**Методические рекомендации для студентов**

**Тема занятия: Электрометрические методы исследования**

**Значение темы**:

Лаборатория любого профиля используют физико-химические методы анализа различных объектов, где устанавливается количественный состав исследуемых биологических соединений. Контроль качества лабораторных исследований необходим, он направлен на оценку того, достаточна ли надежность получаемых результатов для выдачи их лабораторией, так и на устранение причин неудовлетворительных характеристик этих результатов.

Методы клинической аналитики, широко используются современными лабораториями. Наиболее часто в лабораторной практике используются методы, основанные на физико-химических принципах (электромагнитное излучение, распространение и генерация его, поглощение и рассеивание света и др.) – так называемые оптические методы.

На основе теоретических знаний и практических умений обучающийся должен

**знать**:

* сущность и классификацию электрометрических методов анализа;
* оборудование для электрометрического анализа;
* методы определения веществ;

**уметь:**

* применять разделительные методы, используемые в лабораторной диагностике.

**овладеть ОК и ПК**

Студент должен овладеть **общими компетенциями**:

ОК-1. Выбирать способы решения задач профессиональной деятельности применительно к различным контекстам;

ОК-2. Использовать современные средства поиска, анализа и интерпретации информации, и информационные технологии для выполнения задач профессиональной деятельности;

ОК-4. Эффективно взаимодействовать и работать в коллективе и команде;

ОК-5. Осуществлять устную и письменную коммуникацию на государственном языке Российской Федерации с учетом особенностей социального и культурного контекста;

ОК-9. Пользоваться профессиональной документацией на государственном и иностранном языках.

ПК-1.1 Проводить физико-химические исследования и владеть техникой лабораторных работ;

ПК-1.2 Обеспечивать требования охраны труда, правил техники безопасности, санитарно-эпидемиологического и гигиенического режимов при выполнении;

#  Контроль исходного уровня знаний.

Ответьте на вопросы:

* 1. Оптические методы определения веществ.
	2. Классификация оптических измерительных приборов.
	3. Определение рефракции.
	4. Фотометрия.
	5. Перечислите физико-химические методы исследования.
	6. Понятие о разделительных методах.
	7. Понятие о хроматографическом анализе.
	8. Характеристика основных видов хроматографического анализа.

**2. Содержание темы.**

**Учебный текстОбщая характеристика физико-химических методов анализа**

Оптические методы основываются на регистрации изменений, происходящих с лучом света при прохождении его через среды, а именно:

- интенсивности поглощения света (*абсорбционная фотометрия*);

- свечение молекул и атомов вещества (*флюориметрия, пламенная фотометрия*);

- изменений угла вращения плоскополяризованного луча света (*поляриметрия)*;

- величины отклонения монохроматического светового потока от первоначального направления распространения (*рефрактометрия*).

На основании этого методы определения веществ делятся на:

**А) Объёмный анализ (титриметрические методы):**

-кислотно-основное титрование

-окислительно-восстановительное титрование

-комплексонометрия

**Б) Оптические (спектральные) методы анализа:**

-флуориметрию

- фотометрию (фотоколориметрию и спектофотометрию)

-спектрометрия

- нефелометрия

- поляриметрия

-люминисценция

- рефрактометрия

**В) Электрометрические методы:**

- потенциометрия

-кондуктометрия

- кулонометрия

- электролиз

**Г) Хроматографические методы:**

- хроматография

- экстракция

В соответствии с этой классификацией оптические измерительные приборы, используемые в клинической лабораторной диагностике, подразделяются на: Фотометры и спектрофотометры

Нефелометры и турбидиметры

Денситометры

Атомные абсорбциометры Флюориметры

Поляризационные флюориметры

Пламенные фотометры

Люминометры

Атомно-эмиссионные спектрофотометры

**Рефрактометрия**- метод, основанный на измерении показателя преломления света при прохождении его через оптически неоднородные среды.

 **Показатель преломления (n) –** Отношение скорости света в вакууме к скорости света в среде, из которой свет падает на границу раздела сред.

**Рефракция**- функция показателя преломления.

В основе поляриметрии лежит свойство прозрачных веществ вращать плоскость поляризованного луча света. Оптическая активность твердых веществ (кварц, исландский шпат) обусловлена особенностями строения пространственной кристаллической решетки, а жидких веществ и растворов – наличием асимметричного атома углерода в молекулах.

**Абсорбционный анализ** основан на взаимодействии света с веществом, на физическом свойстве вещества избирательно поглощать монохроматический поток световой энергии. Свет способен поглощаться при прохождении через слой вещества, образуя **спектр поглощения.** Если вещество прозрачно, то поглощение очень мало. В окрашенных или мутных растворах часть света поглощается, а оставшиеся кванты света вызывают фотохимические изменения, испускаются электромагнитные волны разной длины, образующие **спектр испускания.**

# Таблица подбора светофильтров

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Окраска исследуемого****раствора** | **Приблизительная область длин волн, нм** | **Окраска подходящего светофильтра** | **Приблизительная область длин волн, нм** |
| Фиолетовая | 400-450 | Желто-зеленая | 560-575 |
| Синяя | 450-480 | Желтая | 575-590 |
| Зелено-синяя | 480-490 | Оранжевая | 590-625 |
| Сине-зеленая | 490-500 | Красная | 625-750 |
| Зеленая | 500-560 | Пурпурная | − |
| Желто-зеленая | 560-575 | Фиолетовая | 400-450 |
| Желтая | 575-590 | Синяя | 450-480 |
| Оранжевая | 590-625 | Желто-зеленая | 480-490 |
| Красная | 625-750 | Сине-зеленая | 490-500 |

**Нефелометрия-** вид оптического анализа, в основе которого лежит измерение светового потока, рассеиваемого в направлении, почти перпендикулярном направлению его падающего пучка.

**Атомная абсорбционная спектроскопия** – это вид оптического анализа, основанный на измерении поглощения света, сопровождающего переход электронов с более низкого энергетического уровня на более высокий.

Эмиссионный анализ- основан на испускании анализируемым веществом световой энергии, электромагнитного излучения под воздействием:

Высокой температуры (пламенная фотометрия, атомно-эмиссионный спектральный анализ)

Возбуждающего света (флюориметрия, люминометрия и др.) Теплоты или химической реакции (лазерная спектроскопия) Рентгеновских лучей (рентгеновская флюорметрия).

**Пламенная фотометрия**- метод, основанный на изучении окраски пламени, возникающей при переходе электронов анализируемого вещества с энергетически высокого уровня на более низкий уровень, попадая в пламя, окрашивают его.

**Хроматография-** основывается на различном распределении составных частей анализируемой смеси между двумя фазами: подвижной и неподвижной.Компоненты разделяемой смеси перемещаются через пористую стационарную фазу под влиянием движущейся жидкости или газа -подвижной фазы. Стационарной фазой могут служить твердое вещество, специальная хроматографическая бумага, пленки из пористых материалов, а также неподвижные жидкости, не смешивающиеся с подвижной фазой.

Переход молекул из подвижной фазы в неподвижную называется **адсорбцией.**

Сущность хроматографии наиболее полно отражают:

* Агрегатное состояние разделяемых веществ;
* Природа сорбента;
* Характер взаимодействия между сорбентом и разделяемыми веществами: распределение молекул между фазами, образование координационных соединений в фазе или на поверхности сорбента, протекание окислительно – восстановительных реакций и др.;
* Техника выполнения анализа.

**Классификация хроматографических методов** проводится по:

* Технике выполнения хроматографического анализа;
* Направлению движения растворителя;
* Агрегатному состоянию среды разделяемой смеси компонентов;
* Способу обнаружения разделяемых веществ;
* Механизму(или химизму) процесса разделения.

**По технике выполнения анализа и форме слоя сорбента** различается хроматография:

* Планарная (плоскостная) –бумажная,тонкослойная, мембранная, высокоэффективная тонкослойная хроматография и др.;
* Колоночная (в специальных колонках)
* Капиллярная.

**По механизму разделения веществ** выделяют хроматографию:

* Ионообменную
* Распределительную
* Адсорбционную
* Осадочную
* Хемоабсорбционную
* Аффинную
* Диффузионную
* Молекулярно-ситовую (гель-хроматографию) и т.д

**Электрофорез**-направленное перемещение электрически заряженных частиц в дисперсной фазе (или ионов в электропроводном растворе) под действием

внешнего электрического поля. Иначе говоря, электрофорез – это процесс движения частиц в электрическом поле.

В зависимости от среды-носителя различают электрофорез:

* На хроматографической бумаге
* На ацетатцеллюлозной пленке
* В агаровом геле
* В полиакриламидном геле и др.

**Люминесценция** – вид свечения, в котором испускание света обусловлено иными процессами, чем при тепловом (температурном) излучении.

Люминесцентный метод анализа основан на измерении компонентов биологических жидкостей и структур по интенсивности люминесценции (флюоресценции), то есть излучения, возникающего в ответ на облучение анализируемого объекта светом с более короткой длиной волны электромагнитного излучения, которое монохроматизируется с помощью интерференционных светофильтров и монохроматоров.

# ОСНОВНЫЕ ВИДЫ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА

В зависимости от фактора, вызывающего свечение, различают следующие виды люминесценции:

* + фотолюминесценция
	+ пьезолюминесценция
	+ электролюминесценция
	+ биохемилюминесценция
	+ биолюминесценция
	+ хемилюминесценция
	+ усиленная люминесценция и др.

**Фотолюминесценция –** процесс свечения, вызванный облучением объекта короткими лучами (фиолетовые, сине-фиолетовые).

**Пьезолюминесценция** – люминесценция, связанная с неоднородными электрическими и иными свойствами некоторых диэлектриков, которые при механическом воздействии в определенном направлении начинают излучать световые волны.

**Элетролюминесценция**– излучение, вызываемое облучением объекта электрическим током, то есть потоком элетронов, а не особенно электромагнитным излучением.

**Биохемилюминесценция**–свечение живых организмов, отдельных органов и тканей, возникающее за счет энергии протекающих в них экзотермических химических реакций. В свою очередь, она делится на биолюминесцецию сверхслабое свечение(хемилюминесценцию)

**Биолюминесценция** – видимое глазом свечение, свойственное некоторым живым организмом (свечение светлячков, гнилушек, моря и др.), испускаемое специализированными системами и характеризующееся высокой эффективностью превращения химической энергии в свет и высоким уровнем интенсивности (0,02 свечей у светлячков)

**Хемилюминесценция (сверх слабое)** – свечение, свойственное всем живым организмам. Оно связано с протекающими в них окислительно- восстановительными реакциями.

**Флюорохромы** – органические вещества, способные флюоресцировать при освещении синими, фиолетовыми и УФ-лучами. Поглощая часть падающего на них возбуждающего света, они излучают часть энергии в форме видимого света с длиной волны большей, чем длина волны возбуждающего света.

Флюорохромы широко применяются в клинической лабораторной диагностике:

* + при проведении иммунофлюоресцентного анализа;
	+ при люминесцентной микроскопии;
	+ в иммунофлюоресцентнойцитометрии и проточной цитометрии;
	+ в качестве лигандов при сатурационном анализе;
	+ в качестве лигандов при аффинной хроматографии;
	+ в качестве флюоресцентных зондов;
	+ как метки, вводимые в растительные и иные живые клетки, исследуемые суправитально.

В качестве флюорохромов используются различные органические вещества, чаще всего – флюоресцирующие красители.

**Флюориметры**– приборы, использующиеся для измерения концентрации вещества по интенсивности его флюоресценции.

Наиболее активно современные высокие технологии используются в исследовании биологически активных веществ: специфических белков, ферментов и изоферментов, гормонов, рецепторов гормонов, тканевых гормонов, медиаторов, опухолевых маркеров, цитокинов, лекарственных и токсических веществ.

В лабораторной аналитике наиболее широко применяются **методы оптического анализа**, главным образом **фотометрия и спектрофотометрия.**

Разработаны фотометрические и спектрофотометрические методы определения более 250 веществ, находящихся в плазме крови и в других биологических жидкостях.

**Турбидиметрический и нефелометрический** методы реализуются в определении содержания различных белков в крови и других биологических жидкостях. Они лежат в основе определения индивидуальных белков крови, других биологических жидкостях, а также оценки показателей коагулограммы с использованием коагулометров некоторых видов.

Широкое распространение получили также **методы эмиссионного анализа.**

Метод **пламенной фотометрии** используется для определения электролитов и некоторых других элементов, атомы которых способны возбуждаться и испускать свечение в высокотемпературном пламени газовой горелки.

В **атомно-эмиссионном спектральном анализе** можно определять около 50 химических элементов не только в биологических жидкостях, но и в объектах внешней среды.

В последнее время все больше лабораторий используют **полярографию.** Этот метод применяется при определении концентрации тяжелых металлов, токсикантов внешней среды, лекарственных препаратов и т.д.

Все более широкое распространение находят **радиометрические методы исследований.** Так, изучение спектра **ЯМР** и **ЭПР** позволяет сделать выводы о химической и пространственной структуре различных веществ без проведения химического анализа.

Масс- спектрометрия используется для анализа изотопного состава вещества, исследования газообмена, изучения молекулярной структуры вещества, а также для определения некоторых важнейших биомолекул, главным образом белков. В гигиенической практике они широко применяются при контроле за загрязнением окружающей среды.

Широкое распространение получила **отражательная фотометрия,**

лежащая в основе так называемой **«сухой химии».**

Индикаторные тест- полоски, принципы устройства которых уже были изложены, применяются для полуколичественного и количественного определения диагностически значимых компонентов мочи, крови и других биологических жидкостей.

Достоинствами технологий «сухой химии» являются простота, малая трудоёмкость, доступность, большая производительность, отсутствие загрязнения окружающей среды жидкими реактивами, использование микроколичеств биологических жидкостей, меньшая травматичность, безопасность, быстрое получение результата, что немаловажно в случаях использования их в целях экстренной диагностики.

# 3. Самостоятельная работа.

1. Изучите теоретический материал, и анализируя прочитанное выполните предложенные задания.
2. Заполните таблицу:

Таблица – 1 **Характеристика физико-химических методов анализа**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Методы** |  | **Используемый****прибор** | **Характеристика метода** | **Применение метода** |
| **Оптические** | -флуориметрия- фотометрия -спектрометрия- нефелометрия- поляриметрия-люминисценция- рефрактометрия |  |  |  |
| **Электрометрические** | - потенциометрия-кондуктометрия- кулонометрия- электролиз |  |  |  |
| **Хроматографические** | - хроматография- экстракция |  |  |  |

**4. Подведение итогов.**

**5. Домашнее задание**

с. 219-241

**Литература**:

1. Пустовалова, Л. М. [Физико-химические методы исследования и техника лабораторных работ](https://krasgmu.ru/index.php?page%5bcommon%5d=elib&cat=catalog&res_id=109752) : учебное пособие / Л. М. Пустовалова, И. Е. Никанорова. - Ростов-на-Дону : Феникс, 2020. - 300 с. : ил. - (Среднее медицинское образование). -

2. Руанет, В. В. [Физико-химические методы исследования и техника лабораторных работ](https://krasgmu.ru/index.php?page%5bcommon%5d=elib&cat=catalog&res_id=109753) : учебник / В. В. Руанет. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2019. - 496 с. - Текст : электронный. - URL: http://www.medcollegelib.ru/book/ISBN9785970449196.h