підходів дослідження міграції енергії в молекулах полягає в гасінні флуоресценції. Гасіння флуоресценції — це явище, коли енергія збудження молекул переходить не в світлову, а в теплову енергію їхнього руху і зіткнення з іншими молекулами.

Метод гасіння флуоресценції тирозину і триптофану низькомолекулярними гасниками використовується для вивчення "доступності" хромофорів. Як гасники флуоресценції білків використовують Γ , Cs^+ , N_2 , NO_2 та ін.

Згідно з рівнянням Штерна–Фольмера маємо:

$$F/F_0 = 1/(1+KC) \quad \text{або} \quad Q/Q_0 = 1/(1+KC),$$

де: F_0 і F — інтенсивність флуоресценції без гасника і з гасником; Q_0 і Q — квантовий вихід флуоресценції без гасника і з гасником; K — константа гасіння; C — концентрація гасника.

Рівняння Штерна–Фольмера можна перетворити наступним чином:

$$E = KC,$$

де: $E = F_0/F - 1$ — ефективність гасіння.

Наведене вище рівняння справедливе, якщо в розчині є одна форма хромофорів. У випадку, коли в розчині є дві форми — "доступні" і "приховані" хромофори, — рівняння Штерна–Фольмера модифікується наступним чином:

$$F = \frac{\alpha_1 F_0}{1 + K_1 C} + \frac{\alpha_2 F_0}{1 + K_2 C},$$

де: α_1 і α_2 — внески "доступних" і "прихованих" хромофорів у сумарну інтенсивність флуоресценції F_0 ; K_1 і K_2 — відповідні константи гасіння.

При наявності в білковій молекулі великої кількості хромофорів одного типу використовують модифіковане рівняння Штерна–Фольмера

$$F_0/F_0 - F = 1/\alpha \text{ КС} + 1/\alpha.$$

В цьому випадку залежність $F_0/F_0 - F$ від $1/C$ являтиме собою пряму лінію, для якої нахил буде мати значення $1/\alpha \text{ К}$. Ця пряма лінія відтинає від осі ординат відрізок, який дорівнює $1/\alpha$. Таким чином, якщо побудувати графік у координатах $F_0/F_0 - F$ від $1/C$, можна одержати інформацію про внесок "доступних" і "прихованих" хромофорів у сумарну флуоресценцію білка.

Зв'язок між ступенем поляризації флуоресценції і часом життя збудженого стану описується рівнянням Перрена–Вавилова:

$$1/P - 1/3 = \left(1/P_0 - 1/3\right) \cdot \left(1 + 3\tau/\theta\right),$$

де: P — ступінь поляризації флуоресценції; P_0 — граничний ступінь поляризації флуоресценції; τ — час життя збудженого стану; θ — час релаксації.

Для сферичних частинок, що флуоресціюють,

$$\theta = \frac{3\eta V}{RT},$$

де: V — об'єм частинки; η — в'язкість розчину; T — абсолютна температура; R — газова постійна.

Рівняння Перрена–Вавилова можна переписати у вигляді:

$$1/P - 1/3 = \left(1/P_0 - 1/3\right) \cdot \left(1 + tRT/\eta V\right)$$

Таким чином, якщо побудувати графік залежності $1/P$ від T/η , маючи значення τ , можна визначити об'єм молекули, що флуоресціює.

Як уже зазначалося, одним з методів дослідження просторової організації біополімерів (у тому числі й білків) є вивчення спектральних характеристик флуоресцентних міток — хромофорів, ковалентно зв'язаних з досліджуваною молекулою. Цей метод використовується, в основному, для вивчення міграції енергії між різними хромофорними групами.

Як правило, досліджується індуктивно–резонансне перенесення енергії, спричинене електростатичною взаємодією між донором та

акцептором. Виділяють три типи такої міграції енергії: синглет — синглетний, триплет — синглет (відбуваються на відстані до 6,5 нм), а також триплет–триплетний (на відстані до 1,5 нм).

Процес перенесення енергії між одними хромоформними групами (донорами на інші акцептори) протікає в такій послідовності:

1) поглинання молекулою донора кванта енергії з переходом її у збуджений стан і встановлення без випромінювання теплової рівноваги з середовищем або внутрішня конверсія в стабільний збуджений електронний стан;

2) передача енергії збудження від донора до акцептора;

3) коливальна реакція без випромінювання в донорі до встановлення теплової рівноваги з оточенням та коливальна рівновага або внутрішня конверсія в молекулі акцептора;

4) випромінювання кванта енергії акцептором (у деяких випадках може відбуватися розсіювання енергії — перетворення в тепло без випромінювання).

Згідно з теорією Фьостера ефективність перенесення енергії (E) між донором і акцептором визначається рівнянням:

$$E = \frac{R_0^6}{R^6 + R_0^6},$$

або відстань між донором і акцептором (R) дорівнює:

$$R = \frac{R_0}{(Q_0/Q - 1)^{1/6}},$$

де: R_0 — ефективна відстань, на якій вірогідність синглет–синглетного перенесення енергії дорівнює 50% — радіус Фьостера; Q_0 і Q — квантові виходи флуоресценції донора без акцептора та в його присутності відповідно.

Таким чином, на основі величин Q_0 і Q можна визначити відстань між донором і акцептором.

Як флуоресцентну мітку використовують цілий ряд сполук. Для вивчення просторової організації білків дослідження проводять, зокрема, з малеїнізоїмідородаміном Б (MIP), флуоресцин–димеркуріацетатом (ФДМА), флуоресцин–інізотиноціанатом (ФІТЦ) та ін.

Ще один метод, який широко використовується для визначення структури ділянок білка — це *метод флуоресцентних зондів*. Нагадаємо, що флуоресцентні зонди — це відносно малі за розмірами молекули, здатні до флуоресценції після приєднання за

допомогою нековалентних зв'язків до молекули, що досліджується.

Ці зонди, залежно від своєї хімічної будови і фізичних властивостей, зв'язуються з певними ділянками білка і змінюють параметри своєї флуоресценції (положення λ_{max} , квантовий вихід, час життя збудженого стану, ступінь поляризації).

Як зонди для біохімічних досліджень білків найчастіше використовують штучні барвники: 1,8 — АНС (1 — анілінонафталін-8-сульфонат, $\lambda_{\text{max}} \text{ погл.} = 360 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{max}} \text{ вип.} = 470 \text{ нм}$), 2,6-ТНС (2-толуїдинонафталін-6-сульфонат, $\lambda_{\text{max}} \text{ погл.} = 350 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{max}} \text{ вип.} = 430 \text{ нм}$), БФС (бромфеноловий синій, $\lambda_{\text{max}} \text{ погл.} = 590 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{max}} \text{ вип.} = 605 \text{ нм}$), ДМХ (4-деметиламінохалкон ($\lambda_{\text{max}} \text{ погл.} = 410 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{max}} \text{ вип.} = 520 \text{ нм}$) та ін. Крім того, для дослідження ферментативних реакцій часто як зонд використовують аналоги субстратів, здатних до флуоресценції. Так, при вивченні АТФаз (аденозинтрифосфатаз) використовують ξ -АДФ (етеноаденозиндифосфат, $\lambda_{\text{max}} \text{ погл.} \approx 275 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{max}} \text{ вип.} \approx 410 \text{ нм}$), ξ -АТФ (етеноаденозинтрифосфат, $\lambda_{\text{max}} \text{ погл.} = 340 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{max}} \text{ вип.} = 376 \text{ нм}$).

Одним з методичних підходів при вивченні структури білків за допомогою флуоресцентних зондів, як і при використанні флуоресцентних міток, є дослідження міграції енергії між хромофорами білкової молекули (від донора на акцептор). Як уже зазначалося, ефективність міграції енергії характеризується радіусом Фьостера (R_0) — відстанню, на якій вірогідність міграції енергії дорівнює 50%.

Донорами можуть бути ароматичні амінокислоти, певні штучні барвники тощо, акцепторами — ті ж штучні барвники, білки, цитохроми тощо.

При вимірюванні ефективності перенесення енергії між донорами й акцепторами можна визначити відстань між хромофорами білкової молекули.

У біохімічних дослідженнях флуоресцентні зонди використовуються також для визначення кількості центрів на молекулі білка, які зв'язують зонд, а також для визначення константи зв'язування зонда (на основі графіка Скетчарда — залежності g від r/c , де: g — концентрація зв'язаного зонда, а c — концентрація вільного зонда). Крім того, за допомогою позитивно або негативно заряджених флуоресцентних зондів досліджується електричний заряд центрів зв'язування, особливості їхньої структури.

За допомогою флуоресцентних зондів ще досліджують структурні перебудови в молекулі білків зі зміною зовнішніх умов (рН, іонної сили тощо).

Спектрофлуориметрія нуклеїнових кислот. Спектрофлуориметрія при вивченні нуклеїнових кислот застосовується, як і при вивченні білків, для якісного (ідентифікація сполук) і кількісного аналізу, визначення структури, дослідження процесів полімеризації, зв'язування з іншими сполуками (особливо білками) тощо.

Використовуються ті ж методичні підходи, що й при вивченні білків.

Найпоширенішим є метод *флуоресцентних зондів*. Зондами при дослідженні нуклеїнових кислот служать: АО (акридин оранжевий, в H_2O $\lambda_{\text{max}} \text{ погл.} = 494 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{max}} \text{ вип.} = 530 \text{ нм}$), ЕБ (етидій бромистий, в H_2O $\lambda_{\text{max}} \text{ погл.} = 480 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{max}} \text{ вип.} = 590 \text{ нм}$), ПФ (профлавін, в H_2O $\lambda_{\text{max}} \text{ погл.} = 443$, $\lambda_{\text{max}} \text{ вип.} = 520 \text{ нм}$) та ін.

При зв'язуванні з нуклеїновими кислотами спектральні характеристики флуоресцентних зондів стають іншими, ніж у воді внаслідок зміни електронних спектрів поглинання зондів.

Молекули АО зв'язуються з дволанцюговими ланками нуклеїнових кислот у мономерній формі ($\lambda_{\text{max}} \text{ вип.} = 530 \text{ нм}$), а з одностанцюговими ланками — в димерній формі ($\lambda_{\text{max}} \text{ вип.} = 640 \text{ нм}$). Завдяки цьому спектрофлуориметричним методом з використанням флуоресцентного зонда АО вдається виявити наявність одно- і дволанцюгових ланок у молекулах нуклеїнових кислот та оцінити кількість їх. Крім того, якщо визначити співвідношення інтенсивності флуоресценції при двох довжинах хвиль, для яких характерні максимуми флуоресценції мономерної і димерної форм АО (I_{530} і I_{640}), то можна встановити відносну кількість різних нуклеїнових кислот у клітині або в різних ділянках однієї клітини. Існує велика група клітин, в яких нуклеїнові кислоти представлені одностанцюговими РНК і дволанцюговими ДНК (лейкоцити, нервові клітини та ін.). Для цих клітин можна вирахувати так званий параметр α , який визначається відношенням концентрації нуклеїнових кислот:

$$\alpha = I_{640} / I_{530} = A \frac{[РНК]}{[ДНК]},$$

де: А — коефіцієнт пропорційності.

Слід пам'ятати, що в загальному випадку основний внесок в I_{530} дають, як правило, двоспиральні РНК, а внесок в I_{640} — денатуровані (односпиральні) ланки ДНК. Крім того, відносно мала частина I_{530} (до 2% при рН 4,1) спричинена флуоресценцією АО, яка обумовлена зв'язуванням цього зонда з білками, а частина I_{640} — зв'язуванням АО з мукополісахаридами, тому необхідно спочатку провести попереднє дослідження при рН 2,0, бо при цьому значенні рН вся флуоресценція при 640 нм обумовлена димером АО, який зв'язаний з мукополісахаридами.

Відмінності спектрів флуоресценції комплексів АО з нативною (двоспиральною) і денатурованою (односпиральною) ДНК покладені в основу методу визначення кількості денатурованої ДНК в суміші з нативною.

Як високоспецифічний реагент–зонд на нуклеїнові кислоти часто використовують етидій бромистий (ЕБ). При зв'язуванні ЕБ з нативною ДНК інтенсивність флуоресценції посилюється приблизно в 100 разів, а при зв'язуванні з РНК — в 46 разів. Разом з тим, інтенсивність флуоресценції ЕБ практично не змінюється при зв'язуванні зі сполуками ненуклеїнової природи. Це явище дає можливість визначати відносний вміст нуклеїнових кислот у сумішах з іншими сполуками, зокрема білками.

Спектрофлуориметричні методи не обмежуються тільки наведеними вище прикладами застосування їх для вивчення білків і нуклеїнових кислот. Крім ряду їхніх модифікацій для дослідження цих сполук, ці методи використовуються, також (особливо методи флуоресцентних міток і зондів) для якісного і кількісного аналізу, вивчення структури, конформаційних перебудов вуглеводів, ліпідів і вітамінів.

Імунофлуоресценція. Експериментально встановлено, що певні флуоресцентні барвники (флуоресценти) можуть взаємодіяти з антитілами без втрати останніми здатності до реакції з антигеном. Результатом цього відкриття стала розробка методу *імунофлуоресценції*, котрий можна використовувати у будь-якій галузі біології, де доводиться використовувати антитіла. Імунофлуоресценція — це зручний метод аналізу багатьох зразків на вміст та ідентифікацію специфічних антитіл.

Широкого використання набув метод імунофлуоресценції для оцінки клітин і зразків тканин. У дослідях з клітинами роблять, як правило, мазки клітин. У цьому методі краплину суспензії клітин (приблизно 10^6 клітин/мл) наносять на предметне скельце мікроскопа, надосадову рідину відсмоктують, а скельце швидко висушують теплим повітрям. Ще один метод приготування препаратів клітин для імуноферментного аналізу — використання цитоцентрифугування. На предметне скельце мікроскопа наносять приблизно 50 мкл суспензії клітин, яка містить 10^6 клітин/мл. Після центрифугування осаджені на скельці клітини висушують теплим повітрям.

Зразки тканин для приготування препаратів повинні бути якомога свіжішими. Основні методи заморожування для одержання криозрізів — це використання твердого та газоподібного CO_2 , заморожування в рідкому азоті. Товщина криозрізів повинна бути у межах 4–6 мкм, їх необхідно якомога скоріше висушувати на предметному скельці мікроскопа стисненим повітрям при кімнатній температурі.

Більш простим, ніж метод криозрізів, є метод приготування відбитків. Препарати відбитків готують наступним чином:

предметного скельця мікроскопа, на якому знаходиться свіжий зріз тканини, легко торкаються іншим скельцем, котре негайно висушують.

Для максимального збереження антигенної здатності зрізів тканин використовують нефіксовані кріозрізи. Однак останніми роками розроблені методики помірної фіксації зрізів, за якою їхня здатність до зв'язування антитіла не знижується. Оскільки чутливість антигенів до різних хімічних реагентів, які використовуються для фіксації, неоднакова, необхідно у кожному конкретному випадку використовувати відповідні методики. Слід пам'ятати, що широкоживаний фіксатор формальдегід пригнічує здатність багатьох антигенів до зв'язування антитіл. У той же час більшість антигенів стійкі до органічних розчинників (етанолу, метанолу, ацетону та ін.).

Антисироватки для імуофлуоресцентного методу готують з достатньо активних і високоспецифічних препаратів антитіл, які кон'югують з оптимальною кількістю флуоресценту. Найпоширенішими серед них є антиглобулінові кон'югати.

Антигенспецифічне зв'язування кон'югатів, як правило, корелює з їхньою преципітатною активністю, тому загальноприйнятим методом оцінки активності кон'югатів є звичайна реакція преципітації. Специфічність антисироватки контролюють за допомогою відповідних стандартних методів. Так, для антиглобулінових кон'югатів придатним може бути імуоелектрофорез або подвійна імунодифузія з очищеними препаратами імуноглобулінів. Можна також використовувати реакцію непрямой гемаглютинації з еритроцитами, які містять антиген.

Одним з перших флуоресцентів в імуофлуоресцентному методі використовували *флуоресцеїн*, який поширений і зараз. Для кон'югації з білками звичайно використовують флуоресцеїнізотиоцінат, ізомер 1. Він добре з'єднується з білками і утворює стабільні кон'югати із заданим вмістом флуоресценту. Максимум поглинання цієї речовини (λ_{\max}) — 495 нм. Для сполучення з відносно малою кількістю білка, як правило, 10% флуоресцент диспергують в інертному носії — целіті, який після утворення кон'югатів відділяють центрифугуванням.

Серед інших флуоресцентів, особливо в методі подвійної імуофлуоресценції, використовують *родаміни* (зокрема, тетраметілродамінізотиоцінат, λ_{\max} погл — 555 нм), *техаський червоний* (λ_{\max} погл. — 596 нм) тощо.

Певною альтернативою антитілам, які мічені флуоресцентом, може бути реагент, виготовлений на основі біотин—авідину. В цьому випадку водорозчинний вітамін біотин (вітамін Н) сполучається з

антитілами, а флуоресцент зв'язується з білком авідином (його віділяють з білка курячих яєць), котрий має високу здатність до сполучення з біотином.

У процесі формування кон'югатів значна частина флуоресцентів не сполучається з білками і дають високий рівень фонові флуоресценції. Кількість незв'язаного флуоресценту визначають, як правило, хроматографічними методами, а найкращим методом видалення вільного флуоресценту є гель-фільтрація на сефадексах G25 або G50.

При правильному виборі співвідношення між концентрацією білка і флуоресцентною міткою, вміст останньої у більшості молекул кон'югата буде оптимальним. Однак певна частина антитіл все ж таки буде мічена недостатньо, а інша — надмірно. Молекули з недостатнім вмістом флуоресцента гальмуватимуть зв'язування з антигеном оптимально мічених антитіл, а з надмірно міченими антитілами спричинятимуть неспецифічну флуоресценцію. Тому в ряді випадків для подальшого дослідження доцільно виділяти фракцію з оптимальним вмістом флуоресцентної мітки за допомогою, наприклад, іонообмінної хроматографії.

Для флуоресцентної мікроскопії потрібні спеціальні джерела світла, які дозволяють отримати випромінювання з певною довжиною хвилі для збудження флуоресценції барвника, який використовується як мітка. Крім того, необхідні інтерференційні світлофільтри для виділення максимумів довжини хвилі збудження та випромінювання флуоресцента.

Результати імуноферментного аналізу, як правило, документуються шляхом фотографування. При цьому слід враховувати, що флуоресцентні мітки під мікроскопом здатні до "вицвітання" (затухання флуоресценції). Тому при довготривалій експозиції необхідно використовувати речовини, які уповільнюють "вицвітання," — парафенілендіамін, 1,4-діазобіциклооктан тощо.

11.5. ОПТИЧНІ МЕТОДИ, ЯКІ БАЗУЮТЬСЯ НА ЯВИЩІ РОЗСИЮВАННЯ СВІТЛА РОЗЧИНАМИ БІОПОЛІМЕРІВ

Визначення розмірів, форми і молекулярної маси молекул при релєївському розсіюванні. Дослідження закономірностей розсіяного світла молекулами біополімерів дає інформацію про розміри і форму цих молекул. Існує два методичних прийоми при вимірюванні світлорозсіювання розчинів. Один з них базується на

закономірностях розсіювання світла частинками, розміри яких значно (в 10–20 разів) менші за довжину хвилі падаючого світла. В цьому випадку молекула виступає як один центр розсіювання. Інший методичний прийом базується на закономірностях розсіювання світла частинками, розміри яких порівнянні з довжиною хвилі падаючого світла. В цьому випадку у складі однієї молекули може існувати декілька незалежних центрів розсіювання і тому необхідно враховувати інтерференцію світла, розсіяного різними частинами однієї молекули.

Розсіювання світла реєструють приладами, які залежно від використаної методики дають можливість визначити інтенсивність світла, що пройшло крізь зразок, або інтенсивність світла, котре розсіюється під різними кутами. В першому випадку можна скористатися спектрофотометром (див. рис. 11.3), а в другому — спеціально сконструйованими приладами, в яких приймач світла (фотоелектронний помножувач) автоматично може розміщуватися під різними кутами щодо напрямку падаючого світла, джерелом якого є, як правило, лазерне випромінювання.

Розсіювання світла малими частинками. При опроміненні світлом у частинці, що знаходиться в розчині, формується електричний диполь, котрий є джерелом вторинного випромінювання. Р.Релей встановив, що інтенсивність неполяризованого світла, розсіяного окремою молекулою під кутом θ , описується рівнянням:

$$\frac{I_{\theta}}{I_0} = \frac{8\pi^4 \alpha^2 (1 + \cos^2 \theta)}{\lambda^4 r^2},$$

де: I_0 — інтенсивність розсіяного світла, I_{θ} — інтенсивність падаючого світла, r — відстань від розсіяної частинки до приймача світла, λ — довжина хвилі ($\lambda = \lambda_0/n_0$, де: λ_0 — довжина хвилі у вакуумі, n_0 — показник заломлення середовища), α — поляризованість молекули (індукований момент частинки в розрахунку на одиницю напруженості електричного поля).

Можна показати, що існує така залежність:

$$Hc/\tau = 1/M + 2Ac,$$

де: $H = \frac{32\pi^3 n_0^2}{3\lambda_0^4 N_A} \cdot \nu^2 \cdot a$; $\nu = \frac{n - n_0}{c}$; λ_0 — довжина хвилі у вакуумі, n і

n_0 — показники заломлення розчину і розчинника, c — концентрація частинок, N_A — число Авогадро; τ — мутність середовища,

$$\tau = \frac{32\pi^3}{3} \cdot \frac{n_o^2(n - n_o)}{\lambda_o^4 a}, \text{ а — число частинок в } 1 \text{ см}^3 \text{ об'єму,}$$

$a = cN_A/M$; M — молекулярна маса; A — коефіцієнт, який враховує взаємодію частинок з розчинником.

Вимірюючи залежність інтенсивності розсіяного світла від концентрації частинок, а також використовуючи наведене вище рівняння, можна визначити молекулярну масу розчиненої речовини. Вимірювання проводять під фіксованим кутом, як правило, 90° , з урахуванням розсіювання світла розчинником

Розсіювання світла великими частинками. В біохімічних дослідженнях значний інтерес становить вимірювання частинок, розміри яких порівнянні з довжиною хвилі падаючого світла. В цьому випадку маємо:

$$Hc/\tau = 1/M \cdot P(\theta) + Ac,$$

де: $P(\theta)$ — поправочний коефіцієнт, який враховує інтерференцію випромінювання.

Для частинок різної форми значення $P(\theta)$ будуть різні. Крім того, внаслідок інтерференції світла, яке розсіюється під різними кутами, його інтенсивність буде різною для частинок неоднакового розміру. Для характеристики цієї відмінності вводять спеціальний параметр — $I_{45^\circ} / I_{135^\circ}$ асиметрія розсіювання світла (I_{45° і I_{135° — інтенсивність розсіювання світла під кутом 45° і 135°). Вимірюючи відношення $I_{45^\circ} / I_{135^\circ}$ при різних довжинах хвиль, можна за виглядом графіка визначити форму частинок, що вивчаються. Якщо форма частинок відома, то за відповідним графіком можна визначити їхній розмір.

Спектроскопія комбінаційного розсіювання (Раманівська спектроскопія). Релеївське розсіювання має частоту, яка дорівнює частоті світла, що падає. Коли монохроматичне світло проходить крізь прозоре середовище, то частина його поглинається, частина виходить без поглинання, а частина (приблизно 10^{-6} падаючого світла) розсіюється під прямим кутом щодо падаючого світла. Менше 1% розсіяного світла має іншу довжину хвилі, і в спектрі розсіяного світла по обидва боки від основної (релеївської) лінії з частотою ν_0 існують лінії низької інтенсивності з частотами $\nu_1 < \nu_0$ (стоксовські лінії) і частотами $\nu_1 > \nu_0$ (антистоксовські лінії). Це явище називається ефектом Рамана або комбінаційним розсіюванням світла (КР — розсіювання). В КР-спектрах комбінується частота падаючого світла

з частотою власних коливань молекули, звідки й походить назва цього ефекту. Як джерело світла використовують лазери, котрі дають високоінтенсивне монохроматичне і поляризоване випромінювання.

Будова КР-спектрометра подібна до будови спектрометрів, які використовуються для вимірювання релєвського розсіювання.

Механізм виникнення КР-спектрів можна пояснити так: збуджені світлом молекули після втрати надлишкової енергії не завжди повертаються на вихідний коливний рівень; при взаємодії кванта електромагнітного випромінювання з молекулою, яка знаходиться на одному зі збуджених коливальних рівнів, може статися передача енергії від молекули цьому кванту і його частота збільшиться, внаслідок чого в спектрі розсіювання з'являться лінії, зміщені щодо релєвської лінії в короткохвильову область — антистоксієвські лінії.

У певних випадках частина енергії кванта може передатися молекулі, і вона переходить в один зі збуджених коливальних станів. Енергія розсіяного випромінювання при цьому зменшується, і в спектрі з'являються лінії, зміщені відносно до релєвської лінії в довгохвильову область — стоксієвські лінії.

Вірогідність виникнення КР-спектрів значно нижча, ніж релєвського розсіювання, тому інтенсивність цих спектрів мала. Крім того, передача енергії збудженою молекулою кванту падаючого світла менша, ніж навпаки — квантом світла молекулі. Тому в КР-спектрах інтенсивність смуг у стоксієвській області більша, ніж в антистоксієвській (рис. 11.16).

В КР-спектрах проявляються частоти, які відповідають коливальним енергетичним рівням у молекулі, і тому вони розміщуються в ІЧ-області. На відміну від ІЧ-спектрів, які обумовлені наявністю постійних дипольних моментів (див. рис. 11.11), у КР-спектрах проявляються переходи, обумовлені індукованими (наведеними) дипольними моментами. Інакше кажучи, в ІЧ-спектрі проявляються внутрішньомолекулярні коливання лише електрично заряджених складових частин молекули, а в КР-спектрі — всі внутрішні коливання (заряджених і нейтральних груп молекули). Таким чином, КР-спектри доповнюють

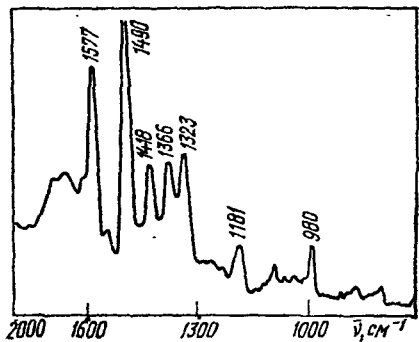


Рис. 11.16 Спектр комбінаційного розсіювання гуанозину (за Р.П.Виноградовою та ін., 1983)

інформацію, одержану шляхом ІЧ–спектрометрії. Широко КР–спектроскопія використовується для якісного та кількісного аналізу суміші органічних сполук, оскільки кожному компоненту суміші відповідають свої смуги в КР–спектрі, а за їх інтенсивністю можна зробити висновок про кількісний вміст цих компонентів.

Нефелометричний і турбідиметричний методи аналізу. При проходженні світла крізь суспензію дрібних частинок спостерігається бічне розсіювання світла, завдяки чому візуально сприймається мутність розчину. Якщо лінійні розміри частинок більші, ніж довжина хвилі падаючого світла, то його розсіювання обумовлене заломленням світла на межі розділу частинка–розчинник і відбиванням світла частинками. Якщо ж довжина хвилі падаючого світла, більша за лінійні розміри частинок, то відбувається дифракція світлової хвилі, обгинання нею частинки (*ефект Тундаля*).

Інтенсивність розсіювання збільшується з підвищенням кількості частинок, які розсіюють світло. На цьому засновані два подібних методи визначення концентрації речовин — *нефелометрія* (від грец. *perhele* — хмара) та *турбідиметрія* (від лат. *turbo* — обертання, вихор).

При *нефелометрії* вимірюють інтенсивність світлового потоку, котрий виникає внаслідок розсіювання світла, що падає на суспензію, у напрямку, перпендикулярному напрямку первинного пучка. *Турбідиметричний* метод заснований на вимірювань ослаблення світлового потоку, який проходить через суспензію, у напрямку, який співпадає з напрямком первинного пучка.

Інтенсивність потоку світла, яке розсіюється частинками суспензії (J_p), описується рівнянням:

$$J_p = k_1 J_0 \frac{Vc}{\sigma \lambda^4} \left(\frac{n_1^2 - n_2^2}{n_1^2 - 2n_2^2} \right)^2;$$

де: k_1 — коефіцієнт пропорційності; J_0 — інтенсивність первинного потоку світла; V — об'єм частинок суспензії; c — концентрація частинок; σ — густина речовини частинок; λ — довжина хвилі світла, яке падає; n_1 і n_2 — показники заломлення частинок суспензії і розчинника відповідно.

При нефелометричному аналізі величини V , λ , σ , n_1 і n_2 залишаються постійними, тому наведене вище рівняння можна переписати у вигляді

$$J_p = k \cdot c.$$

Таким чином, інтенсивність розсіяного світла прямо пропорційна концентрації частинок суспензії. Для двох суспензій з частинками однакової форми і розміру відношення інтенсивностей розсіяного світла пропорційне відношенню концентрації частинок:

$$\frac{J_{p1}}{J_{p2}} = \frac{c_1}{c_2},$$

звідки:

$$c_1 = \frac{J_{p1} \cdot c_2}{J_{p2}}.$$

Саме це рівняння використовується для нефелометричного аналізу, який проводиться за допомогою спеціальних приладів — нефелометрів. Цей прилад діє за принципом урівноваження двох світлових потоків — від суспензії і від мостового скляного розсіювача. Потоки врівноважують, змінюючи потужність одного з них за допомогою діафрагми. Оптична схема нефелометра НФМ наведена на рис. 11.17.

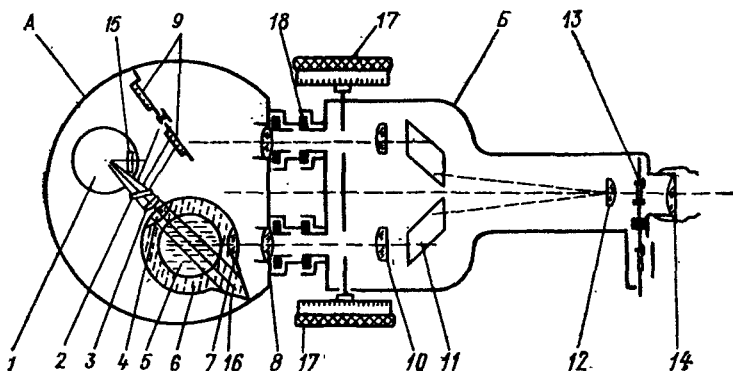


Рис. 11.17. Оптична схема нефелометра НФМ: А — нефелометрична доточка; Б — фотометричний вимірювач; 1 — лампа; 2 — пластинка, яка розділяє світловий потік; 3 — циліндрична лінза; 4 — конденсор; 5 — кювета; 6 — камера з дистильованою водою; 7 — об'єктив нефелометричної доточки; 8 — світловловлювач; 9 — лінза нефелометричної доточки; 10 — барабани діафрагм; 11 — об'єктиви фотометричного вимірювача; 12 і 13 — призми; 14 — окуляр; 15 — світлофільтр для дослідження зразків, які флуоресцюють; 16 — розсіювачі; 17 — проміжна трубка; 18 — світлофільтри

Світло від освітлювача (1) проходить крізь прозору пластинку (2), лінзу (3), конденсор (4) і попадає в камеру (6) з дистильованою водою (для зменшення розсіювання світла стінками кювети), в якій стоїть кювета (5) з досліджуваною суспензією. Світловий потік, який пройшов крізь кювету, гаситься у світловловлювачі, а та частина його, яка розсіюється частинками суспензії, попадає крізь лінзу (9) у фотометричний вимірювач і створює яскравість однієї половини поля зору окуляра. Друга частина світлового потоку, яка відбилася від скляної пластинки (2), попадає на розсіювач (16) і крізь лінзу (9) також потрапляє у фотометричний вимірювач і створює яскравість другої половинки поля зору окуляра. Світлові потоки у фотометричному вимірювачі проходять крізь діафрагми, кожна з яких зв'язана із своїм барабаном (10). Обидва світлових потоки об'єктивами (11) призми (12, 13) зводяться до осі окуляра (14) і попадають в очі дослідника, котрий бачить поле зору в формі кола, розділеного вертикальною лінією. На барабані діафрагми нанесені дві шкали — світлопропускання і оптичної густини. Обертанням барабанів урівноважують фотометричні поля за яскравістю і відраховують показники за шкалою оптичної густини.

У попередніх дослідженнях будують калібрувальну криву (по осі абсцис відкладають значення концентрації, а по осі ординат — відповідні їм значення відносної оптичної густини зразків — стандартів), за якою визначають концентрацію речовини в експериментальному зразку, який містить такі ж частинки, як і зразки — стандарти.

При *турбідиметричному аналізі* зв'язок між потужністю світла, яке пройшло крізь суспензію і частинки описуються наступним наближеним рівнянням для розведених суспензій:

$$A = \lg \frac{J_0}{J} = k_1 \frac{lc \cdot r^3}{r^4 + \alpha \lambda^4},$$

де: A — здатність до розсіювання (величина, аналогічна оптичній густині); J_0 — потужність світлового потоку, який падає на суспензію; J — потужність світлового потоку, який пройшов суспензію; l — товщина шару, який розсіює світло; r — середній діаметр частинок; λ — довжина хвилі світла, яке падає на суспензію; k_1 — коефіцієнт пропорційності, який залежить від природи суспензії і методу дослідження, α — константа, яка залежить від методу дослідження.

При *турбідиметричному аналізі* вимірювання проводять в умовах, коли k_1 , r , λ і α — постійні величини, тому вищенаведене рівняння можна спростити:

$$A = klc.$$

Останній вираз аналогічний рівнянню Бугера–Ламберта–Бера (розділ 11.1). Тому в турбідиметрії використовують для вимірювання колориметри, спектрофотометри.

Нефелометричний і турбідиметричний аналіз мають високу чутливість, але ці методи не набули широкого використання в біохімічній практиці через те, що важко відтворити однакові за розмірами частинок суспензії, не дати їм можливості коагулювати тощо. Крім того, слід пам'ятати, що розрахунки, покладені в основу кількісного визначення концентрації досліджуваних речовин, справедливі тільки для сильно розведених суспензій (концентрація не більше 100 мг на 1 л розчинника).

11.6. РЕФРАКТОМЕТРИЧНИЙ МЕТОД АНАЛІЗУ

При переході проміння світла з одного прозорого середовища до іншого змінюється напрямок проміння — його заломлення. Воно оцінюється за величиною *показника заломлення*, яка залежить від будови речовин та їхньої концентрації, складу системи, довжини хвилі світла, температури, тиску тощо. Методи, засновані на вимірюванні показника заломлення, називаються рефрактометричними (від лат. refractus — заломлений).

Середовище є оптично щільнішим, коли в ньому швидкість розповсюдження світла менша. При переході проміння світла з середовища менш оптично щільного в середовище з більшою оптичною щільністю кут падіння променя буде більший за кут заломлення (рис. 11.18).

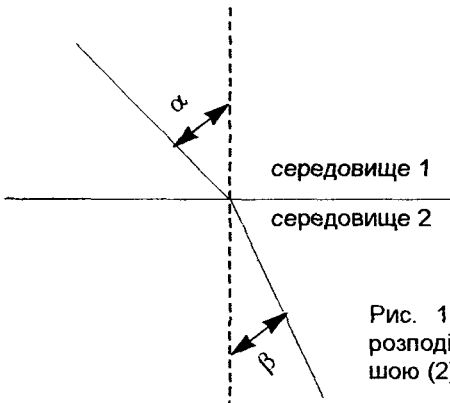


Рис. 11.18. Заломлення світла на межі розподілу середовища з меншою (1) і більшою (2) оптичною щільністю

Згідно з законом заломлення світла відносний показник (коефіцієнт) заломлення дорівнює відношенню швидкості світла в даному середовищі до швидкості світла в тому середовищі, в якому воно розповсюджується після заломлення, і відповідає наступному співвідношенню:

$$n_{\text{від}} = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta},$$

де: $n_{\text{від}}$ — відносний показник заломлення другого середовища до першого; α — кут падіння променя; β — кут заломлення. Звичайно показники заломлення середовищ визначають відносно повітря і називають просто "показник заломлення", який позначають літерою n (якщо промінь падає з повітря, то $n_{\text{від}}$ — показник заломлення середовища відносно повітря).

Відносний показник заломлення двох середовищ також дорівнює

$$n_{\text{від}} = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{n_2}{n_1}.$$

де: n_1 і n_2 — показники заломлення відносно повітря першого і другого середовища відповідно.

Показники заломлення залежать, як уже зазначалося, від природи речовин середовища, температури, довжини хвилі світла тощо. Залежність показника заломлення від довжини світлової хвилі називається *дисперсією* (від лат. dispersus — розсіяний). Найменші відхилення від початкового напрямку мають червоні промені, найбільші — фіолетові. Таким чином, зі збільшенням довжини хвилі показник заломлення зменшується.

Кількісно дисперсію оцінюють як різницю

$$D = n_{\lambda_1} - n_{\lambda_2},$$

де: n_{λ_1} і n_{λ_2} — показники заломлення при довжині хвилі λ_1 і λ_2 відповідно.

Звичайно дисперсію прийнято оцінювати за величиною різниці показників заломлення для довжин хвиль, які відповідають лінії С (червона в спектрі водню — $\lambda_c = 656,5$ нм) та лінії F (синя лінія в спектрі водню $\lambda_f = 486$ нм). Різницю $D = n_f - n_c$ називають *середньою дисперсією*.

Табличні значення показників заломлення наводять при довжині хвилі $\lambda_D = 583,9$ нм (жовта лінія в спектрі натрію) і температурі 20°C. При збереженні постійними довжини хвилі світла та умов проведення досліджень, від яких залежить показник заломлення, його значення

будуть визначатися тільки природою середовищ, які контактують.

На орбітальні електрони та ядра атомів, які здійснюють коливання під дією впливу світлової хвилі, впливають сусідні заряджені частинки — електрони та ядра інших атомів і молекул. Чим більше таких заряджених частинок в одиниці об'єму, тим більше буде проявлятися такий вплив. Це в загальному вигляді пояснює залежність показника заломлення від густини речовини:

$$f(n) = rd,$$

де: r — коефіцієнт пропорційності, який називається питомою рефракцією; d — густина речовини (кг/м^3).

Виходячи з уявлення про поляризацію атомів і молекул в електричному полі, функцію $f(n)$ можна записати у вигляді:

$$f(n) = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \text{ або } \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} = rd,$$

$$\text{звідки } r = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{1}{d} \quad (\text{м}^3/\text{кг}).$$

Якщо через α позначити певний коефіцієнт, значення якого характеризує величину диполя, котрий виникає під впливом електричного поля, то для речовини з молекулярною масою M значення питомої рефракції пропорційне коефіцієнту α :

$$r = \frac{4\pi}{3} \cdot \frac{N_A}{M} \alpha,$$

де: N_A — число Авогадро.

Величина α залежить від природи речовини і називається *поляризованістю*.

$$\text{Величина } R = rM = \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \cdot \frac{M}{d} = \frac{4\pi}{3} N_A \alpha = 2,52 \cdot 10^{24} \alpha \quad (\text{м}^3/\text{кмоль})$$

— називається *молярною рефракцією*.

Визначення величини молекулярної рефракції є одним з методів, які використовуються при визначенні складу речовини, структури її молекул.

Залежність показника заломлення від складу досліджуваної речовини встановлюється експериментально шляхом визначення показника заломлення для стандартних зразків, склад яких відомий. На основі одержаних результатів будують калібрувальні криві в координатах: по осі ординат — значення показника заломлення, по

осі абсцис — концентрація досліджуваних речовин. Для багатьох речовин спостерігається наступний зв'язок:

$$n = n_0 + KC, \text{ або } C = (n - n_0) / K,$$

де: n і n_0 — показники заломлення розчину, який містить речовину, та чистого розчинника відповідно; C — концентрація розчиненої речовини; K — експериментально знайдений коефіцієнт на основі вимірювання зразків-стандартів.

Показник заломлення визначається за допомогою приладів, які називаються *рефрактометрами*. Найчастіше в біохімічних дослідженнях використовують рефрактометри типу Аббе або Пульфріха. Вимірювання цими приладами засновані на визначенні величини граничного кута заломлення.

При збільшенні кута падіння α буде збільшуватися і кут заломлення β , але весь час він буде менший α , якщо $n_2 > n_1$. Таким чином, коли кут падіння досягне 90° , величина кута заломлення досягне певної граничної величини, меншої 90° , — *граничний кут заломлення*. При цьому промінь, який падає, буде ковзати вздовж поверхні розділу двох середовищ. Якщо $\alpha = 90^\circ$, то $\sin \alpha = 1$ і тоді вираз

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{n_2}{n_1}$$

можна записати:

$$\frac{1}{\sin \beta} = \frac{n_2}{n_1}, \text{ або } n_1 = n_2 \sin \beta.$$

Якщо n_2 має відомі значення (наприклад, друге середовище — це призма із скла), то для визначення n_1 достатньо виміряти величину кута β .

У рефрактометрі типу Аббе (рис. 11.19) призмений блок складається з вимірювальної (1) та освітлювальної призми (2), між гіпотенузними гранями яких знаходиться тонкий шар досліджуваної рідини.

Поверхня гіпотенузної грані освітлювальної призми жорстка, матова і розсіює світло,

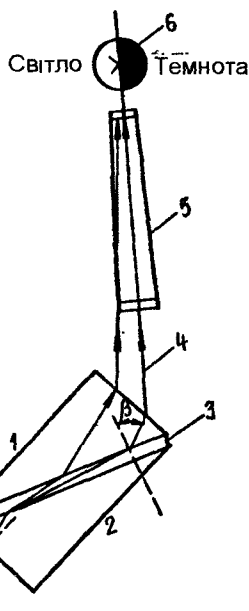


Рис 11.19 Схема рефрактометра типа Аббе 1 — вимірювальна призма, 2 — освітлювальна призма, 3 — шар рідини, 4 — межові промені, 5 — зорова труба, 6 — поле зору

яке попадає в шар досліджуваної рідини крізь освітлювальну призму. Промені перетинають шар рідини в різних напрямках, певна частина променів (4) майже під кутом 90° (межові промені) попадає в зорову трубку (5). За положенням лінії відрахунку в зоровій трубці визначають величину заломлення.

Для зменшення дисперсії, яка викликає розкладання білого світла і внаслідок цього появу розмитої та забарвленої межі в зоровій трубці, в рефрактометрах використовують спеціальні пристрої — компенсатори дисперсії, до яких входять призми Амічі, котрі складаються з трьох призм, виготовлених з різних сортів оптичного скла і склеєних разом. Оптичні характеристики цих призм підібрані таким чином, що тільки хвилі лінії D в спектрі натрію входять і виходять з цієї призми без зміни напрямку. Сині і червоні промені (лінії F і C у спектрі водню) відхиляються на певні кути, протилежні за знаком тим кутам, які відповідають відхиленню променів тих же кольорів вимірювальної призми. В результаті підсумовування рівних і протилежних за знаком відхилень дисперсія зводиться до 0.

Схема рефрактометра типу Пульфриха наведена на рис. 11.20.

В цих приладах кут між вхідною (1) і вихідною (2) призмами

дорівнює 90° . Краї вхідної грані мають форму кола. На цій грані розміщують циліндричний стакан (куюета), в який наливають досліджувану рідину. В рефрактометрах типу Пульфриха використовуються монохроматичні джерела світла. До рефрактометра додаються таблиці, які дозволяють знаходити показник заломлення за величиною кута, який вимірюється. Якщо n — показник заломлення рідини, яка досліджується, а N — показник заломлення вимірювальної призми, то

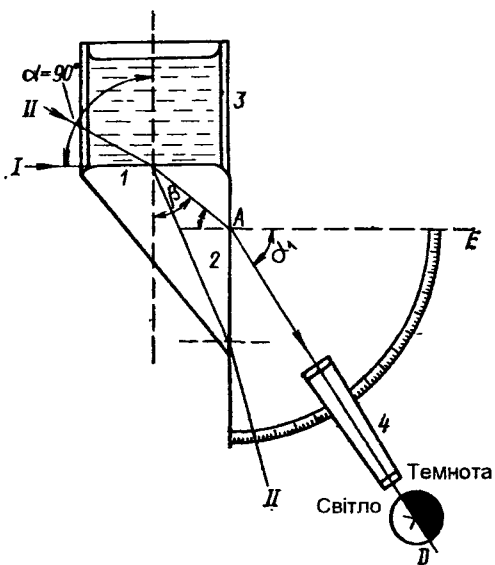


Рис. 11.20. Схема рефрактометра Пульфриха: 1,2 — вхідна і вихідна вимірювальна призма відповідно; 3 — кювета для досліджуваної рідини; 4 — зорова трубка

$$n = N \sin \beta, \text{ або } \sin \beta = \frac{n}{N} .$$

Показник заломлення N можна визначити також відповідно до значення кутів α і β (рис. 11.20):

$$N = \frac{\sin \alpha_1}{\sin \beta_1}, \text{ або } \sin \beta_1 = \frac{\sin \alpha_1}{N}.$$

Оскільки призма рефрактометра типу Пульфриха прямокутна, то кут, утворений перпендикулярами до двох граней призми, також прямий. Таким чином,

$$\sin \beta = \cos(90^\circ - \beta) = \cos \beta_1 = \frac{n}{N}.$$

Оскільки $\cos^2 \beta_1 + \sin^2 \beta_1 = 1$, то

$$\cos \beta_1 = \sqrt{1 - \sin^2 \beta_1}.$$

Якщо підставити це значення для синуса і косинуса кута β_1 (відповідно $\frac{\sin \alpha_1}{N}$ і $\frac{n}{N}$), одержуємо:

$$\frac{n}{N} = \sqrt{1 - \frac{\sin^2 \alpha_1}{N^2}}, \quad \text{або } n = \sqrt{N^2 - \sin^2 \alpha_1}.$$

Таким чином, за величиною кута α_1 можна визначити показник заломлення досліджуваної рідини. Величини показників заломлення змінних призм рефрактометра відомі і у вигляді таблиць додаються до приладу.

11.7. ПОЛЯРИМЕТРИЧНИЙ МЕТОД АНАЛІЗУ

В *поляриметричному методі* для визначення концентрації речовин використовують вимірювання кута обертання площини *поляризації* (від лат. *polos* — вісь, полюс) світла. Це явище відбувається з променем світла при його відбиванні, заломленні і, особливо, при подвійному заломленні. Воно засноване на тому, що коливальні рухи в усіх точках поляризованого променя виникають лише в одній площині, яка проходить крізь напрямок променя, тимчасом як у неполяризованому промені коливання відбуваються в усіх напрямках, перпендикулярних променю. (рис. 11.21)

Площина, яка проходить крізь лінії, які відповідають напрямку орієнтованих коливань і напрямку розповсюдження світлової хвилі, називається *площиною коливань*, а перпендикулярна їй площина — *площиною поляризації*.

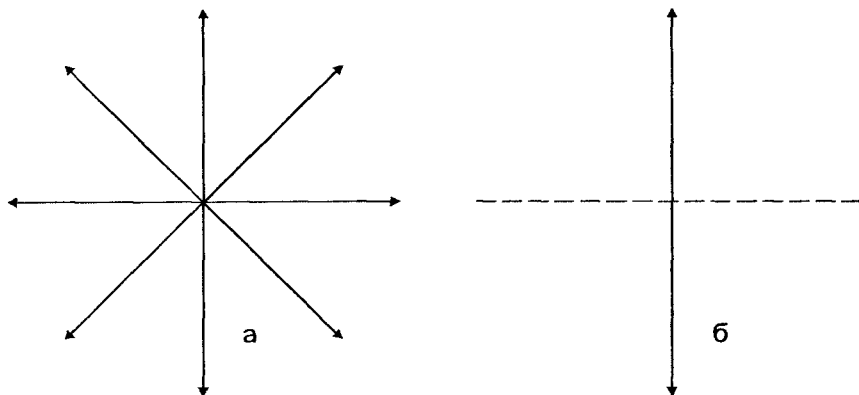


Рис. 11.21. Світлові коливання: а — в природному (неполяризованому) світлі; б — в поляризованому світлі

Оптично активними називають речовини, проходження крізь розчини яких поляризованого світла пов'язане з обертанням площини поляризації на певний кут. Поляриметричний метод аналізу заснований саме на залежності кута обертання площини поляризації від концентрації оптично активних речовин у розчині.

Речовини, оптична активність яких пов'язана з будовою їхніх молекул, зберігають цю властивість і в розчиненому вигляді (на відміну від тих речовин, в яких вона визначається будовою кристалічної ґратки). Оптично активні речовини можуть бути *правообертаючі* та *лівообертаючі*. Перші при проходженні поляризованого світла обертають площину поляризації вправо, а другі — вліво. Це явище пов'язане з асиметрією в структурі кристалічних ґраток цих речовин або з асиметрією будови їхніх молекул.

Взяті в одній концентрації розчини правообертаючих та лівообертаючих речовин в однакових умовах дають однаковий за величиною і протилежний за знаком внесок. Тому вони можуть компенсувати оптичну активність одна одної — кут обертання площини поляризації в даному випадку дорівнюватиме нулю.

Величина кута обертання площини поляризації буде тим більша, чим більше число молекул речовини зустрічається в розчині на шляху поляризованого променя. Таким чином, величина кута обертання залежить від концентрації оптично активної речовини в розчині і шляху проходження променя. Якщо цей шлях не змінюється, то кут обертання площини поляризації буде пропорційний концентрації речовини.

Природних джерел поляризованого світла не існує. Будь-яке природне джерело світла випромінює неполяризовані промені.

Одержати поляризоване світло можна, пропускаючи його крізь кристалічні речовини (ісландський шпат, турмалін та ін.) або поляроїдні плівки (поляроїди). Ці оптичні пристрої, в яких відбувається поляризація, називаються поляризаторами. Вони є анізотропними речовинами, тобто при проходженні пучка світла крізь них він розділяється на два поляризованих у взаємно перпендикулярних напрямках промені. Один з цих променів — *звичайний промінь* — лежить у тій же площині, що й первинний промінь, його показник заломлення не залежить від кута падіння променя, який вийшов з ізотропного середовища. Інший — *незвичайний промінь* — який з'являється в поляризаторі, його показник заломлення залежить від кута падіння, напрямку розповсюдження і не збігається з площиною падіння. Якщо певним чином вивести з оптичної системи звичайний промінь, то одержаний незвичайний промінь буде поляризований в одній площині.

Широко розповсюджені такі поляризатори світла, як *призми Ніколя*, або просто *ніколя*. Ці оптичні пристрої виготовляють з ісландського шпату. З кристалу шпату вирізають дві прямокутні призми і склеюють їх, як правило, канадським бальзамом (смола певних видів канадської піхти). Показник заломлення бальзаму ($n = 1,55$) має проміжне значення між показниками заломлення звичайного ($n_o = 1,658$) і незвичайного ($n_e = 1,486$) променів.

Світло, яке попадає на призму Ніколя під певним кутом, розщеплюється на першій призмі на звичайний і незвичайний промені. Звичайний промінь відбивається від шару канадського бальзаму на бічну грань призми, де й поглинається. Незвичайний промінь проходить крізь другу призму повністю поляризованим.

Деяким кристалам, крім подвійного променезаломлення, притаманний також дихроїзм (від грец. *dics* — два і *chroma* — колір), тобто властивість неоднаково поглинати промені світла в різних напрямках у результаті чого в цих напрямках з'являється різне забарвлення. Ця властивість пов'язана з вибіркоvim поглинанням звичайного і незвичайного променів. Наприклад, пластинка турмаліну (складний мінерал, який містить бор, алюмосилікати натрію, магнію тощо), вирізана з кристалу, паралельно його оптичній осі (завтовшки 1 мм), практично не проникна для звичайного променя. Таким чином, з неї, як з призми Ніколя, виходить тільки поляризований незвичайний промінь.

Широко використовується така дихроїчна органічна сполука, як герпатит (сірчаноокислий йод-хінін). Ця речовина (шаром завтовшки десять частки міліметра) наноситься на целулоїдні плівки і в такий

спосіб створює поляроїд. У певних випадках для цього використовують простіші йодовані пластмасові плівки.

При аналізі чинників, які впливають на величину кута обертання площини поляризації, слід ще раз відзначити залежність цього явища від природи досліджуваної речовини, товщини шару, крізь який проходить поляризоване світло, довжини хвилі світла, температури та ін.

Таким чином, для окремої речовини маємо:

$$\beta = \alpha \cdot l,$$

де: β — кут обертання площини поляризації; l — товщина шару розчину; α — коефіцієнт пропорційності, який залежить від природи речовини, довжини хвилі поляризованого світла, температури та ін.

Значення величини коефіцієнта α , яке розраховують на одиницю густини речовини (d), називається *питомим обертанням*.

$$\alpha_0 = \frac{\alpha}{d}.$$

$$\text{Тоді } \beta = \alpha_0 d l, \text{ або } \alpha_0 = \frac{\beta}{dl} \left(\frac{M^2}{\text{кг}} \cdot \text{радіан} \right).$$

У випадку розчинів питома обертання відносять до одиниці концентрації і товщини шару:

$$\beta = \alpha_0 c \cdot l \text{ або } \alpha_0 = \frac{\beta}{c \cdot l} \left(\frac{M^2}{\text{кг}} \cdot \text{радіан} \right),$$

де: c — концентрація оптично активної речовини ($\text{кг}/\text{м}^3$)

Питома обертання площини поляризації є мірою оптичної активності речовин. Якщо питома обертання розраховують для концентрації в $1 \text{ кмоль}/\text{м}^3$, то знайдені значення називають *молярним обертанням площини поляризації* (α_M). Між питомих і молярних обертанням площини поляризації існує таке співвідношення:

$$\alpha_M = \alpha_0 M,$$

де: M — маса речовини (кмоль).

Значення величини питомого та молярного обертання площини поляризації для ряду оптично активних речовин наведені у довідниках.

Прилади для вимірювання обертання площини поляризації називаються *поляриметрами*, вони складаються з пристрою для

одержання поляризаційного світла (поляризатора) та пристрою (аналізатора), який дозволяє визначити напрямок обертання і величину кута, на який повернута була площина поляризації при проходженні світла крізь оптично активну речовину. Поляризатором може бути призма Ніколя або пластинка поляроїда. Вони можуть бути використані і як аналізатори.

Монохроматичне світло, яке пройшло крізь призму Ніколя або поляроїд, стає поляризованим. Якщо на його шляху розмістити інший поляризатор у такому ж положенні, то його площина поляризації співпаде з площиною поляризації першого поляризатора, і світло пройде також крізь цей другий поляризатор. Коли другий поляризатор повернути на 90° навколо горизонтальної осі, то площини, в яких вони пропускають світло, стануть взаємно перпендикулярними, і світло, поляризоване першим поляризатором, не пройде через другий поляризатор. Система стане непрозорою.

Якщо між схрещеними поляризаторами поставити кювету з розчином оптично активної речовини, то після проходження світла крізь розчин площина обертання повернеться на певний кут, який співпадає з кутом обертання площини поляризації світла речовини, що досліджується.

Існує декілька типів поляриметрів. Один з них — *коловий поляриметр* (рис. 11.22), який дозволяє визначити кути обертання в межах $\pm 360^\circ$.

Промені від джерела світла (1) крізь щілину в кожусі освітлювача (2) проходять світлофільтр (3) і лінзу (4), яка дає паралельний пучок світла, і попадають на поляризатор (5). На шляху поляризованого світла знаходиться діафрагма з кварцевою пластинкою (6), котра відхиляє площину поляризованого світла на $5-7^\circ$. Обертанням аналізатора (7) домагаються ослаблення освітлення в середній частині фотометричного поля освітлення зорової трубки (8). В результаті знаходять таке положення аналізатора, при якому фотометричне поле буде рівномірно затемненим. Положення рівного затемнення фіксують за лімбом (9), коли в приладі немає трубки (кювети) з розчином (10) який досліджується, та коли вона є. Відновлення положення рівномірного затемнення фотометричного поля зору за наявності трубки з оптично активною речовиною потребує повороту аналізатора на певний кут, який дорівнює куту обертання площини поляризації досліджуваної речовини. Величина цього кута відраховується за нанесеною на лімбі шкалою.

У деяких моделях поляриметрів на шляху світлового потоку встановлюються за основним поляризатором додаткові, що дозволяє

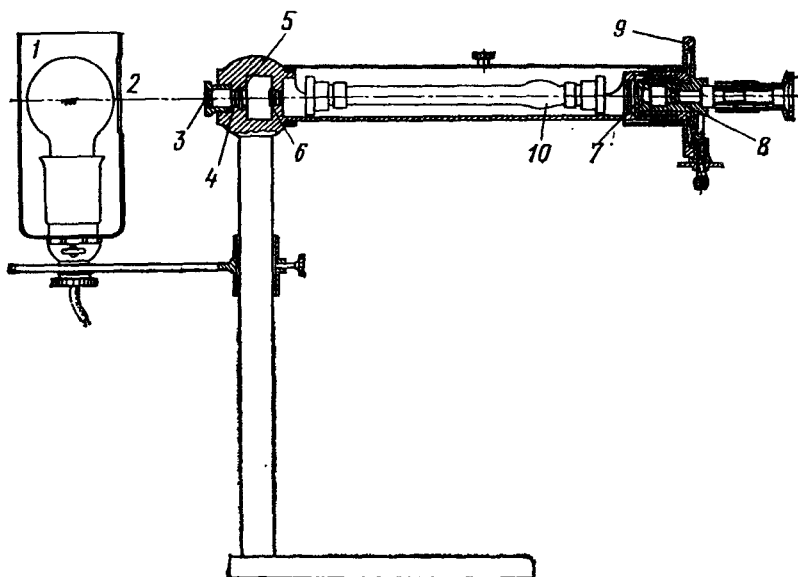


Рис. 11.22. Схема колового поляриметра:

1 — джерело світла (лампа розжарювання); 2 — щілина в кожусі освітлювача; 3 — світлофільтр; 4 — лінза-конденсор; 5 — поляризатор; 6 — діафрагма; 7 — аналізатор; 8 — зорова трубка; 9 — лімб зорового поля

спростити систему отримання фотометричного поля, яке розділене на ділянки різного ступеня затемнення.

У *клиновому поляриметрі* аналізатор закріплено нерухомо. Положення його відносно поляризатора таке, що в тому разі, коли трубка з оптично активною речовиною не розміщена в приладі, то половинки фотометричного поля затемнені однаково. Компенсаційний пристрій складається з пластинки правообертаючого кварцу і двох клинів з лівообертаючого кварцу. Один з цих клинів закріплений нерухомо, а другий обертається відносно першого. Якщо в поляриметр помістити трубку з розчином досліджуваної речовини, то площина поляризації світла повернеться на той чи інший кут вправо або вліво відповідно до властивостей речовини. Це спричинить зміну затемнення фотометричного поля. Щоб повернути фотометричному полю рівномірне затемнення, зсувають рухомий клин у потрібний бік мікрометричним гвинтом. Кут обертання площини поляризації вираховують за переміщенням рухомого клину.

11.8. СПЕКТРОМЕТРІЯ ПОЛУМ'Я

Атоми речовин, які випаровуються в полум'ї, випромінюють або поглинають світло певної довжини хвилі. За інтенсивністю смуг у спектрі можна визначити кількість окремих хімічних елементів у зразку.

З найбільшою вірогідністю хімічні елементи поглинають і випромінюють світло тих довжин хвиль, які відповідають найближче розміщеним енергетичним рівням.

Кількість світла, що випромінюється, пропорційна числу збуджених атомів, яке, у свою чергу, залежить від температури і складу полум'я. Для калібрування приладу використовують стандартні (еталонні) речовини. В певних випадках використовують внутрішній стандарт, за який беруть літій.

При визначенні вмісту металів у біологічних зразках (а це основне використання полум'яної спектрометрії в біохімії) *методом атомної емісійної спектрометрії* необхідно спочатку спалити органічні молекули. Робити це треба дуже обережно, щоб не випарувати разом з ними елементи, що досліджуються. Для цього спалювання органічних речовин проводять при відносно низьких температурах в атмосфері кисню або суміші перекису водню з концентрованою сірчаною кислотою. Як каталізатор використовують сульфат селену, а для підвищення температури кипіння додають сульфат літію.

Однією з модифікацій полум'яної спектрометрії є *атомна абсорбційна спектрометрія*, основою якої є вимірювання поглинання монохроматичного світла атомами в полум'ї. Поглинена енергія пропорційна числу атомів на шляху променя.

Блок–схема атомного емісійного полум'яного спектрофотометра наведена на рис. 11.23.

Розпилювач — це звичайний пульверизатор, в якому стиснене повітря, що проходить крізь капіляр, захоплює розчин з досліджуваною речовиною. Краплини розчину разом з повітрям попадають у полум'я пальника. Для осадження краплин великого розміру зразок попередньо пропускають крізь камеру з насиченою парю.

Як уже відзначалося, склад газової суміші, що горить, має принципове значення для визначення металів у зразку. Так, для визначення Na, K і Ca використовують суміш повітря/природний газ (температура полум'я — 1500°C), тільки Ca — повітря/пропан (2000°C), Ca, Mg, Fe — повітря/ацетилен (2500°C), Ti, V — окис азоту

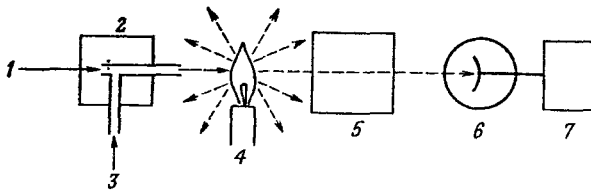


Рис 11 23. Схема будови полум'яного емісійного спектрофотометра
 1 — повітря від компресора, 2 — розпилювач, 3 — зразок; 4 — пальник; 5 —
 монохроматор або фільтр; 6 — детектор, 7 — реєструючий пристрій

/ацетилен (3000°C).

В оптичних приладах, які розкладають світло на смуги, в полум'яних спектрофотометрах застосовуються фільтри (для поточного визначення Na, K і Ca) або призми чи диференційні ґратки. Звичайно детектором служить фотоелемент, а при деяких поточних вимірюваннях одночасно декількох елементів — багатоканальні поліхроматори.

Як реєструючий пристрій використовують самописці після підсилення сигналу.

В абсорбційних атомних спектрометрах вимірювання ведеться при довжинах хвиль 190–850 нм.

Для отримання монохроматичного світла використовують, як правило, лампи розжарювання з вольфрамовою ниткою, заповнені аргоном, світло яких проходить через подвійний монохроматор. У певних дослідженнях використовують розрядні лампи, які підбирають з урахуванням специфічності елемента, який визначається.

Існують як одно-, так і двопроменеві абсорбційні атомні спектрометри. Реєструючим приладом, як правило, служить фотоелемент.

У методі флуоресцентної атомної спектрометрії світло випромінюється атомами, які перейшли у збуджений стан не внаслідок нагрівання, а в результаті поглинання світла. Цей метод має дуже велику чутливість. Зокрема, цим методом можна виявити наявність кадмію при його вмісті $2 \cdot 10^{-10}$ часток.

Полум'яні спектрофотометри дуже широко використовуються в клінічній біохімії для визначення складу крові, сечі, спинномозкової рідини, материнського молока тощо. Такі хімічні елементи, як Na, K, Ca, Mg, Cd, Zn, можна визначити безпосередньо в середовищі, а Cu, Fe, Pb, Hg — після їх виділення з біологічних рідин. Метод полум'яної спектроскопії використовується також при аналізі ґрунту і рослин, але солі металів необхідно попередньо екстрагувати. Цим методом

можна визначати вміст металів у макромолекулах, органах, клітинах і тканинах.

Для визначення Na, K, Ca використовуються, як правило, емісійні полум'яні спектрофотометри. Взагалі за допомогою цих спектрофотометрів можна визначити вміст більш як 20 хімічних елементів, котрі зустрічаються в біологічних зразках.

Абсорбційні полум'яні спектрометри більш чутливі, ніж емісійні (виняток становить лише визначення лужних металів). За допомогою цих спектрометрів можна визначити більше 20 хімічних елементів, особливо важких металів, коли їхня частка в зразку становить не менше 10^{-6} .

11.9. ЕЛЕКТРОННИЙ ПАРАМАГНІТНИЙ РЕЗОНАНС

Метод електронного парамагнітного резонансу використовується для дослідження речовин, яким притаманні парамагнітні властивості. До таких речовин належать іони перехідних металів та їхні комплекси, вільні радикали, сполуки у збудженому стані, тобто такі, атоми яких мають неспарені електрони.

Електрони мають електричний заряд і механічний момент обертання (спін) і тому поводяться як магніти, тобто їм притаманний магнітний момент. У зовнішньому магнітному полі магнітні моменти електронів можуть бути орієнтовані в напрямі поля (паралельно) або проти цього (антипаралельно). Паралельна орієнтація відповідає більш низькому енергетичному стану, ніж антипаралельна. Перехід електронів у вищий енергетичний стан супроводжується поглинанням кванта електромагнітного випромінювання. Неспареному електрону для такого резонансного (від лат. *resonans* — той, що дає відгук) переходу потрібна така кількість енергії (E):

$$E = h\nu = g\beta H,$$

де: h — постійна Планка; ν — частота електромагнітного поля; g — константа, що має назву *фактор спектроскопічного розщеплення*; β — магнітний момент електрона, або магнетон Бора; H — напруженість зовнішнього магнітного поля.

В магнітному полі з напруженістю 50–1000 мТл енергія поглинається в мікрохвильовому діапазоні, це явище отримало назву *електронний парамагнітний резонанс (ЕПР)*.

З наведеного вище рівняння видно, що частота поглинання випромінювання залежить від величини магнітного моменту (β) і

напруженості зовнішнього магнітного поля (H). Як правило, в серійних ЕПР–спектрометрах підтримують постійну частоту поля і реєструють залежність поглинання (пік ЕПР) від напруженості магнітного поля. Спектр поглинання піка ЕПР відповідає парамагнетизму зразка, а площа піка залежить від кількості неспарених електронів у зразку (рис. 11.24). Звичайно ЕПР–спектрометр калібрують: змінюють ЕПР–спектри зразка, який містить відому кількість неспарених електронів, і потім з цим піком порівнюють ЕПР–пік досліджуваного зразка.

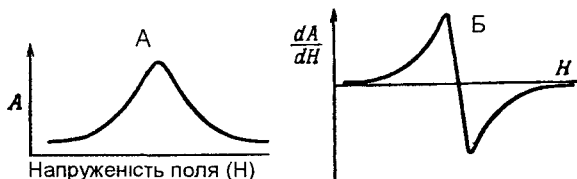


Рис. 11.24. Спектри ЕПР: А — залежність інтенсивності поглинання від напруженості магнітного поля (H); Б — залежність першої похідної поглинання (dA/dH) від напруженості магнітного поля (H)

Для делокалізованого електрона фактор спектроскопічного розщеплення $g=2,0023$. Для зв'язаних електронів цей параметр інший, і величина його зміни характеризує ступінь зв'язування електрона в молекулі.

При взаємодії неспарених електронів з іншими частинами молекули виникає так звана *спін–граткова взаємодія*, яка спричиняє розширюванню ЕПР–пиків, що теж дає інформацію про структуру молекули.

Внаслідок взаємодії неспарених електронів з магнітним полем ядер атомів, які входять до складу молекули, виникає *надтонке розщеплення ЕПР–пиків*. Воно дає інформацію про розташування атомів у молекулі.

Блок–схема ЕПР–спектрометра наведена на рис. 11.25.

У серійних ЕПР–спектрометрах використовують магніти з напруженістю поля 50–500 мТл і точністю до 10^{-6} . Як правило, використовують постійний електромагніт з напруженістю поля 330 мТл і змінюють його напруженість у межах 10–100 мТл за допомогою додаткового свіп–магніта. Джерело мікрохвильового випромінювання (квістроновий осцилятор) генерує електромагнітні хвилі в сантиметровому діапазоні частот, як правило, — 3 см (9000 МГц). Зразок повинен бути у твердому стані, тому біологічні зразки заморожують у рідкому азоті (-196°C).

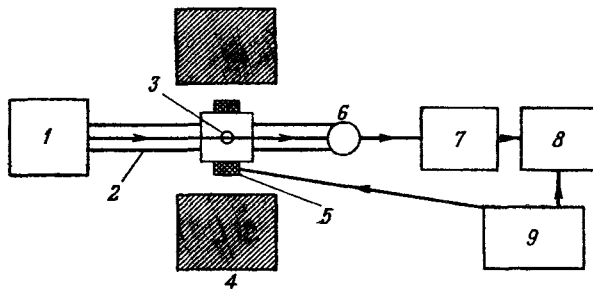


Рис. 11 25. Будова ЕПР-спектрометра

1 – клістрон (джерело мікрохвильового випромінювання); 2 – хвильовід, 3 – порожнина для зразка; 4 – основний магніт, 5 – додатковий свіп-магніт; 6 – детектор; 7 – помножувач; 8 – самописець, 9 – осцилятор

Для підвищення роздільної здатності ЕПР-спектр представляють у вигляді залежності першої похідної інтенсивності (амплітуди) поглинання (dA/dH) від напруженості поля (H) (рис. 24Б).

У біохімічних дослідженнях ЕПР-спектроскопія набула широкого застосування при вивченні металовмісних біологічних речовин. Наприклад, ксантиоксидаза містить молібден, цитохромоксидаза — мідь, яка не входить до гемів, негемові залізопротеїди — залізо. Атоми цих металів не здатні поглинати у видимій та УФ-областях. Разом з тим, в окисленому стані вони здатні поглинати мікрохвильове випромінювання, що дає характерні ЕПР-піки. Поява або зникнення цих сигналів дозволяє вивчати механізми функціонування досліджуваних сполук, їхню біологічну роль.

Значно розширилися межі використання ЕПР-спектрометрії у зв'язку з розробкою методу спінової мітки. Він базується на наступному: стабільний нереакційно здатний радикал з характерним ЕПР-спектром приєднують до молекули, яка не містить неспарених електронів, і вивчають її (наприклад, вивчають взаємодію з біологічними мембранами, транспорт через них). Використання цього методу дало можливість вивчити механізми функціонування ряду мембранозв'язаних ферментів з використанням аналогів субстратів (H^+ -АТФази мітохондрій, Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФази саркоплазматичного ретикулуму та ін.), що не гідролізуються.

11.10. ЯДЕРНИЙ МАГНІТНИЙ РЕЗОНАНС

Метод ядерного магнітного резонансу дає можливість визначати атоми, ядра яких мають магнітний момент. Як правило, це

атоми, які містять непарне число протонів.

Більшість атомних ядер мають власний механічний момент обертання J , який пропорційний величині I , що має назву *ядерний спіл*: $J = \hbar \gamma I$, де: $\hbar = h/2\pi$, а h — постійна Планка. Величина ядерного спіна I постійна для кожного ядра в основному стані. Обертальний момент J зв'язаний з *магнітним моментом* μ :

$$\mu = \gamma J = \hbar \gamma I.$$

Коефіцієнт пропорційності γ називається *гіромагнітним відношенням* і його величина постійна для кожного типу ядер.

Чим більші величини γ та I , тим більший магнітний момент ядра, а звідси, величина магнітного поля, яке створюється ядром.

Серед стабільних ізотопів ядро атома водню (^1H) має найбільше значення гіромагнітного відношення ($2,6752 \cdot 10^8 \text{ Тл}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$). Серед ядер, які становлять інтерес для біохімії і мають спіл $I = 1/2$, крім ^1H , можна назвати ядра ^{31}P , ^{13}C , ^{15}N . В той же час, такі розповсюджені ізотопи, як ^{16}O , ^{12}C , ^{32}S , мають нульовий ядерний спіл ($I = 0$), а отже, не можуть бути виявлені за допомогою ЯМР.

Слід відзначити, що магнітний момент протона приблизно в $2 \cdot 10^3$ разів менший, ніж неспареного орбітального електрона.

Магнітні моменти ядер, якщо немає зовнішнього магнітного поля, повністю розупорядковані. Якщо ж прикласти постійне магнітне поле, то елементарні магнітики ядер будуть орієнтуватися паралельно полю (спін, наприклад, дорівнює $+1/2$) або антипаралельно йому (спін дорівнює $-1/2$). Антипаралельне розміщення магнітного моменту відповідає вищому енергетичному стану ядра. Переорієнтація магнітного моменту ядра з паралельної орієнтації до антипаралельної супроводжується резонансним поглинанням електромагнітних хвиль. У зовнішньому магнітному полі напруженістю декілька сотень мілітесел (мТл) резонансне поглинання ядер відбувається в радіодіапазоні електромагнітних хвиль. Саме це явище і називається *ядерним магнітним резонансом (ЯМР)*.

Розглянемо умови виникнення ЯМР під дещо іншим кутом. Усі в дитинстві спостерігали обертання дзиги в полі тяжіння Землі. Під впливом цього поля вісь дзиги (якщо її напрямок відхилений від вертикалі) обертається навколо напрямку поля тяжіння Землі. Частота цього обертання залежить від величини поля тяжіння. Подібне спостерігається і для ядра з магнітним моментом, відмінним від 0 у ядра зі спіном I , магнітним моментом μ і гіромагнітним відношенням γ , яке розташоване в зовнішньому магнітному полі з напруженістю B_0 , вектор μ буде обертатися з кутовою частотою:

$$w_i = \gamma_i B_0 .$$

Якщо на ядерний спін і крім постійного магнітного поля B_0 діє додатково змінне магнітне поле B_1 (радіочастотне поле), перпендикулярне полю B_0 , то в системі може виникнути резонанс. Це відбудеться тоді, коли частота w цього змінного поля дорівнюватиме частоті обертання проекції магнітного моменту w_i .

Якщо ЯМР-спектроскопія проводиться для протонів (^1H), то говорять про *протонний магнітний резонанс (ПМР)*.

Частота резонансного поглинання радіохвиль в ЯМР, насамперед залежить від типу ізотопу і напруженості зовнішнього магнітного поля. Як правило, в сучасних ЯМР-спектрометрах частоту радіохвиль підтримують постійною, а змінюють напруженість магнітного поля. Тому ЯМР-спектри у цьому випадку являють собою залежність поглиненої енергії від напруженості магнітного поля.

На рис. 11.26 наведена блок-схема будови ЯМР-спектрометра.

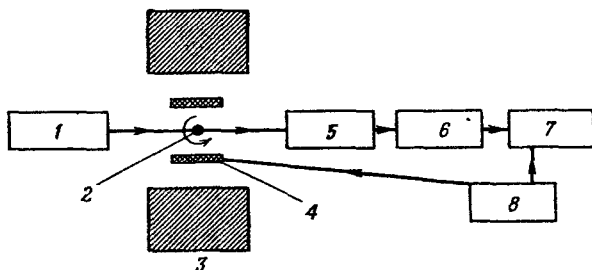


Рис. 11.26. Схема будови ЯМР-спектрометра

1 — джерело радіохвиль; 2 — зразок; 3 — основний зовнішній магніт; 4 — свіп-магніт; 5 — радіоприймач; 6 — помножувач; 7 — самописець; 8 — свіп-генератор

В сучасних ЯМР — спектрометрах постійне магнітне поле має напруженість 1–10 Тл. Для зміни в межах 10^{-2} Тл використовують додатковий свіп-електромагніт. Джерелом електромагнітних хвиль є радіочастотний генератор. Зразок розчиняють у розчинниках, які не містять протонів (наприклад, D_2O або CDCl_3). Поглинання реєструють радіоприймачем, сигнал підсилюється і записується самописцем. Для розшифрування складних спектрів ЯМР використовуються ЕОМ.

Справжня напруженість магнітного поля, в якому знаходиться ядро, залежить від його оточення і має відмінності від зовнішнього магнітного поля. Це обумовлене дією локального магнітного поля, яке створюється орбітальними електронами атома і впливом на нього сусідніх атомів.

Унаслідок цього резонанс одних і тих же ядер у різних хімічних групах спостерігається при різних частотах радіохвиль, їхні смуги зміщені одна відносно одної. Це зміщення, яке називають *хімічним зрушенням*, визначають, як правило, відносно сигналу певної стандартної сполуки. В ПМР-спектроскопії в органічних розчинниках стандартним є, як правило, сигнал тетраметилсилану — $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, а у водних розчинах — триметилсилілпропансульфонату — $(\text{CH}_3)_3\text{Si}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3-\text{Na}^+$. Шкала сучасних ЯМР-спектрометрів прокалібрована в одиницях τ (мільйонних частках робочої частоти, $1 \cdot 10^{-6}$). За цією шкалою пік $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ спостерігається при $\tau = 10$ і основні хімічні зрушення відбуваються в діапазоні значень $\tau = 0 \div 10$.

Спектри ЯМР можуть також відображати *спін-спінову взаємодію*, яка на розділених унаслідок хімічного зрушення спектрах ЯМР виявляється як *надтонке розщеплення*. Це розщеплення дає інформацію про оточення ядер.

Таким чином, при інтерпретації ЯМР-спектрів можна за величиною хімічного зрушення ідентифікувати окремі хімічні групи сполуки, а за інтенсивністю ліній спектрів визначити співвідношення цих груп. Крім того, надтонке розщеплення спектрів ЯМР дає інформацію про оточення ядер, а величина цього розщеплення дозволяє встановити просторову орієнтацію в молекулах речовини, що досліджується.

Як приклад наведемо спектр протонів у 95% етанолі (рис. 11.27)

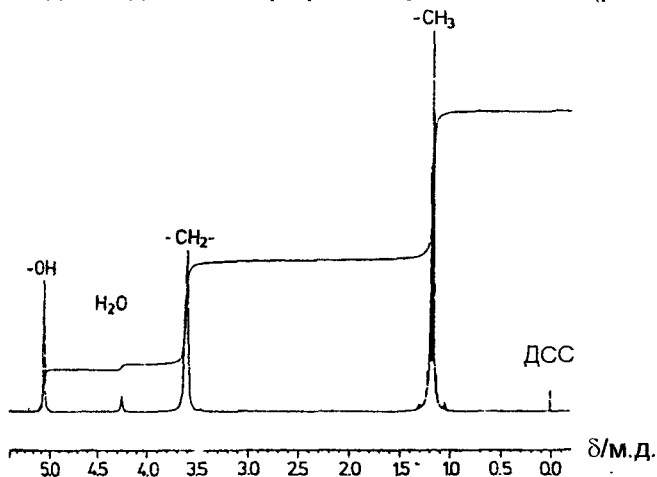


Рис. 11.27. Спектр ^1H (500 мГц) 95% етанолу. Сигнал при 0 м.д. відповідає метильній групі стандарту ДСС (2, 2-диметил-2-силапентан-5-сульфонієва кислота); δ — хімічне зрушення, яке вимірюється в м.д. — мільйонних частках робочої частоти ($1 \cdot 10^{-6}$)

Розглянемо також ПМР-спектри аденілаткінази, які характеризують конформаційні зміни в молекулі цього ферменту при утворенні зв'язку із субстратом. Для цього ферменту характерна наявність двох відмінних конформацій: відкритої форми (до утворення зв'язку з субстратом) і закритої форми (після утворення цього зв'язку).

Цим двом різним структурам відповідають різні спектри ЯМР. Дійсно (рис. 11.28), найбільші зміни в спектрах ^1H аденілатциклази відбуваються у випадку, коли фермент утворює комплекс з аналогом субстрату, що не гідролізується, за який взяли $\text{A}_{\text{p5}}\text{A}$ (два аденозинових залишки, зв'язані між собою ланцюжком з п'яти фосфатних груп):

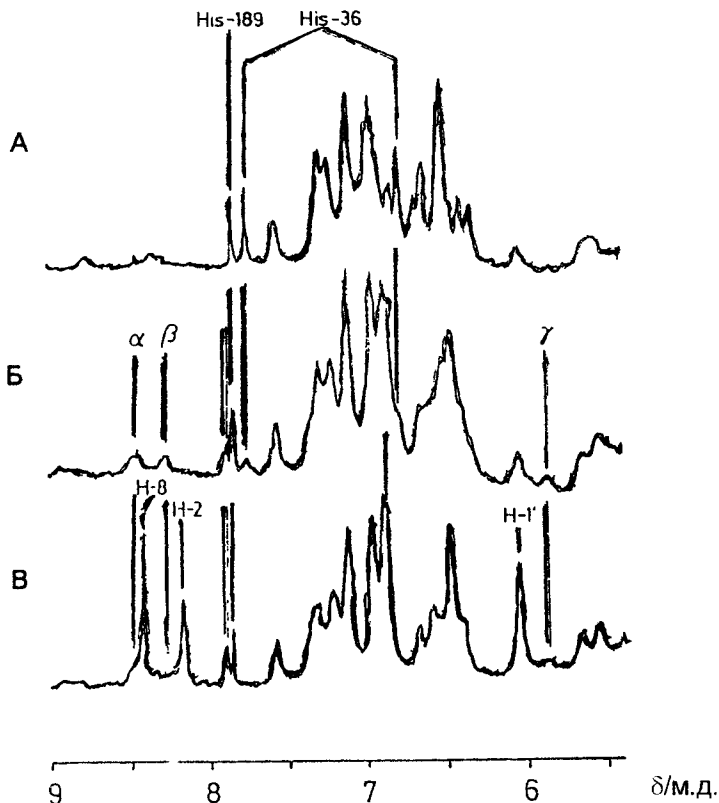


Рис. 11.28. Спектр ЯМР ^1H (360 МГц) аденілатциклази людини без субстрату (А), після додавання $\text{A}_{\text{p5}}\text{A}$ в співвідношенні 1:2 (Б) та в надлишку (В) (за К.Х.Хауссер, Х.Р.Кальбитцер, 1993)

Останнім часом метод ЯМР значно поширився у біохімічних дослідженнях. Певним обмеженням до застосування цього методу є складність дослідження високомолекулярних сполук. Так, молекули білків містять сотні і навіть тисячі протонів, резонансне поглинання яких лежить у вузькій області спектра. Сучасні серійні ЯМР–спектрометри дають можливість одержати надтонку структуру лише для молекул, молекулярна маса яких не більше $5 \cdot 10^4$ Да.

У біохімічних дослідженнях метод ЯМР є, в першу чергу, аналітичним методом, за допомогою якого встановлюють структуру сполук, одержують інформацію про просторове розташування атомів, а також про конфігурацію молекул і молекулярних комплексів. Ця інформація дає можливість визначити, наприклад, шляхи протікання біохімічних реакцій, внести суттєвий внесок у з'ясування механізмів ферментативних реакцій.

Основні напрямки використання ЯМР–спектроскопії в біохімії наведені в табл. 11.1.

Таблиця 11.1. Використання ЯМР–спектроскопії в біохімічних дослідженнях

№ п/п	Напрямок використання ЯМР–спектроскопії
ЯМР низькомолекулярних сполук	
1.	Хімічний аналіз
2.	Визначення невідомих хімічних сполук
3.	Визначення концентрацій
4.	Дослідження шляхів протікання реакцій
5.	Визначення констант зв'язування
6.	Встановлення конформаційних змін, визначення конформаційного стану субстрату в активному центрі ферменту
ЯМР високомолекулярних сполук	
1.	Конформаційні зміни молекул при дії зовнішніх факторів (температура, іонна сила, рН, тиск тощо)
2.	Конформаційні зміни при виникненні зв'язку субстрату з активним центром ферменту
3.	Структура активного центру ферменту, просторове розміщення бічних ланцюгів відносно субстрату, іонізація функціональних груп
4.	Визначення динамічних змін при локальних і глобальних конформаціях
5.	Взаємодія між молекулами: фермент-субстрат, білок-білок, білок-ліпід, ліпід-ліпід та ін.
6.	Визначення вторинної і третинної структури в розчинах

Безумовно, перелік наведених напрямків використання ЯМР–спектрометрії не обмежується наведеними в табл. 11.1. Останнім часом інтенсивно розвивається ЯМР–спектроскопія *in vivo*, в умовах, близьких до фізіологічних. Об'єктом досліджень є органели клітин, окремі клітини, цілі органи і навіть організми. В медицині почала широко використовуватися ЯМР–томографія.

Значно розширилися межі використання ЯМР в зв'язку з розробкою методу подвійного електронно–ядерного резонансу (ПЕЯР), який об'єднує ЕПР і ЯМР.

11.11. МАС–СПЕКТРОМЕТРІЯ

Мас–спектрометричний метод дозволяє одержати інформацію про структуру молекул і, таким чином, ідентифікувати речовину, що досліджується.

В основі цього методу лежить явище іонізації речовини, внаслідок чого поряд з іонами вихідної сполуки утворюються іонізовані "уламки" меншої молекулярної маси. Як правило, утворені іони мають позитивний заряд. Їх розділяють після прискорення в магнітному полі за величиною *відношення маси до заряду (m/e)*. Метод дозволяє в зразку масою 10^{-9} – 10^{-6} г виявити сполуку навіть у тому випадку, коли її частка становить 10^{-6} .

Більшість іонів, що виникають, є однозарядними, тобто молекули та їхні фрагменти втрачають по одному електрону. Такі іони розрізняються тільки за масою. В певних випадках можуть утворитися багатозарядні позитивні іони. Очевидно, що для тих з них, які мають однакову масу, відношення m/e буде в стільки разів менше, у скільки разів їхній заряд більший.

Явище іонізації речовини, що досліджується, в серійних мас–спектрометрах викликається, як правило, бомбардуванням молекул цієї речовини електронами з енергією 10^{-17} Дж (однозарядні іони утворюються при бомбардуванні молекул речовини, як правило, електронами з енергією $(1-2) \cdot 10^{-18}$ Дж). В цьому випадку молекули розпадаються на позитивно заряджені фрагменти різної маси. Спосіб, яким фрагментуються молекули досліджуваної речовини, є індивідуальною характеристикою кожної сполуки.

Іонізацію молекул речовини, яка досліджується, можна викликати не тільки шляхом бомбардування електронами. Це можна зробити, наприклад, сильним електричним полем (*польовою іонізацією*), опроміненням ультрафіолетовим світлом (*фотоіонізацією*) та ін. У певних випадках це значно підвищує чутливість мас–спектрометрич-

ного методу.

Мас–спектри являють собою великий набір піків або ліній різної висоти, розміщених відповідно до m/e іонів–"уламків", які утворюються при іонізації. Для калібрування осі абсцис за масою використовують іон, m/e якого відповідає m/e іона вихідної сполуки. Цей іон у мас–спектрі зображений піком, який відповідає найбільшій масі (основний пік).

Інтенсивність (амплітуду) піків у мас–спектрі, яка відповідає кількості відповідного іона, виражають, як правило, у відсотках до інтенсивності основного піка (вісь ординат на мас–спектрі).

При кількісному визначенні проводять відповідні перерахунки. Мас–спектри різних сполук зібрані в каталоги. Сучасні мас–спектрометри налічують у своїх каталогах $5 \cdot 10^5$ і більше сполук. Мас–спектр досліджуваної речовини, порівнюється з даними каталога за допомогою ЕОМ і таким чином встановлюється структура сполуки, яка вивчається.

Розглянемо як приклад мас–спектр CO_2 . Так, при іонізації цієї молекули утворюються іони CO_2^+ , CO^+ , O_2^+ , O^+ , C^+ . У мас–спектрі їм відповідають піки з такими значеннями m/e : 44, 28, 32, 16 і 12. У мас–спектрі є також інші піки, які відповідають природним ізотопам тих же фрагментів — наприклад, $^{13}\text{C}^+$ ($m/e = 13$) і $^{13}\text{CO}^+$ ($m/e = 45$). Амплітуда цих піків унаслідок малої кількості ізотопів, відмінних від ^{12}C , мала, а самі піки дуже вузькі (мінорні піки). Здатність мас–спектрометра розділяти два іони з маловідмінними масами m_1 і m_2 називається *роздільною здатністю*. Вона визначається за формулою:

$$P = \frac{m_1}{m_2 - m_1} .$$

Роздільна здатність залежить від конструкції мас–спектрометра і для приладів, які мають подвійне фокусування, вона досягає значення 10^5 , а для однофокусуєчих — 10^4 .

На рис. 11.29 наведена блок–схема мас–спектрометра з подвійним фокусуванням. В однофокусуєчих приладах змінюється тільки магнітне поле, а електростатичне поле залишається постійним.

Для того, щоб іони речовини, яка вивчається, не взаємодіяли з молекулами повітря і не утворювалися внаслідок цього побічні продукти, досліджування необхідно проводити у високому вакуумі (тиск не більше 10^{-5} Па).

Речовини, які легко випаровуються, вміщують у резервуар, зв'я-

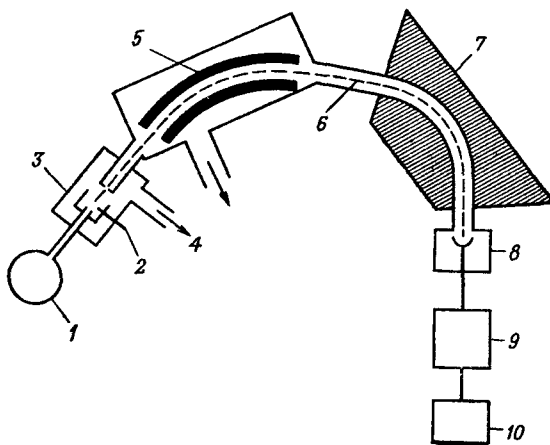


Рис. 11.29 Схема будови мас-спектрометра

1 — резервуар з парою зразка, 2 — твердий зразок, 3 — іонізаційна камера, 4 — вакуумний насос, 5 — електростатичне поле, 6 — траєкторія іонів, 7 — магніт, 8 — детектор, 9 — помножувач, 10 — самописець

заний з іонізаційною камерою. Зразки речовин, які незначно випаровуються або зовсім не випаровуються, вміщують безпосередньо в іонізаційну камеру і там їх випаровують спеціальними методами.

Розділення після іонізації іонів, що виникли, у відповідність з величинами m/e проводять наступним чином. Спочатку ці іони прискорюються електричним полем (за допомогою негативно заряджених електродів), а потім попадають у магнітне поле, де вони відхиляються від своєї першопочаткової орбіти. Для іонів з однаковим зарядом, ступінь відхилення залежить тільки від їхньої маси, причому легкі іони відхиляються найбільше.

При зміні напруженості магнітного поля і (або) прискорюючого електричного поля змінюється траєкторія іонів і, таким чином, на щілину детектора попадають іони з певним значенням m/e . Число зареєстрованих детектором іонів залежить від їхньої кількості. Якщо проводити сканування потоку іонів у поперечному його розрізі, то можна встановити весь спектр іонів.

Роздільна здатність мас-спектрометра залежить від розмірів щілин детектора — чим вони менші, тим ця здатність більше. Однак треба враховувати, що при зменшенні ширини щілини детектора знижується чутливість спектрометра, оскільки зменшується кількість іонів, які потрапляють у детектор. Тому необхідно, виходячи з поставлених завдань, вибрати оптимальні розміри щілини детектора.

Детектором мас–спектрометрів звичайно служить електронний помножувач або звичайний електрод (чашка Фарадея). Електричний струм після детектора підсилюється і реєструється самописцем. Оскільки мас–спектри містять великий набір піків, які дуже відрізняються за інтенсивністю (амплітудою), спектри реєструють з різною чутливістю (міняється в 300 і більше число разів), і це враховується в кінцевому результаті.

В біохімії, як і в фізичній хімії, мас–спектрометрія використовується здебільшого для визначення структури молекул, а отже, і для ідентифікації речовин. Структура простих іонізованих молекул визначається просто із значень їхньої маси, а структура складніших органічних сполук — з аналізу іонізованих фрагментів. Якщо знати точну молекулярну масу органічної молекули, то можна встановити її структуру за масами фрагментів, які ідентифікуються за допомогою каталога мас–спектрометра.

Одним з практичних застосувань мас–спектрометрії в біохімії є аналіз послідовності амінокислот у білках. Для підвищення здатності цих білків до випаровування їх ацетилюють або етилюють. Пептидні зв'язки відносно легко розщеплюються при бомбардуванні білків електронами, причому з С–кінця.

Для правильної інтерпретації мас–спектрів важливо, щоб речовини, які вивчаються, були чистими. В біохімічних дослідженнях мас–спектрометри, як правило, об'єднують з газорідинними хроматографами. Після розділення суміші на хроматографі і видалення газу–носія, досліджувана сполука потрапляє в мас–спектрометр.

12. ХРОМАТОГРАФІЧНІ МЕТОДИ

У практичній біохімії ніяк не можна обійтися без розділення, очищення та ідентифікації хімічних сполук. Для цього існує універсальний і ефективний фізико-хімічний метод — *хроматографія*, основний принцип якого полягає в розумінні природи фізичного, хімічного або біологічного явища, котре обумовлює розділення. Хроматографічний метод використовується для вирішення найрізноманітніших завдань, починаючи від одержання відносно великих кількостей чистих речовин (декілька грамів) і закінчуючи аналітичними прийомами, які дозволяють ідентифікувати будь-яку речовину.

Найважливішою перевагою хроматографічного методу над іншими методами є те, що при його використанні речовини, як правило, хімічно не змінюються, що особливо важливо при багатьох біохімічних дослідженнях. Крім того, хроматографічний метод придатний для розділення газоподібних та рідких речовин, сумішей речовин, близьких за хімічним складом, будовою та властивостями. Даний метод характеризується високим ступенем розділення речовин, простий у виконанні та за технічною оснащенням, доступний для будь-якої лабораторії.

На перший погляд іноді не просто зорієнтуватись в різноманітності методів хроматографії та їхніх назв, і часом важко надати переваги тому чи іншому методу або його модифікації. Зважаючи на це, нижче наводимо основні критерії та види методів хроматографії, що дозволяють скласти уявлення про їхню класифікацію (табл. 12.1).

Таблиця 12.1. Класифікація методів хроматографії за різними ознаками

№ п/п	Критерії	Види методу	Варіанти методу
1	За принципом фракціонування та фізико-хімічної взаємодії адсорбента та речовин	Адсорбційна	На колонці
			Тонкошарова
		Розподільна (адсорбційна)	Газорідинна
			На папері
			В тонкому шарі
			Гель-проникаюча (молекулярно-ситова)
		Іонообмінна	На колонці
			На папері
		Проникаюча	Гель-фільтрація
			Гель-фільтрація в тонкому шарі
Афінна	На колонці		

№ п/п	Критерії	Види методу	Варіанти методу
2	За природою та розташуванням нерухомої фази	На папері На колонці На плівці В тонкому шарі В товстому шарі	
3	В залежності від агрегатного стану фаз	Рідинна Газова Газорідинна	
4	За способом елюції	Проявна (елюентна) Фронтальна Витискувальна	На колонці На колонці На колонці
5	За апаратним оформленням або розміщенням	На колонці	
		Площинна	На папері В тонкому шарі
6	За напрямком руху елюента	Низхідна Висхідна	

Будь-яка хроматографічна система базується на розподілі компонентів між двома фазами, з яких одна нерухома (стаціонарна) з великою поверхнею, а друга переміщується відносно першої (рухома). Як нерухома фаза використовується тверда речовина або рідина, що наноситься на твердий носій. Компоненти, що розділяються, разом з рухомою фазою (рідиною або газом), проходять крізь нерухому. Розділення речовин пов'язане з сорбційно-десорбційним процесами і можливе тільки у випадку, якщо стаціонарна фаза — сорбент (поглинач — тіло або рідина, які застосовуються для поглинання будь-яких речовин з розчинів або газів) — характеризується різною сорбційною здатністю щодо кожної з речовин, що розділяються. При цьому під сорбцією розуміють будь-який процес, пов'язаний з накопиченням того чи іншого компонента в нерухомій фазі або на межі розділу фаз.

Загалом речовини в суміші можуть розділитися за рахунок встановлення:

— рівноважного розподілу між нерухомою рідкою і рухомою рідкою фазами (протиточне розподілення та паперова хроматографія) або між нерухомою рідкою і рухомою газовою фазами (газорідинна

хроматографія);

— адсорбційної рівноваги між нерухомою твердою і рухомою рідкою фазами (адсорбційна хроматографія);

— іонообмінної рівноваги між іонообмінною смолою (нерухома фаза) та електролітом (рухомою фазою) (іонообмінна хроматографія);

— рівноважного зв'язування біомакромолекули з малою молекулою (лігандом) відносно якої вона виявляє специфічну спорідненість (афінна хроматографія);

— рівноваги між рідкою фазою на внутрішній та зовнішній поверхні пористої структури (гель) (молекулярна–ситова, або проникаюча, хроматографія).

12.1. АДСОРБЦІЙНА ХРОМАТОГРАФІЯ

У методі адсорбційної хроматографії використовується різниця в ступені адсорбції певних речовин адсорбентом та розчинності їх у відповідному розчиннику. В загальноприйнятому розумінні *адсорбент* — це тверда речовина, яка здатна утримувати на своїй поверхні молекули, тобто здатна до *адсорбції* — вбирання речовин з розчину поверхневим шаром твердого тіла. Але адсорбційна здатність властива не тільки твердому тілу, але й будь-якій поверхні розділення двох фаз. Зауважимо побіжно, що явище адсорбції має місце при хроматографії на папері, гель–проникаючий та тонкошаровій хроматографії.

При адсорбції взаємне притягування молекул адсорбенту і речовини, що адсорбується, не є електростатичним, а відбувається за рахунок утворення водневих зв'язків, сил Ван дер Ваальса та неполярних взаємодій. Пов'язане це з тим, що на поверхні адсорбенту міститься безліч різноманітних центрів зв'язування (наприклад, ділянки, збагачені електронами (негативно заряджені), бідні на електрони (позитивно заряджені), неполярні тощо). Подібні центри зв'язування здатні фіксувати молекули розчинених речовин, причому кожна активна ділянка здатна взаємодіяти тільки з однією молекулою адсорбційної речовини. Після утворення мономолекулярного шару на поверхні адсорбенту, швидкість адсорбції буде пропорційною концентрації речовини і частки незайнятих активних ділянок. За умови оборотності зв'язування, ця залежність описується *ізотермами адсорбції* і може бути трьох типів — опуклою (L–ізотерма), ввігнутою (S–ізотерма) та лінійною (C–ізотерма) (рис. 12.1). Ізотерму адсорбції можна вважати лінійною тільки в разі незначного завантаження колонки або шару, що відповідає першочерговому



Рис 12 1 Типи ізотерм адсорбції

зв'язуванню центрами, які мають більшу спорідненість, а додаткові кількості розчиненої речовини при цьому зв'язуються менш міцно.

Таким чином, з одного боку, швидкість руху речовини, що аналізується, залежить від міцності зв'язування (чим міцніше зв'язування, тим повільніше рухається речовина), а з другого боку, кількість зв'язаної речовини не постійна, а зменшується зі зменшенням концентрації.

Звідси випливає, що молекули можна розділити тільки тоді, коли для них характерні неоднакові ізотерми адсорбції, оскільки в цьому випадку в них буде різний ступінь зв'язування. Ізотерма зв'язування характерна для конкретної молекули і адсорбенту.

В адсорбційній хроматографії як адсорбенти використовуються і полярні речовини (оксиди алюмінію, магнію, заліза (III), кальцію, сульфат та карбонат магнію, гідроксид кальцію, вуглеводи та ін.), і неполярні (активоване вугілля, деякі смоли). На полярних адсорбентах енергія адсорбції тим більша, чим більша полярність або ненасиченість речовини, що адсорбується, а на неполярних адсорбентах енергія адсорбції зростає зі збільшенням розмірів молекули речовини, що адсорбується. Відповідно до енергії адсорбції й одержують окремі фракції з колонки.

В адсорбційній хроматографії використовується ряд адсорбентів (табл. 12.2), але для хроматографічного розділення нейтральних і

Таблиця 12 2 Адсорбенти, які найчастіше використовуються в адсорбційній хроматографії

Носій	Застосування
Оксид алюмінію	Білки, ліпиди, низькомолекулярні сполуки
Силікагель	Амінокислоти, нітро- та нітрозосполуки, стерни, вуглеводи, вищі жирні кислоти
Активоване вугілля (деревне, кісткове, лігнінове, кам'яне та ін.)	Амінокислоти, вуглеводи, пептиди
Силкат магнію	Нейтральні ліпиди
Гідроксиалатит	Білки, полінуклеотиди, нуклеїнові кислоти

лужних розчинів найчастіше беруть активований оксид алюмінію, а для розділення кислих розчинів — силікагель.

Слід брати до уваги, що чим вища полярність аналізованої речовини, тим більша міцність зв'язування її з полярним адсорбентом. Тому зразок полярних речовин, що аналізуються, краще вносити в малополярний розчинник, а промивати — розчинником з високою полярністю.

В адсорбційній хроматографії важливе значення має правильний підбір розчинника, який тісно пов'язаний як з природою адсорбенту, так і з властивостями компонентів аналізованої суміші. Як правило, обирають розчинник, який добре розчиняє всі компоненти аналізованої суміші, мінімально адсорбується на адсорбенті і не вступає в хімічні реакції з речовиною, що аналізується, та з адсорбентом.

Методом адсорбційної хроматографії макро- та напівмікрокількості речовин розділяють в основному на колонках, рідше — в тонкому шарі.

Хроматографія на колонці. Колонка для адсорбційної хроматографії являє собою скляну трубку з відтягнутим нижнім кінцем або бюретку, завдовжки 25–30 см та діаметром 8–12 мм. Колонка заповнюється просіяним дрібним сухим порошком адсорбенту або його суспензією в тому розчиннику, який буде використаний для хроматографування. Після заповнення колонки розчинником на нерухому фазу наноситься невеликий об'єм зразка з таким розрахунком, щоб він пройшов у верхній шар (завантаження колонки). Якщо швидкість проходження розчинника недостатня, то створюють розрідження знизу або, навпаки, у верхню частину колонки подають стиснене повітря.

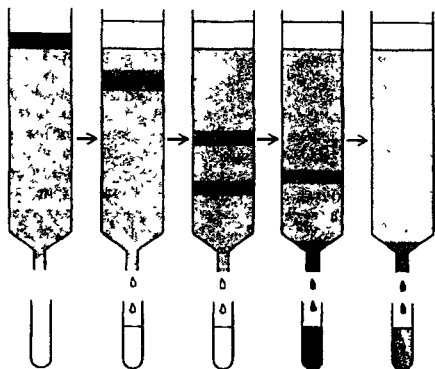


Рис 12.2 Схематичне зображення, розділення речовин методом хроматографії на колонці

При проходженні крізь колонку розчинника (рухомої фази) хроматограма проявляється (елювання колонки), тобто відбувається розділення (рис. 12.2). Рідина, яка виходить з колонки (елюат) звичайно збирається у вигляді окремих фракцій за допомогою автоматичного колектора фракцій (рис. 12.3). Потім шляхом спектральних вимірювань, хімічних тестів, вимірювань

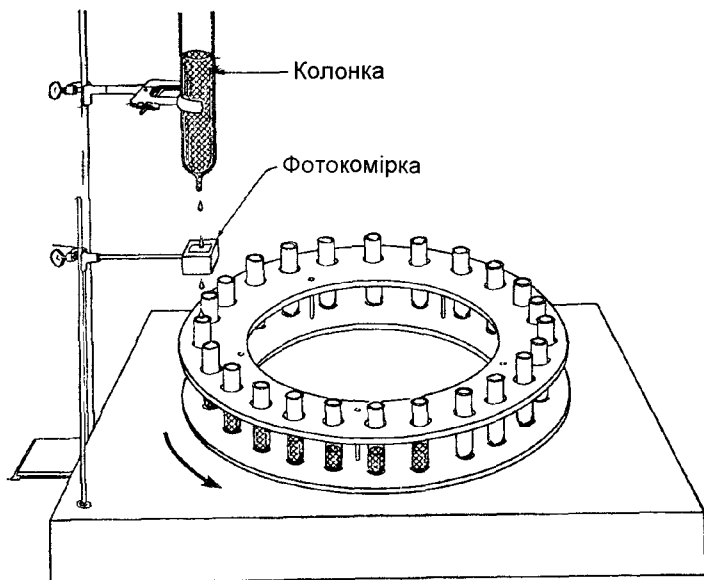


Рис. 12.3 Колектор фракцій

радіоактивності тощо. розділені компоненти визначаються в аліквотах, які відбираються з кожної фракції. Для вимірювань поглинання світла застосовується автоматичний самописний спектрофотометр безперервної дії.

При адсорбційному хроматографуванні на колонці елюювання може здійснюватися трьома способами:

— розділення речовин з використанням постійно тільки одного розчинника;

— *ступінчасте*, або *періодичне*, елюювання, коли хроматографічна колонка спочатку промивається певною кількістю одного розчинника, а потім використовується інший розчинник, що дозволяє створити умови, за яких можна одержувати конкретні компоненти малих об'ємів елюату;

— *градієнтне елюювання*, при якому змінюється співвідношення між двома розчинниками або збільшуються концентрації одного чи більше компонентів у розчиннику. Градієнти одержуються за допомогою пристрою, схема якого зображена на рис. 12.4. Пристрій складається з двох ємкостей — резервуара і камери для змішування, з'єднаних між собою. Остання сполучена з колонкою і містить вихідну концентрацію розчинника, а резервуар — більш концентрований

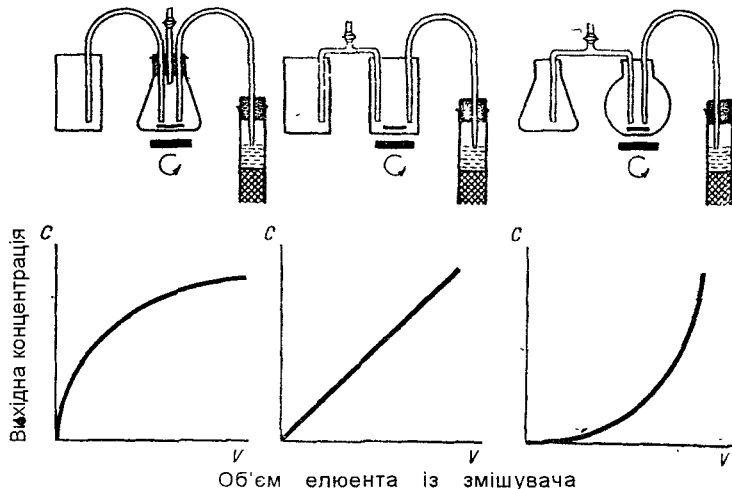


Рис. 12.4. Пристрої для одержання градієнта та типи градієнтів

розчинник. За рівних об'ємів резервуара і камери для змішування створюється лінійний градієнт, а якщо форма камери для змішування змінюється, то можна одержати випуклий або ввігнутий градієнт.

Тонкошарова хроматографія.

Хроматографія в тонкому шарі — це, насправді, адсорбційна хроматографія, хоча залежно від умов експерименту і завдань розділення вона може бути розподільною, іонообмінною або молекулярно-ситовою.

Порівняно з хроматографією на колонці або на папері тонкошарова хроматографія має набагато вищу розділювальну здатність і швидкість розділення, більшу точність, відзначається зручністю і простотою виконання. Цим методом можна досліджувати практично всі органічні сполуки і виявляти незначні їх кількості (від 0,1 до 0,005 мкг, або до 1 нмоля). Такі переваги обумовлені в основному двома факторами: по-перше, якщо частки сорбенту будуть дуже дрібні (менше 0,1 мм), значно збільшиться співвідношення поверхня/об'єм, а отже, збільшиться й активна поверхня, по-друге, має місце надзвичайно високе співвідношення маси розчинених речовин і маси сорбенту — $1:10^3-1:10^4$.

У тонкошаровій хроматографії нерухомою фазою служить тонкий шар сорбенту (0,25–0,5 мм), котрий рівномірно наноситься на поверхню скляної, чи пластмасової пластинки або металевої (алюмінієвої)

фольги. Найчастіше використовується будь-який матеріал; його необхідно дуже подрібнити і одержати однорідний його шар. Це можуть бути неорганічні речовини (оксиди алюмінію, магнію та кальцію, силікагель, силікат магнію), а також органічні речовини (целюлоза, ДЕАЕ—целюлоза, поліаміди, порошок поліетилену). Адсорбент спеціальним аплікатором, вальцем або скляним стрижнем наноситься на пластинку у вигляді кашоподібної суспензії в специфічному для нього розчиннику. Іноді для кращої фіксації адсорбенту на пластинці застосовуються зв'язуючі речовини в певній пропорції (крохмаль, гіпс, колодій, розчин ацетилцелюлози в ацетоні тощо).

Нині для тонкошарової хроматографії все частіше використовуються готові пластинки на основі алюмінієвої фольги — фіксіон та силуфол. Бувають фіксіони, що містять катіонообмінні шари в натрієвій формі та аніонообмінні шари в ацетатній формі. Із силуфольних пластинок найпоширенішою є пластинка на основі силуфолу УФ₂₅₄, покритою закріпленим шаром адсорбенту (широкопористий силікагель) з люмінесцентним індикатором для УФ₂₅₄ (люмінофор).

Після термічного підсушування і наступного нанесення зразка речовин та їхніх сумішей край пластинки нижче стартової лінії занурюють у герметично закриту скляну камеру з розчинником. Розчинниками можуть бути бензол, дихлоретан, циклогексан, бензол—ацетон, хлороформ—бутанол тощо. Рухаючись по шару адсорбенту за рахунок капілярних сил, розчинник переміщує з різними швидкостями компоненти аналізованої суміші. Коли розчинник дійде майже до краю пластинки, фіксується фронт розчинника.

Положення плям речовин, які розділяються, на хроматограмі визначається за забарвленням, флуоресценцією, поглинанням ультрафіолетовим світлом, а також за обприскуванням різними реагентами (нінгідрином, родаміном В, хлоридом сурми, перманганатом калію у сірчаній кислоті, ганусовим (анісовим) альдегідом у сірчаній кислоті, парою бромю тощо), котрі реагують з певними сполуками в плямі з утворенням зафарбованих продуктів; дія таких барвників здебільшого базується на специфічних кількісних кольорових реакціях. Якщо хроматографуються радіоактивні речовини, то можна одержати авторадіограми пластинок, а місцезнаходження компонентів визначити за темними плямами на рентгенівській плівці; іноді пластинки з радіоактивною речовиною розраховуються на лічильниках за допомогою спеціальних скануючих приладів.

Положення плям характеризується значенням R_f — відстанню від точки старту до середини плями, поділеній на загальну відстань, яку пройшов розчинник від лінії старту:

$$R_f = \frac{\text{відстань, яку пройшла речовина}}{\text{відстань, яку пройшов розчинник}}$$

Відношення R_f є індивідуальною характеристикою кожної речовини в даній системі за даних умов, але залежить від температури, якості сорбенту, складу елюенту. Тому хроматографування проводиться разом з відомими сполуками (стандартами, тобто чистими речовинами, вміст яких передбачається в досліджуваному розчині). В цьому випадку положення компонентів суміші, яку розділяють на хроматограмі, визначають, порівнюючи його з положенням речовин-свідків:

$$R_x = \frac{\text{відстань, яку пройшла речовина}}{\text{відстань, яку пройшла стандартна речовина X}}$$

При подібних розрахунках величина R_f за визначенням завжди менша одиниці, а значення R_x може бути більше одиниці.

Якщо виникає необхідність добути розділені компоненти, проводиться елюювання, яке здійснюється шляхом зскрібання сорбенту з наступним промиванням одержаного порошку відповідним розчинником

Для очищення досліджуваної речовини від домішок, а також для підвищення ефективності розділення застосовується *двоірвна (двократна) хроматографія*. Для цього зразок спочатку розділяється в одному напрямку, а потім хроматографія проводиться в іншій системі розчинників у напрямку, який перпендикулярний початковому.

Тонкошарова хроматографія має не тільки аналізуючий характер, а й дозволяє одночасно розділити значно більшу кількість матеріалу. Це так звана *препаративна тонкошарова хроматографія*. Суть цього варіанта методу полягає в тому, що пластинки покривають товстим шаром адсорбенту (до 5 мм), а матеріал, що розділяється, наносять не плямою, а у вигляді смуги вздовж одного з боків пластинки. Внаслідок цього на хроматограмі компоненти розподілюються також у вигляді окремих смуг.

При проведенні тонкошарової хроматографії іноді виникають труднощі, пов'язані з тим, що деякі складні суміші речовин не вдається ефективно розділити при використанні звичайних адсорбентів. У цьому разі застосовується метод *аргентації* (сріблення) в *тонкому шарі*. Суть методу полягає в тому, що до суспензії адсорбенту додається азотнокисле срібло, яке потім, у міру висихання пластинок, просочує адсорбент. Метод аргентації може бути особливо придатним для розділення речовин, які відрізняються між собою кількістю та розташуванням зв'язків. До таких речовин належать головним чином ліпіди.

12.2. РОЗПОДІЛЬНА ХРОМАТОГРАФІЯ

При розподільній хроматографії створюється система, яка містить два фізично різних компоненти ? рухому (розчинник або проявник) та нерухому (стаціонарну) фази. Розділення речовин за типом молекул відбувається саме за рахунок різниці в розподіленні між цими двома фазами. До того ж відносна рухомість кожної молекули залежить від співвідношення між рухомою силою, якою в цій системі є рух рухомої фази, і силами стримування, до яких насамперед слід віднести розподілення та адсорбцію.

Подібний принцип у розподільній хроматографії базується на тому, що якщо дві фази знаходяться в контакті одна з одною, і одна з них або обидві містять розчинену речовину (компоненти суміші, що розділяється), то ця розчинена речовина розподілятиметься між двома фазами. Цей процес має назву *розподілення* і кількісно виражається як *коефіцієнт розподілення*, котрий являє собою відношення концентрації розчиненої речовини в кожній з двох фаз.

Хроматографія на папері. Метод розподільної паперової хроматографії відзначається не тільки простотою техніки виконання, але є й надзвичайно чутливим і дозволяє одночасно визначати велику кількість різних сполук, які містяться в складній суміші.

Як інертний носій використовується спеціальний хроматографічний папір, який здатний утримувати в порах велику кількість нерухомої рідкої фази і не спроможний адсорбувати речовини, що аналізуються. Стаціонарною фазою служить вода (іноді буферні розчини), адсорбована або з'єднана на поверхні паперу; рухомою — звичайно органічний розчинник (бутанол, фенол, ацетон), котрий містить деяку кількість води (іноді до насичення). У більшості випадків використовується не один розчинник, а певна система розчинників. Наприклад, при хроматографуванні на папері моно- та дисахаридів застосовується система розчинників *n*-бутанол/піридин/вода (50 : 28 : 22), а для розділення амінокислот — *n*-бутанол/оцтова кислота/вода (40 : 10 : 50) тощо.

Швидкість руху розчинених речовин у рухомій фазі різна і залежить від адсорбційних властивостей хроматографічного паперу, природи розчинника, молекулярної природи речовин. У кількісному вираженні цей процес залежить від відношення між розчинністю компонента розділюючої суміші в органічному розчиннику та розчинністю у воді. Це означає, що чим більше розчинність компонента в ор-

ганічному розчиннику, тим швидше (ближче до фронту розчинника) він буде переміщуватися, або чим більша його розчинність у воді, тим більше він буде утримуватися вологою, яка міститься в папері, і тим повільніше буде рухатися.

Подібні ствердження можна пояснити в такий спосіб. Нанесені на папір компоненти, що аналізуються, переходять у рухому фазу і внаслідок капілярності паперу переміщуються з різними швидкостями відповідно до коефіцієнта розподілення кожного з них (рис. 12.5). На початку хроматографування деяка частина речовини з паперу переходить у рухому фазу. Коли органічний розчинник досягне ділянки паперу, яка не містить розчинену речовину, знову відбувається перерозподіл — з органічної фази речовина переходить у водяну, фіксовану на папері. Внаслідок цього відбувається концентрування кожного компонента на певній ділянці паперу, або утворення відповідної зони окремого компонента на хроматограмі.

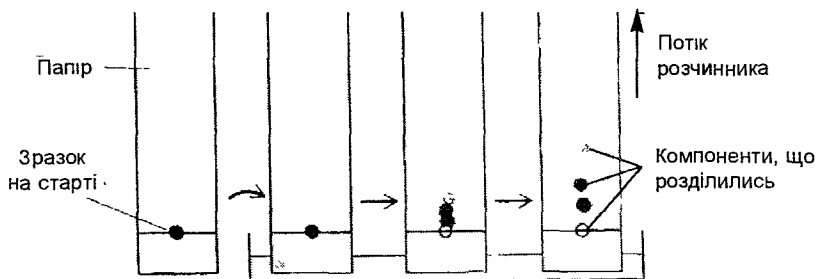


Рис. 12.5. Схематичне зображення розділення речовин методом хроматографії на папері

Для розділення методом розподільної хроматографії на папері використовується різниця в коефіцієнтах розподілення компонентів суміші, що розподіляється, між двома розчинами (фазами), які не змішуються. Переміщення зони компонента, що хроматографується, визначається за величиною коефіцієнта R_f :

$$R_f = \frac{\text{відстань, яку пройшов компонент}}{\text{відстань, яку пройшов фронт розчинника}}$$

Величина R_f залежить від багатьох факторів: типу хроматографічного паперу, природи компонента, складу рухомої фази, умов експерименту тощо. Однак при сталих усіх параметрах хроматографування, значення R_f визначається тільки індивідуальними властивостями кожного компонента.

За способом аналізу хроматографія на папері поділяється на одномірну (висхідна і низхідна), двомірну та радіальну (кругова). В *низхідній хроматографії* розділення речовин здійснюється рухом розчинника вниз по паперу, а при *висхідній* — розчинник у хроматографічній камері піднімається знизу вгору (рис. 12.6). При висхідній хроматографії розчинник піднімається проти сил тяжіння іноді на обмежену висоту, що може виявитись недостатнім для розділення речовин. Тому частіше застосовується низхідна хро-

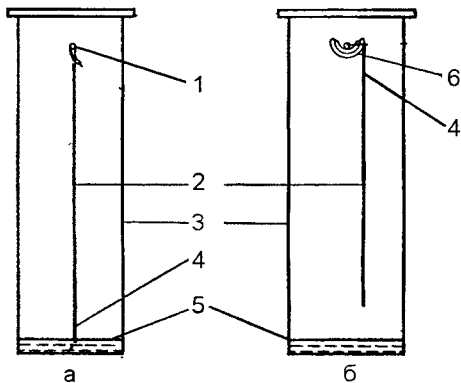


Рис. 12.6. Висхідна (а) і низхідна (б) хроматографія на папері:

- 1 – тримач, 2 – папір, 3 – скляна камера,
- 4 – місце нанесення проби, 5 – розчинник,
- 6 – лоток з розчинником

маграфія. Цей метод полягає в тому, що після проведення хроматографії в одному напрямку папір висушується і потім вдруге хроматографується під прямим кутом до напрямку початкового руху розчинника з використанням іншого розчинника. Внаслідок цього, речовини, які були частково розділені після одномірного хроматографування, остаточно розділяються в другому розчиннику і мають відмінні від першого характеристики (речовини мають різні R_f у різних розчинниках).

Іноді хроматографія на папері в одному напрямку комбінується (поєднується) з електрофорезом у напрямку, перпендикулярному першому.

Для швидшого розділення речовин застосовується *радіальна, або кругова, хроматографія*. В цьому виді паперової хроматографії суміш, що аналізується, наносять в центр круглого аркуша фільтрувального паперу, вирізують тонку смужку за радіусом і

занурюють її в розчинник. При цьому смужка править за гніт, по якому надходить розчинник.

Плями на паперових хроматограмах виявляють різними способами — за кольором, флуоресценцією, за допомогою специфічних реакцій, які відбуваються після обприскування паперу спеціальними реагентами, а також за радіоактивністю на рентгенівській плівці або на лічильниках скануючих приладів.

Ідентифікують плями шляхом порівняння їх зі зразками з відомими значеннями R_f або після елюювання. Елюювання звичайно проходить кількісно і зводиться до вирізування з паперу зон, які містять плями, з наступним промиванням його відповідним розчинником. Однак треба зауважити, що використання хроматографії на папері з препаративною метою дуже обмежене.

Розподільна хроматографія на папері дає можливість очищати речовини від домішок, розділяти складні суміші, концентрувати та ідентифікувати речовини. Зокрема, цей метод має широкі можливості для розділення азотистих основ, нуклеїнових кислот, амінокислот та пептидів, вуглеводів, гормонів, для розділення й очищення антибіотиків тощо.

Розподільна хроматографія на колонці. У даному виді розподільної хроматографії колонкою служить трубка, заповнена носієм (матриця) та розчинником (проявник). Як правило, стаціонарною фазою є вода, а носієм — крохмаль, целюлоза, кремнієва кислота та інші речовини, здатні міцно утримувати нерухому фазу, легко пропускати рухому рідку фазу і не спричиняти адсорбції речовин, каталітичної дії на компоненти суміші та інші побічні явища. Одним з таких носіїв, що майже повністю відповідає вищезгаданим вимогам і широко використовується в методах хроматографування, є силікагель. Зауважимо побіжно, що успішність розділення залежить від ступеня гідратованості носія. І саме силікагель є одним з небагатьох носіїв, здатних вбирати без намокання значну кількість води.

Підготовка колонки (заповнення, завантаження тощо) та інші технічні прийоми є звичайними. В процесі розділення речовини з різними коефіцієнтами розподілення рухаються по колонці з різними швидкостями, і тому елюювання їх здійснюється в різний час.

12.3. ГАЗОВА ХРОМАТОГРАФІЯ

Взагалі газова хроматографія — це метод розділення летких сполук, який базується на розподіленні речовин між двома фазами (рухомою та нерухомою). Якщо нерухома фаза повинна бути тільки твердою або рідкою, то рухома фаза може бути й газоподібною. Відповідно до цього існує дві системи: газова хроматографія на твердій основі (газоадсорбційна хроматографія) і газорідинна хроматографія.

У випадку *газоадсорбційної хроматографії* розділення визначається адсорбційними властивостями наповнювача колонки (силікагель, активоване вугілля) відносно до компонентів, що розділяються.

Для *газорідинної хроматографії* рухомою фазою служить газ, а нерухомою — рідка фаза і розділення базується на різній спорідненості речовин до рідини на колонці. Метод газорідинної хроматографії характеризується дуже високою ефективністю та швидким виконанням аналізу (до 1 хв). Він може бути використаний для якісної та кількісної характеристики будь-яких органічних речовин, здатних випаровуватися без зміни структури. Але деякі сполуки, завдяки особливій природі їхніх хімічних груп, не можуть бути використані для розділення методом газорідинної хроматографії. Це пов'язане з тим, що вони значно довше утримуються на колонці. В цих випадках вдаються до попередньої хімічної модифікації подібних речовин шляхом їх окислення, силінізації, алкілювання, ацилювання тощо з метою підвищення леткості, а отже, й ефективності коефіцієнта розподілення. Наприклад, жирні кислоти перетворюють у метилові ефіри, амінокислоти піддають ацетилюванню по аміногрупах або силінізації (приєднання атомів кремнію) по карбоксильних групах, вуглеводи в такий спосіб також силінізуються.

Для газорідинної хроматографії використовується скляна або металева трубка (капіляр) з внутрішнім діаметром 0,02–0,5 см і довжиною 1–10 м і більше, яка щільно наповнюється рівномірно подрібненим (гранульованим) твердим носієм (сорбентом). Головною вимогою до будь-якого неорганічного сорбенту в цьому методі є забезпечення великої однорідної та інертної поверхні для розподілення рідкої фази. Зважаючи на це, як твердий носій можуть бути використані діатомітова земля (целіт) або вогнетривка цегла, які просочуються (нашаровуються) нелеткими рідинами (нерухома фаза) в концентрації від 1 до 25% (залежно від умов досліду). Це робиться для того, щоб виключити можливість взаємодії твердого

носія з аналізованою речовиною, і в такий спосіб поліпшити розділення останньої. З цієї метою також застосовуються органічні речовини з високою температурою кипіння — мастильні чи силіконові масла або полієфіри високомолекулярних спиртів та двохосновних кислот. Вибір тієї чи іншої органічної сполуки залежить, насамперед, від природи суміші, що аналізується, її розчинності, коефіцієнта розподілу тощо. Взагалі різні органічні речовини, які застосовуються в газорідинній хроматографії як нерухома фаза, поділяють на: *вибіркові* (якщо розділення базується на різниці в хімічних властивостях компонентів, що розділяються) і *невибіркові* (якщо розділення базується на різниці в температурах кипіння компонентів). Слід мати на увазі, що селективність й універсальність газорідинної хроматографії пов'язані з можливістю широкого вибору саме рідких фаз.

При аналізі введена у верхню частину колонки суміш летких речовин, що аналізуються, швидко там випаровується (без розпаду) завдяки тому, що під час хроматографування по всій довжині колонки за допомогою термостата підтримується висока температура — 170–225°C (рис. 12.7). При цьому пара речовин захоплюється рівномірним потоком інертного газу (рухома фаза) — гелію, водню, аргону або азоту — і між рухомою та нерухомою фазами встановлюється

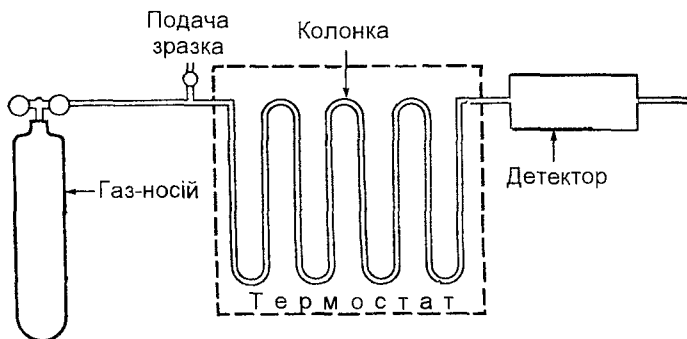


Рис. 12.7. Схема будови газового хроматографа

рівновага. Використання саме інертних газів обумовлене необхідністю виключення можливості їхньої взаємодії зі зразком або рідкою фазою та забезпечення необхідних дифузійних характеристик речовин, що аналізуються.

Компоненти суміші, у вигляді півки рухаються по колонці з різною швидкістю, залежно від коефіцієнтів розподілення між нелеткою рідиною (нерухома фаза) та газом (рухома фаза):

$$K = \frac{\text{концентрація речовини, що аналізується, в рідкій фазі}}{\text{концентрація речовини, що аналізується, в газовій фазі}}$$

Величина K значно зростає, якщо більша частина речовин, що аналізується, затримується рідкою фазою.

Швидкість переміщення компонентів досліджуваної суміші вздовж колонки буде тим більшою, чим важче розчиняється газова фаза в рідкій; елюювання міцно зв'язаних речовин полегшується з підвищенням температури.

Час, за який за стандартних умов досліду (температура, тиск, швидкість потоку тощо) зразок, що аналізується, проходить крізь колонку, має назву *час утримування*; він є характерним для кожної окремої речовини. Величину часу утримування можна використовувати для ідентифікації піків.

Наявність речовин, що розділяються, в потоці газу, який виходить з колонки, визначається фізичними або хімічними засобами. Сучасні хроматографічні системи для газорідної хроматографії обладнані *детекторами*, котрі реагують на появу речовин, що розділяються, в потоці газу, і за допомогою самописця ці речовини автоматично реєструються на діаграмній стрічці у вигляді серії піків. Нині застосовуються три типи детекторів:

— *термоіонні детектори* — прилади, в котрих як чутливий елемент використовується вольфрамовий дріт, що нагрівається від джерела постійного струму. Принцип дії термоіонних детекторів полягає в тому, що електричний опір дроту залежить від температури і за умови постійної швидкості потоку газу, нагрітий дріт охолоджується до температури, яка визначається цим потоком, теплопровідністю газу, а значить — і опором. Термоіонні детектори особливо чутливість (біля 10 мкг) виявляють до фосфорорганічних сполук (фосфорні детектори) та азотовмістних (азотні детектори);

— *детектори із захопленням електронів* (ДЗЕ) застосовуються головним чином для аналізу галогеновмісних сполук, які здатні захоплювати в приладі електрони, що призводить до зниження струму між електродами. Чутливість ДЗЕ становить 0,1 мкг;

— *полум'яно-іонізаційні детектори* (ПІД). Це найчутливіші і найпоширеніші детектори, які застосовуються для аналізу майже всіх органічних сполук, оскільки чутливість їх залишається лінійною в широкому діапазоні концентрацій речовин, що аналізуються (від 0,01 мкг до 5 мг). Одним з електродів ПІД є полум'я (суміш водню та повітря), в якому аналізована речовина, разом з газом-носієм іонізується, і відповідний підсилений сигнал реєструється.

Якщо в газорідній хроматографії застосовувати детектори, які не спричиняють деструкцію речовин (наприклад, термоіонні детектори), то цей метод можна використовувати з препаративною метою, шляхом конденсації речовин на виході із колонки. Подібний прийом дозволяє одержувати високоочищені речовини в грамах.

Площа кожного піку пропорційна концентрації відповідного компонента суміші, і для визначення кількості речовин краще користуватися *інтеграторами*, які здатні вимірювати відносний час утримування (час виходу речовини з колонки відносно такого для стандарту) і визначати площу піків. Якщо інтеграторів немає, то площа піків вимірюється планіметричним способом або простим обчисленням добутку висоти піка на його ширину на половині висоти.

Компоненти на хроматограмі, як правило, ідентифікують за допомогою стандартів.

Газорідна хроматографія використовується для аналізу сумішей речовин. Однак при дослідженні речовин можна виявляти ступінь їхньої чистоти, визначати кількість і характер домішок, а також встановлювати фізичні, хімічні та фізико-хімічні властивості. В біохімії газорідна хроматографія широко застосовується для дослідження механізмів ферментативних реакцій, вивчення проміжних стадій метаболізму, розділення жирних кислот, спиртів, складних ефірів, амінів тощо. За допомогою цього методу можна розділяти і будь-які радіоактивні сполуки.

Широке використання методу газорідної хроматографії обмежене через складність апаратури та стійкість речовин, що аналізуються, при відповідній температурі, яка необхідна для створення достатнього тиску пари.

12.4. ІОНООБМІННА ХРОМАТОГРАФІЯ

Іонообмінна хроматографія ґрунтується на обмінній сорбції, за якої відбувається оборотний та стехіометричний обмін іонів, які знаходяться в розчині, на іони, які входять до складу іонообмінника. Розділення суміші іонів, котрі є в досліджуваному розчині, базується на неоднаковій здатності їх до обміну з іонами сорбенту (рис. 12.8).

В іонообмінній хроматографії застосовуються різні за органічним і неорганічним походженням іонообмінні матеріали, котрі являють собою тримірні структури, не розчинні у воді матриці з позитивно або від'ємно зарядженими групами. Якщо групи сорбенту заряджені позитивно, вони будуть обмінювати від'ємні іони; в цьому випадку вони служать *аніонообмінником*, або аніонітом (лужний іонооб-

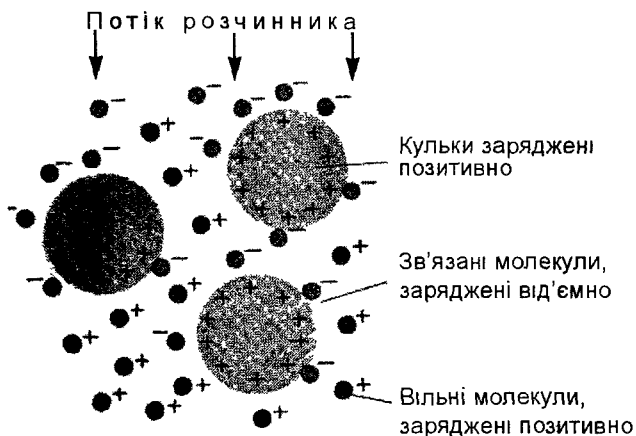
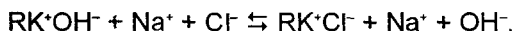
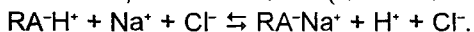


Рис 12 8. Схематичне зображення розділення речовин методом іонообмінної хроматографії

мінник):



Якщо заряд групи від'ємний, вони обмінюють позитивні іони і слугують *катионообмінником*, або катіонітом (кислотний іонообмінник):



Однією з найважливіших характеристик іонообмінників є їхня *обмінна ємність*, величина, яка показує максимальну кількість іонів, яку здатний зв'язати іонообмінник. Обмінна ємність визначається кількістю фіксованих іонів (RK^+ , RA^-), від яких залежить заряд матриці. Це означає, що електричний заряд іонів у будь-якому місці і часі в іоніті має бути компенсований зарядом протііонів (іони, які компенсують заряд каркаса іонообмінника) (OH^- , H^+). Для низькомолекулярних іонів обмінна ємність іонообмінника залежить від ступеня доступності всього об'єму пористої матриці для молекул, від співвідношення розмірів молекул речовини, а також від середньої відстані між іоногенними групами.

До цього можна додати, що при хроматографії високомолекулярних сполук (білків, нуклеїнових кислот) не обов'язково використовувати повну обмінну ємність іонообмінника, оскільки можлива багаточасова фіксація цих макромолекул. У таких випадках вдаються до свідомого зниження повної ємності обмінника за рахунок вибору значень рН, яке відповідає неповній його іонізації (ефективна ємність). Взагалі треба враховувати й те, що в іонному обміні беруть участь також іони буферних розчинів, унаслідок чого рівновага рН може змінюватись. Тому, як правило, аніонні буфери використовуються з

катіонітами, а катіонні буфери — з аніонітами. Необхідно також дотримуватись так званих "стартових умов": по–перше, оскільки зв'язування залежить від іонної сили, вибрані буферні розчини повинні мати більшу ємність, але при цьому іонна сила не повинна бути занадто великою; по–друге, іонні умови при елююванні мають бути тотожними іонним умовам зразка на початку дослідження.

Для розділення біологічних сполук як матрицю застосовують целюлозу (волокнисту і мікрогранульовану), декстран (сефадекс G–25 та G–50) та іонообмінники на основі полістиролу, поліакрилату або поліметакрилату (смоли) (табл. 12.3).

Таблиця 12.3. Типи іонообмінних смол

Назва	Функціональні групи	Матриця
<i>Аніонообмінники:</i>		
КАЕ - сефадекс (QAE-Sephadex)	Діетил-(2-оксипропіл)-аміностильні	Декстран
ДЕАЕ-сефадекс (DEAE- Sephadex)	Діетиламіностильні	Декстран
ДЕАЕ-целюлоза (DEAE-cellulosa)	Діетиламіностильні	Целюлоза
ПЕІ-целюлоза (PEI- cellulosa)	Поліетиленімінні	Целюлоза
ДЕАЕ (БНД)-целюлоза (DEAE (BND)-cellulosa)	Бензоільовані нафтоільовані, діетиламіностильні	Целюлоза
ПАБ-целюлоза (PAB-cellulosa)	n-Амінобензоільні	Целюлоза
AG-3	Третинна аміногрупа	Епоксіамінна
<i>Катіонообмінники:</i>		
СП-сефадекс (SP- Sephadex)	Сульфопропільні	Декстран
КМ- сефадекс (CM- Sephadex)	Карбоксиметильні	Декстран
КМ-целюлоза (CM - cellulosa)	Карбоксиметильні	Целюлоза
Фосфоцелюлоза (P-cel)	Фосфатні	Целюлоза
AG-50	Сульфокислота	Співполімер стиролу та дивінілбен-золу
Біорекс-70 (Bio Rex 70)	Карбоксильні	Акрильна
Біорекс-40 (Bio Rex 40)	Сульфокислота	Фенольна

Серед вищезгаданих іонообмінників залежно від сили полярних груп розрізняють сильні та слабкі іонообмінники. Сильними іонообмінниками є такі, в яких іоногенні групи залишаються іонізованими (зберігають незмінним свій заряд) майже в усьому діапазоні робочих значень рН (рН 3–11), при якому може проходити фракціонування біологічного матеріалу. Подібні властивості мають — SO_3H -групи (сильнокислі) або —

$\text{CH}_2\text{N}^+\text{R}_3$ -групи (сильнолужні). До слабких іонообмінників відносять такі, в яких іоногенні групи виявляють здатність до іонізації в обмеженій зоні значень рН, а також до зменшення міцності сорбції речовин у межах цього діапазону (в області зміни сумарного заряду). Пояснюється це тим, що при тих значеннях рН, коли іонізація слабкого іонообмінника не досягне 100%, має місце динамічна рівновага заряджених і незаряджених станів, в якому беруть участь усі іоногенні групи обмінника. В цих умовах кожна з груп у будь-який момент часу нейтралізується і перестає утримувати навколо себе іон речовини. Прикладом слабких груп можуть бути — CO_2H -групи (слабокислі) або — CH_2NR_2 -групи (слабколужні).

Вибір того чи іншого іонообмінника для конкретного хроматографування визначається насамперед його загальною і реальною ємністю, а також пористістю та ситовим розміром часток. Для розділення низькомолекулярних сполук використовуються іоніти з невеликими розмірами пор (з високим ступенем зшивання), а для розділення макромолекул (білки, полінуклеотиди тощо) — сорбенти з великими розмірами пор. Проте більшість іонообмінників, за винятком сефадексу, не виявляють помітну залежність між пористістю і молекулярною масою речовин, що підлягають розділенню. Особливо це стосується сорбентів на основі стиrolу та дивінілбензолу.

Ефективність розділення і швидкість хроматографічного процесу залежать від розміру крупинок сорбенту. Діапазон лінійних розмірів сорбенту зазначається безпосередньо в мікронах або у вигляді інтервалу чисел "МЕШ" (ситовий розмір). *Ситовий розмір* — це розмір частинок сорбенту, який задається при сортуванні (просіюванні) їх на стандартних ситах. Наприклад, сито (20–50) має 20–50 отворів власної площі. В біохімічній практиці застосовуються адсорбенти від 20–50 меш (великі за розмірами частинки) до 200–400 меш (найдрібніші). Сорбенти з дрібними частинками мають підвищене співвідношення площі поверхні до об'єму, а отже, й більшу ємність, менший час обміну. Але з другого боку, при цьому уповільнюється швидкість току, що, в свою чергу, може спричинитися до збільшення розмивання зон та погіршення розділення. Сорбенти з дрібними частинками застосовуються для аналітичного розділення речовин. Іонообмінники з великими розмірами крупинок (20–50 та 50–100 меш) забезпечують високу швидкість розділення; вони використовуються для грубого або препаративного аналізу. З урахуванням зазначеного вище, на практиці оптимальний ситовий розмір підбирають емпірично.

Принциповим в іонообмінній хроматографії є те, що спорідненість речовин до іонообмінника залежить насамперед від електричних

властивостей речовини і відносної спорідненості інших заряджених речовин, які містяться в розчиннику. Однак оптимізація режиму проведення хроматографії залежить і від інших факторів, котрі слід враховувати в кожному конкретному випадку. До таких факторів належать:

— природа, концентрація, рН та ємність буфера, зокрема близькість обраного значення рН до межі нормального діапазону ефективної буферної ємності;

— природа і концентрація іонів солі;

— температура, в'язкість та діелектрична проникність розчинника (з її зменшенням ослаблюється іонізація обмінника);

— наявність в елюенті добавок, котрі забезпечують нативність біологічного матеріалу (β -меркаптоетанол, іони Mg^{2+} та ін.), покращують його розчинність або перешкоджають агрегації молекул речовини (детергенти, органічні розчинники тощо), чи блокують неспецифічну сорбцію речовини на матриці (сечовина, детергенти та ін.).

Оскільки різні речовини мають різні електричні властивості, вибір способу елюювання залежить від виду зв'язаних молекул. В іонообмінній хроматографії найчастіше використовується ступінчасте або градієнтне елюювання. *Ступінчасте елюювання* здійснюється послідовно декількома розчинами, кожний з яких відрізняється від попереднього або величиною рН, або більш високою концентрацією солі, або і тим і другим. Змінювання рН розчину застосовується, як правило, з метою нейтралізації, а іноді й зміни знака заряду компонентів фракціонуваної суміші або нейтралізації самого іонообмінника. При *градієнтному елююванні* використовується один розчин, в якому змінюється один або декілька параметрів, наприклад, поступово підвищується концентрація будь-якої нейтральної солі або самого розчину.

У випадку розділення речовин, близьких за своїми хроматографічними властивостями проводиться *ізократичне елюювання*, тобто елюювання розчином постійного складу. Цей вид елюювання є найкращим з огляду на розрізнення піків, однак цього досягають виключно за рахунок збільшення часу хроматографування та об'єму фракцій, що розділяються.

Останнім часом в ензимологічній практиці широкого застосування набув метод елюювання ферментів розчинами специфічних лігандів (активаторів, субстратів тощо). За відповідних умов (якщо ліганд має високу спорідненість до певного ферменту) він витягує тільки (переважно) саме цей фермент.

Вибираючи умови елюювання, слід враховувати вплив елюату на аналіз речовин. Так, у разі проведення спектрального аналізу буфер не

повинен поглинати світло в обраному діапазоні довжин хвиль. Якщо зразок аналізується за його радіоактивністю, то краще застосовувати нелеткі буфери, щоб запобігти включенню радіоактивності в кристали, які утворюються внаслідок висихання буфера. При використанні сцинтиляційного лічильника важливо, щоб елюат не містив домішки, які спрчиняють гасіння.

Взагалі на практиці спосіб елювання підбирають експериментально з врахуванням умов стабільності речовини, що аналізується.

Крім особливостей використання двох компонентів (іонообмінники, елюент) у системі іонообмінної хроматографії велике значення мають речовини, які хроматографуються. Насамперед слід звернути увагу на розмір (масу) та форму молекул, від параметрів яких залежить ступінь проникнення в пори матриці іонообмінника і швидкість дифузії в рідких фазах системи. Для оцінки можливостей локальних взаємодій з обмінником обов'язково треба мати уявлення про просторову відповідність розподілу і середніх відстаней між іоногенними групами на поверхні обмінника та про характер розподілу цих груп на поверхні макромолекул. Бажано враховувати також ступінь гідрофобності ділянок на поверхні макромолекул та схильність молекул речовин до утворення водневих зв'язків. Це важливо тому, що гідрофобні взаємодії і водневі зв'язки є першорядними факторами, які обумовлюють неспецифічну сорбцію речовини на поверхні матриці.

Розрізняють статичний і динамічний варіанти іонообмінної хроматографії. *Статичний* — це розділення суміші досліджуваних речовин на іонообміннику шляхом зміни рівноважного стану, коли компоненти суміші по черзі практично повністю десорбуються і вимиваються елюентом. *Динамічний* — це хроматографічне розділення суміші досліджуваних речовин, при якому всі компоненти цієї суміші у вигляді хроматографічних зон мігрують уздовж колонки і розділяються за рахунок різниці в міграційній швидкості.

Як правило, в біохімічній практиці іонообмінна хроматографія проводиться на колонках. Але для розділення різних сполук застосовується хроматографія на іонообмінному папері. Як основа використовується хімічно модифікована целюлоза — DEAE-целюлозна (сильнолужна), KM-целюлозна (слабкокисла), аміноетил-целюлозна (слабколужна), фосфат-целюлозна (сильнокисла), цитрат-целюлозна (слабкокисла). В деяких випадках використовується папір, просочений іонообмінною смолою (Амберліт SB-2, SA-2). Прикладом застосування хроматографії на іонообмінному папері є розділення білків за ступенем зв'язування з одно- та дволанцюговою ДНК,

очищення репресорів, нуклеаз, полімерів тощо.

Взагалі на іонообмінниках можна хроматографувати будь-яку речовину, що має заряд. У промисловості метод іонообмінної хроматографії застосовують при очищенні різних речовин, зокрема, при виробництві лікарських препаратів з уповільненою дією, антибіотиків, іонітного молока, при аналізі слідових кількостей компонентів, для знесолення води тощо. В наукових цілях метод іонообмінної хроматографії застосовується для розділення іонів металів, невеликих органічних молекул, моно- та олігонуклеотидів, білків, полісахаридів та інших біологічно важливих речовин. Особлива значущість методу іонообмінної хроматографії полягає у використанні його для аналізу амінокислотного складу білків та пептидів. Для цього існують спеціальні автоматичні прилади — *амінокислотні аналізатори* (рис. 12.9).

Сучасні амінокислотні аналізатори можуть бути укомплектовані інтегратором з мікрокомп'ютером, які здатні обраховувати площі піків і

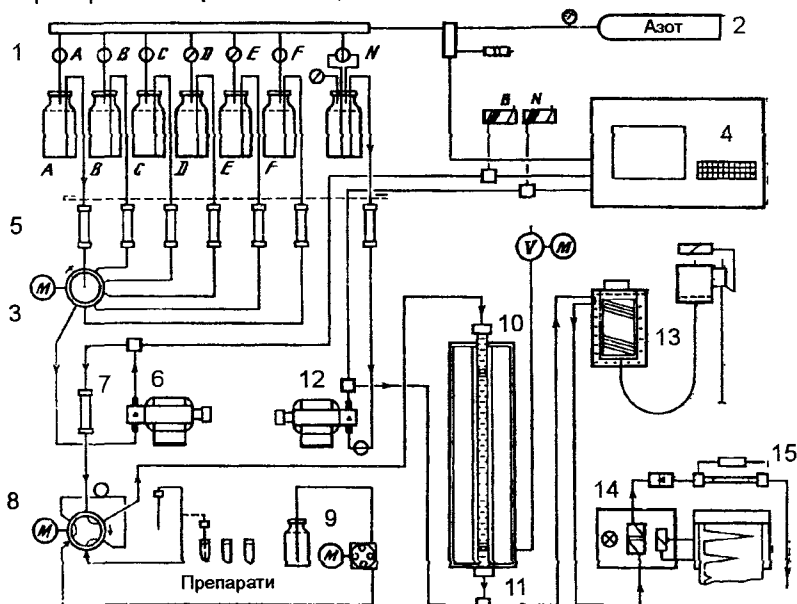


Рис. 12.9 Принципова блок-схема амінокислотного аналізатора:

- 1 – бутелі; 2 – балон із азотом (0,3–0,6 атм.); 3 – розподільний кран ротаційного типу; 4 – блок управління з мікропроцесором; 5 – контрольні пристрої з насосами; 6 – насос плунжерного типу; 7 – передколонка для утримання аміаку; 8 – інжектор, подача зразка; 9 – реверсивний насос низького тиску; 10 – електронагрівач з вентилятором; 11 – змішувач; 12 – насос; 13 – олійна баня; 14 – денситометр; 15 – двоканальний реєстратор

друкувати на стрічці амінокислотний склад досліджуваного білка, чи пептиду (рис. 12.10).

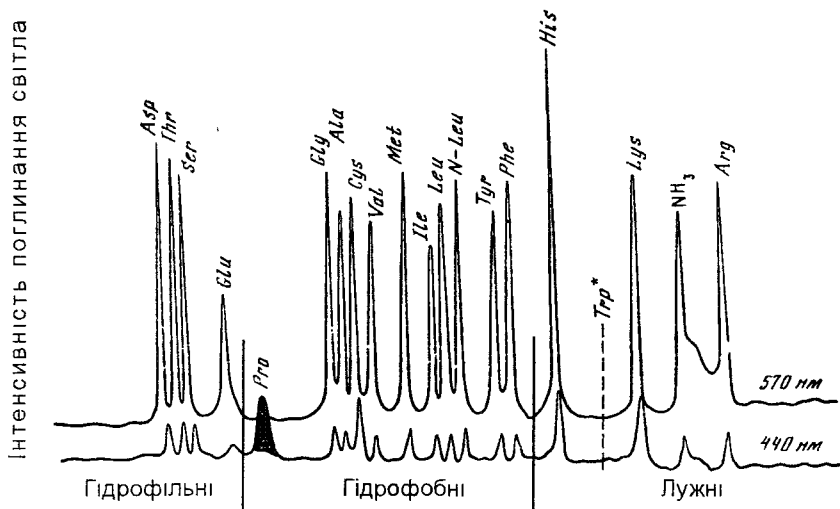


Рис 12.10 Типовий профіль елювання амінокислот після розділення в амінокислотному аналізаторі

* Положення триптофану визначається його значною гідрофобністю

Піки амінокислот реєструють шляхом фарбування нінгідрином або чутливішим флуориметричним методом, в котрому як барвник використовується ортофталевий альдегід. У разі застосування радіоактивно мічених амінокислот реєстрація проводиться за допомогою рідинного сцинтиляційного лічильника з проточною кюветою.

Автоматичні аналізатори амінокислот дозволяють здійснювати повний амінокислотний аналіз будь-якої білкової речовини в малих кількостях за короткий проміжок часу з високим ступенем точності.

12.5. ГЕЛЬ-ПРОНИКАЮЧА (ГЕЛЬ-ФІЛЬТРАЦІЯ, АБО МОЛЕКУЛЯРНО-СИТОВА) ХРОМАТОГРАФІЯ

При гелі-хроматографії речовини розділяються в основному за розміром, формою та молекулярною масою, а не за хімічними властивостями або розчинністю. Це пов'язане з тим, що крупинки сорбенту мають пори, в які молекули малих розмірів та молекулярних мас проникають і затримуються в них, а отже, затримуються сорбентом; речовини ж, розмір яких перевищує розмір пор сорбенту не проникають всередині

ну гранул і рухаються відносно швидко (молекулярні сита) (рис. 12.11). Залежно від обраного сорбенту можна розділяти та виділяти речовини

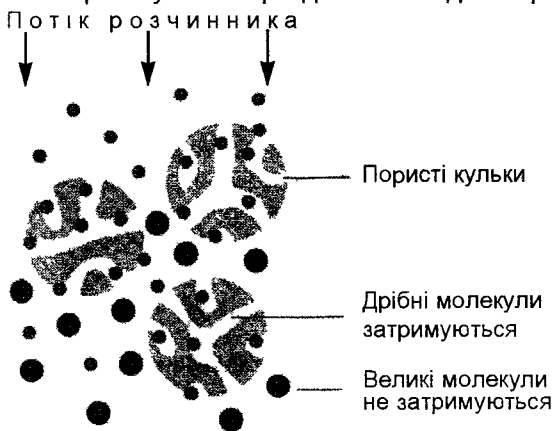


Рис. 12.11 Схематичне зображення розділення речовин методом гель-фільтрації

різної (або потрібної) молекулярної маси.

У гель-проникаючій хроматографії використовуються як гелі на основі природних полімерів (декстран, агароза), так і синтетичні полімери (поліакриламід, полістирол, хлор-бутиловий каучук) (табл. 12.4). Незалежно від

Таблиця 12.4 Сорбенти, що використовуються в гель-хроматографії

Тип сорбенту	Молекулярна маса речовин, що розділяються, Дальтон	Тип сорбенту	Молекулярна маса речовин, що розділяються, Дальтон
Декстран		Поліакриламід	
Сефадекс G-10	< 700	Біогель P2	200 - 2000
Сефадекс G-25	1 000 - 5 000	Біогель P6	1 000 - 6 000
Сефадекс G-50	1 500 - 3 000	Біогель P150	15 000 - 150 000
Сефадекс G-100	4 000 - 150 000	Біогель P300	60 000 - 400 000
Сефадекс G-200	5 000 - 800 000	Ультрогелі Аса	
Агароза		202	1 000 - 15 000
Сефароза 6В	$1 \cdot 10^6 - 4 \cdot 10^6$	44	10 000 - 130 000
Сефароза 4В	$5 \cdot 10^6 - 20 \cdot 10^6$	22	100 000 - 1200 000
Сефароза 2В	$20 \cdot 10^6 - 40 \cdot 10^6$	Сефакрил	
Біогель А - 0.5М	30 000 - 500 000	S - 200	1 000 - 80 000
Біогель А - 15М	$40 000 - 15 \cdot 10^6$	S - 300	1 000 - 750 000
Біогель А - 150М	$5 \cdot 10^6 - 150 \cdot 10^6$	S - 400	10 000 - $2 \cdot 10^6$
		S - 500	40 000 - $20 \cdot 10^6$
		S - 1000	500 000 - $100 \cdot 10^6$

походження, сорбенти здатні набухати у воді і ставати гелеподібними та пористими.

Сефадекси — сферичні декстранові гелі з високим ступенем гідрофільності, які складаються з полісахаридних ланцюгів, що побудовані із залишків глюкози, та поперечнозшитих епіхлоргідринном. Ступінь зшивання декстрану може бути різним, що дозволяє одержувати матеріал з неоднаковими розмірами пор — від найбільш дрібнопористого сефадексу G-10 до найбільш крупнопористого G-200. Отже, чим крупніші пори, тим більше води може зв'язатися в гранулах при їх набуханні (при набряканні пори заповнюються рідиною, яка використовується як елюент).

У більшості випадків сферичні гранули за розмірами поділяються на два типи: звичайні (діаметром 40–120 мкм) та дрібнозернисті, або "Superfine" (10–40 мкм). Крім того, останні мають ще три діапазони розмірів: "Fine" (20–80 мкм), "Medium" (50–150 мкм) та "Coarse" (100–300 мкм). Особливо це стосується найпоширеніших сефадексів G-25 і G-50. На практиці для аналітичних цілей при гель-фільтрації на колонці використовуються категорії "Fine" та "Superfine", а для гель-фільтрації в тонкому шарі — тільки сефадекси категорії "Superfine". Як правило, категорії "Medium" використовують у препаративних дослідженнях, а "Coarse" — для фракціонування у вільному об'ємі. Декстранові гелі застосовуються в основному для фракціонування сферичних біомолекул (глобулярних білків).

Носії на основі гелей *агарози* являють собою лінійні полімери із залишків D-галактози та 3,6-ангідро-L-галактози, розміщених по чергово. Характерною особливістю агарози є здатність утворювати міцний гель, стабілізований водневими зв'язками без поперечних зшивок. Агароза розчиняється в киплячій воді, а при охолодженні вона утворює гель. В умовах хроматографування агароза хімічно неактивна, але чутлива до дії кислот, лугів і окислювачів.

Для надання жорсткості та хімічної стійкості, особливо в лужних середовищах, сефарозу іноді "зшивають" 2,3-дибромпропанолом. Наявність зшивки в сефарозі позначається літерами "CL" ("cross-linked"). Матриці на основі "зшитої" сефарози можна використовувати в значно ширшому діапазоні рН (3–14), витримувати в автоклаві при температурі 120°C. Ці матриці здатні витримувати тривалий контакт з 8M сечовиною і 6M гуанідинхлоридом, а також з багатьма органічними розчинниками (етанолом, ацетоном, дихлоретаном, хлороформом і ін.).

Для гель-фільтрації використовуються також біогелі серії А на агарозній матриці.

Носії на основі гелей агарози використовуються для аналізу або розділення високомолекулярних глобулярних білків або довгих лінійних молекул (наприклад, ДНК).

Сефакрил — зернистий гель, який одержується ковалентним зшиванням алілдекстрану N, N'-метиленбісакриламідом. За своїми властивостями сефакрилові гелі характеризуються гідрофільністю, хімічною інертністю. Робочий діапазон рН — 2–11. Завдяки значній жорсткості гелю хроматографування сефакрилами можна проводити при значно більших швидкостях елюювання, ніж з сефадексами з подібною пористістю. Сефакрили використовуються для фракціонування нуклеїнових кислот, рестриктазних фрагментів ДНК, полісахаридів, для очищення плазмід, рибосом і навіть цілих вірусів.

Поліакриламідні гелі (ПААГ) — це сферичні гранули поліакриламиду, які одержують шляхом співполімеризації акриламиду та N,N'-метиленбісакриламиду. Пористість та жорсткість гелю визначається відсотковим вмістом у ньому полімеру, а розмір пор визначається ступенем зшивання компонентів. Порівняно з декстраном та агарозою поліакриламідні гелі відрізняються кількістю полярних карбоксиамідних груп на деяких атомах вуглецю, що дає можливість одержувати ширший спектр розмірів пор.

Інша перевага поліакриламідних біогелей серії P полягає в наявності вузького діапазону розмірів гранул для аналітичного фракціонування (40–80 мкм, проти 40–120 або 20–80 мкм для сефадексів).

Значні переваги перед біогелями серії P мають інші сорбенти — *ультрогелі* типу AcA ("AcA" означає "acrylamide-agarose"), де контролююча пористість ПААГ поєднується із жорсткістю агарози. Подібна полімеризація сітки акриламідного гелю всередині жорсткого каркаса агарози (без утворення хімічного зв'язку між компонентами) додає додаткової жорсткості сферичним гранулам ультрогелю при збереженні можливостей фракціонування відносно низькомолекулярних речовин та з підвищеною швидкістю. Хімічна стійкість ультрогелей AcA визначається сукупністю чутливих місць поліакриламиду та агарози.

З наведених характеристик сорбентів, що застосовуються в гель-проникаючій хроматографії, можна зробити висновок, що межі молекулярних мас, в яких відбувається фракціонування речовин, в першу чергу визначаються розмірами пор сорбенту. Але треба брати до уваги й те, що зі збільшенням розмірів гранул прискорюється потік елюенту і погіршується розрізнення. Тому, коли виникає потреба в максимальній розділювальній здатності (наприклад, для аналітичних цілей), застосовуються супертонкі гранули сорбенту. Для препара-

тивних цілей, якщо швидкість потоку елюенту не має дуже великого значення, застосовуються тонкі гранули матриці. І, нарешті, крупніші гранули застосовуються для розділення у великих масштабах, коли розрізнення має менше значення, ніж тривалість розділення.

Гель-фільтрація на колонці. Залежно від умов хроматографування — при високому або низькому тиску — гель-фільтрація на колонці потребує різних підходів. Якщо гель-фільтрація повинна відбуватися при високому тиску, використовуються готові фірмові колонки із застосуванням крупнопористих силікагелей у вигляді сферичних гранул діаметром 5 і 10 мкм, покритих, як правило, "глікофазою" (обробка гліцерилпропілсиланом) або іншими спеціальними речовинами для пригнічення сорбції на поверхні силікагелю.

Колонки для хроматографування при низькому тиску готуються в лабораторних умовах. Вибір довжини та діаметра колонки визначається об'ємом речовини, що аналізується, і конкретними завданнями досліду. Від цих факторів залежить співвідношення висоти і діаметра колонки, яке може становити від 10:1 (для знесолювання сполук) до 100:1 (для фракціонування молекул). При цьому треба брати до уваги те, що роздільна здатність будь-якої колонки пропорційна кореню квадратному її довжини. Звідси стає зрозумілим, чому для фракціонування речовин використовуються довгі колонки (до 3–4 м і більше).

Більшість сорбентів, за винятком сефадексів та біогелів типу Р, постачаються у вигляді водяних суспензій, котрі перед внесенням у колонку спочатку піддають розділенню на фракції вузького діапазона розмірів, а потім розводять до потрібної консистенції. З метою оптимального розрізнення піків речовин, що розділяються, колонки треба заповнювати сорбентом якомога однорідніше. Якість однорідності заповнення колонки матрицею перевіряють, пропускаючи крізь колонку розчин забарвленої високомолекулярної речовини (наприклад, блакитного декстрану).

Аналіз складу розчину, що витікає з колонки (елюат), дає можливість оцінювати ефективність розділення суміші.

Для проведення хроматографічних досліджень на колонці використовуються перистальтичний насос, денситометр, реєстратор та колектор фракцій.

Тонкошарова гель-фільтрація. Замість циліндричної колонки матрицю пористого гелю з успіхом можна використовувати в тонкому шарі (0,4–1 мм) на скляній пластинці. При цьому елювання здійснюється за рахунок руху

рідини вздовж пластинки з однаковою швидкістю по всій її ширині. Загальна швидкість елюювання регулюється шляхом зміни нахилу пластинки під кутом від 5 до 20°. На кінці пластинки рівномірно розташовуються гноти (стрічки) з фільтрувального паперу, які занурюються з другого краю в резервуари з елюентом (рис. 12.12).

Речовина, що досліджується, наноситься на стартовій лінії у верхній частині пластинки.

Найчастіше для гель-фільтрації в тонкому шарі використовуються сефадекси типу "Superfine", які наносяться на пластинки формувальним пристроєм. Це гладенький сталевий дротик, на кінцях якого виступають ексцентрично розташовані квадратні фланці. Зазор між склом та дротиком визначає товщину шару сорбенту.

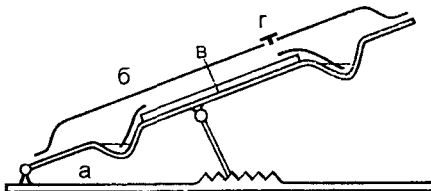


Рис. 12.12. Схема приладу для тонкошарової гель-фільтрації:

а – столик; б – прозора кришка; в – пластинка, г – гумова вставка

Які і в колонці, високомолекулярні компоненти суміші молекул рухаються між гранулами сорбенту разом з потоком рухомої фази, а компоненти меншої молекулярної маси просовуються до нижнього краю пластинки тим повільніше, чим більша частина внутрішнього об'єму гранул виявиться для них доступною. Рух рідини припиняється до того, як потрібна речовина зійде в нижній резервуар.

Після закінчення процесу хроматографування фільтрувальний папір підсушується, а плями на ньому виявляються одним з численних методів фарбування біомолекул (білків, нуклеїнових кислот), шляхом реєстрації ферментативної активності, радіоактивності, імунними методами тощо.

Зважаючи на високу чутливість та швидкість розділення, використання малих кількостей речовин, що аналізуються, та можливість одночасного дослідження багатьох препаратів (10–15), гель-фільтрацію в тонкому шарі можна використовувати як пробний метод для добору сорбенту та швидкості елюювання при наступному препаративному очищенні біомолекул за допомогою гель-фільтрації на колонці, а іноді вона може доповнити або навіть замінити електрофорез і електрофокусування.

Гель-фільтрація в тонкому шарі використовується для розділення, визначення молекулярних мас та перевірки чистоти високомолекулярних гідрофільних сполук — білків, пептидів, глікопептидів, ферментів, нуклеїнових кислот тощо.

Як уже згадувалося, гель–проникаюча хроматографія дозволяє проводити розділення речовин, які відрізняються за молекулярною масою, причому майже за будь–яких умов, оскільки хроматографічна поведінка речовин практично не залежить від складу та іонної сили буфера, рН, температури; при проведенні аналізу практично бракує адсорбційних явищ, що дозволяє досліджувати лабільні речовини (наприклад, ферменти) без зміни їхньої активності і властивостей. Слушним є й те, що об'єм елюювання перебуває в прямій залежності від молекулярної маси.

В цілому застосування гель–проникаючої хроматографії в біохімічній практиці можливе в широкому спектрі аналітичних та препаративних досліджень, а саме: при визначенні молекулярних мас біополімерів, особливо білків, та очищення їх; при ідентифікації різних фракцій РНК для подальшого вивчення її метаболізму; при вивченні зв'язування між білками та низькомолекулярними сполуками (або їх вилученні); при розділенні нативних молекул ДНК, ДНК — від РНК та супутних домішок; при дослідженні дії ферментів в умовах додавання або вилучення інгібіторів, кофакторів тощо; при концентруванні та знесоленні високомолекулярних сполук.

12.6. АФІННА ХРОМАТОГРАФІЯ (ХРОМАТОГРАФІЯ СПОРІДНЕНОСТІ)

Афінна хроматографія — є ефективним методом розділення, очищення та вилучення із суміші біологічних речовин (компонентів) без порушення їхньої нативності. На відміну від звичайних методів виділення та очищення речовин (електрофорез, проникаюча хроматографія), які базуються на фізико–хімічних властивостях макромолекул (молекулярна маса, заряд, розмір молекул тощо), в афінній хроматографії використовується унікальна властивість макромолекул — їхня біологічна специфічність, тобто здатність специфічно та оборотно взаємодіяти з певними сполуками — лігандами (субстратами, інгібіторами, рецепторами, коферментами та ін.), які ковалентно зв'язані на матрицях (носіях) і утворюють біоспецифічний адсорбент. Цей адсорбент здатний вибірково вилучати з суміші, що розділяється, біомолекули, які мають до нього спорідненість (рис. 12.13).

Біоспецифічна взаємодія відзначається винятковою вибірковістю, а нерідко й дуже високим ступенем спорідненості між партнерами. Вона лежить в основі численних строго детермінованих процесів,

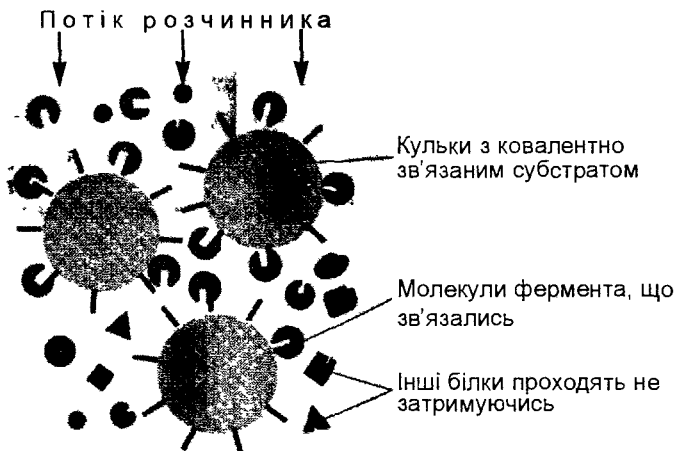


Рис. 12 13. Схематичне зображення розділення речовин методом афінної хроматографії

що відбуваються в організмі.

В афінній хроматографії адсорбенти звичайно складаються з трьох ковалентнозв'язаних компонентів: нерозчинного носія (матриці), "ніжки" (спейсера) та специфічного ліганда.

Носії, що застосовуються в афінній хроматографії, крім звичайних хроматографічних властивостей (відповідні форма та розмір гранул, нерозчинність та гідрофільність, жорсткість і хімічна стабільність, брак неспецифічної адсорбції тощо) повинні мати додаткові особливості, а саме: містити велику кількість хімічних груп, що дозволяють ковалентно зв'язувати різноманітні біомолекули (ліганди та спейсери) і при цьому не руйнуватись під час зв'язування та наступного елюювання макромолекул; нерозчинна матриця повинна якомога слабкіше взаємодіяти з іншими макромолекулами, щоб неспецифічне зв'язування було мінімальним.

Зважаючи на це, як носій (матриця) з порами великого розміру, найчастіше використовується один з природних лінійних полімерів — зерниста 4 або 6% агароза (сефароза). В числі інших матриць з однорідними твердими сферичними гранулами можна назвати поперечно-зшитий декстран, поліакриламід, гідроксіалкілметакратні полімери (сферони), носії на основі целюлози та силікателі. Відносно останніх треба зазначити, що для афінної хроматографії крупнопористі силікателі модифікують за силанольними групами γ -амінопропілтриметоксисиланом, до аміногруп якого за допомогою глутарового альдегіду приєднують хімотрипсин і сироватковий альбумін.

Вибір того чи іншого ліганда визначається специфічністю макромолекул, що підлягають очищенню. Однак при цьому треба мати на увазі, що біополімери, які можуть бути застосовані як ліганд в афінній хроматографії, здебільшого лабільні. Щоб уникнути денатурації їх під час зв'язування з матрицею, останню піддають *активації*. Під активацією розуміють хімічну реакцію за участю певного активатора, внаслідок якої на поверхні матриці утворюються реактивні електрофільні групи, що формують ковалентні зв'язки з нуклеофільними групами ліганда. Найпоширеніший спосіб активації полісахаридної матриці (агарози) — активація бромціаном (BrCN). У відповідних умовах (рН 10,5–11,0) бромціан реагує з гідроксильними групами матриці з утворенням циклічних та нециклічних імідокарбонатів і неактивних карбонатів. Активними проміжними сполуками є імідокарбонати та відповідні імідоефіри.

Останнім часом запропонований інший, доцільніший підхід в активуванні агарози, суть якого полягає в збільшенні електрофільності ціанової групи за рахунок її проміжного перенесення на триетиламін у майже нейтральному середовищі (рН 7–8). Подібна реакція активації спричиняється до утворення вельми реакційноздатного комплексу — триетиламонійнітрину. Порівняно з бромціаном цей комплекс більш електрофільний і здатний успішніше атакувати гідроксильні групи агарози.

В додатку 21 наведені основні матриці, які найчастіше застосовуються в афінній хроматографії, та спосіб приєднання до них реактивних груп ліганда. До цього слід додати, що в деяких випадках, коли приєднання до матриці може займати активний центр ферменту, до реакційної суміші додається відповідний субстрат або конкурентний інгібітор ферментативної активності. Це дає змогу захистити активний центр ферменту від небажаної інактивації.

Для усунення стеричних ефектів, які можуть виникати і перешкоджати взаємодії низькомолекулярного ліганда зі специфічною біомолекулою, між ними впроваджується *спейсер*. Як спейсери використовуються вуглеводневі ланцюги завдовжки 6–17 атомів вуглецю, на вільних кінцях яких знаходяться аміногрупи або карбоксили (1,6–діаміногексан та 6–аміногексанова кислота, відповідно). Але вуглеводневі спейсери здатні вступати в гідрофобні взаємодії з макромолекулами і таким чином адсорбувати їх. У цих випадках перевагу віддають спейсерам, які містять більше гідрофільних груп. Подібні спейсери складаються з похідних аліфатичних спиртів (наприклад, 1,3–діамінопропанол–2) або таких, які містять пептидні зв'язки. Іноді, якщо як ліганд використовується білок

(макромолекулярний ліганд), спейсер взагалі не потрібний, оскільки білок здатний безпосередньо закріплюватися на твердому носії.

Будь-яка молекула, низькомолекулярна або високомолекулярна, яка здатна специфічно взаємодіяти з іншою біомакромолекулою, яку потрібно очистити, потенційно є придатною як ліганд для афінної хроматографії. Але при цьому ліганд повинен приєднуватися до матриці без будь-яких змін зв'язуючих властивостей.

Ліганди з індивідуальною специфічністю — це численна група речовин, кожній з яких властива чітка взаємна специфічність (спорідненість) до іншої речовини. Прикладами лігандів з індивідуальною специфічністю можуть бути білки-рецептори (для зв'язування гормонів та інших низькомолекулярних ефекторів), транспортні білки плазми та білки-переносники клітинних мембран (для зв'язування й очищення своїх низькомолекулярних партнерів), білки-антигени (для очищення специфічних антитіл). Досить часто в ферментативних реакціях як ліганди з індивідуальною специфічністю використовуються ферменти, відповідні субстрати та їхні аналоги, продукти цих реакцій, інгібітори та коферменти, алостеричні ефектори, іони металів. Однак, працюючи з ними, треба проводити дослід з особливою обережністю, щоб фермент не виявив каталітичну активність у перетворенні субстрату, а тільки був здатний зв'язуватися з ним у комплекс. Щоб запобігти неспецифічній сорбції домішок на лігандах з індивідуальною специфічністю, не бажано використовувати як ліганди речовини з вираженою гідрофобністю та збагаченими іоногенними групами.

Інший вид біоспецифічної взаємодії, коли ліганд здатний зв'язувати цілу групу споріднених речовин. — *групоспецифічні ліганди*. Вони використовуються в тих особливих випадках, коли буває потрібно не тільки очистити, але і розділити декілька речовин, що проявляють спорідненість до одного і того ж ліганда. Якщо ступінь цієї спорідненості неоднаковий для різних речовин групи і якщо не вдається підібрати для них специфічні (різні), конкурентні елюенти, то розділення речовин може бути здійснене хроматографічно шляхом почергового елюювання з сорбенту. При використанні сорбентів з груповою специфічністю для очищення однієї речовини іноді знижується вибірковість сорбції. Цей недолік компенсується за рахунок вибірковості афінного конкурентного елюювання.

При практичному застосуванні афінної хроматографії треба перш за все враховувати наступне: якщо з'ясовується, що в досліджуваному препараті є подібні за своєю біологічною активністю компоненти, то хроматографування слід проводити шляхом *динамічного*

фракціонування, спираючись на різницю сил спорідненості вихідних компонентів до ліганда або на афінне вибіркове елюювання. Для цього використовується колонка зі співвідношенням висоти до її діаметра в межах від 20:1 до 50:1, а максимальний об'єм препарату має становити не більше 5% від об'єму колонки. *Статичний* варіант фракціонування застосовується у випадках, коли подібних компонентів у препараті немає; тоді фракціонування проводиться шляхом сорбції, промивання та десорбції речовини з колонки. При статичному фракціонуванні використовується широка і коротка колонка — відношення висоти до діаметра колонки становить від 5:1 до 1:1. При цьому максимальна кількість речовини, яка здатна зв'язатися з сорбентом (з розрахунку на 1 мл), при перемішуванні у вільному об'ємі та достатньому для рівноваги часі, не повинна перевищувати 15–25% (ефективна ємність колонки) з тим, щоб концентрація цієї речовини в рідкій фазі залишалась практично нульовою.

Звичайно, готові (фірмові) сорбенти містять відповідну кількість ліганда (10^{-3} – $2 \cdot 10^{-2}$ M). Але якщо необхідно синтезувати афінний сорбент, важливим є вибір концентрації (густини просторового розташування) ліганда до матриці. В більшості випадків оптимальну концентрацію ліганда підбирають емпірично. Але для орієнтації слід зазначити, що, наприклад, для очищення ферментів треба використовувати сорбенти з концентрацією лігандів 10^{-3} M і вище, тобто, починаючи з 1 мкмоль ліганда на 1 мл сорбенту. А для сорбентів з участю білкових рецепторів, імуносорбентів і, особливо, транспортних білків концентрацію лігандів можна зменшувати додатково на декілька порядків, що не буде перешкодою для повноти афінного зв'язування. Навпаки, надмір невикористаних лігандів може призвести до підвищеної неспецифічної сорбції.

Загалом вибірковість та міцність афінного зв'язування речовин з лігандом обумовлені кооперативною дією різних сил у місці зв'язування. З урахуванням усіх інших факторів, неабияке значення при цьому має вибір буфера та, особливо використання різних добавок. Тому з метою збереження нативності речовини та зменшення неспецифічної сорбції інших компонентів у вихідній суміші, застосування тієї чи іншої солі та її концентрація в буфері, вибір відповідного рН обумовлюються в кожному конкретному випадку. Введення сечовини, гуанідинхлориду, органічних розчинників, детергентів тощо сприяє послабленню дії сил певного типу і навіть усіх їх одночасно, але в таких межах, щоб біоспецифічна, афінна взаємодія була послаблена лише частково, а неспецифічна сорбція пригнічувалась повністю. При цьому залежно від домінуючого характеру неспецифічної сорбції

віддають перевагу тому чи іншому фактору або комбінації їх.

Після вилучення сторонніх сумішей промиванням елюювання іммобілізованої речовини здійснюється в умовах, коли зв'язування її не можливе, але при цьому вона не повинна руйнівню впливати на сполуки, що виділяються. Досягається це або безпосередньо шляхом створення несприятливих для біоспецифічної взаємодії умов (зміна рН, збільшення іонної сили та температури елюенту, введення до складу елюенту органічних розчинників, детергентів, денатуруючих речовин), або шляхом конкурентного афінного елюювання. Останнє передбачає введення розчинного ліганда, який також має біоспецифічну спорідненість до речовини, що елююється. Це може бути ліганд, подібний до того, що вже іммобілізований на матриці, або інший, наприклад, інгібітор ферменту, тимчасом як з матрицею зв'язаний його кофактор або субстрат. У будь-якому випадку для успішного вивільнення речовини від зв'язку з сорбентом, конкуруючий ліганд або аналог повинні мати достатньо високий ступінь спорідненості відповідно до речовини або ліганда сорбенту і знаходитися в розчині в достатньому надлишку.

Конкурентне елюювання вносить додатковий етап селективного відбору шуканої речовини, що може суттєво підвищити ступінь її очищення, особливо в тих випадках, коли вона була фіксована на сорбенті, який має групову специфічність.

Афінна хроматографія особливо придатна для виділення необхідних біополімерів з високим (абсолютним) ступенем чистоти. Афінні методи також використовуються для очищення та виділення специфічних нуклеїнових кислот, білків (ферментів, глікопротеїнів, імуноглобулінів, лектинів, рецепторних білків), складних клітинних структур, гормонів, клітинних мембран, з якими зв'язуються гормони, для виділення специфічних клітин (наприклад, злоякісних пухлин) тварин за допомогою іммобілізованих аглютининів тощо.

Підсумовуючи вищевикладене, треба зауважити, що на практиці при одержанні й очищенні гомогенних біомакромолекул часто застосовується не один який-небудь вид або тип методу хроматографії, а сукупність їх. Так, якщо перед дослідником стоїть завдання одержати нативний високоочищений білок, то спочатку використовується іонообмінна хроматографія, в якій початковий клітинний екстракт піддається фракціонуванню крізь колонку з іонообмінною смолою (рис. 12.14 А); потім відповідними прийомами елюювання виявляються ферментативно активні фракції білка, що досліджується і піддаються гелю-фільтрації (рис. 12.14Б); нарешті, ферментативно активні фракції збираються і піддаються очищенню до гомогенного стану за допомогою афінної хроматографії на колонці з іммобілізованим субстратом ферменту (рис. 12.14 В).

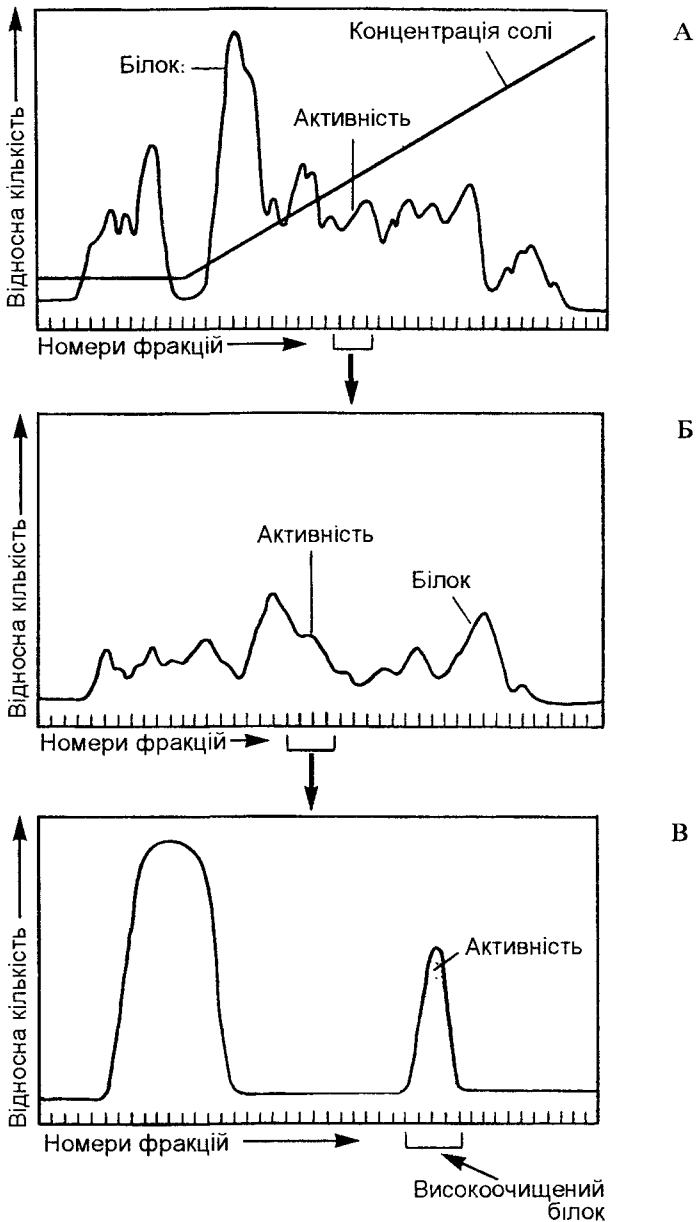


Рис. 12.14. Типовий приклад очищення білка з використанням іонообмінної хроматографії (А), гель-фільтрації (Б) та афінної хроматографії (В)

13. ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНІ МЕТОДИ

В загальному розумінні *електрофорез* (від грец. *elektron* — смола, бурштин та *phoreo* — переносу) — це рух заряджених колоїдних частинок, спричинений дією зовнішнього електричного поля. Цей метод дозволяє розділити в рідинах з використанням певних носіїв молекули, які різняться між собою за величиною електричного заряду, просторовою конфігурацією, молекулярною масою (розмірами). В біохімічних дослідженнях електрофорез використовується для розділення різних молекул з метою ідентифікації і кількісного їх визначення, а також встановлення молекулярної маси і змін у складі молекул при заміні заряджених груп на незаряджені та навпаки.

Електричні заряди в молекулах виникають у результаті депротування або протування функціональних груп (залежно від значення рН), а також адсорбції ними іонів з розчину (утворення так званого подвійного електричного шару).

Принцип методу полягає в наступному: молекули, що знаходяться в буферному розчині, мають певний сумарний електричний заряд, величина і знак якого залежать від значення рН середовища (при значенні рН, при якому білки знаходяться в ізоелектричній точці, їх сумарний заряд дорівнює нулю). При пропусканні крізь буферний розчин електричного струму між електродами (анодом і катодом) виникає градієнт електричної напруги — формується електричне поле. Сила руху молекул визначається добутком напруженості електричного поля (E) і сумарного заряду молекули (Q), якій протистоїть сила в'язкості (F_b), що дорівнює $F_b = 6\pi\eta r v$ (η — коефіцієнт в'язкості; r — радіус (стоксовий) молекули; v — швидкість руху); в стаціонарному стані $E \cdot Q = 6\pi\eta r v$, питома рухомість $U = V/E = Q/6\pi\eta r$. Залежно від величини заряду і розмірів молекули мають різну швидкість руху, і це дозволяє розділити суміш досліджуваних речовин на зони однакових молекул, які мігрують з однією і тією ж швидкістю: $V = RE$, де: R — коефіцієнт пропорційності, який називається *електрофоретичною рухомістю* і чисельно дорівнює швидкості руху молекул при $E = 1$ В/см.

Якщо виключити електричне поле до того, як іони суміші, що досліджується, досягнуть електродів, її компоненти розподіляться відповідно до значення їхньої електрофоретичної рухливості.

Основними чинниками, які впливають на електрофоретичну рухомість молекул, є: властивості зразка, електричне поле, буферна суміш, природа і властивості носіїв.

Електрофоретична рухливість зростає зі збільшенням сумарного заряду, величина якого звичайно залежить від значення рН середовища. Чим більші за розмірами (молекулярними масами) молекули, тим менша їхня рухливість. Пов'язано це зі зростанням сил тертя і електростатичної взаємодії високомолекулярних сполук з оточуючим середовищем порівнянно з молекулами менших розмірів. Крім того через ці ж причини, молекули різної форми (наприклад, глобулярні та фібрилярні білки), але однакового розміру теж мають різну рухливість.

Чинники електричного поля (сила струму, напруга й електричний опір) також суттєво впливають на електрофоретичну рухливість молекул. Так, швидкість переміщення іонів зразка і буфера прямо пропорційна силі струму (I), який для відтворення результатів повинен бути постійним. Довжина шляху, який проходять іони, пропорційна часу пропускання струму.

Електрофоретична рухливість пропорційна електричній напрузі (E) або градієнту напруги (V/cm). Використовують як низькі (100–500 В), так і високі (500–10000В) напруги з градієнтом від 20 до 200 В/см.

Електричний опір (R) залежить від іонної сили буфера, кількості іонів зразка, типу і розміру носія. Так, зі збільшенням кількості іонів у системі і ширини носія електричний струм зменшується, а зі збільшенням довжини носія — збільшується.

Слід пам'ятати, що в процесі електрофорезу виділяється тепло, кількість якого за одиницю часу дорівнює I^2R , при цьому електричний опір зменшується. Таким чином, при постійній напрузі буде збільшуватися електричний струм (згідно із законом Ома $I = E/R$), що спричиняє підвищення температури і випаровування буфера, а також виникнення білок–білкових взаємодій. Для зменшення цього ефекту апарати для електрофорезу обладнуються повітрянепроникними кришками, а при необхідності — системою охолодження.

Буфери впливають безпосередньо на електрофоретичну рухливість молекул. Для ефективного відведення тепла доцільно використовувати буфери з низькою електропровідністю (трис–боратний, рН 8–9; трис–морфолінопропансульфат, рН 7–8, та ін.), хоча при цьому знижується швидкість міграції молекул.

Звичайно використовують буфери з сумарною іонною силою, яка лежить в межах концентрації 0,05–0,15 М. Це дає можливість піти на компроміс між низькою провідністю, яка дозволяє використовувати високу напругу, та нагрівом. Найпоширеніші форміатний, ацетатний, цитратний, вероналовий, фосфатний, піридиновий, трис– та ЕДТА–буфери.

Буфери, котрі заливають у дві камери, в яких розміщені електроди, як правило, ідентичні тому, що використовують для насичення носія, і від нього залежить певною мірою розділення.

Як носії, в порах яких відбуваються електрофорез, використовують однорідні і відносно інертні речовини, які насичуються відповідним буфером. При використанні носіїв однією з проблем є виникнення адсорбції — утримання молекул зразка носієм, як при адсорбційній хроматографії (див. розділ 12.1.). Це спричиняє розмивання зон на електрофореграмах, унаслідок чого зразок рухається не у вигляді смуги, а має вигляд "комети", тобто зменшується розділення.

Інша проблема — електроосмос, обумовлений виникненням відносного електричного заряду між молекулами води буферного розчину і поверхнею носія. Внаслідок цього з молекул води можуть виникнути іони гідроксонію (H_3O^+), здатні захоплювати нейтральні речовини і прискорювати рух катіонів до катода, а швидкість руху аніонів при цьому знижується. Необхідно вживати спеціальних заходів для того, щоб потік рідини не виніс за межі носія препарат, який досліджується. Крім того, електроосмос спричиняє розширення зон на електрофореграмах, що зменшує розділення.

Ще одна проблема, яка виникає при використанні як носіїв гелів, — це наявність *молекулярного сита*. Гелі складаються з молекулярних ланцюгів, котрі неупорядковано переплітаються і утворюють ситоподібну структуру. Розмір пор гелів, що виникли, може варіювати в певних межах. Так, у крохмальному, агаровому і поліакриламідному гелі молекули великого розміру рухаються крізь гель тим повільніше, чим менші розміри пор.

Конкретні причини виникнення розглянутих вище проблем при використанні носіїв, а також заходи щодо зменшення їхнього впливу будуть розглянуті при описі зонального електрофорезу (див. розділ 13.2)

Прилади для електрофорезу складаються з двох основних частин — джерела живлення і електрофоретичного блоку.

Від джерела живлення, що має систему контролю напруги і сили струму, надходить високостабільний постійний струм до електрофоретичного блоку.

Електрофоретичний блок складається з електродів, герметичної камери (при необхідності з прозорою кришкою), буферних камер, а також (залежно від конструкції приладів, яка визначається цілями електрофоретичних досліджень), має ще ряд пристроїв, особливості яких будуть розглянуті при описі схем приладів для конкретних методів електрофорезу.

Більшість біологічних речовин є безбарвними, тому для визначення місцеположення їх на електрофореграмі, ці речовини необхідно фарбувати після електрофоретичного розділення. Існує велика кількість барвників для конкретних речовин. Так, білки можна забарвлювати нігрозином з оцтовою (триоцтовою) кислотою, бромфенолом синім з оцтовою кислотою, кумасі G-250, данзилхлоридом, флюоресцаміном, 2-метокси-2,2-дифеніл-3-фураном, ортофта-левим альдегідом тощо. Нуклеїнові кислоти забарвлюють, наприклад, метиловим зеленим з піроніном, бромистим етидієм, акридином оранжевим, гомзидином синім тощо. Полісахариди можна фарбувати йодом, ліпопротеїди — суданом чорним в етанолі та ін. При освоєнні конкретного методу необхідно, виходячи з поставленої мети та завдань дослідження, вибрати барвник, який найбільше придатний за даних умов.

Якщо барвник кількісно взаємодіє з досліджуваною речовиною, то за його вмістом у пробі можна визначити кількість електрофоретично розділених речовин. Існує декілька таких методів. Так, можна з відповідної ділянки електрофореграми екстрагувати певним розчинником речовину, що досліджується, в комплексі з барвником, а потім визначити її вміст, наприклад, спектрофотометрично (див. розділ 11.2.). Одна з можливостей — це сканування електрофореграми за допомогою денситометра. Цей прилад дозволяє вимірювати кількість світла, яке пройшло крізь смужку носія. В свою чергу, ця кількість світла зв'язана зворотною залежністю з кількістю забарвленої речовини. Прилад калібрують з використанням таких електрофореграм, які містять відому кількість речовини, що досліджується, нанесеної на носії і обробленої барвником.

Локалізацію ферментів можна визначити і побічним шляхом. Для цього, наприклад, гель занурюють у розчин субстрату даного ферменту і, якщо продукт реакції забарвлений, визначають його місце розташування, а отже й розташування самого ферменту.

Місце розташування радіоактивних речовин після електрофоретичного розділення можна визначити методом авторадіографії або наступним чином: носій розрізають на шматочки, які містять окремі зони, а потім їх обраховують за допомогою рідинного сцинтиляційного детектора (див. розділ 14.4.).

Залежно від розмірів молекул, а також завдань їх розділення електрофорез поділяють на *безпосередньо електрофорез* — розділення відносно високомолекулярних речовин (раніше він називався *катафорезом*); *іонофорез* — переміщення в електричному полі низькомолекулярних сполук (широко використовується в медицині

для введення через шкіру і слизові оболонки лікарських препаратів, які являють собою іони); *електродіаліз* — відділення низькомолекулярних іонів від високомолекулярних; *електроосмос* — рух іонів крізь напівпроникну перетинку під впливом електричного поля.

Виділяють також *препаративний електрофорез* (його застосовують для одержання відносно великої кількості препаратів) і *аналітичний електрофорез* (для визначення компонентів у суміші, контролю чистоти та ін). За способом розміщення носіїв розрізняють *горизонтальний* і *вертикальний електрофорез*, а за величиною електричної напруги між електродами — *низьковольтний* (менше 500 В) і *високовольтний* (більше 500 В).

Залежно від мети біохімічних досліджень найчастіше використовують такі електрофоретичні методи: *фронтальний електрофорез* (або *метод рухомої межі*), *метод зонального електрофорезу* (або *електрофорез на носії*), *ізоелектрофокусування*, *ізотахофорез*, *імуноелектрофорез*.

Кожний з цих методів має ряд модифікацій, котрі в деяких випадках набувають певної самостійності. Основні з них: електрофорез у градієнті густини, в колонках, в блоці і неперервний (проточний), диск–електрофорез, на носіях — папері та аркушах ацетату целюлози, в тонких шарах, гелях тощо.

13.1. ФРОНТАЛЬНИЙ ЕЛЕКТРОФОРЕЗ

Фронтальний електрофорез (метод рухомої межі) є одним з перших, який набув широкого застосування. В цьому методі речовини, що досліджуються, присутні в усьому об'ємі буферного розчину. і розташування цієї речовини як функцію часу визначають оптичним методом. Реально визначають у часі розташування межі, яка віддаляє розчин речовини від розчинника, тобто визначають швидкість руху межі.

Принцип методу наступний. В U–подібну трубку під буферний розчин нашаровують розчин досліджуваної речовини, таким чином, щоб між двома розчинами утворилася межа розділення. В обидва коліна трубки вставляють електроди і з'єднують їх з джерелом живлення. При проходженні струму молекули речовини під дією електричного поля починають переміщуватися єдиним **фронтом**.

Основною частиною електрофоретичного блока є U–подібна вимірювальна комірка, розроблена А.Тизеліусом ще в 1937 р. (рис.13.1). Вона складається з нижньої, двох середніх і двох верхніх секцій, котрі можуть зсуватися в горизонтальному напрямку.

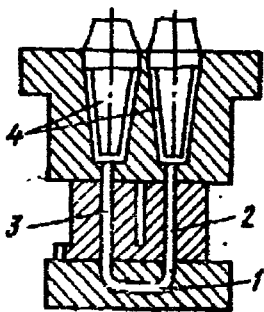


Рис 13 1 Схема U-подібної комірки до приладу Тизелуса

1 – нижня секція, 2 – середні секції, 3 – верхні секції, 4 – електроди

Після встановлення температури нижні комірки з'єднують з середніми, після чого утворюються дві чіткі межі між речовинами буфера і досліджуваної речовини. В одну з комірок електрода додають буферний розчин і при зменшенні його об'єму в другій електродній комірці виводять обидві межі на певний рівень у середніх секціях. Потім приєднують електроди до джерела живлення, вмикають його і за допомогою оптичної системи спостерігають за переміщенням межі з часом.

Концентрація розчинів буфера і досліджуваної речовини визначається доцільною напругою електричного поля (щоб вона була високою, але не спричиняла перегріву), а також стійкістю межі розділення розчинів. Звичайно використовують концентрацію електролітів у розчинах, як уже відзначалося, в межах 0,05–0,15 М.

У приладі для методу фронтального електрофорезу можуть використовуватися платинові, срібні або вугільні електроди. В практиці найчастіше використовують хлор–срібні електроди.

Для відведення тепла U-подібну комірку розміщують, як уже зазначалося в термостаті. Здебільшого використовують водяний термостат, в якому підтримують температуру біля 1°C.

Для спостереження за рухом межі розподілу розчинів буфера і досліджуваної речовини, використовують оптичні системи, принцип роботи яких базується на різниці оптичних властивостей цих розчинів — різниці в показниках заломлення, світлорозсіювання, спектрофотометрії у видимій і ультрафіолетовій областях тощо. Найпоширенішими є методи, які базуються на визначенні різниці показників заломлення — рефрактометричні (див. розділ 11.6).

При аналізі суміші речовин можна визначити її кількісний склад. Для цього вираховують відношення площин відповідних піків електрофореграми (рис. 13.2).

Однією з різновидностей вертикального електрофорезу в труб-

ках є електрофорез у буферному розчині, щільність якого підвищується з глибиною (електрофорез у градієнті щільності). Це досягається додаванням до буфера речовини різної концентрації, яка не дисоціює (як правило, сахарози). На певному рівні стовпчика буфера вузькою смугою вводиться досліджувана речовина. Після завершення електрофорезу стовпчик розділяють на фракції й аналізують. Саме розробка методу електрофорезу в градієнті щільності поклала початок ізоелектрофокуванню

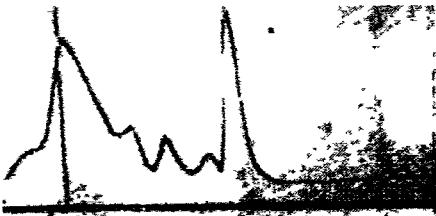


Рис 13.2 Електрофореграма сироватки крові людини, одержана методом фронтального електрофорезу (за Э Гааль и др , 1982)

Основними напрямками використання методу фронтального електрофорезу в біохімічних дослідженнях є:

- розділення речовин, зокрема білків;
- визначення електрофоретичної рухливості речовин, особливо білків; це має суттєве значення для діагностики патологій, за яких змінюється склад і електрофоретичні властивості білків крові, сечі, слини, спинномозкової рідини, шлункового соку тощо,
- визначення однорідних речовин;
- кількісне визначення асоціації або дисоціації речовин, утворення комплексів між ними.

Суттєвим обмеженням традиційного методу фронтального електрофорезу є його використання тільки для високомолекулярних речовин.

13.2. МЕТОД ЗОНАЛЬНОГО ЕЛЕКТРОФОРЕЗУ

Зональний електрофорез (електрофорез на носії, електрофорез у підтримуючому середовищі) дуже широко використовується в біохімічних дослідженнях завдяки високій роздільній здатності, великій швидкості, можливості розділення найрізноманітніших речовин — від білків, нуклеїнових кислот, вуглеводів, ліпідів до неорганічних сполук. Суть методу полягає в тому, що процес електрофорезу відбувається в порах твердого матеріалу. Цей матеріал повинен мати однорідні пори; бути механічно і хімічно стійким, не розчинятися в широкому діапазоні значень рН; мати незначну адсорбційну та електроосмотичну здатність.

Використання носіїв у зональному електрофорезі є основним, але не обов'язковим. Існує електрофорез зі стабілізацією зон обертання та певні модифікації проточного електрофорезу, де носії не використовуються.

Для зменшення адсорбції білків, використовуються, як правило, детергенти. Проте адсорбція, особливо білків, все ж таки може відбуватися. *Зворотна адсорбція* проявляється в уповільненні руху речовин і утворенні "хвостів" в електрофоретичних зонах, що ускладнює розділення і кількісний аналіз. *Необоротна адсорбція* спричиняє "слід" від адсорбованої речовини вздовж шляху її руху, що призводить до зменшення кількості речовини в електрофоретичній зоні.

Врахувати адсорбційну здатність матеріалу носія можна таким чином: спочатку проводять хроматографічні дослідження речовини на носії (без електричного поля) і встановлюють кількість речовини, яка утрималася на носії.

Існує багато різних типів носіїв: хроматографічний папір, аркушки ацетату целюлози, тонкі шари целюлози, окиси кремнію та алюмінію тощо, крохмальні, агарозні, агарові, поліакриламідні, змішані та інші гелі.

Для електрофорезу можна використати звичайний хроматографічний папір (див.розділ 12.2.). Електрофорез на папері найпростіший і він дуже широко застосовується для розділення цілого ряду речовин. Однак використання як носіїв замість паперу інших матеріалів, особливо гелів, забезпечує більшу роздільну здатність методу.

Ацетат целюлози має незначну адсорбуючу здатність, що дає можливість розділяти навіть незначні кількості речовин. Цей носій менш гідрофільний, ніж папір, тому він утримує меншу кількість буфера. Це обумовлює швидке розділення досліджуваних речовин, оскільки електричний струм у системі спричинений в основному іонами препарату.

Тонкі шари целюлози, окисів кремнію або алюмінію тощо. наносять на скляні пластинки таким же чином, як і при тонкошаровій хроматографії (див. розділ 12.3.).

Високе розділення вдається одержати при використанні гелів як носіїв. При гель-електрофорезі є незначними адсорбція, електроосмос і розширення електрофоретичних зон в результаті дифузії. Найчастіше гель-електрофорез проводять з аналітичною метою.

Крохмальні гелі готують при нагріванні й охолодженні частково гідролізованного крохмалю з буфером. Високопористі гелі утворюються при додаванні до буфера менше 2% (за масою) крохмалю, а низькопористі — від 8 до 15%. Як правило, крохмальні гелі наносять

на плексигласові пластинки для горизонтального або вертикального електрофорезу.

Агароза — це полісахарид, у полімерному ланцюгу якого чергуються β -D-галактопіраноза і 3,6-ангідро- α -галактопіраноза. Гелі утворюються при концентрації агарози в буфері більше 0,3%. Звичайно використовують 2% гелі, а з вищою концентрацією — для гель-фільтрації.

Агар — це суміш галактозних полімерів агарози і агаропектину. Концентрація їх у гелі дорівнює 1%. Агарові гелі містять велику кількість води, і тому вони зручні для розділення антигенів методом імуноелектрофорезу.

Поліакриламідні гелі (ПААГ) є найрозповсюдженішими у біохімічних дослідженнях завдяки таким характеристикам:

- розмір пор у цих гелях можна змінювати в широких межах;
- їх можна використовувати з найрізноманітнішими буферами;
- в них дуже низькі адсорбція і електросмос;
- розподіл проходить швидко з високим розділенням.

Поліакриламідні гелі отримують при полімеризації акриламіду ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$), як правило, з $\text{N,N}'$ -метилендіакриламідом [$\text{CH}_2(\text{NHCOOH} = \text{CH}_2)_2$] в присутності каталізатора (0,1–0,3% персульфату амонію, 0,1–0,3% β -диметиламінопропіонітрилу та ін.). Поліакриламідні гелі готують із загальним вмістом акриламіду від 3% (пори мають діаметр 0,5 нм) до 30% (пори — 0,2 нм).

Електрофорез у поліакриламідному гелі проводять у колонках (вертикальних трубочках) або на пластинках.

Для запобігання агрегації білків у розчин препарату і буфер вводять сечовину в концентрації 2,0–8,0 М. У концентрованих розчинах сечовини виникає денатурація білків (порушується вторинна і третинна структури). Як правило, така денатурація зворотня, але ступінь і зворотність денатурації залежить від природи білка і концентрації сечовини.

Особливо гідрофобні білки, наприклад, важкі ланцюги міозину здатні до агрегації навіть у присутності 8,0 М сечовини. Тому такі білки доцільно обробляти додатково речовинами, які мають детергентні властивості, наприклад фенолом.

Для визначення молекулярної маси білків широко використовують електрофорез у поліакриламідному гелі з детергентом додецилсульфатом натрію (ДДС–Na). За рахунок гідрофобних взаємодій детергент майже однаково зв'язується з більшістю білків і робить несуттєвою роль заряду самого білка. Електрофорез у присутності ДДС–Na дозволяє розділяти білки в залежності тільки від

одного параметра — молекулярної маси.

Одночасно з розділенням білків у досліджуваному препараті, проводять, як правило, електрофорез набору білків-маркерів з відомими молекулярними масами.

При горизонтальному електрофорезі (будова приладу наведена схематично на рис. 13.3), розділення можна проводити на

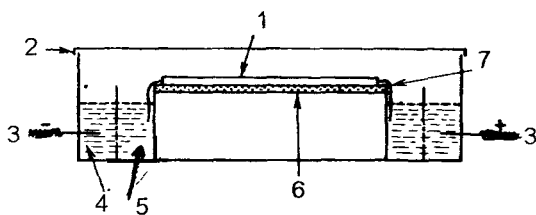


Рис. 13.3. Загальна схема будови приладу для горизонтального електрофорезу з використанням носіїв

1 — носій; 2 — кришка; 3 — електрод; 4 — електродне відділення; 5 — відділення для гноту-містка; 6 — ізолююча пластинка; 7 — гніт-місток

тка. Контакт між цими відділеннями здійснюється за рахунок маленьких отворів чи щілин у перегородках між відділеннями або за допомогою простих гнотів. Контакт між насиченим буфером-носієм і буфером, який знаходиться в камерах, підтримують за допомогою гнотів-містків. При використанні паперового носія ці містки не потрібні — контакт виникає за рахунок безпосереднього занурення паперу в буфер.

При вертикальному електрофорезі використовуються як носії аркушки паперу або ацетату целюлози, пластинки з тонкими шарами, гелю або оксиду кремнію, алюмінію тощо, які розміщують вертикально в спеціальних камерах. (рис. 13.4).

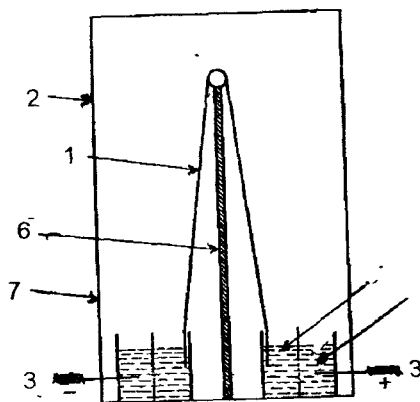


Рис. 13.4. Загальна схема будови приладу для вертикального електрофорезу на папері та пластинках гелів

1 — носій; 2 — кришка; 3 — електрод; 4 — електродне відділення; 5 — відділення для занурення носія; 6 — опора; 7 — камера

аркушках хроматографічного паперу або ацетату целюлози, в пластинках гелю і в тонкому шарі. Останні іноді додатково накривають ізолюючою пластинкою, щоб запобігти випаровуванню.

Обидві буферні камери, як правило, розділені на дві комірки — електродне відділення і відділення для гноту-містка.

У приладах певної конструкції для вертикального електрофорезу пластинки розміщують не під кутом, як це показано на рис. 13.4, а суворо вертикально.

У поліакриламідному гелі зразки при вертикальному електрофорезі розділяють на пластинках тільки при препаративному електрофорезі, а для аналітичних досліджень використовують циліндричні стовпчики гелю, які розміщують у калібрувальних скляних трубочках. Трубочки (12–18 штук), як правило, мають діаметр 5–6 мм, довжину — 10 см. У деяких випадках використовуються трубочки інших розмірів (діаметр 2,0–14,6 мм, довжина 7,5–30 см) їх встановлюють вертикально. Загальний вигляд приладу для гель-електрофорезу наведений на рис. 13.5.

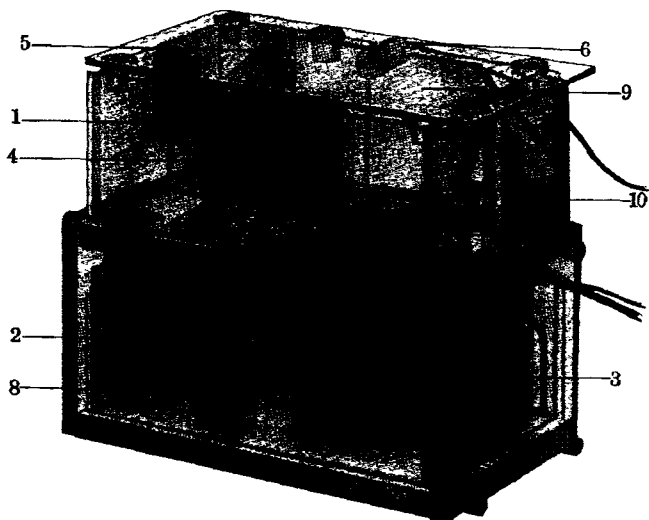


Рис. 13.5 Прилад для гель-електрофорезу в поліакриламідному гелі
1 і 2 – верхній та нижній буферні резервуари відповідно; 3 – бокові пластини;
4 – перегородка, яка розділяє буферні резервуари на робочу і електродну
комірки; 5 – тримачі для підведення електричного струму; 6 – закріплювач
проводів від джерела електричного струму; 7 – платиновий електрод, 8 –
скляні трубочки, 9 – кришка, 10 – автоматичний вимикач електричного струму

Розчин зі зразком наносять, як правило, мікропіпеткою у вигляді малої плями або вузької смуги. Якщо окремі компоненти досліджуваного препарату мають протилежні заряди, які будуть рухатися до різних електродів, то зразок наносять на пластинку або вводять у гель посередині. При горизонтальному електрофорезі зразки вводять у щілину або ямку, вирізану на поверхні гелю. У разі вертикального

електрофорезу зразок нашаровують на поверхню стовпчика гелю. При необхідності, як вже відзначалося, зразок включають у гель.

Аркушки паперу, смуги ацетату целюлози, тонкошарові пластинки після завершення електрофорезу висушують при кімнатній температурі або при температурі 110°C. Для видалення стовпчиків гелю з трубочок їх обводять струменем води під тиском зі шприца, виштовхують у трубочку і висушують.

Основні переваги поліакриамідного гель–електрофорезу полягають у тому, що можна необмежено пристосовуватися до будь–яких виникаючих потреб, можна варіювати концентрацією складових частин гелю, системою буферів та їхнім складом, концентрацією досліджуваної речовини, рН, електричними параметрами тощо. У випадку "двомірного" поліакриамідного гель–електрофорезу його можна проводити перпендикулярно до напрямку першого розділення. За інших умов, що додатково значно підвищує його роздільну здатність.

З наведених на рис. 13.6 результатів можна судити про роздільну здатність електрофорезу на папері, в крохмальному і поліакриамідному гелі. Для електрофорезу використовували один і той же зразок сироватки крові людини: на папері — 100 мкл проби, в крохмальному гелі — 80 мкл, в поліакриамідному гелі — 5 мкл.

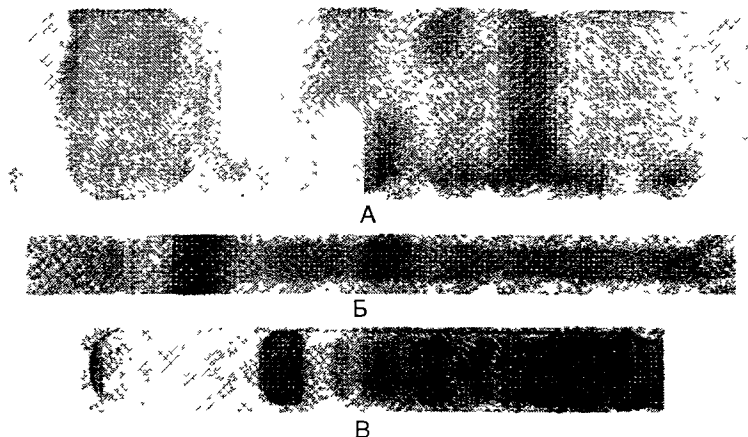


Рис 13.6 Порівняння роздільної здатності електрофорезу на папері (А), в крохмальному (Б) і поліакриамідному гелі (В)

Поліакриамідний гель є носієм у *диск–електрофорезі*. В цьому методі використовується неоднорідне переривчасте середовище гелю. На відміну від електрофорезу в однорідному середовищі, при диск–електрофорезі значення рН і розміри пор гелю неоднакові в

різних частинах колонки, таким чином, у верхній частині колонки. Верхній шар гелю (концентруючий) має більші розміри пор (меншу концентрацію) і готується у буфері з низькою іонною силою і різними значеннями рН. Нижній шар гелю (розділяючий) має малі розміри пор та інші значення рН. У верхньому шарі молекули речовин, що досліджуються, завдяки більшим порам рухаються швидше і затримуються менше, ніж у нижньому. Крім того, у верхньому шарі напруженість електричного поля більша завдяки більшому електричному опору, який створює менша іонна сила. Різниця значень рН теж створює ефект більшої швидкості руху речовин, які розділяються у верхньому шарі. Все це спричиняє утворення в гелі зон відповідно до компонентів, які розділяються, а саме до концентрації молекул з близькою рухливістю.

Метод диск–електрофорезу має переваги перед іншими методами зонального електрофорезу, оскільки в ньому використовується розділення речовин не тільки за їхньою рухливістю в гелі під дією електричного поля, а також завдяки ефекту молекулярного сита та ефекту концентрації.

Різновидністю низьковольтного електрофорезу є *неперервний (проточний) електрофорез*. Суть його полягає в тому, що зразок, розчинений або суспендований у буфері, неперервно наносять у верхній частині, як правило, на вертикально розміщений носій — аркушик паперу. Верхній край цього паперу занурюють у резервуар з буфером, причому весь папір попередньо змочують цим же буфером. Зразок під дією сили тяжіння рухається по паперу вниз і капає з зубців на нижньому краї паперу в ряд розміщених пробірок. Заряджені компоненти зразка під впливом електричного поля переміщуються в горизонтальному напрямку.

Цей метод потребує експериментального підбору умов проведення електрофорезу — швидкості току буферного розчину, його складу, рН, визначення місця нанесення зразка тощо. Він успішно використовується для розділення пептидів, амінокислот, інших невеликих молекул.

Для того, щоб виключити можливу адсорбцію на папері певних речовин, був розроблений метод *неперервного електрофорезу без носія*. Для цього буферний розчин постійно тече з резервуару між дуже близько розміщеними скляними пластинками. Через ряд конічних отворів на нижньому кінці відбираються різні фракції.

Таким чином, *електрофорез у тонкому шарі рідини (проточний електрофорез у вільному середовищі)* є різновидністю зонального електрофорезу без середовища підтримки.

Ще однією рідновидністю електрофорезу у вільному середовищі є *електрофорез зі стабілізацією зон обертання*. У цьому методі для запобігання конвекції (розмиття зон) використовується обертання електрофорезної трубки (до 40 об/хв.), яке запобігає конвекційному збуренню.

При розділенні методом електрофорезу низькомолекулярних речовин значно поліпшується розділення і процес протікає швидше, якщо використовувати *високовольтний електрофорез* (електрична напруга — до 10000 В, сила струму — до 500 мА). Однак при високовольтному електрофорезі виділяється велика кількість тепла і це потребує спеціальних методів охолодження. Одним з таких методів є метод "повного занурення", при якому носій (як правило, папір) занурюють у рідину для охолодження, яка не змішується з буфером (органічні розчинники — толуол, уайт-спірит та ін.) Ефективнішим є використання двох пластин (як правило, алюмінієвих), які через ізолюючі прокладки з поліетилену притискаються з двох боків до носія. Розміри цих пластин досягають 50X50 см, мають канали для циркуляції води.

13.3. ІЗОЕЛЕКТРИЧНЕ ФОКУСУВАННЯ

Ізоелектричне фокусування (ІЕФ, або ізоелектричне фракціонування, ізоелектричне розділення, ізоелектрична конденсація, стаціонарний електрофорез) — один з найефективніших і широко розповсюджених методів фракціонування та очищення білків. Суміш білків, які підлягають розділенню, вносять у колонку або наносять на пластину, заповнену електропровідною рідиною. Електричне поле впливає на молекули, що спричиняє міграцію їх уздовж поля в напрямку до анода або катода залежно від знака електричного заряду кожної молекули. Швидкість міграції молекул пропорційна напруженості електричного поля і електрофоретичній рухливості подібно до того, як це відбувається при фронтальному електрофорезі (методі рухомої межі), однак при ІЕФ відбувається ще додаткове розділення в градієнті рН. При переміщенні в градієнті рН амфотерних молекул їхній сумарний заряд буде змінюватися доти, поки вони не досягнуть положення, де він стає рівним 0 (молекула стає цвіттеріоном). Це відбудеться в тому місці градієнта рН, в якому молекули знаходяться в ізоелектричній точці. Таким чином, молекули, які мають однакову ізоелектричну точку, сконцентруються у вузькій зоні. Ця зона, якщо градієнт рН стабільний, буде зберігатися

доти, поки зберігається електричне поле.

Метод ІЕФ використовується не тільки для розділення, але і для визначення ізоелектричних точок білків. Необхідно виміряти значення рН у тій точці градієнта, де знаходиться зона білка, що досліджується, після завершення процесу ІЕФ.

Градієнти рН формують трьома принципово різними методами: 1) за допомогою амфолітів–носіїв; 2) шляхом формування температурного градієнту; 3) завдяки допоміжному градієнту концентрації органічної речовини.

Найпоширенішим є метод використання амфолітів–носіїв. У цьому випадку градієнт рН утворюється електричним полем. Середовищем, в якому відбувається ІЕФ, є водний розчин (1–2%) суміші великої кількості різних амфотерних молекул. Такі суміші випускаються під такими фірмовими назвами: амфоліни ("LKB–Producter"), фармаліти ("Pharmacia"), серваліти ("Serva"), біоліти ("Bio–Rad") тощо. Всі ці речовини є штучно синтезованим набором цвіттеріонів, мають різні значення ізоелектричної точки (у діапазоні від 2–3 до 10–11 одиниць рН). Вони повинні легко відділятися від молекул білків.

У методі ізоелектричного фокусування в градієнті температури колонку, в якій проходить розділення, заповнюють звичайним буферним розчином, але верхню її частину термостатують при значно вищій температурі, ніж нижню. Оскільки ступінь дисоціації слабкої основи або кислоти залежить від температури, то одночасно з градієнтом температури формується градієнт рН. Можливості цього методу обмежені високою чутливістю більшості білків до нагрівання.

В градієнті концентрацій органічних розчинників (етанол, гліцерин, діоксин та ін.) змінюються константи дисоціації компонентів буферних розчинів, що дозволяє створити градієнт рН в діапазоні приблизно 1,5 одиниці. Одним з перших методів стабілізації зон був ІЕФ у *градієнті щільності*, зокрема сахарози, в деяких випадках — гліцерину, етиленгліколю, фіколу та ін. Градієнт створюють внесенням у колонку для електрофокусування різних концентрацій сахарози. Колонку заповнюють за допомогою перистальтичного насосу. На дно колонки амфоліти потрапляють як правило, у 50% розчині сахарози, а до її верхнього кінця концентрація сахарози знижується до 5%.

Одна з модифікацій ІЕФ — так званий *конвекційний ІЕФ*, для якого використовують розчини, котрі містять тільки амфоліти–носії і попередньо не формують градієнт щільності сахарози.

Метод ІЕФ у поліакриламідному гелі має не меншу, а в деяких випадках і більшу роздільну здатність, ніж у градієнті щільності. Його

можливо проводити в будь-якому приладі для електрофорезу на пластинках або в стовпчиках гелю. Від електрофорезу в поліакриламідному гелі цей метод відрізняється тим, що гель містить амфоліти-носії. Особлива перевага ІЕФ у гелі полягає в тому, що цей метод легко можна поєднати з іншим — імунофорезом, електрофорезом у напрямку, перпендикулярному до переміщення молекул при ІЕФ, тощо.

Час фокусування в гелі менший, ніж у розчині з градієнтом щільності. Однак інші процедури (фіксація і фарбування білків, денситометрія або фотографування, вибір градієнта рН) займають багато часу і роблять ІЕФ у гелях менш точним, ніж у розчинах.

При розділенні білків з відносно великою молекулярною масою замість поліакриламідного гелю доцільно використовувати агарозу, яка має більші розміри пор і є міцнішою.

Методи використання тонких шарів гранульованих гелів зберігають усі переваги ІЕФ в гелі і мають ще ряд переваг. Так, у гранульованих гелях значно менше виявляється полімеризація. Це дає можливість розділяти білки з відносно великою молекулярною масою.

Неперервне ІЕФ в гранульованому підтримуючому середовищі є модифікацією цього методу. В даному випадку простір між двома пластинками заповнюють, як правило, сефадексом G-100, який містить амфоліни. Досліджуваний розчин і амфоліни подають до верхньої частини шару сефадексу, а в нижній розміщують ряд пробірок (до 54) для збирання фракцій білків.

Виявлення білків після їх розділення ІЕФ проводять тими ж методами, які використовуються після звичайного гель-електрофорезу, — забарвлення спеціальними барвниками з урахуванням того, що амфоліни здатні утворювати з ними комплекси.

Забарвлені білки визначають скануванням у видимій або ультрафіолетовій області спектра. При імуноелектрофорезі білки визначають за допомогою специфічних антигенів. Чутливості і вибіркової забарвлених білків після ІЕФ можна підвищити, використовуючи специфічні ферментативні реакції, результатом яких є забарвлені продукти. Взагалі, якщо білки становлять собою ферменти, то можна одержати ензимограми.

13.4. ІЗОТАХОФОРЕЗ

При *ізотахофорезі* (від ізо + грец. tachos — швидкість) всі заряджені молекули в електричному полі рухаються з однаковою

швидкістю. Спочатку вони розділяються відповідно до величини заряду і рухливості, а потім переміщуються в спектральному полі з однаковою і постійною швидкістю. Цей метод має дуже високу роздільну здатність і використовується як для аналітичного, так і для препаративного розділення речовин. В основі цього методу лежить принцип фронтального електрофорезу (метод рухомої межі). Залежно від конструкції наявного обладнання розділення проводять у горизонтальному або вертикальному напрямку. Розчин, в якому відбувається розділення, містить, як правило, сахарозу (для забезпечення більшої щільності). Суть ізотахофорезу полягає в наступному. Зразок вводять між *ведучим електролітом* (містить іони з більшою рухливістю, ніж у іонів зразка) і *закриваючим* (містить іони з меншою рухливістю, ніж у іонів зразка). Іони зразка ведучого і закриваючого електролітів мають однаковий знак заряду. Для досягнення необхідних значень рН і буферної ємності розчину зразка, ведучого і закриваючого електролітів мають відповідні протиіони. В електричному полі всі заряджені іони спочатку рухаються зі швидкістю, яка визначається напруженістю електричного поля, величиною заряду і рухливістю. Ведучі іони, які мають високу рухливість, рухаються з більшою швидкістю і накопичуються в зоні анода (якщо вони заряджені негативно). Зона ведучих іонів характеризується підвищеною концентрацією іонів з високою рухливістю. Відповідно до цього вона матиме найменший електричний опір, що спричинить низьку напруженість електричного поля. Зона ведучих іонів має також низьке значення рН і меншу температуру.

Внаслідок зменшення концентрації ведучих іонів за межами їхньої зони підвищується електричний опір у системі, що призводить до підвищення напруженості електричного поля. У зв'язку з чим підвищується швидкість міграції іонів зразка, які рухаються слідом за ведучими іонами.

Ведучі іони та іони зразка майже не змішуються. І ось чому. В ситуації, коли певна частина іонів зразка все ж таки потрапить у зону ведучих іонів, яка характеризується низькою напруженістю електричного поля через велику концентрацію іонів з високою рухливістю, то швидкість іонів зразка різко зменшиться, і вони "відстануть" від ведучих іонів; якщо ж ведучі іони попадуть у зону іонів зразка, то внаслідок високої напруженості електричного поля в цій зоні швидкість руху їх різко збільшиться, і вони опиняться в характерній для них зоні. Таким чином, унаслідок того, що зона зразка характеризується нижчою концентрацією іонів і меншою, ніж у

ведучих іонів рухливістю, але більшою напруженістю електричного поля і вищим значенням рН, відбувається "автоматична" стабілізація межі між зонами.

За іонами зразка рухаються замикаючі іони, котрі мають менший електричний заряд і рухливість, ніж іони зразка. Для них іони зразка є ведучими, тому вони не здатні їх випередити і також спричиняють звуження зони зразка.

В міру звуження зони зразка концентрація іонів у ній підвищується, відповідно зменшується її електричний опір, що призводить до падіння напруженості електричного поля в цій зоні. Такий процес буде відбуватися до моменту стабілізації системи, коли швидкість руху всіх іонів — ведучих зразка і замикаючих — стане рівною. Іони зразка будуть "стиснутими" між ведучими і замикаючими іонами у вузькій зоні, ширина якої і концентрація в ній іонів значною мірою залежить від концентрації і рухливості ведучих іонів.

Якщо зразок містить декілька іонів з різною рухливістю, то вони будуть розміщуватися між замикаючими і ведучими іонами в міру зменшення їхньої рухливості у вигляді дискретних зон, які контактують між собою, але містять тільки левні іони. Після досягнення рівноваги і розділення іонів зразка в системі виникає градієнт рН, напруженості електричного поля (E) і температури (t°) (рис. 13.7).

У випадку, коли рухливості іонів зразка близькі, роздільну здатність ізотахофорезу можна підвищити шляхом внесення у зразок амфолітів, подібних до тих, які використовуються при ізоелектричному фокусуванні; їх підбирають таким чином, щоб вони мали проміжну рухливість порівнянно з іонами зразка і розміщувалися між ними, що підвищує розділення.

Для аналізу низькомолекулярних іонів (амінокислот, нуклеотидів, низькомолекулярних білків тощо) використовують, як правило, аналітичний ізотахофорез у скляних або пластмасових трубочках (капілярах) і завдовжки 50–100 см з внутрішнім діаметром 0,4–0,6 мм. Як розділяючі іони використовують відповідні амфоліни, а також валін, аланін та інші речовини.

Ізотахофорез можна проводити й на смужках з ацетату целюлози і поєднувати з іншими видами електрофорезу.

Оскільки в зонах розділення створюються різні градієнти електричної напруги, в них виділяється неоднакова кількість тепла — чим менша напруженість електричного поля, тим менше виділяється тепла. Це явище використовується для виявлення зон при ізотахофорезі, для чого вимірюють їхню температуру термометром, термопарою, термістором тощо. Для визначення зон при ізотахофорезі

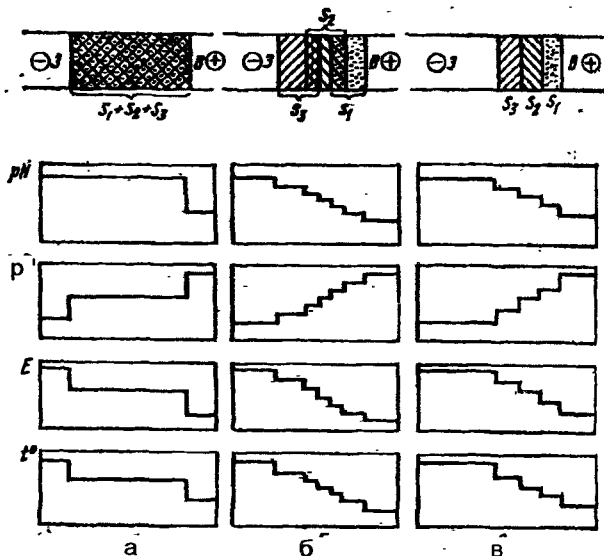


Рис. 13.7. Схематичне зображення зміни рН, рухливості (p), електричного поля (E) і температури (t°) в аніонній ізотахофоретичній системі (за Р.П. Виноградовою та ін., 1983)

а – початкові значення досліджуваних параметрів; б – через певний час після часткового розділення компонентів проби; в – після досягнення стабільного стану, коли відбулося повне розділення компонентів проби;

S_1, S_2 і S_3 – компоненти проби; В – електроліт з ведучими іонами; З – електроліт з замикаючими іонами

використовуються також детектори провідності градієнта електричного потенціалу (мікроелектроди). Речовини, здатні поглинати ультрафіолетове випромінювання, можна реєструвати високочутливими детекторами в цій області.

Широко розповсюдженим є метод препаративного ізотахофорезу в поліакриламідному гелі. Роздільна здатність його не нижче, ніж при диск-електрофорезі або ізоелектричному фокусуванні. Перевагою даного методу є те, що при цьому не відбувається осадження білків.

Для ізотахофорезу підбирають таку концентрацію гелю, при якій не виникає ефект молекулярного сита. Буферні суміші повинні бути такими, щоб компоненти зразка мали рухливість не нижче рухливості замикаючого іона. Місце розташування білків звичайно визначають за положенням барвників (метиленового синього і зеленого, бромфенолового синього тощо), за зміною рН гелю, за положенням межі, яка заломлює світло тощо.

13.5. ІМУНОЕЛЕКТРОФОРЕЗ

При імуноелектрофоретичному аналізі поєднують електрофорез з імунодифузією. Принцип цього методу полягає в наступному. Спочатку проводять електрофоретичне розділення суміші білків, синтетичних поліпептидів або деяких полісахаридів у гелі агарози чи поліакриламідному гелі. Замість гелів можна використовувати плівки ацетатцелюлози. Однак через особливості будови цих плівок може виникати так званий "фільтруючий ефект" (затримка макромолекул), який спричиняється до викривлення результатів. Після електрофоретичного розділення компонентів зразка у вирізану в гелі канавку, яка спрямована паралельно осі міграції, вносять специфічну, преципітуючу (від лат. praecipitatio — нестримне падіння) сироватку (імунову сироватку), яка містить антитіла. Антигени, які містяться в електрофоретично розділеному зразку, та антитіла з такої сироватки дифундують назустріч один одному і в місці їх взаємодії утворюють нерозчинні комплекси — преципітати у вигляді дуг, які мають еліпсоподібну форму (рис. 13.8). Число, положення і форма цих дуг дають уявлення про склад суміші антигенів у зразку.

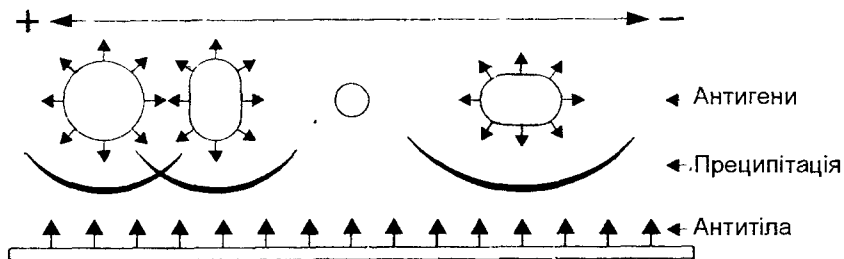


Рис 13 8 Принцип методу імуноелектрофорезу

Таким чином, за допомогою імуноелектрофорезу можна визначати тільки ті компоненти зразка, які здатні давати реакцію преципітації (осадження) з антитілами. Такими компонентами є *повні антигени* чи *гаптени* (утворюються після деградації певних модифікованих повних антигенів). При отриманні антитіл до нуклеїнових кислот при імунізації використовують нуклепротеїди або очищені нуклеїнові кислоти, ковалентно зв'язані з білком-носієм або адсорбовані на метильованому сироватковому альбуміні.

Використання барвників, які реагують з досліджуваними речовинами зразка, робить дуги преципітації помітнішими. Якщо ці

речовини містять якісь компоненти (метали, вуглеводи, ліпіди тощо), то за допомогою характерних для них хімічних реакцій можна визначити наявність цих компонентів і охарактеризувати будь-яку дугу преципітації.

Шляхом імуноелектрофорезу можна дуже повно і точно визначити компоненти складних сумішей за їхньою електрофоретичною рухливістю та імунологічною специфічністю. Крім того, цей метод дає уявлення про відносну концентрацію досліджуваних компонентів, а в деяких випадках — про їхні хімічні властивості та фізіологічну активність. Цей метод дозволяє визначити певний конкретний антиген без його виділення з суміші. Специфічність реакції преципітації дає можливість розділити речовини з однаковою електрофоретичною рухливістю, молекулярною масою, певними фізико-хімічними властивостями, а її висока чутливість — використовувати дуже малі кількості зразка для аналізу.

Основними об'єктами імуноелектрофоретичних досліджень є сироватка крові, сеча і спинномозкова рідина, а метою у таких дослідженнях — визначення станів, які супроводжуються наявністю патологічних білків, браком білкових компонентів.

Основні вимоги до проведення реакції преципітації такі:

— речовини, що досліджуються, повинні розчинятися у водному буферному розчині і бути антигеном або галтеном;

— імунна сироватка повинна містити достатню кількість антитіл, які преципітують (осаджують) досліджувані речовини, для виявлення максимальної кількості цих речовин іноді необхідно використати декілька сироваток;

— кількість антитіл повинна бути достатньою для вірогідного визначення необхідних параметрів.

Існує декілька видів (модифікацій) імуноелектрофорезу. Зокрема, широко розповсюджений метод, в якому використовують 1,5% агаровий гель, який наносять на предметне скельце для мікроскопа. За допомогою спеціальних шаблонів у шарі геля вирізають лунки для антигенів і канавки для імунних сироваток. Вирізані стовпчики гелю вилучають голкою або змивають водою. В утворені лунки вносять приблизно 2 мкл зразка і проводять горизонтальний електрофорез. Після завершення електрофорезу (для сироватки крові людини — 1,5–2,0 год при напруженості електричного поля 6–8 В/см) у повздовжні канавки вносять 30–40 мкл імунної сироватки. Імунодифузія продовжується не менше 24 год. Білки, які не беруть участі в преципітації, вилучають (тривалість елюювання — від 3 год до 3 діб) фізіологічним розчином або 0,15 М

розчином NaCl Після цього пластинку геля покривають фільтрувальним папером так, щоб не було пухирців повітря, і висушують при кімнатній температурі або в сушильній шафі при температурі не вище 40°C Після висушування папір знімають і забарвлюють білки амідочорним 10В або лісаміновим зеленим азокарміном В чи іншими барвниками Ліпопротеїди забарвлюють, як правило, суданом чорним В Після забарвлення проводять вимірювання преципітатів з метою ідентифікації антигенів та визначення їхньої кількості На рис 13 9 наведена імуноелектрофореграма білків сироватки крові людини, одержаної за допомогою імунної сироватки кроля до всіх білків сироватки людини

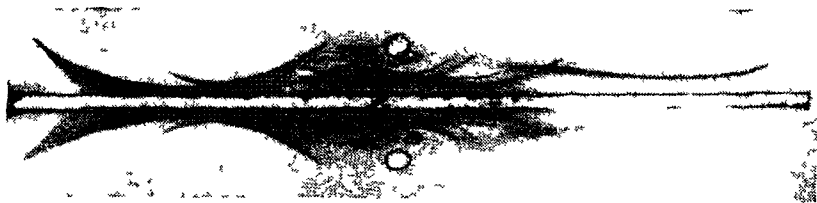


Рис 13 9 Імуноелектрофореграма сироватки крові людини

Одним з варіантів електроімунного аналізу є *електрофорез у гелі котрий містить антитіла* ("ракетний" імуноелектрофорез імуноелектрофорез за Лореллом) При виготовленні гелю (зокрема агарозного) його компоненти змішують з моноспецифічною антисироваткою і рівномірним шаром розподіляють по пластинці В одержаному гелі вирізують лунки, в які вносять суміш антигенів зразка Під дією електричного поля молекули антигенів пересуваються в гель, де взаємодіють з антитілами сироватки Внаслідок такої дії по краях рухомої області, яка містить молекули антигена, з'являються преципітати В процесі руху антигена його молекули поступово зв'язуються з антитілами, і утворюється витягнутий в довжину гострокінцевий преципітат — "ракета" (рис. 13 10) В стандартних умовах (постійні концентрація геля та його товщина, вміст антитіл,

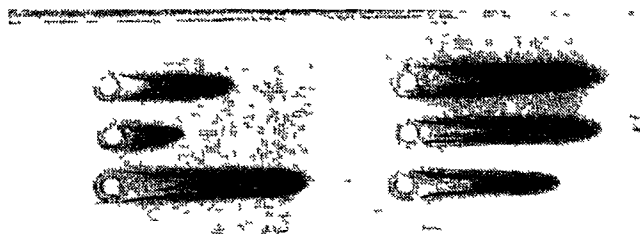


Рис 13 10 Імуноелектрофоретичне визначення концентрації альбуміну за методом Лорелла

напруга і сила струму) довжина смуги такого преципітату прямо пропорційна концентрації антигена. Це дає змогу кількісно визначати антигени.

Широко розповсюдженим методом є *двоірний імуоелектрофорез* (перехресний імуоелектрофорез за Лореллом). На його першому етапі проводять електрофоретичне розділення зразка (наприклад, білки сироватки крові) в гелі агарози, який містить імунну сироватку (антитіла). Потім розділені білки знову дифундують у гелі під дією електричного поля в другому напрямку, перпендикулярному першому. При взаємодії антигенів з антитілами утворюються преципітати у формі пків (рис. 13.11). Площа їх прямо пропорційна концентрації відповідного антигена в досліджуваному зразку. Слід відзначити, що площа цих пків також залежить від концентрації антитіл у гелі.

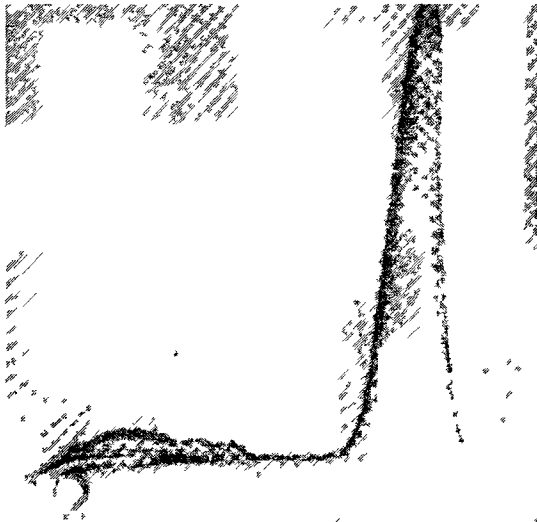


Рис. 13.11. Розділення білків сироватки крові людини методом двоірного імуоелектрофорезу.

Одним з варіантів імуоелектрофоретичного аналізу є використання чистих антигенів. Цей метод застосовується тоді, коли шляхом забарвлення не можна ідентифікувати невідомий антиген. У ньому порівнюють антиген, що досліджується, з відомим контрольним. Різниця в розташуванні і формі дуг преципітації дає можливість виключити не ідентичні антигени з відомим антигеном.

Певний антиген можна ідентифікувати за допомогою моно-

специфічної імунної сироватки. В цьому методі дуга преципітації, утворена на одному боці імуноелектрофореграми поліспецифічною сироваткою, може злитися з іншою дугою, утвореною на іншому боці моноспецифічною сироваткою. Таке злиття свідчить про ідентичність даного компонента суміші антигенів і того антигена, до якого була одержана моноспецифічна сироватка.

Існує ще ряд варіантів методу імуноелектрофорезу — метод Оссермана (використовується суміш відомих антигенів), метод Гереманса (в основі його лежить реакція двох різних антигенів з імунною сироваткою, яка містить антитіла до них обох) тощо. Той чи інший обирають залежно від мети дослідження, наявності необхідних контрольних антигенів моноспецифічних сироваток та ін.

В імунологічних дослідженнях використовують також методи, в основі яких лежить розділення антигенів тільки за рахунок дифузії (без додаткової дії електричного поля). І хоча вони не мають прямого відношення до імуноелектрофорезу, розглянемо бодай коротко основні з них.

В *методі простої лінійної імунодифузії* (за Уденом) гель, який містить імунну сироватку, розмішують в стаканчику, пробірці або трубочці. Стаканчики і пробірки занурюють у розчин, який містить антигени, а в трубочках ці антигени нашаровуються на гель. Антигени дифундують у гель і при взаємодії їх з антитілами утворюються преципітати, кількість яких залежить від кількості реагуючих антигенів і антитіл. Чим більший час дифузії, тим далі буде фронт преципітації від межі, яка розділяє гель і суміш антигенів зразка. Відстань, яку проходить фронт преципітації за певний проміжок часу при постійних умовах (концентрація імунної сироватки і самого геля, температура тощо), залежить від концентрації дифундуючого антигена. Це дає можливість визначити кількість антигена.

При *простій радіальній імунодифузії* імунну сироватку вводять рівномірно в гель, а в зроблені в ньому лунки вносять досліджуваний розчин, який містить антигени. Молекули антигена радіально дифундують у гель і при зустрічі з антитілами утворюють кільце преципітації. Діаметр кільця преципітації збільшується доти, поки в лунці є надлишок антигена.

При *подвійній радіальній імунодифузії* в шарі агарового гелю рівномірної товщини на певній відстані (4–10 мм) одна від одної роблять лунки (канавки) для суміші антигенів та імунної сироватки і заповнюють їх відповідними речовинами. Після цього антигени і антитіла дифундують у гель, де при взаємодії утворюють преципітати.

14. РАДІОІЗОТОПНІ МЕТОДИ

Інтенсифікація наукових досліджень у біохімії потребує розробки і впровадження нових високоєфективних методів. Серед широкого арсеналу фізичних і хімічних методів, які застосовуються в біохімічних дослідженнях, інтенсивно розвиваються методи з використанням *радіоактивних ізотопів (радіоізотопів, радіонуклідів)*. Основна перевага цих методів перед іншими фізико-хімічними — висока чутливість. Сучасна техніка методу радіоактивних міток дозволяє визначити вміст багатьох речовин в кількості до 10^{-12} моль/л. Інша важлива перевага цього методу — радіоізотопи можна вводити в живий організм і проводити дослідження інтактного організму. Так, метод подвійної радіоактивної мітки дозволяє одночасно спостерігати за двома сполуками або розпізнавати дві ідентичні речовини, які синтезуються в різний час; метод імпульсної мітки дозволяє спостерігати за сполуками після їх утворення без впливу на них конкурентно синтезованих речовин тощо.

Однак, метод радіоактивної мітки має і деякі обмеження. По-перше, радіоактивні речовини беруть участь у тих же біохімічних реакціях, що й відповідні їм звичайні речовини, проте швидкість реакцій з участю радіоізотопів може бути іншою, ніж для нерадіоактивних речовин (так званий радіоізотопний ефект). По-друге, кількість радіоізотопів в досліджуваному об'єкті має бути такою, щоб їх можна було ефективно реєструвати, однак випромінювання радіоізотопів не повинне впливати на організм. Крім того, слід враховувати те, що при введенні радіоактивної речовини в організм її рівень у ньому стає вище нормального, і це може вплинути на функціонування об'єкта, що досліджується.

Більшість обмежень методу радіоактивних міток можна враховувати в умовах експерименту і тому цей метод знайшов широке використання в біохімічних дослідженнях. У багатьох випадках він є саме таким, що дозволяє одержати необхідну інформацію.

У біохімічних дослідженнях метод радіоактивної мітки застосовують при вирішенні цілого ряду питань. Так, за допомогою радіоізотопів встановлюють шляхи метаболізму різних сполук. Речовина, яка мітиться радіоізотопом, вводиться в організм, а потім у визначені моменти часу експериментатори беруть проби, екстрагують з них продукти реакції та аналізують їх. Після ідентифікації мічених радіоізотопом речовин і визначення в них рівня

радіоактивності можна одержати інформацію про реакції, які беруть участь у метаболізмі.

Широко використовують метод радіоактивної мітки для кількісного визначення багатьох сполук, концентрацію яких іншими фізико-хімічними методами визначити не можна, оскільки ці сполуки присутні в дуже малих кількостях і часто в суміші з аналогічними сполуками. При радіоактивному розведенні рівень радіоактивності служить характеристикою концентрації радіоактивного матеріалу. В цьому методі до суміші будь-якої сполуки в кількості, наприклад, $N_{\text{докл}}$, додають невелику кількість цієї сполуки, міченої радіоізотопом (N_p) відомої активності (A_p). Питома радіоактивність суміші (A) у цьому випадку зменшиться: $A = A_p (N_p / N_p + N_{\text{докл}})$, тобто таким же чином, як концентрація звичайного реактиву при його розведенні розчинником. З наведеного вище рівняння після його перетворення можна визначити кількість нерадіоактивної сполуки:

$$N_{\text{докл}} = N_p \frac{A_p - A}{A}.$$

Перелік конкретних досліджень з використанням радіоізотопів у біохімії не обмежується зазначеними вище. Радіоізотопи широко використовуються в медицині (особливо для діагностики), у фармакології, екології тощо.

14.1. ПРИРОДА РАДІОАКТИВНОСТІ ТА ОСНОВНІ ТИПИ РАДІОАКТИВНИХ ПЕРЕТВОРЕНЬ

Німецький фізик Вільгельм Конрад Рентген 8 листопада 1895 року зробив відкриття, яке започаткувало цілу епоху в розвитку фізики. При дослідженні катодних променів у газорозрядній трубці він відкрив випромінювання невідомої природи, яке назвав *X-променями* (в подальшому *рентгенівське випромінювання*). На початку 1896 року французький вчений Анрі Беккерель з'ясував, що солі урану самочинно випромінюють промені, які засвічували фоточутливу пластинку, що була загорнута в світлонепроникний папір. У подальшому було з'ясовано, що це було випромінювання радіоізотопів урану та продуктів їхнього розпаду. Завдяки роботам французького вченого П'єра Кюрі та його дружини (польки за походженням) Марії Склодовської-Кюрі (в 1898 році відкрили нові хімічні елементи полоній і радій), а також англійця Ернеста

Резерфорда та цілої групи талановитих фізиків було відкрито явище *радіоактивності* (від лат. radiare — випромінювати та activus — діяльний) — самочинне перетворення ядер атомів одних хімічних елементів в ядра інших, яке супроводжується викидом частинок або електромагнітного випромінювання, а також поділ ядер.

Як відомо, ядра атомів складаються з двох основних елементарних частинок: *позитивно заряджених частинок* — протонів (р) і електронейтральних — нейтронів (п). Виняток становить тільки ядро водню (Гідрогену), яке містить один протон. Число протонів в атомі хімічного елемента називають його атомним номером (позначають, як правило, літерою Z), а суму протонів і нейтронів — масовим числом (A). Звичайно хімічні елементи позначають наступним чином: ${}^A_Z X$, де: X — символ хімічного елемента, A — масове число, Z — атомний номер.

Атоми одного і того ж хімічного елемента, ядра якого містять однакове число протонів, але різне число нейтронів, тобто різні значення масового числа (A), і однакові значення атомного номера (Z), називаються *ізотопами*. Ізотопи мають подібні хімічні властивості, але відрізняються за своїми фізичними властивостями, зокрема стабільністю (сталістю) і розповсюдженням. Існують стабільні ізотопи і нестабільні (здатні до перетворення). Саме нестабільним ізотопам і притаманне явище радіоактивності. Вони (радіоізотопи) після одного або декількох розпадів перетворюються на стабільні. Явище радіоактивності, властиве природним радіоізотопам, називається *природною радіоактивністю*. Відомі радіоізотопи всіх хімічних елементів.

В 1919 році Е.Резерфорд встановив, що при опроміненні атомів азоту (Нітрогену) ядрами атома гелію можуть утворюватися атоми кисню (Оксигену). Таким чином, була відкрита можливість штучного перетворення одних хімічних елементів в інші. В цьому процесі утворюються нестабільні (радіоактивні) ізотопи. Притаманна штучно утвореним хімічним елементам радіоактивність називається *штучною радіоактивністю*. В даний час чітко ідентифіковано 13 штучних хімічних елементів і всі вони є радіоактивними.

При вивченні природи радіоактивності було встановлено, що радіоактивне випромінювання поділяється на такі основні види:

1. **Корпускулярне і фотонне випромінювання.** В першому випадку при перетворенні ядер радіоізоотопів випромінюються частинки — ядра атома гелію, електрони, позитрони, нейтрони, протони та ін. При фотонному (електромагнітному) випромінюванні внаслідок зміни енергетичних рівнів ядра з нього вилітають γ -кванти

(фотони).

2 **Альфа-випромінювання (α -промені)** — корпускулярне випромінювання, яке складається з α -часток (ядер атома гелію, ${}^4_2\text{He}^{2+}$), котрі виникають при розпаді ядер радіоізоотопів чи при ядерних реакціях.

3. **Бета-випромінювання (β -промені)** — корпускулярне електронне (e^- , ${}^0_{-1}\beta$) або позитронне (e^+ , ${}^0_{+1}\beta$) випромінювання з безперервним енергетичним спектром, що виникає при перетворенні ядер радіоізоотопів або нестабільних частинок.

4. **Гамма-випромінювання (γ -промені)** — короткохвильове електромагнітне випромінювання з довжиною хвиль менше 0,1 нм, що виникає при розпаді ядер радіоізоотопів, переході ядер із збудженого стану в основний, анігіляції електронно-позитронних пар, при взаємодії швидких заряджених частинок з речовиною (гальмівне випромінювання) тощо.

5. **Гальмівне випромінювання** — електромагнітне (фотонне) випромінювання з безперервним енергетичним спектром, яке виникає при розсіюванні (гальмуванні) швидких заряджених частинок у кулонівському полі ядер атомів та орбітальних електронів.

6. **Характеристичне випромінювання** — електромагнітне (фотонне) випромінювання з дискретним енергетичним спектром, яке виникає при зміні енергетичного стану орбітальних електронів атому.

7. **Рентгенівське випромінювання** — електромагнітне (фотонне) випромінювання з довжиною хвилі 10^{-5} – 10^{-2} нм, яке виникає при гальмуванні швидких електронів у речовині (безперервний енергетичний спектр) та при переході електронів із зовнішніх електронних оболонок атома на внутрішні (дискретний спектр, характеристичне випромінювання).

8. **Іонізуюче випромінювання** — будь-яке випромінювання (корпускулярне чи фотонне), яке при взаємодії з речовиною безпосередньо або опосередковано спричиняє утворення електричних зарядів різних знаків (іонізацію) та збудження атомів і молекул цієї речовини.

Експериментально встановлено, що число ядер атомів кожного радіоізоотопу, яке розпадається за одиницю часу, пропорційне числу ядер атомів цього радіоізоотопу, яке не розпадається до даного моменту часу. Таким чином, швидкість зменшення кількості радіоактивних атомів ($-dN/dt$, де: dN – число розпадів за проміжок часу dt) пропорційне числу атомів радіоізоотопу (N):

$$-\frac{dN}{dt} = \lambda N,$$

де: λ — коефіцієнт пропорційності, який називається постійною часу розпаду; він характеризує вірогідність розпаду і дорівнює частці радіоактивних атомів, що розпадаються за одиницю часу.

При інтегруванні цього рівняння в межах від $t=0$ ($N=N_0$ — первісне число радіоактивних атомів) до $t=t$ ($N=N_t$ — число радіоактивних атомів у момент часу t), отримуємо:

$$\ln \frac{N_t}{N_0} = -\lambda t \text{ або } N_t = N_0 e^{-\lambda t}.$$

Останнє рівняння називають чисельним виразом закону радіоактивного розпаду.

Загальноприйнято радіоактивний розпад характеризувати періодом напіврозпаду ($t_{1/2}$) — часом, за який кількість радіоактивних атомів даного радіоізоотопу зменшується вдвоє, тобто коли $N_t / N_0 = 2$. Підставляючи цей вираз у наведене вище рівняння, отримуємо:

$$\ln \frac{N_t}{2N_0} = -\lambda t \text{ або } t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda} = \frac{0,693}{\lambda}.$$

Чисельні значення $t_{1/2}$ для різних радіоізоотопів змінюється в широких межах. Так, для $^{204}_{82}\text{Pb}$ $t_{1/2} = 10^{19}$ років, а для $^{212}_{84}\text{Po}$ — $3 \cdot 10^{-7}$ секунд.

Швидкість радіоактивного розпаду характеризує активність радіоізоотопу (A), тобто число розпадів ядер атомів (dN) за певний проміжок часу (dt):

$$A = dN/dt.$$

У СІ (Інтернаціональній системі вимірювання одиниць) за одиницю активності радіоізоотопу приймають Беккерель (Бк) — одне перетворення ядра елемента за секунду (с^{-1}). Широко використовується також позасистемна одиниця радіоактивності — Кюрі (Ки , K_1), яка дорівнює числу розпадів, що відбуваються за 1 сек в 1 г радю, а саме $3,7 \cdot 10^{10}$ розпадів за секунду. Часто в біохімічних дослідженнях активність радіоізоотопу виражають числом розпадів радіоізоотопу за хвилину — dpm (аббревіатура від словоскорочення англійською мовою).

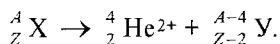
$$1\text{Ku} = 3,7 \cdot 10^{10} \text{Бк} = 2,22 \cdot 10^{12} \text{dpm} .$$

В ядерних реакціях енергетичні співвідношення звичайно виражають в електронвольтах (eВ). Один електровольт (1 eВ) — це енергія , яку отримує електрон в електричному полі з різницею потенціалів 1В :

$$1\text{eВ} = 10^{-3} \text{KeВ} = 10^{-6} \text{MeВ} \cong 1,6 \cdot 10^{-19} \text{Дж} .$$

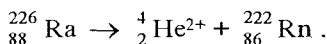
Відповідно до видів випромінювання при радіоактивному розпаді ядер атомів розрізняють декілька типів радіоактивних перетворень. Основні з них:

Альфа-розпад (α -розпад). Цей тип радіоактивного розпаду характерний для радіоактивних елементів з великим атомним номером (урану, плутонію, америцію та ін.). Внаслідок цього розпаду відбувається випромінювання α -частинки (ядра атома гелію, ${}^4_2\text{He}^{2+}$). В загальному вигляді перетворення ядра атома при α -розпаді можна представити наступним чином:



де (тут і надалі): X – символ вихідного хімічного елемента, Y – символ атома продукту розпаду.

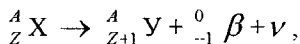
Прикладом α -розпаду є перетворення радію в родон:



Середня енергія α -частинок, які випромінюються при перетворенні ядер природних радіоактивних елементів, — 4–6 MeВ.

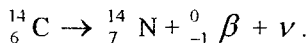
Випромінені α -частинки за своєю енергією можуть бути однорідними або розподілятися на групи. Останнє пов'язано з тим, що при розпаді вихідного ядра атома радіоізоотопу виникають збуджені ядра продуктів розпаду, які при переході в основний стан випромінюють додатково γ -промені.

1. Електронний β -розпад. Цей тип розпаду характерний для природних і штучних радіоізоотопів. Він виникає внаслідок того, що ядро атома випромінює електрон, і при цьому відбувається втрата нейтрона і придбання протона. Спряжено з випромінюванням електрона відбувається випромінювання елементарної частинки нейтрино. Тому енергетичний спектр електронів безперервний. Сумарна енергія β -частинок і нейтрино (ν) дорівнює максимальній енергії ($E_{\text{макс}}$), яка характерна для даного радіоізоотопу. В загальному вигляді електронний β -розпад можна представити наступним чином:



де: ${}^0_{-1} \beta$ — електрон (e^-), ν — нейтрино.

Прикладом електронного β -розпаду може бути перетворення вуглецю в азот:



У деяких випадках при електронному β -розпаді ядро продукту може знаходитися в збудженому стані, і при поверненні в основний стан відбувається додатково випромінювання γ -квантів.

Енергетичні спектри електронів, які випромінюються при розпаді ядер атомів, котрі найчастіше використовуються в біохімічних дослідженнях радіоізоотопів ${}^3_1 H$, ${}^{14}_6 C$ і ${}^{32}_{15} P$, наведені на рис. 14.1.

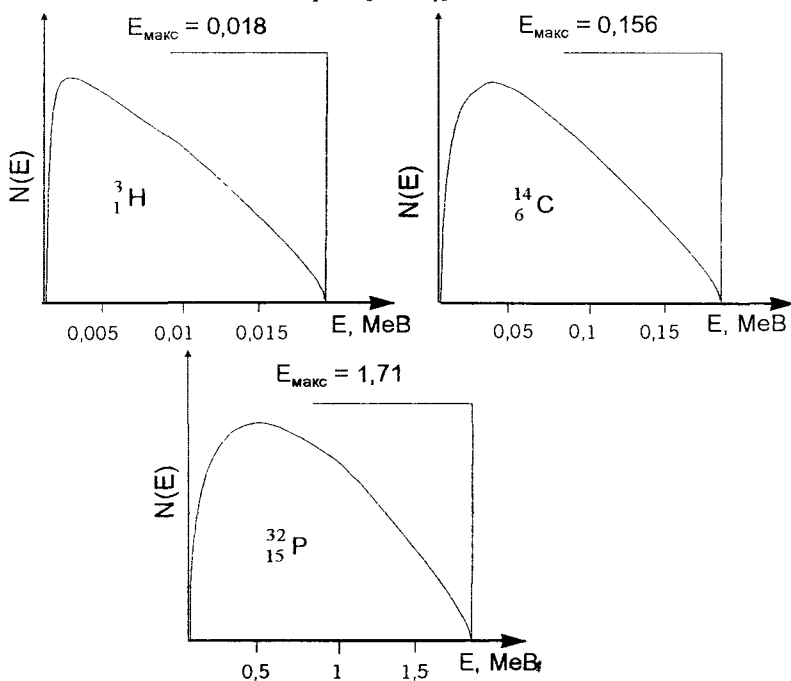
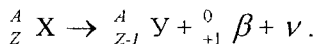


Рис. 14.1 Енергетичні β -спектри ${}^3_1 H$, ${}^{14}_6 C$ і ${}^{32}_{15} P$:

E — енергія електронів, MeB, $N(E)$ — число випромінених електронів з енергією E

2. **Позитронний β -розпад.** Цей тип розпаду спостерігається в деяких штучних радіоізотопів. У результаті цього розпаду ядро атома випромінює позитрон, і при цьому відбувається втрата протона і придбання нейтрона. Аналогічно електронному β -розпаду, спряжено з випромінюванням позитрона відбувається випромінювання нейтрино. Тому енергетичні спектри позитронів теж безперервні. В загальному вигляді позитронний β -розпад можна представити так:



де: ${}^0_{+1} \beta$ — позитрон (e^+), ν — нейтрино.

Прикладом позитронного β -розпаду є перетворення натрію в неон:

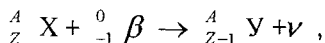


Позитрони є нестабільними елементарними частинками. Після втрати кінетичної енергії вони взаємодіють з електронами, і відбувається реакція анігіляції — перетворення електрона і позитрона у два γ -кванти, які розлітаються в протилежних напрямках. Крім того, ядро продукту розпаду може бути в збудженому стані, і при переході його в основний стан випромінюються додатково γ -кванти.

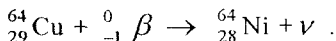
3. **Гамма-розпад (γ -розпад).** Цей тип розпаду характерний для природних і штучних радіоізотопів. Він виникає внаслідок енергетичних перетворень ядер певних атомів з виділенням електромагнітного випромінювання (γ -квантов) довжиною хвилі менше 0,1 нм. У цьому розпаді атомний номер і масове число ядра атома не змінюється. Змінюється тільки енергетичний стан ядра.

Випромінювання γ -квантів відбувається також, як уже відзначалося, при переході ядер атомів із збудженого стану в основний, при анігіляції, а також при взаємодії швидких заряджених частинок з речовиною (гальмівне випромінювання) внаслідок розсіювання цих частинок у полі ядра або орбітальних електронів (виникають збуджені стани).

4. **K-захоплення.** В цьому процесі відбувається захоплення ядром атома орбітального електрона з найближчої до нього K-оболонки. В результаті цього атомний номер зменшується на одиницю, а масове число не змінюється. Цей тип перетворення, як і β -розпад, супроводжується випромінюванням нейтрино. В загальному вигляді K-захоплення можна представити таким чином:



де: ${}^0_1\beta$ — електрон з К-оболонки атома, ν — нейтрино.
Прикладом К-захоплення є наступне перетворення міді в нікель:



При К-захопленні виникає γ -випромінювання (характеристичне), обумовлене захопленням електрона з К-оболонки.

5. Самочинний поділ ядер. Це явище спостерігається в радіоізотопів з великим атомним номером. Внаслідок цього утворюються радіоактивні осколки і випромінюються (в основному) α -частинки, нейтрони, γ -кванти. Одним з варіантів поділу ядер є примусовий поділ ядер, який виникає при захопленні ядрами радіоізотопів з великим атомним номером (${}^{235}_{92}\text{U}$, ${}^{239}_{94}\text{Pu}$) нейтронів. Це явище використовується для створення ланцюгової реакції в ядерних реакторах та для вибуху ядерної (інколи її називають атомною) бомби.

6. Ядерний синтез. Синтез ядер (термоядерний синтез) з легких хімічних елементів (об'єднання їх у ядра більш важких елементів) протікає при температурі декілька мільйонів градусів і відбувається на Сонці та інших зірках. Прикладом штучного створення ядерної реакції синтезу є вибух водневої бомби, в якій для створення високої температури використовують вибух ядерної бомби.

У біологічних (в тому числі і біохімічних) дослідженнях процеси поділу і синтезу ядер не використовуються.

Взаємодія радіоактивного випромінювання з речовиною. Випромінювання різних видів, яке виникає при перетворенні ядер радіоізотопів, супроводжується вивільненням неоднакової кількості енергії і має різну проникаючу здатність.

Енергія α -випромінювання при взаємодії з речовиною витрачається на збудження атомів та молекул, а також на іонізацію атомів. Ці процеси відбуваються в результаті непружних зіткнень α -частинок з орбітальними електронами атомів. В окремих випадках α -промені можуть взаємодіяти з ядрами атомів речовини, і при цьому виникають ядерні реакції.

Довжина пробігу (R_α) α -частинок в речовині залежить від багатьох чинників — початкової енергії, атомного номера, густини речовини тощо. При розрахунках R_α визначають з експериментальних формул. Так, для повітря за нормальних умов R_α для α -частинок з енергією в межах 3–8 МеВ може бути розраховано з точністю до 5% за формулою Гелігера:

$$R_{\alpha} = \frac{\sqrt{E_{\alpha}^3}}{3}, \text{ см.}$$

В інших середовищах R_{α} може бути розрахована за формулою Брега:

$$R_{\alpha} = \frac{\sqrt{A \cdot E_{\alpha}^3}}{\rho}, \text{ мкм}$$

або Глессена:

$$R_{\alpha} = \frac{A \sqrt{E_{\alpha}^3}}{\rho^3 Z^2}, \text{ мкм,}$$

де: E_{α} — енергія α -частинок, МеВ; A — атомна маса (г); Z — атомний номер, ρ — густина речовини (г/см^3).

Число пар іонів, яке виникає в процесі іонізації на одиницю шляху пробігу α -частинок, залежить від глибини проникнення випромінювання в речовину. На початку пробігу питома іонізація залишається майже незмінною, а зі зниженням енергії α -частинок вона різко зростає і досягає максимуму в кінці шляху. В α -частинок відносно велика маса і заряд, тому вони мають невисоку проникаючу здатність. Так, для α -частинок з енергією 4 МеВ довжина пробігу в біологічних тканинах становить у середньому 30 мкм.

При проходженні β -частинок крізь речовину виникає як пружна, так і непружна взаємодія їх з атомами і молекулами речовини. Зміна кінетичної енергії β -частинок на одиницю довжини пробігу в речовині (лінійна втрата енергії) пропорційна густині й атомному номеру речовини, а також коефіцієнту взаємодії, котрий є лінійною функцією $\ln E_{\beta}$. Питома густина іонізації, яка створюється β -частинками, приблизно в 10^2 разів менша, ніж для α -частинок з тією ж енергією. Для розрахунків довжини пробігу (R_{β}) β -частинок в речовині використовують експериментально встановлені формули.

Так, для повітря: $R_{\beta} = 400 E_{\beta}$ см, де: E_{β} — енергія β -частинок, МеВ.

Для легких речовин (алюміній, скло та ін.) при $E_{\beta} < 0,5$ МеВ:

$$R_{\beta} = 0,2 E_{\beta}, \text{ см,}$$

а при $E_{\beta} > 0,5$ МеВ:

$$R_{\beta} = 0,1 E_{\beta}, \text{ см.}$$

Для β -частинок з енергією 4 МеВ довжина пробігу у повітрі становить приблизно 17,8 м, у воді — 2,6 мм.

При проходженні γ -випромінювання крізь речовину в результаті

взаємодії γ -квантів з атомами речовини зменшується їхня інтенсивність. Встановлено, що число γ -квантів (dl), які убувають внаслідок взаємодії γ -випромінювання з речовиною, пропорційне шару речовини (dx), крізь який вони проходять, і числу фотонів, які первісно взаємодіють з поверхнею речовини (I):

$$dl = -\mu I dx,$$

де: μ — коефіцієнт пропорційності, який називається *коефіцієнтом ослаблення*.

Якщо γ -випромінювання має одну енергію (монохроматичне), то μ є сталою величиною і тоді при інтегруванні наведеного вище рівняння одержуємо:

$$I_x = I_0 e^{-\mu x}$$

де: I_0 — густина потоку γ -квантів на поверхні речовини, тобто коли $x = 0$; I_x — густина потоку γ -квантів на глибині речовини x .

В області енергії γ -квантів від 50 KeV до 50 MeV головне місце мають такі процеси взаємодії їх з речовиною:

— при енергії 50–500 KeV переважає фотоелектричний ефект, при якому γ -квант передає свою енергію орбітальному електрону. В цьому процесі частина енергії γ -квантів втрачається на переборювання зв'язку орбітального електрона;

— в області енергії γ -квантів 1 MeV виникає розсіювання γ -квантів орбітальними електронами, і переважаючим є ефект Комптона;

— при енергії γ -квантів більше 1 MeV переважаючим видом їх взаємодії з речовиною є утворення електронно-позитронної пари. В цьому процесі γ -квант у полі ядра або орбітального електрона зникає, і народжується пара — електрон і позитрон. Останній при зниженні енергії анігілює.

Ці процеси взаємодії γ -квантів з речовиною можуть проходити незалежно один від одного, тому повний коефіцієнт ослаблення (μ) дорівнює сумі коефіцієнтів ослаблення для фотоэффекту, розсіювання й утворення пар. Відносне значення кожного з наведених видів взаємодії γ -квантів з речовиною залежить від енергії γ -квантів, атомного номера і густини речовини тощо.

Рентгенівське і γ -випромінювання мають високу проникну здатність, і довжина їхнього пробігу (R_γ) в повітрі досягає сотень метрів (при $E_\gamma = 4\text{MeV}$ R_γ у повітрі — 800 м). Числові значення кратності ослаблення різних за товщиною матеріалів для різних за

енергією γ -квантів наведено в довідниках із захисту від іонізуючих випромінювань.

При поділі ядер і ядерних реакціях можуть виникати, як уже відзначалося, й інші види випромінювання (протонів, нейтронів, мезонів та ін.). Ці випромінювання не використовуються в біохімічних дослідженнях, а питання взаємодії їх з речовиною викладені в спеціальній літературі з ядерної фізики та довідниках із захисту від радіоактивного випромінювання.

14.2. ПРИНЦИПИ ВИКОРИСТАННЯ РАДІОІЗОТОПІВ У БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

Вибір типу ядерного розпаду і конкретного радіоізоотопу для біохімічних досліджень обумовлений декількома причинами. Основні з них: 1) мета та завдання досліджень (необхідно використовувати ті радіоізотопи і мічені ними сполуки, котрі беруть участь у досліджуваних процесах); 2) існуюча техніка радіоактивного аналізу (насамперед наявність високоефективних детекторів (лічильників)) випромінювання радіоізоотопів або фотоемальсій і апаратури для дешифрування треків при авторадіографічному методі визначення локалізації радіоізоотопів в об'єктах досліджень); 3) наявність відповідних навичок роботи з радіоактивними речовинами, а також відповідне медичне свідоцтво на право такої роботи. Крім того, в кожному конкретному випадку дослідник при плануванні експериментальних досліджень з радіоактивними речовинами повинен критично оцінити можливість одержання вірогідних результатів.

У біохімічних дослідженнях при використанні методу радіоактивної мітки з декількох типів радіоактивних розпадів найчастіше використовують β - і γ -розпади. Використання α -випромінюючих радіоізоотопів обмежене: по-перше, внаслідок малої проникаючої здатності α -частинки сильно поглинаються самим зразком, тому високоефективна реєстрація їх неможлива; по-друге існує лише невелика кількість α -випромінюючих радіоізоотопів, які можна використовувати в біохімічних дослідженнях.

Основні характеристики радіоізоотопів, які звичайно використовуються в біохімічних дослідженнях, наведені в таблиці 14.1.

Таблиця 14.1. Основні характеристики радіоізотопів, які використовуються в біохімічних дослідженнях.

Радіоізотоп	Тип випромінювання	$E_{\text{макс.}}$ МеВ	Період напіврозпаду
${}^3_1\text{H}$	β	0,018	12, 35 рока
${}^{14}_6\text{C}$	β	0,156	5730 років
${}^{22}_{11}\text{Na}$	β γ	1,39 1,70; 2,75	2,6 рока
${}^{32}_{15}\text{P}$	β	1,71	14,29 доби
${}^{35}_{16}\text{S}$	β	0,167	87,44 доби
${}^{45}_{20}\text{Ca}$	β	0,254	163 доби
${}^{60}_{27}\text{Co}$	γ	1,17; 1,33	5,271 рока
${}^{131}_{53}\text{I}$	β γ	0,335; 0,60 0,284; 0,364; 0,637	8,04 доби

В даний час виробляється багато радіоактивних препаратів, які дозволяють вирішувати найрізноманітніші завдання біохімії.

Використання в наукових дослідженнях методу радіоактивних міток базується на двох основних положеннях: 1) за час проведення досліді кількість радіоізоотопу в зразку зменшується несуттєво (розпадається набагато менша кількість, ніж залишається), а це означає, що вірогідність випромінювання будь-яким ядром радіоізоотопу протягом реального часу спостереження набагато менше одиниці; 2) в зразку, який містить велику кількість радіоізоотопу, середнє число ядерних перетворень, котрі супроводжуються випромінюванням, що реєструється детектором радіоактивності, пропорційне часу спостереження.

Якщо позначити символом α вірогідність перетворення ядра радіоізоотопу за час проведення досліді, то згідно з наведеними вище положеннями $\alpha \ll 1$ (але не може дорівнювати нулю, оскільки перетворення ядер радіоізоотопу все ж таки відбувається), а загальне число ядер радіоізоотопу, здатних до перетворення, в зразку (N) дуже велике ($N \gg 1$). В цьому випадку середнє число ядер, які підлягають радіоактивному розпаду (\bar{n}) за час проведення досліді, дорівнюватиме:

$$\bar{n} = \alpha \cdot N$$

Відомо, що в умовах $\alpha \ll 1$ і $N \gg 1$ процес радіоактивного розпаду описується розподіленням Пуассона (див.розділ 8.2.):

$$P_N(n) = \frac{\bar{n}^n}{n!} e^{-\bar{n}},$$

де: $P_N(n)$ — вірогідність радіоактивного розпаду n ядер із загального їх числа N .

Однією з важливих властивостей розподілення Пуассона є така: якщо \bar{n} — це середнє число перетворень ядер радіоізоотопу, яке спостерігається за час проведення досліду, а n — число перетворень, зареєстрованих за будь-який конкретний проміжок часу, то відхідхилення n від \bar{n} дорівнюватиме $\pm \sqrt{\bar{n}}$, а відносна похибка —

$$\Delta n / \bar{n} = 1 / \sqrt{\bar{n}}.$$

Оскільки число зареєстрованих радіоактивних розпадів збільшується з тривалістю часу спостереження, а похибка вимірювання збільшується пропорційно $\sqrt{\bar{n}}$, для того, щоб зменшити відносну похибку $\Delta n / \bar{n}$ в r раз, тривалість вимірювання необхідно збільшити в r^2 раз.

При застосуванні методів, в основі яких лежить підрахунок числа радіоактивних перетворень ядер радіоізоотопів за допомогою детекторів радіоактивності, дослідник стикається з декількома практичними труднощами. Насамперед вони пов'язані з урахуванням фонові радіації і часом розділення самого детектора радіоактивності.

Фонова радіація (фон) — це випромінювання, обумовлене природною радіоактивністю довкілля, а також космічними променями.

Зареєстрована радіоактивність зразка (зареєстроване за одиницю часу число перетворень ядер радіоізоотопу) дорівнює:

$$A_{зр} = \bar{n}/t,$$

де: $A_{зр}$ — зареєстрована радіоактивність зразка, \bar{n} — зареєстроване середнє число перетворень ядер радіоізоотопу за проміжок часу t .

У той же час радіоактивність зразка можна також визначити, як різницю між сумою радіоактивності зразка і фону ($A_{зар}$) та активністю фону ($A_{фон}$):

$$A_{зр} = A_{заг.} - A_{фон}$$

З урахуванням цих положень показано, що відношення часу вимірювання зразка в присутності фону ($t_{заг.}$) до часу вимірювання тільки фону ($t_{фон}$) дорівнює:

$$t_{заг.} / t_{фон} = \sqrt{A_{заг.} / A_{фон}}$$

Таким чином, якщо зареєстрована радіоактивність у присутності фону зразка перевищує радіоактивність фону в p раз, то вимірювання радіоактивності зразка доцільно проводити в \sqrt{p} разів довше, ніж вимірювання фону.

Відомо, що кожний детектор радіоактивності після реєстрації процесу радіоактивного розпаду протягом короткого проміжку часу, який називається "мертвим часом", не здатний реєструвати наступний розпад (випромінену частинку або γ -квант). Цей проміжок часу визначається принципом реєстрації випромінювання, яке виникає при перетворенні ядер, і для кожного типу детекторів має своє конкретне значення. Якщо час, коли немає чутливості детектора ("мертвий час"), позначити символом τ , а зареєстроване число розпадів (радіоактивність, що спостерігається) за конкретний проміжок часу — $A_{сн}$, то час непрацездатності детектора радіоактивності дорівнюватиме:

$$t_{непрац.} = A_{сн} \cdot \tau$$

Протягом $t_{непрац.}$ буде незареєстрована наступна кількість радіоактивних розпадів:

$$A_{незарег.} = A \cdot A_{сн} \tau,$$

де: A — дійсне число розпадів в зразку.

З іншого боку, дійсне число розпадів дорівнює сумі зареєстрованих і незареєстрованих розпадів, тобто:

$$A = A_{сн} + A \cdot A_{сн} \cdot \tau, \text{ або}$$

$$A = \frac{A_{сн}}{1 - A_{сн} \cdot \tau}$$

Для визначення "мертвого часу" детекторів радіоактивності

використовують такий методичний прийом: беруть два зразки (№1; №2) і визначають їхню радіоактивність (реєструють число розпадів в одиницю часу) як окремо кожного зразка, так і в сумі. Сума дійсних радіоактивностей (з урахуванням "мертвого часу" детектора) зразків № 1 і № 2 повинна дорівнювати сумарній активності зразків № 1 і № 2:

$$\frac{A_1}{1 - A_1\tau} + \frac{A_2}{1 - A_2\tau} = \frac{A_{1+2}}{1 - A_{1+2}}$$

Для існуючих детекторів радіоактивності за час дослідження $\tau \ll 1$ (час вимірювання — це хвилини, а "мертвий час" — частки мілісекунди або менше) і $\tau^2 \ll \tau$. З урахуванням цього знаведеного вище рівняння одержуємо:

$$\tau = \frac{A_1 + A_2 - A_{1+2}}{2A_1 \cdot A_2}$$

14.3. МЕТОДИ РЕЄСТРАЦІЇ РАДІОАКТИВНОСТІ, ЯКІ ГРУНТУЮТЬСЯ НА ІОНІЗАЦІЇ ГАЗІВ

Заряджена частинка, яка рухається при проходженні поблизу атома речовини, як уже відзначалося, здатна спричинити явище іонізації. Іонізуюча здатність α -, β - і γ -випромінювання зменшується в порядку $\alpha > \beta > \gamma$ відповідно як $10^4 : 10^2 : 1$. Таким чином, якщо α - і β -частинки можна реєструвати методами, які ґрунтуються на явищі іонізації, то для реєстрації γ -квантів ці методи не придатні. Як речовину, котру іонізують заряджені частинки, використовують гази (гелій, неон, аргон тощо), оскільки в них малий потенціал іонізації, або спеціальні газові суміші. Якщо частинка, яка випромінюється при перетворенні ядер радіоізоотопів, має достатню для іонізації енергію, то вона здатна вибити орбітальний електрон з атома газу. Внаслідок процесу іонізації утворюється пара — вибитий електрон і позитивно заряджений іон. Залежно від енергії ця частинка може іонізувати декілька атомів газу.

Іонізацію можна реєструвати, якщо в наповнену газом трубку помістити пару електродів і прикласти до них електричну напругу. Електрони, які утворилися внаслідок процесу іонізації, будуть у цьому

полі рухатися до анода, а позитивно заряджені іони — до катода, що можна зареєструвати у вигляді імпульсу заряду або електричного струму.



Рис. 14.2. Залежність напруги між електродами іонізаційного детектора та кількості пар електронів — іонів, які виникають при іонізації газу: 1— область рекомбінації, 2— область простої іонізації, 3 — область пропорційного рахунку, 4 — область Гейгера-Мюлера, 5 — область пезперервного розряду

Ефективність реєстрації іонізаційного струму залежить від величини напруги між електродами. Залежність кількості утворених іонізацією пар електрон — іон від величини напруги між електродами іонізаційного детектору, наведена на рис. 14. 2.

За низької електричної напруги між електродами більшість іонів, які утворилися внаслідок іонізації атомів газу, рекомбінує до того, як вони досягли електродів (область рекомбінації).

При підвищенні напруги іони й електрони досягають електродів. Режим простої іонізації відповідає такій напрузі між електродами, коли одна взаємодія випроміненої частинки з одним атомом газу призводить до утворення однієї пари електрон — іон. Електричний струм, який виникає при цьому, невеликий, і для його реєстрації необхідні високочутливі прилади. Тому ця область обрахування рідко використовується в кількісних вимірюваннях.

При збільшенні напруги між електродами ті електрони, які виникли внаслідок первинної іонізації, прискорюються електричним полем так

сильно, що здатні самі іонізувати атоми газу, які знаходяться на шляху їхнього руху. Таким чином, виникає додаткова (вторинна) іонізація. В свою чергу ці вторинні електрони теж здатні спричиняти іонізацію і т.д. Таке підсилення потоку електронів, яке називається ефектом Таунсенда, викликає різке збільшення електричного струму, який реєструється. Режим роботи детектора, коли електричний струм пропорційний напрузі між електродами, називається *режимом пропорційного обрахування*. Суттєвий недолік детекторів, які використовують цей режим, — необхідність мати високостабільні джерела електричної напруги, оскільки навіть незначні флуктуації напруги викликають суттєві зміни струму.

При подальшому підвищенні напруги між електродами за областю пропорційного обрахування знаходиться *область Гейгера–Мюллера*, де всі можливі пари електронів — іонів (первинні, вторинні, третинні і т.д.) збираються електродами повністю. В цій області досягається максимальний лавиноподібний ефект, і флуктуації напруги практично не впливають на іонізаційний струм. Область Гейгера–Мюллера використовується в так званих лічильниках Гейгера–Мюллера; вони відзначаються стабільністю, чутливістю, надійністю і тому широко використовуються.

Лічильники Гейгера–Мюллера дуже різні за своєю конструкцією. Найчастіше використовуються торцеві лічильники. Вони являють собою циліндр (як правило, скляний), внутрішня поверхня стінки якого вкрита металом і є катодом, а в центрі цього циліндра розміщується дротяний анод. У торці циліндра є віконце, крізь яке радіоактивне випромінювання попадає в заповнений газом внутрішній об'єм циліндра, який після наповнення газом герметизується. Матеріал для торцевого віконця підбирають залежно від енергії та типу випромінювання. Як правило, таким матеріалом є скло, слюда або тонкі полімерні плівки. Низькоенергетичні β -частинки (наприклад, випромінювання ^3H) і α -частинки через їхню малу проникаючу здатність майже повністю затримуються даже тонкими торцевими віконцями. Для реєстрації такого випромінювання використовують, як правило, газопроточні лічильники без вікна, в яких радіоактивний зразок на спеціальній підкладці розміщують всередині лічильної камери. Оскільки при введенні і виведенні зразка газ втрачається, крізь лічильну камеру безперервно пропускають газ (з метою здешевлення — як правило паливний газ).

При підвищенні напруги між електродами після області Гейгера–Мюллера розміщується область безперервного розряду. В цьому випадку газ іонізується під дією електромагнітного поля навіть без участі іонізуючого випромінювання. Цей режим роботи в

іонізаційних детекторах непридатний для реєстрації радіоактивного випромінювання.

Ефективність реєстрації іонізуючих випромінювань, які мають малу проникну здатність, за допомогою іонізаційних детекторів, дуже низька. Наприклад, навіть для газопроточних лічильників при використанні спеціальних газових сумішей ефективність реєстрації β -випромінювання ^3H не перевищує 10%. Крім того, відносно низька ефективність реєстрації іонізаційними газовими детекторами високоенергетичного β -випромінювання обумовлена тим, що навіть тоді, коли зразок притиснутий до торцевого віконця, то тільки половина випромінених частинок буде потрапляти у внутрішній об'єм детектора, оскільки інші частинки будуть випромінюватися в напрямку, протилежному детектору. При використанні газопроточних детекторів суттєво затримує випромінювання підкладка, на якій знаходиться радіоактивний зразок.

Крім вказаних вище причин, суттєвий внесок у зменшення ефективності реєстрації випромінювання іонізуючими детекторами вносить їхній відносно великий (100–200 мкс) "мертвий час".

З цих причин та ще через ряду інших детектори, засновані на іонізації газів, не бажано використовувати для визначення абсолютного числа радіоактивних розпадів у зразках. Як було вказано вище, іонізаційні детектори малопридатні для кількісної реєстрації β -випромінювання, оскільки вони мають низьку іонізуючу здатність.

У біохімічних дослідженнях іонізаційні детектори, як правило, не використовуються через вказану вище низьку ефективність, а також малу чутливість. У деяких лабораторіях ще й досі користуються газопроточними лічильниками (наприклад, "Протока"), але тільки для відносних досліджень з високоенергетичним β -випромінюванням.

14.4. РЕЄСТРАЦІЯ РАДІОАКТИВНОСТІ СЦИНТИЛЯЦІЙНИМИ ДЕТЕКТОРАМИ В БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

Недоліки іонізаційних детекторів певною мірою можна подолати, якщо використовувати для реєстрації радіоактивного випромінювання чутливіші методи, засновані, зокрема, на явищі сцинтиляції (від лат. scintillatio – мерехтіння) — короткочасних слабких спалахів світла, які виникають у певних речовинах (сцинтиляторах) під дією іонізуючих випромінювань.

Ці речовини, які являють собою органічні й неорганічні сполуки або розчини їх, здатні поглинати енергію випромінювання таким чином, що їхні молекули переходять у збуджений стан, а після повернення в основний стан — випромінюють поглинену енергію у вигляді світлових фотонів. Світло випромінювання реєструється спеціальними електронними приладами—фотоелектронними помножувачами (ФЕП). Вони перетворюють світловий сигнал в електричний імпульс, пропорційний інтенсивності світла, котре падає на ФЕП (див. розділ 11.4).

Існують два основних способи реєстрації радіоактивного випромінювання за допомогою сцинтиляційних детекторів: зовнішній сцинтиляційний рахунок, який використовується в *твердотілих детекторах* і внутрішній сцинтиляційний рахунок, при якому використовують *рідинні сцинтилятори*.

Розглянемо докладніше ці способи реєстрації радіоактивних випромінювань.

У *твердотілих сцинтиляційних детекторах* зразок поміщають у скляний або пластмасовий флакон, закривають кришкою і вводять крізь отвір у середину кристала, який є сцинтилятором ("рахунок у криниці").

Твердотілі сцинтиляційні детектори використовуються переважно для реєстрації γ -випромінювання, оскільки саме для даного виду випромінювання цей метод має відносно високу ефективність, а інші методи менш ефективні. Обмежено твердотілі детектори використовуються також для реєстрації β -випромінювання (сцинтиляторами слугують органічні речовини), а також α -випромінювання (сцинтилятори — сульфід цинку та ін.)

Для реєстрації γ -випромінювання найчастіше використовують як сцинтилятор кристал NaI, який активується талієм [NaI(Te)]. Оскільки γ -випромінювання має високу проникаючу здатність, воно виходить за межі флакона без суттєвого зменшення енергії. Це випромінювання, проходячи через кристал NaI, взаємодіє з його атомами і за час проходження з ефективністю в декілька відсотків спричиняє появу електронів унаслідок явища іонізації. Електрони, що виникають, у свою чергу, збуджують молекули кристала, в результаті чого спостерігається явище сцинтиляції. Світло випромінювання реєструється ФЕП. Для підвищення ефективності збирання всього світла сцинтиляції використовується декілька ФЕП, які охоплюють поверхню кристала сцинтилятора. В біохімічних дослідженнях найчастіше для реєстрації радіоактивного випромінювання використовують *рідинні сцинтиляційні детектори*. Обумовлене це тим, що ці детектори мають відносно велику ефективність реєстрації β -випромінювання, найпоширеніших у біохімічних дослідженнях

радіоізотопів $^{14}_6\text{C}$, $^{32}_{15}\text{P}$, $^{35}_{16}\text{S}$, $^{45}_{20}\text{Ca}$, а також, що особливо важливо, низькоенергетичного ^3_1H . У цьому методі зразок розчиняють або суспендують у розчиннику, який є рідинним сцинтилятором і містить також флуоресцентні речовини. Випромінювання радіоізоотопу, яке виходить за межі зразка, взаємодіє з молекулами розчинника в такий спосіб, що вони переходять у збуджений стан. Збуджені молекули потім повертаються в основний стан, і при цьому випромінюється енергія збудження у вигляді світлових фотонів. Як розчинник-сцинтилятор використовують здебільшого толуол, п-ксилол та 1,4-диоксан або спеціальні суміші. Саме ці рідини здатні ініціювати явище сцинтиляції при взаємодії з β -випромінюванням. Завдяки використанню рідинних сцинтиляторів досягається максимальний ефект контакту зразка з сцинтилятором. Світло випромінювання рідинних сцинтиляторів має коротку довжину хвилі і не може ефективно реєструватися існуючими серійними ФЕП, для яких максимум області чутливості відповідає приблизно довжині хвилі 430 нм (рис.14.3).

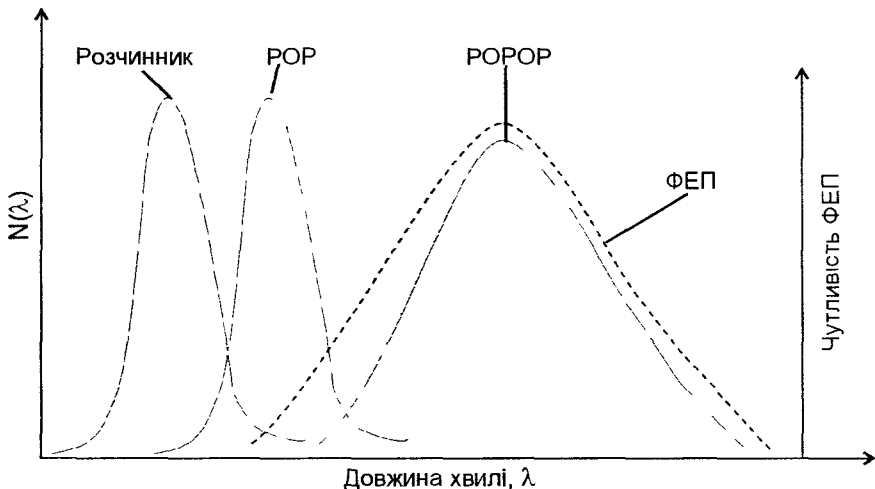


Рис.14.3. Спектри випромінювання розчинника, флуоресцентів POP і POPOP та область чутливості ФЕП. $N(\lambda)$ — число випромінюваних світлових фотонів з довжиною хвилі λ

Для збільшення ефективності реєстрації світла, яке випромінюється розчинником, до нього додають відносно невелику кількість первинного флуоресценту (флуорофору). Як флуоресцент найчастіше використовують 2,5-дифенілоксазол (POP), котрий поглинає фотони, що випромінює розчинник, і також сам випромінює у більш

довгохвильовій області (флуоресціює). Однак флуоресценція РОР реєструється ФЕП все ж таки недостатньо ефективно. Тому вже до суміші розчинника і РОР додають ще один флуоресцент (вторинний флуоресцент) — 1,4-ди-[2-(5-феніл-оксазол)]-бензол (РОРОР). Світло, яке випромінюється РОР, поглинається РОРОР, і в свою чергу ця речовина випромінює світло в області максимальної чутливості ФЕП (рис.14.3). Оскільки РОР і РОРОР у сцинтиляційній рідині знаходяться в дуже малих кількостях, вони практично не поглинають енергію β -частинок радіоізотопів, а функціонують як перетворювачі довжини хвилі фотонів, які випромінюються збудженими молекулами розчинника. Послідовність перетворення енергії β -частинок в енергію світлових квантів проходить, приблизно за 10^{-9} с, а перетворення енергії світла в електричний імпульс — за 10^{-6} с.

Крім РОР і РОРОР, існують інші флуоресценти, які використовуються залежно від розчинника і необхідної ефективності. Так, є флуоресценти, які відразу випромінюють світло довжини хвилі, яка ефективно реєструється ФЕП, наприклад, 2-феніл-5-(4'-дифеніл)-1,3,4-оксадіазол.

Для підвищення розчинності біологічних зразків і ефективності реєстрації випромінювання в певних випадках вносять до складу сцинтиляційних рідин невелику кількість простих спиртів, ефірів, сублімованого нафталіну та ін.

Склад деяких сцинтиляційних рідин, які широко використовуються в біохімічних дослідженнях, наведено в табл.14.2.

Сучасні сцинтиляційні детектори побудовані таким чином, що величина електричних імпульсів після ФЕП пропорційна інтенсивності Таблиця 14.2. Склад деяких сцинтиляційних рідин, які випускаються промисловістю і використовуються в біохімічних дослідженнях

Марка сцинтиляційної рідини	Склад сцинтиляційної рідини
ЖС 1	Розчин: 4 г п-терфенілу, 0,1 г РОРОР в 1 л толуолу
ЖС – 3	Розчин: 5 г 2-феніл-5-(4'-дифеніл)-1,3,4-оксадіазола в 1 г толуолу
ЖС – 7	Розчин: 5 г РОР, 0,1 г РОРОР, 0,1 г нафталіну сублімованого в 1 л діоксану
ЖС – 14	Розчин: 5 г 2-феніл-5-(4'-дифеніл)-1,3,4-оксадіазолу в 1 л ксилолу.
ЖС – 103	Розчин: 4 г РОР, 0,1 г РОРОР в 1 л діоксану
ЖС – 106	Розчин: 4 г РОР, 0,05 г РОРОР в 1 л толуолу

світла випромінювання сцинтилятором, а вона, в свою чергу, пропорційна енергії випромінювання радіоізоотопу. Таким чином, величина електричних імпульсів пропорційна енергії випромінювання. Це дає можливість при використанні аналізатора амплітуди імпульсів одночасно визначати в одному зразку декількох ізотопів. Для них повинен бути один і той же вид опромінення (тільки γ або β -випромінювання), різна енергія, але не велика її відмінність. Обумовлене це тим, що ефективність реєстрації випромінювання декількох ізотопів має бути подібною. Залежність швидкості розпаду радіоізоотопу від амплітуди зареєстрованих імпульсів відповідає швидкості розпаду від енергії випромінювання, яке реєструється. Пояснюється це тим, що як уже відзначалося, амплітуда імпульсів пропорційна енергії випромінювання. Таким чином, залежність числа зареєстрованих імпульсів від їхньої амплітуди ідентична енергетичному спектру випромінювання. Для ${}^3_1\text{H}$ і ${}^{14}_6\text{C}$ ця залежність наведена на рис. 14.4.

Для реалізації можливості визначення двох ізотопів в одному зразку використовують двоканальні сцинтиляційні детектори. Якщо використовувати одноканальні детектори, то обрахування для двох радіоізоотопів необхідно проводити послідовно два рази. Уже зазначалося, в реєстраційній апаратурі використовують *аналізатор амплітуди імпульсів*, а також *дискримізатор*. Амплітуда імпульсів — це значення електричної напруги (вимірюється в одиницях напруги — вольтах). Дискримізатор дозволяє реєструвати імпульси тільки між певними рівнями їхньої напруги.

Включення аналізатора амплітуди імпульсів і дискримізатора в ланцюг обрахування імпульсів детектора радіоактивності дозволяє реєструвати випромінювання, яке має амплітуду до якогось певного значення, що встановлюється дискриміратором. Включення ж двох дискриміраторів у два ланцюги обрахування імпульсів дає можливість одночасно рахувати імпульси в двох інтервалах значення амплітуди. Діапазон обрахування, який визначається конкретними значеннями напруги (амплітуди імпульсів), називається *каналом* (на рис. 14.4 позначені А і Б, а рівні напруги — L_1 , L_2 і L_3).

При використанні для підсилення електричних імпульсів після ФЕП "лінійного" помножувача спектри розподілення числа імпульсів від їхньої амплітуди в методі подвійної мітки радіоізоотопів в одному зразку суттєво перекриваються в області малих амплітуд на виході помножувача (рис. 14.4а). Якщо використовувати "логарифмічний" помножувач, на виході якого амплітуда пропорційна логарифму їхньої амплітуди на вході, то спектри радіоізоотопів будуть

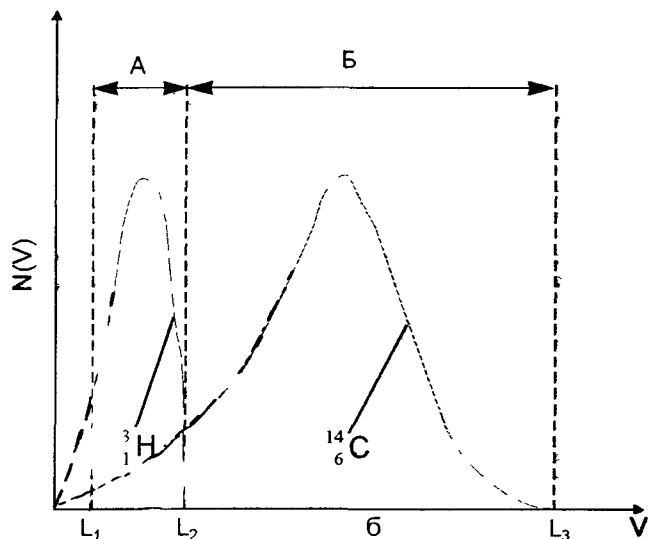
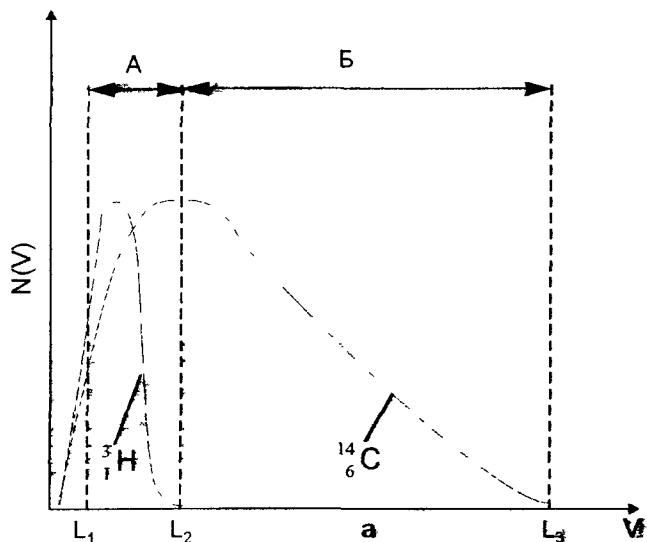


Рис. 14.4. Принцип оброблення зразка з двома радіоізотопами на прикладі ${}^3\text{H}$ і ${}^{14}\text{C}$ при використанні "лінійного" (а) і "логіфімічного" (б) помножувача. $N(V)$ — число зареєстрованих імпульсів з амплітудою V ; А і Б — канали, які визначені значенням напруги L_1 , L_2 і L_3 , що встановлюється дискримінаторами

трансформовані таким чином, що вони стають компактнішими, стисненими (рис.14.4б). Число зареєстрованих імпульсів при цьому не змінюється, перетворюється тільки їхня амплітуда.

Для зменшення числа електричних імпульсів, які надходять від ФЕП і не пов'язані з дією радіоактивного випромінювання (так званий "тепловий шум" ФЕП), в конструкції сцинтиляційних детекторів використовують *схему співпадання*.

Основні елементи двоканального сцинтиляційного детектора наведені на рис.14.5.

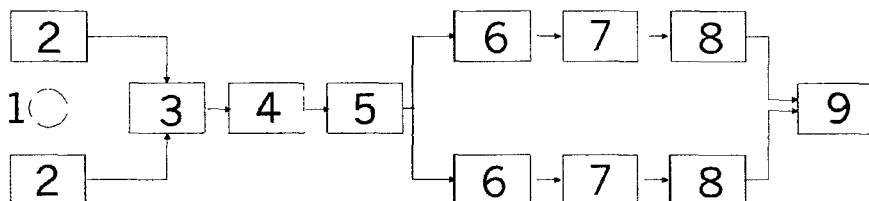


Рис. 14.5. Основні елементи двоканального сцинтиляційного детектора: 1 - флакон з радіоактивним зразком; 2 - фотоелектронний помножувач (ФЕП); 3 - схема співпадіння; 4 - "лінійний" помножувач; 5 - "логарифмічний" помножувач; 6 - дискримінатор нижнього рівня; 7 - дискримінатор верхнього рівня; 8 - лічильник числа імпульсів; 9 - цифродрукуючий пристрій

Сучасні сцинтиляційні детектори, крім вказаних на рис. 14.5 пристроїв, мають також таймер, який забезпечує час включення і зупинки детектора, зовнішній стандарт для визначення ефективності обрахування тощо. Керування детектором і розрахунок ефективності проводиться ЕОМ.

Методичні підходи до зменшення фонового шуму сцинтиляційних детекторів. Сцинтиляційні детектори мають, як уже відзначалося, ряд переваг перед детекторами, заснованими на іонізації газів. Основна з них — вища ефективність реєстрації радіоактивного випромінювання. Особливо це стосується рідинних сцинтиляційних детекторів, котрі здатні реєструвати низькоенергетичне β -випромінювання радіоізотопів, які використовуються в біохімічних дослідженнях.

Однак, сцинтиляційний метод реєстрації радіоактивного випромінювання має й деякі недоліки. Одним з них є "фоновий шум" — реєстрація імпульсів, не пов'язаних з дією випромінювання. Він обумовлений, по-перше, "тепловим шумом" ФЕП, який обумовлений

помноженням ФЕП електричних імпульсів, що виникають за рахунок появи електронів під дією прикладеної до ФЕП високої напруги для досягнення необхідного коефіцієнта підсилення; по-друге, фоновим випромінюванням, що реєструється сцинтиляційним детектором і обумовлене космічними променями та радіоактивністю природних радіоізотопів довкілля. "Тепловий шум" ФЕП найбільшою мірою впливає на ефективність реєстрації низькоенергетичного випромінювання. Так, енергія β -частинки, яка дорівнює середній енергії випромінювання ${}^3_1\text{H}$ (5,5KeВ), перетворюється в рідинних сцинтиляційних детекторах, котрі звичайно використовуються для біохімічних досліджень з коефіцієнтом помноження ФЕП приблизно 10^6 разів, в електричний імпульс, який дорівнює приблизно 0,018 В. В той же час при кімнатній температурі "тепловий шум" ФЕП спричиняє появу імпульсів з амплітудою приблизно 0,05 В. Рівень обрахування, обумовлений "тепловим шумом" ФЕП, досягає (без спеціальних заходів обмеження) 10^5 імп/хв.

У сучасних сцинтиляційних детекторах використовується принцип істотного зменшення "теплого шуму" ФЕП, суть якого полягає в тому, що останній дає поодинокий імпульс, тимчасом як β -частинка при взаємодії зі сцинтилятором поступово зменшує свою енергію і може викликати збудження декількох молекул розчинника, що призведе до появи декількох фотонів, отже, до декількох електричних імпульсів. Ці імпульси з'являються майже одночасно (інтервал 10^{-12} с) і йдуть один за одним. На практиці використовують одночасно два зв'язаних ФЕП, сигнали з яких потрапляють на електронну схему співпадання (рис. 14.5, позначка 3). Ця схема передає сигнал далі тільки в тому випадку, коли на її вхід приходять з двох ФЕП практично одночасно два імпульси (від однієї β -частинки). В цьому випадку поодинокі імпульси, спричинені "тепловим шумом" ФЕП, відсіюються. Використання схеми співпадання дозволяє знизити рівень "теплого шуму" до 15 імп/хв., який обумовлений все ж таки існуючими поодинокими випадками швидкого слідування одного імпульсу шуму за одним.

Використання схеми співпадання в сцинтиляційних детекторах хоча й дає безумовний виграш у різкому зниженні "теплого шуму", однак має і декілька недоліків. По-перше, при використанні схеми співпадання не можна реєструвати низькоенергетичне випромінювання, котре спричинює появу тільки одного імпульсу через малу енергію. По-друге, схема співпадання має певний час дії, що збільшує "мертвий час" детектора. Використання швидкодіючих схем співпадання дозволяє зменшити "мертвий час" рідинних

сцинтиляційних детекторів до одиниць мікросекунд (<10 мкс).

Для зменшення "теплого шуму", крім використання схеми співпадання, в детекторах, які містять аналізатор амплітуди імпульсів і дискримінатор, нижній рівень реєстрації (рис.14.4, рівень L_1) виставляють таким, щоб значно зменшити реєстрацію "теплого шуму" ФЕП.

Одним з джерел фону є іонізуюче випромінювання природних радіоізоотопів довкілля. Для зменшення впливу цього випромінювання детектори необхідно розміщувати в спеціально обладнаних приміщеннях. При виборі місця для детектора необхідно виміряти рівень радіоактивності оточуючого середовища і в разі необхідності забезпечити захист детектора від цієї радіоактивності.

При використанні для обрахування скляних флаконів, в яких розміщують зразок і сцинтиляційну рідину, джерелом фону є природний радіоізоотоп $^{40}_{19}\text{K}$. Тому для сцинтиляційного обрахування використовують флакони, виготовлені зі спеціального скла з низьким вмістом калію, або ж флакони з поліетилену. На жаль, останні стійкі не до всіх розчинників, які використовуються для сцинтиляційного обрахування, і тому їх рекомендується використовувати тільки один раз.

Певний внесок у величину фону робить і космічне випромінювання. Галактичне випромінювання, що надходить у Сонячну систему з міжзоряного простору, складається в основному з протонів високої енергії (приблизно 80%) та α -частинок (19%). Первинне випромінювання Сонця являє собою переважно рентгенівське випромінювання. При інтенсивних спалахах на Сонці випромінюється також значна кількість заряджених частинок, здебільшого протонів і α -частинок. Ці випромінювання є, в основному, високоенергетичними, і їхня енергія більша, ніж максимальна енергія випромінювання радіоізоотопів, котрі використовуються в біохімічних дослідженнях. Тому в детекторах, які містять аналізатор амплітуди імпульсів і дискримінатор, верхній рівень реєстрації (рис.14.4, рівень L_3) виставляють так, щоб відсіяти імпульси з енергією, яка перевищує максимальну енергію реєстрованого випромінювання. Однак певна частка відносно низькоенергетичного космічного випромінювання все ж таки може взаємодіяти зі сцинтиляційною рідиною і спричинити появу фонових імпульсів. Для зменшення впливу космічного випромінювання, крім вказаного вже виставлення за допомогою дискримінатора верхнього рівня реєстрації енергії випромінювання, необхідно детектор ставити в приміщеннях, де рівень космічного випромінювання мінімальний або ж вжити заходи щодо захисту від нього.

Внаслідок комплексного використання заходів захисту від фону в

рідинних сцинтиляційних детекторах радіоактивності "фоновий шум" вдається зменшити приблизно до 35 імпл/хв без суттєвого зменшення ефективності.

Методи приготування біологічних зразків для сцинтиляційного обрахування. При визначенні кількості радіоактивних розпадів за допомогою рідинних сцинтиляційних детекторів суттєвою практичною трудностю є зменшення ефективності обрахування внаслідок явища гасіння сцинтиляції. Це явище обумовлені зниженням ефективності передачі енергії від β -частинок на ФЕП, і відбувається воно з трьох основних причин:

1. *Хімічне гасіння* обумовлене, як правило, наявністю в біологічному зразку речовин, здатних поглинати частину енергії β -частинок без випромінювання фотонів, або ж поглинати фотони, які випромінюються збудженими молекулами розчинника чи флуоресцентів. Найпоширенішими хімічними гасниками в біохімічних дослідженнях є вода, кислоти, солі, розчинний кисень тощо;

2. *Кольорове гасіння* обумовлене тим, що пофарбовані зразки здатні поглинати частину фотонів, які випромінюються флуоресцентами. Кольорове гасіння особливо характерне для зразків, жовтого, червоного або коричневого кольору. Саме тому забарвлені зразки необхідно знебарвлювати;

3. *Гасіння за рахунок розведення* має місце при розведенні сцинтиляційної рідини, найбільшою мірою воно виявляється якщо зразок є рідиною.

Від більшості вказаних гасінь сцинтиляції можна позбутися за допомогою деяких конструктивних прийомів і спеціальних методів приготування зразків. Якщо усунути причину, яка викликає перекручення результатів досліджень, не можна (наприклад, гасіння за рахунок розведення), то необхідно вводити поправки згідно з існуючими методичними підходами.

Однією з суттєвих перешкод при відносно ефективній реєстрації іонізуючого випромінювання сцинтиляційними детекторами є самопоглинання випромінювання зразком. Якщо зразок має відносно значні геометричні розміри (наприклад, доволі товстий), то низькоенергетичне випромінювання, яке надходить з глибини зразка, поглинається зразком або ж настільки втрачає енергію, що не здатне спричинити явище сцинтиляції (в іонізаційних детекторах — іонізацію газу). При високоенергетичному випромінюванні (наприклад, β -випромінюванні $^{32}_{15}\text{P}$) цієї проблеми не існує, оскільки переважна більшість цього випромінювання здатна покинути реальні зразки без суттєвої зміни енергії. Для β -випромінювання $^{14}_6\text{C}$ самопоглинання

впливає на "істинне" визначення радіоактивності зразків з масою більше 1 мг, а для реєстрації β -випромінювання ^3H воно є серйозною практичною трудностю. Вплив самопоглинання можна врахувати, якщо в попередніх дослідженнях використовувати зразки — стандарти (з відомим вмістом радіоізоотопу) різної маси (товщини, об'єму) і визначити за їхньою допомогою радіоактивність на одиницю маси (товщини, об'єму) для кожного з них. Таким чином, одержують залежність радіоактивності від маси (товщини, об'єму) зразка — стандарту і в дослідженнях експериментального зразка цю залежність використовують для корекції одержаних результатів.

При використанні рідинних сцинтиляційних детекторів зразок в ідеальному випадку повинен бути розчинним у сцинтиляційній рідині, оскільки в цьому випадку досягається найкращий контакт між атомами радіоізоотопу і розчинником. Якщо зразок нерозчинний, то для низькоенергетичного випромінювання спостерігається явище самопоглинання.

Існують три основних методи приготування біологічних зразків для обрахування рідинними сцинтиляційними детекторами.

1. *Вибір розчинника, здатного змішуватися в певному співвідношенні з водою.* В біохімічних дослідженнях зразки являють собою найчастіше розчини в полярних розчинниках (здебільшого у воді) або містять відносно багато води. Однак сцинтиляційні рідини, які використовуються на практиці, розчинні в неполярних розчинниках. і в них біологічні об'єкти, як правило, нерозчинні. При виборі розчинника, який змішується з водою, керуються наступним принципом: розчинник має бути таким, щоб до нього можна було додавати водні розчини у певній кількості, а зразок у розчиннику при цьому повинен залишатися в розчинному вигляді.

Рідинні сцинтилятори, які готуються на основі толуолу, практично не змішуються з водою. Однак якщо до толуольного сцинтилятора додати поверхнево-активну речовину (наприклад, емульгатор тритон-X100), то в таку суміш можна ввести до 15% води. В емульсії, яка при цьому виникає, діаметр крапель води не перевищує 0,1 мкм. Оскільки середня довжина пробігу β -частинок, які випромінюються низькоенергетичним радіоізоотопом ^3_1H , дорівнює приблизно 0,5 мкм, то додавання емульгатора до толуольного сцинтилятора дозволяє реєструвати радіоактивність зразків, мічених ^3_1H , які містять до 15% води.

Осади і нерозчинні речовини в толуольному сцинтиляторі можна диспергувати й іншими методами. Зокрема, останнім часом широко використовують фільтрування зразків крізь целіт або ультразвукову обробку суміші зразка зі сцинтилятором.

Рідинні сцинтилятори на основі діоксану дозволяють вводити в них до 23% води, однак діоксан є менш ефективним сцинтилятором, ніж толуол. Для збільшення ефективності діоксану до нього додають сублімований нафталін, а для підвищення розчинності нафталіну при додаванні води в сцинтиляційну рідину вводять невелику кількість спиртів або простих ефірів. Склад деяких сцинтиляційних рідин, до яких можна додавати певну кількість води, наведено в табл. 14.3. Для першої сцинтиляційної суміші максимальна ефективність реєстрації випромінювання ^3_1H дорівнює приблизно 50%, $^{14}_6\text{C}$ — 95%, а для решти сумішей для ^3_1H — 30–35%, а для $^{14}_6\text{C}$ — 85–90%.

Таблиця 14.3. Склад деяких сцинтиляційних сумішей, до яких можна додавати певну кількість води

№	Склад сцинтиляційної суміші	Максимальна кількість води, яка додається, %
1	Розчин: 4,0 г РОР, 0,1 г РОРОР, 333 мл тритон-Х100, 1 л толуолу	15
2	Суміш Брея: 4,0 г РОР, 0,1 г РОРОР, 60 г сублімованого нафталіну, 100 мл метанолу, 20 мл етиленгліколю, діоксан – до 1 л	23
3	Суміш Бруно: 10,0 г РОР, 0,5 г РОРОР, 80 сублімованого нафталіну, 420 мл целозолу В, 140 мл ксилолу, 420 мл діоксану	23
4	Суміш Кінара: 5,0 г РОР, 0,1 г РОРОР, 80 г сублімованого нафталіну, 230 мл абсолютного етанолу, 385 мл ксилолу, 385 мл діоксану	23

Введення в сцинтиляційну рідину домішок спричиняється до підвищення хімічного гасіння. Якщо ступінь гасіння в усіх зразках однаковий, то при визначенні відносної радіоактивності зразків гасінням можна знехтувати. Якщо ж ці умови виконати не можна, то необхідно визначити ступінь гасіння в кожному зразку і врахувати це в результатах досліджень.

2. *Розчинення біологічних зразків.* Як уже зазначалося, більшість біологічних зразків (тканини, клітини, високомолекулярні сполуки тощо) не розчинні в сцинтиляційних рідинах. Для визначення радіоактивності таких зразків необхідно їх солюбілізувати. Найпростіший спосіб солюбілізації — обробка біологічних зразків концентрованим розчином лугу (наприклад, КОН) при температурі 70°C протягом 1–4 год. Однак часто повного розчинення домогтися

цим методом не вдається. Зразки, які містять сполуки з кислотними властивостями (нуклеїнові кислоти, амінокислоти тощо), можуть бути переведені в розчинну в сцинтиляційних рідинах форму при обробці органічними основами, наприклад високомолекулярними амінами (зокрема, гіамін–10X–гідроксидом). Нерозчинні зразки з лужними властивостями для їх розчинення в сцинтиляційній рідині обробляють, як правило, 2–етилкапроною кислотою або кислими діалкілфосфатами. Однак всі вказані вище солюбілізатори спричиняють відносно сильне хімічне гасіння. Існує ряд інших солюбілізаторів, зі значно меншим рівнем хімічного гасіння (наприклад, солуен–100, солуен–350, протозол та ін).

Якщо не вдається солюбілізувати зразки, які містять ${}^3_1\text{H}$ і ${}^{14}_6\text{C}$, то їх можна спалити в кисні до утворення CO_2 і H_2O . Весь ${}^3_1\text{H}$ в цьому випадку буде в складі ${}^3\text{H}_2\text{O}$, яку збирають конденсацією, а ${}^{14}_6\text{C}$ — в складі ${}^{14}\text{CO}_2$, який поглинають спеціальними рідинними поглиначами (наприклад, β -фенілетиламіном). Після цього ${}^3\text{H}_2\text{O}$ і поглинач з ${}^{14}\text{CO}_2$ піддають сцинтиляційному обрахуванню.

3. Сорбція на мембранних фільтрах. Цей метод приготування зразків для сцинтиляційного обрахування в даний час є найпоширенішим у біохімічних дослідженнях внаслідок відносної швидкості, простоти і зручності. Принцип методу такий: нерозчинний зразок для вилучення води відфільтровують або висушують на тонких мембранних фільтрах з нітроцелюлози (Synpor, Myllipor, Gelman, Владипор та ін), або скловолкна. Зразок концентрують на фільтрі до невеликого об'єму і максимально позбавляють від води. Як правило, в біохімічних дослідженнях це роблять шляхом осадження хлорною або трихлороцтовою кислотою. Розмір пор фільтра вибирають таким, щоб радіоактивний зразок, що досліджується, не вимивався, а залишався на поверхні фільтра. Зразок нашаровують на фільтр таким чином, щоб він утворював тонкий шар. Це особливо необхідно при роботі з низькоенергетичним випромінюванням. Суть полягає в тому, що вже при концентрації речовини зразка на поверхні фільтра більше ніж 1 мг/см^2 можливе самопоглинання низькоенергетичного випромінювання в зразку.

Використання нітроцелюлозних фільтрів має певний недолік. Після відфільтровування зразка його висушують при 100°C для вилучення залишків води, яка спричиняє сильне хімічне гасіння. При такій температурі виникає жовтий колір нітроцелюлозних фільтрів або навіть їх обвуглювання. Після попадання в сцинтиляційну рідину такого фільтра виникає кольорове гасіння. Для усунення даного ефекту найчастіше використовують для швидкого висушування зразка його

промивання органічними розчинниками (ацетоном, спиртом та ін.). Поява забарвлення фільтра при високотемпературному висушуванні виключається при використанні скловолокнистих фільтрів. Використовувати паперові фільтри не рекомендується через те, що, по-перше, ефективність обрахування залежатиме від орієнтації паперового фільтра в сцинтиляційній рідині, оскільки такий фільтр світлонепроникний і здатний затримувати фотони, по-друге, молекули, які мають малі геометричні розміри (наприклад, амінокислоти), здатні проникати всередину паперового фільтра, а отже, будуть недосяжні для розчинника.

Визначення ефективності рідинних сцинтиляційних детекторів Для визначення абсолютного числа ядерних розпадів у зразку, який містить радіоізотоп-мітку, або при порівнянні радіоактивності зразків з різним рівнем гасіння необхідно знати ефективність детектора. Вона визначається, як правило, наступним чином:

$$E = \frac{c_{pm}}{d_{pm}} \cdot 100\% ,$$

де: E — ефективність обрахування (в %), c_{pm} — виміряне число імпульсів за 1 хв, d_{pm} — "істинне" число розпадів у зразку за 1 хв.

Гасіння спричиняється до зниження зменшення ефективності детектора. Методи визначення останньої базуються на такому явищі: гасіння викликає зсув середнього енергетичного рівня випромінювання в область більш низьких значень енергії (амплітуди зареєстрованих імпульсів). Цей ефект тим більший, чим сильніше гасіння. Найпоширенішими є три основних методи визначення ефективності рідинних сцинтиляційних детекторів, які можна використати і в детекторах іншої конструкції.

1. *Метод відношення каналів.* У цьому методі доцільно використовувати двоканальний детектор (рис.14.5). Хоча можна скористатися й одноканальним, але в цьому випадку зразки треба обраховувати два рази в різних каналах. Один канал охоплює весь енергетичний спектр β -випромінювання (канал А), а другий, як правило, — від третини до половини (канал Б). Попередньо готують набір зразків-стандартів (вони містять відому кількість радіоізоотопу-мітки), які мають різний рівень гасіння — від нульового (без гасника) до максимально можливого в експериментальному зразку. Як гасник використовують, наприклад, воду або ту речовину, яка викликає найбільше гасіння, чи їхню суміш. У подальшому роблять таким чином: зразки-стандарт, які мають активність A , розпадів за 1

хв (dpm_i , де: i — номер зразка–стандарту), прораховують у кожному каналі (ресструють число імпульсів за 1 хв в каналі А — $срм_{A_i}$ і в каналі Б — $срм_{B_i}$) і вираховують ефективність детектора в каналі А:

$$E_{iA} = \frac{срм_{A_i}}{dpm_i} \cdot 100\% .$$

Потім розраховують відношення обрахування в каналі Б і А (V_i):

$$V_i = \frac{срм_{B_i}}{срм_{A_i}} .$$

За результатами досліджень будують калібрувальну криву — залежність ефективності (E_{iA}) в каналі А (охоплює весь енергетичний спектр радіоізотопу–мітки) від відношення обрахувань у каналах (V_i). Цю калібрувальну криву використовують для визначення ефективності обрахування експериментального зразка, який обраховують у тих же каналах, що і зразки — стандарти. Для нього визначають відношення обрахувань у каналах і за калібрувальною кривою знаходять ефективність обрахування. Метод відношення каналів придатний для визначення рівня всіх типів гасіння. Необхідною умовою є ідентичність приготування і обрахування експериментального зразка і зразків–стандартів.

2. *Метод внутрішньої стандартизації.* В цьому методі використовується такий підхід: експериментальний зразок обраховують (ресструють число імпульсів за 1 хв, наприклад $срм_1$), виймають його із детектора, додають до нього відому кількість речовини (стандарту), яка містить той же радіоізотоп, що й експериментальний зразок, але не дає гасіння (dpm), і знову обраховують ($срм_2$). Ефективність (E) обрахування експериментального зразка визначають за формулою:

$$E = \frac{срм_2 - срм_1}{dpm} \cdot 100\% .$$

Для визначення ефективності обрахування зразків, які містять $^{14}_6\text{C}$, як стандарт, як правило, використовують $^{14}_6\text{C}$ –толуол, $^{14}_6\text{C}$ –гексадекан, $^{14}_6\text{C}$ –бензойну кислоту, а для ^3_1H — ^3_1H –толуол, ^3_1H –гексадекан тощо.

Метод внутрішньої стандартизації є простим і надійним способом визначення ефективності обрахування при всіх типах гасіння. Проте він має ряд недоліків, через що й не набув широкого розповсюдження. По–перше, цей метод потребує внесення дуже точної невеликої за об'ємом (щоб не було ефекту розбавлення) кількості стандарту. По–друге, зразок після додавання стандарту стає непридатним для повторного обрахування. По–третє, кожний зразок необхідно обрахувати двічі, що подовжує час вимірювання.

3. *Метод зовнішньої стандартизації.* Принцип методу базується на тому, що за межами флакона, який містить зразок (але всередині детектора) розміщують високостабільне та з великою активністю джерело γ -випромінювання (як правило, $^{137}_{55}\text{Cs}$). Це джерело опромінює γ -квантами сцинтиляційну рідину, і в результаті взаємодії γ -випромінювання з молекулами розчинника з ефективністю декілька відсотків утворюються електрони, котрі ресструються таким же чином, як і β -частинки, що випромінюються зразком. Якщо проба містила певний гасник, то енергетичний спектр цих електронів також зсувається у більш низькоенергетичну область, що дає можливість встановити залежність ефективності обрахування від ступеня гасіння. При використанні двоканального сцинтиляційного детектора процедура визначення ефективності обрахування за допомогою методу зовнішньої стандартизації зводиться до такого: за допомогою γ -випромінювання зовнішнього стандарту визначають ефективність обрахування зразків–стандартів (вони містять відому кількість радіоізоотопу–мітки) з різним рівнем гасіння (від нульового до максимально можливого в експериментальному зразку) в каналі А, який охоплює весь енергетичний спектр радіоізоотопу, а також у каналі Б, який охоплює від третини до половини цього енергетичного спектра. Потім визначають відношення обрахувань у каналах Б і А. За результатами вимірювань будується калібрувальна крива, яку використовують для визначення ефективності обрахування експериментального зразка. Якщо використовувати одноканальні детектори, то зразки треба обрахувати два рази в різних каналах.

Сучасні сцинтиляційні детектори, як уже відзначалося, містять ЕОМ, котра керує послідовністю проведення обрахувань, побудовою калібрувальної кривої, вирахуванням ефективності обрахування експериментального зразка. На цифродрукуючий пристрій (рис. 14.5) подається інформація після корекції.

Метод зовнішньої стандартизації має суттєві переваги перед методом відношення каналів. Зовнішнє γ -джерело забезпечує, завдяки значній активності, високу швидкість обрахування (до 10^5

імп/хв), і тому одержані результати мають високу статистичну вірогідність. Це особливо суттєво при дослідженні зразків з низькою ефективністю обрахування.

Як уже згадувалося, наведені вище методи визначення ефективності детекторів придатні для врахування всіх типів гасіння (хімічного, кольорового і за рахунок розведення). Разом з тим слід мати на увазі, що при роботі з пофарбованими зразками простіше знебарвити їх, щоб усунути цей тип гасіння. Біологічні зразки, як правило, знебарвлюють окислюючи їх, наприклад, H_2O_2 . При врахуванні гасіння, спричиненого розведенням, простіше здійснити ряд послідовних розведень зразка сцинтиляційною рідиною і побудувати залежність радіоактивності в одиниці маси (об'єму) від концентрації зразка в сцинтиляційній рідині. Цю залежність потім можна використати для корекції результатів при дослідженні експериментального зразка.

При визначенні ефективності детектора слід пам'ятати, що вказані вище методи дозволяють врахувати гасіння, але не вплив самопоглинання випромінювання на ефективність обрахування. Тому, для врахування або усунення самопоглинання зразки необхідно готувати згідно з існуючими методами, які були викладені вище, або ж враховувати самопоглинання за допомогою калібрувальних кривих.

Приклади використання рідинних сцинтиляційних детекторів у біохімічних дослідженнях. Область використання радіоіотопів у біохімічних дослідженнях надзвичайно широка. Розглянемо для прикладу тільки деякі завдання, які вирішуються за допомогою визначення радіоактивності зразків рідинними сцинтиляційними детекторами.

При вимірюванні радіоактивності різних тканин тварин (м'язи, печінка, нирки, кров та ін.), не розчинних у сцинтиляційних рідинах, їх піддають спеціальній обробці з метою зменшення самопоглинання випромінювання. Найчастіше для цього використовують солюбілізатори (наприклад, солуен). Однакові наважки досліджуваної тканини, (10–50 мг), які містить радіоіотоп–мітку, обробляють солюбілізатором до повного розчинення. Якщо використовують солуен, то наважку тканини поміщають у флакони для сцинтиляційного обрахування і додають до них по 1 мл солюбілізатора. Закриті кришками флакони поміщають у водяну баню при температурі 60 °C і витримують там до повного розчинення тканини, час від часу збовтуючи вміст флаконів. Після розчинення тканини флакони виймають з водяної бані і охолоджують до кімнатної температури. В

кожний флакон потім додають по 10 мл сцинтиляційної рідини (наприклад, ЖС-106: 4 г РОР, 0,05 г РОРОР в 1 л толуолу) і вимірюють радіоактивність зразків (А). Як правило, проводять обрахування в імг/хв (срт) на одиницю маси тканини:

$$A = \frac{A_i - A_{\text{фон}}}{P_i},$$

де: і — номер зразка, A_i та $A_{\text{фон}}$ — радіоактивність (срт) зразка досліджуваної тканини, і відповідний фон; P_i — наважка тканини (мг).

Для визначення "істинної" радіоактивності зразків (срт) необхідно врахувати ефективність реєстрації випромінювання і ввести поправки на гасіння, спричинене як зразком, так і солюбілізатором.

При використанні як солюбілізатора солуену слід пам'ятати, що розчиненим у ньому біологічним зразкам властиві фосфорисценція і хемілюмінесценція, тобто вони здатні випромінювати фотони, не пов'язані із взаємодією іонізуючого випромінювання зі сцинтиляційною рідиною. На відміну від радіоактивного випромінювання, інтенсивність цих видів люмінесценції різко зменшується з часом і через певний час майже зникає. Тому при використанні солуену як солюбілізатора необхідно зразки деякий час перед обрахуванням витримати в темряві. Цей проміжок часу визначається експериментально в серії послідовних вимірювань радіоактивності. Якщо кожне послідовне вимірювання радіоактивності дає такий же результат, як і попереднє, то внеску фосфоресценції і хемілюмінесценції немає.

Одним з методів виділення речовин, що досліджуються, з біологічних зразків є хроматографічне розділення їх. Якщо піддослідній тварині був введений радіоактивний попередник метаболітів, які вивчаються, то після вимірювання радіоактивності хроматограм можна визначити вміст відповідних метаболітів. При використанні, наприклад, тонкошарової хроматографії для розділення метаболітів контури плям обводять голкою і адсорбент кожної плями, який містить певний метаболіт, переносять у флакон для сцинтиляційного обрахування за допомогою шпателя. Для врахування гасіння, спричиненого адсорбентом, у контрольну пробу вносять таку ж кількість адсорбенту з краю хроматографічної пластинки.

У випадку використання для розділення речовин хроматографії на папері доцільно відділити досліджувані речовини від хроматографічного паперу за допомогою належного розчинника і вже його

внести в сцинтиляційну рідину. Якщо це неможливо, то за певних умов допускається внесення в сцинтиляційну рідину безпосередньо хроматографічного паперу зі зразком. Для цього навколо плями креслять квадрат із стороною 1,5 см, вирізають його і поміщають у флакон зі сцинтиляційною рідиною. Треба мати на увазі, що папір не проникний для фотонів, які випромінюють розчинники і флюоресценти. Крім того, малі за розмірами речовини (амінокислоти, цукри тощо) здатні проникати всередину паперу і ставати недосяжними для сцинтиляційної рідини.

Радіоактивність хроматографічно розділених речовин, які містяться в одиниці маси досліджуваної тканини, (наприклад, імп/хв на 1 г тканини) визначають за формулою:

$$A = \frac{A_1 - A_2}{P},$$

де: A_1 і A_2 — відповідно радіоактивність (срм) досліджуваного зразка, (плями хроматограми) і контролю, P — наважка тканини, взятої для визначення радіоактивності, г.

Наведений вище вираз придатний для розрахунків лише в тому випадку, коли фон при визначенні A_1 і A_2 однаковий. Якщо це не так, то слід врахувати рівень фону при кожному вимірюванні. Для визначення "істинного" числа розпадів радіоізоотопу (dpm) необхідно врахувати ефективність реєстрації випромінювання детектором.

При визначенні радіоактивності препаратів, розділених за допомогою електрофорезу (наприклад, в поліакриламідному гелі), які містять радіоізотопи з високою енергією випромінювання (наприклад, $^{14}_6\text{C}$, $^{32}_{15}\text{P}$), стовпчик гелю розрізають на диски завтовшки не більше 1–2 мм. Ці диски потім висушують, як правило, на фільтрувальному папері протягом 30 хв при температурі 50 °С або протягом 2–3 год при кімнатній температурі до стану тонкої плівки, поміщають у флакон зі сцинтиляційною рідиною і прораховують, як осад на фільтрах. Однак у випадку, коли зразок містить ^3_1H , тонкі диски гелю (завтовшки до 1 мм) гідролізують. Для цього диски вносять у флакон для сцинтиляційного обрахування, додають 0.1 мл суміші 30% H_2O_2 і концентрованого NH_4OH у співвідношенні 99:1. Флакони після струшування поміщають у термостат і витримують при температурі 37 °С протягом 18–20 год, а потім переносять у водяну баню при температурі 60 °С на 2 год, і періодично струшують їх. Після цього флакони охолоджують і додають 10 мл сцинтиляційної рідини (наприклад, суміші Брея, табл. 14.3). Одним з методів підвищення

ефективності реєстрації ${}^3_1\text{H}$ у зразках, розділених за допомогою електрофорезу, є введення в гель замість певної кількості води сцинтиляційної рідини.

Для визначення радіоактивності білкових фракцій у біологічному зразку широко використовують елюцію білків 1% додецилсульфатом натрію. При використанні електрофоретичного розділення речовин тонкі диски гелю розміщують в 0,5 мл 1% додецилсульфату натрію, витримують при температурі 37°C протягом 1 доби і відібрані аліквоти обраховують у рідинному сцинтиляційному детекторі.

Звичайно вміст високомолекулярних сполук у біологічному зразку визначають при вимірюванні їхньої функціональної активності або на основі їхніх фізико-хімічних властивостей, які дозволяють розділити досліджувані сполуки. Однак якщо визначити вміст таких сполук цими методами не можна, то використовують радіоактивну мітку. Розглянемо приклад використання подвійної мітки для очищення білків. Нехай культуру бактерій, здатних продукувати певний білок, вирощують у середовищі, яке містить, наприклад, ${}^3_1\text{H}$ -лейцин. У цьому випадку (за умов, що всі білки включають радіоактивну мітку) всі білки цих бактерій (в тому числі і той, що вивчається) будуть включати ${}^3_1\text{H}$. Якщо в середовищі, яке містить ${}^{14}_6\text{C}$ -лейцин, вирощувати мутантні бактерії, які продукують тільки фрагмент білка, що вивчається, то всі білки, крім досліджуваного, включатимуть ${}^{14}_6\text{C}$ -лейцин, оскільки в мутантів білок, що досліджується, не синтезується. При змішуванні мічених ${}^3_1\text{H}$ і ${}^{14}_6\text{C}$ культур бактерій і виділенні загального білкового препарату після його фракціонування (наприклад, за допомогою хроматографії) досліджуваний білок буде знаходитися у фракції з найбільшим відношенням ${}^3_1\text{H} / {}^{14}_6\text{C}$. У фракції, яка містить тільки ${}^3_1\text{H}$, цей білок буде знаходитися в чистому вигляді.

Безумовно, область використання радіоізоотопів у біохімічних дослідженнях не обмежується наведеними прикладами. Дослідник повинен критично оцінити можливість одержання вірогідних результатів методом радіоактивної мітки.

14.5. АВТОРАДІОГРАФІЯ

Основна мета авторадіографічного методу реєстрації випромінювання радіоізоотопів — визначення розподілу радіоізоотопів в об'єкті дослідження. За допомогою цього методу можна визначити локалізацію радіоактивної мітки в тканинах, клітині, клітинних органелах і навіть у макромолекулах. У біохімічних дослідженнях, крім вище-

згаданих об'єктів, авторадіографічний метод широко застосовується для ідентифікації плям на хроматограмах і зон на електрофореграмах.

Метод авторадіографії базується на таких принципах: 1) якщо досліджуваний зразок, містить радіоізотоп—мітку, привести в контакт зі спеціальною фотоемульсією (ядерною емульсією), а в деяких випадках, з високочутливою рентгенівською плівкою, то при взаємодії випромінювання радіоізоотопу з матеріалом емульсії активуються зерна галогеніду срібла (вони містяться в емульсії); 2) внаслідок активації зерна галогеніду срібла при обробці їх фотопроявником набувають здатності до відновлення в металеве срібло; 3) картинка (почорніння), яка утворюється після проявлення емульсії, показує розподіл радіоізоотопу в зразку. Зображення, які виникли на емульсії, розглядають під світловим мікроскопом. У випадках, коли інтенсивність почорніння емульсії, спричиненого дією випромінювання, пропорційна кількості радіоізоотопу в зразку, можна проводити кількісне визначення вмісту радіоізоотопу. Для цього використовують зразки—стандарті, які ідентичні дослідному зразкові, але містять відому кількість радіоізоотопу. При порівнянні ступеня почорніння дослідного зразка зі зразками—стандартами (це робиться на спеціальному приладі — денситометрі) можна визначити вміст радіоізоотопу в дослідному зразку.

Авторадіографічний метод реєстрації випромінювання радіоізоотопів потребує великої та ретельної підготовчої роботи (приготування зразків, вибір ядерної емульсії, підбір способу контакту зразка з емульсією та часу експозії тощо), акуратності і чіткості виконання правил зберігання та проявлення емульсій і роботи з ними тощо. Незважаючи на ці недоліки, авторадіографія знайшла широке використання в біохімічних дослідженнях внаслідок того, що це поки що єдиний метод реєстрації випромінювання радіоізоотопів, який дозволяє відносно точно визначити локалізацію радіоізоотопів в об'єкті дослідження, особливо при дослідженні об'єктів малого розміру з незначним вмістом радіоізоотопів.

Ядерні емульсії, які використовуються в авторадіографії мають ряд відмінностей від звичайних фотоемульсій, основними з них є: великий вміст зерен галогеніду срібла (як правило, співвідношення кількості зерен галогеніду срібла до наповнювача желатину становить 1:1) і малі розміри зерен галогеніду срібла (діаметр — 0,02–0,30 мкм).

У біохімічних дослідженнях авторадіографічним методом, виходячи з мети та завдань досліджень, реєструють розподіл у біологічних об'єктах, в основному, β -випромінюючих радіоізоотопів —

${}^3_1\text{H}$, ${}^{14}_6\text{C}$, ${}^{32}_{15}\text{P}$, ${}^{35}_{16}\text{S}$ та ін. Дуже рідко використовують α -випромінюючі радіоізотопи полонію або торію. Використання γ -випромінюючих радіоізотопів обмежене тим, що γ -кванти мають дуже низьку іонізаційну здатність, і тільки при великих потужностях γ -опромінення можлива активація зерен галогеніду срібла вторинними електронами, що утворилися після взаємодії γ -квантів з речовиною емульсії.

При проходженні крізь ядерну емульсію частинки, яка випромінюється радіоізотопом, її енергія поступово зменшується в результаті взаємодії частинки з речовиною емульсії. Частина енергії випромінювання йде на активацію зерен галогеніду срібла. Розподіл зерен, який спостерігається після проявлення, називається *треком* випроміненої частинки. Прийнято вважати, що для ідентифікації треку необхідно, щоб на прямій лінії було не менше чотирьох проявлених зерен, оскільки така комбінація маловірогідна в емульсіях, які не були опромінені. Трек характеризується довжиною, формою, густиною проявлених зерен. Ці параметри треку обумовлюються видом випромінювання, властивостями емульсії, способом контакту емульсії зі зразком, її проявлення тощо.

При проходженні крізь емульсію α -частинок, які мають високу іонізаційну здатність, практично всі зерна галогеніду срібла, які зустрічаються на їхньому шляху, активуються, і α -частинки швидко втрачають свою енергію. Треки α -частинок характеризуються високою густиною зерен і відносно малою довжиною.

При взаємодії β -частинок з атомами емульсії виникає їх розсіювання, внаслідок чого вони втрачають енергію і різко змінюють напрямку свого руху. Величина цієї зміни залежить від енергії β -частинок. При відносно великих енергіях β -частинки незначно розсіюються на початку свого пробігу. В міру збільшення довжини пробігу в результаті взаємодії з орбітальними електронами атомів емульсії енергія β -частинок зменшується, і вірогідність зміни напрямку руху збільшується. Однак оскільки електронна густина речовини емульсії велика, різкі зміни напрямку руху взаємно компенсуються. Таким чином, на короткій відстані трек високоенергетичних β -частинок (наприклад, ${}^{32}_{15}\text{P}$) залишається практично прямолінійним, а потім, в міру зменшення енергії β -частинок, починає викривлятися, причому густина зерен більша в кінці треку, ніж на початку. Оскільки для випромінених β -частинок енергетичний спектр є широким, для них характерний великий набір довжин треків.

Треки, які виникають унаслідок взаємодії з речовиною емульсії β -випромінювання ізотопів із середньою енергією (наприклад, ${}^{14}_6\text{C}$),

являють собою короткі викривлені лінії. Низькоенергетичні β -частинки (наприклад, ті, що випромінюються ^3_1H) треків не утворюють, а результатом їх взаємодії з емульсією є активація окремих зерен галогеніду срібла, які після проявлення являють собою почорніння у вигляді крапок.

Залежно від мети і завдань дослідження, а також радіоізоотопів, які використовуються, роздільної здатності й ефективності методу авторадіографії в біохімічних дослідженнях використовують три основних типи взаємного розміщення зразка та емульсії: зразок занурений в шар емульсії, товщина якого більше, ніж довжина треків; зразок, який знаходиться на поверхні предметного скельця мікроскопа, зверху покритий шаром емульсії, товщина якого більша, ніж максимальна довжина треків; зразок, який розміщений на поверхні предметного скельця мікроскопа, зверху покритий тонким шаром емульсії, товщина якого менше довжини треків.

Найчастіше в біохімічних дослідженнях використовують два методи контакту між емульсією і зразком:

Метод тимчасового контакту, в якому зразок приводиться в зіткнення з емульсією протягом часу експозиції і видаляється перед проявленням. Між зразком і емульсією в разі необхідності розміщують тонкий захисний шар желатину з метою запобігання впливу на емульсію речовин, які містяться в зразку. Цей метод широко застосовується для ідентифікації плям на хроматограмах і зон на електрофореграмах, при визначенні локалізації радіоізоотопів у відносно великих за розмірами об'єктах;

Метод постійного контакту. Звичайно використовують три варіанти цього методу:

1. Нанесення зразка на попередньо підготовлену емульсію. В цьому варіанті зразок висушують на емульсії (якщо він являє собою осад) або емульсію вводять під зразок таким чином, щоб зразок розміщувався на емульсії. Чутливість методу може бути збільшена, якщо зразок зверху покрити додатковим шаром рідкої емульсії. Цей метод відносно чутливий, але він має і ряд недоліків, основним є те, що, по-перше, треки необхідно бачити крізь зразок, по-друге, проявник повинен проникати крізь зразок, тому проявлення може бути неоднорідним, по-третє, він супроводжується високим рівнем фону;

2. Метод занурення. В цьому методі зразок попередньо наносять на предметне скельце мікроскопа і занурюють у розплавлену емульсію. Занурення особливо ефективне при роботі з низькоенергетичним випромінюванням, оскільки в цьому випадку досягається найтісніший контакт між зразком і емульсією. Перевагами цього

методу є швидкість і простота приведення в контакт зразка і емульсії; висока роздільна здатність, зважаючи на те, що в рідких емульсіях зерна галогеніду срібла мають мінімальні розміри; можливість одержання тонких емульсій. Суттєвим недоліком даного методу є нерівномірність товщини емульсії;

3. Метод покривної емульсії. Приготовлена спеціальним чином за допомогою аплікатора тонка емульсійна плівка (завтовшки до 5 мкм) і яка розміщена на підложці із желатини (завтовшки до 10 мкм) відділяється від предметного скельця мікроскопа, на якому її готували, і поміщається на поверхні води на 2–3 хв. За цей час унаслідок набрякання желатину поверхня емульсії збільшується на 40–50%. Зразок, розміщений на предметному скельці мікроскопа вводять під плаваючу на воді емульсійну плівку і піднімають так, щоб остання оточувала його. Після висушування площа плівки зменшується до початкових розмірів і щільно вкриває зразок. Цей метод має високу роздільну здатність, товщина емульсії рівномірна, що дає можливість на основі обрахування проявлених зерен порівнювати радіоактивність різних зразків або окремих частин одного зразка. Недоліками методу занурення є відносно великий (порівнянно з іншими методами) час приготування системи зразок–емульсія; те, що емульсії, які використовуються в цьому методі, мають відносно меншу чутливість, а зразок повинен бути не розчинним у воді.

Під роздільною здатністю методу авторадіографії розуміють можливість визначення місця розміщення в зразку джерела випромінювання, розрізнення проявлених зерен галогеніду срібла при підрахуванні їх з метою порівняння радіоактивності зразків тощо. Розділення залежить від багатьох факторів, з яких основними є вид, активність і енергія випромінювання, тип емульсії, розміщення і розміри зразка, спосіб контакту між зразком і емульсією та проявлення емульсії, наявність фону, апаратура для дешифрування авторадіограм, наявність досвіду та навичок у дослідника тощо.

Для локалізації джерела випромінювання по треках їх, як правило, екстраполюють до точки, в якій вони беруть початок. Таким чином, радіоізотопи, які дають викривлені треки (наприклад, ^{14}C) не можна використати з високим розділенням для локалізації джерела випромінювання. В той же час для високоенергетичних радіоізотопів, які утворюють довгі та прямі треки, визначити локалізацію джерела випромінювання можна з високим розділенням.

Якщо джерело випромінювання внаслідок великих геометричних розмірів зразка або його віддаленого розміщення знаходиться

відносно далеко від емульсії, розділення погіршується, оскільки певна частка випромінювання не досягає емульсії. Розмір зерен галогеніду срібла теж суттєво впливає на розділення. Якщо центр зерна значно віддалений від шляху випромінюваної частинки, то таке зерно може не активуватися випромінюванням. Дуже важливо мати мінімальні розміри зерен при реєстрації низькоенергетичного випромінювання (наприклад, ${}^3_1\text{H}$), оскільки таке випромінювання може спричинити активацію одиничних зерен. На розділення впливає також чутливість емульсії, тобто значення енергії випромінювання, необхідної для активації зерен галогеніду срібла. Вказані причини далеко не вичерпують усіх факторів, які здатних впливати на роздільну здатність методу авторадіографії.

При оцінці ефективності авторадіографічного методу необхідно виходити з наступного: по–перше, якщо зразок розміщений на емульсії, то тільки половина частинок, які випромінюються, взаємодіє з емульсією; по–друге, навіть коли зразок і занурений в емульсію, то в зв'язку з тим, що він має певну товщину, виникає явище самопоглинання випромінювання зразком.

Результати вивчення впливу товщини зразка, який становить собою усереднену біологічну тканину (за масою O_2 — 76,2%, C — 11,1%, H_2 — 10,1%, N_2 — 2,6%), на поглинання енергії β -випромінювання радіоіотопів ${}^{32}_{15}\text{P}$, ${}^{14}_6\text{C}$ і ${}^3_1\text{H}$ наведені в табл.14.4.

Таблиця 14.4. Вплив товщини біологічного зразка на поглинання β -випромінювання радіоіотопів ${}^{32}_{15}\text{P}$, ${}^{14}_6\text{C}$ і ${}^3_1\text{H}$

Радіоіотоп	Товщина зразка і частка поглиненої енергії, %		
	0,5 мкм	5 мкм	10 мкм
${}^{32}_{15}\text{P}$	< 0,1	1	10
${}^{14}_6\text{C}$	1	18	30
${}^3_1\text{H}$	84	96	99

Ефективність реєстрації випромінювання радіоіотопів методом авторадіографії залежить також від товщини емульсії. Для β -випромінювання ${}^{32}_{15}\text{P}$ треки спостерігаються на глибині до 100 мкм, для ${}^{14}_6\text{C}$ максимальна ефективність досягається при товщині емульсії 3–5 мкм, а довжина пробігу β -частинок ${}^3_1\text{H}$ в емульсіях становить приблизно 1 мкм.

Існують також інші фактори, які впливають на ефективність методу авторадіографії. Це, зокрема, час експозиції, температура, вологість повітря тощо. Перед початком роботи дослідник повинен критично оцінити методику авторадіографії, яку він збирається використати, і можливість одержання вірогідних результатів.

В авторадіографії *фоном* називають темні окремі зерна або треки, що спостерігаються при проявленні емульсії, які не зазнали дії випромінювання досліджуваних радіоізоотопів. Фон може бути обумовлений цілим рядом причин, основні з яких є: випадкове попадання світла; наявність у зразку хімічно активних речовин (наприклад, атомів міді), здатних активувати зерна галогеніду срібла;* умови проявлення; дія електромагнітного поля; механічна дія на емульсію; випромінювання природних радіоізоотопів довкілля та космічне випромінювання тощо.

Фон може з'явитися до внесення зразка, під час експонування або проявлення і може бути представлений як у вигляді треків (в основному в товстих емульсіях), так і окремих темних зерен (крапок). Фон у вигляді треків, який з'явився до внесення зразка, можна усунути при використанні рідких емульсій, оскільки треки руйнуються при плавленні емульсії. При використанні методу покривної емульсійної плівки до складу емульсії вводять спеціальний гасник зображення, який робить процес активації зерен галогеніду срібла оборотним. Цей гасник зображення є водорозчинним, і за час знаходження емульсійної плівки на воді видаляється з емульсії.

Оскільки число зерен збільшується з товщиною емульсії для зменшення фону доцільно використовувати тонкі емульсії, не товстіші, ніж це необхідно для досягнення максимальної ефективності реєстрації випромінювання.

Для зменшення фону, обумовленого природною радіоактивністю довкілля та космічними променями, дослідження необхідно проводити в спеціально обладнаних приміщеннях з мінімальним рівнем цих випромінювань, а при необхідності треба вжити заходи щодо захисту від них.

Дослідники, які мають певний досвід і навички роботи, здатні з високою ефективністю при дешифруванні авторадіограм відрізнити результат дії випромінювання, що досліджується, від фону.

Крім розглянутого вище звичайного методу авторадіографії, існують модифікації цього методу. Так, для авторадіографічної реєстрації високоенергетичного β -випромінювання і, особливо, γ -випромінювання, які здатні покинути межі емульсії без суттєвого віддавання своєї енергії, використовують *метод "непрямої"*

авторадіографії. В цьому методі енергія випромінювання, яке не взаємодіяло з емульсією, трансформується у світлову енергію. Для цього емульсію по інший бік від зразка покривають флуоресцентним екраном. Під дією випромінювання на цьому екрані в місцях, розмічених над джерелом випромінювання, виникає свічення, яке буде зареєстроване емульсією. Таким чином, в цьому випадку почорніння емульсії при проявленні обумовлене як прямою дією випромінювання, так і опосередкованою — свіченням флуоресцентного екрана.

Широко використовується також *флюорографічний метод* визначення локалізації джерела радіоактивного випромінювання. В цьому методі, на відміну від "непрямої" авторадіографії, флюорограф приводиться в безпосередній контакт з радіоактивним зразком. Так, при дослідженні радіоактивності гелів, флюорограф вноситься в сам гель. Світло флуоресценції, яке збуджується за рахунок енергії випромінювання, реєструється, наприклад, за допомогою ядерної емульсії або високочутливої рентгенівської плівки. Чутливість цього методу настільки велика, що дозволяє з високою ефективністю реєструвати випромінювання ${}^3_1\text{H}$, а тим більше — високоенергетичне випромінювання.

14.6. ВИКОРИСТАННЯ РАДІОІЗОТОПІВ В ІМУНОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ

В основу радіоімунних методів покладений *метод ізотопного розведення*, де реакцією, яка визначає конкуренцію радіоактивних і нерадіоактивних попередників, є реакція утворення імунного комплексу антиген–антитіло. Різні варіанти цих методів пов'язані з різноманітними способами виявлення таких комплексів. Чутливість радіоімунних методів дозволяє визначати білки у кількості 10^{-12} – 10^{-9} г. Вибірковість цих методів для нуклеїнових кислот та інших сполук дещо нижча.

Існує відносно велика кількість способів уведення радіоізо-топу–мітки в речовини, в тому числі ті, які можуть бути антигенами або антитілами. Так, для білків одним з них є *йодування тирозину*. В цьому методі радіоактивний йод з Na^{125}I під дією окислювача, наприклад N-хлортолуол–сульфотаміда натрію (хлораміна T) або H_2O_2 , заміщує протон у бензойному кільці тирозину.

Введення $^{14}_6\text{C}$ у білки проводять, як правило, за допомогою ^{14}C –формальдегіду, а ^3_1H — як формальдегіду, так і боргїдриду натрію або ціанобромгїдриду.

Широко розповсюджені також ферментативні методи. Так, білки можна фосфорилувати (якщо це можливо) за допомогою відповідної протеїнкінази (як правило, цАМФ–залежної) з використанням — [γ – ^{32}P]– АТФ.

Радіоізоотоп–мітку ^{125}I вводять у нуклеїнові кислоти таким же чином, як і в білки (джерелом ^{125}I є Na^{125}I , а окислювачем, як правило, хлорамін Т). В цих випадках ^{125}I приєднується до кільця піримідинів у положенні C_5 . Зв'язок з цитозином значно міцніший, ніж з урацилом.

Фосфор входить у складі фосфорної кислоти до кожного нуклеотиду РНК або ДНК. На радіоактивний ^{32}P його заміщують, як правило, за допомогою ферментних систем (дезоксинуклеотидил–трансферази, ДНК–полімерази, РНК–лігази та ін.), причому це можна зробити з 5'– або 3'–кінців молекули.

Включення $^{14}_6\text{C}$ і ^3_1H в нуклеїнові кислоти можна провести, наприклад, за рахунок метилювання залишків гуаніну або аденіну за допомогою міченого цими радіоізотопами диметилсульфату. Включення ^3_1H в нуклеїнові кислоти можна провести з $^3\text{H}_2\text{O}$: в пурини без участі каталізаторів (повільний обмін ^1_1H на ^3_1H) або за участю метабісульфату натрію ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$). Під дією цієї сполуки цитозин у складі нуклеїнової кислоти перетворюється на урацил, при цьому з водного середовища приєднується протон. Якщо в це середовище ввести $^3\text{H}_2\text{O}$, то ^3_1H з тритієвої води буде включатися в утворений урацил.

Існує ще ряд методів включення радіоізотопу–мітки в білки і нуклеїнові кислоти, а також вуглеводи, ліпіди та ін. Один з них — це введення радіоізоотопів у дослідях *in vivo*: використовують мічені радіоізотопами попередники метаболізму (амінокислоти, моносахариди, нуклеотиди, жирні кислоти тощо), які вводяться в організм з продуктами харчування, питною водою, підшкірно, внутрішньовенно або внутрішньочеревно (тваринам), з розчинами для підживлення (рослини), через середовище живлення (мікроборганізми, культура клітин) тощо.

В радіоімунних методах використовують мічений радіоізоотопом імунний комплекс антиген–антитіло, в якому одна з цих сполук радіоактивна. Радіоактивну мітку, як правило, вводять в антигени, однак у випадках, коли ця мітка включається в антиген погано (наприклад, мало тирозину) або порушуються антигенні властивості білка, доцільно мітку включати в специфічні антитіла.

Такий підхід дозволяє визначити дуже малу кількість антигену (або антитіла) в складі неміченого препарату.

Іншим методичним прийомом є використання подвійних або потрійних імунних систем. Наприклад, до початкового комплексу антиген–антитіло приєднуються антитіла, одержані від іншої тварини, котра імунізована сироваткою крові (містить імуноглобуліни–антитіла) донора. Ці так звані "вторинні" антитіла здатні "впізнавати" антитіла першого комплексу, оскільки для другої тварини первинні антитіла є антигенами.

Один з радіоімунних методів базується на використанні радіоактивно міченого білка А з *Staphylococcus aureus*, здатного утворювати комплекси з імуноглобулінами, які виступають у ролі антитіл. Ця здатність зберігається навіть коли білок А знаходиться в складі стінки вищезгаданих бактерій. Через цей білок імуноглобуліни зв'язуються з бактеріальними клітинами і разом з ними можуть бути осаджені центрифугуванням або зібрані на фільтрі. Виготовлено імуносорбент "Protein A–Sepharose", придатний для очищення антигенів, які відповідають "посадженим" на цей імуносорбент специфічним антитілам.

Широкого розповсюдження набули конкретні *радіоімунні методи*. В них використовують радіоактивно мічений антиген, котрий необхідно визначити в експериментальному зразку, а також імунову сироватку до нього (сироватку, яка містить антитіла певної специфічності). Підбирають таку концентрацію їх, щоб в імунній реакції імунна сироватка зв'язувала тільки 50–80% радіоактивно міченого антигена, і це спричиняє нестачу антитіл. Частка зв'язаних антигенів визначається після відділення імунних комплексів від розчину шляхом преципітації, фільтрування або сорбції стосовно вихідної і зв'язаної з комплексом (або залишеної в розчині) радіоактивності. В серії попередніх дослідів до описаної вище суміші (стандартної) додають у порядку збільшення відомі кількості неміченого антигена. Між міченим радіоізотопом і неміченими молекулами антигена виникає конкуренція за антитіла, яких обмаль. Таким чином, мічені радіоізотопом антигени в складі імунних комплексів розводяться неміченими, і це спричиняється до зниження радіоактивності описаної вище стандартної суміші за рахунок її виведення цими комплексами.

На основі всіх цих вимірювань можна побудувати калібрувальну криву, де по осі абсцис відкладають концентрацію неміченого антигена, а по осі ординат — частку вихідної радіоактивності (у

відсотках), яка зв'язується в імунному комплексі антиген–антитіло або залишається в розчині. Для визначення вмісту антигена в експериментальному зразку додають його відомий об'єм до стандартної суміші міченого радіоізотопом антигена та імунної сироватки, відділяють імунні комплекси від розчину і обраховують радіоактивність. Після визначення частки зв'язаної радіоактивності за калібрувальною кривою визначають кількість даного антигена в зразку.

За способами відділення імунного комплексу з розчинів радіометричні методи поділяються на:

— преципітаційні (наприклад, осадження сульфатом амонію або іншими способами, з наступним центрифугуванням);

— фільтрувальні (імунні комплекси, що сорбовані на поверхні клітин *S. aureus*, збирають фільтруванням крізь фільтр і обраховують на ньому радіоактивний осад);

— твердофазні (один з компонентів імунного комплексу хімічно або за рахунок сорбції зв'язується з певним твердофазним носієм — сефарозою, поліакриламідним гелем, полістиролом, полівінілхлоридом або іншими речовинами).

Існує також ряд модифікацій розглянутих вище радіоімунних методів, які застосовуються в біохімічних дослідженнях.

15. ЕЛЕКТРОХІМІЧНІ МЕТОДИ

Електрохімічні методи аналізу ґрунтуються на вивченні явищ, які відбуваються на електродах або в міжелектродному просторі. Електродний процес — це гетерогенна реакція, обумовлена перенесенням заряджених часток (електронів, іонів) крізь межу розділу двох зіткнених електропровідних фаз. У результаті такого перенесення на поверхні електрода виникає різниця потенціалів і утворюється подвійний електричний шар. Через деякий час електродна реакція переходить до електрохімічної рівноваги, при якій її швидкість в обох напрямках однакова. За цих умов електричний струм крізь межу розділу фаз не проходить, і на електроді встановлюється рівноважний потенціал.

В електрохімічних методах досліджень використовується вимірювання залежності сили електричного струму в розчині від прикладеного до електрода потенціалу (полярографія); вимірювання величин рівноважних електродних потенціалів, або залежність потенціалу електрода від складу розчину (потенціометрія); вимірювання електропровідності розчинів у результаті хімічних реакцій, змін концентрації, температури тощо (кондуктометрія); вимірювання кількості електричного струму, витраченої при кількісному електрохімічному перетворенні речовини (кулонометрія).

15.1. ПОЛЯРОГРАФІЯ

Полярографія — це електрохімічний метод, в основі якого лежить автоматична реєстрація сили струму при поступовому збільшенні напруги на електродах, занурених у досліджуваний розчин. В полярографічному методі використовується явище концентраційної поляризації, яке виникає на електроді з малою поверхнею при пропусканні електричного струму крізь розчин електролітів. Зі збільшенням різниці потенціалів між електродами зростає сила струму, що проходить крізь розчин, та щільність струму на малому електроді. При цьому швидкість збіднення розчину в безпосередній близькості до поверхні малого електрода зростає, як і зростає опір проходження струму на межі малий електрод — розчин. У цілому настає такий період, коли подальше підвищення різниці потенціалів не викликає помітного зростання сили струму, що проходить крізь розчин.

При сталій рухомій рівновазі, коли кількість відновлених іонів починає дорівнювати кількості іонів, що продифундували до ртутного катода, сила струму стає постійною. Таку силу струму, при якій досягається повний розряд усіх іонів аналізованої речовини, які надходять в приелектродний простір за рахунок дифузії, називають *дифузійним* або *граничним струмом*. Швидкість дифузії речовини з розчину з вищою концентрацією в розчин з нижчою концентрацією пропорційна різниці концентрацій обох розчинів. Тому дифузійний струм пропорційний концентрації іона, що визначається в розчині.

Чутливість полярографічного методу визначається величиною ємнісного струму і обмежується $10^{-5}M$, а відносна похибка визначень становить 2–3%. Ця обставина дозволяє досліджувати значно розведені речовини і невеликі об'єми — до 0,1–0,02 мл. Висока чутливість методу поєднується зі швидкістю аналізу та можливістю одночасно визначати якісний і кількісний склад досліджуваної речовини. У зв'язку з тим, що під час аналізу концентрація розчину не змінюється, метод дозволяє в одному розчині проводити декілька повторних визначень. Варто зазначити також, що полярографічний метод можна застосовувати при дослідженні сумішей без попереднього розділення речовин.

Схематичне зображення полярографа наведено на рис.15.1.

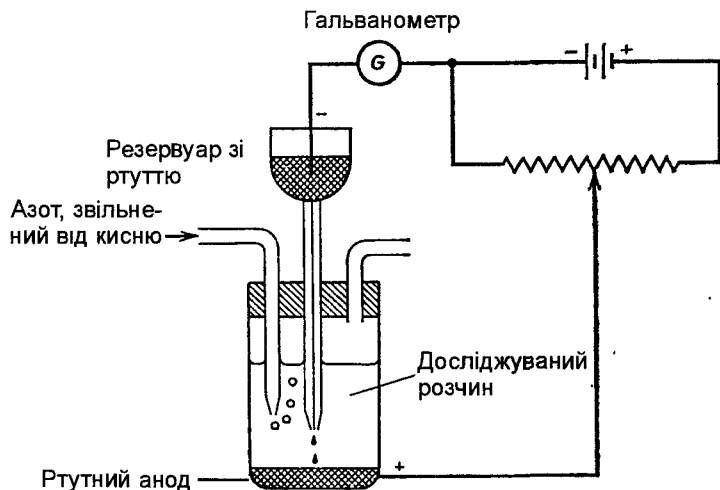


Рис. 15.1. Принципова схема полярографічної установки

Головною частиною полярографа є електролітична комірка, яка складається з резервуара, який заповнюється досліджуваним

розчином, та двох ртутних електродів. Один з них — ртутно-крапельний (катод) — являє собою скляну капілярну трубку діаметром вихідного отвору біля 0,02–0,03 мм, з якого під впливом сили тяжіння ртутні краплі з постійною швидкістю (1 крапля за 3–5 с) падають на дно електролізера з ртуттю (анод). Поверхня ртуті на дні електролізера значно більша за поверхню краплі катода, і при проходженні невеликих за величиною струмів потенціал аноду залишається постійним, тобто електрод не поляризується.

Для полярографічних досліджень нині, як правило, використовуються автоматичні електронні полярографи, в яких полярографічні криві записуються за допомогою самописця. Ці прилади мають високу чутливість, роздільну здатність і точність.

Залежність сили струму від напруги (полярограма) складається з декількох етапів (рис.15.2). Спочатку сила струму незначна, але в міру зростання напруги вона зростає, оскільки заряджається ртутно-крапельний електрод, і електроліз не відбувається. Невелике збільшення різниці потенціалів до значення, при якому відновлюється іон, призводить до того, що в цій частині невелике зростання напруги супроводжується значним збільшенням сили струму. При більш значному збільшенні напруги сила струму досягає деякої постійної величини. Пов'язане це з тим, що всі іони речовини, що їх аналізують, в приелектродному шарі встигають розрядитися, і при

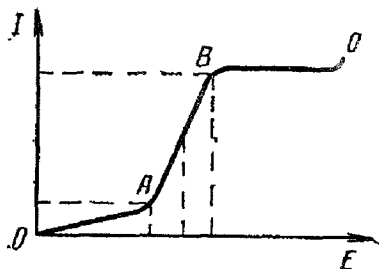


Рис. 15.2. Типова полярограма відновлення катіона

цьому швидкість дифузії відстає від швидкості виділення іонів. У випадку, коли потенціал продовжує зростати до величини, при якій починається відновлення іншого різновиду іонів, виникає нова хвиля. Таким чином, висота полярографічної кривої (полярографічної, або вольтамперної, хвилі) характеризує граничний (дифузійний) струм, прямо пропорційний концентрації речовини, що її визначають.

При якісному аналізі зручним є використання *потенціалу напівхвилі* (потенціал середини полярографічної кривої, $E_{1/2}$), величина якого не залежить від концентрації розчиненої речовини, а залежить від природи іона, що відновлюється, і його можна використати для ідентифікації аналізованої речовини.

Полярографічні хвилі властиві тим речовинам, які здатні

відновлюватися чи окислюватися на ртутно–крапельному електроді й утворювати солі з ртуттю. Для аналізу інших речовин використовуються електроди іншої природи (вугільні, срібні, платинові) або застосовуються певні хімічні реакції, які відбуваються на електроді і здатні змінювати силу струму (кінетична хвиля).

Для збільшення електропровідності розчину, що досліджується, а також для пригнічення міграційного струму (переміщення іонів під дією електростатичного поля катода) застосовується інший індиферентний електроліт (фон), розкладення якого настає при більшій різниці потенціалів, ніж це потрібно для речовини, що визначається. Подібні електроліти, котрі додаються до розчину, який аналізують, називаються *поляррографічним фоном*. Застосування того чи іншого індиферентного електроліта залежить від розчинності та стійкості в ньому досліджуваної речовини. Крім того, індиферентний електроліт не повинен реагувати з речовиною, що аналізується, і брати участь в електрохімічних процесах на електроді. Як індиферентні електроліти використовуються сольові розчини лужних, лужноземельних металів, солі амонію, луги, кислоти в концентраціях, які набагато перевищують концентрацію речовини, що визначається.

Поляррографічний метод дозволяє досліджувати як неорганічні, так і органічні речовини, здатні окислюватися або відновлюватися на поверхні електродів при проходженні постійного електричного струму. За допомогою поляррографії можна виявляти наявність і концентрацію багатьох біомолекул (амінокислот, гормонів, вітамінів) та їхніх компонентів. При дослідженні біологічних об'єктів метод також використовується для вивчення ферментативної активності білків, та взаємозв'язків між коферментами й апоферментами. Значущість поляррографічного методу полягає також у тому, що він застосовується для вимірювання концентрацій кисню в розчині. Це дозволяє використовувати метод для автоматичного реєстрування метаболічних процесів, які змінюються в короткі проміжки часу; з високою чутливістю проводити дослідження насамперед процесів дихання в мітохондріях.

Принцип методу поляррографії можна застосовувати з аналітичною метою при титруванні певних речовин — *амперометричне* (поляррометричне) *титрування*. Термін "амперометричне" вказує на те, що в цьому методі також передбачається реєстрація зміни сили струму, в якому існує залежність між зміною концентрації електроактивної речовини та величиною дифузійного струму. При цьому кінцевою точкою титрування є зменшення величини граничного струму до

нуля, або, навпаки, до початку зростання сили струму від нульового значення. Титрування проводиться при постійному потенціалі, який повинен відповідати граничному дифузійному струму електроактивної речовини, що визначається.

В амперометричному титруванні, як і в полярографії, може бути використаний ртутно–крапельний електрод, але в більшості випадків застосовуються тверді мікроелектроди (платинові, графітові тощо), які розширюють можливість використання різноманітних анодних реакцій. Крім того, титрування можна здійснювати з двома поляризованими електродами (біамперометричне титрування), в яких різниця потенціалів залежить від ступеня оборотності електродних процесів з участю реагента і речовини, що визначається.

При амперометричному титруванні можуть використовуватися реакції утворення слабозрочливих, слабодисоційованих (комплексних) сполук або окисно–відновні процеси.

Метод амперометричного титрування порівняно з класичною полярографією має ряд переваг. Насамперед це стосується точності — метод дозволяє визначати до 10^{-6} моль/л речовини, тобто на порядок вище чутливості звичайної полярографії; для проведення аналізу можуть досліджуватися досить розведені розчини (до 0,001M), а також забарвлені та каламутні розчини. На результати аналізу не впливають температура, фон, характеристика капіляра, оскільки при визначенні важлива не абсолютна величина граничного струму, а його зміна. Зміна під час титрування потенціалу окислення (відновлення) дозволяє вести роздільне титрування декількох компонентів суміші. За допомогою амперометричного титрування можна проводити аналіз без вилучення кисню з розчину і додавання поверхнево–активних речовин. І, нарешті, метод амперометричного титрування дозволяє шляхом підбору відповідних реагентів і електрохімічних активних індикаторів визначати вміст і концентрацію таких речовин, які самі по собі електрохімічно не відновлюються і не окислюються.

У зв'язку з тим, що метод амперометричного титрування поєднує протікання різноманітних і взаємопов'язаних хімічних та електродних процесів, він знаходить застосування в різнобічних дослідженнях кінетики цих процесів, складу утворених речовин, розчинності їх, участі в комплексоутворенні тощо. У біохімічних дослідженнях цей метод найчастіше використовується для титрування SH–груп та S–S зв'язків у білках.

15.2. ПОТЕНЦІОМЕТРІЯ

Потенціометричний метод базується на залежності потенціалу електроду і фізичних та фізико-хімічних процесів, які відбуваються в розчині. Величина потенціалу залежить від складу і концентрації (активності) іонів у розчині, характеру хімічних реакцій, природи електроду та інших факторів. Вимірювання величини потенціалу можливе при порівнянні величини потенціалу одного електроду з величиною потенціалу іншого електроду, тобто за різницею електродної пари, або за її електрорушійною силою. Два електроди, занурені у відповідний розчин, мають характерні для деяких умов потенціали і утворюють гальванічний елемент, напруга якого дорівнює алгебраїчній різниці цих потенціалів. При постійній величині потенціалу одного електроду за значенням електрорушійної сили можна визначити потенціал другого електроду редокспари. Електрод, потенціал якого порівнюється з другим електродом у гальванічному елементі, умовно приймається рівним нулю і має назву *електрод порівняння* (стандартний електрод). У потенціометричних дослідженнях як електроди порівняння використовуються каломельні та хлорсрібні електроди. Каломельний електрод (каломельний напівелемент) складається з металевої ртуті і розчину хлориду калію, насиченому відносно хлористої ртуті (каломелі). В насиченому розчині HgCl_2 в присутності KCl активність іонів ртуті визначається активністю іонів хлору. Потенціал каломельного електроду характеризується стійкістю і незначно змінюється зі зміною температури. Хлорсрібний електрод складається із срібного дроту, покритого рівномірним шаром хлористого срібла в розчині, що містить хлорид калію до насичення.

Електроди порівняння є слабополяризованими, потенціал яких не змінюється під час проведення потенціометричного вимірювання, а зміна електрорушійної сили електродної пари буде залежати тільки від потенціалу другого електроду пари — індикаторного електроду.

Індикаторний електрод — це електрод, потенціал якого змінюється залежно від концентрації іонів (молекул). Індикаторні електроди поділяються на металеві та мембранні. Металеві оборотні електроди виготовлені з різних стійких до окислення металів: срібла, ртуті, свинцю, платини, міді тощо, які виконують функцію металевого провідника і в розчині утворюють окисно-відновну систему. Мембранні електроди поділяються на іонселективні скляні, з рідкими, твердими мембранами (селектроди) та ензимні (ферментні) електроди.

Скляні електроди виготовляються з тонкого літєво-кальці-алю-

мосилікатного скла у вигляді кульки. Всередині електроду розташований електрод порівняння, занурений у розчин з фіксованим рН. Загальний потенціал скляного електроду складається з трьох потенціалів: потенціалу внутрішнього електроду порівняння, потенціалу асиметрії та потенціалу, обумовленого різницею концентрації іонів водню по обидва боки скляної мембрани. При цьому величини двох перших потенціалів повинні бути сталими для певного електроду. Величина третього потенціалу є змінною, оскільки при зануренні скляної мембрани в розчин іони натрію зі скла в процесі іонного обміну заміщуються еквівалентною кількістю іонів водню з розчину. Таким чином, скляна мембрана являє собою електрод, котрий є оборотним стосовно іонів водню і, отже, може бути використаний для вимірювання концентрації водневих іонів (рН) у біологічних рідинах та при роботі з біомакромолекулами.

В іонселективних електродах з твердими або осадовими мембранами передбачено використання різних малорозчинних, механічно міцних та хімічно інертних кристалів фторидів лантану, берилію, бору, сульфідо-, галогенідо- та ціанідоселективних мембранних електродів, іонообмінних полімерних смол та інших матеріалів, за допомогою яких електроди з високою чутливістю і селективністю осаджують з водних розчинів катіони та аніони. Принципова дія більшості електродів з твердими мембранами не відрізняється від інших видів іонселективних електродів, і вони можуть бути модифіковані та пристосовані для будь-яких практичних концентраційних визначень іонів у розчині.

В катіон- та аніонселективних електродах з рідкими мембранами застосовуються відповідні органічні речовини, котрі містять кислотні та лужні групи (рідкий іоніт), мають високу в'язкість і не розчинні в досліджуваному розчині. В рідинних іонселективних електродах органічний іонообмінник нанесений на тонку пористу мембрану, яка виявляє спорідненість до органічних сполук. Потенціал встановлюється на поверхні між аналізованим розчином та органічною рідиною, яка селективно реагує з іоном, що визначається. При зв'язуванні іонів органічні сполуки повинні утворювати нейтральні іоногенні групи з іонами протилежного знака заряду (в рідкому іонообміннику) або заряджені комплекси з нейтральними групами органічної природи. Рідкі мембрани в електроді розділяють дві водні фази. На межі між мембраною і розчином відбувається швидкий обмін між вільними іонами в розчині та іонами, які зв'язані органічними групами у фазі мембрани. Селективність електроду насамперед залежить від вибірковості цього іонообмінного процесу.

В ензимних електродах застосовують іммобілізацію ферменту у вигляді тонкого шару гелю між двома діалізними мембранами, або за рахунок хімічного зв'язування самого ферменту з поверхнею мембрани. В біохімічних дослідженнях використовуються ензимні електроди з іммобілізованою глюкозооксидазою (для вимірювання глюкози в біологічних рідинах), уреазою (для визначення сечовини або NH_4^+ в результаті ферментативного гідролізу), уриказою (для визначення сечової кислоти), L-амінокислотою оксидазою або каталазою (для визначення амінокислот) тощо.

Надзвичайно актуальним є підхід до вивчення фізико-хімічних процесів на біологічних мембранах, де, як відомо, вибірковий транспорт речовин підпорядковується електрохімічним закономірностям. В першу чергу це стосується здатності біомембран до нерівномірного розподілу іонів поза та всередині клітини, що спричиняє появу електричних мембранних потенціалів. Створення клітинних моделей, використання тканин для розробки мембранних біоелектродів дозволяє здійснювати модельне дослідження перенесення іонів крізь мембрани.

Взагалі для кожної реакції, як правило, підбирається відповідний індикаторний електрод. Цей вибір залежить від типу реакції, інтервалу змін рН, часу вимірювання тощо. В методі окислення — відновлення як індикаторний електрод використовуються індиферентні метали (платина, паладій, золото) у вигляді дротів, пластинок або сітки, а як електрод порівняння — водневий, каломельний або хлорсрібний. Окисно-відновний потенціал (редокс-потенціал) виникає на металевому індикаторному електроді, зануреному в оборотню окисно-відновну систему, тобто систему, яка містить речовину одночасно в окисленій та відновній формах і легко переходить одна в одну. Зміна потенціалу індикаторного електроду від однієї окисно-відновної системи до іншої супроводжується різкою зміною потенціалу. Стрибок різниці потенціалів поблизу точки еквівалентності вказує на закінчення титрування. Величина стрибка потенціалу залежить від різниці електродних потенціалів окислювача і відновника — чим більша ця різниця, тим більший стрибок.

До індикаторних електродів у методах осадження і комплексоутворення найчастіше входять срібло або ртуть, які в розчині утворюють відповідні поганорозчинні солі або комплексні сполуки. За допомогою таких металевих електродів вимірюється концентрація іонів срібла, ртуті, а також тих іонів, які зі срібними або ртутними іонами утворюють малорозчинні солі чи комплекси. В тих випадках, коли індикатор-

ним електродом є платина, застосовуються іони будь-якого іншого металу в двох різних ступенях окислення.

Найважливішим для біохімічних досліджень є метод *нейтралізації*, який використовується для вимірювання рН біологічних середовищ та для потенціометричного титрування кислот і лугів. У цьому методі застосовуються електроди, котрі є індикаторними щодо концентрації іонів водню. Найчастіше це хінгідроновий та скляний електроди. Хінгідрон—сполука еквімолекулярна і у водневому розчині поступово розпадається на хінон та гідрохінон, а отже, концентрація його складових завжди буде рівна. З цієї причини потенціал платинового електроду в розчині залежить тільки від концентрації іонів водню. Хінгідроновий електрод застосовується для вимірювання рН від 0 до 8; в лужних середовищах електрод не придатний, оскільки хінгідрон в цих умовах легко окислюється.

Скляні електроди (рН-електроди) являють собою трубку, до кінця якої припаяна тонка кулька з рН-чутливого скла. Всередині електроду знаходиться хлорводнева кислота, насичений AgCl і срібний дріт, а тому розчин має постійну активність іонів водню. При потенціометричному вимірюванні рН розчину між внутрішньою та зовнішньою поверхнями скляної мембрани виникає різниця потенціалів. При цьому потенціал внутрішньої поверхні залишається практично постійним, а потенціал зовнішньої поверхні залежить від рН розчину, що аналізується.

Взагалі конструктивно та за принципом дії скляні рН-електроди не відрізняються від іонселективних скляних електродів, але в складі скляної мембрани є певні відмінності. Слід відзначити, що поверхня мембрани рН-електродів покрита гідратованим шаром гелю кремнієвої кислоти, внаслідок чого на внутрішній і зовнішній поверхнях виникає дифузійний потенціал. При ідентичності обох шарів і рівних значеннях рН у стандартному розчині та в розчині, що аналізується, дифузійні потенціали рівні, але протилежні за знаком. Їхній сумарний потенціал дорівнює нулю. В реальних умовах сумарний потенціал відрізняється від нуля (потенціал асиметрії), і тому при вимірюванні рН необхідно систематично градуувати скляні електроди за стандартним буферним розчином з відомим значенням рН.

Потенціометричний метод аналізу застосовується для знаходження точки еквівалентності при титриметричних визначеннях (потенціометричне титрування) за різкою зміною потенціалу індикаторного електроду поблизу точки еквівалентності (стрибок потенціалу). Потенціометрія застосовується також для визначення концентрації іонів у розчині (пряма потенціометрія). За допомогою

потенціометричного методу визначається концентрація іонів водню (рН–метрія) та концентрація іонів Na^+ , K^+ , Cl^- тощо (іонометрія).

Буферні системи та визначення рН потенціометричним методом.

Організми і клітини досить стійкі до значних змін концентрації водневих іонів оточуючого середовища. Внутрішньоклітинним процесам, навпаки, властива висока чутливість до концентрації водневих іонів, і ці процеси регулюються. В живому організмі безперервно утворюється велика кількість кислих та лужних продуктів, проте зміна рН крові, тканинних рідин, лімфи тощо не відбувається. Отже, сталість концентрації водневих іонів внутрішнього середовища організмів є однією з характерних властивостей. Для проходження майже всіх біохімічних процесів необхідна сталість реакції середовища.

Більшість біологічних рідин (кров, лімфа, слина, секрети залоз, клітинний сік) мають нейтральну, слабкокислу або слабколужну реакцію середовища і виявляють буферну дію.

Чутливість біохімічних процесів до рН обумовлена різними обставинами. Іони водню можуть виступати як каталізатори деяких процесів, можуть бути учасником або продуктом реакції. При зміні рН змінюється проникність клітинної мембрани, а це призводить до зміни розподілу речовини або іонів по обидва її боки. Крім того, мембрани містять здатні до іонізації групи і залежно від ступеня іонізації їх змінюється конформація та біологічна активність молекул, до яких ці групи входять. Таким чином, зміна рН середовища різко змінює інтенсивність і спрямованість процесів обміну речовин.

У регуляції реакції середовища беруть участь декілька фізико–хімічних та фізіологічних механізмів, серед яких є *буферна система*.

Буферна система — це розчини, здатні протидіяти змінам концентрації водневих іонів як при додаванні сильних кислот або лугів, так і при розведенні. В біологічних рідинах буферні системи перешкоджають змінам рН, які виникають у процесі метаболічного утворення азотвмісних сполук (наприклад, аміаку), кислот (наприклад, молочної кислоти). Подібна здатність біологічних рідин обмежувати зміщення рН обумовлена наявністю в них буферних розчинів.

Основними буферними системами організму тварин, які забезпечують сталість рН у клітинах та міжклітинній рідині, є:

— фосфатна буферна система — NaH_2PO_4 та Na_2HPO_4 .

В даному випадку роль слабкої кислоти виконує аніон — H_2PO_4^- ;

— білкова буферна система. Для білків характерні амфотерні властивості, і ці сполуки здатні взаємодіяти як з кислотами, так і з лугами;

— гідрокарбонатна та гемоглобінова буферні системи — H_2CO_3 та NaHCO_3 . Бікарбонат нейтралізує кислоти з утворенням вугільної кислоти H_2CO_3 , яка дисоціює на H^+ і HCO_3^- .

Взагалі буферні властивості мають розчини, які містять слабкодисоційовану кислоту (донор іона водню) і сіль цієї кислоти з сильною основою (акцептор іона водню). Буферна дія цих розчинів пов'язана з ефектом нейтралізації, доданих до них кислот чи лугів, у результаті чого більша частина іонів водню (чи гідроксилу), які надійшли в розчин, переходять у малодисоційовану сполуку.

Під час дослідження метаболічних процесів *in vitro* виникає необхідність використовувати "нефізіологічні" буферні розчини, які дозволяють при спрямованій зміні рН та за допомогою електрофорезу й іонообмінної хроматографії вивчати структуру та властивості білків, нуклеїнових кислот тощо.

Найчастіше в біохімічній практиці застосовуються такі буферні суміші: ацетатний буфер (CH_3COOH та CH_3COONa); фосфатний буфер (NaH_2PO_4 та Na_2HPO_4); амонійний буфер (NH_4OH та NH_4Cl); бікарбонатний буфер (CO_2 та NaHCO_3).

Спосіб приготування різних буферних розчинів наведено в додатку 18.

Кожна з буферних сумішей характеризується певною концентрацією водневих іонів, яку буферна система намагається зберігати при додаванні кислот (H^+) або лугів (OH^-). Концентрація водневих іонів буферного розчину, який складається зі слабкої кислоти та її солі з сильним лугом, визначається величиною константи дисоціації кислоти і величиною відношення концентрації кислоти до концентрації солі:

$$[\text{H}^+] = K \cdot \frac{[\text{кислота}]}{[\text{сіль}]}$$

Якщо буферна система складається зі слабого луку та солі, то концентрація іонів гідроксилу в ній матиме вигляд:

$$[\text{OH}^-] = K \cdot \frac{[\text{луг}]}{[\text{сіль}]}$$

Приклад. Розрахувати рН ацетатного буферного розчину, який складається з 30 мл 0,1н розчину оцтової кислоти та 10 мл 0,1н

розчину оцтового натрію. Константа дисоціації оцтової кислоти дорівнює $1,8 \cdot 10^{-5}$.

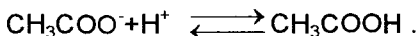
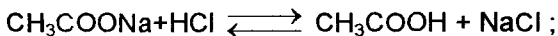
Розрахунки проводять таким чином:

$$[H^+] = K \cdot \frac{[\text{кислота}]}{[\text{сіль}]} = 1,8 \cdot 10^{-5} \cdot \frac{0,1 \cdot 30}{0,1 \cdot 10} = 1,8 \cdot 10^{-5} \cdot 3 = 5,4 \cdot 10^{-5} \text{ з-іон / л.}$$

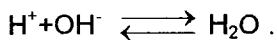
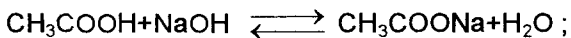
$$pH = -\lg [H^+]; \quad pH = -\lg (5,4 \cdot 10^{-5}) = -0,73 + 5 = 4,27$$

Сталу активну кислотність мають буферні розчини, які являють собою суміш слабкої кислоти з її сіллю, що утворена сильним лугом, або суміш слабого лугу з його сіллю, що утворена сильною кислотою. Концентрація водневих іонів буферної суміші залежить від концентрації її складових частин.

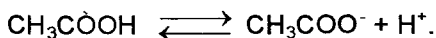
Механізм буферної дії можна розглянути на прикладі ацетатної буферної суміші, яка складається з оцтової кислоти і оцтовокислого натрію. Якщо до буферної суміші додати сильну кислоту (HCl), то аніони CH_3COO^- будуть сполучатися з іонами водню з утворенням слабкодисоційованої оцтової кислоти:



З рівняння виходить, що сильна кислота (HCl) замінюється еквівалентною кількістю слабкої кислоти (CH_3COOH), тому концентрація іонів водню залишається незмінною. При додаванні до буферного розчину лугу (NaOH) відбувається реакція нейтралізації:



Доданий луг замінюється еквівалентною кількістю слабкоосновної солі. Під час цієї реакції витрачається оцтова кислота, і можна було б очікувати значного зниження концентрації іонів водню, але практично це не відбувається, бо зменшення концентрації іонів водню в розчині спричинює зрушення рівноваги реакції дисоціації слабкої оцтової кислоти в бік розпаду її на іони:



Внаслідок цього кількість водневих іонів поповнюється, і значення рН розчину помітно не змінюється.

При додаванні кислоти до буферного розчину концентрація іонів водню (рН) зберігатиметься в ньому майже постійною до того часу, поки не зв'яжеться вся сіль; при додаванні лугу рН не змінюється, поки не буде витрачена вся кислота буферної суміші. Після цього буферна дія припиняється, і надалі при додаванні кислоти або лугу рН розчину різко змінюється. Чим вища концентрація кислоти або солі в буферному розчині, тим довше він протистоїть зміні рН, тим більша його буферна ємність.

Спряжена пара кислота–луг має важливу властивість — вона перешкоджає зміні рН розчину, тобто є буфером. Кількісною характеристикою буферних властивостей розчину є *буферна ємність*, яка чисельно дорівнює кількості г-екв (мг-екв) сильної кислоти або лугу, котру потрібно додати до 1л (мл) буферної суміші, щоб змінити водневий показник на одиницю. Таким чином, додавання кислоти або лугу до буферного розчину спричинює зрушення відношення сіль/кислота, яке визначає величину водневого показника даної буферної суміші. Чим вища концентрація компонентів суміші і чим ближче співвідношення їх до 1, тим мінімальніше зрушення, тим менше змінюється величина водневого показника, тим більша ємність буферного розчину. Отже, буферна ємність залежить від концентрації компонентів буферної суміші і від відношення сіль/кислота. Буферна ємність розраховується за формулою:

$$C = \frac{NV_1}{(pH_1 - pH_0) \cdot V_0},$$

де: N — нормальність доданої кислоти чи лугу; V_1 — об'єм доданої кислоти чи лугу; pH_1 — водневий показник розчину після титрування; pH_0 — водневий показник вихідного розчину кислоти чи лугу; V_0 — об'єм вихідного буферного розчину.

Як правило, концентрація кислоти і солі в буферних розчинах знаходиться в діапазоні 0,05–0,20М; а достатню буферну ємність розчини мають при значеннях рН = $pK_a \pm 1$.

При використанні буферних розчинів у біохімічних дослідженнях треба брати до уваги таке:

— компоненти буферної суміші повинні мати високий ступінь чистоти;

— буфер повинен мати достатню ємність у потрібному діапазоні значень рН;

— рН буферних розчинів повинен якомога менше залежати від їхніх концентрацій, температури та іонного або сольового складу середовища;

— комплекси буфера з катіонами повинні бути розчинними;

— буферні розчини не повинні поглинати світло у видимій або ультрафіолетовій областях спектра;

— компоненти буферної суміші повинні добре розчинятися у воді і не проходити крізь біологічні мембрани; бути стійкими до гідролізу та дії ферментів;

— буферні розчини не повинні виявляти токсичну або інгібуючу дію.

Концентрація водневих іонів визначається реакцією середовища (кисла, лужна та нейтральна) в діапазоні значень від 0 до 14. За нейтральне значення середовища прийняте рН хімічно чистої води, в якій концентрація іонів водню дорівнює концентрації іонів гідроксилів. Це обумовлюється характером дисоціації молекули води, в 1 л якої на кожний вид іонів припадає по $1 \cdot 10^{-7}$ моль/іонів. Виходячи з того, що величина рН дорівнює від'ємному значенню десятичного логарифма концентрації іонів водню, водневий показник води дорівнюватиме:

$$\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}} = -\lg[\text{H}^+] = -\lg 1 \cdot 10^{-7} = 7.$$

При $\text{pH} < 7$ буде кисла реакція, в якій концентрація іонів водню переважає над концентрацією іонів гідроксилів і, навпаки, $\text{pH} > 7$ свідчить про лужну реакцію, коли концентрація водневих іонів менша, за концентрацію іонів гідроксилів.

Практично всі біохімічні реакції залежать від рН і тому важливо мати можливість точно або наближено виміряти рН. У біохімічних дослідженнях для визначення рН середовища, окисно-відновного потенціалу, кінця реакції при титруванні застосовуються індикаторний та потенціометричний методи.

Індикаторний метод ґрунтується на використанні рН-індикаторів. *Індикатори* — це переважно органічні речовини із слабкими кислотними або лужними властивостями, здатні змінювати колір залежно від концентрації водневих іонів середовища. Колір молекулярної та іонізованої форм цих речовин різний. Зміна кольору відбувається за рахунок того, що колір молекули індикатора відрізняється від кольору іонів. Наприклад, недисоційована молекула метилового червоного має червоний колір, а дисоційована — жовтий колір; молекула індикатора фенолфталеїна — безбарвна, а іон — червоний.

Залежно від того, в якому середовищі (кислому або лужному) знаходиться індикатор, його власна дисоціація буде знижуватися або підвищуватись, що і визначає забарвлення індикатора в розчині.

Кожний індикатор окремо придатний для роботи тільки у вузькому інтервалі рН, а чутливість деяких з них сягає 0,2 одиниці рН.

Якщо ж виникає необхідність знайти значення рН невідомого розчину або спостерігати за зміною рН у широкому діапазоні, використовують суміш декількох індикаторів. Набір універсальних індикаторів дає можливість визначити значення рН в інтервалі від 3 до 11.

Індикатори бувають у рідкому стані і паперові. На практиці найчастіше використовують паперові універсальні індикатори, які дозволяють визначати рН розчину з точністю від $\pm 0,5$ до $1,0$ і відносяться, як правило, до попереднього, наближеного визначення величини рН.

Використання рН-індикаторів у деяких випадках обмежене. Це пов'язано з тим, що чутливість і характер зміни кольору індикаторів значно змінюється залежно від умов визначення (температури, іонної сили розчинів, наявності деяких органічних речовин у розчині тощо). Застосування рН-індикаторів зовсім неможливе також при вимірюванні рН забарвлених розчинів.

Для визначення величини рН різних розчинів (у тому числі і забарвлених) у лабораторних умовах використовуються різні *іоніметри* (*потенціометри*), принципова схема яких наведена на рис. 15.3. Всі ці прилади базуються на вимірюванні електрорушійної сили електродної системи, яка складається з електроду порівняння

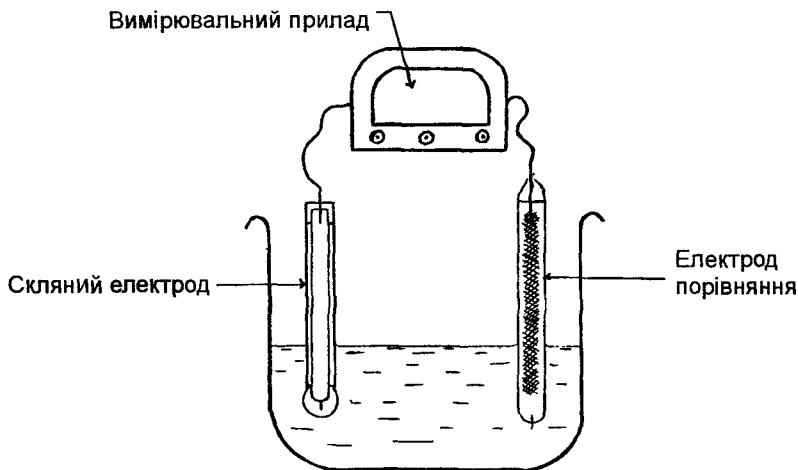


Рис.15.3. Загальний вигляд потенціометра

(водневого, каломельного, хлорсрібного) з відомим потенціалом та індикаторного електроду, потенціал якого визначається концентрацією іонів водню в досліджуваному середовищі.

У біохімічних дослідженнях використовуються різні рН-метри (рН-340, рН-262, рН-121, рН-150), універсальні іономіри (ЗВ-74, И-102) та редоксиміри. Вони призначені для вимірювання концентрації іонів водню (рН), потенціометричного титрування окисно-відновних реакцій, визначення одно- і двовалентних катіонів та аніонів (рNa, рK, рCa, рCl, рBr, рAg, рF, рNO₃, рNH₄) у водних середовищах і біологічних рідинах з відповідними іонселективними електродами. Деякі потенціометри забезпечені температурним коректором для компенсації температурних ефектів у разі, якщо температура електроду і досліджуваного розчину, не відповідає тій, при якій проводилось налагодження за буферним розчином.

Перед визначенням рН шкалу приладу налагоджують за допомогою наступних стандартних буферних розчинів при однаковій температурі:

буферний розчин	рН (20°C)
0,05 М розчин оксалату калію	1,68
насичений розчин гідротартрату калію	3,56
0,05 М розчин гідрофталату калію	4,01
0,02М розчин гідрофосфату натрію	6,86
0,01М розчин тетраборату натрію	9,18

Крім стандартних буферних розчинів, застосовуються 0,1н розчин соляної кислоти, який готується з фіксаналу. Для 0,1 н розчину НСІ рН = 1,1.

Сучасні потенціометри обладнані мікропроцесорною технікою, здійснюють автоматичне калібрування, автоматичне розпізнавання стабільного показника з цифровою індикацією на дисплеї з рідкими кристалами. Автоматичні аналізатори рН/іономіри, відповідно до умов досліду, здатні проводити складні операції щодо вибору буферних розчинів, параметрів калібрувальних точок, мають режим автоматичної температурної корекції тощо. Подібні аналізатори забезпечують діалоговий режим роботи з користувачем та реєстрацію й обробку результатів вимірювань на комп'ютері.

15.3. КОНДУКТОМЕТРІЯ

Однією з найважливіших фізико-хімічних властивостей водних розчинів є здатність проводити електричний струм, що обумовлено переміщенням катіонів та аніонів в електроліті. Здатність розчину

проводити електричний струм характеризує його опір та електропровідність. Електропровідність розчину (W) обернена величині опору (R): $W = 1/R$. Одиницею вимірювання електропровідності є обернений Ом⁻¹, або — сіменс (См).

Електропровідність розчинів залежить від кількості іонів в одиниці об'єму розчину (концентрації), їхнього складу та швидкості руху іонів в електричному полі (рухомості). Разом з тим електропровідність розчину обернено пропорційна відстані між електродами і прямо пропорційна площі електродів. Отже, електропровідність будь-якого розчину є показником концентрації розчиненої речовини і обумовлена рухомістю іонів; вимірювання електропровідності розчинів може бути використане для кількісного визначення хімічного складу розчину (кондуктометрія).

Якщо виникає потреба у порівнянні значень провідності, які одержуються з різними парами електродів, користуються *питомою електричною провідністю*. Питома провідність відповідає електропровідності 1 м³ розчину, що знаходиться між розташованими на відстані 1 м один від одного плескатими електродами площею в 1 м². За одиницю питомої електропровідності прийнято сіменс на метр (См/м). Питома електропровідність залежить від концентрації іонів, їхніх зарядів та швидкості руху іонів у розчині. До того ж, електропровідність взагалі і питома провідність зокрема залежить від температури — з підвищенням температури збільшення електропровідності розчину обумовлюється збільшенням рухомості іонів.

На практиці іноді зручно користуватися *еквівалентною* (молярною) *електропровідністю*, яка відповідає провідності шару електроліту завтовшки 1 м, вміщеному між електродами такої площі, щоб об'єм електроліту між ними містив один еквівалент (1 моль) розчиненої речовини. За одиницю вимірювання еквівалентної провідності прийнято сіменс-квадратний метр на моль (См·м²/моль). Еквівалентна електропровідність також залежить від температури, природи і концентрації досліджуваної речовини. Як правило, еквівалентна електропровідність зростає зі зменшенням концентрації речовини, а при розведенні розчину досягає деякого граничного значення (залежно від природи електроліту). При розведенні сильних електролітів слабшає взаємне притягання іонів різного заряду, а при розведенні слабких електролітів ступінь дисоціації їх зростає і прямує до одиниці; при нескінченному розведенні еквівалентна провідність електроліту дорівнюватиме сумі рухомостей катіонів і аніонів, що входять до його складу.

Кондуктометричний метод аналізу поділяється на аналітичний і

титриметричний способи визначення.

При *аналітичному* (кількісному) *методі* визначення будується графік залежності електропровідності розчину з речовиною, що аналізується, від її концентрації. За визначенням електропровідності розчину і за допомогою графіка знаходять концентрацію речовини, що аналізується.

Найбільше значення має вимірювання електропровідності в об'ємному аналізі для визначення точки еквівалентності при титруванні суміші кислот і лугів. При *кондуктометричному титруванні* одного електроліту іншим внаслідок проходження в розчині хімічних реакцій змінюється його іонний склад та електропровідність, за якою і визначається точка еквівалентності. Останню знаходять шляхом побудови графіка залежності питомої провідності від об'єму доданого (витраченого) реагента.

З метою визначення концентрації речовин кондуктометричне титрування може бути застосоване для всіх типів титриметричних визначень — реакцій нейтралізації, більшості реакцій осадження та комплексоутворення; додатне воно для титрування забарвлених та каламутних розчинів, коли перехід забарвлення індикатора важко спостерігати візуально. Метод кондуктометричного титрування дозволяє проводити аналіз суміші кислот, лугів, солей тощо в концентраціях 10^{-3} – 1 M з відносною помилкою визначень у межах 0,1–2%.

При кислотно–лужному титруванні можливі такі випадки:

— титрування сильної кислоти сильним лугом або призводить спочатку до падіння електропровідності внаслідок заміщення більш рухомих іонів водню на катіони з меншою рухомістю. В процесі титрування додавання лугу після точки еквівалентності викликає збільшення електропровідності в результаті надміру гідроксид–іонів з більшою рухомістю;

— титрування слабкої кислоти сильним лугом також призводить спочатку до зниження електропровідності розчину внаслідок утворення солі, що зменшує дисоціацію слабкої кислоти. Однак у міру того, як у розчині накопичується сіль та її гідроліз (наприклад, $\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{CH}_3\text{COOH} + \text{OH}^-$), малорухомий іон (CH_2COO^-) заміщується сильно рухомих іоном OH^- ; поблизу точки еквівалентності електропровідність розчину зростає;

— титрування слабкої кислоти слабким лугом або, навпаки, слабого лугу слабкою кислотою спочатку призводить до зростання електропровідності розчину, а після додавання надлишку реактиву залишається постійним. Це пов'язане з тим, що слабкий луг

незначно змінює загальну електропровідність розчину, а результати титрування можуть бути дуже викривлені внаслідок гідролізу утвореної солі.

Кондуктометричне титрування також може бути застосоване для аналізу суміші різних кислот та лугів з різним ступенем дисоціації. Наприклад, при титруванні суміші соляної і оцтової кислот розчином лугу спочатку проходить титрування соляної кислоти з певною точкою еквівалентності, а потім — оцтової кислоти з відповідною точкою еквівалентності.

При титриметричних визначеннях реакцій осадження треба враховувати вплив концентрації різних іонів та їхню рухомість, розчинність осаду та його утворення й інші фактори. Як правило, при титруванні за методом осадження з метою зменшення розчинності осаду до розчину додається органічний розчинник (наприклад, етанол) або титрування проводиться при пониженій температурі. Титрування на основі реакцій комплексоутворення дає можливість визначати більшість двовалентних іонів металів, а як титрант використовується етилендіамінтетраацетат (ЕДТА). При такому способі титрування спочатку підвищується електропровідність розчину внаслідок вивільнення іонів водню в реакції металів з ЕДТА, а після досягнення точки еквівалентності провідність помітно знижується. На практиці для визначення окремих іонів трилоном Б у суміші з іншими іонами застосовуються буферні розчини з різними значеннями рН середовища.

Електрична провідність розчинів у кондуктометричному методі аналізу досліджується за допомогою приладів та пристроїв зі змінним струмом, в яких використовуються невеликі пластинки платини, покриті тонким шаром платинової черні для зменшення поляризації та збільшення поверхні електродів. Типовий прилад для кондуктометричного титрування та його схема подані на рис.15.4.

У біохімічних дослідженнях титриметричний метод аналізу використовується для визначення окремих неорганічних та органічних карбонових кислот, аміно- і оксикислот, мікроелементів, SH-груп тощо. Важливе практичне значення одержало кондуктометричне титрування для визначення активності деяких ферментів (зокрема, амінотрансфераз, фосфатаз (кислої та лужної), холінестерази, лактатдегідрогенази тощо).

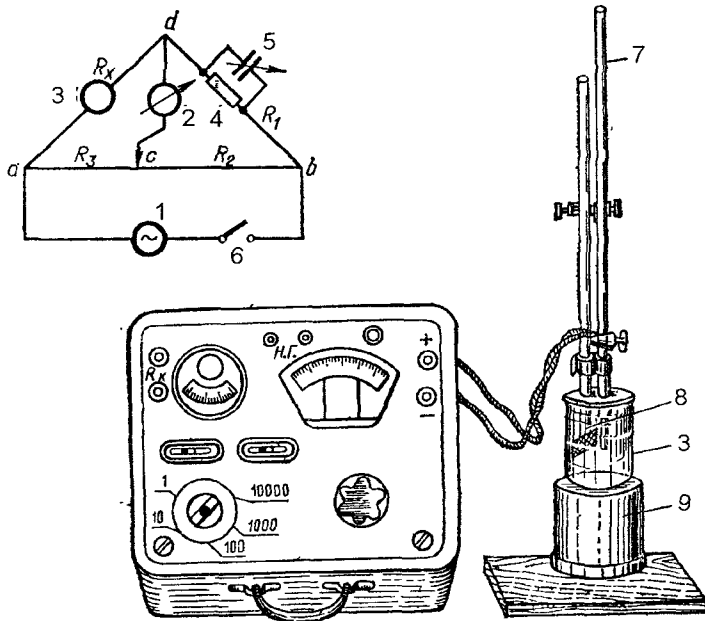


Рис. 15.4. Прилад для титриметричного титрування та його принципова схема

1 – джерело змінного струму, 2 – гальванометр; 3 – ємкість з досліджуваним розчином, 4 – постійний опір; 5 – конденсатор; 6 – вимикач, 7 – бюретка, 8 – платинові електроди, 9 – магнітна мішалка

ДОДАТКИ

Додаток 1

МІЖНАРОДНА СИСТЕМА ОДИНИЦЬ (СІ)

В 1960 р. Генеральна конференція з мір і ваг ухвалила єдину міжнародну систему одиниць (System International d'Unites). Відповідно цій системі одиниць назва і позначення основних одиниць наступні:

А. НАЗВА ТА ПОЗНАЧЕННЯ* ОСНОВНИХ ОДИНИЦЬ СІ

Фізична величина	Назва	Позначення
Довжина	метр	м
Маса	кілограм	кг
Час	секунда	с
Сила електричного струму	ампер	А
Термодинамічна температура	кельвін	К
Сила світла	кандела	кд

*При написанні одиниць СІ треба мати на увазі те, що позначення одиниць не є скороченням повної їх назви і тому після нього не ставиться крапка, вони не мають множини і, як правило, пишуться з малої літери, за виключенням випадків, коли одиниці вимірів названі на честь славетних вчених: Н (Ньютон), Дж (Джоуль), Да (Дальтон), В (Вольт), Вт (Ватт), К (Кельвін), А (Ампер), Кл (Кулон); при необхідності написання декількох позначень, що об'єднані в один вираз, записують, наприклад, наступним чином: метр в секунду, або $\text{м}\cdot\text{с}^{-1}$.

Б. КОНЦЕНТРАЦІЯ РЕЧОВИН

Назва	Основні одиниці	Похідні одиниці
Молярна концентрація	моль/л	ммоль/л, мкмоль/л, нмоль/л
Моляльна концентрація	моль/кг	ммоль/кг, мкмоль/кг, нмоль/кг
Мольна доля	моль/моль	ммоль/моль, мкмоль/моль, нмоль/моль
Масова концентрація	кг/л	г/л, мг/л, мкг/л, нг/л
Масове відношення	кг/кг	г/кг, мг/кг, мкг/кг, нг/кг
Об'ємне відношення	л/л	мл/л, мкл/л

СПІВВІДНОШЕННЯ ОДИНИЦЬ ВИМІРУ

Фізичні величини	Одиниці виміру
Довжина	$1 \text{ см} = 10^{-2} \text{ м} = 10 \text{ мм} = 10^4 \text{ мкм} = 10^7 \text{ нм} = 10^8 \text{ \AA} = 0,3937 \text{ дюйма}$ $1 \text{ нм} = 10^{-9} \text{ м} = 10^{-6} \text{ мм} = 10^{-3} \text{ мкм} = 1 \text{ мілімікрон (м } \mu)$ $1 \text{ мкм} = 10^{-6} \text{ м} = 10^{-3} \text{ мм} = 1000 \text{ нм} = 1 \text{ мікрон (} \mu)$ $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ м} = 10^{-8} \text{ см} = 10^{-4} \text{ мкм} = 10^{-1} \text{ нм}$
Маса	$1 \text{ г} = 10^{-3} \text{ кг} = 10^3 \text{ мг} = 10^6 \text{ мкг} = 3,527 \cdot 10^{-2} \text{ унцій}$ $1 \text{ Дальтон (Да)} = 1,661 \cdot 10^{-24} \text{ г, що дорівнює } 1/12 \text{ маси атому вуглецю (} ^{12}\text{C)}$
Об'єм	$1 \text{ см}^3 = 10^{-6} \text{ м}^3 = 10^3 \text{ мм}^3 = 6,1 \cdot 10^{-2} \text{ дюйм}^3 = 3,53 \cdot 10^{-5} \text{ фут}^3$ $1 \text{ мкл} = 1 \text{ мм}^3 = 10^{-9} \text{ м}^3$ $1 \text{ мл} = 1 \text{ см}^3 = 10^{-3} \text{ л} = 10^3 \text{ мкл}$ $1 \text{ л} = 1 \text{ дм}^3 = 10^{-3} \text{ м}^3$
Температура	$\text{К} = ^\circ\text{C} + 273,15$ $^\circ\text{C} = 5/9(^{\circ}\text{F} - 32)$
Енергія	$1 \text{ Дж} = 10^7 \text{ ерг} = 0,239 \text{ кал} = 1 \text{ Вт} \cdot \text{с}$
Тиск	$1 \text{ торр} = 1 \text{ мм рт.ст. (0 } ^\circ\text{C)} = 1,333 \cdot 10^2 \text{ Н/м}^2 = 1,333 \cdot 10^5 \text{ Па}$ $= 1,316 \cdot 10^{-3} \text{ атм}$

ПРИСТАВКИ ДЛЯ УТВОРЕННЯ КРАТНИХ ТА ДОЛЬНИХ ОДИНИЦЬ ВИМІРІВ*

Число	Назва	Число	Назва
10^{18}	екза(Е)	10^{-1}	деці (д)
10^{15}	пета (П)	10^{-2}	санті (с)
10^{12}	тера (Т)	10^{-3}	мілі (м)
10^9	гіга (Г)	10^{-6}	мікро (мк)
10^6	мега (М)	10^{-9}	нано (н)
10^3	кіло (к)	10^{-12}	піко (п)
10^2	гекто (г)	10^{-15}	фемто (ф)
10^1	дека (да)	10^{-18}	атто (а)

*використовують для зазначення десяткових часток основних та похідних одиниць СІ.

ГРЕЦЬКІ ТА ЛАТИНСЬКІ НАЗВИ ЧИСЕЛ

Чис- ло	Назва		Чис- ло	Назва	
	Грецька	Латинська		Грецька	Латинська
1	моно-	уні-	13	тридека-	-
2	ди-	ду-, бі-	14	тетрадека-	-
3	три-	три-	20	ікоса-	вігінті-
4	тетра-	квадрі-	30	триконта-	-
5	пента-	квінква-	40	тетраконта-	-
6	гекса-	секса-	100	гекато- (гекто)	центі-(санті-фр.)
7	гепта-	септуа-	1000	хіло(кіло)	мілі-
8	окта-	окто-	1/2	гемі-	семі-
9	ена-(нона-)	нона-	двічі	дис-	біс-
10	дека-	деці-	тричі	трис-	тер-
11	гендека-	ундеці-	багато	полі-	-
12	додека-	дуодеці-			

РОЗЧИННІСТЬ ДЕЯКИХ СОЛЕЙ У ВОДІ ПРИ РІЗНИХ
ТЕМПЕРАТУРАХ (в г безводної речовини на 100 г води)

Назва солі	Температура, С °			
	0	20	50	100
Хлористий натрій (NaCl)	35,7	36,0	37,0	39,8
Хлористий калій (KCl)	27,6	34,0	42,6	56,7
Азотнокислий калій (KNO ₃)	13,3	31,6	85,5	246
Хлористий амоній (NH ₄ Cl)	29,4	37,2	50,4	77,3
Азотнокисле срібло (AgNO ₃)	122	222	455	952
Сірчанооксида мідь (CuSO ₄ · 5H ₂ O)	14,3	20,7	33,3	75,4

Додаток 6**ТЕМПЕРАТУРА КИПІННЯ ВОДИ ЗА РІЗНИХ ТИСКІВ**

Тиск (атм)	Температура (°C)	Тиск (атм)	Температура (°C)
0,5	80,9	7	164,2
1	100,0	8	169,6
2	120,0	9	174,5
3	132,9	10	179,0
4	142,9	15	197,0
5	151,1	20	211,4
6	158,1	25	222,9

Додаток 7**ГУСТИНА ВОДИ ЗА РІЗНИХ ТЕМПЕРАТУР**

Температура (°C)	Густина (г/см ³)	Температура (°C)	Густина (г/см ³)
0	0,99987	60	0,9832
4	1,00000	80	0,9718
20	0,99823	100	0,9584
40	0,99225		

ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ НЕОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ І ЛУГІВ.

Кис- лота	Концентрація		Густина г/см ³	Спосіб виготовлення
	Моль/л	% (мас.)		
HNO ₃	15,7 (конц.)	69,8	1,42	385 мл HNO ₃ (конц.) розвести до 1л 128 мл HNO ₃ (конц.) розвести до 1л 6,5 мл переганної HNO ₃ (конц.) розвести до 1л
	6	31,6	1,195	
	2	11,8	1,067	
	0,1	0,36	1,00	
H ₂ SO ₄	18,0 (конц.)	95,6	1,84	112 мл H ₂ SO ₄ (конц.) влити в 0,5 л H ₂ O, охолодити, розвести до 1л а) 2,8 мл H ₂ SO ₄ (конц.) влити в 0,5 л H ₂ O, охолодити, розвести до 1л б) 25 мл H ₂ SO ₄ (4н) розвести до 1л
	2	17,5	1,123	
	0,05	0,49	1,00	
HCl	12,14 (конц.)	37,23	1,19	494 мл HCl (конц.) розвести до 1л 164 мл HCl (конц.) розвести до 1л 8,23 мл HCl (конц.) розвести до 1л
	6	20,0	1,100	
	2	7,05		
	0,1	0,36	1,00	
KOH	6	26,9	1,26	340 г KOH розчинити в H ₂ O та розвести до 1 л 112 г KOH розчинити в H ₂ O та розвести до 1л 5,6 г KOH розчинити в H ₂ O та розвести до 1л
	2	10,3	1,09	
	0,1	0,56	1,00	
NaOH	6	19,7	1,22	240 г NaOH розчинити в H ₂ O, охолодити та розвести до 1л 80 г NaOH розчинити в H ₂ O, охолодити та розвести до 1л
	2	7,4	1,08	

ФОРМУЛИ ДЛЯ ПЕРЕРАХУВАННЯ КОНЦЕНТРАЦІЙ РОЗЧИНІВ

Назва та визначення	Спосіб вираження концентрацій		m	M	N	C	P	S
	Позначення та одиниці виміру	Позначення та одиниці виміру						
Молярна – число моль розчиненої речовини на 1000 г розчинника	m	моль/1000г	m	$\frac{1000 \cdot M}{1000\rho - N \cdot M}$	$\frac{1000 \cdot NE}{(1000\rho - NE)M}$	$\frac{1000 \cdot C}{(1000\rho - C)M}$	$\frac{1000 \cdot P}{(1000\rho - P)M}$	$\frac{100S}{M}$
Молярна – число моль розчиненої речовини на 1 л розчину	M	моль/л	$\frac{1000 \cdot M}{1000 + mM}$	M	$\frac{NE}{M}$	$\frac{C}{M}$	$\frac{100P}{M}$	$\frac{1000S}{(100+S)M}$
Еквівалентна (нормальна) число еквівалентних мас розчиненої речовини на 1 л розчину	N	моль/л	$\frac{1000 \cdot M}{1000 + mM}$	$\frac{M}{E}$	N	$\frac{C}{E}$	$\frac{100P}{E}$	$\frac{1000S}{(100+S)E}$
В грамах розчиненої речовини на 1 л розчину	C	г/л	$\frac{1000 \cdot M}{1000 + mM}$	MM	NE	C	100P	$\frac{1000S}{100+S}$
Відсоткова – число грамів розчиненої речовини на 100 г розчину	P	% (мас.)	$\frac{100 \cdot mM}{1000 + mM}$	$\frac{MM}{10\rho}$	$\frac{NE}{10\rho}$	$\frac{C}{10\rho}$	P	$\frac{100S}{100+S}$
В грамах розчиненої речовини на 100 г розчинника	S	г/100г	$\frac{mM}{10}$	$\frac{100 \cdot M}{1000\rho - M}$	$\frac{100 \cdot NE}{1000\rho - NE}$	$\frac{100 \cdot C}{1000\rho - C}$	$\frac{100 \cdot P}{100\rho - P}$	S

Позначення: M_B — мольна маса розчиненої речовини, г/моль; E — еквівалентна маса розчиненої речовини, г/моль; ρ — густина розчину, г/мл.

Додаток 10.
ГУСТИНА(г/см³) ТА КОНЦЕНТРАЦІЯ (%)
ВОДНИХ РОЗЧИНІВ (20°С)

%	H ₂ SO ₄	CH ₃ COOH	HCl	HNO ₃	NaOH	KOH	NH ₃	NaCl
1	1,0051	0,9996	1,0032	1,0036	1,0095	1,007	0,9939	1,0053
2	1,0118	1,0012	1,0082	1,0091	1,0207	1,017	0,9895	1,0115
4	1,0250	1,0040	1,0181	1,0201	1,0428	1,035	0,9811	1,0215
6	1,0385		1,0279	1,0312	1,0648	1,053	0,9730	1,0313
8	1,0522	1,0097	1,0376	1,0427	1,0869	1,072	0,9651	1,0411
10	1,0661		1,0474	1,0543	1,1089	1,090	0,9575	1,0510
12	1,0802	1,0154	1,0574	1,0661	1,1309	1,109	0,9501	1,0610
14	1,0947		1,0675	1,0781	1,1530	1,128	0,9430	1,0710
16	1,1094	1,0209	1,0776	1,0903	1,1751	1,148	0,9362	1,0810
18	1,1243		1,0878	1,1026	1,1972	1,167	0,9295	1,1319
20	1,1394	1,0263	1,0980	1,1150	1,2191	1,186	0,9229	1,1478
22	1,1548		1,1083	1,1276	1,2411	1,206	0,9164	1,1640
24	1,1704	1,0313	1,1187	1,1404	1,2629	1,226	0,9101	1,1804
26	1,1862		1,1290	1,1534	1,2848	1,247	0,9040	1,1972
28	1,2023	1,0361	1,1392	1,1666	1,3064	1,267	0,8980	
30	1,2185		1,1493	1,1800	1,3279	1,288	0,8920	
32	1,2349	1,0406	1,1593	1,1934	1,3490			
34	1,2515		1,1691	1,2071	1,3696			
36	1,2684	1,0449	1,1789	1,2205	1,3900			
38	1,2855		1,1885	1,2335	1,4101			
40	1,3028	1,0488	1,1980	1,2463	1,4300	1,396		
42	1,3205			1,2591	1,4494			
44	1,3384	1,0525		1,2719	1,4685			
46	1,3569			1,2847	1,4873			
48	1,3758	1,0559		1,2975	1,5065			
50	1,3951			1,3100	1,5253	1,511		
52	1,4148	1,0590		1,3219				
54	1,4350			1,3336				
56	1,4557	1,0618		1,3449				
58	1,4768			1,3560				
60	1,4983	1,0642		1,3667				
62	1,5200			1,3769				
64	1,5421	1,0662		1,3866				
66	1,5646			1,3959				
68	1,5874	1,0678						
70	1,6105							
72	1,6338	1,0690						
74	1,6574							
76	1,6810	1,0698						

%	H ₂ SO ₄	CH ₃ COOH	HCl	HNO ₃	NaOH	KOH	NH ₃	NaCl
78	1,7043							
80	1,7272	1,0700						
82	1,7491							
84	1,7693	1,0693						
86	1,7872							
88	1,8022	1,0675						
90	1,8144							
92	1,8240	1,0643						
94	1,8312							
96	1,8355	1,0588						
98	1,8361							
100		1,0498						

Додаток 11.

КОНЦЕНТРАЦІЯ І ГУСТИНА КОНЦЕНТРОВАНИХ КИСЛОТ

Речовина	М	Концен- трація, %	Молярна концен тра- ція, моль/л	Кількість, яка необхідна для приготування 1л 1М розчину, мл	Густина, г см ³
Оцтова кислота	60,05	99,6	17,4	57,5	1,05
Мурашина кислота	46,03	90; 98	23,6; 25,9	42,4; 38,5	1,205; 1,22
Соляна кислота	36,46	36	11,6	85,9	1,18
Азотна кислота	63,01	70	15,7	63,7	1,42
Хлорна кислота	100,46	60; 72	9,2; 12,2	108,8; 82,1	1,54; 1,70
Фосфорна кислота	98,0	85	14,7	67,8	1,70
Сірчана кислота	98,07	98	18,3	54,5	1,835

РОЗЧИНИ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ГРАДІЄНТУ ГУСТИНИ

САХАРОЗА (М 342, 30)

Концентрація розчину сахарози			густина, г/мл		Показник заломлення, $n_D(20^\circ\text{C})$
			в'язкість $\cdot 10^2$, Па		
%	г/л розчину(20°C)	моль/л	0°C	20°C	
0	-	-	1 000 1 78	0 998 1 00	1.3330
1	10.02	0.029	1 004 1 83	1 002 1 03	1.3344
2	20.12	0.059	1 008 1 88	1 006 1 06	1.3359
4	40.55	0.119	1 016 2 00	1 014 1 12	1.3388
6	61.31	0.179	1 024 2 13	1 022 1 18	1.3418
8	82.40	0.241	1 033 2 29	1 030 1 25	1.3448
10	103.81	0.303	1 041 2 46	1 038 1 34	1.3478
12	125.6	0 367	1 050 2 65	1 046 1 43	1.3509
14	147.7	0 431	1 058 2 88	1 055 1 53	1.3541
16	170.2	0.497	1 067 3 13	1 063 1 65	1.3573
18	193.0	0, 564	1 076 3 43	1 072 1 79	1.3605
20	216.2	0 632	1 085 3 81	1 081 1 96	1.3638
22	239 8	0 701	1 094 4 21	1 090 2 14	1.3672
24	263.8	0 771	1 104 4 69	1 099 2 35	1.3706
26	288.1	0.842	1 113 5 26	1 108 2 59	1.3740
28	312.9	0.914	1 123 5 93	1 118 2 87	1.3775
30	338.1	0 988	1 133 6 74	1 127 3 21	1 3811
32	363.7	1.063	1 143 7 70	1 137 3 61	1.3847
34	389.8	1 139	1 153 8,90	1 146 4 08	1.3883
36	416.2	1 216	1 163 10 4	1 156 4 65	1.3920
38	443.2	1.295	1 173 12 3	1 166 5 35	1.3958
40	470.6	1.375	1 184 14 7	1 176 6 21	1.3997
42	498 4	1.456	1 194 17 8	1 187 7 28	1.4036
44	526.8	1 539	1 205 21 9	1 197 8 64	1.4076
46	555.6	1.623	1 216 27 4	1 208 10 4	1.4117

Концентрація розчину сахарози			густина, г/мл в'язкість $\cdot 10^3$, Пз		Показник заломлення n_D (20°C)
%	г/л розчину (20°C)	моль/л	0°C	20°C	
48	584.9	1.709	1 227 34.8	1 219 12.60	1.4158
50	614.8	1.796	1 238 45.1	1 230 15.5	1.4200
52	645.1	1.885	1 249 59.5	1 241 19.5	1.4242
54	676.0	1.975	1 261 80.5	1 252 24.9	1.4285
56	707.4	2.067	1 272 112	1 263 32.4	1.4329
58	739.4	2.160	1 284 160	1 275 43.1	1.4373
60	771.9	2.255	1 296 237	1 286 58.9	1.4418
62	804.9	2.351	1 308 367	1 298 83.0	1.4464
64	838.6	2.450	1 320 596	1 310 121	1.4509
66	872.8	2.550	1 332 1020	1 322 183	1.4555

ХЛОРИД ЦЕЗІЮ (M168, 37)

Концентрація розчину CsCl			Густина г/мл		Показник заломлення n_D (25°C)
%	г/л розчину (25°C)	моль/л	0°C	25°C	
0	-	-	1.000	0.997	1.3326
1	10.25	0.056	1.008	1.005	1.3333
2	20.25	0.119	1.016	1.013	1.3340
3	30.61	0.182		1.020	1.3348
4	41.14	0.244	1.032	1.028	1.3356
5	51.83	0.308		1.037	1.3364
6	62.68	0.373	1.049	1.045	1.3372
7	73.72	0.438		1.053	1.3380
8	84.92	0.504	1.066	1.062	1.3388
9	96.30	0.572		1.070	1.3397
10	107.88	0.641	1.084	1.079	1.3405
11	119.6	0.710		1.088	1.3414
12	131.6	0.782	1.102	1.097	1.3423
13	143.8	0.854		1.106	1.3431
14	156.1	0.927	1.121	1.115	1.3441
15	168.7	1.002		1.124	1.3450
16	181.4	1.077	1.140	1.134	1.3459

Концентрація розчину CsCl			Густина, г/мл		Показник заломлення n_D (25 °C)
%	г/л розчину (25 °C)	моль/л	0 °C	25 °C	
17	194 4	1 155		1 144	1 3469
18	207 6	1 233	1 160	1 154	1 3478
19	221 1	1 313		1 164	1 3488
20	234 8	1 395	1 181	1 174	1 3498
21	248 7	1 477		1 184	1 3508
22	262 9	1 561	1 203	1 195	1 3518
23	277 3	1 647		1 205	1 3529
24	291 9	1 734	1 225	1 216	1 3539
25	306 9	1 823		1 227	1 3550
26	322 1	1 913	1 247	1 239	1 3561
27	337 6	2 005		1 250	1 3572
28	353 3	2 098	1 271	1 262	1 3584
29	369 4	2 194		1 274	1 3595
30	385 7	2 291	1 296	1 286	1 3607
31	402 4	2 390		1 298	1 3619
32	419 5	2 492		1 311	1 3632
33	436 9	2 595		1 323	1 3644
34	454 2	2 698		1 336	1 3657
35	472 4	2 806	1 361	1 350	1 3670
36	490 7	2 914		1 363	1 3683
37	509 5	3 026		1 377	1 3696
38	528 6	3 140		1 391	1 3709
39	548 3	3 257		1 405	1 3722
40	567 8	3 372	1 432	1 420	1 3736
41	588 4	3 495		1 434	1 3749
42	609 0	3 617		1 450	1 3763
43	630 0	3 742		1 465	1 3777
44	651 6	3 870		1 481	1 3792
45	673 6	4 001	1 511	1 497	1 3807
46	696	4 134		1 513	1 3822
47	718 6	4 268		1 530	1 3837
48	742 1	4 408		1 547	1 3853
49	766 4	4 552		1 565	1 3869
50	791 3	4 700	1 598	1 582	1 3886
51	816 5	4 849		1 601	1 3902

Продовження

Концентрація розчину CsCl			Густина, г/мл		Показник заломлення n_D (25°C)
%	г/л розчину (25°C)	моль/л	0°C	25°C	
52	841 9	5 000		1 619	1 3920
53	868 1	5 156		1 638	1 3937
54	895 3	5 317		1 658	1 3955
55	922 8	5 481	1 695	1 678	1 3973
56	951 4	5 651		1 698	1 3992
57	980 4	5 823		1 719	1 4011
58	1009 8	5 998		1 740	1 4031
59	1040 2	6 178		1 762	1 4051
60	1070 8	6 360	1 804	1 785	1 4072
61	1102 9	6 550		1 808	1 4093
62	1135 8	6 746		1 831	1 4115
63	1167 3	6 945		1 855	1 4137
64	1203 2	7 146		1 880	1 4160
65	1238 4	7 355		1 905	1 4183

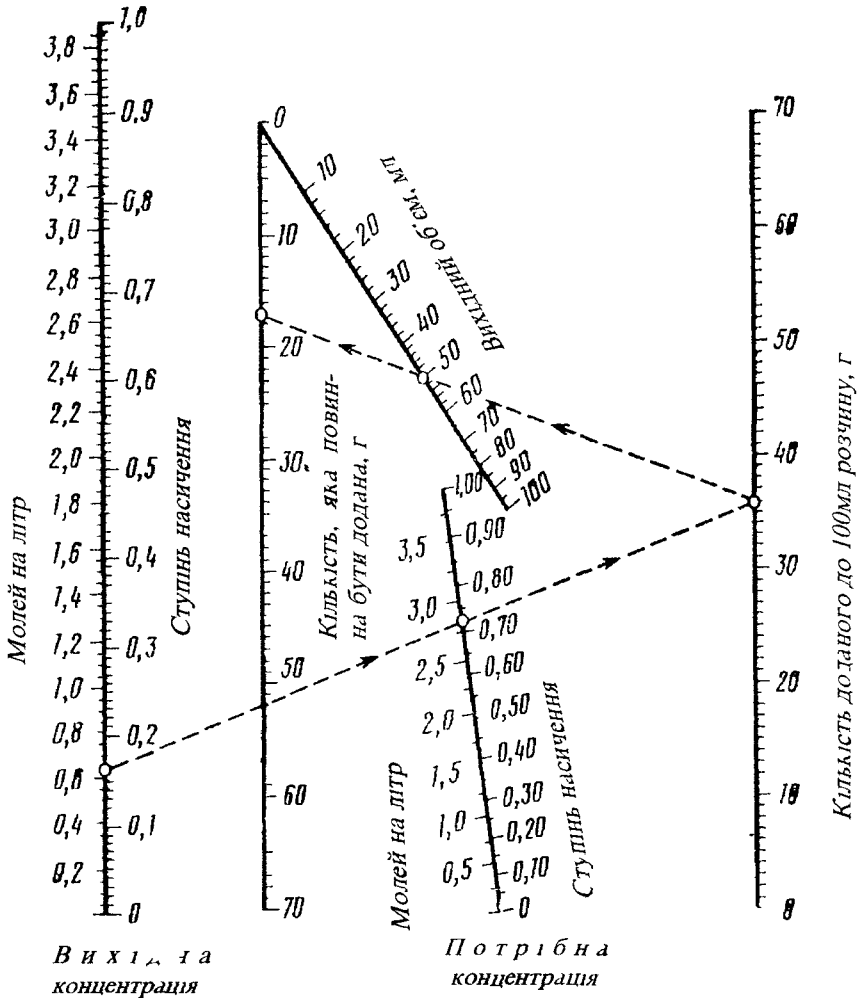
Додаток 14.

СТАНДАРТНІ ДОВЖИНИ ЗВ'ЯЗКІВ

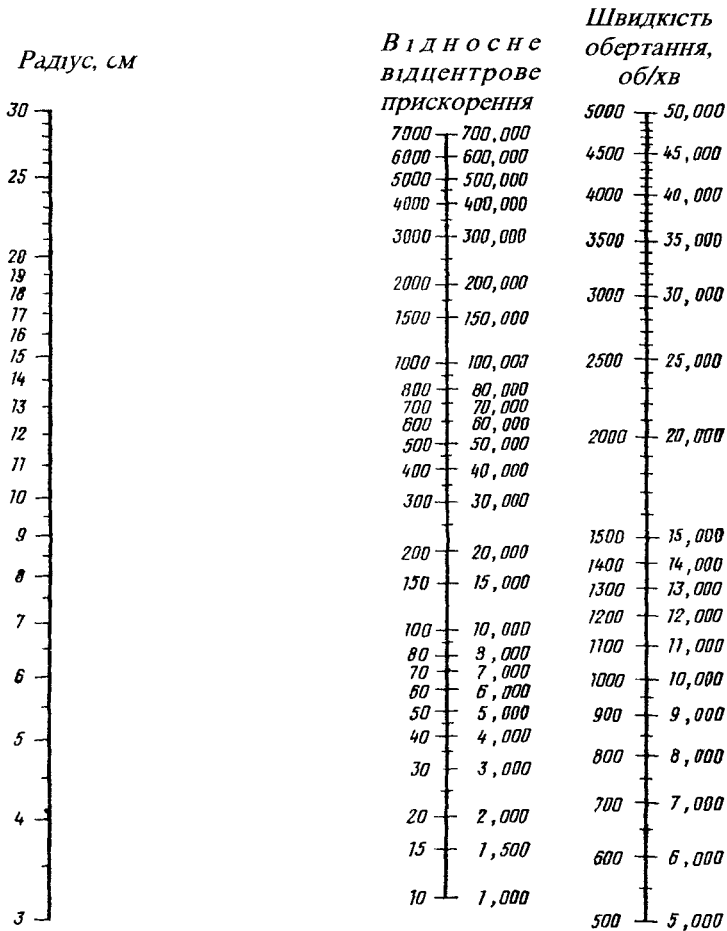
Зв'язок	Структура	Довжина, нм
C - H	R_2CH_2	0,107
	Ароматична	0,108
	RCH_3	0,110
C - C	Вуглеводна	0,154
	Ароматична	0,140
C = C	Етилен	0,133
C \equiv C	Ацетилен	0,120
C - N	RNH_2	0,147
	$O = C - N$	0,134
C - O	Спирт	0,143
	Ефір	0,136
C = O	Альдегід	0,122
	Амід	0,124
C - S	$R_2 S$	0,182
N - H	Амід	0,099
O - H	Спирт	0,097
O - O	O_2	0,121
P - O	Ефір	0,156
S - H	Тюл	0,133
S - S	Дисульфід	0,205

Додаток 15.

Номограма для обчислення кількості сульфату амонію, який необхідно додати до розчину для одержання потрібної концентрації

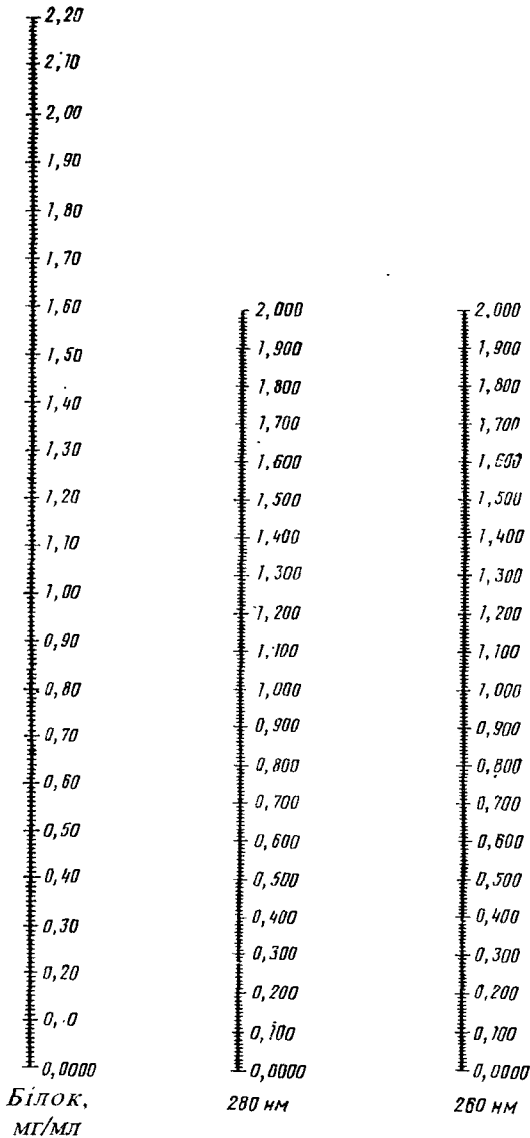


Номограма для визначення відцентрового прискорення*



*В залежності від розмірів ротора та швидкості центрифугування (обертання) величину відцентрового прискорення (G) визначають шляхом сполучення прямою лінією значення радіуса та швидкості обертання ротора на крайніх шкалах. Точка перетину цієї прямої з середньою шкалою дає невідому величину G.

Номограма для кількісного визначення білка за величиною оптичної щільності при 260 і 280 нм



БУФЕРНІ РОЗЧИНИ

1. Розчини за Кларком-Лабсом, рН 1,0÷2,2

Склад: 25 мл 0,2М КСІ(14,919 г/л) + Хмл 0,2М НСІ; розвести Н₂О до 100 мл

рН (25 ⁰ С)	НСІ Х, мл	Буферна ємність	рН (25 ⁰ С)	НСІ Х, мл	Буферна ємність
1.00	67.0	0,31	1.70	13.0	0,060
1.10	52.8	0.24	1.80	10.2	0,049
1.20	42.5	0.19	1.90	8.1	0,037
1.30	33.6	0.16	2.00	6.5	0,030
1.40	26.6	0.13	2.10	5.1	0,026
1.50	20.7	0.10	2.20	3.9	0,022
1.60	16,2	0,077			

2. Буферні розчини, що містять гліцин-НСІ, рН 2,2÷3,6 (25⁰С)Гліцин С₂Н₅NO₂; М 75,07Склад: 25 мл 0,2М гліцина (15,01 г/л) + Х мл 0,2 М НСІ; розвести Н₂О до 100 мл

рН (25 ⁰ С)	НСІ Х, мл	рН (25 ⁰ С)	НСІ Х, мл
2,2	22,0	3,0	5,7
2.4	16,2	3.2	4.1
2.6	12,1	3.4	3.2
2.8	8,4	3,6	2.5

3. Розчини за Кларком-Лабсом, рН 2,2÷4,0

Склад: 50 мл 0,1М КН-фталата (20,42 г/л) + Х мл 0,1 М НСІ; розвести Н₂О до 100 мл

рН (25 ⁰ С)	НСІ Х, мл	Буферна ємність	рН (25 ⁰ С)	НСІ Х, мл	Буферна ємність
2.20	49,5				
2,30	45,8	0,036	3,20	15,7	0,030
2,40	42,2	0,035	3,30	12,9	0,026
2,50	38,8	0,034	3,40	10,4	0,023
2,60	35,4	0,033	3,50	8,2	0,020
2,70	32,1	0,032	3,60	6,3	0,018
2,80	28,9	0,032	3,70	4,5	0,017
2,90	25,7	0,033	3,80	2,9	0,015
3,00	22,3	0,034	3,90	1,4	0,014
3,10	18,8	0,033	4,00	0,1	0,014

4. Буферні розчини, що містять лимонну кислоту — Na₂HPО₄ (за Макилвейном), рН ≈ 2,6 ÷ 7,6

Моногідрат лимонної кислоти $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$; М 210,14; 0,1М розчин містить 21,01г/л

Na_2HPO_4 М 141,98; 0.2М розчин містить 28,40 г/л

$Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ М 178,05; 0.2М розчин містить 35,61 г/л

Склад. X мл 0,1М лимонної кислоти + У мл 0,2М Na_2HPO_4

pH	0.1M $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ X. мл	0.2M Na_2HPO_4 У. мл	pH	0.1M $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ X. мл	0.2M Na_2HPO_4 У. мл
2.6	89.10	10.90	5.2	46.40	53.60
2.8	84.15	15.85	5.4	44.25	55.75
3.0	79.45	20.55	5.6	42.00	58.00
3.2	75.30	24.70	5.8	39.55	60.45
3.4	71.50	28.50	6.0	36.85	63.15
3.6	67.80	32.20	6.2	33.90	66.10
3.8	64.50	35.50	6.4	30.75	69.25
4.0	61.45	38.55	6.6	27.25	72.75
4.2	58.60	41.40	6.8	22.75	77.25
4.4	55.90	44.10	7.0	17.65	82.35
4.6	53.25	46.75	7.2	13.05	86.95
4.8	50.70	49.30	7.4	9.15	90.85
5.0	48.50	51.50	7.6	6.35	93.65

5. Буферні розчини, що містять лимонну кислоту — цитрат натрію, рН 3,0-6,2
Моногідрат лимонної кислоти $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$; М 210,14; 0,1М розчин містить 21,01 г/л

Дигідрат тринатрієвої солі $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$; М 294,12; 0,1М розчин містить 29,41 г/л

Склад: X мл 0,1М лимонної кислоти + У мл 0,1 М тринатрієвої солі лимонної кислоти

pH	0.1 M лимонна кислота X. мл	0.1 M тринатрієва сіль лимонної кислоти У. мл	pH	0.1 M лимонна кислота X. мл	0.1 M тринатрієва сіль лимонної кислоти У. мл
3.0	82.0	18.0	4.8	40.0	60.0
3.2	77.5	22.5	5.0	35.0	65.0
3.4	73.0	27.0	5.2	30.5	69.5
3.6	68.5	31.5	5.4	25.2	74.5
3.8	63.5	36.5	5.6	21.9	79.0
4.0	59.0	41.0	5.8	16.0	84.0
4.2	54.0	46.0	6.0	11.5	88.5
4.4	49.5	50.5	6.2	8.0	92.0
4.6	44.5	55.5			

6. Буферні розчини, що містять β - β' -диметилглутарову кислоту- NaOH^* , pH 3,2÷7,6 (21⁰С)

β - β' -диметилглутарова кислота $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{O}_4$; М 160,2

Склад: 50 мл 0,1 М β - β' -диметилглутарової кислоти (16,02 г/л) +
+ X мл 0,2 М NaOH ; розвести H_2O до 100 мл

pH (21 ⁰ С)	0,2М NaOH X, мл	pH (21 ⁰ С)	0,2М NaOH X, мл
3.2	4,15	5.6	27.9
3.4	7.35	5,8	29.85
3.6	11,0	6.0	32.5
3,8	13.7	6.2	35.25
4.0	16.65	6,4	37.75
4.2	18,4	6,6	42.35
4.4	19,9	6.8	44.0
4.6	20.85	7,0	45.2
4.8	21.95	7.2	46,05
5.0	23.1	7.4	46.6
5.2	24.5	7,6	47.0
5.4	26.0		

*Буфер використовують при вивченні ферментів, коли потрібен буфер із малим (не значним) поглинанням в УФ-світлі

7. Буферні розчини, що містять ацетат натрію — оцтову кислоту, pH 3,7÷5,6

Тригідрат ацетата натрію $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$; М 136.09; 0,2 М розчин містить 27,22 г/л

Склад: X мл 0,2 М CH_3COONa + Y мл 0,2 М CH_3COOH

pH (18 ⁰ С)	0,2 М CH_3COONa X, мл	0,2 М CH_3COOH Y, мл	pH (18 ⁰ С)	0,2 М CH_3COONa X, мл	0,2 М CH_3COOH Y, мл
3.7	10.0	90.0	4.8	59.0	41.0
3.8	12.0	88,0	5,0	70.0	30.0
4,0	18,0	82,0	5.2	79.0	21,0
4.2	26,5	73.5	5.4	86.0	14,0
4.4	37.0	63,0	5,6	91.0	9,0
4.6	49.0	51,0			

8. Буферні розчини, що містять янтарну кислоту — NaOH, pH 3,8÷6,0 (25 °C)

Янтарна кислота $C_4H_6O_4$; M 118,09

Склад: 25мл 0,2М янтарної кислоти (23,62 г/л) + Xмл 0,2М NaOH;
розвести H_2O до 100 мл

pH (25°C)	0,2М NaOH	X,мл	pH (25°C)	0,2М NaOH	X,мл
3,8	7,5		5,0	26,7	
4,0	10,0		5,2	30,3	
4,2	13,3		5,4	34,2	
4,4	16,7		5,6	37,5	
4,6	20,0		5,8	40,7	
4,8	23,5		6,0	43,5	

9. Розчини за Кларком-Лабсом, pH 4,1÷5,9

Склад: 50 мл 0,1М КН-фталата (20,42 г/л) + X мл 0,1 М NaOH;
розвести H_2O до 100 мл

pH (25°C)	0,1М NaOH	Буферна	pH (25°C)	0,1М NaOH	Буферна
	X, мл	ємність		X, мл	ємність
4,10	1,3	0,016	5,10	25,5	0,031
4,20	3,0	0,017	5,20	28,8	0,030
4,30	4,7	0,018	5,30	31,6	0,026
4,40	6,6	0,020	5,40	34,1	0,025
4,50	8,7	0,022	5,50	36,6	0,023
4,60	11,1	0,025	5,60	38,8	0,020
4,70	13,6	0,027	5,70	40,6	0,017
4,80	16,5	0,029	5,80	42,3	0,015
4,90	19,4	0,030	5,90	43,7	0,013
5,00	22,6	0,031			

10. Буферні розчини, що містять какодилат натрію — HCl, pH 5,0÷7,4 (15°C)

Тригідрат какодилата натрію $Na(CH_3)_2AsO_2 \cdot 3H_2O$; M 214, 02;

Склад: 50 мл 0,1 М $Na(CH_3)_2AsO_2 \cdot 3H_2O$ (21,40 г/л) + X мл 0,1 М HCl;
розвести H_2O до 100 мл

pH (15°C)	0,1М HCl	X,мл	pH (15°C)	0,1М HCl	X,мл
5,0	46,75		6,4	18,75	
5,2	45,05		5,6	13,3	
5,4	42,6		6,8	9,3	
5,6	39,2		7,0	6,3	
5,8	34,8		7,2	4,15	
6,0	29,55		7,4	2,7	
6,2	23,85				

11. Буферні розчини, що містять кислий малеат натрію — NaOH; рН 5,2÷6,8 (25°C)

Кислий малеат натрію $\text{NaHC}_4\text{H}_2\text{O}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; М 192,11; 0,2М розчин одержується розчиненням 23,2 г малеїнової кислоти в H_2O , додаванням 200 мл 1 М NaOH і розчиненням H_2O до 1 л

Склад: 25 мл 0,2 М NaH-малеата + X мл 0,1 М NaOH; розвести H_2O до 100 мл

рН (25°C)	0,1М NaOH X,мл	рН (25°C)	0,1М NaOH X,мл
5,2	7,2	6,2	33,0
5,4	10,5	6,4	38,0
5,6	15,3	6,6	41,6
5,8	20,8	6,8	44,0
6,0	26,9		

12. Буферні розчини, що містять трис (гідроксиметил) амінометан - малеат; рН 5,4÷8,4

Склад: 25 мл 0,2 М трис-малеата (на 1 л розчину 24,2 г трис + 23,2 мл малеїнової кислоти) + X мл 0,2 М NaOH; розвести H_2O до 100 мл

рН (23°C)	0,2М NaOH X,мл	рН (23°C)	0,2М NaOH X,мл
5,4	5,40	7,0	24,00
5,6	7,75	7,2	25,50
5,8	10,25	7,4	27,00
6,0	13,00	7,6	29,00
6,2	15,75	7,8	31,75
6,4	18,50	8,0	34,50
6,6	21,25	8,2	37,50
6,8	22,50	8,4	40,50

13. Буферні розчини, що містять 2-(N-морфоліно) етансульфоно-ву кислоту (MES) — NaOH, рН 5,4÷6,8

Склад: 25 мл 0,1 М MES (19,523 г/л) + X мл 0,1 М NaOH; розвести H_2O до 50 мл

рН	0,1 М NaOH X, мл		рН	0,1 М NaOH X, мл	
	21° С	37° С		21° С	37° С
5,4	-	4,4	6,2	10,3	12,0
5,6	4,6	5,7	6,4	12,9	14,9
5,8	6,2	7,3	6,6	15,3	16,9
6,0	8,0	9,4	6,8	17,4	-

14. Буферні розчини, що містять Na_2HPO_4 - NaH_2PO_4 ; рН 5,8÷8,0 (25°C)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; М 178,05; 0,2М розчин містить 35,61 г/л

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$; М 358,22; 0,2М розчин містить 71,64 г/л

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; М 138,01; 0,2М розчин містить 27,6 г/л

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; М 156,03; 0,2М розчин містить 31,21 г/л

Склад: X мл 0,2 М Na_2HPO_4 + Y мл 0,2 М NaH_2PO_4 ; розвести H_2O до 100 мл

pH (25°C)	0,2М Na_2HPO_4 X, мл	0,2 М NaH_2PO_4 Y, мл	pH (25°C)	0,2М Na_2HPO_4 X, мл	0,2 М NaH_2PO_4 Y, мл
5,8	4,0	46,0	7,0	30,5	19,5
6.0	6.15	43,85	7,2	36,0	14,0
6.2	9.25	40,75	7,4	40,5	9,5
6.4	13.25	36,75	7,6	43.5	6,5
6,6	18,75	31.25	7,8	45,75	4.25
6,8	24,5	25,5	8,0	47,35	2,65

15. Розчини за Кларком-Лабсом, pH 5,8÷8,0

Склад: 50 мл 0,1 М KH_2PO_4 (13,60 г/л) + X мл 0,1 М NaOH; розвести H_2O до 100 мл

pH (25°C)	0,1М NaOH X, мл	Буферна ємність	pH (25°C)	0,1М NaOH X, мл	Буферна ємність
5,80	3,6				
5.90	4,6	0,010	7,0	29,1	0,031
6,00	5,6	0,011	7,10	32,1	0,028
6,10	6,8	0,012	7,20	34,7	0,025
6,20	8,1	0,015	7,30	37,0	0,022
6.30	9,7	0,017	7,40	39,1	0,020
6,40	11,6	0,021	7,50	40,9	0,016
6.50	13,9	0.024	7,60	42,4	0,013
6,60	16,4	0,027	7,70	43,5	0,011
6.70	19,3	0,030	7,80	44,5	0,009
6,80	22,4	0,033	7,90	45,3	0,008
6.90	25,9	0,033	8,00	46,1	

16. Буферні розчини на основі системи бікарбонат натрію - 5%CO₂, рН 6,0÷8,0 (37°С)

рН* (37°С)	Концентрація NaHCO ₃ (М 84,02) у рівновазі з газовою фазою, яка містить 5%CO ₂ , моль/л	рН* (37°С)	Концентрація NaHCO ₃ (М 84,02) у рівновазі з газовою фазою, яка містить 5%CO ₂ , моль/л
6.0	5,86 10 ⁻⁴	7.2	9,29 10 ⁻³
6.2	9,29 10 ⁻⁴	7.4	1,47 10 ⁻²
6.4	1,47 10 ⁻³	7.6	2,33 10 ⁻²
6.6	2,33 10 ⁻³	7.8	3,70 10 ⁻²
6.8	3,70 10 ⁻³	8.0	5,86 10 ⁻²
7.0	5,86 10 ⁻³		

*при температурі <37°С (>20°С) для одержання бажаного рН концентрацію бікарбонату, яка приведена в таблиці, треба знижувати на 1,88% на кожний градус.

17. Буферні розчини, що містять імідазол (гліюксалін)-HCl, рН 6,2÷7,8 Імідазол C₃H₄N₂; М 68,08

Склад: 25 мл 0,2М імідазола (13,62 г/л) + X мл 0,2М HCl; розвести H₂O до 100 мл

рН (25°С)	0,2М HCl X, мл	рН (25°С)	0,2М HCl X, мл
6,2	21,45	7,2	9,3
6,4	19,9	7,4	6,8
6,6	17,75	7,6	4,65
6,8	15,2	7,8	3,0
7,0	12,15		

18. Буферні розчини, що містять 2,4,6-триметилпіридин (2,4,6-колідин) — HCl, рН 6,4÷8,3

2,4,6-триметилпіридин C₈H₁₁N; М 121,18

Склад: 25 мл 0,2М 2,4,6-триметилпіридина (24,24 г/л) + X мл 0,2М HCl; розвести H₂O до 100 мл

рН		0,2М HCl X, мл	рН		0,2М HCl X, мл
23°С	37°С		23°С	37°С	
6,4	6,4	22,5	7,5	7,4	11,25
6,6	6,5	21,25	7,6	7,5	10,0
6,8	6,7	20,0	7,7	7,6	8,75
6,9	6,8	18,75	7,8	7,7	7,5
7,0	6,9	17,5	7,9	7,8	6,25
7,1	7,0	16,25	8,0	7,9	5,0
7,2	7,1	15,0	8,2	8,1	3,75
7,3	7,2	13,75	8,3	8,3	2,5
7,4	7,3	12,5			

19. Буферні розчини, що містять морфолінопропансульфонову кислоту (MOPS)-KOH, pH 6,6÷7,8 (22°C)

Склад: 25 мл 0,1М MOPS (20,93 г/л) + X мл 0,1М KOH; розвести H₂O до 50 мл

pH	0.1М KOH	X,мл	pH	0.1М KOH	X,мл
	22°C	37°C		22°C	37°C
6.4		5,8	7,2	11.5	16.4
6.6	4.8	7.8	7.4	15.0	19,3
6.8	6.7	10.1	7.6	18.0	21.8
7.0	8.7	13.0	7.8	20.6	

20. Буферні розчини, що містять 5,5-диетилбарбітурат натрію (веронал натрію; барбітон натрію) — HCl, pH 6,8÷9,6 (18 °C)

5,5-диетилбарбітурат натрію C₈H₁₁N₂O₃Na: M 206,18; 0,04М розчин містить 8,25 г/л

Склад: Xмл 0,04М диетилбарбітурата натрію + Умл 0,2М HCl

pH (18°C)	0,04М диетилбарбітурата натрію X, мл	0,2М HCl У, мл	pH (18°C)	0,04М диетилбарбітурата натрію X, мл	0,2М HCl У, мл
6,8	100	18,4	8,4	100	5,21
7,0	100	17,8	8,6	100	3,82
7,2	100	16,7	8,8	100	2,52
7,4	100	15,3	9,0	100	1,65
7,6	100	13,4	9,2	100	1,13
7,8	100	11,47	9,4	100	0,70
8,0	100	9,39	9,6	100	0,35
8,2	100	7,21			

21. Буферні розчини, що містять N-етилморфолін-HCl, pH 7,0÷8,2 (20°C) N-етилморфолін C₆H₁₃NO*; M 115,17

Склад: 50 мл 0,2 М N-етилморфолін (23,03г/л) + X мл 1М HCl; розвести H₂O до 100 мл.

pH (20°C)	1 М HCl, X мл	pH (20°C)	1 М HCl, X мл
7.0	8,0	7.8	4,0
7.2	7,1	8.0	2,9
7.4	6,1	8.2	2,0
7.6	5,0		

* N-етилморфолін повинен бути сухим і свіжоперегнаним (t_{кип.} 138-139°C при 763 мм рт.ст.).

22. Буферні розчини, що містять N-((трисгідроксиметил)метил)гліцин (TRICINE)-NaOH, pH 7,4÷8,6 (37°C)

Склад: 25 мл 0,05 М TRICINE (8,958г/л) + X мл 0,05 М NaOH; розвести H₂O до 50 мл.

pH	0,05 М NaOH X,мл		pH	0,05 М NaOH X,мл	
	22°C	37°C		22°C	37°C
7,4		8,4	8,2	12,4	18,6
7,6	5,5	10,8	8,4	15,2	21,2
7,8	7,3	13,5	8,6	17,8	23,2
8,0	9,6	16,0	8,8	19,8	

23. Буферні розчини, що містять трис (гідроксиметил)амінометан*, pH 7,1÷8,9 (25°C)

C₄H₁₁NO₃; M 121,14.

Склад: 50 мл 0,1 М триса (12,114г/л) + X мл 0,1 М HCl; розвести H₂O до 100 мл.

pH (25°C)	0,1 М HCl, X мл	Буферна ємність	pH (25°C)	0,1 М HCl, X мл	Буферна ємність
7,10	45,7	0,010	8,10	26,2	0,031
7,20	44,7	0,012	8,20	22,9	0,031
7,30	43,4	0,013	8,30	19,9	0,029
7,40	42,0	0,015	8,40	17,2	0,026
7,50	40,3	0,017	8,50	14,7	0,024
7,60	38,5	0,018	8,60	12,4	0,022
7,70	36,6	0,020	8,70	10,3	0,020
7,80	34,5	0,023	8,80	8,5	0,016
7,90	32,0	0,027	8,90	7,0	0,014
8,00	29,2	0,029			

*розчин триса поглинає CO₂ із повітря

24. Буферні розчини, що містять N-2-гідроксиетилпіперазин-N'-етансульфонову кислоту (HEPES)-NaOH, pH 7,2÷8,2 (21°C)

Склад: 25 мл 0,1 М HEPES (23,83г/л) + X мл 0,1 М NaOH; розвести H₂O до 50 мл.

pH	0,1 М NaOH X,мл		pH	0,1 М NaOH X,мл	
	21°C	37°C		21°C	37°C
7,0		7,4	7,8	13,7	17,1
7,2	6,6	9,9	8,0	16,3	19,5
7,4	8,7	12,3	8,2	18,8	
7,6	11,2	14,6			

25. Буферні розчини, що містять N-2-гідроксиетилпіперазин-N'-3-пропансульфонову кислоту (EPPS)-NaOH, pH 7,5÷8,7

Склад: 25 мл 0,1 М EPPS (25,232г/л) + X мл 0,1 М NaOH; розвести H₂O до 50 мл.

pH	0,1 М NaOH X,мл		pH	0,1 М NaOH X,мл	
	23°C	37°C		23°C	37°C
7,3		5,9	8,1	11,7	14,8
7,5	5,4	7,8	8,3	14,2	17,3
7,7	7,1	10,0	8,5	16,8	19,6
7,9	9,3	12,4	8,7	19,3	

26. Буферні розчини, що містять 2-аміно-2-метилпропандіол-1,3- HCl, pH 7,8÷9,7

2-аміно-2-метилпропандіол-1,3 C₄H₁₁NO₂; M 105,14.

Склад: 25 мл 0,2 М 2-аміно-2-метилпропандіола-1,3 (21,03г/л) + X мл 0,2 М HCl; розвести H₂O до 100 мл.

pH		0,2M HCl X, мл	pH		0,2M HCl X. мл
23°C	37°C		23°C	37°C	
9,7	9,6	2,5	8,7	8,6	13,75
9,6	9,4	3,75	8,6	8,5	15,0
9,4	9,3	5,0	8,5	8,4	16,25
9,3	9,1	6,25	8,4	8,3	17,5
9,1	9,0	7,5	8,3	8,2	18,75
9,0	8,9	8,75	8,2	8,1	20,0
9,0	8,8	10,0	8,0	7,9	21,25
8,9	8,8	11,25	7,8	7,7	22,5
8,8	8,7	12,5			

27. Буферні розчини, що містять N,N-біс(2-гідроксиметил)піпін (BICINE)- NaOH, рН 7,9÷8,9 (22°C)

Склад: 25 мл 0,1М BICINE (16,317г/л) + X мл 0,1 М NaOH; розвести H₂O до 50 мл

рН	0,1М NaOH X,мл		рН	0,1М NaOH X,мл	
	22°C	37°C		22°C	37°C
7,7		6,5	8,5	12,7	17,0
7,9	5,7	8,6	8,7	15,8	19,4
8,1	7,8	11,0	8,9	18,3	
8,3	10,0	13,9			

28. Розчини за Кларком-Лабсом, рН 8,0÷10,2

Склад: 50 мл 0,1М KCl + H₃BO₃ (на 1л розчину 7,455г KCl + 6,184 г H₃BO₃) + X мл 0,1 М NaOH; розвести H₂O до 100 мл

рН (25°C)	0,1 М NaOH, X мл	Буферна ємність	рН (25°C)	0,1 М NaOH, X мл	Буферна ємність
8,00	3,9				
8,10	4,9	0,010	9,20	26,4	0,029
8,20	6,0	0,011	9,30	29,3	0,028
8,30	7,2	0,013	9,40	32,1	0,027
8,40	8,6	0,015	9,50	34,6	0,024
8,50	10,1	0,016	9,60	36,9	0,022
8,60	11,8	0,018	9,70	38,9	0,019
8,70	13,7	0,020	9,80	40,6	0,016
8,80	15,8	0,022	9,90	42,2	0,015
8,90	18,1	0,025	10,00	43,7	0,014
9,00	20,8	0,027	10,10	45,0	0,013
9,10	23,6	0,028	10,20	46,2	

29. Боратні буферні розчини, рН 8,1÷9,0 (25°C)

Склад: 50 мл 0,025М Na₂B₄O₇·10H₂O (9,525 г/л) + X мл 0,1 М HCl; розвести H₂O до 100 мл

рН (25°C)	0,1 М HCl X, мл	Буферна ємність
8,10	19,7	0,009
8,20	18,8	0,010
8,30	17,7	0,011
8,40	16,6	0,012
8,50	15,2	0,015
8,60	13,5	0,018
8,70	11,6	0,020
8,80	9,4	0,023
8,90	7,1	0,024
9,00	4,6	0,026

30. Буферні розчини, що містять гліцин-NaOH, pH 8,6÷10,6 (25°C)

Гліцин (аміноцтова кислота) $C_2H_5NO_2$; M 75,07

Склад: 25 мл 0,2M гліцина (15,01 г/л) + X мл 0,2 M NaOH; розвести H_2O до 100 мл

pH (25°C)	0,2M NaOH X, мл	pH (25°C)	0,2M NaOH X, мл
8,6	2,0	9,6	11,2
8,8	3,0	9,8	13,6
9,0	4,4	10,0	16,0
9,2	6,0	10,4	19,3
9,4	8,4	10,6	22,75

31. Буферні розчини, що містять карбонат натрію - бікарбонат натрію, pH 9,2÷10,8

$Na_2CO_3 \cdot 10H_2O$; M 286,2; 0,1M розчин містить 28,62 г/л

$NaHCO_3$; M 84,0; 0,1 M розчин містить 8,40 г/л

Склад: X мл 0,1M Na_2CO_3 + Y мл 0,1M $NaHCO_3$

pH		0,1M Na_2CO_3 X, мл	0,1M $NaHCO_3$ Y, мл
20°C	37°C		
9,2	8,8	10	90
9,4	9,1	20	80
9,5	9,4	30	70
9,8	9,5	40	60
9,9	9,7	50	50
10,1	9,9	60	40
10,3	10,1	70	30
10,5	10,3	80	20
10,8	10,6	90	10

32. Боратні буферні розчини, pH 9,3÷10,7 (25°C)

Склад: 50 мл 0,025M $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ (9,525 г/л) + X мл 0,1 M NaOH; розвести H_2O до 100 мл

pH (25°C)	0,1M NaOH X, мл	Буферна сміть
9,30	3,6	0,027
9,40	6,2	0,026
9,50	8,8	0,025
9,60	11,1	0,022
9,70	13,1	0,020
9,80	15,0	0,018
9,90	16,7	0,016
10,00	18,3	0,014
10,10	19,5	0,011

pH (25°C)	0,1M NaOH X, мл	Буферна ємність
10,20	20,5	0,009
10,30	21,3	0,008
10,40	22,1	0,007
10,50	22,7	0,006
10,60	23,3	0,005
10,70	23,8	0,004

33. Карбонатні буферні розчини, pH 9,7÷10,9 (25°C)

Склад: 50 мл 0,05M NaHCO₃(4,20 г/л) + X мл 0,1 M NaOH; розвести H₂O до 100 мл

pH (25°C)	0,1M NaOH X, мл	Буферна ємність
9,70	6,2	0,013
9,80	7,6	0,014
9,90	9,1	0,015
10,00	10,7	0,016
10,10	12,2	0,016
10,20	13,8	0,015
10,30	15,2	0,014
10,40	16,5	0,013
10,50	17,8	0,013
10,60	19,1	0,012
10,70	20,2	0,010
10,80	21,2	0,009
10,90	22,0	0,008

34. Фосфатні буферні розчини, pH 11,0÷11,9 (25°C)

Склад: 50 мл 0,05M Na₂HPO₄(7,10 г/л) + X мл 0,1 M NaOH; розвести H₂O до 100 мл

pH (25°C)	0,1M NaOH X, мл	Буферна ємність
11,0	4,1	0,009
11,10	5,1	0,011
11,20	6,3	0,012
11,30	7,6	0,014
11,40	9,1	0,017
11,50	11,1	0,022
11,60	13,5	0,026
11,70	16,2	0,030
11,80	19,4	0,034
11,90	23,0	0,037

35. Буферні розчини, що містять гідроксид натрію-хлорид калію, рН 12,0÷13,0 (25°C)

Склад: 25 мл 0,2М КСІ (14,91г/л) + X мл 0,2 М NaOH; розвести H₂O до 100 мл

рН (25°C)	0,2М NaOH X, мл	Буферна сміть
12,00	6,0	0,028
12,10	8,0	0,042
12,20	10,2	0,048
12,30	12,8	0,060
12,40	16,2	0,076
12,50	20,4	0,094
12,60	25,6	0,12
12,70	32,2	0,16
12,80	41,2	0,21
12,90	53,0	0,25
13,00	66,0	0,30

Додаток 19.

СТАНДАРТНІ ЗНАЧЕННЯ КРИТЕРІЮ СТ'ЮДЕНТА (t)

v	$\beta=0,90$	$\beta=0,95$	$\beta=0,99$	$\beta=0,999$	v	$\beta=0,90$	$\beta=0,95$	$\beta=0,99$	$\beta=0,999$
1	6,3	12,7	63,7	637,0	13	1,8	2,2	3,0	4,1
2	2,9	4,3	9,9	31,6	14-15	1,8	2,1	3,0	4,1
3	2,4	3,2	5,8	12,9	16-17	1,7	2,1	2,9	4,0
4	2,1	2,8	4,6	8,6	18-20	1,7	2,1	2,9	3,9
5	2,0	2,6	4,0	6,9	21-24	1,7	2,1	2,8	3,8
6	1,9	2,4	3,7	6,0	25-28	1,7	2,1	2,8	3,7
7	1,9	2,4	3,5	5,3	29-30	1,7	2,0	2,8	3,7
8	1,9	2,3	3,4	5,0	31-34	1,7	2,0	2,7	3,7
9	1,8	2,3	3,3	4,8	35-42	1,7	2,0	2,7	3,6
10	1,8	2,2	3,2	4,6	43-62	1,7	2,0	2,7	3,5
11	1,8	2,2	3,1	4,4	63-175	1,6	2,0	2,6	3,4
12	1,8	2,2	3,1	4,2	175-∞	1,6	2,0	2,6	3,3

СТАНДАРТНІ ЗНАЧЕННЯ КРИТЕРІЮ ФІШЕРА

ν_1/ν_2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200	500	∞	ν_1/ν_2	
1	167,5	148,5	141,1	137,1	134,6	132,9	131,8	130,6	130,0	129,5	128,9	128,3	127,7	127,1	126,5	125,9	125,6	125,3	125,0	124,7	124,4	124,1	123,8	123,5	123,5	
3	34,1	30,8	29,5	28,7	28,2	27,8	27,4	27,2	27,1	26,9	26,8	26,7	26,5	26,4	26,3	26,2	26,2	26,2	26,2	26,2	26,2	26,2	26,1	26,1	26,1	3
	10,1	9,6	9,3	9,1	9,0	8,9	8,8	8,8	8,8	8,8	8,8	8,7	8,7	8,7	8,7	8,6	8,6	8,6	8,6	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	
	74,1	61,2	56,1	53,4	51,7	50,5	49,8	49,0	48,6	48,2	47,8	47,4	47,0	46,6	46,2	45,8	45,6	45,4	45,2	45,0	44,4	44,5	44,3	44,1	4	
4	21,2	18,8	16,7	16,0	15,5	15,2	15,0	14,8	14,7	14,5	14,4	14,3	14,1	14,0	13,9	13,8	13,8	13,8	13,8	13,5	13,5	13,5	13,5	13,5	4	
	6,7	6,9	6,6	6,4	6,3	6,2	6,1	6,0	6,0	5,9	5,9	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	6	
	47,0	36,6	31,2	31,1	29,8	28,8	28,2	27,6	27,3	27,0	26,7	26,7	26,4	26,1	25,8	25,4	25,2	25,2	25,2	25,2	24,3	24,4	24,4	24,3	5	
5	16,3	13,3	12,1	11,4	11,0	10,7	10,5	10,3	10,2	10,1	10,0	9,9	9,8	9,7	9,7	9,6	9,6	9,6	9,6	9,6	9,6	9,6	9,6	9,6	9,6	5
	6,6	5,8	5,4	5,2	5,1	5,0	4,9	4,8	4,8	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	5	
6	13,4	10,9	9,8	9,2	8,8	8,5	8,3	8,1	8,0	7,9	7,8	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	7,7	6	
	6,0	5,1	4,8	4,4	4,3	4,2	4,1	4,1	4,1	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	6	
7	12,3	9,6	8,5	7,9	7,5	7,2	7,0	6,8	6,7	6,6	6,5	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4	7	
	5,6	4,7	4,4	4,1	4,0	3,9	3,8	3,7	3,7	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	7	
8	11,3	8,7	7,6	7,0	6,6	6,4	6,2	6,0	5,9	5,8	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	5,7	8	
	5,3	4,6	4,3	3,8	3,7	3,6	3,5	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4	8	
9	10,6	8,0	7,0	6,4	6,1	5,8	5,6	5,5	5,4	5,3	5,2	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	5,1	9	
	5,1	4,8	3,6	3,5	3,4	3,3	3,2	3,2	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	3,1	9	
10	10,0	7,9	6,6	6,0	5,6	5,4	5,2	5,1	5,0	4,9	4,8	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	4,7	10	
	5,0	4,1	3,7	3,5	3,3	3,2	3,1	3,1	3,0	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	2,9	10	
11	9,7	7,2	6,2	5,7	5,3	5,1	4,9	4,7	4,6	4,5	4,5	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	4,4	11	
	4,8	4,0	3,6	3,4	3,2	3,1	3,0	3,0	2,9	2,9	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	11	
12	9,3	6,9	6,0	5,4	5,1	4,8	4,7	4,5	4,4	4,3	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	4,2	12	
	4,8	3,9	3,5	3,3	3,1	3,0	2,9	2,9	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8	12	
13	9,1	6,7	5,7	5,2	4,9	4,6	4,4	4,3	4,2	4,1	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	4,0	13	
	4,7	3,8	3,4	3,2	3,0	2,9	2,8	2,7	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	13	
14	8,9	6,5	5,6	5,0	4,7	4,5	4,3	4,1	4,0	3,9	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8	14	
	4,6	3,7	3,3	3,1	3,0	2,9	2,8	2,7	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	2,6	14	
15	8,7	6,4	5,4	4,9	4,6	4,3	4,1	4,0	3,9	3,8	3,7	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	15	
	4,5	3,7	3,3	3,1	2,9	2,8	2,7	2,6	2,6	2,6	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	15	
ν_2/ν_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200	500	∞	ν_2/ν_1	

Примітка: перша цифра проти значення ν_2 відповідає вірогідності безпомилкових прогнозів (β), яка дорівнює 0,95; друга - $\beta=0,99$; третя - $\beta=0,999$.

Продовження

ν_2/ν_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200	500	∞	ν_2/ν_1
133	88	71	61	55	51	49	46	45	43	17	36	33	31	31	31	31	32	31	30	29	28	27	26	26	30
30	6	54	45	40	37	35	3	32	31	30	29	28	27	27	25	25	24	24	22	22	21	21	20	20	10
42	33	29	27	25	24	23	23	22	22	21	21	20	20	19	19	19	18	18	18	17	17	17	17	16	16
132	87	70	60	54	50	48	45	41	42	41	38	37	35	34	34	32	32	31	30	28	27	26	25	25	32
32	5	53	45	40	37	34	32	31	30	29	29	28	27	26	24	24	23	22	22	21	21	20	20	20	32
41	33	29	27	25	24	23	22	22	21	21	20	20	19	19	19	19	18	18	17	17	17	16	16	16	16
131	86	70	60	54	50	48	45	44	42	41	39	38	36	35	35	33	32	31	30	29	28	26	26	25	34
34	74	53	44	39	36	34	32	31	30	29	28	28	27	26	25	24	23	22	22	21	21	20	20	20	34
41	33	29	27	25	24	23	22	22	21	21	21	20	20	19	19	18	18	17	17	17	17	16	16	16	16
130	86	69	59	53	49	47	44	43	41	40	38	37	36	4	33	31	31	30	29	27	26	25	24	24	36
36	4	52	44	39	36	33	32	30	29	29	28	27	26	25	24	23	23	22	21	20	20	19	19	19	36
41	33	29	26	25	24	23	22	21	21	21	20	20	19	19	19	18	18	18	17	17	16	16	16	15	21
129	85	68	58	53	49	47	44	43	41	40	38	37	35	34	34	32	31	30	29	28	27	26	25	21	38
38	73	52	43	39	35	33	31	30	29	28	27	27	26	25	24	23	22	21	21	20	20	19	19	18	38
11	32	24	24	24	23	23	22	21	21	21	20	20	19	19	18	18	18	17	17	16	16	16	15	15	40
128	84	67	58	52	48	46	43	42	40	39	37	36	35	33	33	32	30	30	29	28	26	25	24	23	40
40	73	52	43	38	35	33	31	30	29	28	27	27	26	25	24	23	22	21	20	20	19	18	18	18	40
41	32	24	26	21	23	22	22	21	20	20	20	19	18	18	17	17	17	17	17	16	16	15	15	15	40
127	83	67	57	52	48	46	43	42	40	39	37	36	35	33	33	31	30	29	28	27	26	24	24	23	42
42	73	51	43	38	35	33	31	30	29	28	27	26	25	25	23	23	22	21	20	19	18	18	18	18	42
41	32	28	26	24	23	22	22	21	21	20	20	19	19	18	18	17	17	16	16	16	16	15	15	15	42
125	82	66	56	51	47	45	42	41	39	38	36	35	34	32	32	31	29	29	28	27	25	24	23	22	44
44	72	51	43	38	35	32	31	29	28	27	27	26	25	24	23	22	21	21	20	19	18	18	18	17	44
41	32	28	26	24	23	22	22	21	20	20	20	19	19	18	18	17	17	16	16	16	16	15	15	15	44
124	81	65	56	50	46	44	41	40	38	37	35	34	33	31	31	30	28	28	27	26	24	23	22	21	46
46	72	51	42	38	34	32	30	29	28	27	26	26	25	24	23	22	21	20	20	19	19	18	18	17	46
40	32	28	26	24	23	22	21	21	21	20	20	20	19	19	18	17	17	17	16	16	16	15	15	15	46
123	81	64	55	50	46	44	41	40	38	37	35	34	33	31	31	30	28	28	27	26	24	23	22	21	48
48	72	51	42	37	34	32	30	28	28	27	26	26	25	24	23	22	21	20	19	18	18	18	17	17	48
40	32	28	26	24	23	22	21	21	21	20	20	20	19	19	18	17	17	16	16	16	16	15	15	14	50
122	80	64	54	49	45	43	40	39	37	36	34	33	32	30	29	29	27	27	26	24	23	22	21	20	50
50	72	51	42	37	34	32	30	28	27	26	26	25	24	23	22	21	20	20	19	19	18	18	17	17	50
40	32	28	26	24	23	22	21	21	20	20	19	19	18	18	17	17	17	16	16	16	15	15	15	14	50
ν_2/ν_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200	500	∞	ν_2/ν_1

v_2/v_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200	500	∞	
12,1	7,9	6,3	5,4	4,9	4,5	4,3	4,0	3,9	3,7	3,6	3,4	3,3	3,2	3,0	2,9	2,7	2,7	2,6	2,5	2,3	2,2	2,1	2,0		
55	7,1	5,0	4,1	3,7	3,4	3,1	3,0	2,8	2,7	2,7	2,6	2,5	2,4	2,3	2,2	2,1	2,0	1,9	1,8	1,8	1,7	1,7	1,6	55	
	4,0	3,2	2,8	2,5	2,4	2,3	2,2	2,1	2,0	2,0	1,9	1,9	1,8	1,8	1,7	1,7	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,4	1,4		
	12,0	7,8	6,2	5,3	4,8	4,4	4,2	3,9	3,8	3,6	3,5	3,3	3,2	3,1	2,9	2,8	2,6	2,6	2,5	2,4	2,2	2,1	2,0	1,9	
60	7,1	5,0	4,1	3,6	3,3	3,1	2,9	2,8	2,7	2,6	2,6	2,5	2,4	2,3	2,2	2,1	2,0	1,9	1,8	1,7	1,7	1,6	1,6	60	
	4,0	3,1	2,8	2,5	2,4	2,2	2,2	2,1	2,0	2,0	1,9	1,9	1,8	1,7	1,7	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,5	1,4	1,4	
	11,9	7,7	6,1	5,2	4,7	4,3	4,1	3,8	3,7	3,5	3,4	3,2	3,1	3,0	2,8	2,7	2,5	2,5	2,4	2,3	2,1	2,0	1,9	1,8	
65	7,0	5,0	4,1	3,6	3,3	3,1	2,9	2,8	2,7	2,6	2,5	2,5	2,4	2,3	2,2	2,1	2,0	1,9	1,8	1,8	1,7	1,6	1,6	65	
	4,0	3,1	2,7	2,5	2,4	2,2	2,1	2,1	2,0	2,0	1,9	1,9	1,8	1,8	1,7	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,4	1,4	1,4		
	11,6	7,6	6,0	5,2	4,7	4,3	4,1	3,8	3,7	3,5	3,4	3,2	3,1	3,0	2,8	2,7	2,5	2,4	2,3	2,2	2,1	2,0	1,8	1,7	
70	7,0	4,9	4,1	3,6	3,3	3,1	2,9	2,8	2,7	2,6	2,5	2,4	2,3	2,3	2,1	2,1	2,0	1,9	1,8	1,7	1,7	1,6	1,6	70	
	4,0	3,1	2,7	2,5	2,3	2,2	2,1	2,1	2,0	2,0	1,9	1,9	1,8	1,8	1,7	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,4	1,4	1,4		
	11,6	7,5	6,0	5,1	4,6	4,2	4,0	3,7	3,6	3,4	3,3	3,1	3,0	2,9	2,7	2,6	2,4	2,4	2,3	2,2	2,0	1,9	1,8	1,7	
80	7,0	4,9	4,0	3,6	3,2	3,0	2,9	2,7	2,6	2,5	2,5	2,4	2,3	2,2	2,1	2,0	1,9	1,8	1,8	1,7	1,6	1,6	1,5	1,5	80
	4,0	3,1	2,7	2,5	2,3	2,2	2,1	2,0	2,0	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8	1,7	1,6	1,6	1,5	1,5	1,5	1,4	1,4	1,3	1,3	
115,5	7,4	5,9	5,0	4,5	4,1	3,9	3,7	3,6	3,4	3,3	3,1	3,0	2,8	2,7	2,5	2,4	2,3	2,2	2,1	2,1	1,9	1,8	1,7	1,6	
100	6,9	4,8	4,0	3,5	3,2	3,0	2,8	2,7	2,6	2,5	2,4	2,3	2,2	2,1	2,0	1,9	1,8	1,7	1,6	1,6	1,5	1,5	1,4	1,4	
	3,9	3,1	2,7	2,5	2,3	2,2	2,1	2,0	2,0	1,9	1,9	1,8	1,8	1,7	1,7	1,6	1,6	1,5	1,5	1,4	1,4	1,3	1,3	1,3	
	11,4	7,4	5,8	5,0	4,5	4,1	3,9	3,6	3,5	3,3	3,2	3,0	2,9	2,8	2,6	2,5	2,4	2,3	2,3	2,1	2,0	1,9	1,8	1,6	1,5
125	6,8	4,8	3,9	3,5	3,2	2,9	2,8	2,6	2,6	2,5	2,4	2,3	2,2	2,1	2,0	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5	1,5	1,4	1,4	1,25	
	3,9	3,1	2,7	2,4	2,3	2,2	2,1	2,0	1,9	1,9	1,9	1,8	1,8	1,7	1,6	1,6	1,5	1,5	1,4	1,4	1,3	1,3	1,2		
	11,3	7,3	5,7	4,9	4,4	4,0	3,8	3,5	3,4	3,2	3,1	2,9	2,8	2,7	2,5	2,4	2,2	2,2	2,0	1,9	1,8	1,7	1,5	1,4	
150	6,8	4,7	3,9	3,4	3,1	2,9	2,8	2,6	2,5	2,4	2,3	2,2	2,1	2,0	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5	1,5	1,4	1,4	1,3	1,3	
	3,9	3,1	2,7	2,4	2,3	2,2	2,1	2,0	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8	1,7	1,6	1,6	1,5	1,5	1,4	1,4	1,3	1,3	1,2	1,2	
	11,2	7,2	5,6	4,8	4,3	3,9	3,7	3,5	3,4	3,2	3,1	2,9	2,8	2,7	2,5	2,4	2,2	2,1	1,9	1,8	1,7	1,6	1,4	1,3	
200	6,8	4,7	3,9	3,4	3,2	2,9	2,7	2,6	2,5	2,4	2,3	2,2	2,1	2,0	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5	1,4	1,3	1,3	1,2	1,2	
	3,9	3,0	2,6	2,4	2,3	2,1	2,0	2,0	1,9	1,9	1,8	1,8	1,7	1,7	1,6	1,6	1,5	1,4	1,4	1,3	1,3	1,2	1,2	1,2	
400	11,0	7,1	5,6	4,7	4,2	3,8	3,6	3,4	3,3	3,1	3,0	2,8	2,7	2,5	2,4	2,2	2,1	2,0	1,9	1,8	1,6	1,5	1,1	1,3	
	6,7	4,7	3,8	3,4	3,1	2,8	2,7	2,5	2,5	2,4	2,3	2,2	2,1	2,0	1,9	1,8	1,7	1,6	1,6	1,5	1,4	1,3	1,2	1,2	
	3,9	3,0	2,6	2,4	2,2	2,1	2,0	1,9	1,8	1,8	1,8	1,7	1,7	1,6	1,6	1,5	1,4	1,4	1,3	1,3	1,2	1,2	1,2	1,2	
1000	10,9	7,0	5,5	4,7	4,2	3,8	3,6	3,4	3,3	3,1	3,0	2,8	2,7	2,5	2,4	2,2	2,1	2,0	1,8	1,7	1,6	1,5	1,3	1,2	
	6,7	4,6	3,8	3,4	3,1	2,8	2,7	2,5	2,4	2,3	2,2	2,1	2,0	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5	1,4	1,3	1,2	1,1	1,1	1,1	
	3,8	3,0	2,6	2,4	2,2	2,1	2,0	1,9	1,8	1,8	1,8	1,7	1,6	1,6	1,5	1,4	1,4	1,3	1,3	1,2	1,1	1,1	1,1	1,1	
1000	10,8	6,9	5,4	4,6	4,1	3,7	3,5	3,3	3,2	3,0	2,9	2,7	2,6	2,4	2,3	2,1	2,0	1,9	1,7	1,6	1,5	1,4	1,2	1,1	
	6,6	4,6	3,8	3,3	3,0	2,8	2,6	2,5	2,4	2,3	2,2	2,2	2,1	2,0	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5	1,4	1,4	1,2	1,1	1,0	
	3,8	3,0	2,6	2,4	2,2	2,1	2,0	1,9	1,8	1,8	1,8	1,7	1,7	1,6	1,6	1,5	1,5	1,4	1,3	1,3	1,2	1,1	1,1	1,0	
∞	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	16	20	24	30	40	50	75	100	200	500	∞	

СОРБЕНТИ ДЛЯ АФІННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Носії	Структура	Активна група ліганда	Спосіб приєднання ліганда до матриці
A. Активовані агарози			
1 За допомогою карбонілдимідою юду		R - NH ₂	
2 За допомогою бромціану CNBr		R - NH ₂	
3 За допомогою гідроксиуксниміду		R - NH ₂ (R-SH)	
4 За допомогою п-нітрофенілу		R - NH ₂	
5 За допомогою трезилу		R - NH ₂ R - SH	
Б. Агарози з приєднаними спейсерами:			
1 Спейсер, що містить на кінці аміногрупу - NH ₂		R - COOH R - COOH R - COOH R - COOH	- NH - CO - R - NH - CO - R - NH - CO - R - NH - CO - R
2 Спейсер, що містить на кінці карбоксильну групу -COOH		R - NH ₂ R - NH ₂	

<p>3 Спейсер що містить на кінці епоксигрупу</p> ---CH---CF_2 <p>(епоксиактивована агароза)</p>	---CH---CH_2 <p>R - NH₂ R - OH R - SH</p>	$\text{---CH---CH}_2\text{---NH---R}$ <p>-CHOH-CH₂-NH-R -CHOH-CH₂-O-R -CHOH-CH₂-S-R</p>
<p>4 Спейсер що містить на кінці гідрозидну групу -NHNH₂</p> <p>5 Спейсер що містить на кінці N-гідроксисукцинімідферну групу (N-гідроксисукцинімід-активовану агарозу)</p>	$\text{---NHNHCO(CH}_2)_4\text{CONHNH}_2$ <p>R ClHO</p> $\text{---NH(CH}_2)_x\text{COO}$ <p>R - NH₂</p> $\text{---OCH}_2\text{CO NH(CH}_2)_3\text{NH}$ <p>R - NH₂</p> $\text{---OCH}_2\text{CO NH(CH}_2)_3\text{NH(CH}_2)_3$ <p>R - NH₂</p>	---NH---N=CH---R <p>↓ NaBH₄ -NH---NH---CH₂---R</p> <p>-CO - NH - R -CO - NH - R -CO - NH - R</p>
<p>6 Спейсер, що містить на кінці тільну групу -SH</p>	$\text{---NHCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ <p>R SH</p> $\text{---NH(CH}_2)_2\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2\text{SH}$ <p>R SH</p> $\text{---OCH}_2\text{CO NH(CH}_2)_2\text{NHHS(CH}_2)_2\text{CHCOCH}_3\text{CO NH}$ <p>R - SH</p>	<p>-S - S - R -S - S - R -S - S - R</p>
<p>7 Спейсер, що містить на кінці групи які реагують з тільними групами</p>	$\text{---OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{SS---}$ <p>R - SH</p> $\text{---NHCH(CH}_2)_2\text{CONHCHCOOH}$ <p>R - SH</p>	<p>-S - S - R -S - S - R</p>

8 Багатозарядні спейсери полі-L-лізину	$\left\{ \begin{array}{c} \text{NH-Lys} \\ \\ (\text{Lys})_n\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH-Lys} \end{array} \right.$	R-COOH	$-\text{NH-CO-R}$
9 Поліакрилідразид агароза	$\left\{ \begin{array}{c} -\text{NH-NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CH} \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{NH} \\ \text{NH}_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CH} \\ \\ \text{CO} \\ \\ \text{NH} \\ -\text{NH-NHCO}(\text{CH}_2)_2\text{CH} \\ \\ \text{CO} \end{array} \right.$		

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Антитела. Методы. Кн.2 // Под ред. Д.Кэтти – М.: Мир, 1991. – 384 с.
2. Бабков А.В., Горшкова Г.Н., Кононов А.М. **Практикум по общей химии с элементами количественного анализа.** – М.: Высшая школа, 1978. – 168 с.
3. Барковский В.Ф., Горелик С.М., Городенцева Т.Б. **Физико-химические методы анализа.** – М.: Высшая школа, 1972. – 344 с.
4. Барковский В.Ф., Городенцева Т.Б., Топорова Н.Б. **Основы физико-химических методов анализа.** – М.: Высшая школа, 1983. – 247 с.
5. Биология развития млекопитающих. Методы // Под ред. М. Манк. – М.: Мир, 1990. – 406 с.
6. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика: Практический курс. – М.: ФАИР-ПРЕСС, 1999. – 720 с.
7. Васильев А.Н. Теоретические основы хроматографических методов в биохимическом анализе. – К.: Вища школа, 1979. – 44 с.
8. Виноградова Р.П., Кучеренко М.Е., Литвиненко А.Р. та ін. **Біологічна хімія. Практикум.** – К.: Вища школа, 1977. – 384 с.
9. Виноградова Р.П., Цудзевич Б.А., Храпунов С.Н. **Физико-химические методы в биохимии.** – К.: Вища школа, 1983. – 287 с.
10. Войцицкий В.М., Бабенюк Ю.Д., Рудич В.В., Марченков Ф.С. Общие принципы организации биохимических исследований. – К.: УМК ВО, 1989. – 39 с.
11. Гааль Э., Медьеша Г., Верецкен Л. Электрофорез в разделении биохимических макромолекул. – М.: Мир, 1982. – 448 с.
12. Гитис С.С., Глаз А.И., Иванов А.В. **Практикум по органической химии. Учебное пособие для нехимических специальных вузов.** – М.: Высшая школа, 1991. – 303 с.
13. Глинка Н.Л. **Задачи и упражнения по общей химии. Учебное пособие для вузов.** – Л.: Химия, 1982. – 272 с.
14. Горячковский А.М. Клиническая биохимия. **Справочное пособие.** – Одесса: Астропринт, 1998. – 608 с.
15. Грин Н., Стаут У., Тейлор Д. Биология. Кн.1 – М.: Мир, 1990. – 368 с.
16. Демченко А.П. Люминесценция и динамика структуры белков. – К.: Наукова думка, 1989. – 280 с.
17. Дин П., Джонсон У., Милд Ф. Афинная хроматография. Методы. – М.: Мир, 1988. – 278 с.
18. Довідник здобувача наукових ступенів // За ред. Р.В.Бойка. – К., 1999. – 64 с.
19. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. **Справочник биохимика.** – М.: Мир, 1991. – 544 с.
20. Душкин В.А. Лабораторное животноводство. – М.: Россельхозиздат, 1980. – 48 с.
21. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. **Лабораторные животные, разведение, содержание, использовани в эксперименте.** К.: Вища школа, 1983. – 383 с.
22. Иваненко Е.Ф., Пандакова В.Н. **Важнейшие аспекты изучения метаболизма в живом организме. Учебное пособие.** – Донецк, 1983. – 110 с.
23. Иммунологические методы // Под ред. Х.Фримеля. – М.: Мир, 1979. – 518 с.
24. Кирхнер Ю. Тонкослойная хроматография. В 2-х т. – М.: Мир, 1981. – 1143 с.
25. Коллинз У.П. Новые методы иммуноанализа. – М.: Мир, 1991. – 280 с.
26. Коростелев П.П. Приготовление растворов для химико-аналитических работ. – М.: Химия, 1964. – 399 с.

27. Коростелев П.П. **Лабораторная техника химического анализа**. М: Химия, 1981. – 311 с.
28. Кочетов Г.А. **Практическое руководство по энзимологии. Учебное пособие для студентов биологических специальностей университетов**. – М.: Высшая школа, 1980. – 272 с.
29. Крешков А.П., Ярошлицев А.А. **Курс аналитической химии. Количественный анализ**. – М.: Химия, 1982 – 312 с.
30. Кучеренко М.С., Бабенюк Ю.Д., Войццкий В.М. **Біохімія. Практикум** = К: Либідь, 1995 – 152 с.
31. **Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам** // Под ред. О.Михоши М: Мир, 1982 – 784 с.
32. Лакшминараянаiah П. **Мембранные электроды**. – Л.: Химия, 1979. – 300 в.
33. Малахов А.Г., Ометова И.Ф. и др. **Биохимическая химия с основами физической и коллоидной химии. Методические указания и контрольные задания** = М: МВА, 1987. – 34 с.
34. Мельничук Д.О., Устатюк П.В., Цыпльовський М.І. та ін. **Біологічна хімія з основами фізичної та колоїдної хімії. Лабораторно-практичні заняття**. – К.: Вид-во УААН, 1998. – 147 с.
35. **Методы биохимических исследований** // Под ред. М.М.Прохоровой - Л: ЛГУ, 1982. – 272 с.
36. **Методы практической биохимии** // Под ред. Б.Уильямса, К.Уилсона М: Мир, 1978. – 268 с.
37. Мусил ЯІ., Новакова О., Кунц К. **Современная биохимия в схемах**. – М: Мир, 1984. – 216 с.
38. **Норми радіаційної безпеки України (НРБУ-97). Державні гігієнічні нормативи** – К.: Укр.центр держсанепідагляду МОЗ України, 1997. – 121 с.
39. Остерман Л.А. **Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование**. – М.: Наука, 1981. – 288 с.
40. Остерман Л.А. **Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами**. – М.: Наука, 1983. – 304 с.
41. Остерман Л.А. **Хроматография белков и нуклеиновых кислот**. – М.: Наука, 1985 – 536 с.
42. Плохинский Н.А. **Математические методы в биологии**. – М.: МГУ, 1978. – 265 с.
43. Позур В.К. **Имуногенетика. Практикум**. – К.: Вид-во Ін-ту математики НАНУ, 2000. – 265 с.
44. Ремизов А.Н. **Медицинская и биологическая физика**. – М.: Высшая школа, 1987. – 638 с.
45. **Руководство к лабораторным занятиям по биоорганической химии** // Под ред. М.А.Тюкавкиной – М.: Медицина, 1985. – 256 с.
46. Сидякин В.Г., Сотников Д.И., Сташков А.М. **Основы научных исследований. Биология**. – К.: Вища школа, 1987. – 197 с.
47. Скоупс Р. **Методы очистки белков**. – М.: Мир, 1985. – 385 с.
48. Фрайфелдер Д. **Физическая биохимия**. – М.: Мир, 1980. – 584 с.
49. Фритц Дж., Гьерде Д., Поланд К. **Ионная хроматография**. – М.: Мир, 1984. – 221 с.
50. Хауссер К.Х., Кальбитцер Х.Р. **ЯМР в медицине и биологии: структура молекул, топография, спектроскопия in vivo**. – К.: Наукова думка, 1993. – 259 с.
51. Хефтман Э., Кастер Т., Нидервизер А. и др. **Хроматография: практическое приложение метода. В 2-х ч.** – М.: Мир, 1986. – 335 с.

**КУЧЕРЕНКО Микола Євдокимович,
БАБЕНЮК Юрій Дем'янович,
ВОЙЦЬКИЙ Володимир Михайлович**

СУЧАСНІ МЕТОДИ БІОХІМІЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Учбовий посібник

Літредактор — О.О. Поляченко
Технічний редактор — І.В. Соломаха
Коректор — Н.С. Веремко

Видавництво Українського фітосоціологічного центру
Київ-28, а.с. 2, тел/факс (044) 264-11-61

Підписано до друку 18.02.2001 р. Формат 60x84 1/16.
Друк офсетний. Папір офсетний. Гарнітура Arial. Наклад 1000 прим.
Умовн. друк. арк. 23,3. Умовн. вид. арк. 25,1. Зам. №130

Надруковано в друкарні
Українського фітосоціологічного центру
Київ-22, просп. акад. Глушкова 2/12

The background of the cover features a blue gradient with several 3D molecular models. On the left, there is a brown ball-and-stick model of a complex organic molecule. On the right, there is a grey ribbon model of a protein structure. In the lower right, there is a yellow ball-and-stick model of a smaller molecule. The overall theme is molecular biology and biochemistry.

М.Є. КУЧЕРЕНКО, Ю.Д. БАБЕНЮК,
В.М. ВОЙЦЬКИЙ

СУЧАСНІ
МЕТОДИ БІОХІМІЧНИХ
ДОСЛІДЖЕНЬ