

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кафедра клінічної лабораторної діагностики

ОСНОВИ ТЕХНІКИ ЛАБОРАТОРНИХ РОБІТ

ПРАКТИКУМ

*для самостійної аудиторної та позааудиторної підготовки
до практичних занять*

студента

групи I курсу II медичного
факультету зі спеціальності:
224 «Технології медичної
діагностики та лікування»

Запоріжжя

2021

УДК 616-07(075.8)

О-75

*Затверджено на засіданні Центральної методичної Ради ЗДМУ
(протокол № від 20 р.)
та рекомендовано для використання в освітньому процесі*

Колектив авторів:

*С. В. Павлов - д-р біол. наук, доцент;
С. В. Горбачова – д-р біол. наук, доцент;
С. А. Біленький - канд. мед. наук, доцент;
Н. В. Бухтіярова - канд. мед. наук, доцент;
Л. В. Баранова - канд. фарм. наук, ст. викладач;
К. В. Левченко – канд. мед. наук, асистент;
Ю. В. Никітченко – асистент;
К. А. Бурлака – асистент;
Д. В. Робота – асистент;
О. О. Марічева – асистент.*

Рецензенти:

О. В. Возний – д-р мед. наук, завідувач кафедри терапевтичної, ортопедичної та дитячої стоматології.

І. С. Качан - канд. мед. наук, доцент кафедри сімейної медицини, терапії, кардіології та неврології ФПО.

*За загальною редакцією зав. кафедрою клінічної лабораторної діагностики
доцента, д-ра біол. наук Павлова С.В.*

Основи техніки лабораторних робіт : практикум для
О-75 самостійної аудиторної та позааудиторної підготовки до практичних
занять студентів I курсу II медичного факультету спеціальності: 224
«Технології медичної діагностики та лікування» / С.В. Павлов [та ін.] ;
за заг. ред. С. В. Павлова. – Запоріжжя : ЗДМУ, 2021. – 122 с.

Практикум складено відповідно до навчального плану Міністерства охорони здоров'я України для студентів медичних факультетів закладів вищої освіти спеціальності «Технології медичної діагностики та лікування».

У практикумі представлений матеріал у відповідність з сучасним уявленням про лабораторну службу. Організація роботи лабораторії базується на суворих наукових принципах. Точне проведення будь-якої операції або прийому в лабораторній роботі неможливе, якщо виконавець не розуміє їх сенсу і тих теоретичних передумов, які лежать в їх основі. До кожного заняття дано питання для підготовки, а також завдання для самостійної аудиторної роботи.

Практикум призначена для студентів медичного факультету, спеціальності «Технології медичної діагностики та лікування»

©Колектив авторів, 2021

©Запорізький державний медичний університет, 2021

ЗМІСТ

| № | Тема заняття | сторінка |
|-----------|---|------------|
| 1 | Тема 1. Вступ. Вимоги до приміщення лабораторій, їх обладнання та устаткування. Охорона праці та правила техніки безпеки в хімічних лабораторіях. | 4 |
| 2 | Тема 2. Лабораторний посуд і допоміжне приладдя. Вимірювальний посуд і техніка роботи з ним. | 14 |
| 3 | Тема 3. Догляд за лабораторним посудом. Стерилізація. Охорона праці під час миття, сушіння та стерилізації хімічного посуду. | 19 |
| 4 | Тема 4. Лабораторні нагрівальні прилади. Охорона праці та заходи безпечної роботи з нагрівальним обладнанням. | 27 |
| 5 | Тема 5. Методи ототожнювання речовин – щільність, температура плавлення, температура кипіння. Термометри. Ареометри. | 32 |
| 6 | Тема 6. Терези, їх види, будова та техніка зважування. | 37 |
| 7 | Тема 7. Реактиви. Очищення реактивів. Фільтрування. Екстракція. Центрифугування. | 41 |
| 8 | Тема 8. Підсумковий контроль змістовного модулю 1. | 46 |
| 9 | Тема 9. Розчини. Способи вираження складу розчинів. Способи їх приготування та зберігання. Охорона праці під час приготування розчинів кислот, лугів. Обчислення. | 46 |
| 10 | Тема 10. Медичні вимірювальні прилади, їх будова, їх призначення, підготовка до роботи. | 54 |
| 11 | Тема 11. Методи об'ємного аналізу. Титриметрія. | 66 |
| 12 | Тема 12. Мікроскопи й техніка мікроскопування. | 79 |
| 13 | Тема 13. Барвники. Класифікація. Приготування. Артефакти. Тинкторіальні властивості клітинних структур. Оцінка якості цитологічного препарату. | 90 |
| 14 | Тема 14. Стандартна світлова мікроскопія фіксованих, забарвлених мазків. Поширені методи забарвлення цитологічних препаратів. Експрес - методи забарвлення цитологічних препаратів. Цитохімічні методи дослідження, мета, призначення. Цитохімічні реакції. | 105 |
| 15 | Тема 15. Підсумковий контроль змістовного модулю 2. | 115 |
| 16 | Тема 16. Модуль 1. | 116 |

ТЕМА № 1 ВСТУП. ВИМОГИ ДО ПРИМІЩЕННЯ ЛАБОРАТОРІЙ, ЇХ ОБЛАДНАННЯ ТА УСТАТКУВАННЯ. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ПРАВИЛА ТЕХНІКИ БЕЗПЕКИ В ХІМІЧНИХ ЛАБОРАТОРІЯХ.

Базуючись на знанні техніки лабораторних робіт можна бути упевненим в точності проведення робіт у біохімічній лабораторії. Точне проведення будь-якої операції або прийому в лабораторній роботі неможливе, якщо виконавець не розуміє їх сенсу і тих теоретичних передумов, які лежать в їх основі.

Лабораторна діагностика - це розділ клінічної діагностики, яка вивчає і оцінює фізіологічний і патологічний стан організму, виявляє захворювання, клітинний і хімічний склад, біологічні особливості тканин і рідин організму, збудників хвороб.

Клінічна лабораторна діагностика в сучасній медицині займає одне з провідних місць в ряду об'єктивних діагностичних досліджень. Відображаючи метаболічні і клітинні процеси, лабораторні дані дозволяють виявити відхилення від норми іноді задовго до появи суб'єктивних відчуттів, клінічних проявів і видимих змін структури уражених органів.

До завдань клінічної лабораторної діагностики входить вивчення закономірностей і встановлення меж нормальних індивідуальних коливань кожного досліджуваного параметра складу біологічних тканин і рідин; вивчення закономірності взаємозв'язку патологічних відхилень цих параметрів з конкретними формами патології; розробка методів дослідження хімічного і клітинного складу біологічних рідин; розробка вимог до якості виконання аналітичних методів і засобів забезпечення цих вимог; встановлення діагностичної цінності окремих лабораторних тестів і їх комбінацій, розробка оптимальних способів їх застосування в діагностики хвороб.

У клінічній медицині методи лабораторної діагностики застосовують, головним чином, для встановлення діагнозу хвороби, для характеристики тяжкості, періоду і терміну захворювання, іноді для визначення його прогнозу, а також для контролю за результатами лікування.

Основними напрямками в розвитку лабораторної діагностики є централізація, автоматизація, уніфікація (стандартизація), інтенсифікація лабораторних досліджень, що сприяють найбільш швидкому, раціональному досягненню кінцевого результату дослідження, розпізнавання захворювання. Подальшому розвитку лабораторної діагностики передують заходи щодо удосконалення системи управління лабораторної службою, контролю якості, матеріально-технічного забезпечення лабораторних досліджень. У цьому процесі велику роль відіграє наукова організація праці, уніфікована звітна та облікова документація, активна раціоналізаторська діяльність, чітка робота служби ремонту апаратури, метрологічного контролю. Особливе місце серед цих заходів відводять підвищенню рівня підготовки фельдшерів-лаборантів, які повинні досконало володіти сучасними, іноді дуже складними лабораторними методами дослідженнями.

Організація лабораторної служби

Розширення сфери практичного застосування лабораторних діагностичних досліджень вимагає такої організації аналітичної служби, яка буде максимально сприяти лікувального процесу. Для цього необхідно приділяти найпильнішу увагу організації цієї служби на рівні окремих лікарень, цілих регіонів і держави в цілому.

Можливості сучасної лабораторної діагностики характеризуються номенклатурою лабораторних досліджень, тобто кількістю видів досліджень і числом певних параметрів в досліджуваному субстраті, а також підвищенням їх якості у зв'язку з впровадженням більш точних і більш специфічних методів, що збільшує інформативність лабораторних даних.

Обов'язковою вимогою до діагностичних лабораторних досліджень є достовірність отриманих результатів. Метод не може бути рекомендований, якщо не проведена оцінка його надійності або аналітичної придатності. Надійність методу характеризується його специфічністю, чутливістю, а також правильністю і відтворюваністю результатів дослідження.

Діагностичне дослідження для найбільш повного використання їх лабораторної діагностичної службою повинні відповідати наступним вимогам: бути доступними, ефективними і безвитратними.

Доступність означає те, що аналіз, який представляє інтерес з клінічної точки зору (навіть якщо його результат складний для інтерпретації) повинен бути доступним для кожного клініциста. Під ефективністю мається на увазі те, що результат повинен приносити максимальну користь з клінічної точки зору, видаватися по можливості швидко і при цьому бути точним і достовірним. При цьому вартість аналізів повинна бути, по можливості, невисокою, що дозволяє здійснювати ефективне обслуговування.

В даний час досить часто зустрічаються ситуації, коли доступне дослідження буває незатребуваним з тієї лише причини, що лікар-клініцист не здатний до інтерпретації отриманих результатів. Нерідко лікарі-клініцисти виявляють недовіру до отриманих результатів, звинувачуючи працівників лабораторії в ненадійною роботі. При аналізі таких ситуацій, як правило, з'ясовується, що лікар-клініцист при отриманні зразка не брав до уваги ряд факторів (вплив раніше введених в організм ліків, час забору матеріалу, температурні фактори та ін.), Що істотно спотворило діагностичну картину.

Щоб ефективно видавати результати досліджень, в лабораторній службі повинно бути зайнята велика кількість співробітників, здатних швидко виконувати аналізи рутинними методами на старому полуізношеном обладнанні, або повинні бути сучасні автоматичні аналізатори, здатні замінити більшу частину співробітників.

Результати дослідження перебувають у прямій залежності від точності засобів вимірювання медичного призначення, перевірку яких забезпечує метрологічний контроль силами Держстандарту і Метрологічній служби системи охорони здоров'я. Розрізняють такі види вимірювань:

- механічні: ваги, гирі, секундоміри, годинник та ін .;
- оптичні: фотоелектроколориметри, спектрофотометри, рефрактометри, поляризатори, флюорометри, вогняні фотометри, гемоаналізатори;
- фізико-хімічні: рН-метри, газоаналізатори та ін.

Точні і правдоподібні результати - обов'язкові умови виконання лабораторних методів дослідження, гарантією чого є проведення контролю їх якості. Відповідно до методичних вказівок, які входять до наказів Міністерства охорони здоров'я, проводять:

1. міжлабораторних контроль якості досліджень силами державних, обласних організаційно-методичних і контрольних центрів по лабораторної справи;

2. внутрішньолабораторний контроль якості досліджень, який чинять колективом співробітників лабораторії.

На деяких етапах проведення контролю якості бере участь фельдшер-лаборант. На сьогодні введено внутрішньолабораторний контроль якості здебільшого біохімічних, деяких загальноклінічних і гематологічних досліджень.

Організація праці персоналу лабораторії.

Більшість лабораторій є відділеннями медичних установ і організуються відповідно до їх структури. Тип і потужність лабораторії залежать від профілю і потужності установи до складу якої вона входить найбільш поширені лабораторії загального типу, які обслуговують багатопрофільну лікарню, поліклініку; вони виробляють загальноклінічні, гематологічні, біохімічні, цитологічні, мікробіологічні, серологічні та інші дослідження. У спеціалізованих лікувально-профілактичних установах лабораторії проводять загальні і спеціальні лабораторні дослідження, що відповідають профілю закладу.

Лаборант повинен організувати свою роботу так, щоб досягти найвищої її продуктивності з найменшими витратами сил і засобів. Досягненню поставленої мети сприяють такі основні елементи: раціональна організація робочих місць, скорочення витрат праці за рахунок чіткого планування, що передбачає послідовність, чергування різних видів і етапів роботи, зведення до мінімуму непродуктивно витраченого часу; спеціалізація, підвищення кваліфікації, удосконалення методик; використання сучасного обладнання (засобів механізації та автоматизації); впровадження винаходів і раціоналізаторських пропозицій, раціональних форм звітної документації, використання електроннообчислювальної техніки, дотримання санітарно-гігієнічних нормативів і попередження професійних захворювань, економне використання реактивів та електроенергії, естетичне оформлення виробничих приміщень клініко-діагностичних лабораторій.

Обов'язки лаборанта

загальні положення

- на посаду лаборанта призначають фахівця з середньою медичною освітою, який має навички виконання лабораторних досліджень;

- призначення і звільнення лаборанта з середньою медичною освітою здійснює головний лікар медичного закладу згідно з чинним законодавством;

- лаборант підпорядковується безпосередньо завідувачу лабораторії, лікаря-лаборанта, або старшому лаборанту, які контролюють його роботу, виробниче навантаження, згідно з якою лаборант складає індивідуальний план роботи. Керуючись складеним планом, він послідовно, старанно і точно виконує завдання;

Основні обов'язки. Лаборант зобов'язаний:

- готувати своє робоче місце, необхідний посуд, реактиви і барвники для проведення досліджень;

- допомагати лікарю-лаборанта в проведенні всіх видів аналізів і самостійно проводити основні види досліджень (визначення фізико-хімічних властивостей досліджуваного матеріалу, підрахунок формених елементів крові, постановка серологічних реакцій і ін), брати участь в проведенні контролю якості;

- проводити визначення показників із застосуванням апаратури, стежити за робочим станом;

- організовувати процес роботи шляхом групування однотипних досліджень, виконувати їх в строгій послідовності, раціонально використовувати свій час;

- забезпечувати санітарно-протиепідемічний режим в лабораторії;

- вести встановлену документацію;

- систематично працювати над підвищенням рівня теоретичних знань та професійної кваліфікації;

- слідувати правилам медичної етики і деонтології.

Права. Лаборант має право:

- висувати вимоги до керівника лабораторії щодо умов роботи для забезпечення чіткого виконання службових обов'язків;

- вимагати від відвідувачів лабораторії дотримуватися правил внутрішнього розпорядку;

- контролювати роботу молодшого медичного персоналу;

- підвищувати свою кваліфікацію на робочому місці або на курсах підвищення кваліфікації в установленому порядку.

Відповідальність. Лаборант несе відповідальність за:

- якість і своєчасність виконання досліджень;

- виконання посадових обов'язків;

- дотримання правил охорони праці та техніки безпеки.

Оцінка роботи. Оцінку роботи фельдшера-лаборанта дають керівник лабораторії, лікар-лаборант, адміністрація лікувального закладу, громадські організації на підставі обліку та обсягу виконаної роботи, виконання правил внутрішнього режиму, трудової дисципліни, морально-етичних норм. Види персональної відповідальності встановлює закон.

Приміщення

Склад приміщень і їх площа визначається затвердженими будівельними нормами і правилами в залежності від кількості аналізів, виконуваних лабораторією в день. Для кожного співробітника, що займається щодня обробкою зразків, потрібен робочий стіл завдовжки 3-5 м.

Приміщення лабораторії ділять на основні та допоміжні. В основних приміщеннях розміщуються робочі місця для виконання досліджень, лабораторна техніка і апаратура. У допоміжних - проводиться реєстрація, підготовка і попередня обробка матеріалу для дослідження, миття і сушка лабораторного посуду, приготування реактивів, живильних середовищ. У великих лабораторіях виділяються окремі приміщення або робочі місця для різних груп аналізів.

Для проведення лабораторних досліджень в клініко-діагностичній лабораторії треба мати окрему кімнату або робоче місце для:

- забору крові;
- забору матеріалу з ураженої ділянки шкіри при шкірних захворюваннях;
- визначення фізико-хімічних показників крові;
- вимірювальних приладів;
- мікроскопічного дослідження;
- загальноклінічного дослідження (сечі, шлункового вмісту, жовчі, мокротиння, спинномозкової рідини, серозної рідини, виділень з статевих органів);
- фарбування препаратів;
- приготування реактивів.

Робочі місця повинні бути забезпечені всім необхідним для проведення обсягу роботи згідно з табелем оснащення лабораторії. Кількість кімнат визначається обсягом роботи лабораторії і характером досліджень, які призводять до неї.

Санітарно-протиепідемічний режим в клініко-діагностичній лабораторії

Санітарно-протиепідемічний режим - це комплекс організаційних, санітарно-профілактичних і протиепідемічних заходів, які запобігають виникненню внутрішньолікарняної інфекції.

Санітарно-протиепідемічний режим включає в себе вимоги щодо санітарного стану лабораторії, внутрішнього оснащення, освітлення, опалення, вентиляції.

Робочі місця повинні бути добре освітлені лампами денного світла.

Лабораторія повинна бути забезпечена витяжною вентиляцією, витяжною шафами, спеціальною лабораторними меблями, посудом, апаратурою і обладнанням.

Основними елементами комплексу заходів, спрямованих на забезпечення санітарно-гігієнічного режиму, є проведення дезінфекції, суворе дотримання вимог асептики і стерилізації.

У лабораторії двічі в день проводять вологе прибирання з застосуванням дезінфікуючих розчинів (0,5% розчин хлорного вапна, 1% розчин хлораміну), а при необхідності - поточне прибирання. Один раз в тиждень проводять генеральне прибирання (миття та дезінфекцію стін, підлоги, обладнання). Для

прибирання виділяють спеціальний маркувальний інвентар, який зберігається окремо. Після прибирання ганчірки, щітки дезінфікують протягом 1 години в 1% розчині хлораміну.

Охорона праці і техніка безпеки

Лаборант працює відповідно до встановленого в лабораторії режиму роботи. Він повинен пам'ятати про те, що досліджуваний матеріал може бути заразним, тому лаборант повинен працювати в спецодязі, гумових рукавицях, користуватися піпеткою-дозаторами або гумовими грушами. Строго дотримуватися інструкцій і наказів:

- на робочому місці має бути тільки те, що необхідно для проведення даного обсягу роботи;
- зберігати концентровані кислоти, луги гостро пахнуть, легкозаймисті та отруйні речовини і працювати з ними відповідно до інструкцій;
- електроприлади повинні бути в робочому стані, заземлені, під час користування ними додержуватися інструкцій. Якщо виникає поломка, викликати майстра.

Під час роботи в лабораторії необхідно дотримуватися правил роботи з нагрівальними приладами, отруйними і легкозаймистими реактивами, захищати одяг і тіло від хімічних реактивів, особливо берегти очі. Для цього необхідно застосовувати такі індивідуальні засоби захисту:

- медичний халат, хустка або шапочку, гумовий фартух, гумові рукавички, захисні окуляри;
- в лабораторії повинен бути вогнегасник, невеликий запас піску, совок;
- на всіх ємностях з реактивами - етикетки з назвами реактивів;
- особливо обережно потрібно звертатися під час роботи з отруйними легкозаймистими речовинами, концентрованими кислотами, лугами;
- з легкозаймистими реактивами (ефір, ацетон і ін.) потрібно працювати, далеко від вогню і працює нагрівального приладу;
- луги можна виливати в раковину концентровані кислоти, основи, отруйні речовини з сильним запахом, хромову суміш і ін .;
- електронагрівальні прилади потрібно ставити на ізолюваний куля (азбест, метласькими плитками);
- перед включенням в мережу електронагрівальних приладів необхідно перевірити надійність заземлення, справність розетки, вилки, електропроводу, при несправності викликати електрика. Користуватися електрооснащенням студентам дозволяється тільки після ретельного інструктажу і під наглядом викладача. У разі пожежі необхідно вимкнути електрооснащення і здійснювати заходи щодо гасіння вогню, а при необхідності телефонувати в пожежну частину;
- необхідно знати правила надання першої медичної допомоги, лабораторія повинна бути належним чином оснащена.

Підготовка хворого до загальноклінічні досліджень

До проведення лабораторних досліджень хворих готують середні медичні працівники стаціонарів і поліклінік. Для правильної підготовки хворого і транспортування матеріалу лікувальні установи повинні бути досить оснащені. У кабінетах для забору матеріалу, маніпуляційних та процедурних кабінетах необхідно мати набори лабораторного та господарського обладнання: штативи (пластикові та металеві) для пробірок, спеціальні контейнери, термоси або ящики для транспортування. Також потрібно мати набір сухих хімічно чистих пробірок, зокрема силіконових або пластмасових, з певною кількістю антикоагулянту для стабілізації крові. У практиці застосовують широкогорлі банки по 200 мл, великі мірні банки для збирання сечі, серозної рідини, широкогорлі банки по 50 мл для збирання калу, скляні плювальниці з кришками або стерильні закриті банки для мокротиння, стерильні пробірки з пробками для всіх видів бактеріологічних аналізів. Крім того, має бути достатня кількість предметного скла для взяття мазків з пунктатів або відбитків біопсії.

На результати досліджень певний вплив має фізіологічний стан організму, тобто чинники, які формують параметри внутрішнього середовища, або нормальні величини показників. Тому потрібно враховувати умови, в яких перебуває хворий, і прагнути їх стандартизувати: матеріал брати рано вранці натщесерце в однаковому положенні тіла, враховувати прийом лікарських препаратів, рентгенологічні дослідження та ін.

ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ ПРИ РОБОТІ В ХІМІЧНІЙ ЛАБОРАТОРІЇ.

На робочому місці слід підтримувати чистоту і порядок.

У лабораторії заборонено приймати їжу, пити і палити.

Весь посуд повинен мати чіткий і міцний напис. Старі написи необхідно видаляти з посуду.

Не можна використовувати пошкоджений посуд. В усіх випадках, коли є небезпека для очей, треба надягати захисні окуляри.

Особлива обережність потрібна при роботі з посудом, що знаходиться під вакуумом (посудини Дьюара, вакуум-ексикатори, прилади для перегонки у вакуумі), а також при роботі з лужними металами. У цих випадках окрім захисних окулярів необхідні захисні екрани або сітки, захисні рукавички.

При роботі з подразнюючими, отруйними або неприємно пахнучими газами або парами потрібно користуватися витяжною шафою. Вікна шафи закривати, не нахилитися всередину шафи!

Не можна переносити склянки з їдкими, отруйними або горючими реактивами, тримаючи їх за шийку. Склянку завжди треба підтримувати знизу.

Балони із стислими газами зберігають або в горизонтальному положенні, або закріплюють (наприклад, ланцюгами).

Запобіжні засоби

При роботі з легкозаймистими речовинами поблизу не повинно бути відкритого полум'я. Нагрівання проводять за допомогою бань (водяних, масляних, парафінових, повітряних, піщаних).

Нагрівання горючих речовин (наприклад, перегонку) ведуть тільки під постійним наглядом.

Горючі речовини повинні зберігатися на робочому місці лише в невеликих кількостях.

У сушильних шафах не можна випаровувати горючі рідини або сушити осади, які містять їх.

Горючі рідини, що не змішуються з водою, не можна зливати в каналізацію. Їх потрібно регенерувати або знищувати (наприклад, спалювати).

Поведінка при пожежі

Видалити займісті предмети. Вимкнути газ. Вимкнути рубильник електропостачання.

Використовувати вогнегасник (переважно вуглекислотний або наповнений чотирихлористим вуглецем).

Увага! При користуванні вогнегасником з чотирихлористим вуглецем існує небезпека отруєння парами або фосгеном, що утворився. Після пожежі необхідно добре провітрити приміщення!

Пожежі, викликані лужними металами, не можна гасити ні водою, ні чотирихлористим вуглецем, ні вуглекислою. Застосовують сухий пісок.

Одяг, що горить, гасити або за допомогою спеціального душу, або загортанням в ковдру. В крайньому випадку, одяг можна погасити, катаючись по підлозі.

При будь-якому займанні повідомити викладача і завідувача кафедрою. При значних пожежах діють за планом тривоги і евакуації: приводять в дію систему сповіщення про пожежу, вимикають струм і газ головними рубильниками (кранами), по телефону сповіщають відповідних керівників (ректора, інспектора по техніці безпеки, лікаря).

Всі особи, не зайняті гасінням пожежі, негайно покидають приміщення. При цьому слід переконатися, що ніхто випадково не залишився непоміченим.

Дата _____

Підпис _____

Питання до підготовки:

I. Загальні правила роботи в хімічній лабораторії.

1. Лабораторний робочий стіл.
2. Раціональна організація робочого місця.
3. Реактиви та правила поводження з ними.
4. Дистильована вода для хімічних аналізів

II. Техніка безпеки.

1. Правила та обов'язки для студентів
2. Правила безпеки при роботі в хімічних лабораторіях.
3. Правила безпеки при роботі з отрутними та їдкими сполуками.
4. Правила безпеки при роботі з біологічним матеріалом.

4. Чому при розведенні концентрованої сірчаної кислоти не можна вливати воду в кислоту?

5. Яким хімічним посудом необхідно користуватися при розведенні концентрованої сірчаної кислоти, при змішуванні речовин, яке супроводжується виділенням тепла?

6. Яку допомогу необхідно надати потерпілому при:

а) пораненні

б) отруєнні бромом або хлором

в) отруєнні йодом

г) отруєнні лугами, кислотами

д) при опіках?

7. Як розділяються реактиви по ступеню чистоти? Що таке «кваліфікація» реактиву?

8. Як зберігати великі кількості концентрованих кислот?

9. Чому, наливаючи кислоти в ємкості, необхідно тримати їх так, щоб етикетка була зверху?

10. Як зберігають реактиви, які змінюються при дії світла? Перерахуйте такі реактиви.

11. Чому реактиви не можна зберігати відкритими?

**ТЕМА 2. ЛАБОРАТОРНИЙ ПОСУД І ДОПОМІЖНЕ ПРИЛАДДЯ.
ВИМІРЮВАЛЬНИЙ ПОСУД І ТЕХНІКА РОБОТИ З НИМ.**

Без використання хімічного посуду неможливо провести аналізи в жодній з лабораторій. Знання типів і різновидів хімічного посуду визначає точність і правильність проведення аналізів.

Чистота хімічного посуду при аналітичних дослідженнях має величезне значення. Іноді при використанні недостатньо чисто вимитого хімічного посуду можуть бути отримані неправильні результати та зроблені невірні висновки.

ХІМІЧНИЙ ПОСУД

Скляний посуд

Вживаний в лабораторіях хімічний посуд може бути розділений на ряд груп. За призначенням посуд можна розділити на посуд загального призначення, спеціального призначення та мірний. За матеріалом — на посуд з простого скла, спеціального скла, з кварцу.

До групи *загального призначення* відносяться ті предмети, які завжди мають бути в лабораторії і без яких не можна провести більшість робіт. Такими є: пробірки, воронки прості і ділильні, стакани, пласкодонні колби, кристалізатори, конічні колби - Ерленмейєра, колби Бунзена, холодильники, реторти, колби для дистильованої води, трійники, крани.

До групи *спеціального призначення* відносяться ті предмети, які вживаються для однієї якої-небудь мети, наприклад: апарат Кіппа, апарат Сокслета, прилад Кьельдаля, дефлегматори, склянки Вульфа, склянки Тіщенко, пікнометри, ареометри, склянки Дрекслея, калі-апарати, прилад для визначення двоокису вуглецю, круглодонні колби, спеціальні холодильники, прилад для визначення молекулярної ваги, прилади для визначення температури плавлення та кипіння тощо.

До *мірного* посуду відносяться: мірні циліндри і мензурки, піпетки, бюретки та мірні колби.

Посуд загального призначення:

Пробірки є вузькими циліндричної форми посудинами із закругленим дном; вони бувають різного розміру, діаметру та виготовлені з різного матеріалу. Звичайні лабораторні пробірки виготовляють з легкоплавкого скла, але для особливих робіт, коли потрібне нагрівання до високих температур, пробірки виготовляють з тугоплавкого скла або кварцу.

Дата _____

Підпис _____

Питання до підготовки:

I. Хімічний посуд та інше устаткування.

1. Скляний посуд:

- а) загального призначення;
- б) спеціального призначення
- в) мірний посуд

2. Фарфоровий посуд

3. Кварцевий посуд

Колби для відсмоктування
(Бунзена)

Круглодонні колби

Колби К'єльдаля

Реторти

Колби для дистиляції. колби
Вюрца, Клайзена, Арбузова
Алонжі

Кристалізатори

Холодильники

Ексикатори

Сифони

3. Намалюйте посуд вимірювальний посуд:
Вимірювальні циліндри

Піпетки Піпетки для рідин (піпетки Мору)

Газові піпетки.

Мірні колби

4. Намалюйте посуд фарфоровий посуд
Стакани випарювальні

Ступки застосовують для роздрібнення твердих речовин

Тиглі

Ложки-шпателі Човники для прожарення

5. Який посуд використовується в лабораторіях для хімічного аналізу?

6. У яких випадках використовують фарфорові чашки і тиглі?

7. Для яких операцій використовують ділильні лійки?

8. Коли необхідно використовувати бюретки? Як ними користуватися?

9. Який Ви знаєте мірний посуд?

**ТЕМА 3. ДОГЛЯД ЗА ЛАБОРАТОРНИМ ПОСУДОМ.
СТЕРИЛІЗАЦІЯ. ОХОРОНА ПРАЦІ ПІД ЧАС МИТТЯ, СУШІННЯ ТА
СТЕРИЛІЗАЦІЇ ХІМІЧНОГО ПОСУДУ.**

Антисептика — це комплекс заходів, які спрямовані на знищення мікробів у рані, патологічному вогнищі або в організмі в цілому.

Асептика — це комплекс заходів, спрямованих на запобігання проникненню мікробів у рану.

Інфекційні захворювання існують завдяки контагіозності, під якою розуміють можливість передачі збудника від носія до здорової людини. Ця особливість, що забезпечує виживання збудника, як біологічного виду сформувалась у процесі еволюції.

Інфекція (*infectio* — зараження, псування) — стан зараження організму патогенними мікробами, при якому відбувається взаємодія між збудниками захворювання і макроорганізмом.

Інфекційний процес — це складний комплекс специфічних біохімічних, морфологічних та імунологічних змін, що виникають в організмі при попаданні патогенного агента в організм. Ці зміни залежать від виду збудника.

На ранніх етапах розвитку мікробіології, коли були відкриті численні збудники інфекційних захворювань, роль мікроорганізмів у виникненні захворювань переоцінювалась. Попадання патогенного агента в організм вважалось єдиною необхідною умовою для розвитку інфекційного захворювання. Насправді ж, наслідки проникнення мікроорганізму в організм людини визначаються взаємодією збудника (мікроорганізму) і

макроорганізму (людини) в конкретних умовах зовнішнього середовища, при цьому захисним механізмам іноді належить вирішальне значення.

У результаті взаємодії мікроорганізмів з різними патогенними властивостями і організмом людини інфекційний процес, що виникає, може набувати найрізноманітніших форм перебігу: від безсимптомної до клінічно вираженої і навіть смертельної.

Таким чином, збільшується кількість збудників, кількість хворих, поширюється захворюваність. У цьому і вбачають сутність епідемічного процесу, основною закономірністю якого є безперервність, що підтримує життєздатність популяції збудників інфекційних хвороб.

Найкраще основні риси епідемічного процесу були вивчені Л.В. Громашевським, який уклав їх у так звані закони епідеміології.

1. Джерелом збудника інфекції є заражений (хворий, а іноді здоровий) організм людини або (при зоонозах) тварини.

2. Локалізація збудника інфекції в організмі та механізм передачі його — взаємообумовлені явища. Закономірно змінюючи один одного, вони утворюють безперервний ланцюг, який забезпечує існування виду збудника в природі, а разом з тим безперервність епідемічного процесу при будь-яких інфекційних хворобах.

Стерилізація — це знищення всіх вегетативних і спорових форм патогенних і непатогенних мікроорганізмів.

Стерилізації підлягають всі вироби медичного призначення, які в процесі свого використання передбачають контакт з рановою поверхнею, слизовими оболонками й ін'єкційними засобами. Наприклад, ножиці для підстригання нігтів лише дезінфікуються. А ножиці для зняття швів — обов'язково повинні бути стерильними; термометр медичний після використання дезінфікуємо, а коли необхідно виміряти температуру в прямій кишці (у дітей, гінекологічних хворих) його потрібно стерилізувати.

Очищені інструменти стерилізують і вибір методу залежить від особливостей виробу, який необхідно простерилізувати.

Передстерилізаційна очистка інструментів.

Весь інструментарій, який в подальшому буде стерилізуватися повинен пройти передстерилізаційну очистку, яка застосовується з метою очищення його від біологічних, механічних забруднень, залишків ін'єкційних препаратів.

Передстерилізаційна очистка проводиться механічним або ручним способом.

Механічну передстерилізаційну очистку здійснюють за допомогою спеціального обладнання струйним, ротаційним методом з застосуванням йоршів або ультразвуку. Передстерилізаційна очистка інструментів ручним методом складається з наступних етапів:

1. Промивання під проточною водою — кожен інструмент окремо в розібраному вигляді протягом 0,5-1 хв.

2. Замочування в комплексному мийному розчині на 15-20 хв, при умові, що розчин підігрітий до 50-60°C (температура в процесі обробки інструментів не підтримується).

3. Миття в комплексному мийному розчині за допомогою йорша або ватно-марлевого тампона. Миється кожний виріб окремо 0,5-1 хв.

4. Прополіскування під проточною водою протягом 10 хв.

5. Ополіскування дистильованою водою 0,5 хв.

Всі інструменти підлягають передстерилізаційній очистці в розібраному вигляді.

Комплексний мийний розчин складається з: 5 г мийного середника "Лотос" (або іншого на біологічній основі), 170 г 3 % розчину перекису водню, 825 мл води. Для приготування комплексного мийного розчину в маніпуляційних повинні бути мірні ємкості. Передстерилізаційна обробка проводиться в промаркованій посудині. Приготовлений мийний розчин має термін придатності одну добу. Нормативними документами передбачено багаторазове його використання — до 6 разів протягом 24 год з моменту його виготовлення, при умові, що розчин не змінив свого забарвлення. Зміна кольору свідчить про його забруднення, що знижує очисні властивості.

Якість передстерилізаційної очистки інструментів оцінюють при постановці проб:

а) на наявність крові (білка) — азопіритова, проба, проба з гемотестом "Факел";

б) на наявність залишків мийного середника — фенолфталеїнова проба (використовується 1 % спиртовий розчин фенолфталеїну).

Контролю підлягає 1 % від обробленого інструментарію, але не менше 3-5 одиниць. Проби проводять щоденно і це контролює старша медична сестра відділення, головна медсестра.

При позитивних пробах на приховану кров вся партія інструментів, від яких відбирались інструменти на контроль, підлягають повторній передстерилізаційній обробці.

При позитивній фенолфталеїновій пробі (виникає забарвлення малинового кольору) інструменти підлягають повторному ретельному промиванню під проточною водою.

Ведеться журнал обліку передстерилізаційної очистки.

Існують різні методи стерилізації і вибір методу залежить від особливостей виробу, який необхідно простерилізувати.

Методи стерилізації, які найчастіше застосовуються.

Повітряний метод стерилізації — рекомендується для стерилізації виробів зі скла, металу. Стерилізація відбувається під впливом сухого гарячого повітря 180 °C (± 20 °C) протягом 1 год в сухожарових шафах. Інструменти повинні стерилізуватись сухими і в пакунках зі спеціального паперу або у відкритих ємностях на лотку. Вироби, простерилізовані в мішечках зі спеціального паперу, можуть зберігатись стерильними 3 доби. Вироби, простерилізовані без пакунка, повинні бути використані

безпосередньо після стерилізації. Для контролю роботи повітряного стерилізатора з кожною партією інструментів закладається індикатор. Це можуть бути трубчасті індикатори — ТИТ-3, тіосечовина, альбуцид або стрічковий індикатор стерильності. Останній являє собою паперову стрічку білого кольору. Під дією температури 180° С протягом години вона міняє колір — стає коричневою. В повітряний стерилізатор кладуть смужки довжиною 2 см.

Паровий метод рекомендується для стерилізації інструментів з металу, виробів з гуми, перев'язувального матеріалу, білизни. Стерилізація відбувається в автоклаві (Мал. 2.6.) під дією повітряної пари, яка подається під тиском.

У всіх типах парових стерилізаторів принцип будови однаковий. Вони складаються з 3 сталевих циліндрів, розміщених один в одному. Внутрішній циліндр є стерилізаційною камерою, в яку закладають матеріал для стерилізації. Середній циліндр називають водопаровою камерою, в неї заливають воду, яка при нагріванні перетворюється в пару. Водопарова і стерилізаційна камери з'єднані між собою. Зовнішній циліндр — це захисний кожух, який зменшує теплові втрати.

Автоклав оснащений ще манометром, запобіжним клапаном і пристосуваннями для заливання води та контролю за її рівнем.

Процес стерилізації паровим методом складається з декількох етапів. Спочатку водопарову камеру заповнюють водою, потім у стерилізаційну камеру закладають речі, щільно закривають кришку, і запобіжний кран встановлюють на той рівень тиску, при якому планують здійснювати стерилізацію (як правило — 147-196 кПа). Після витіснення з камери повітря доводять тиск пари до заданого. Цей момент вважають початком стерилізаційної витримки (експозиції). При тиску пари 147 кПа і температурі 120 °С витримка повинна становити 45 хв, а при тиску 196 кПа і температурі 132 °С — 20 хв. Витримавши експозицію, знижують тиск в апараті шляхом випускання пари, відчиняють кришку і виймають стерильні матеріали.

Режими роботи автоклава можуть бути такими:

1. Температура 132 °С, тиск 0,20 МПа (2 атмосфери), час стерилізації — 20 хв. Застосовується для стерилізації перев'язувального матеріалу, білизни, виробів з металу. При цьому використовують такі індикатори — фенацетин, манілоза і сечовина, стрічковий індикатор ІС-13.

2. Температура 120 °С, тиск 0,11 МПа (1,5 атмосфери), час стерилізації — 45 хв. Цей метод використовується для стерилізації гумових виробів (рукавиці, катетери, зонди, балончики для відсмоктування слизу і інше). Як індикатор стерильності застосовується фуксин з бензоїдною кислотою.

Стерилізація проводиться в стерилізаційних коробках — біксах або в подвійній м'якій упаковці з бязі. Перед закладкою виробів на стерилізацію, бікс попередньо повинен бути двічі з інтервалом в 15 хв протертий 1 % хлораміну, промитий дистильованою водою і висушений. Матеріали для стерилізації в бікси закладаються в сухому вигляді, пухко. Гумові вироби

повинні бути протальковані та загорнуті в марлю. Переносяться бікси в спеціальних мішках. Термін стерильності виробів в біксах, які не відкривались — 3 доби. Відкритий бікс повинен бути використаний в той же день. Якщо залишились не використані вироби у відкритому біксі — вони підлягають повторній стерилізації. Саме тому, на всіх біксах закріплюють етикетки на яких вказані: дата стерилізації і є підпис медсестри, яка проводила стерилізацію.

Ведеться журнал обліку стерилізації повітряним і паровим методами.

Хімічний метод стерилізації проводиться з використанням розчинів хімічних засобів. Він рекомендується для виробів з полімерних матеріалів, скла, корозійностійких металів. Найчастіше використовується 6 % розчин перекису водню. Стерилізація відбувається при кімнатній температурі — 6 год, в підігрітому до 50 °C розчині — 3 год.

Стерилізація повинна проводитися при повному зануренні виробів, котрі вільно розкладаються в ємкості з розчином, довгі вироби вкладають по спіралі. Всі канали і порожнини заповнюються розчином. Після закінчення часу стерилізації всі вироби двічі занурюють на 5 хв в дистильовану воду, кожний раз змінюючи її. Потім вироби переносяться стерильним корнцангом в стерильну ємність або укладку. Термін збереження стерильності виробів в стерильній ємкості — 3 доби. Розчин перекису водню може використовуватися протягом 7 днів з дня приготування при умові збереження його в закритій ємкості в темному місці. Подальше використання розчину можливе лише при умові контролю вмісту активно діючих речовин.

Для стерилізації *термонестійких* предметів (хірургічні інструменти, виготовлені з полімерних матеріалів, гумові предмети тощо) можна використовувати 1% розчин надцтової кислоти. Тривалість обробки — 45 хв. Предмети повністю занурюють у розчин в емальований посуд і витримують визначений час, накривши посуд покриттям. Після закінчення стерилізації промивають у стерильній дистильованій воді.

Для хімічного методу стерилізації можна використовувати розчин дексону — із глутаровим альдегідом.

Дуже зручно користуватись засобами зарубіжного виробництва. Так, при використанні 2 % розчину корзолексу стерильність досягається через 60 хв, а при застосуванні 4 % розчину — через 30 хв. Корзолекс має антикорозійні властивості, тому ним зручно стерилізувати ріжучі інструменти, а також оптику. Проте слід зазначити, що його використання обмежує його вартість.

Стерилізація іонізуючим випромінюванням. Променеву стерилізацію проводять іонізуючим промінням великої енергетичної сили, яке може проникати на різну глибину в матеріал, що підлягає стерилізації. Переважно застосовують бета- і гама-опромінення. Цей вид стерилізації широко використовують на промислових підприємствах, де виготовляють інструменти одноразового користування (шприци, системи для переливання

крові, перев'язувальний матеріал). Предмети упаковують в герметичні поліетиленові пакети із зазначенням терміну зберігання (до кількох років).

Газовий метод стерилізації у промислових умовах застосовують для обробки термонестійких предметів, які не витримують стерилізації в автоклаві або в сухожаровій шафі (катетери, зонди зі штучних матеріалів, шланги, протези, ендоскопи, оптичні прилади, кетгут). Найчастіше використовують окис етилену, пари формаліну. Застосовується в заводських умовах в спеціальних газових стерилізаторах у приміщеннях з витяжною вентиляцією для стерилізації виробів одноразового призначення.

Кип'ятіння як метод стерилізації шприців та голок згідно з галузевим стандартом 42-21-2-85 "Стерилізація і дезінфекція медичного інструментарію" не передбачений. Але у виняткових випадках (у невеликих лікарнях, амбулаторіях, у домашніх умовах), коли неможливо простерилізувати шприци та голки іншим способом, можна застосовувати кип'ятіння. Стерилізація кип'ятінням проводиться в спеціальних металевих кип'ятильниках з решіткою для вкладання інструментів. Заливають інструменти холодною дистильованою водою і кип'ятять 45 хв з моменту закипання.

За якістю стерилізації ведеться бактеріологічний контроль. Працівники баклабораторії беруть змиви на стерильність 1 раз на 7-10 днів.

При багатoproфільних лікувально-профілактичних закладах і великих лікарнях організовані **центральні стерилізаційні відділення** (ЦСВ), в яких проводять передстерилізаційну очистку інструментів та стерилізацію білизни, перев'язувального матеріалу, інструментів та інших медичних виробів паровим та повітряним методами.

ЦСВ складається з двох зон: нестерильної і чистої. У нестерильній зоні виділяють кілька окремих кімнат: приймально-сортувальна, у якій приймають з відділень і сортують шприци, голки, інструменти; кімнати для проведення передстерилізаційної очистки та кімнати, де інструменти висушують та перевіряють на цілісність та придатність до роботи, готують до стерилізації і завантажують у автоклав чи сухожарову шафу.

У чистій зоні після закінчення стерилізації стерильний матеріал виймають із стерилізаційних апаратів і видають за призначенням.

Хімічний метод стерилізації проводиться з використанням розчинів хімічних засобів. Він рекомендується для виробів з полімерних матеріалів, скла, корозійностійких металів. Найчастіше використовується 6 % розчин перекису водню. Стерилізація відбувається при кімнатній температурі — 6 год, в підігрітому до 50 о С розчині — 3 год.

Стерилізація повинна проводитися при повному зануренні виробів, котрі вільно розкладаються в ємкості з розчином, довгі вироби вкладають по спіралі. Всі канали і порожнини заповнюються розчином. Після закінчення часу стерилізації всі вироби двічі занурюють на 5 хв в дистильовану воду, кожний раз змінюючи її. Потім вироби переносяться стерильним корнцангом в стерильну ємність або укладку. Термін збереження стерильності виробів в

стерильній ємкості — 3 доби. Розчин перекису водню може використовуватися протягом 7 діб з дня приготування при умові збереження його в закритій ємкості в темному місці. Подальше використання розчину можливе лише при умові контролю вмісту активно діючих речовин.

Для стерилізації *термонестійких* предметів (хірургічні інструменти, виготовлені з полімерних матеріалів, гумові предмети тощо) можна використовувати 1% розчин надощтової кислоти. Тривалість обробки — 45 хв. Предмети повністю занурюють у розчин в емальований посуд і витримують визначений час, накривши посуд покриттям. Після закінчення стерилізації промивають у стерильній дистильованій воді.

Для хімічного методу стерилізації можна використовувати розчин дексону — із глутаровим альдегідом.

Дуже зручно користуватись засобами зарубіжного виробництва. Так, при використанні 2 % розчину корзолексу стерильність досягається через 60 хв, а при застосуванні 4 % розчину — через 30 хв. Корзолекс має антикорозійні властивості, тому ним зручно стерилізувати ріжучі інструменти, а також оптику. Проте слід зазначити, що його використання обмежує його вартість.

Стерилізація іонізуючим випромінюванням. Променеву стерилізацію проводять іонізуючим промінням великої енергетичної сили, яке може проникати на різну глибину в матеріал, що підлягає стерилізації. Переважно застосовують бета- і гама-опромінення. Цей вид стерилізації широко використовують на промислових підприємствах, де виготовляють інструменти одноразового користування (шприци, системи для переливання крові, перев'язувальний матеріал). Предмети упаковують в герметичні поліетиленові пакети із зазначенням терміну зберігання (до кількох років).

Дата _____

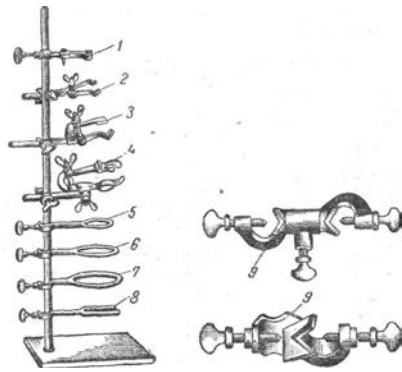
Підпис _____

Питання до підготовки:

- 1.Металеve обладнання: штативи, затискачі різної конструкції, тигельні щипці, пінцети, затискачі для пробірок.
- 2.Лабораторні інструменти та інше додаткове приладдя.
- 3.Асептика та антисептика.
4. Види та способи стерилізації.

Самостійна аудиторна робота

- 1.Зробіть підпис до малюнку



2.Опишіть такі металеві інструменти (з яког металу виробляють, їх призначення):

Затискачі

Пінцети

Тиглі

Ступки металеві

Ножиці.

Ножі

3.Напишіть що означають такі терміни, як

Асептика

4. Опишіть які ви знаєте види стерілізації та опишіть їх.

ТЕМА 4. ЛАБОРАТОРНІ НАГРІВАЛЬНІ ПРИЛАДИ. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ЗАХОДИ БЕЗПЕЧНОЇ РОБОТИ З НАГРІВАЛЬНИМ ОБЛАДНАННЯМ.

В лабораторній практиці є дуже важливим правильний догляд та миття посуду, не належним чином підготований посуд може зіпсувати найсучасніший аналіз.

Миття і сушка хімічного посуду

Хімічний посуд має бути абсолютно чистий; без виконання цієї умови працювати не можна. Для вибору способу миття посуду у кожному окремому випадку необхідне наступне:

1. Знати властивості речовин, що забруднюють посуд.
2. Використовувати розчинність забруднень у воді (холодній або гарячій), в розчинах лугів, різних солей або кислот.
3. Використовувати властивості окислювачів окисляти в певних умовах органічні і неорганічні забруднення, руйнувати їх з освітленням легко розчинних сполук.
4. Для миття можуть бути використані всі речовини, що володіють поверхнево-активними властивостями (мило, синтетичні миючі речовини, миючі глини і ін.).
5. Якщо осад, що забруднює посуд, хімічно стійкий, для його видалення можна застосовувати механічне очищення (за допомогою йоржів і ін.).
6. З реактивів для миття слід застосовувати тільки дешеві матеріали.
7. Потрібно завжди пам'ятати про техніку безпеки і можливість нещасних випадків при митті посуду, особливо якщо той, хто працює, не

знайомий з властивостями забруднень. Кожен новий працівник лабораторії має бути ознайомлений з правилами з техніки безпеки.

У тих випадках, коли хімічний посуд не забруднений смолою, жировими і іншими речовинами, що не розчиняються у воді, посуд можна мити теплою водою. Скляний посуд вважається за чистий, якщо на його стінках не утворюється окремих крапель і вода залишає рівномірну якнайтоншу плівку.

Якщо на стінках посуду є наліт яких-небудь солей або осідань, посуд очищають (заздалегідь змочивши водою) щіткою або йоржем (мал. 1) і вже потім миють водою.

При роботі з йоржем потрібно стежити, щоб нижній кінець його не ударявся ні об дно, ні об стінки посуду, оскільки цим кінцем можна вибити дно або проломити стінку. Щоб запобігти можливості розбивання посуду металевим кінцем йоржа, на кінчик його потрібно надіти шматочок гумової трубки відповідного розміру. Добре вимитий в теплій воді посуд обов'язково два-три рази споліскують дистильованою водою для видалення солей, що містяться у водопровідній воді.

Залишки непотрібних розчинів, що містять солі ртуті, срібла, золота, платини і інших цінних або рідкісних металів, а також йоду, слід збирати в призначені для цього банки. Із зібраних розчинів і осадів потім регенерують відповідні речовини. Так слід поступати і з цінними органічними речовинами, наприклад алкалоїдами.

У рукомийник не можна виливати і викидати концентровані розчини кислот і лугів, хромову суміш, поганопашнучі і отруйні речовини, металевий натрій і тому подібне. Концентровані кислоти і луги необхідно заздалегідь сильно розбавити або, ще краще, нейтралізувати, щоб уникнути руйнування каналізаційної мережі.

Миття органічними розчинниками. Органічні розчинники застосовують для видалення з посуду смолянистих і інших органічних речовин, які не розчиняються у воді.

До органічних розчинників відносяться: діетиловий (сірчаний) ефір, ацетон, спирти, петролейний ефір, бензин, скипидар, чотирихлористий вуглець і інші розчинники.

Більшість органічних розчинників вогнебезпечна, працювати з ними слід далеко від вогню. Забруднені органічні розчинники потрібно збирати кожен окремо і час від часу регенерувати їх. Регенерація полягає в тому, що забруднений розчинник відгоняють.

Для миття посуду можна застосовувати і інші речовини, наприклад мило і особливо 10%-ний розчин тринатрійфосфату, що володіє прекрасними миючими властивостями.

При митті водою з милом або тринатрійфосфатом корисно помістити в колбу шматочки чистого фільтрувального або якого-небудь іншого м'якого паперу. При струшуванні колби папір механічно видаляє із стінок забруднення, що пристали до них.

Абсолютно неприпустимо застосовувати пісок для очищення посуду, оскільки він дряпає скло.

Посуд, що має подряпини при нагріванні, зазвичай лопається.

До хімічних методів очищення посуду відноситься:

Миття хромовою сумішшю. Дуже часто в лабораторіях для миття посуду застосовують хромову суміш, оскільки хромокислі солі в кислому середовищі є сильними окислювачами. Для приготування хромової суміші в концентровану сірчану кислоту додають близько 5% (від маси сірчаної кислоти) подрібненого в порошок кристалічного двохромовокислого калію і обережно нагрівають у фарфоровій чашці на водяні бані до його розчинення.

Для приготування хромової суміші можна застосовувати також двохромовокислий натрій, який розчиняють у воді, а потім в розчин обережно додають сірчану кислоту.

Суміш готують з розрахунку:

Вода..... . 100 мл

Двохромовокислий натрій.... 6 г

Сірчана кислота, рН = 1,84.....100 мл

При митті хромовою сумішшю посуд споліскують спочатку водою, а потім наливають злегка підігріту хромову суміш до 1/3—1/2 об'єму посудини і обережно та поволі змочують його внутрішні стінки. Після цього, хромову суміш виливають назад в ту ж посудину, в якій вона зберігається, причому прагнуть змочити нею стінки посуду і особливо найбільш забруднені її краї, що залишилися не змоченими. Зливши всю рідину, посуд залишають постояти декілька хвилин, потім її миють спочатку водопровідною водою (краще теплою), а потім дистильованою.

Сильно забруднений посуд миють хромовою сумішшю кілька разів.

Найважче відмиваються забруднення на шийках колб. Щоб відмити їх, хромову суміш наливають в стакан, опускають в нього горло колби, злегка обігрітої (достатньо нагрівання рукою), після того, як колба охолонуть, рідина трохи піднімається в її середину. Через одну-дві хвилини колбу виймають, дають стекти хромовій суміші, а потім колбу миють водою, як описано вище.

Хромову суміш служить досить довго. Після тривалого вживання її колір з темно-оранжевого переходить в темно-зелений, що служить ознакою її подальшої непридатності для миття. У лабораторії завжди має бути запас хромової суміші.

Хромову суміш дуже сильно діє на шкіру і одяг, тому поводитися з нею слід обережно.

Недосвідчені працівники при митті піпеток і трубок часто набирають хромову суміш в них ротом. При цьому трапляється, що хромову суміш засмоктується до рота, викликаючи опіки ротової порожнини і псування зубів. Хромову суміш слід набирати в піпетку за допомогою гумової груші

без балона (мал.2). До груші приєднують гумову трубку, кінець якої надягають на піпетку. Стискають рукою грушу, щоб видалити з неї повітря, і закривши великим пальцем отвір для надходження повітря, піпетку опускають в хромову суміш. Поступово розтискають руку (великий палець з отвору не знімати). Усередині піпетки утворюється розрідження і хромово суміш піднімається в неї. Набравши повну піпетку і протримавши в ній хромову суміш 1—2 сек, віднімають великий палець, від отвору груші і дають рідині стекти. Повторивши кілька разів цю операцію, піпетку миють, як завжди.

Піпетки, бюретки і подібні до них довгі трубки зручно також мити хромовою сумішшю в товстостінному циліндрі такої висоти, щоб трубки могли бути занурені в нього більш ніж на половину. У циліндр поміщають ті трубки, що підлягають миттю і заливають його майже доверху хромовою сумішшю. Через деякий час трубки виймають і поміщають їх в циліндр зворотними кінцями (мал.3).

Хромову суміш не застосовують, якщо посуд забруднений парафіном, гасом, воском, мінеральними оліями і продуктами перегонки нафти. У цих випадках посуд миють парою або органічними розчинниками.

Потрібно уникати попадання в хромову суміш спиртів— етилового або метилового, що негайно окислюються і поновлюють Cr_2O_7^- іон до Cr^{3+} . В результаті цього розчин набуває зеленого забарвлення і робиться непридатним для подальшого застосування.

Якщо посуд забруднений солями барію, мити його хромовою сумішшю, що містить сірчану кислоту, не можна, оскільки сірчаноокислий барій, що утворюється, утворює на стінках посуду осад, який важко видаляється.

Потрібно відмітити, що хромову суміш корисно застосовувати злегка підігрітою (до 45—50°C), тоді вона діє сильніше.

Дата _____

Підпис _____

Питання до підготовки:

1. Лабораторні нагрівальні прилади
2. Механічні методи очищення посуду.
3. Хімічні методи очищення посуду.
4. Сушка хімічного посуду
5. Догляд за лабораторним посудом.

Самостійна аудиторна робота

1.Що може бути використано для миття посуду?

2. Що роблять із залишками реактивів?

3. Які речовини не можна просто вилити до каналізації?

4. Як готується хромово суміш та для чого вона використовується?

5. Коли не можна використовувати хромову суміш?

6. Правила безпеки при роботі з хромовою сумішю.

7. Миття марганцевокислим калієм.

8. Миття сумішшю соляної кислоти і перекису водню.

9. Миття сірчаною кислотою і розчинами лугів.

10. Очищення посуду для особливо точних робіт.

11. Сушка хімічного посуду, які ви знаєте методи, опишіть їх.

12. Методи сушки при нагріванні, опишіть ці методи.

13. Які ви знаєте лабораторні нагрівальні прилади _____

**ТЕМА 5. МЕТОДИ ОТOTOЖНЮВАННЯ РЕЧОВИН –
ЩІЛЬНІСТЬ, ТЕМПЕРАТУРА ПЛАВЛЕННЯ, ТЕМПЕРАТУРА
КИПІННЯ. ТЕРМОМЕТРИ. АРЕОМЕТРИ.**

Визначати наявність досліджуваного компоненту в суміші або ідентифікувати вміст складного комплексу можна за фізико-хімічними показниками речовин. Ідентифікація речовин проводиться вимірюванням таких показників як щільність, температура плавлення, температура кипіння, показники заломлення, оптичної щільності, електрофоретичної рухливості, в'язкості і ін.

Щільність речовин. Вимірювальня щільність рідини.

Під час виконання аналізів часто виникає необхідність виміряти щільність біологічних рідин, розчинів кислот, лугів, спирту або твердих речовин.

Щільність – це один з основних показників речовин. Позначається вона буквою « ρ » (читається «ро»). Для однорідного тіла або речовини щільність в усіх точках однакова і дорівнює відношенню маси тіла « m » до його об'єму « V », тобто:

$$\rho = m / V$$

Одиницею щільності (розмірність) в Міжнародних одиницях (система СІ) є $\text{кг}/\text{см}^3$, а розчинів – грам/мл.

Для вимірювання щільності використовують ареометри (денситометри) – вагові, ультразвукові, вібраційні, радіоізотопні, оптичні і поплавцеві.

Поплавцевий ареометр. В основу його дії покладений закон Архімеда. Виділяють ареометри з незмінною масою і змінним об'ємом. Ареометри розділяють за призначенням: лактоденситометри, спиртометри, урометри і ін.

У щоденній практиці користуються відносною щільністю, тобто відношенням щільності даної речовини до щільності дистильованої води при температурі 40°C .

Щільність збільшується з підвищенням тиску і, як правило, зменшується при підвищенні температури. Аномально поводить себе вода. Стандартною температурою, що рекомендується для вимірювань щільності, є 200°C .

Ареометр – це скляна трубка з розширенням, низ якого заповнений дробом або залитий ртуттю. У вузькій частині ареометра є шкала з діленнями відносної щільності точністю до третього десяткового знаку. Найменше числове значення щільності вказаного вгорі, а найбільше – внизу, оскільки із зменшенням щільності розчину ареометр занурюється глибше. Для зручності роботи випускаються набори ареометрів, які охоплюють весь спектр щільності рідин. Випускаються ареометри з вмонтованими термометрами.

Для визначення відносної щільності досліджувана рідина наливається в скляний циліндр без носика і бажано, без ділень, ємкістю і діаметром, що відповідають розмірам ареометра. Ареометр повинен вільно плавати, не торкаючись стінок циліндра. Ареометр не випускають з рук до тих пір, поки не переконаються, що він не потонує, а плаває. Ареометр має бути в центрі циліндра, не торкаючись дна або стінок. Відлік ділень проводять по нижньому меніску рідини. Повторюють вимірювання ще двічі. Для цього, підвівши ареометр на 1-2 см, опускають його, чекаючи поки він зупиниться і проводять відлік.

Після вимірювання ареометр витягають, миють водою, витирають досуха і кладуть у футляр. Користуватися ареометрами необхідно обережно, тому що вони дуже крихкі.

Температура плавлення.

Температура плавлення твердих речовин – це особливість, характерна для всіх речовин. Хоча ця величина і не специфічна, вона може бути ознакою чистоти досліджуваної речовини.

Малу кількість речовини дроблять ретельним розтиранням в ступці або на склі.

Заздалегідь витягають з розплавлених скляних трубок капіляри з внутрішнім діаметром 0,5-0,8 мм і завдовжки 7-9 см. Один з кінців капіляра (краще тонший) запаюють.

Відкритий кінець опускають в подрібнену речовину, капіляр перевертають і постукуванням добиваються, щоб порошок впав на дно капіляра. Повторюючи процедуру кілька разів, заповнюють капіляр на висоту 4-5 мм. Для ущільнення речовини капіляр кілька разів опускають у високу вузьку трубку, яка встановлена вертикально в підставку. Капіляр прикріплюють до термометра гумовим кільцем так, щоб кінець капіляра і резервуар термометра був на одному рівні. Круглодонну довгогорлу колбу наповнюємо до половини концентрованою кислотою і встановлюємо її на азбестову сітку.

У колбу опускають і закріплюють широку пробірку, так щоб вона була частково в кислоті. У пробірку наливають гліцерин або прозору олію. Термометр з капіляром опускають до рівня кислоти так, щоб він не торкався стінок. Колбу нагрівають дуже обережно. У момент плавлення речовини вимірюють температуру. Вимірювання повторюють кілька разів і беруть середню величину. Температуру плавлення можна визначити за допомогою приладів Тіля, Дениса, Евері.

Температура кипіння.

Кожна рідина кипить при певній постійній температурі, яка залежить від зовнішнього тиску. Ця величина і є критерієм чистоти речовини.

Простим приладом є круглодонна з широким горлом колба на 50 мл, в яку наливають досліджувану рідину на $\frac{1}{4}$ об'єму. Колбу закривають пробкою зі вставленим в неї термометром і тонкою, заломленою догори, трубкою. Термометр має бути на поверхні. Пари рідини виходять через трубку. Спостереження ведуть 15 хвилин. За температуру кипіння вважають ту мітку на термометрі, яка встановилася до моменту закипання. Якщо в рідині є домішки, то температура кипіння буде вища за табличні дані. Якщо тиск був нижчий 760 мм.рт. ст., то поправка: $t_1 = 0,038 (760 - P_{ат})$, а якщо вище, то поправка $t_2 = 0,038 /760 - P_{ат}/$. Величину t_1 додають, а t_2 віднімають від практичного показника вимірювань.

Методи визначення температури речовин.

Вимірювання температури засноване на застосуванні термодинамічної шкали, виведеної теоретичним шляхом більше, ніж 100 років тому У. Кельвіном (Англія). Ця шкала має лінійний характер і не залежить від

властивостей речовини, вживаної як робоче тіло. З шкалою Кельвіна збігається інша — шкала ідеального газу, виведена також теоретично. Температуру за цією шкалою вимірюють газовими термометрами, в яких робочими речовинами є гази, — водень або гелій, властивості яких в певних умовах близькі до властивостей ідеального газу.

Градус Кельвіна — одиниця вимірювання температури за термодинамічною температурною шкалою. Експериментальною крапкою репера для цієї шкали є потрійна точка води (температура рівноваги між трьома станами води — льодом, рідкою фазою і водяною паром). Температура потрійної точки води на $0,01^{\circ}$ До вище за температуру танення льоду, для неї встановлено значення $273,16^{\circ}\text{K}$ (точно).

Правила вимірювання температури.

Температуру вимірюють за допомогою термометрів. Термометри, призначені для вимірювання температур вище 630°C , називають пірометрами.

За принципом дії термометри можуть бути класифіковані на наступні групи:

1. Дилатометричні, принцип дії яких заснований на зміні об'єму робочого тіла (переважно рідини) із зміною температури.

2. Манометричні, принцип дії яких заснований на вимірюванні тиску, змінного із змінною температури, в замкнутому просторі, причому робочим тілом в них можуть бути гази, пари або рідини.

3. Електричні, такі, що підрозділяються на:

- а) термометри опору (болметри);
- б) термоелектричні пірометри (термопари);
- в) термістори (напівпровідники).

4. Оптичні, такі, що підрозділяються на:

- а) радіаційні пірометри;
- б) оптичні пірометри.

5. Термохімічні. Термохімічним шляхом температуру вимірюють зазвичай за допомогою речовин, які змінюють забарвлення із зміною температури.

Дата _____

Підпис _____

Питання до підготовки:

Знати:

1. Види ареометрів.
2. Хімічний інструментарій для нагрівання і охолодження.
3. Правила роботи з різними термометрами.

Уміти:

1. Визначати щільність різних біологічних рідин.
2. Правильно користуватися ареометрами.
3. Визначати температуру плавлення твердих речовин.
4. Визначати температуру кипіння різних рідин.

Самостійна робота

1.Що таке щільність речовини?

2.Як вимірюється щільність рідини?

3.Що таке ареометри? Які види ареометрів Ви знаєте??

4.Напишіть значення терміну густина речовин. Як проводять вимірювання густини рідин.

5.Що таке температура плавлення?

6.Як проводять визначення температури плавлення, які прилади використовують.

7.Що таке температура кипіння?

8. Температура кипіння, як проводять визначення.

9. Що таке термометри? Які види термометрів Ви знаєте?

10. Методи визначення температури речовин.

11. Види термостатів

12. Що таке хімічний холодильник? Які види холодильників Ви знаєте?

13. Навіщо використовують зворотні холодильники.

14. Правила сушки речовин.

15. Газові нагрівальні прилади, опишіть їх.

16. Які види бані використовуються в хімічній лабораторії?

17. Види нагрівання. Обґрунтуйте доцільність використання різних бань в лабораторній практиці.

ТЕМА 6. ТЕРЕЗИ, ЇХ ВИДИ, БУДОВА ТА ТЕХНІКА ЗВАЖУВАННЯ.

Ваговий аналіз - це найбільш вивчений метод кількісного аналізу. Він відомий з того часу, коли виникла аналітична хімія, і є основним методом визначення відносних атомних мас елементів. За допомогою цього аналізу встановлений хімічний склад більшості речовин, його використовують для встановлення чистоти речовин. Ваговий метод аналізу має ряд недоліків, основний з них - велика витрата часу на виконання дослідження.

Ваги є найважливішим приладом в хімічній лабораторії, оскільки майже жодна робота в ній не обходиться без визначення маси тієї або іншої речовини або тари, в яку поміщають зважувану речовину.

Зважуванням називають порівняння маси даного тіла з масою гирь, маса яких відома і виражена в певних одиницях (міліграм, грам, кг і ін.).

Залежно від точності, з якою проводять зважування, ваги розділяють на наступні групи:

- 1) для грубого зважування (точність до грамів);
- 2) для точного зважування (точність від 1 до 10-мг);

3) аналітичні:

а) звичайні (точність до 0,1—0,2 міліграма);

б) напів-мікрохімічні (точність до 0,01—0,02 міліграма);

в) мікрохімічні (точність до 0,001 міліграма);

г) ультрамікрохімічні (точність до 10^{-6} — 10^{-9} міліграм);

4) спеціальні (пробірні, торзійні і ін.).

Кожна з цих груп підрозділяється на підгрупи залежно від конструктивних особливостей.

Кожні ваги мають свій важок, тобто набір гирь. На кожній гирці важка позначена її маса, причому ця маса носить назву номінальної. Дійсна маса зазвичай не рівна номінальній. Для важка аналітичних вагів це відхилення виражається в десятих, а іноді, в сотих долях міліграма і не відбивається на точності зважування. Але чим менше гиря, тим більше її відносна неточність.

У важках до вагів грубішим, ніж аналітичні, відносне відхилення гирь може бути значнішим. Величина відхилення номінальної маси від істинної характеризує точність важка.

Гирі важка необхідно періодично перевіряти і таврувати.

Ваги для точного зважування

Ваги для точного зважування дають можливість зважувати з точністю до 10 міліграм і рідше — до 1 міліграма. Є багато типів вагів для точного зважування як двоплечих, так і одноплечих.

Простим типом вагів для точного зважування є ручні, або аптечні. Граничне навантаження ручних вагів може бути різне і досягає 100 г.

Для точного зважування застосовують різноманітні так звані технохімічні або технічні ваги. Технохімічні ваги досконаліші, і їх вантажопідйомність може складати від 200 г до декількох кілограмів. На відміну від вагів для грубого зважування у вагів для точного зважування є так званий арретирний пристрій і гайки балансувань. За допомогою арретирного пристрою найвідповідальніші частини вагів — призми коромисла і подушки — в неробочому положенні відділяються і не торкаються майданчиків. Це оберігає призму від зносу, а ваги — від втрати чутливості. При зважуванні поворотом ручки аретира ваги приводять в робоче положення.

Точні ваги (окрім ручних) встановлюють стаціонарно, у визначеному місці лабораторії, строго по рівню, з дотриманням правил, вказаних в інструкції до них. Для регулювання положення у вагів є передні гвинтові ніжки, які спираються на круглі металеві підставки з виїмками в центрі.

При правильній установці вагів вістря рівня повинне збігатися з вершиною конуса, що знаходиться у підніжки колонки. У деяких типів вагів є рідинні рівні з бульбашкою повітря.

Якщо при опусканні аретира ваги не знаходяться в рівновазі, його добиваються за допомогою гайок балансувань.

Промисловість випускає типи лабораторних вагів 2-го і 1-го класів; технічні ваги 2-го класу з вантажопідйомністю 200 г (Т—200), 1000 г (Т—1000) і 5000 г (Т—5000). У перших вагів допустима помилка при найбільшому навантаженні складає ± 60 міліграмів, у других ± 200 міліграмів і у третіх ± 500 міліграмів.

Дата _____

Підпис _____

Питання до підготовки:

1. Види вагів;
2. Хімічний інструментарій для зважування;
3. Правила роботи з різними вагами.
4. Технохімічні ваги
Аналітичні ваги
6. Торсіонні ваги
7. Аптечні ваги
8. Техніка зважування предмета й наважки на аптечних, терезах.
9. Техніка зважування предмета й наважки на техно-хімічних терезах.
10. Техніка зважування предмета й наважки на торсійних і лабораторних рівноплечих та інших терезах.
11. Гравіметричний аналіз.

Самостійна аудиторна робота

1. Яким вимогам повинен відповідати осад, що утворився в результаті реакції осадження, для визначення того або іншого іона гравіметричним методом?

2. Якими чинниками визначаються умови осадження в гравіметричному аналізі?

3. Яке значення має концентрація водневих іонів при проведенні реакцій осадження? Пояснити на конкретних прикладах.

4. Як влаштовані технохімічні ваги?

5. Як правильно зважувати на технохімічних вагах?

6. Що таке важки? Як правильно зберігати і використовувати важки?

7. Як зважуються летючі і хімічноактивні речовини?

8. Як влаштовані аналітичні ваги?

9. Як правильно зважувати на аналітичних вагах?

10. Як влаштовані торсіонні ваги?

11. Як правильно зважувати на торсіонних вагах?

12. Чим відрізняються демпферні ваги від аналітичних?

13. Чому аналітичні ваги краще встановлювати в окремій кімнаті на мармуровій дошці?

16. Чому не можна брати руками гирки?

**ТЕМА 7. РЕАКТИВИ. ОЧИЩЕННЯ РЕАКТИВІВ.
ФІЛЬТРУВАННЯ. ЕКСТРАКЦІЯ. ЦЕНТРИФУГУВАННЯ.**

У лабораторній практиці дуже часто доводиться вдаватися до операції механічного розділення твердих і рідких компонентів суміші. Цю операцію найчастіше здійснюють шляхом фільтрування.

Окрім фільтрування, розділення суміші рідких і твердих речовин можливе також шляхом центрифугування, тобто розділення речовин в приладах, що називають центрифугами.

Для видалення розчинниками із суміші того або іншого компоненту використовують метод екстракції.

Центрифугування

Окрім фільтрування, розділення суміші рідких і твердих речовин можливо також шляхом *центрифугування*, тобто розділення речовин в приладах, званих центрифугами. Застосування центрифуги засноване на використанні відцентрової сили. При швидкому обертанні (центрифугуванні) тверді частинки з масою більшою за щільність рідини під дією відцентрової сили, що розвивається при обертанні, відкидаються від центру і таким шляхом виділяються з рідини.

Центрифуги бувають: відкриті і закриті, з ручним і механічним, електричним приводом.

Механічні закриті центрифуги (мал.8) зручніші, ніж ручні. Вони дають зазвичай 2000—3000 об/хв, дозволяють досягти досконалішого розділення рідини і твердої речовини. У клініках широко застосовуються центрифуги типу ОПН-3

Пробірки для центрифугування. Пробірки для центрифуг після наповнення рідиною повинні мати однакову масу. Для цього необхідно використовувати спеціальні *центрифужні ваги*, пристосовані для зважування (вірніше, урівноваження - тарування) пробірок. У вказаних вагах шальки підвішують до коромисла за допомогою стрижнів, прикріплених до центру шальок. На цих стрижнях є кільця, в які вставляють пластикові стакани. Ваги врівноважують разом з пластиковими стаканами шляхом додавання шматочків фільтрувального паперу на шальки вагів.

Зрівноваживши ваги, в пластикові стакани вставляють скляні центрифужні пробірки. Досліджувану рідину, що підлягає центрифугуванню, наливають спершу в одну скляну пробірку (за допомогою, наприклад, піпетки), а потім в другу скляну пробірку, добиваючись урівноваження шальок на вагах.

Ніколи не слід наливати в пробірки дуже багато рідини; пробірки наповнюють так, щоб відстань від краю до рівня рідини була не менше 10 мм.

Коли потрібно зрівноважити багато пробірок, доцільно застосовувати наступний прийом. Врівноваживши першу пару пробірок, одну з них виймають і поміщають в гніздо центрифуги, а іншу залишають на вагах. Ця остання пробірка служитиме еталоном для останніх. У місце, що звільнилося на вагах, вставляють іншу пробірку, врівноважують з еталоном і прибирають. Доцільно також заздалегідь наповнити пробірки (узявши кількість рідини

декілька менше потрібного) і вже при урівноваженні додавати необхідну кількість рідини. Такий прийом прискорює роботу.

Урівноважені пробірки вставляють в гнізда центрифуги попарно «один проти одного».

Центрифуга ОПН-3 призначена для розділення неоднорідних рідких систем щільністю до 2 г/см^3 в полі відцентрових сил.

За центрифугою слід постійно спостерігати; неприпустимо її забруднення, особливо рухомих частин. Металеві гільзи повинні легко і вільно обертатися. Шестерні, що приводять в обертання центрифугу, повинні мати легкий хід; їх не можна змащувати мастилами. Вісь центрифуги також має бути в порядку і завжди чистою.

При необережному поводженні з центрифугами можна зігнути вісь і цим вивести центрифугу з ладу.

Після виключення центрифуги дають час зупинитися самій і лише після цього виймають пробірки.

В даний час активно використовують суперцентрифуги, що дають до 40 000 об/хв. Такі центрифуги особливо зручні для центрифугування в'язких розчинів, наприклад лаків, тонких дисперсій, а також емульсій.

Такі центрифуги можуть мати декілька різних змінних роторів, що дозволяють вести центрифугування з різною швидкістю і з метою отримання субклітинних фракцій тканин тварин, дослідження мембран клітин крові і ін.

Екстракція

Екстракція є особливим прийомом виділення органічної речовини з розчину або суміші твердих речовин. Екстракцією називають метод витягування розчинниками з суміші яких-небудь речовин того або іншого компоненту.

У основі цього методу лежить закон розподілу речовини, між двома рідинами (якщо екстрагують речовину з розчину в якій-небудь рідині), що не змішуються, і різною розчинністю окремих речовин в даному розчиннику (якщо речовину витягують з суміші з іншими речовинами).

Для виділення органічних речовин, що знаходяться у водному розчині, застосовують витягування розчинниками, що не змішуються з водою, в яких дані речовини добре розчинні. Зазвичай при екстракції в якості розчинників використовують легко летючі рідини — діетиловий ефір, петролейний ефір, бензол, хлороформ і ін. Шляхом екстракції можна звільнити речовину від домішок, якщо вони не розчинні в узятому розчиннику. Оскільки розчинники, вживані при екстракції, зазвичай мають низькі температури кипіння, відгонка розчинника після екстракції проводиться швидко і не викликає утруднень.

Більшість речовин (як рідких, так і твердих) розчиняються в декількох розчинниках. Якщо дана речовина розчинена в якому-небудь розчиннику і до цього розчину додати інший розчинник, що не змішується з першим, то частина речовини перейде в цей розчинник, утворюючи два шари рідин, що

не змішуються, в яких міститиметься дана речовина. При цьому розподіл речовини між двома розчинниками буде цілком визначеним для кожного окремого випадку. Відношення концентрацій розчиненої речовини в обох рідких фазах називається *коефіцієнтом розподілу*.

Наприклад, оцтова кислота дуже добре розчиняється у воді і в бензолі. Бензол же у воді практично нерозчинний. Тому, якщо до водяного розчину оцтової кислоти додати бензол, то оцтова кислота розподілиться між водою і бензолом. Повторюючи операцію кілька разів, можна витягувати з води майже всю оцтову кислоту.

Якщо ж узяти такий випадок, коли розчинники змішуються між собою, а дана речовина розчиняється тільки в одному з них, то при додаванні в розчин іншого розчинника речовина випадає в осад.

Наприклад, скипидар розчиняється в спирті; якщо ж в спиртовий розчин його додати воду, то він випаде у вигляді тонкої емульсії. Інший приклад: віск добре розчиняється на холодну в хлороформі, але погано в холодному етиловому спирті. Тому, якщо до хлороформного розчину воску додати деяку кількість спирту, то віск виділиться з розчину у вигляді пластивців.

Якщо ж є суміш двох або декількох речовин і потрібно виділити одну з них, то майже завжди можна підібрати такий розчинник, який розчиняє тільки потрібну речовину і майже не розчиняє інших.

Одним з найважливіших розчинників є вода, в якій розчиняється дуже велика кількість різних неорганічних і органічних речовин.

У табл.1 наведені органічні розчинники, що найчастіше використовуються при екстракції.

Дата _____

Підпис _____

Питання до підготовки:

1. Ознайомитися з методами розділення речовин.
2. Вивчити види фільтрування, види фільтрів і правила фільтрування.
3. Ознайомитися з принципом методу екстракції речовин з суміші.
4. Ознайомитися з принципом методу центрифугування, вивчити правила користування лабораторною центрифугою.
5. Вивчити види центрифуг.

Самостійна аудиторна робота

1. Загальні поняття про процес фільтрування. Чинники, що впливають на процес фільтрування.

2.Матеріали, що фільтрують, типи фільтрів.

3.Особливості фільтрування при звичайному тиску.

4.Вимоги по фільтруванню з вакуумним насосом.

5.Способи промивання осадів (декантація, фільтрування, центрифугування).

6.Порядок роботи при виготовленні простого і складчастого паперового фільтру.

7. Правила роботи при процесі центрифугування з використанням лабораторної центрифуги.

8. Техніка безпеки роботи в процесі центрифугування.

9. Принциповий пристрій центрифуги з електричним приводом.

10. Загальне поняття про екстракцію. Коефіцієнт розподілу речовини, що екстрагується з сумішею: його розрахунок; чинники, що впливають на його величину.

11. Принципи вибору екстрагента для речовини, що екстрагується з суміші.

12. Правила роботи з ділільною лійкою. При екстракції.

ТЕМА 8.ПІДСУМКОВИЙ КОНТРОЛЬ ЗМІСТОВНОГО МОДУЛЮ 1.

ТЕМА 9. РОЗЧИНИ. СПОСОБИ ВИРАЖЕННЯ СКЛАДУ РОЗЧИНІВ. СПОСОБИ ЇХ ПРИГОТУВАННЯ ТА ЗБЕРІГАННЯ. ОХОРОНА ПРАЦІ ПІД ЧАС ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ КИСЛОТ, ЛУГІВ. ОБЧИСЛЕННЯ.

Розчинення хімічних речовин є обов'язковою умовою здійснення в організмі різних метаболічних процесів і виконання більшості біохімічних досліджень, у зв'язку з чим, необхідно мати якомога повніше уявлення про все різноманіття розчинів, їх властивості і способи вираження їх концентрації.

Розчин — це рідка, газоподібна або тверда гомогенна система, що складається з двох або більше компонентів, відносні кількості яких можуть бути довільно змінені в досить широких межах.

Рідкі розчини підрозділяють на водні і неводні. І ті і інші є однорідною фізико-хімічною дисперсною системою, в якій рівномірно по відношенню один до одного розподілені частки розчиненої речовини, розчинника і продукти їх взаємодії. Зазвичай той компонент, який в чистому вигляді існує в такому ж агрегатному стані, що і отриманий вважають розчинником. Якщо обидві складові частини системи до розчинення знаходилися в однаковому агрегатному стані (наприклад, спирт і вода), то за розчинник вважається рідина, узята в більшій кількості.

Залежно від розміру часток розподіленої речовини виділяють три класи дисперсних систем:

1) іонно-молекулярні (дійсні розчини), розміри часток розподіленої в них речовини не перевищують 1 нм;

2) колоїдні системи (колоїдні розчини) — з розмірами часток близько 100 нм; для такої системи характерне розсіювання світла, що проходить через неї, - феномен Тіндаля.

3) грубодисперсні системи, що містять частинки твердої (суспензії) і рідкої (емульсії) речовини діаметром більше 100 нм.

Всі речовини відзначаються відомою розчинністю у воді. Вона виражається числом грамів речовини, яка, будучи розчиненою при певній температурі в 100 грамах розчинника, дає насичений розчин. Звідси витікає, що мірою розчинності речовини за даних умов є концентрація його насиченого розчину. Тому розчинність може виражатися в тих же одиницях, що і концентрація, наприклад моль/л розчину. Проте з давніх часів

розчинність прийнято виражати числом грамів речовини, розчиненої в 100 грамах розчинника.

При нагріванні розчинність твердих речовин у воді, як правило, підвищується, а газів — зменшується. На зниженні розчинності з пониженням температури засновано виділення розчиненої речовини з розчину і очищення його від домішок. Так, якщо отримати насичений розчин при високій температурі, а потім охолодити його, то надлишок речовини виділиться у вигляді кристалів певної структури. Цей процес називається кристалізацією. Він йде тим швидше, чим більше концентрація розчину (початку кристалізації сприяє струшування розчину або внесення до нього кристалу розчиненої речовини). У момент встановлення динамічної рівноваги між процесами розчинення і кристалізації кількість речовини, що перейшла в розчин, не змінюється і розчинення практично припиняється.

Розчин, в якому розчинена речовина, за даних умов, більше не розчиняється, є *насиченим*. Всякий розчин, в якому розчиненої речовини знаходиться менше, ніж в насиченому, називається *ненасиченим*. За особливих умов можуть бути отримані і *пересичені* розчини, до утворення яких «схильні» деякі речовини, що слід мати на увазі при виконанні біохімічних досліджень. Так, в процесі визначення іонів калію хімічним методом, заснованому на реакції утворення купрум-гекса-нитриту калій-свинцю — $K_2PbSi(NO_2)_6$, виходить пересичений розчин, для осадження з якого сформованої комплексної подвійної солі потрібне тривале потирання скляною паличкою об внутрішні стінки пробірки (з метою утворення центрів кристалізації). Інакше можуть виникнути занижені результати.

Поняття «насичений» і «ненасичений» не слід ототожнювати з поняттями «концентрований» і «розбавлений». Концентрований розчин зовсім не обов'язково має бути насичений. Наприклад, розчин, що містить 20 г $KMnO_4$ в 100 г води, є концентрованим, але якщо температура його $20^\circ C$, то він ще далеко не насичений. Для отримання насиченого розчину при цій температурі потрібно було б узяти 31,5 г селітри на 100 г води. З іншого боку, і насичений розчин може бути розбавленим (якщо речовина малорозчинна). Так, насичений розчин гіпсу при $20^\circ C$ містить всього лише 0,21 г речовини в 100 г розчину.

Уявлення про кількісний вміст речовини в розчині виражається поняттям *концентрації*.

Концентрацією розчину називається масовий (г, кг) або об'ємний (мл, л) вміст речовини в певній кількості або об'ємі розчину.

По точності виразу концентрації розчини ділять на *приблизні і точні*.

Вміст речовини в приблизних розчинах в даний час рекомендується виражати розмірністю масової концентрації, масових і об'ємних часток, що замінили відповідні вирази окремих видів відсоткової концентрації.

Під *відсотковою концентрацією* прийнято розуміти певну кількість речовини (г або мл), що міститься в 100 г або 100 мл розчину. Це загальне визначення поняття відсоткової концентрації включає декілька різновидів.

Залежно від одиниць (об'єму або маси), використовуваних для позначення кількості розчиненої речовини і розчину, розрізняють *вагову* (масову), *вагово-об'ємну* (масооб'ємну), *об'ємну*, *об'ємно-вагову* (об'ємно-масову) *відсоткову* концентрацію.

Масова (вагова) відсоткова концентрація (%) показує, скільки грамів речовини міститься в 100 г розчину.

$$\% = [a / (a + б)] \cdot 100$$

де **а** — кількість розчиненої речовини, **б** — кількість розчинника в грамах (у сумі складають 100 г).

Наприклад, 38% розчином соляної кислоти називають такий розчин, в 100 г якого міститься 38 г хлористого водню і 62 г води. Для отримання розчину цього виду відсоткової концентрації наважку речовини вносять до хімічного стакану, в який потім вливають 62 мл води (при кімнатній температурі 1 мл води важить приблизно 1 г). При приготуванні розчинів різних хімічних реагентів зручно використовувати масову концентрацію.

Масо-об'ємна відсоткова концентрація (г%) є відношенням кількості розчиненої речовини в грамах до 100 мл розчину. Розмірність цього виду відсоткової концентрації — г/мл (маса/об'єм). Наприклад, 10 г % розчин хлористого натрію містить 10 г солі в 100 мл розчину. Для його отримання наважку солі (10 г) вносять до мірного циліндра або мензурки і доливають водою до мітки. У випадку водних розчинів однаковою по чисельному позначенню масової і масо-об'ємної відсоткової концентрації відмінності в кількісному вмісті речовини в одиниці об'єму практично не виявляються, або ж ними можна знехтувати. Проте при використанні неводних розчинів, вони можуть бути вельми значними. Так, в 10 г% розчині жиру в тетрахлорметані або, що те ж саме, чотирихлористому вуглеці (рідини щільністю 1,6 кг/л) на 10 г жиру доводиться близько 90 мл розчинника, тоді як в 10% розчині - значно менше — 56 мл.

Об'ємна відсоткова концентрація (об%, або ° — градус) - відношення вираженого одиницями об'єму (мл) кількості розчиненої речовини до 100 мл розчину. Розмірність цього виду відсоткової концентрації - мл/мл (об'єм/об'єм). Наприклад, 5 об% (5°) розчин етилового спирту містить 5 мл абсолютного (безводного) спирту і 95 мл води. Слід мати на увазі, що при змішуванні різних рідин, що нескінченно розчиняються один в одному (як, наприклад, у разі спирту і води), кінцевий об'єм розчину може складати менше 100 мл.

Об'ємно-масова (об'ємно-вагова) відсоткова концентрація, що відображає кількість мл речовини, що міститься в 100 г розчину, рідко використовується в клініко-лабораторній практиці.

Багато хімічних реактивів отримуються у вигляді кристалогідратів. Готувати з них відсоткові розчини можна двома способами.

1-й спосіб (точний). Заздалегідь розраховують масову (вагову) кількість кристалогідрату, в якому міститься зазначена кількість речовини. Наприклад, потрібно приготувати 5% розчин сірчанокислої

міді з кристалогідрату цієї речовини. Для визначення необхідної наважки виходять з того, що на одну молекулу сірчаноокислої міді доводиться п'ять молекул води, а молекулярна маса кристалогідрату сірчаноокислої міді складає 245 г (155 г доводиться на чисту сіль і 90 (18

• 5) – на воду). Шляхом вирішення пропорції:

245 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ містить 155 г CuSO_4

X г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 5 г CuSO_4

знаходять необхідну наважку кристалогідрату (X):

$$x = \frac{5 \cdot 245}{155} = 7,90.$$

На етикетці бутля, в якому зберігається такий розчин, повинно бути написано: «5% (або 5 г%) розчин CuSO_4 ». Це означає, що в 100 г (або 100 мл) розчину міститься 5 г сірчаноокислої міді, а не її кристалогідрату.

2-й спосіб (умовний). Часто, готуючи відсоткові розчини, ведуть розрахунок виходячи з маси кристалогідрату. Наприклад, для приготування 5% розчину мідного купоросу ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) зважують 5 г препарату і підливають до цієї його кількості воду до об'єму 100 мл. По суті такий розчин CuSO_4 не є п'ятивідсотковим. На етикетці посуду, в якому він зберігається, має бути напис:

5% (або 5 г%) розчин $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

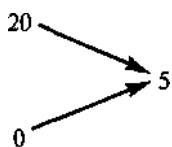
Слід мати на увазі, що неправильне зберігання препаратів кристалогідратів (зокрема, із-за поганої герметичності посуду) може призводити до поступового виходу кристалізаційної води з кристалічної решітки (вивітрювання). При цьому частина речовини, особливо на поверхні кристалів, переходить в аморфний стан. Такий реактив не придатний для приготування розчинів ні першим, ні другим способом. В даному випадку потрібно заздалегідь перекристалізувати його (тобто відновити кристалічну структуру реагенту) або, якщо це дозволяють хімічні властивості речовини, прожарити, перевівши його, таким чином, в аморфний стан.

Оскільки відповідно до вимог Міжнародної системи одиниць як одиниця маси і об'єму розчину використовуються «кг» і «л» відповідно, то для отримання необхідних показників окремих видів відсоткової концентрації, потрібно помножити на 10. При цьому масова (вагова) і об'ємна відсоткова концентрація перетворюються в масове і об'ємне відношення з розмірністю г (кг) /кг, мл (л) /л, а масо-об'ємна (ваго-об'ємна) відсоткова концентрація — в масову концентрацію з розмірністю г (кг) /л.

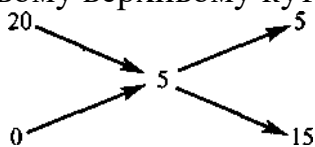
Розчини. Розрахунки та приготування розчинів приблизної концентрації та їх зберігання.

Для приготування неточних розчинів використовуються аптекарські, технічні (техно-хімічні) ваги і неточний мірний посуд (циліндри, мензурки). У випадку, якщо виникає потреба в отриманні приблизних розчинів шляхом розбавлення більш концентрованих, можна скористатися простим і швидким способом, визначуваним правилом «хреста».

Наприклад, необхідно розбавити 20% (200 г/л) розчин сірчаноокислого амонія до 5% (50 г/л). Складають перший запис:



де 20 — показник концентрації узятого розчину, 5 — показник необхідної концентрації і 0 - вода. Від 20 віднімають 5 і набуте значення записують в правому нижньому кутку. Від 5 віднімають 0 і записують цифру в правому верхньому кутку. Після цього схема набирає вигляду:



Це означає, що для отримання 5% розчину потрібно 5 об'ємів 20% розчину змішати з 15 об'ємами води.

Якщо змішувати два початкові розчини однієї і тієї ж речовини для отримання розчину проміжної концентрації, то з схеми усувається «0».

Точні розчини характеризуються розмірністю *молярної* (моль/л), *моляльної* (моль/кг), *нормальної* (г.екв/л, вал/л) *концентрації і титру* (Т). Для отримання розчинів точної концентрації застосовують початкові речовини кваліфікації «х.ч.», що строго відповідають своїй хімічній формулі, стійкі до дії світла і води, негігроскопічні, невзаємодіючі з вуглекислим газом повітря, мають велику молекулярну масу (ця обставина дозволяє звести до мінімуму технічну помилку зважування); фіксанали; точний мірний посуд і ваги для дуже точного зважування (аналітичні, напівмікрохімічні, мікрохімічні). Оскільки не завжди вдається отримати точний розчин потрібної концентрації шляхом розчинення приготованої навважки речовини або вмісту деяких ампул (фіксаналів), його доводиться перевіряти шляхом титрування, знаходити коефіцієнт похибки і при необхідності виправляти.

Питання до підготовки:

1. Ознайомитися з поняттями розчинів.
2. Вивчити способи вираження концентрації розчинів.
3. Навчитися виправляти концентрацію розчинів.
4. Правила приготування розчини точної концентрації.
5. Перехід від одного способу вираження концентрації до іншого.
6. Основні поняття про розчини.
7. Способи вираження концентрації розчинів: відсоткова концентрація, молярна доля, молярність, нормальність, моляльність, титр.
8. Техніка приготування розчинів:
 - а) розбавлених ;
 - б) точних;
 - в) молярних;
 - г) нормальних;
 - д) стандартних
 - е) з фіксаналів

Самостійна аудиторна робота

1. Що таке розчин?

2. Які види рідких розчинів Ви знаєте?

3. Які види дисперсних систем Ви знаєте?

4. Що таке розчинність і як вона виражається?

5. На які види поділяють розчини за точністю виразу концентрації?

6. Що таке масова концентрація, масове і об'ємне відношення?

7. Розмірність яких розчинів виражають масовою концентрацією, масовим і об'ємним відношенням?

8. Способи вираження концентрації розчинів:

Відсоткова концентрація _____

Молярна доля _____

Молярність _____

Нормальність _____

Моляльність _____

Титр _____

9. Вирішити задачі:

1. Маєте ненасичений розчин нітрату калію. Укажіть 3 способи як можна приготувати насичений розчин.

2. Маєте насичений розчин хлориду калію, при $t\ 10^\circ$ Напишіть 2 способи, за допомогою яких можна приготувати ненасичений розчин.

3. Для розчинення $84\text{ г SrCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ при $t\ 15^\circ$ треба 100 г води. Розрахуйте розчинність хлориду стронція (безводна сіль)

4. Розрахуйте кількість нітрату натрію, котрий потрібно розчинити у 800 г води, для приготування 20% розчину.

5. Розрахуйте кількість оцтового ангідриду, котрий потрібно розчинити у 949 г води, для приготування 6% розчину оцтової кислоти.

6. 1 л насиченого розчину CaSO_4 вміщує 2 г солі. Знайдіть молярну, моляльну концентрації та масову частку (%) розчину. Прийняти $\rho=1\text{ г/мл}$.

7. Визначте кількість грамів сульфатної кислоти в 100мл 5М розчину густиною 1,29г/мл.

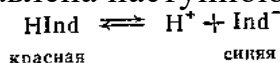
ТЕМА 10. МЕДИЧНІ ВИМІРЮВАЛЬНІ ПРИЛАДИ, ЇХ БУДОВА, ЇХ ПРИЗНАЧЕННЯ, ПІДГОТОВКА ДО РОБОТИ.

Дія рН-метра засноване на вимірі величини ЕРС електродної системи, яка пропорційна активності іонів водню в розчині - рН (водневого показника). Вимірювальна схема по суті являє собою вольтметр, проградуирований безпосередньо в одиницях рН для конкретної електродної системи (зазвичай вимірювальний електрод - скляний, допоміжний - хлорсрібний).

Визначення рН середовища в ході якісного аналізу

Для більшості аналітичних реакцій рН середовища має важливе значення, і в процесі аналізу його часто доводиться визначати. Існують різні методи визначення рН. Точні методи досить складні і вимагають спеціальної апаратури, а тому мало придатні для якісного аналізу, де не потрібна точність визначення, що перевищує одиницю рН (часто дозволяється ще менша точність). Тому в якісному аналізі користуються виключно колориметричним методом, заснованим на застосуванні реагентів, які змінюють забарвлення, залежно від концентрації іонів водню. Такі реагенти (наприклад, лакмус) називаються кислотно-основними індикаторами. Вони є слабкими органічними кислотами або основами, недисоційовані молекули і іони яких мають різне забарвлення. Лакмус містить так звану азолитмінову кислоту, недисоційовані молекули якої червоного, а аніони синього кольору.

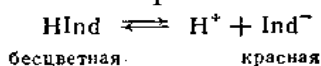
Якщо умовитися будь-яку індикаторну кислоту позначати через HInd, а її аніони — через Ind⁻, то іонізація лакмусу в розчинах може бути представлена наступною схемою:



При розчиненні лакмусу у воді (або в будь-якому нейтральному розчині) молекули його HInd, присутні спільно з аніонами Ind⁻ додадуть розчину проміжне, тобто фіолетове забарвлення. Якщо до цього розчину додати трохи якої-небудь кислоти, то рівновага зміститься вліво. Іншими словами, введені з кислотою H⁺-іони зв'яжуть аніони Ind⁻, що майже всі були в розчині, в неіонізовані молекули HInd, і розчин забарвиться в червоний колір. Якщо до нейтрального розчину лакмусу додати луг, то її

ОН⁻-іони пов'язуватимуть Н⁺-іони індикатора з утворенням неіонізованих молекул Н₂О. В результаті реакція, що виражає рівновагу іонізації індикатора, зміститься вправо, тобто у бік накопичення аніонів Ind⁻, і розчин окраситься в синій колір.

Зміна забарвлення інших індикаторів пояснюється аналогічно. Наприклад, у фенолфталеїну неіонізовані молекули безбарвні, а аніони забарвлені в червоний колір:



Отже, від лугів фенолфталеїн повинен забарвлюватися в червоний колір, а від кислот — обезбарвлюватися.

Збільшення кислоти або лугу, очевидно, змінює рН розчину, з чим і пов'язана зміна забарвлення розглянутих індикаторів. Вивчення цього питання показало, що зміна забарвлення відбувається усередині визначеного, характерного для даного індикатора інтервалу значень рН, визначеного межами переходу індикатора. Так, лакмус при будь-яких значеннях рН, менше 5, має абсолютно однакове червоне забарвлення. При збільшенні рН вище 5 забарвлення починає помітно змінюватися і при рН 8 стає яскраво-синім. Потім, як би не підвищувався рН, тобто скільки б лугу не додавали до розчину, забарвлення його залишається таким же синім, як і при рН= 8. Інтервал рН, рівний 5—8, є межею переходу лакмусу. У інших індикаторів межа переходу відповідає іншим значенням рН. Наприклад, область переходу фенолфталеїну відповідає рН=8-10; при рН = 8 цей індикатор безбарвний, а при рН = 10 має інтенсивно червоне забарвлення. Усередині ж межі переходу спостерігається поступове почервоніння первинно безбарвного розчину, яке при рН=10 досягає найбільшої інтенсивності.

Простим способом визначення реакції розчину є випробування його розчином лакмусу або лакмусовим папером. Лакмусовий папір є смужкою фільтрувального паперу, просоченою розчином лакмусу, який заздалегідь підфарбовують додаванням дуже малої кількості кислоти («червоний лакмусовий папір») або лугу («синій лакмусовий папір»). Якщо при нанесенні на синій лакмусовий папір краплі досліджуваного розчину вона червоніє, то реакція розчину кисла (рН = 5). Те, що червоний лакмусовий папір синіє від краплі досліджуваного розчину показує, що він має лужну реакцію (рН = 8). Якщо ні той, ні інший папір не змінюють забарвлення під впливом досліджуваного розчину, то його вважають за нейтральний (рН=7).

Це залежить від відмінностей в значеннях констант іонізації різних індикаторних кислот (або основ).

Іноді такого приблизного визначення реакції розчину достатньо. Проте у ряді випадків дуже важливо мати точніше уявлення про значення рН розчину. Для цього застосовують не один, а декілька різних індикаторів, області переходу яких відповідають різним значенням рН.

Разом з лакмусом можна застосовувати наступні індикатори:

- Тимоловий синій (рН=1,2=2,8)

- Тимоловий червоний - жовтий; (рН=8,0-9,6);
- Метилловий оранжевий (рН 3,0—4,4, рожевий, — оранжевий)
- Метилловий червоний (рН 4,4—6,2, червоний, — жовтий)
- Феноловий червоний (рН 6,8—8,0, жовтий, — червоний)
- Фенолфталеїн (рН 8,2—10,0, безбарвний— червоний)

Окрім цих п'яти індикаторів можна застосовувати також наступні два:

- Метилловий фіолетовий (рН = 0,5-3, зелений - фіолетовий; рН = 1,5, синій)
- Тимолфталеїн (рН = 9,4—10,6, безбарвний - синій)

Зіставляючи дію досліджуваного розчину на різні індикатори (або просочений їх розчинами папір), неважко приблизно (з достатньою для якісного аналізу точністю) визначити рН досліджуваного розчину.

Хай, наприклад, при змішуванні краплі досліджуваного розчину з краплями розчинів індикаторів отримані наступні забарвлення:

| Індикатор | Забарвлення |
|---------------------------|----------------------|
| Тимоловий синій | Жовте |
| Метилловий оранжевий | Оранжеве (або жовте) |
| Метилловий червоний | Жовте |
| Феноловий червоний | Жовте |
| Фенолфталеїн | Не забарвився |

На підставі цих результатів можна зробити наступний висновок.

Жовте забарвлення тимолового синього указує на те, що рН розчину лежить в межах 2,8 - 8,0. Відсутність почервоніння фенолфталеїну підтверджує, що значення рН не перевищує 8,0. Оранжеве забарвлення метилового оранжевого свідчить про те, що рН = 4,4, а жовте забарвлення метилового червоного - про те, що рН = 6,2. Але оскільки феноловий червоний забарвився в жовтий колір, рН має бути менше 6,8. Отже, значення рН лежить в межах 6,2—6,8, тобто рН = 6,5. Застосовувати для випробування всі індикатори, як видно, доводиться не завжди.

Тимоловий синій має дві межі переходу. При рН = 1,2 і менш забарвлення його червоне; при підвищенні рН до 2,8 він переходить в жовтий і залишається таким аж до рН = 8,0. При подальшому збільшенні рН індикатор поступово синіє і залишається синім, починаючи з рН = 9,6.

При невеликих концентраціях індикатора забарвлення метилового оранжевого при рН = 4,4 - жовте.

Якщо який-небудь індикатор дає не одне зі своїх крайніх забарвлень, а проміжне між ними, це означає, що рН розчину лежить в межах області переходу даного індикатора. Наприклад, якщо замість жовтого або синього забарвлення тимоловий синій дав зелене забарвлення, що виходить при їх оптичному щільності, можна зробити висновок, що рН має проміжне значення між 8,0 і 9,6, тобто близьке 9. Той же висновок можна зробити і при отриманні блідо-рожевого забарвлення фенолфталеїну замість яскраво-червоного.

Замість описаного вище набору індикаторів зручніше користуватися так званими «універсальними індикаторами»; це суміші окремих індикаторів, що змінюють забарвлення в широкому інтервалі рН.

Наприклад, один з універсальних індикаторів є сумішшю п'яти різних індикаторів і міняє забарвлення в інтервалі рН 2 - 10 таким чином:

| рН | Забарвлення |
|-------------|------------------|
| 2 (і менше) | червоно-рожеве |
| 3 | червоно-оранжеве |
| 4 | оранжеве |
| 5 | жовто-оранжеве |
| 6 | лимонно-жовте |
| 7 | жовто-зелене |
| 8 | зелене |
| 9 | синє-зелене |

Індикатор можна застосовувати або у вигляді розчину, краплю якого змішують на краплинній пластинці з 1-3 краплями досліджуваного розчину, або у вигляді індикаторного паперу, просоченого розчином універсального індикатора і висушеною. До пачки паперу додається кольорова шкала, що показує, яке забарвлення приймає папір при різних величинах рН. Визначення рН за шкалою надзвичайно просте. Якщо шкала відсутня, корисно мати серію буферних розчинів і паралельно з досліджуваним розчином діяти універсальним індикатором на ці розчини.

Користуючись складнішими прийомами, можна визначати колориметрично рН розчинів з точністю приблизно до 0,2 одиниць рН.

При тлумаченні результатів визначення рН розчинів слід враховувати, що дистильована вода, що вживається для їх приготування, не абсолютно чиста, але містить CO_2 , що поглинається з повітря, а також речовини з скла посудин, наприклад Na_2SiO_3 . Унаслідок цього рН дистильованої води, визначеної на досліді, не відповідає теоретичному значенню 7; він зазвичай декілька менше (рН = 5-6). Якщо на такій воді готувати, розчини нейтральних солей, подібних NaCl , KNO_3 і т. п., то і їх рН опиняться не рівними 7, а відповідатимуть рН води (тобто рН = 5-6).

Щоб отримати розчини цих солей строго нейтральними: необхідно користуватися або водою, нейтралізованою до рН=7, або водою, з якої CO_2 видалений шляхом тривалого кипіння. Щоб вода знову не поглинула CO_2 при охолодженні, посудину, що містить її, після кипіння закривають пробкою, крізь яку пропущена трубка з натронним вапном (прожарена: суміш NaOH з Ca). Проходячи через цю трубку, повітря очищається від CO_2 ; двоокис вуглецю поглинається NaH і Ca , утворюючи тверді з'єднання Na_2CO_3 і CaCO_3 . Так само слід захищати, від CO_2 і розчинів солей, якщо хочуть, щоб рН їх відповідав теоретичному значенню 7. Потрібно врахувати також, що при тривалому зберіганні розчинів, рН їх може підвищуватися завдяки витяганню водою з скла судини розчинних силікатів, що мають

унаслідок гідролізу лужну реакцію. Щоб попередити вилуговування, стінки посудини зсередини покривають шаром парафіну.

На практиці до всіх цих запобіжностей, що дуже ускладнюють роботу, доводиться вдаватися рідко, оскільки в більшості випадків вони не дають особливих переваг. Потрібно тільки пам'ятати, що експериментально визначальне значення рН нейтральних розчинів може не відповідати теоретичному значенню рН 7.

Оптичні методи кількісного аналізу речовин.

Фотоелектроколориметрія

До оптичних методів кількісного аналізу, які використовуються у клінічних лабораторіях, відносять методи, які засновані на вимірюванні інтенсивності світла, що поглинається, випромінюється, відбивається або розсіюється.

Оптичні методи кількісного аналізу

До оптичних методів кількісного аналізу, які використовуються у клінічних лабораторіях, відносять методи, які засновані на вимірюванні інтенсивності світла, що поглинається, випромінюється, відбивається або розсіюється.

До цих методів відносяться:

1. Атомно-абсорбційний аналіз
2. Молекулярний абсорбційний аналіз
3. Турбидиметрія
4. Нефелометрія
5. Люмінесцентний (флуоресцентний) аналіз
6. Полум'яна фотометрія
7. Рефрактометрія
8. Поляриметрія

У свою чергу з методів молекулярного абсорбційного аналізу, при якому світло поглинається молекулами аналізованої сполуки, найбільше поширення набули фотометричні методи до яких відносять фотоколориметрію та спектрофотометрію.

При фотоколориметричному аналізі вимірюється світлопоглинання, але тільки у видимій області спектру, при цьому використовується монохроматичне випромінювання.

При спектрофотометричному аналізі вимірюється світлопоглинання в УФ ($\lambda=10-400$ нм), видимій (400-760 нм) або ІЧ (760-10000 нм) областях спектру при строго зазначеній довжині хвилі (монохроматичне випромінювання), яка відповідає максимуму кривої поглинання даної сполуки.

Фотоелектроколориметрія

В основі колориметричного методу аналізу лежать реакції утворення або руйнування забарвлених сполук, тобто сполук, які здатні поглинати

світло. При утворенні забарвленої сполуки кількість продукту реакції пропорційна інтенсивності забарвлення; руйнування забарвленої сполуки характеризується зменшенням інтенсивності забарвлення, пропорційним кількості продукту реакції.

Колориметричне визначення складається з двох основних етапів: утворення (або руйнування) забарвленої сполуки і вимірювання інтенсивності забарвлення.

Основним у колориметричному визначенні є хімічна реакція. Від вибору хімічної реакції залежать час, витрачений на аналіз, чутливість і точність методу. Той чи інший спосіб вимірювання інтенсивності забарвлення, хоч і має велике значення, але він зумовлений загальними умовами роботи лабораторії.

Колориметричні методи застосовуються для визначення вмісту малих кількостей різних речовин ($1 \cdot 10^{-4}$ — $1 \cdot 10^{-6}$ г в об'ємі 50—100 мл). Такі кількості не можна визначити ваговим та об'ємним методами. Застосовується колориметричний аналіз і для визначення порівняно великого вмісту речовин.

Колір забарвлених розчинів залежить від нерівномірного поглинання світла різної довжини хвилі. Для характеристики кольору розчину користуються спектрами поглинання, або кривими поглинання, які характеризують розподіл поглинальної здатності розчину залежно від довжини хвилі. Знаючи спектр поглинання, можна вибрати максимально чутливу довжину хвилі для вимірювання оптичної густини розчину (інтенсивності забарвлення). Найкращим для колориметричного визначення є вузький спектр поглинання, тому що в цьому випадку оптичну густину речовини можна вимірювати навіть у присутності інших забарвлених сполук.

Визначення концентрації сполуки у розчині фотометричними методами засновується на вимірюванні оптичної густини розчину або самої сполуки, якщо вона поглинає електромагнітне випромінювання в УФ- чи видимій області спектру, або продукту реакції після проведення фотометричної реакції, якщо сполука не має оптичного поглинання.

Фотоколориметри (ФЕКи). Прилади, якими вимірюють інтенсивність забарвлення за допомогою фотоелементів, називають фотоколориметрами. Вони призначені для заміру коефіцієнтів поглинання або пропускання прозорих середовищ у видимій області спектру. Принцип роботи приладів полягає у замірі співвідношення двох світлових потоків, повного та який пройшов крізь кювету з розчином, методом пропорціональних відхилень. Найбільш розповсюдженими являються дві принципові схеми ФЕКів:

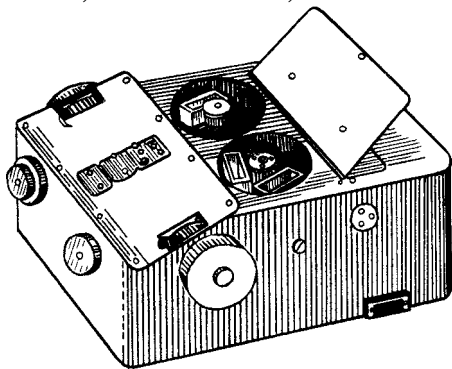
1. Фотоколориметри однолучові з одним фотоелементом (КФО, КФК - 2). Фототек вимірюють у них безпосередньо по відхиленню стрілки гальванометру

2. Фотоколориметри дволучові з двома фотоелементами

. У цих фотоколориметрах вимірюють різницю фотострумів у двох фотоелементах, на які падає світло, пройшовши крізь кювети з

досліджуваним розчином і розчином порівняння. Фотоелементи сполучені між собою за принципом протитечії, гальванометр показує різницю фотострумів. Якщо інтенсивність забарвлення обох розчинів (досліджуваного і порівняння) однакова, то на обидва фотоелементи падає світло однакової інтенсивності, фотоструми двох елементів компенсуються і стрілка гальванометра не відхиляється.

У хімічних лабораторіях поширені фотоколориметри ФЭК-М, ФЭК-Н-57, ФЭК-Н-56, КФК.



Загальний вигляд фотоколориметра ФЭК-Н-57.

Кожний фотоколориметр випускається з інструкцією користування, де подається схема приладу і описані правила роботи з ним. Усі вони мають: джерело світла, світлофільтри, кювети, фотоелементи, системи регулювання опору та гальванометр.

Побудова колориметричної кривої

При визначенні концентрації сполуки у розчинах можуть застосовуватися калібровочні (градуировочні) графіки або вони ще називаються колориметричні криві. Будуються вони у такій спосіб.

Готують ряд розчинів даної сполуки з відомими концентраціями, які різняться між собою не менш ніж на 30%.

Потім заміряють оптичну густину усіх розчинів та будують калібровочний графік, в якому на осі X – відкладають відомі концентрації сполуки, а на осі Y – відповідну їм значення оптичної густини.

Далі заміряють оптичну густину розчину, що досліджується, та за графіком знаходять концентрацію сполуки у розчині.

Питання для підготовки:

1. Поняття про буферні розчини.
2. Розрахунки для приготування буферних розчинів з зазначеним рН середовища.
3. Будова та принцип дії рН-метрів.
4. Визначення рН середовища зазначеного буферного розчину.
5. Атомно-абсорбційний аналіз
6. Молекулярний абсорбційний аналіз
7. Турбидиметрія
8. Нефелометрія
9. Люмінесцентний (флуоресцентний) аналіз

10. Полум'яна фотометрія
11. Рефрактометрія
12. Поляриметрія
13. Визначення концентрації сполуки у розчині.
14. Вибір світлофільтрів.
15. Вибір кювет.
16. Визначення концентрації сполуки на основі вимірювання оптичної густини розчину одним з декількох відомих способів.

Самостійна аудиторна робота

1. Фотоелементи – як важливіша складова частина фотоколориметрів. Недоліки фотоелементів.

2. Характеристика та принцип підбору світлофільтрів.

3. Принцип вибору кювети.

4. Фотометричні методи визначення концентрації сполук у розчинах:

5. Метод порівняння оптичної густини стандартного та розчинів досліджування;

6. Метод калібрувального графіка;

7. Метод розрахунку за допомогою молярних або питомих коефіцієнтів поглинання.

8. Фотоколориметрія. Сутність методу.

9. Способи визначення концентрації речовин у фотоколориметрії.

10. Спектрофотометрія. Сутність методу.

11. Види спектрофотометричних визначень, визначення концентрації, переваги перед фотоколориметрією, можливості методу, застосування в аналізі.

16. Люмінесцентний метод аналізу. Флюориметрія. Сутність методу.

17. Способи визначення концентрацій, можливості методу, застосування в аналізі.

18. Заповніть таблицю

III Метод розрахунку за допомогою молярних або питомих коефіцієнтів поглинання на основі основного закону світлопоглинання

ТЕМА 11. МЕТОДИ ОБ'ЄМНОГО АНАЛІЗУ. ТИТРОМЕТРІЯ.

Титриметричний (об'ємний) аналіз ґрунтується на точному вимірюванні кількості реагента, який витрачено на реакцію з визначуваною речовиною. Титрування - це процес, в якому до розчину визначуваного інгредієнта поступово малими порціями (краплями) додають розчин реагенту (титранту), доки не буде досягнута точка еквівалентності. Отже, відтитрувати розчин - це означає встановити кількості проби і титранта, в яких вони еквівалентні один одному. Момент титрування, коли кількість доданого титранта хімічно еквівалентна кількості титрованої речовини, називають точкою еквівалентності. Отже, щоб використати реакцію в титриметричному аналізі, необхідне фіксування точки еквівалентності.

Методи аналізу речовин засновані на особливостях хімічної подібності і відмінності речовин в сумішах. В більшості випадків речовину для аналізу спочатку переводять в розчин, а тоді визначають в нім окремі компоненти. Аналіз в розчинах раніше називався «Мокрим методом» у відмінності від «сухого», в якому усі операції аналізу проводять з сухими речовинами.

Наявність того або іншого компоненту можна визначити, не переводячи досліджувану речовину в розчин. Для визначення іона Na^+ невелику кількість сухої речовини вносять на платиновому дроті в безбарвне полум'я. Якщо в дослідній речовині містяться іони натрію, то полум'я забарвлюється в жовтий колір. Іон калія забарвлює полум'я у фіолетовий колір.

Для хімічного аналізу речовин беруть різну кількість досліджуваного розчину і відповідно – різну кількість реактивів. Метод аналізу, для якого беруть 0,1 — 1 г речовини, називається макрометодом, якщо використовується менше 0,01 г, то – мікрометодом. Проміжний метод аналізу називається напівмікрометодом.

В більшості випадків користуються напівмікрометодом. Існує і ультрамікрометод, коли для аналізу беруть дуже маленьку кількість речовини, а зовнішній ефект реакції спостерігають під мікроскопом.

Для проведення реакції можна використовувати одну або декілька крапель розчинів дослідних речовин на смужках фільтрувального паперу або на годинниковому склі. Такий метод називається краплинним.

Для відкриття того або іншого іона можна використовувати реакції, в результаті яких утворюються кристали певної форми. Такий метод називається мікрокристалоскопічним.

До електрохімічних методів аналізу відноситься потенціометричний аналіз. Суть його полягає у визначенні вмісту іонів за допомогою вимірювання електрохімічного потенціалу електроду, зануреного в досліджуваний розчин.

Кількісний аналіз — це сукупність хімічних і фізичних методів визначення відносної кількості елементів, іонів або хімічних сполук в досліджуваних речовинах. Методи кількісного аналізу базуються на низці теоретичних положень: закономірностях процесів кристалізації і утворення важкорозчинних речовин, явищах осадження, окислювально-відновних процесах, способах використання комплексних сполук для аналітичних визначень і таке інше.

Хімічні методи аналізу засновані на хімічних реакціях. У фізичних методах аналізу хімічні реакції можуть зовсім не використовуватися або мати другорядне значення. Найбільш поширеними хімічними методами аналізу є гравіметричний (ваговий), титриметричний (або об'ємний), колориметричний і полярографічний.

Перша група методів кількісного хімічного аналізу включає методи, в основу яких покладено вимірювання показника особливостей продукту реакції (Р). Сюди відносяться гравіметричний і колориметричний аналізи.

У гравіметричному аналізі вимірюють масу продукту реакції. Суть вагового аналізу полягає в тому, що складову частину досліджуваної речовини відокремлюють осадженням у вигляді важкорозчинної сполуки відомого складу і потім зважують.

Підрозділом гравіметричного аналізу є електроваговий, де «реактивом» служить електричний струм.

У основі колориметричного методу аналізу лежать реакції утворення або руйнування забарвлених сполук, які здатні поглинати світло. При утворенні забарвлених сполук кількість продукту реакції пропорційна інтенсивності забарвлення. Руйнування сполуки характеризується зменшенням інтенсивності забарвлення, пропорційно кількості продукту реакції.

Гравіметричний і колориметричний методи відрізняються між собою застосованою апаратурою (ваговий метод — терези, колориметричний — фотоелектроколориметри різних систем). Але між обома методами є багато спільного — в обох випадках вимірюють особливість продукту реакції Р.

Друга група методів кількісного хімічного аналізу включає методи, в основі яких лежить вимірювання кількості реактиву, витраченого на

взаємодію з досліджуваним компонентом. До цієї групи відноситься титриметричний (об'ємний) аналіз з його типами.

Об'ємний аналіз об'єднує ряд методів, класифікація яких ґрунтується на різниці в типах хімічних реакцій, які лежать в основі методу, і різниці в способах встановлення точки еквівалентності.

За типом хімічної реакції виділяють такі методи об'ємного аналізу: метод кислотно-основного титрування (метод нейтралізації), метод осадження і комплексоутворення, метод окислення — відновлення, який, залежно від характеру реактиву, підрозділяється на перманганатометрію, йодометрію, хроматометрію.

За способом встановлення точки еквівалентності методи об'ємного аналізу класифікуються так: визначення з кольоровими індикаторами, методи потенціометричного визначення, кондуктометричні методи визначення, амперометричний метод визначення.

До третьої групи методів кількісного хімічного аналізу відносять хроматографічні методи, які ґрунтуються на вимірюванні змін особливостей самого компоненту X, обумовлених зв'язуванням його реактивом R в певну хімічну сполуку.

Окислювально - відновний метод титрування. Перманганатометрія. Розрахунки.

При титруванні окислювачів розчинами відновників або відновників розчинами окислювачів змінюється окислювально – відновний потенціал системи. Точку еквівалентності встановлюють за допомогою спеціальних індикаторів, які бувають різних типів.

Методи окислювально - відновного титрування

При титруванні окислювачів розчинами відновників або відновників розчинами окислювачів змінюється окислювально – відновний потенціал системи. Точку еквівалентності встановлюють за допомогою спеціальних індикаторів, які бувають різних типів.

1. Індикатором може бути робочий розчин реактиву, якщо він має власне забарвлення. Так, наприклад, робочі розчини перманганату калію, йоду можуть бути одночасно індикаторами. Перманганат калію забарвлений у фіолетовий колір; при титруванні розчину цієї сполуки в точці еквівалентності, коли весь відновник окислюватиметься, з'являється рожеве забарвлення при введенні невеликого надлишку перманганату. Такий же спосіб встановлення точки еквівалентності можна використовувати при титруванні розчином йоду.

2. Індикатором може бути сполука, яка дає специфічну кольорову реакцію з робочим розчином реактиву, яким титрують. Таким індикатором є крохмаль, який з йодом утворює комплекс синього кольору. Крохмаль є специфічним індикатором на йод; з іншими окислювачами він не утворює забарвлених сполук. Крохмаль є оборотним індикатором, тому що синє забарвлення зникає у присутності речовин, які відновлюють йод, і знову з'являється при додаванні йоду.

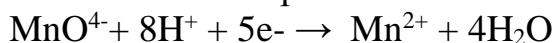
3. Індикатором може бути забарвлена органічна речовина, яка руйнується під дією надлишку окислювача. Таким індикатором є метилоранж при титруванні робочим розчином броміду калію KBrO_3 . Індикатори цього типу називаються необоротними.

4. Індикатором може бути забарвлена органічна речовина, яка змінює свій колір залежно від величини окислювально – відновного потенціалу системи. Це органічні речовини, які в окислювальних і відновних формах мають різний колір, причому перехід окислювальної форми у відновну є оборотним. Індикатором такого типу є дифеніламін і його похідні.

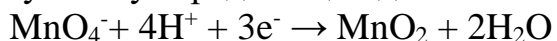
До окислювально-відновних методів відносяться перманганатометрія, йодометрія, броматометрія, хроматометрія і ін.

Перманганатометрія – метод об'ємного аналізу, в якому кількість речовини визначають титруванням перманганатом калію. Цей метод застосовується для визначення багатьох відновників: солі заліза, солі олова, ванадію, урану, марганцю і так далі. Перманганат калію може окислювати деякі органічні сполуки: спирти, альдегіди, оксикислоти та інші. При цьому, залежно від кислотного розчину, перманганат може відновлюватися до Mn^{4+} або Mn^{2+} .

У достатньо кислому середовищі відновлення перманганату калію здійснюється за таким рівнянням:



При меншій місткості водневих іонів, а також нейтральному, слаболужному середовищі відновлення відбувається за таким рівнянням:



Утворення оксиду марганцю утрудняє спостереження точки еквівалентності. Тому зазвичай використовують титрування відновника в сильнокислому середовищі.

Перманганат калію – це сильний окислювач (його нормальний окислювально-відновний потенціал в сильнокислому середовищі складає 1,528 в), тому з його допомогою можна визначити не тільки сильний відновник (Fe^{2+} , Sn^{2+} , Ti^{2+}), а також відновники середньої сили (V^{3+}).

Але з іншого боку, високий окислювально-відновний потенціал перманганату калію викликає певні ускладнення. Так, під час титрування солянокислих розчинів можуть відбуватися побічні реакції – окислення соляної кислоти до вільного хлору.

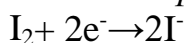
Перманганат калію не є початковою речовиною, тому що містить домішки діоксиду марганцю. Концентрація розчину перманганату калію змінюється з часом в результаті відновлення його під дією світла і різних органічних речовин, які потрапляють в розчин. Тому, розчин перманганату калію готують приблизно вмісту препаратів на технічних вагах, а потім встановлюють його точну нормальність по інших початкових речовинах (щавлевій кислоті).

Для кількісних визначень найчастіше користуються децинормальними розчинами (перманганат має обмежену розчинність у воді). Більш розведені розчини швидко розпадаються.

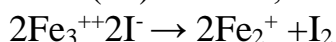
Індикатором в перманганометрії є сам робочий розчин реактиву. Точку еквівалентності встановлюють по рожевому забарвленню, яке виникає від зайвої краплі робочого розчину перманганату.

Йодометрія – це окислювально – відновний метод об'ємного аналізу, в основі якого лежить вимірювання кількості йоду, яка витрачається на окислення відновника або виділяється під час взаємодії окислювача з розчином іодида калію.

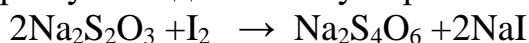
Основною реакцією методу є:



Ця реакція оборотна. Залежно від умов вона може здійснюватися як в прямому, так і у зворотному напрямі. Нормальний окислювально – відновний потенціал системи $I_2/2I^-$ дорівнює 0,54 в, тобто йод є окислювачем середньої сили. От чому вільний йод легко окислюється тільки сильним відновником, таким як хлорид олова (II). З іншого боку, сильні окислювачі окисляють іодиди до вільного йоду, наприклад, перманганат калію, дихромат калію, солі заліза (III) та інші, вони виділяють вільний йод з іодидів:



Остання реакція лежить в основі йодометричного визначення катіонів заліза. Таким чином, реакцію $I_2 + 2e^- \rightarrow 2I^-$ можна використовувати для визначення і відновників, і окислювачів. У першому випадку для титрування застосовують робочий розчин йоду, в іншому - розчин тіосульфату натрію, який реагує з йодом такому вирівню:

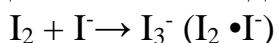


Особливістю йодометричного методу є незалежність двох основних реакцій методу від кислотності розчину. Те, що окислювально – відновний потенціал системи $I_2/2I^-$ не залежить від концентрації водневих іонів розчину, дає можливість йодометричне титрування проводити в широкому інтервалі рН.

Важливою особливістю йодометрії є висока точність встановлення точки еквівалентності. Індикатором в цьому методі є розчин крохмалю, який чутливий до йоду, з розведенням розчину останнього (0,00001н) утворюється синє фарбування.

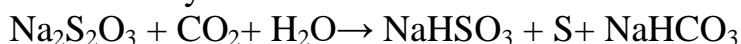
Препарат йоду, який буває у продажу, не відповідає вимогам, які ставляться до початкових речовин (містить вологу, домішки хлору, бромів і так далі), тому готують розчин йоду з очищеного препарату і встановлюють його нормальність титруванням розчином тіосульфату натрію, точну нормальність якого спочатку встановлюють по іншій початковій речовині.

Йод важко розчиняється у воді; його розчинність зростає у присутності іодида калію в наслідок утворення полійодиду:

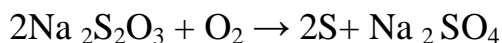


Щоб збільшити розчинність йоду, беруть 3-4-х кратний об'єм еквівалентної кількості йодиду калію проти еквівалентної кількості йоду. Розчини йоду, що титрують, потрібно зберігати в посуді з темного скла, оскільки в денному світлі вміст йоду в розчині поступово збільшується внаслідок окислення іодида калію киснем повітря до вільного йоду. При йодометричних визначеннях можна користуватися 0,05Nробочим розчином.

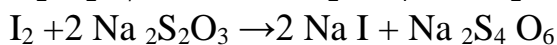
Тіосульфат натрію, за допомогою якого встановлюють нормальність розчину йоду, також не є початковою речовиною. Тіосульфат натрію кристалізується з п'ятьма молекулами води, але вода поступово випаровується, і дійсний склад солі перестає відповідати її хімічній формулі $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Розчин тіосульфату натрію змінюється з часом під впливом вуглекислого газу:



Тому розчин тіосульфату натрію потрібно захистити від проникнення вуглекислого газу хлоркальцієвою трубкою. Окрім цього, розчини мають здатність окислюватися киснем повітря:



На практиці готують розчин тіосульфату натрію і встановлюють його нормальність по дихромату калію, який є початковою речовиною. Встановлення нормальності робочого розчину тіосульфату по дихромату калію відбувається по такому рівнянню:



Кількість виділеного йоду, як видно з рівняння, еквівалентна кількості взятого дихромату калію, а між кількостями виділеного йоду і використаного на титрування тіосульфату, у свою чергу, існують також еквівалентні співвідношення. Таким чином, по нормальності та об'єму розчину дихромату і за об'ємом використаного на титрування розчину тіосульфату можна визначити нормальність останнього.

Питання до підготовки:

1. Методи окислювально-відновних досліджень (оксидиметрія)
 - а) Ацидиметрія;
 - б) Алкаліметрія;
 - в) Криві титрування;
 - г) Вибір індикаторів для різних випадків титрування.
2. Методи окислювально-відновних досліджень (оксидиметрія):
 - а) Перманганатометрія;
 - б) Йодометрія.
3. Сутність титриметричного (об'ємного) аналізу. Вимоги до реакцій, які використовують у титриметричному аналізі.
4. Класифікація методів титриметричного аналізу.
5. Загальні положення титриметрії.
6. Розчини, які використовують у титриметрії.

7. Розрахункові формули в титриметричному аналізі.

8. Мірний посуд.

9. Точність аналізу

Самостійна аудиторна робота

1. Які методи об'ємного аналізу Ви знаєте?

2. Закон еквівалентів. Крапка еквівалентності;

3. Основні поняття об'ємного аналізу:

Робочий розчин (титрант);

Досліджуваний розчин;

Титрування;

4. Які операції в роботі називаються титруванням? Що таке титр розчину?

5. Вимоги до реакцій, що висуваються в об'ємному аналізі.

6. Класифікація методів титриметричного (об'ємного) аналізу.

7. Методи комплексного аналізу (комплексометрія).

8. Вимоги до стандартної речовини.

9. Техніка титрування й визначення крапки еквівалентності.

10. Що є індикаторами методу нейтралізації? Як підібрати індикатор для визначення кінця титрування?

11. Що таке показник титрування індикатора?

12. Який індикатор необхідно використовувати при титруванні сильних лугів слабкими кислотами?

13. Який індикатор необхідно використовувати при титруванні слабких основ сильними кислотами?

14. Який індикатор необхідно використовувати при титруванні сильних основ сильними кислотами?

15. Типи бюреток. Підготовка бюреток до роботи. Зберігання бюреток.

16. Сутність та класифікація методів осаджувального титрування.

17. Вимоги до реакцій, що застосовуються в осаджувальному титруванні.

18. Аргентометрія. Класифікація аргентометричних методів аналізу.

19. Метод Мора. Приготування та стандартизація срібла нітрату, індикатори, умови визначення, можливості методу.

20. Аргентометрія. Метод Фольгарда. Сутність та можливості прямого та зворотного титрування. Приготування та стандартизація амонію тіоціанату,

індикатори, умови визначення, можливості методу.

21. Аргентометрія. Адсорбційні індикатори в аргентометрії. Метод Фаянса-Ходакова, його сутність, умови титрування, застосування в аналізі.

22. Меркурометрія. Сутність та умови меркурометричного метода аналізу. Приготування титранту, його стандартизація, умови визначення. Можливості методу, застосування в аналізі.

23. Сутність та класифікація комплексиметричних методів аналізу. Вимоги до реакцій в комплексиметрії.

24. Комплексонометрія. Сутність методу, титрант, його стандартизація.

25. Безіндикаторні методи аналізу.

26. Способи окислювально-відновного титрування - пряме, зворотне, спосіб заміщення.

27. Перманганатометрія. Сутність методу. Приготування та стандартизація титранту. Умови перманганатометричних визначень, можливості методу, застосування в аналізі.

28. Сутність йодометричного визначення окисників різної сили. Приготування та стандартизація натрію тіосульфату. Визначення кінцевої точки титрування, умови визначення, можливості методу.

29. Сутність йодиметричного визначення відновників. Приготування та стандартизація розчину йоду, індикатори методу. Умови визначення, можливості методу.

30. Броматометрія. Сутність методу. Приготування титранту, його стандартизація, індикатори методу. Умови броматометричних визначень, застосування в аналізі неорганічних та органічних сполук.

31. Нітритометрія. Приготування, стандартизація та зберігання натрію нітриту, індикатори методу. Умови нітритометричних визначень, застосування в аналізі неорганічних та органічних сполук.

32. Цериметрія. Сутність методу. Приготування та стандартизація титранту, визначення кінцевої точки титрування, можливості методу, застосування в аналізі.

33. Йодхлориметрія. Приготування та стандартизація титранту, визначення кінцевої точки титрування, можливості методу, застосування в аналізі.

34. Дихроматометрія. Сутність методу. Приготування титранту, визначення кінцевої точки титрування, можливості методу, застосування в аналізі.

ТЕМА 12. МІКРОСКОПИ Й ТЕХНІКА МІКРОСКОПУВАННЯ.

Цитологія це наука, яка вивчає клітини, їх будова, функціонування, процеси розмноження, старіння і смерті. А так же окремі клітинні структури, їх участь в загальноклітинними фізіологічних процесах, шляхи регуляції цих процесів, відтворення клітин і їх компонентів, пристосування клітин до умов середовища, реакції на дію різних факторів, патологічні зміни клітин.

Клінічне цитологічне дослідження - це оцінка характеристик морфологічної структури клітинних елементів в цитологічному препараті (мазку) для встановлення діагнозу доброякісної або злоякісної трансформації і непухлинних уражень. За допомогою мікроскопа оцінюються особливості будови клітин, клітинного складу органів, тканин, рідин організму людини в нормі і при патологічних процесах. Відмінність цитологічного дослідження від гістологічного полягає в тому, що вивчаються не зрізи тканин, а клітини; висновок ґрунтується на особливостях зміни ядра, цитоплазми, ядерно-цитоплазмових співвідношення, освіти структур і комплексів клітин. В даний час цитологічні дослідження широко застосовуються в клінічній діагностиці різних захворювань.

Цитологічний аналіз використовують при:

- При масових профілактичних оглядах;
- Для встановлення або уточнення діагнозу при будь-якому захворюванні;
- Для встановлення або уточнення діагнозу під час оперативного втручання;
- Для контролю над ефективністю лікування, як під час його проведення, так і після його завершення;
- Для своєчасного виявлення рецидивів (відновлення) будь-яких хвороб.

Матеріали для проведення дослідження можуть бути різними. Вибір способу їх отримання залежить від характеру ураження органів і тканин. Зазвичай під мікроскопом досліджують:

- мокротиння;
- сечу;
- Сік передміхурової залози;
- Цереброспінальну (отриману з спинномозкового каналу) рідина;
- Амніотичну рідину (навколоплідні води);
- Зіскрібки з різних поверхонь (наприклад, з шийки матки, з поверхні ран, виразок, деяких пухлин);
- Матеріал, який отриманий при проведенні ендоскопічного обстеження бронхів, шлунка, кишечника;
- Рідини з порожнин суглобів або серозних порожнин (черевної, плевральної, околосоердечної);
- Матеріал, отриманий при пункції різних органів (наприклад, молочної залози, лімфатичних вузлів);
- Відбитки з поверхні розрізу віддалених при операції органів.

На правильність кінцевих результатів цитологічного дослідження безпосередній вплив надає якість взятого на дослідження матеріалу, дотримання всіх правил його обробки, аж до забарвлення цитологічного препарату.

У нашій країні клінічна цитологія є розділом лабораторної діагностики в зв'язку з тим, що традиційно дослідження клітинного складу входить в комплекс клінічних лабораторних аналізів - кров, кістковий мозок, ексудати, виділення різних органів. Важлива роль належить цитологічним дослідженням при масових профілактичних оглядах, особливо, груп з підвищеним ризиком злякисних новоутворень. Рання та своєчасна діагностика пухлин при скринінгу організаційно складається з двох етапів:

1. Масове обстеження населення (скринінг всієї популяції або тільки груп підвищеного ризику) для виявлення пухлин або ознак, що не дозволяють виключити пухлину.

2. Уточнювальна діагностика в відібраних під час скринінгу випадках, в порівняно невеликих групах.

На 1-му етапі основною вимогою до цитологічному дослідженню як скринінг-тесту є висока чутливість (тобто висока частота виявлення клітин пухлини у хворих із злякисними новоутвореннями і низьке число так званих «помилково негативні» результатів) при одноразовому дослідженні матеріалу. Цитологічне дослідження мазків з шийки матки є високоефективним скринінг-тестом по раку цієї локалізації, бо приблизно в 10 разів підвищує виявлення пухлин в порівнянні з візуальним обстеженням; при цьому значно збільшується откосітельная частота виявлення раку в ранніх і доклінічних стадіях процесу.

На 2-му етапі ранньої діагностики пухлин, поряд з необхідністю високої чутливості, до цитологіческому методу ставиться вимога вькокой специфічності (тобто низьке число так званих «хибнопозитивних» діагнозів злякисного новоутворення

Вимоги до забезпечення безпеки праці медичного персоналу при цитологічному дослідженні

Вимоги з безпеки праці при виконанні технології відповідають загальним правилам безпеки при роботі в клініко-діагностичної лабораторії згідно. ISO 15189 - Вимоги до медичних лабораторій.

Повинні дотримуватися правила біологічної безпеки, правила збору і видалення відходів, правила роботи з електроприладами та реактивами, пожежної безпеки.

Вимоги біологічної безпеки.

Всі зразки, що містять біологічний матеріал (аспірат, мазки), є джерелами інфекції. Для дотримання біологічної безпеки виконують такі правила:

а) розпакування надісланого в цитологічну лабораторію біологічного матеріалу проводиться в індивідуальних засобах захисту (халати, гумові рукавички);

б) мазки, що надходять в лабораторію, поміщають на металеві або пластикові підноси;

г) не допускається залишати на столах нефіксовані мазки;

д) після закінчення роботи співробітники повинні проводити дезінфекцію робочих місць і приміщень лабораторії в гумових рукавичках. Для знезараження використовуються кошти, що забезпечують знищення вірусної і бактерійної флори, що рекомендуються для дезінфекції [2, 3].

Потенційно небезпечні відходи, забруднені залишками біологічного матеріалу, що утворюються в процесі виконання технології, дезінфікують, потім збирають у герметичну одноразову упаковку і видаляють з лабораторії в контейнерах, встановлених в певних місцях на території установи.

Всі співробітники повинні виконувати інструкції і правила техніки безпеки, викладені в технічних паспортах до електричних приладів, що застосовуються при дослідженні: електронних ваг, мікроскопу. Всі співробітники лабораторії, що працюють з хімічними реактивами, повинні бути навчені поводженню з ними, використовувати засоби індивідуального захисту, дотримуватися правил особистої гігієни.

Для попередження пожеж необхідно дотримуватися правил пожежної безпеки у відповідності до діючих нормативних документів.

Правила роботи з мікроскопом

Мікроскоп необхідно утримувати в чистоті і обережати від пошкоджень. В неробочому стані мікроскоп повинен бути накритий чохлам.

Особливу увагу слід звертати на чистоту об'єктивів і інших оптичних деталей.

УВАГА! Не можна торкатися пальцями поверхонь лінз. Для запобігання оптичних деталей візуальної насадки від пилу слід залишати окуляри в тубусах або надягати на них ковпачки.

Оптичні поверхні окулярів, об'єктивів і конденсора можна обережно протирати чистою ватою, повернути на дерев'яну паличку і змоченою спеціальною рідиною для чищення оптичних деталей.

При забрудненні внутрішніх поверхонь лінз об'єктива необхідно об'єктив відправити для чищення в оптичну майстерню.

УВАГА! Забороняється самим розбирати об'єктиви, окуляри, конденсор.

Розглянемо найважливіші похибки при роботі з мікроскопом, щоб початківці дослідники не допускали їх з найперших кроків, домагаючись, таким чином, максимального використання можливостей мікроскопа.

До таких помилкових дій необхідно віднести наступні дії:

одночасне застосування увігнутого дзеркала і конденсора, що порушує принцип освітлення препарату;

використання високоапертурний конденсорів з $NA = 1,2-1,4$ з нізкоапертурними об'єктивами з $NA = 0,2-0,4$, що погіршують якість зображення. Для усунення цієї помилки слід попередньо зменшити нумеричної апертуру конденсора шляхом зняття (відгвинчування) його верхній лінзи;

довільне опускання конденсора без урахування товщини предметного скла може привести до появи артефактів;

регулювання освітленості поля зору мікроскопа за допомогою опускання і підняття конденсора оскільки це впливає на якість зображення;

довільне зміна величини отвори апертурними діафрагми конденсора з метою регулювання освітленості поля зору мікроскопа;

зневага нейтральними світлофільтрами і матовими стеклами для регулювання освітленості поля зору мікроскопа, що погіршує сприйняття препарату і може чинити негативний вплив на зір дослідника;

застосування товстих предметних стекол (товщі 1, 2 мм), що перешкоджає правильній установці освітлення при високоапертурний об'єктивах,

оскільки при цьому не вдається сфокусувати конденсор на об'єкті;

застосування покривних стекол невідповідною товщини (товщі або тонше 0,17 мм);

зневага створенням повної іммерсії при роботі з об'єктивами, що мають нумеричної апертуру понад 1,2, що не дозволяє повністю використовувати нумеричної апертуру об'єктива.

Заходи безпеки при роботі з мікроскопом

При роботі з мікроскопом з освітлювачем слід дотримуватися заходів безпеки, відповідні заходів, які застосовуються при експлуатації електроустановок напругою до 1000 В.

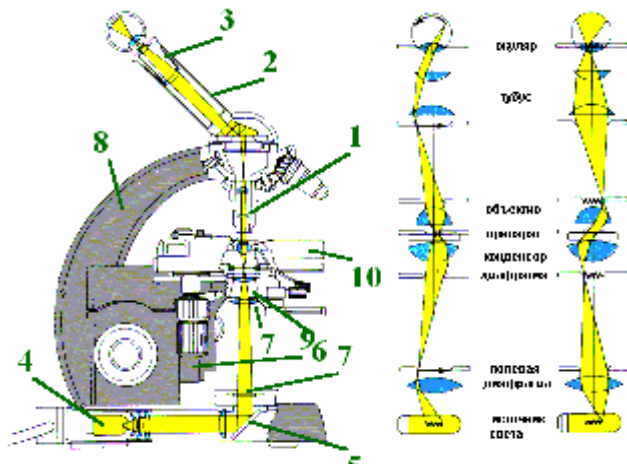
УВАГА! Заміну лампи в освітлювачі мікроскопа виробляти тільки при відключенні від електричної мережі. Щоб уникнути опіку шкіри рук про колбу лампи або контактні пластини патрона заміну лампи слід проводити через 15-20 хв після її перегорання.

Заміну плавкою вставки (запобіжника) в мікроскопі слід проводити при відключеному від мережі мікроскопі.

Після роботи на мікроскопі з освітлювачем необхідно відключити його від мережі.

Не рекомендується залишати без нагляду включений в мережу мікроскоп.

Будова світлового мікроскопа:



У мікроскоп входять 3 системи: оптична,

- освітлювальна,

- механічна.

1.оптична система включає об'єктив і окуляр.

а) Об'єктив (1) - це система лінз, що вставляється в тубус (2) знизу і безпосередньо спрямовується на об'єкт (звідси - і назва).

Звичайні збільшення об'єктива:

x8, x20, x40 (сухі об'єктиви), x90 (іммерсійний об'єктив).

При використанні останнього об'єктива його слід занурити в краплю кедрового (іммерсионного) масла, нанесену на покривне скло препарату.

б) Окуляр (3) вставляється в тубус зверху. Застосовуються окуляри зі збільшенням: x7, x10, x15.

в) Результуюче збільшення мікроскопа - твір збільшень об'єктива і окуляра, наприклад: $(x20) \cdot (x10) = 200$ раз.

г) Таким чином, функція оптичної системи - формирование збільшеного зображення препарату на сітківці ока спостерігача.

2. Освітлювальна система - джерело світла, дзеркало, конденсор і діафрагма.

а) Джерело світла (4) може бути вбудований в мікроскоп, а може знаходитися і поза мікроскопа (приклад - звичайна настільна лампа).

б) Дзеркало (5) збирає промені від джерела і направляє їх на препарат знизу.

Одна поверхню дзеркала - плоска, друга - увігнута; остання використовується при штучному освітленні.

в) Конденсор (6) складається з лінз, які фокусують промені світла на препараті. Піднімаючи і опускаючи конденсор (за допомогою гвинта), можна налаштувати фокусування променів.

г) Діафрагма (7) вмонтована в конденсор; це система непрозорих пластинок з отвором посередині. Она обмежує світловий потік, що падає на препарат. При використанні об'єктивів з великим збільшенням отвір діафрагми слід зменшити - для ослаблення сферичної аберації.

3. Механічна система - тубус (2), штатив (8), колонка (9) і предметний столик (10).

а) З колонкою пов'язані макро- і мікрометричний гвинти.

Вони піднімають і опускають тубус для фокусування зображення об'єкта на сітківці ока спостерігача.

У підсумку, світлові промені проходять наступний шлях:
джерело світла (4) → дзеркало (5) → конденсор (6) → діафрагма (7) → препарат → об'єктив (1) → тубус (2) → окуляр (3).

Тобто мікроскопія ведеться в світлі, для чого препарат повинен бути досить тонким. Заметім також, що мікроскоп дає перевернуте зображення об'єкта.

Для отримання точної інформації необхідно послідовне мікроскопічне вивчення всього цитологічного мазка. Огляд цитологічної картини проводять під малим збільшенням (x10), деталізацію обраних об'єктів - під збільшенням (x20, x40); далі мікроскопічне вивчення мазка виконується під іммерсійним об'єктивом (x90, x100). Спочатку проводять систематичне вивчення полів зору по краю мазка. Потім мазок досліджують методом «систематичного перехресного дворазового кроку», який дозволяє практично без пропуску вивчити кожен міліметр площі препарату.

Дослідження, здійснювані за допомогою методів клінічної цитології:

1. Цитологічне дослідження пункційного матеріалу.

Цитологічне дослідження пунктатів, отриманих тонкою голкою (тонкоигольная біопсія) з пухлин, пухлиноподібних утворень ущільнень будь-якої локалізації: голови, ший, молочної, щитовидної залози, лімфатичних вузлів, кісток, м'яких тканин кінцівок, шкіри, легенів, середостіння, органів черевної порожнини і заочеревинного простору ,

2. Цитологічне дослідження ексfolіативного матеріалу.

Цитологічне дослідження секретів, екскретів, виділень і зіскрібків з поверхні ерозій, виразок, ран, свищів, мокротиння, промивних вод, ексудатів, трансудатів.

3. Цитологічне дослідження ендоскопічного матеріалу.

Дослідження матеріалу, отриманого при бронхоскопії, катетеризації бронхів, езофаго-, гастро-, дуодено, лаборо-, ректоромано-, колоно-, цистоскопії та інших видів ендоскопічного обстеження при будь-якої локалізації патологічного процесу.

4. Цитологічне дослідження матеріалу біопсії і операційного матеріалу

Цитологічне дослідження мазків - відбитків, зіскрібків з біопсійної шматочків і операційного матеріалу.

Цитохимические дослідження матеріалу - в т. ч. На глікоген, ліпіди, ДНК, РНК, ферменти та ін.

Визначення статевого хроматину в клітинах пухлини.

Таким чином, клінічна цитологія представлена або ексfolіативної цитологією: дослідження рідин - ексудати, промивні води; виділень - мокрота, сеча; мазків з шийки матки, з поверхні пухлини, або пункційної-коли матеріал для дослідження отримують за допомогою пункції пухлинних утворень тонкою голкою, пункції під контролем ультразвуку, рентгена,

комп'ютерної томографії. Значну частку досліджень в сучасній клінічній цитології складають дослідження мазків з шматочків, отриманих при трепанобиопсії, мазків-відбитків з операційного та біопсійного матеріалу, мазків щіточкою і зіскрібків при ендоскопічних дослідженнях.

Основне призначення цитологічного аналізу - отримати відповідь на питання про наявність чи відсутність злоякісного новоутворення (онкоцитологію). В процесі диференціальної діагностики визначається характер патологічного процесу і встановлюються запальні, реактивні, проліферативні або передракові ураження, а також доброякісні пухлини. Роль морфологічних досліджень при діагностиці пухлин неухильно зростає, так як детальна морфологічна характеристика новоутворення дозволяє більш обґрунтовано вибрати метод лікування (хірургічне, променеве, хіміотерапевтичне і їх комбінацію), оскільки пухлини різної будови, походження і ступеня атипії клітин по-різному реагують на лікування.

Цитологічний аналіз дозволяє оцінити характер і ступінь вираженості проліферації епітелію, діагностувати передракові стани (дисплазії) і на цій основі формувати групи «підвищеного ризику». Цитологічне дослідження дозволяє здійснювати спостереження безпосередньо за характером клітинних змін епітелію в осіб групи «підвищеного ризику», що фактично неможливо за допомогою інших морфологічних методів.

Незрівнянні переваги перед іншими методами має цитологічне дослідження у виявленні раку початкових стадій. Розвиток ендоскопічної техніки, ультразвукових методів дослідження в чималому ступені сприяв широкому впровадженню цитологічного аналізу в діагностиці новоутворень.

Доставка, реєстрація та маркування матеріалу

Матеріал для цитологічного дослідження повинен бути доставлений в лабораторію в найближчі терміни після отримання. (Рідина сеча, вміст кіст, Промінь води ексудати, мокрота). Мазки, висушені на повітрі, можуть зберігатися.

Флакони з матеріалом і скла-мазки повинні бути марковані (вказано прізвище хворого).

У супроводжуючому матеріалі напрямку повинно бути:

- прізвище, ім'я та по батькові, стать і вік хворого;
- яким чином і звідки отримано матеріал;
- в якому вигляді надсилається (рідина, скла-мазки), кількість;
- короткий анамнез з обов'язковим зазначенням на наявність і характер шкідливих впливів, попереднього лікування (особливо гормонального, променевого, хіміотерапії);
- дані інших методів дослідження (рентген, ендоскопія та ін.), при підозрі на системне захворювання (гемобластози) - аналіз крові;
- опис status localis;
- клінічний діагноз.

Способи отримання і характер матеріалу для цитологічного дослідження

Матеріал для цитологічного дослідження може бути отриманий різними способами. Перш за все це:

а) Ексфолюативна цитологія, де аналізу піддаються:

▪ виділення різних органів (молочна залозу бронхи і ін.). Для приготування препарату крапля виділень наноситься на скло і готується мазок. Можна також робити відбитки з місця виділення (сосок молочної залози, вихідний отвір свища). Виділення бронхів зазвичай у вигляді мокротиння збирається в судину, приготування препаратів докладно описано в розділі дослідження органів дихання,

▪ рідини і вміст кіст отримують шляхом пункції порожнин (черевної, плевральної та ін.) і кіст. Якщо матеріалу мало, то він наноситься на стекла і розподіляється у вигляді тонкого мазка. Значні кількості рідини попередньо центрифугують і потім мазки готують з осаду. Таким же чином обробляється матеріал промивних вод,

▪ відбитки зі слизових і шкірних покривів, якщо це доступно, можна робити безпосередньо на скло. В інших випадках мазки готують з соскобов шпателем, з тампонів.

Для дослідження ексфолюативного матеріалу в гінекології існують відпрацьовані методики, опис яких - у відповідному розділі.

б) Пункційна цитологія - один з найбільш частих видів дослідження в клінічній цитології.

в) Використання для цитологічного дослідження мазків-відбитків з біопсійного та операційного матеріалу значно підвищує ефективність цитологічної діагностики. Крім того, морфологічний висновок може бути отриманий значно раніше, ніж гістологічне. Слід відзначити виняткову цінність таких паралельних досліджень (цитологічних і гістологічних) в можливості проведення цитогістологічних зіставлень, що в свою чергу суттєво збагачує як один, так і інший метод. Для приготування препарату необхідно зішкріб зі зрізу біоптату або операційного матеріалу розподілити тонким мазком на склі. Відбитки з зрізу біоптату або шматочка оперативної видаленої тканини наносяться дотиком поверхні зрізу до скла. Якщо відбитки роблять з тканини багатокровою (печінка, селезінка та ін.), з поверхні зрізу необхідно зняти кров на фільтрувальну папір і лише потім проводити відбитки на скло.

г) З розвитком ендоскопічної техніки обов'язкове цитологічне дослідження стало більш доступним. В сучасних ендоскопічних приладах є спеціальні пристосування для взяття матеріалу на морфологічне дослідження. При ендоскопії можуть бути отримані зокрема;

1. мазки щіточкою,
2. промивні води,
3. мазки тампоном,
4. мазки - відбитки щипкових біопсій.

Вибір способу взяття матеріалу визначається характером поразки, локалізацією, можливістю проведення інструментальних досліджень. Бажано використання в комплексі всіх доступних методів взяття матеріалу. Зокрема, при ураженні сечового міхура для цитологічного дослідження може бути використана нативная сеча (ефективність цитологічної діагностики 40-50%), спиртовий змив (ефективність цитологічної діагностики 60-65%), мазки-відбитки з шматочків пухлини, взятих при цистоскопії (ефективність цитологічної діагностики близько 90%). При комплексному обстеженні ефективність цитологічної діагностики становить близько 100%

Цитологічне дослідження є обов'язковим компонентом різних клінічних методів обстеження і необхідно при гінекологічному огляді брати мазки з шийки матки і з цервікального каналу, при підозрі на патологію тіла матки-мазки аспирата.

Ендоскопічне дослідження:

а) бронхоскопія - мазки щіточкою, трансбронхіальну пунктати, мазки з матеріалу щипкових біопсій, промивні води,

б) гастроскопія - мазки щіточкою, відбитки з щипкових біопсій,

в) колоноскопія, ректоскопія - мазки з ватного тампона, щіткові мазки, відбитки з біопсій,

г) цистоскопія - нативная сеча, спиртовий змив, відбитки, з біопсійної шматочків.

д) ларингоскопія - мазки з ділянок ураження і відбитки з шматочків,

е) шкіра і слизові оболонки - мазки соскобов з ділянок ураження, при пухлини - пункція тонкою голкою.

М'які тканини, молочна залоза, лімфатичні вузли, щитовидна залоза - пункція тонкою голкою.

Пункція під контролем ультразвуку (щитовидна залоза, пухлини ший, печінка, селезінка, нирка, матки, яєчники, передміхурова залоза, заочеревинні пухлини).

Цитологічному дослідженню обов'язково повинні піддаватися пунктати серозних порожнин, кіст, виділення з зіскрібка молочної залози та ін.

Питання для підготовки:

1. Цитологічні дослідження.
2. Вимоги до безпеки.
3. Устрій мікроскопа.
4. Правила роботи з мікроскопом.
5. Способи отримання і характер матеріалу для цитологічного дослідження.
6. Ендоскопічне дослідження.

Самостійна аудиторна робота

1. Цитологія – _____
-

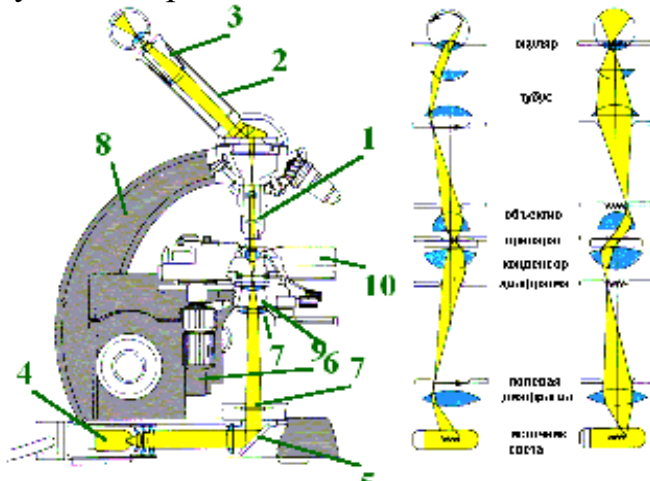
2. Цитологічний аналіз використовують при _____

3. Вимоги біологічної безпеки _____

4. Правила роботи з мікроскопом _____

5. Заходи безпеки при роботі з мікроскопом _____

6. Будова мікроскопа



7. Способи отримання і характер матеріалу для цитологічного дослідження

8. Ендоскопічне дослідження

ТЕМА 13. БАРВНИКИ. КЛАСИФІКАЦІЯ. ПРИГОТУВАННЯ. АРТЕФАКТИ. ТИНКТОРІАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ КЛІТИННИХ СТРУКТУР. ОЦІНКА ЯКОСТІ ЦИТОЛОГІЧНОГО ПРЕПАРАТУ.

Барвники, що використовуються в цитологічній діагностики, можна класифікувати за наступними критеріями:

▪ За походженням:

1. Природні - до яких відносяться фарби рослинного і тваринного походження.

2. Штучні (отримані за допомогою хімічного синтезу).

Фарбою рослинного походження є гематоксилін, який видобувається з кампешевого дерева, що росте в Америці і в Вірменії.

До фарбам тваринного походження відноситься кармін, який видобувається з комах кошенилі, що живуть на кактусових деревах в Мексиці, Вірменії та ін.

В даний час більшість фарб готують синтетично.

II. За хімічним складом:

1. Кислі - кислоти і кислі солі (еозин, кислий фуксин).

2. Основні - основні солі (гематоксилін, АЗУР 2, кармін).

3. Нейтральні - суміш двох барвників: основного (АЗУР 2) і кислого (еозин).

Як приклад можна привести найбільш уживаний барвник гематоксилін, який забарвлює ядра клітин в фіолетовий колір, і кислий барвник - еозин, що забарвлює цитоплазму в рожево-жовтий колір. Виборча спорідненість структур до певних барвників обумовлено їх хімічним складом і фізичними властивостями. Структури, добре забарвлюються кислими барвниками, називаються Оксифільні, а забарвлюються основними - базифільними. Наприклад, цитоплазма клітин найчастіше забарвлюється Оксифільні, а ядра клітин - фарбуються базифільно. Структури, сприймають як кислі, так і основні барвники, є нейтрофільними (Гетерофільні).

4. Індиферентні барвники (судан III, судан IV).

5. Флюорохроми. Група барвників, здатних флюоресцировать при тій чи іншій довжині хвилі збуджуючого світла. Незважаючи на те, що ми виділили ці барвники в самостійну групу, більшість з них слід було б віднести до цитоплазматическим або, рідше, до ядерних красітелям. Так, наприклад, флюоресцеин, поглинаючи світло з довжиною хвилі 420-490 нм, випромінює світло з довжиною хвилі 520-540 нм. При цьому об'єкти, пофарбовані флюоресцеином в люмінесцентному мікроскопі, світяться зеленим світлом.

III. По здатності забарвлювати определенні цитологіческі структури (по тинкторіальними властивостями):

1. Ядерні (фарбування ядра). Являють собою чи не найчисленнішу групу барвників взагалі. Основна мета обробки цими речовинами полягає в тому, щоб виявити матеріал, близький до ДНК або РНК. По механізму фарбування ядерні барвники ділять на дві групи, принципово відрізняються один від одного. Це основні барвники та протравні барвники.

Застосування основних барвників (всі вони є «катионними») засновано на освіту з'єднань типу солей в присутності ДНК або РНК. До них відносяться:

- Азобарвники (янус зелений В, Бісмарк коричневий).
- сафранін (сафранін Т, сафранін А, сафранін О, феносафранін).
- оксазінових барвники (брильянтовий крезіловий синій, крезіловий прочний фіолетовий).
- Тіазіни (метіонін; Азури С, А, В; метіленовий синій; толуїдиновий синій).
- трифенілметанового (парарозанілін, кристалічний фіолетовий, метиловий фіолетовий, метиловий зелений, альціановий синій).

В основу методик застосування протравних барвників лягла здатність ряду сполук утворювати яскраво забарвлені лаки з іонами металів - літію, заліза, хрому. У цю групу входять гематоксілін, кармін (кармінова кислота), алізарінціанін, алізарин, бразіллін, галлоціанін і т.д.

Залежно від того, іон якого металу входить до складу протравні реагенту, кінцевий колір забарвлення може мінятися від червоного до зеленуваточерного.

2. Цитоплазматичні (фарбують цитоплазми). Ця група барвників представлена здебільшого сульфоновими і карбоновими кислотами, які в тканинах міцно зв'язуються з білками і в результаті забарвлюють більшість внеядерная структур. До них відносяться: еозин, пікрофуксин, аурамін О, еритрозин, конго червоний і т.д.

Цитоплазматичні барвники в поєднанні з фосфорновольфрамовою кислотою, фосфорномолібденовою кислотою можуть фарбувати специфічні структури клітин і тканин, наприклад, колаген. У більшості методик цитоплазматическі барвники використовуються для контрасту після забарвлення ядерними барвниками. Деяко рідше вдаються до такої властивості цитоплазматичних барвників, як здатність забарвлювати живі клітини без порушення функцій останніх (так звані вітальні барвники); в

таких методиках застосовують дуже великі розведення барвників - від 1: 1000 до 1: 20000.

3. Спеціальні, що забарвлюють вибірково певних структур клітин - суданШ (забарвлює жир в помаранчевий колір), осмієва кислота (імпрегніруємий нею жир окрашивається в чорний колір).

Метахромазія- властивість клітин і тканин фарбуватися в колірний тон, що відрізняється від кольору самого барвника, а також властивість змінених клітин і тканин забарвлюватися в інший колір в порівнянні з нормальними клітинами і тканинами. Обумовлена полімеризацією молекул барвника під впливом вільних негативних зарядів клітин або тканини. Відзначається при патології сполучної тканини, пухлинному рості, некробиотических зміни і в ряді інших випадків.

Якісна підготовка зразків біологічних матеріалів для клініко-лабораторних досліджень є обов'язковою передумовою адекватного результату цих досліджень. Точність результату лабораторного дослідження визначається правильним отриманням зразка біологічного матеріалу та приготуванням препарату, а також якістю реагентів, застосовуваних для фіксації та фарбування мазка. Ретельне дослідження мазків крові є важливою складовою частиною оцінки захворювань. Методичні вказівки містять описи процедур приготування мазка, методів їх фіксації і забарвлення. Методичні вказівки призначені для студентів кафедри клінічної лабораторної діагностики.

1. ПРИГОТУВАННЯ, ФІКСАЦІЯ ТА ФАРБУВАННЯ МАЗКІВ КРОВІ

Підготовка скла

Мазки крові роблять на предметних стеклах за допомогою більш вузького шліфованого предметного скла.

1. Скло кип'ятять без мила і соди протягом 15-20 хв., промивають чистою водою і занурюють на 1 год. в насичений розчин двохромовокислового калію в сірчаної кислоти. Оброблено таким чином скло промивають під струменем водопровідної води і насухо витирають чистим рушником.
2. За відсутності двохромовокислового калію та сірчаної кислоти скло кладуть у мильний розчин і витримують в ньому 8-10 год., а потім в тому ж розчині кип'ятять їх 5-10 хв.

Від більш тривалого кип'ятіння скла робляться каламутними. Після кип'ятіння скла виймають і ретельно промивають під струменем водопровідної води, а потім насухо витирають.

3. Скло, що не використовувалося раніше, промивають в гарячій воді і насухо витирають. Зберігають у скляній банці з кришкою.

Приготування мазків

Взявши предметне скло за довгі краї, торкаються його поверхнею (відступивши 0,5-1 см від вузького краю) до краплі крові (але не до шкіри). Предметне скло тримають на столі або в лівій руці за вузькі краю. Правою рукою приставляють шліфоване скло вузьким краєм до скла з кров'ю зліва від краплі під кутом 45 ° і просувають його вправо до зіткнення з кров'ю.

Вичікують, поки кров розпливеться по всьому ребру шліфованого скла, і потім легким швидким рухом ведуть його справа наліво доти, поки не буде вичерпана вся крапля. Крапля крові повинна бути невеликого розміру, і її треба розмістити так, щоб весь мазок містився на склі, не доходячи 1-1,5 см до його краю. Не можна припиняти розмазування і віднімати скло раніше, ніж крапля буде вичерпана. Не можна також сильно натискати на скло, так як багато клітини можуть виявитися пошкодженими. Добре зроблений мазок тонкий, має жовтуватий колір.

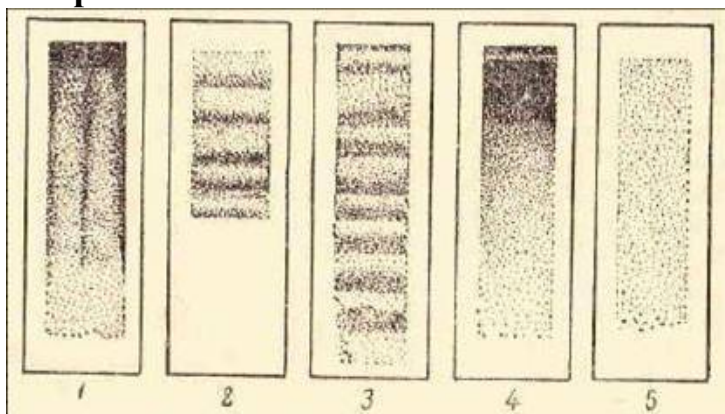
Густо-рожеві і червоні мазки непридатні для рахунку, тому що вони занадто товсті і клітинні елементи при цьому диференціювати неможливо. Після приготування мазки швидко сушать на повітрі до зникнення вологого блиску. При повільному висиханні може змінюватися морфологія клітин.

На висушеному мазку куточком предметного скла або олівцем (тільки не хімічним) пишуть прізвище, ініціали хворого, дату. При необхідності переслати мазок з консультаційною метою в інше місто мазок рекомендується робити на добре відмитій використаній рентгенівській плівці, нарізаною за розміром предметного скла.

Такі мазки можна пересилати в листах.

Малюнок 1.

Правильно і неправильно виготовлені мазки



- 1.мазок на погано знежиреному склі
- 2.дуже короткий мазок
- 3.нерівномірний хвилястий мазок
- 4.занадто товстий і нерівномірний мазок
- 5.правильний мазок, тонкий, рівномірний і достатньо довгий

Фіксація мазків

Принцип. Для закріплення матеріалу на склі висушений мазок піддають фіксації, яка заснована на згортанні білкових речовин. Фіксація, викликаючи коагуляцію білка, прикріплює препарат до скла. Крім того, при фіксуванні мазок закріплюється на поверхні предметного скла, і тому при подальшій забарвленні препарату мікробні клітини не змиваються. Крім того, убиті мікробні клітини фарбуються краще, ніж живі. Мазки слід піддавати фіксації відразу після висушування.

Фізичний спосіб фіксації

1-й метод. Предметне скло з препаратом беруть пінцетом або I і II пальцями правої руки за ребра мазком догори і плавним рухом проводять 2-3 рази над верхньою частиною полум'я пальника. Весь процес фіксації повинен займати не більше 2с. Надійність фіксації перевіряють наступним прийомом: вільну від мазка поверхню предметного скла прикладають до тильної поверхні лівої кисті. При правильному фіксуванні мазка скло повинне бути гарячим, але не викликати відчуття опіку.

2-й метод. Залишають мазки на електричному фіксаторі (65-75 ° C) не менше ніж на 2 години.

Хімічний спосіб фіксації

Для фіксації застосовують:

- метиловий спирт, 3-5 хвилин;
- метиловий спирт і ацетон в рівних частинах, 3-5 хвилин;
- суміш Никифорова (етиловий спирт ректифікат і ефір порівну), 20-30 хвилин;

- 1% осмієва кислота;
- етиловий спирт, 30 хвилин;
- денатурований спирт, 30 хвилин;
- дуже добре фіксуються мазки крові наступним розчином: 5 г сірчанокислого цинку, 5 г хімічно чистого хлористого натрію всипати в мірний циліндр або в колбу на 100 мл і додати до мітки дистильованої води. У цьому розчині мазки фіксують 2-3 хвилини, після чого їх відразу фарбують;

- рідина Карнуа (спирту 96% 60 мл, хлороформу 30 мл, крижаної оцтової кислоти 10 мл);

- фіксатор Суза;
- рідина Максимова;

- рідина Буена (15 мл насиченого водного розчину пікринової кислоти: 5 частин формаліну: 1 частина крижаної оцтової кислоти. Цей фіксатор готують безпосередньо перед вживанням. Час фіксації від 1 до 24 годин (іноді кілька діб). Фіксований матеріал зберігають у 70% спирті),

- формалін-крижана оцтова кислота;
- осмієвая кислота;
- ацетон (для імуноцитохімії);

- фіксатори, що містять сулему (хлорид ртуті (II) - $HgCl_2$). Сулема використовується у вигляді насиченого водного розчину в суміші з крижаною оцтовою кислотою (25: 1), формаліном (8,5: 1) і більш складних композицій (фіксатор «Суза», фіксатор Ценкера та ін.) Час фіксації від 1 до 24 годин. Потім сулему видаляють спиртовим розчином йоду (6 частин 70%-спирту: 1 частина йодної настоянки), а йод видаляють 70% спиртом. Фіксований матеріал зберігають у 70% спирті. *Треба пам'ятати, що сулема отруйна!*

•Фіксатори, що містять осмій (чотириокис осмію, або осмієва кислота). Дають найкращі результати, використовуються при виготовленні препаратів як для світлової, так і електронної мікроскопії. Можна використовувати 1-2%-ний розчин осмієвою кислоти, але частіше застосовують композиції, наприклад, фіксатор Флеммінга - 15 частин 2%-ної осмієвою кислоти: 1 частина крижаної оцтової кислоти. Фіксація протікає повільно (від 24 годин до декількох діб). *Треба пам'ятати, що осмієва кислота і її пари отруйні!*

Щадна хімічна фіксація - ацетон, суміш Нікіфорова, рідина Карнуа.

Кращим фіксатором вважається метиловий спирт. *Треба пам'ятати, що метиловий спирт отруйний!*

Про властивості метилового спирту як фіксатору треба додати особисту думку лікаря – лаборанта вищої категорії: «Метиловий спирт перешкоджає вивченню мікробів у цитологічних препаратах, є недоліки у виявленні хромосом в мітозі, викликає неспецифічні опади азурового барвників на склі та ін. Метиловий спирт викликає сильне знежирення клітин (він екстрагує ліпіди з клітин)». Але для фіксації мазків крові метиловий спирт залишається найкращим фіксатором.

Методика. Висохлі на повітрі мазки крові, складені попарно (мазками назовні), опускають пінцетом в спеціальний посуд для фіксації або у звичайні скляні стакани, обрізані до 6-6,5 см і наповнені до певної висоти фіксуючою рідиною. В останньому випадку для забезпечення вільного дотику намазали сторін препаратів з фіксатором зверху, між попарно складеними мазками, прокладають предметні скла, що спираються своїми ребрами на верхню частину склянки.

По закінченні терміну фіксації препарати виймають пінцетом, сушать на повітрі на штативі, або фільтрувальному папері, або обполіскують в банці з нейтралізованої дистильованою водою і укладають мазками догори на скляний місток для фарбування.

Фіксація мазків по Яхонтовій

Принцип. Підвищення якості фіксації етиловим спиртом за рахунок попередньої обробки його цитратом і оксалатом натрію.

Методика. Прозорі реактиви 1 і 2 через добу після їх приготування зливають в рівних кількостях і в цій суміші фіксують сухі мазки крові протягом 20-30 с, після чого їх підсушують на повітрі (можна і не сушити!) і фарбують.

Якщо при фарбуванні еритроцити виходять не блідо-рожеві, а сірувато-рожеві, то додають розчин цитрату натрію в більшій кількості. Якість фарбування при такій фіксації добра, тому за відсутності метилового спирту може бути застосований описаний вище фіксатор.

Фіксація мазків парами фенолу (по Сюткіну)

Принцип. Отримання хорошої якості фіксації мазків за відсутності спирту.

Методика. У ексикаторі (*ексикатор* - посуд, в якому підтримується певна вологість повітря (зазвичай близька до нуля), виготовлений з товстого скла або пластику) замінюють порцелянову підставку на скляний місток для мазків. Притираючи поверхні ексикатора і його кришки змазують вазеліном. На дно ексикатора наливають рідкий фенол (90 вагових частин кристалічного фенолу і 10 вагових частин дистильованої води) з розрахунку 100 мл на 1,4 л об'єму ексикатора. Поблизу ексикатора на стіні вішають термометр. Приготовлені звичайним способом сухі мазки крові поміщають в ексикатор на містку в один ряд намазала поверхнею вниз. Для збереження форми еритроцитів, лейкоцитів і диференційованого фарбування зернистості лейкоцитів вплив на мазки крові парів фенолу має тривати залежно від кімнатної температури строго певний час: при температурі 16-18 ° - 20 хв., при 19-21 ° - 10 хв., при 22 - 24 ° - 5 хв., при 25-27 ° - 3 хв. Після закінчення цього часу мазки виймають, розкладають на столі намазала поверхнею догори. Час вивітрювання мазків повинно бути не менше часу фіксації. Час фіксації мазків крові парами фенолу може бути скорочено до 1ч-1ч30 хв. в умовах термостата при 28-30 °. Час звільнення від парів фенолу при впливі його протягом 10 - 20 хв. може бути в термінових випадках скорочено до 5 хв. шляхом підігрівання при 37 ° у термостаті, сушильній шафі, на батареях водяного опалення або вивітрюванням настільним електровентилятором.

Якщо застосовують рідкий фенол, якість якого буває різною, то час фіксації може не співпадати з зазначеним вище. У цьому випадку, щоб уникнути помилок виробляють пробну фіксацію кількох мазків протягом 3; 5; 10; 15; 20; 25 хв. Після фарбування мазків відбирають ті з них, в яких добре виражена нейтрофільна зернистість і відсутній гемоліз еритроцитів. Те ж проробляють при можливих коливаннях кімнатної температури. За відібраними мазкам складають таблицю часу фіксації парами фенолу в залежності від температури в кімнаті. Недостатня фіксація мазків дає слабке забарвлення нейтрофільної зернистості, а недостатнє звільнення мазків від парів фенолу веде до гемолізу еритроцитів при забарвленні чи фарбуванню мазка в червоний колір.

2. ЗАБАРВЛЕННЯ МАЗКІВ КРОВІ

Барвники

Для забарвлення препаратів використовують основні (лужні), кислі та нейтральні барвники.

До основних (лужних) гематологічним фарб відносяться метиленовий синій і його похідні - азури I (метиленазур) і азури II (суміш рівних частин азури I і метиленового синього) та інші.

До кислих - водорозчинний жовтий еозин, кислий фуксин, конго червоний та інші.

Азури-еозінові суміші фарб мають високу чутливість до реакції води і тому вживана для приготування барвників і для змивання їх дистильована вода повинна мати нейтральну реакцію, тобто рН 7,0. При кислій реакції води клітини довго не зафарбовуються і мають червоний відтінок. При

лужної реакції еритроцити фарбуються в сірувато-синій колір, а ядра і цитоплазма клітин - в дуже темні кольори.

Найменш токсичні барвники використовуються для прижиттєвої забарвлення клітин. Ці барвники зазвичай застосовують у вигляді водних розчинів, наприклад: метиленовий синій (концентрація від 1: 1000 до 1: 10000), трипановий синій (0,5% розчин), нейтральний червоний (від 1: 50 000 до 1: 200 000).

Барвники для фіксованих клітин можуть використовуватися в чистому вигляді (водні або спиртові розчини, концентрація від 0,1% до 1%), наприклад: еозин, фуксин.

Часто використовують суміші барвників, наприклад, суміш Романовського-Гімза (містить метилен-азур, метиленовий фіолетовий, метиленовий синій і еозин), забарвлення по Маллорі (послідовне використання кислотного фуксину, а потім суміші анілінового синього та помаранчевого золотого), азур-еозин, метилблау-еозин.

Назви барвників можуть відповідати одержуваному забарвленню (рубін, кармін, метиловий синій, метиленовий синій, генціановий фіолетовий, метиловий зелений, помаранчевий золотий).

Іноді назви кольорів замінюють на німецькі, наприклад: метилблау, генціанвіолет. В інших випадках назви носять абстрактний, історично сформований характер, наприклад: піронін, фуксин, сафранін, флороглюцин, судан III. Барвник везувін (друга назва цього барвника - Бісмарков) має назву на честь канцлера Германії Бісмарка. Іноді назва барвника не відповідає отриманому забарвленню, наприклад, синій тіонін дає фіолетово-червоне забарвлення.

Досить рідко застосовуються хімічні номенклатурні назви барвників, наприклад: диметиламінобензальдегідом, 8-аміно-1-нафтол-5-сульфо кислота.

Визначення рН води

Фарбу слід готувати на воді нейтральної реакції. Концентрацію водневих іонів (рН) води визначають за допомогою рН-метра або індикаторних папірців.

Нейтралізація дистильованої води

В кислу воду додають по краплях 1% розчин карбонату натрію, в лужну - 1% розчин оцтової кислоти доти, поки вона не буде мати рН 7,0.

Більш зручний спосіб нейтралізації буферними сумішами.

Для цього готують 1/15 н. розчини:

1) динатрійфосфат ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), висушеного в теплом місці протягом 5 діб, розчиненням 11,876 г його в 1 л дистильованої води

2) монофосфату калію (KH_2PO_4) розчиненням 9,078 г його в 1 л дистильованої води. Ці розчини зберігають у темному місці з додатком кришталіка тимолу для запобігання утворення цвілі.

Користуватися ними можна до утворення в них пластівців.

Робочу суміш готують змішуванням 7 частин першого розчину з 3 частинами другого.

Приклад. Визначають рН дистильованої води, що підлягає нейтралізації. Припустимо, що рН води 5,2, тоді до 100 мл дистильованої води додають 4,5-5 мл зазначеної вище буферної суміші, перемішують і знову визначають рН. Якщо рН буде 6,8-7,0, тобто необхідна, то, виходячи з цього, вираховують по простому потрібного правилом кількість буферного розчину, яку необхідно додати до всієї кількості дистильованої води, що підлягає нейтралізації.

Забарвлення крові за Романовським.

Принцип. Фарбування різних елементів клітин в різні кольори і відтінки сумішшю основних (азур II) і кислих (водорозчинний жовтий еозин) фарб.

Методика. Фіксовані мазки укладають на місток, що складається з двох скляних паличок, покладених на два протилежних краю кювети. Потім мазки заливають розведеною фарбою, яку наливають на мазок можливо більш високим шаром. Фарбування триває залежно від температури повітря в приміщенні від 25 до 45 хв. Якщо температура в приміщенні низька або потрібно швидше забарвити мазки, то розведену фарбу можна підігріти до 60-70 ° (до кипіння доводити не можна). Після закінчення забарвлення фарбу змивають (але не зливають) сильним струменем води і ставлять мазки вертикально в дерев'яний штатів для просушування. Розведеною фарбою можна користуватися тільки протягом одного дня.

Забарвлення за Романовським в модифікації Філіпсона

Принцип. Застосування барвників-фіксаторів, якими мазки крові в перший період одночасно фіксуються і частково забарвлюються, а в другий період, після розбавлення барвників-фіксаторів дистильованою водою, дофарбовував остаточно.

Методика. Приготований барвник наливають на нефіксований мазок, покриваючи його повністю і через 1 хвилину, не зливаючи барвника, додають до нього але краплях приблизно стільки ж дистильованої води, стежачи за тим, щоб вода при з'єднанні з барвником не зливати з мазка. Через 20-30 хв. барвник змивають водою і мазок висушують. Цим способом клітини фарбуються добре, але іноді, мабуть, від недоброякісності спирту в еритроцитах виявляються дрібні бульбашки, які заважають визначенню ступеня насичення їх гемоглобіном.

Забарвлення за Лейшманом

Спосіб Лейшмана відрізняється від попереднього лише застосуванням барвником і тривалістю періодів фіксації та забарвлення. При цьому способі застосовують барвник, одержуваний розчиненням суміші азура I, метиленового синього і жовтого водорозчинного еозину в кількості 0,2 г на 10 мл абсолютного метилового спирту. Тривалість фіксації нерозбавленим барвником 3-4 хв., а забарвлення з рівною кількістю води 5-10 хв.

Способи швидкого забарвлення мазків фарбою

Романовського по Алексєєву

Принцип. Одночасна фіксація та фарбування мазків із застосуванням для прискорення фарбування за першим способом підігріву дистильованої води і за другим способом - підігріву розведеною фарби Романовського.

Методика. 1. На сухій нефіксованій мазок наносять очною піпеткою 6-10 крапель фарби Романовського, розподіляючи її тією ж піпеткою рівномірним шаром. Через 30 з іншого піпеткою додають до фарби по краплях подвоєну кількість підігрітої до 50-60 ° дистильованої води. Погойдуванням препарату перемішують фарбу з водою і залишають на 3 хв в спокої, потім змивають її дистильованою водою і висушують мазок фільтрувальної папером. При цьому методі забарвлення частково гемолізуються еритроцити, проте клітини білої крові не змінюються.

При другому способі, що наводиться нижче, результати виходять краще, забарвлення препаратів мало відрізняється від звичайного забарвлення за Романовським.

2. На сухий нефіксований мазок наливають рівномірним шаром 10-12 крапель фарби Лейшмана. Через 20-30 с, не зливаючи фарбу, додають до неї нагріте до 50-60° розчин фарби Романовського в кількості, здатній утриматися на препараті. Через 3 хв, не зливаючи фарбу, змивають її сильним струменем дистильованої води і висушують препарат фільтрувальної папером.

Забарвлення за Нохтом

Принцип. Вплив на фіксований мазок водного розчину суміші основний (азур II) і кислій фарби (еозин).

Методика. Барвник наливають на фіксований мазок, і фарбування триває залежно від температури повітря 25-45 хв. Потім барвник змивають і мазки висушують на повітрі.

Забарвлення за Паппенгеймом – Крюковим

Принцип. Комбіноване забарвлення фіксатором-барвником Мая-Грюнвальда і фарбою Романовського, що дає можливість дуже добре диференціювати складові частини клітин.

Посуд та апаратура - див. «Забарвлення за Романовським».

Методика. На нефіксованій мазок наливають піпеткою 10-15 крапель готового барвника-фіксатора Мая-Грюнвальда, через 3 хв. додають по краплях стільки ж води і продовжують фарбування ще 1 хв, після чого барвник змивають водою і мазок висушують на повітрі. Потім на висушений мазок наливають свіжо приготований водний розчин барвника Романовського на 8-15 хв. залежно від температури в приміщенні, змивають фарбу водою і мазок висушують на повітрі. Цей спосіб забарвлення вважається найкращим.

Забарвлення за Райтом

Принцип. Застосування спеціально приготованого барвника-фіксатора, що дає найбільш чітку забарвлення зернистості гранулоцитів особливо базофілів.

Методика. На сухій нефіксованій мазок наливають кілька крапель фарби, через 1 хв. додають стільки ж крапель дистильованої води. Через 2-3 хв. препарат промивають у воді (близько півхвилини), поки він в тонкому шарі не набуває рожевого відтінку.

Приготування та фарбування товстої краплі

Принцип. Використання більшого обсягу крові з метою поліпшення умов виявлення в крові малярійних плазмодій, спірохет поворотного тифу, еозинофілів.

Методика. Готують звичайний мазок крові і на товсті місця його наносять окремо дві великі краплі крові. Кожну краплю кінцем голки або кутом іншого скла розмазують до величини двох копійок і сушать на повітрі.

Мазок до нанесення товстих крапель і після не фіксують, а наливають на нього на кілька хвилин дистильовану воду для вилучення гемоглобіну. Забарвлену гемоглобіном воду потім обережно зливають і на препарат наливають розведenu, як звичайно, фарбу Романовського на 20-30 хв. Після забарвлення препарат обережно промивають водою, щоб не змити краплю, і висушують на повітрі. Більший обсяг крові, ніж в мазках, і гемоліз еритроцитів дозволяють легше виявити в крові малярійні плазмодії, спірохети поворотного тифу, а також еозинофіли.

При гарній фіксації і забарвленні будь-яким із наведених вище способів ядра лейкоцитів фарбуються в вишнево-червоний колір з добре видимою структурою хроматину,

ядерця - в синювато-блакитний або в світло-фіолетовий,

цитоплазма нейтрофілів - у світло-рожевий,

лімфоцитів - в чистий синьо-блакитний

моноцитів - в сіро-блакитний або димчастий,

зернистість нейтрофільна - в червонувато-фіолетовий,

еозинофільна - в оранжево-червоний,

базофільна - в темно-фіолетовий або темно-сірий,

азурофільної - в вишнево-червоний,

еритроцити - в блідо-рожевий колір.

Клінічне значення

Наведені методи забарвлення дають можливість диференціювати вид клітин, особливості структури їх ядер і цитоплазми і патологічні зміни в них. Крім того, забарвлення методом товстої краплі використовується для виявлення найпростіших (наприклад, малярійного плазмодія).

Забарвлення патологічної (токсигенної) зернистості нейтрофілів за Шмельовим

Принцип. Фарбування патологічної зернистості нейтрофілів в кислих розчинах азура II і еозину

(Починаючи з рН 5,4). При цьому в нормі зернистість не виявляється і цитоплазма нейтрофілів забарвлюється в гомогенно-рожевий колір.

Методика. Мазок фіксують протягом 4 хв. в метиловому спирті, потім фарбують протягом години азуром II - еозином в фосфатній буферній суміші.

Після цього фарбу змивають дистильованою водою і мазок просушують фільтрувальним папером.

При правильному фарбуванні поряд з нейтрофілами, цитоплазма яких містить фіолетові зерна (патологічна зернистість), зустрічаються клітини з абсолютно гомогенної рожевою цитоплазмою. При занадто кислої суміші лейкоцити майже не фарбуються.

При лужному середовищі зернистість виявляється у всіх нейтрофілах. У цих випадках потрібно трохи збільшити кількість або дифосфата натрію, або монофосфату калію. Індикатором точності реакції буферної суміші є мазки крові.

Забарвлення патологічної (токсигеної) зернистості по Фрейфельд

Принцип. Застосування основної фарби - карбол-фуксин-метиленового синього.

Методика. Мазки крові, фіксовані 3 хв. в метиловий спирт, фарбують 1:00 робочою сумішшю барвника, а потім барвник змивають водою і мазки висушують.

Препарат, вже пофарбований за Романовським, може бути пофарбований цим способом без попереднього знебарвлення. У цитоплазмі лейкоцитів виявляється синювата сіточка з усіма переходами до утворення великих грудочок. Кількість клітин з патологічною зернистістю в цитоплазмі виражають у відсотковому відношенні; наприклад, кількість всіх нейтрофілів 75%, з них з патологічною зернистістю 48%.

Клінічне значення

Наявність в цитоплазмі патологічної зернистості нейтрофілів має велике значення для оцінки стану хворого при інфекційних процесах, при сепсисі, новоутвореннях, інтоксикаціях і інших захворюваннях.

Збільшення кількості нейтрофілів з патологічною зернистістю вказує на тяжкість процесу, зменшення їх при повторних дослідженнях крові - на сприятливий перебіг хвороби. При гострих інфекціях патологічна зернистість з'являється не раніше 4-5-го дня від початку захворювання і часто не йде паралельно з ядерним зсувом, який зазвичай з'являється на початку хвороби.

Забарвлення для виявлення базофільної пунктації еритроцитів по Фрейфельд

Принцип. Базофільна зернистість еритроцитів добре сприймає лужний розчин метиленового синього.

Методика. Мазок фіксують протягом 3 хв. в метиловий спирт, а потім фарбують протягом години розчином метиленового синього (5 крапель 1% розчину на 20 мл водопровідної води). Фарбу змивають водою і мазок висушують.

Базофільну пунктацію можна виявити і в мазках крові, пофарбованих звичайними способами за Романовським, Паппенгеймом-Крюковим та інш. У цьому випадку вона набуває фіолетово-синій колір.

У здорових людей кількість еритроцитів з базофільною пунктацією коливається від 0 до 3-4 на 10 000 еритроцитів.

Клінічне значення

Базофільна зернистість (пунктація) еритроцитів - гранули синьо-фіолетового або синього кольору, різного розміру, розташовуються частіше по периферії еритроцита, являє собою залишки рибосом.

Число еритроцитів з базофільною пунктацією збільшується в крові плоду, при деяких анеміях, отруєнні важкими металами (свинець, вісмут, цинк, ртуть). Однак цей симптом не є специфічним для якого-небудь захворювання. Збільшення кількості еритроцитів з базофільною пунктацією не завжди спостерігається навіть при свинцевому отруєнні.

Метод прижиттєвого забарвлення ретикулоцитів діамантовим крезіловим синім

Діамантовий крезіловий синій (блискучий крезіловий синій, діаманткресілблау) – лужний (основний) аніліновий барвник для прижиттєвого забарвлення.

Краплю насиченого розчину крезілового синього в абсолютному спирті наносять на вимите, знежирене і підігрите скло і роблять тонкий мазок. На приготоване таким чином скло наносять краплю крові, роблять мазок і негайно поміщають скло у вологу камеру (чашку Петрі, на краю якої викладають змочені валики марлі), витримують у ній протягом 3-5 хвилин, висушують на повітрі, після чого мікроскопірують. Зернисто - нитчаста субстанція всередині ретикулоцитів забарвлюється у фіолетово-синій колір на зеленувато-блакитному тлі еритроцитів.

Забарвлення ретикулоцитів способом Гель-Мейера

Краще забарвлення ретикулоцитів досягається способом Гель-Мейера. В пробірці Відаля змішують кілька крапель крові з рівним об'ємом 1% розчину брильянтового крезілового синього у фізіологічному розчині хлориду натрію, закривають пробкою і залишають у пробірці на 1 годину, потім з суміші роблять мазок на предметному склі.

Питання для підготовки:

1. Класифікації барвників
2. Фіксація мазків
3. Забарвлення мазків крові

Самостійна аудиторна робота

1. Класифікації барвників _____

флюорохромами, фазово-контрастний - розглянути особливість клітин, не вдаючись до фіксації і фарбування (в нативному стані) навіть з иммерсионной системою. Обидва методи не вимагають багато часу на підготовку препарату, однак і не скорочують терміну його дослідження і не завжди дають можливість уточнити діагноз. Метод нативного препарату при світловому мікроскопі в цитологічному дослідженні відіграє орієнтовну роль і використовується в загальному клініко-лабораторному аналізі.

Оцінка якості пофарбованого цитологічного препарату.

Якісне фарбування дозволяє правильно ідентифікувати клітинні елементи мазка і оцінити їх особливості при мікроскопії.

Хороший якісно пофарбований мазок повинен:

- рівномірно забарвлені;
- не містити артефакти (пухкі скупчення фарби) і зморщені клітини;
- іметьв достатній кількості рівномірно розподілені клітини (всі ділянки мазка повинні добре проглядатися і не містити "товсті ділянки", що містять непросматриваемие (погано Популярні) скупчення або комплекси клітин);
- окрашівать електівнострутури цитоплазми, ядра, ядерного хроматину, ядерець.

В основі фарбування клітин лежать фізико-хімічні процеси (дифузія, адсорбція, абсорбція, розчинність і ін.), Що відбуваються як в барвнику, так і в мікроструктурах.

При застосуванні будь-якої методики фарбування мазка важливо точно дотримуватися послідовність процедур приготування розчинів і тимчасові проміжки протягом процесу фарбування.

Існуючі в продажу партії барвника мають різну інтенсивність забарвлення. Це зобов'язує дослідним шляхом встановити оптимальні концентрації (розведення) і час фарбування для кожного флакона барвника, який встановлює при фарбуванні серії препаратів розчинами з різною концентрацією барвника, змінюючи тривалість його впливу. При приготуванні розчинів необхідно враховувати рН води: вона повинна бути нейтральною (рН 6,8 - 7, 2) що забезпечується використанням буферних розчинів.

Рекомендовані методи фарбування цитологічних мазків: АЗУР - еозіновий, за Романовським - Гімзою, Лейшману, Маю-Грюнвальда, Паппенгейма; гематоксилин - еозіновий, метод Папаніколау.

Самим поширеному методом забарвлення є забарвлення гематоксилін-еозином. Поєднує в собі основний і кислий барвники, тому дозволяє виявити майже всі клітини і багато неклітинні структури (ядра набувають синьо-фіолетовий колір, цитоплазма - жовтувато-рожевий колір). Гематоксилін сам по собі не є барвником. Для того щоб приготувати фарбу, гематоксилін піддають окисленню (за методом Ерліха, Майєру, карацу -калійними квасцями), в результаті чого він перетворюється в барвник - гематеїн (синьо-фіолетовий барвник). При цьому на окислення гематоксиліном потрібно від

10 днів до 2 - 3 тижнів. Цей процес прискорюють за допомогою солей алюмінію, хрому, заліза та ін.

• **Квасцовий гематоксилин Майера** готують наступним чином: в літрі дистильованої води розчиняють 1 г гематоксилином, 0,2 г йодноватої-кислого натрію (KaJ03) і 50 г калійних квасцов. Потім додають 50 г хлоралгідрату і 1 г кристалічної лимонної кислоти. Розчин придатний для негайного вживання і довгий час добре зберігається. Препарат фарбують протягом 5 - 10 хвилин, після чого 10 хвилин промивають в проточній воді.

• **Квасцовий гематоксилин по Ерліху.** Для приготування барвника 2 г гематоксилином розчиняють в 100 см³ 96-градусного спирту і додають 100 см³ води, 100 см³ хімічно чистого гліцерину, 3 г калійних квасцов і 10 см³ оцтової кислоти.

Барвник повинен «дозрівати» приблизно 14 днів. Розчин зберігає свою фарбувальну силу довгий час. Якщо замість гематоксилином взяти 0,25 - 0,5 г гемагіна, то барвник придатний до вживання відразу ж після виготовлення. Фарбування роблять так само, як і гематоксилином Майера. Ядра фарбуються в темно-синій колір.

• **Квасцовий гематоксилин по карацу.** Гематоксилином - 0,5 г, калійних квасцов - 25г, нодноватокіслого калію КГОЗ - 0,01 г, гліцерину - 100 см³, дистильованої води - 400 см³.

Перевагою гематоксіліз-еозінових барвників є виражене забарвлення ядер з атипией, в зв'язку з чим цей метод добре використовувати для дослідження мазків при скринінгу.

Забарвлення АЗУР - еозіновими барвниками.

Метод фарбування за Романовським (АЗУР-еозіновою сумішшю) в різних лабораторіях використовується в різних модифікаціях - за Паппенгейма (Травень-Грюнвельду-Гімзою), Лейшману, Романовським-Гімзою і т.д. Перевага методу є чітке прокрашивание ядер, внаслідок чого добре проглядаються структури хроматину, а також бактеріальна флора і найпростіші.

Забарвлення за Романовським-Гімзою. Барвник складається з лужної частини (АЗУР II - яскраво-синій колір), і кислої частини (еозин - рожево-червоний колір).

В даний час використовується готовий барвник Романовського-Гімза, з якого перед початком роботи готують робочий розчин з розрахунку 1 крапля фарби на 1 млдістільованной води.

Висохлий фіксований мазок поміщається в кювету з робочим розчином фарби на 25-40 хвилин (конкретний час встановлюється дослідним шляхом для кожної партії барвника). Бактерії фарбуються у фіолетово-червоний колір, цитоплазма клітин - в блакитний, ядра - в червоний. При фарбуванні найпростіших їх цитоплазма набуває блакитного кольору, а ядра - червоно-фіолетовий. Результати фарбування мазків крові:

- Ядра клітин - червоно-фіолетові.
- Еозинофільні гранули - червонувато-коричневі.

- Базофільні гранули - сині.
- Нейтрофільні гранули - фіолетові.
- Цитоплазма лімфоцитів - блакитна.
- Еритроцити - блідо-червоні.
- Тромбоцити - зовнішня частина синя (світліша); внутрішня - фіолетова (більш темна).

Забарвлення по Маю-Грюнвальда. Даний метод дуже зручний для візуалізації гранулоцитів. Для фарбування застосовується готовий розчин еозин-метиленового синього по Маю-Грюнвальда. Мазок без попередньої фіксації заливають барвником, через 5 хвилин промивають і висушують.

- лімфоцити- ядра: синьо-фіолетові; цитоплазма: блакитна.
- моноцити- ядра: синьо-фіолетові; цитоплазма: сіро-блакитна.
- гранулоцити - ядра: синьо-фіолетові; гранули: червоні, фіолетові, темно-сині (залежить від типу).
- тромбоцити- зовнішня частина блакитна; внутрішня - фіолетова.
- еритроцити- рожеві.

Забарвлення по Паппенгейма. Являє собою комбінацію двох попередніх методів. Сухі нефіксовані мазки поміщаються в кювету з розчином Мая-Грюнвальда на 3 - 5 хвилин. Після цього контейнер з мазками ополіскується дистильованою водою, після чого мазки поміщаються в кювету з розведеним розчином Романовського-Гимзе на 20 - 30 хвилин. Після цього мазки промиваються проточною водою і висушують.

- Ядра клітин - червоно-фіолетові.
- Цитоплазма лімфоїдних клітин - світло-синя.
- Лімфоїдна азурная грануляція - яскраво-синя.
- Мієлоїдна азурная грануляція - фіолетова.
- Нейтрофільні гранули - світло-фіолетові.
- Еозинофільні гранули - червоні, червоно-коричневі.
- Базофільні гранули - темно-фіолетові, чорні.
- Еритроцити - рожеві (поліхроматофільні еритроцити - синюваті).
- Тельца Жоллі - червонувато-фіолетові.
- Тельця Ауера - яскраво-червоні.

Методика забарвлення по Лейшману. Висушені на повітрі препарати заливають фарбою Лейшмана на 3 хв., При цьому препарат одночасно фіксується. Після цього потрібно очистити, промити водою і заливають АЗУР - еозіновою сумішшю (40 мл 0, 1% Азура II і 30 мл 0,1% еозину К) на 15-20 хв. Потім промивають водопровідною водою, висушують на повітрі і проводять мікроскопію. Використовується для виявлення малярійних плазмодіїв.

Експрес - методи забарвлення цитологічних препаратів.

Забарвлення по Алексєєву. Відповідь дається вже через 5- 10 хвилин. Метод Алексєєва передбачає прискорену обробку цитологічних препаратів азуреозіновими сумішами за принципом Романовського з метою отримання звичної цитологічної картини. Методика приготування препаратів.

Обробка препаратів може здійснюватися двома способами:

- Предметні скла з висохлими на повітрі препаратами в кількості 3 - 5 штук, укладають на поличку для забарвлення відбитками або мазками догори. Очною піпеткою на кожен препарат наносять розчин фарби Романовського-Гімзе в кількості 5 - 8 крапель. Фарба повинна покрити весь мазок або відбиток. В такому стані препарат залишають на 60 секунд, протягом яких він фіксується метанолом, що входять до складу фарби, і частково фарбуються його елементи. Потім до фарби на предметних стеклах додають 10 - 16 крапель нейтральної дистильованої води, нагрітої до 50 - 60 ° і погойдуванням змішують фарбу з водою. Препарат залишають на 1-2 хвилини. Потім струменем нейтральної дистильованої води з колби-промивалки, не зливаючи, омивають фарбу з препарату. Залишок води зливають і препарат просушують фільтрувальною папером. Пофарбований препарат дивляться під мікроскопом спочатку з малим збільшенням, а при знаходженні підозрілих місць переходять на іммерсійний об'єктив. Решта мазки залишають залитими фарбою на 3 - 5 хвилин на той випадок, якщо перший препарат виявиться блідо забарвленим. Першим зазвичай фарбується найтонший з препаратів, так як він швидше просочується і сушиться.

Забарвлення за цим методом тканинних і пухлинних клітин і лейкоцитів майже не відрізняється від забарвлення їх в препаратах, оброблених звичайними цитологічними методами. При цьому чітко виділяється структура ядер, добре видно нуклеоли, зернистість і включення протоплазми. Еритроцити частково гемолизируються, що полегшує дослідження.

- Готують 0,4% розчин сухої фарби Лейшмана в метанолі (метиловий спирт). Для прискорення розчинення фарби її можна в закритому флаконі помістити у водяну баню при 60 ° на 1 годину, помішуючи. При охолодженні фарбу слід профільтрувати. Розчин стійок. Препарати укладають на поличку для забарвлення, покривають тонким шаром розчину фарби Лейшмана (12 - 15 крапель на кожен препарат) і залишають їх на 20 - 30 секунд. Потім, не зливаючи фарби Лейшмана зі скла, додають до неї розчин фарби Романовського-Гімзіна нейтральної дистильованої воді (1,6 краплі на 1 мл води), нагрітий до 50 - 60 °, в кількості, здатній утриматися на склі. Перший препарат змивають через 2 - 3 хвилини, решта - дофарбовують. Препарат висушують фільтрувальним папером і досліджують під мікроскопом. Мікроскопічна картина при цьому способі забарвлення більш яскрава, ніж при першому. Еритроцити зберігаються. Особливо чітко виступають темні нуклеоли на ніжно забарвлених ядрах. Дистильована вода для розведення фарби і змивання її з препаратів повинна мати рН 6,8 - 7,0.

Забарвлення по Папаніколау. Метод фарбування по Папаніколау являється найкращим для гінекологічних мазків, так як цей метод поліхромний, він дозволяє оцінити ступінь дозрівання цитоплазми (від синьо-зеленого кольору в незрілих клітинах до рожевого в клітинах зі зрілою цитоплазмой і оранжевого в клітинах з зроговінням), завдяки вологому фіксації добре

зберігаються ядра, клітинна мембрана і структура хроматину. Відповідь дається через 15- 20 хвилин.

Необхідні реактиви:

1. Суміш Никифорова.
2. Спирт 95, 90, 80, 70 і 50 °.
3. Гематоксилін Гарріса.
4. 0,25% -ний розчин соляної кислоти.
5. Фарба помаранчева Г.
6. Фарба (ЕА-36).
7. Абсолютний спирт.
8. Ксилол.
9. Канадський бальзам.

Приготування гематоксиліном Гарріса:

1 г гематоксиліном розчиняють в 10 мл абсолютного спирту, 20 г калійних квцов розчиняють при нагріванні в 200 мл дистильованої води. Через 24 год обидва розчини з'єднують і додають 0,5 г червоної або жовтої окису ртуті. Розчин нагрівають до кипіння, остуджують і через 24 год фільтрують.

Приготування розчину фарби помаранчева Г:

До 100 мл 0,5% -ного спиртового розчину помаранчевої фарби Г додають 0,015 г фосфорно-вольфрамової кислоти.

Приготування складовою фарби (ЕА-36):

45 мл 0,5% -ного спиртового розчину світлої зеленої, 10 мл 0,5% -ного спиртового розчину бісмаркбраун, 45 мл 0,5% -ного спиртового розчину еозину жовтуватого (водо- і спирторозчинні), 0,2 г фосфорновольфрамової кислоти, крапля насиченого водного розчину вуглекислого літію.

Хід забарвлення:

Мазки після фіксації проводять послідовно через судини, що містять 80, 70 і 50 ° спирти і дистильовану воду. Потім 6 хв гематоксилином Гарріса, обережно споліскують дистильованою водою і занурюють (6 разів) в 0,25% -ний розчин соляної кислоти. Далі на 6 хвилин кладуть у посудину з проточною водопровідною водою і обмивають дистильованою водою. Потім проводять через 50, 70, 80 і 95 ° спирти. Зневоднені таким чином препарати забарвлюють протягом 1,5 хв фарбою помаранчевої Г, споліскують в двох змінах 95 ° спирту і фарбують протягом 1,5 хв складовою фарбою (ЕА-36). Мазки відмивають від надлишку фарби в трьох змінах 95 ° спирту. Далі препарати прояснюють проведенням через абсолютний спирт, через суміш абсолютного спирту і ксилолу в рівних обсягах і, нарешті, через ксилол, після чого укладають в канадський бальзам.

До поліхромним методам забарвлення так само відносять метод Шорр (або його модифікацію М. Г. Арсенъевой (1963) і ін.), що дозволяє диференціювати клітини на еозинофільні (червоні) і базофільні (сині), і монохромні методи (забарвлення гематоксиліном і еозином або гематоксиліном і фуксином). Фіксація препарату проводилася в метиловий

спирт (15 хвилин). Фарбування препаратів проводилося гематоксилином-еозином. Фіксовані мазки офарблювалися водним розчином гематоксилином до отримання блідо-фіолетового забарвлення (7 - 10 хвилин). Після промивання проточною водою мазки знову офарблювалися 1% -ним водним розчином еозину протягом 0,5 хв, промивалися проточною водою і висушувались. При поліхромній методі поверхневі клітини фарбуються в червоний або синьо-зелений колір, проміжні і парабазальні - в синьо-зелений, базальні - в темно-синій.

Цитохімічні методи засновані на специфічній хімічній кольоровій реакції між хімічним реактивом і певним компонентом клітини для визначення в клітинах різних речовин (під дією спеціально підібраних реактивів відбувається фарбування тих чи інших речовин в цитоплазмі, а за ступенем і характером забарвлення судять про кількість або активності досліджуваних речовин).

При цитохімічному дослідженні частіше користуються полуколичественною оцінкою результатів, використовуючи принцип Астальдо, заснований на виявленні різного ступеня інтенсивності специфічного забарвлення (середній цитохімічний коефіцієнт - СЦК).

Залежно від неї досліджувані елементи ділять на 4 групи: з негативною реакцією (-), слабоположитальною (+), позитивною (++) і різко позитивною (+++). Для кількісного вираження результатів підраховують 100 клітин певного виду, диференціюючи їх за вказаним принципом, потім число клітин з однаковою інтенсивністю забарвлення множать на відповідне даній групі число плюсів, сума цих творів становить умовні одиниці. Наприклад, при дослідженні активності лужної фосфатази в нейтрофілах з 100 переглянутих клітин в 60 клітинах активність ферменту не визначена (-), в 35 - специфічна забарвлення була слабкою (+) і в 5 - більш інтенсивною (++) . Результат визначення активності лужної фосфатази в нейтрофілах в такому випадку складе $(60 \times 0) + (35 \times 1) + (5 \times 2) / 100 = 0 + 35 + 10 / 100 = 0,45$ од.

ШИК-реакція або PAS-реакція (для виявлення глікогену).

Реактив - Шифф-періодная кислота (виділені букви і складають аббревіатуру ШИК - Шифф-йодна кислота). Під впливом періодатом калію глікоген окислюється з утворенням альдегідних сполук, легко реагують з реактивом Шиффа (фуксин-сірчиста кислота). У місцях локалізації глікогену виявляється вишнево-фіолетове забарвлення, за інтенсивністю якого можна судити про кількість глікогену в клітинах.

Крім глікогену, позитивну реакцію можуть давати такі ШИК-позитивні речовини, як кислоти і нейтральні мукополісахариди, мукопротеїни, глікопротеїни та ін. Глікоген легко диференціювати від інших речовин пробою зі слиною чи діастазою.

У мазках периферичної крові глікоген міститься в цитоплазмі нейтрофілів (у вигляді рясної дрібної зернистості), цитоплазмі лімфоцитів (у вигляді невеликої кількості великих зерен) і тромбоцитів. (У вигляді

одиначних великих зерен). В пунктаті кісткового мозку глікоген виявляється в нейтрофілах різного ступеня зрілості, лімфоцитах і мегакаріоцитах.

Виявлення глікогену методом Мак-Мануса.

Метод Мак-Мануса виявляє речовини вуглеводної природи (глікозаміногліканів, гликопротеїдів, глікогену та ін.) в цитологічних препаратах. Метод ґрунтується на утворенні діальдегіду, які визначають за допомогою реактиву Шиффа під впливом окислювача (йодною кислотою). У клітках глікоген виявляється у вигляді вишнево-червоних гранул.

Методи виявлення ферментів:

1. Оксидози - ферменти, що каталізують окислювальні процеси молекулярним киснем. Серед них особливе значення має мієлопероксидаза (МПО).

Мієлопероксидази - є лізосомальні ферменти, що каталізують у присутності перекису водню окислення різних субстратів. Вона локалізується переважно в специфічних азурофільних гранулах в цитоплазмі гранулоцитів і є маркером клітин мієлоїдного ряду. Мієлопероксидази виявляється в клітинах гранулоцитарного ряду, починаючи з мієлобласти. Активність ферменту підвищується в міру дозрівання клітин. Однак, у міру диференціювання їх в зрілі клітини, активність ферменту знижується. У клітинах мієлопероксидаза бере участь в реакціях руйнування токсичною перекису водню. У цитохімічних реакціях активність ферменту визначається по окисленню хромогенів (бензидину, о-діанізідину та інших) за методом Грехема-Кноль або його модифікацій. Реакція використовується головним чином з метою діагностики гострого лейкозу.

2. Фосфатази входять до складу гідролаз. Ці ферменти широко поширені в клітинах людини і тварин. Вони беруть участь в обмінних процесах з жирами, полісахаридами і нуклеопроїдами. До них відносяться такі ферменти як кисла фосфатаза і лужна фосфатаза.

Кисла фосфатаза (КФ) - каталізує звільнення фосфату зі спиртових або фенольних моноестерів при кислому рН середовища. Кислі фосфатази локалізовані в лізосомах і цитохімічних виявляються завдяки освіті забарвлених ділянок червоного кольору в місцях гідролізу субстрату. Як субстрат можуть бути використані нафтол-AS-фосфат, а-нафтілфосфат натрію, нафтол-A8-O-фосфат та ін. Кисла фосфатаза присутній в більшості клітин крові і кісткового мозку. У гранулоцитах, моноцитах, еозинофілів і базофілів вона виявляється, починаючи з незрілих клітин цих рядів, де її активність найбільш висока.

Лужна фосфатаза (ЛФ) - це фермент, котрий способен звільнити фосфат, каталізує відщеплення фосфатних груп з фосфомоноестерів в лужному середовищі і бере участь в обміні ліпідів і нуклеїнових кислот. Міститься виключно в зрілих нейтрофілах. У периферичній крові активність лужної фосфатази значно вище, ніж в клітинах кісткового мозку. Фермент виявляється у вигляді жовто-коричневих гранул в цитоплазмі.

3. Неспецифічні естерази (НЕ) також відносяться до гідролаз. Ці ферменти здатні гідролізувати прості ефіри N-вільних спиртів жирних кислот. Це досить неоднорідна група ензимів, назви яких обумовлені субстратом, який вони гідролізують. Отримано понад 9 изоферментів НЕ. Фракції 1, 2, 7, 8, 9 виявляються при використанні нафтол-АБ-О-хлорацетата і представляють активність хлорацетатестерази, яка присутня в гранулоцитах. Фракції 3, 4, 5, 6 взаємодіють з ефірами α -нафтілацетата і представляють собою НЕ, які виявляються в моноцитах, плазматичних клітинах і тромбоцитах. Найбільший інтерес для гематологів представляють хлорацетатестерази, α -нафтілацетатестераза, кисла α -нафтілацетатестераза. Неспецифічні естерази є лізосомальними ферментами.

α -Нафтілацетатестераза (α НАЕ) виявляється у всіх мієлоїдних клітинах, але найбільша її активність визначається в моноцитах. У клітинах еритроїдного ряду в нормі вона не визначається.

Кисла нафтілацетатестераза - це фермент, що локалізується в лізосомальних гранулах. Його активність виявляється в реакції з α -нафтілацетатом в кислому середовищі при рН 5,8. Вона характерна для Т-хелперів. Крім того, вона виявляється в клітинах моноцитарного ряду.

Хлорацетатестеразу (ХАЕ) називають гранулоцитарною. Як і мієлопероксидаза, вона є маркером нейтрофілів. Активність ферменту виявляється у вигляді гранул синього кольору.

Здвоєну реакцію на ХАЕ і α НАЕ проводять послідовно на одному мазку. Це дозволяє розділити клітини гранулоцитарною і моноцитарній ліній, що має значення при діагностиці мієломоноцитарний лейкозу.

Реакція Браше. Метод служить для виявлення РНК. Використовується реактив із суміші двох барвників: метилового зеленого і піроніна. Піронін специфічно забарвлює РНК в червоний цвет. Поетому на препараті ядерця (в складі ядра) і рибосомбогаті ділянки цитоплазми мають червоний цвет. Другі структури ядра (крім ядерця) - зелені.

Реакція Фельгена. Основний реактив - фуксінсерністая кислота (реактив Шиффа). ДНК-містять структури фарбуються в пурпурно-червоний колір.

Цитохимические дослідження ліпідів. Ліпіди локализуються в цитоплазмі клітин головним чином в мембранах органел і виявляються переважно в нейтрофільних гранулоцитах. Відіграють важливу роль в проникності мембран. Цитохимические дослідження ліпідів засноване на застосуванні барвників, що розчиняються в жирах (судан III, судан IV, черний судан і ін.). Для виявлення нейтрального жиру користуються Суданом III, забарвлює жир в помаранчевий колір. Ліпоїдами виявляються краще Суданом чорним (чорне забарвлення).

Питання для підготовки:

1. Світлова мікроскопія.
2. Оцінка якості пофарбованого цитологічного препарату.

5. Забарвлення по Паппенгейма _____

6. Методи виявлення ферментів _____

ТЕМА 15. ПІДСУМКОВИЙ КОНТРОЛЬ 2.

Тема 16 Модуль 1

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Законодавчо-нормативні документи:

1. Про затвердження Порядку внутрішньолабораторного контролю якості досліджень при виявленні серологічних маркерів ВІЛ методами імуноферментного та імунохемилюмінесцентного аналізів [Електронний ресурс] : Наказ МОЗ України №4 від 14.01.2015. – Режим доступу : <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/z0112-15>
2. ДСТУ 2708:2006 Повірка засобів вимірювальної техніки. Організація та порядок проведення
3. ГОСТ 8.010-99 Методика виконання вимірювань.
4. ДСТУ EN ISO 15189: 2015 «Медичні лабораторії. Вимоги до якості та компетенції»
5. ДСТУ ISO/IEC 17025:2006 «Загальні вимоги до компетентності вимірювальних та калібрувальних лабораторій».
6. ISO/IEC 17043:2010 «Оцінка відповідності. Основні вимоги до проведення перевірки кваліфікації».
7. ІЛАС-G13:08/2007 «Основные принципы и требования ИЛАС к компетенции провайдеров программы проверки квалификации».
8. ISO 13528:2005 «Статистичні методи для застосування у перевірці професійного рівня шляхом міжлабораторних звірянь».
9. ДБН В 2.2-10-2001 «Будівлі та споруди. Заклади охорони здоров'я».

Основна:

10. Гирина Н. П. Техніка лабораторних робіт : навч. посіб. для студентів / Н. П. Гирина, А. В. Шляніна, І. С. Ковальчук. - Київ : Медицина, 2017. - 304 с.
11. Юзик Г. Ю. Техніка лабораторних робіт : посібник / Г.Ю. Юзик. - Київ : Медицина, 2007. - 144 с.

Додаткова:

1. Хейломський, О. Б. Концепція впровадження вимог стандарту ДСТУ EN ISO 15189:2015 в практику медичних лабораторій України / О. Б. Хейломський, Т. О. Хейломська, Д. Б. Шахнін // Лаб. діагностика. - 2016. - N 3. - С. 35-39.
2. Руанет В. В. Теория и техника лабораторных работ : специальные методы исследования : учебное пособие / Руанет В. В. ; под ред. А. К. Хетагуровой. – М. : ВУНМЦ Росздрава, 2007. - 175 с.
3. Камышников В. С. Техника лабораторных работ в медицинской практике / В. С. Камышников. - 4-е изд. - Москва : МЕДпресс-информ, 2016. - 342 с.

4. Пустовалова Л. М. Техника лабораторных работ : учеб. пособие / Л.М. Пустовалова, И.Е. Никанорова. - Ростов н/Д : Феникс, 2004 (ЗАО Книга). - 283 с.
5. Пустовалова Л. М. Физико-химические методы исследования и техника лабораторных работ / Л. М. Пустовалова, И. Е. Никанорова. - Изд. 2-е, перераб. и доп. - Ростов-на-Дону : Феникс, 2014. - 300 с.
6. Клинико-лабораторные аналитические технологии и оборудование : учебное пособие / Т. И. Лукичева [и др.] ; под ред. В. В. Меньшикова. - Москва : Академия, 2007. - 236 с.
7. Методы клинических лабораторных исследований / В. С. Камышников, О. А. Волотовская, А. Б. Ходюкова [и др.] ; под ред. В. С. Камышникова. - 4-е изд. - М. : МЕДпресс-информ, 2011. - 751 с.,
8. Кишкун, А. А. Клиническая лабораторная диагностика : учеб. пособие для мед. сестер / А.А. Кишкун. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2008. - 720 с.
9. Медицинские лабораторные технологии : справочник / под ред. А.И. Карпищенко. - 2-е изд., перераб. и доп. - СПб. : Интермедика. - Т. 1. - 2002. - 408 с.
10. Клиническая биохимия : учеб. пособие / А.Я. Цыганенко, В.И. Жуков, В.В. Мясоедов, И.В. Завгородний. - М. : Триада-Х, 2002. - 504 с. -
11. Мещин И.Ф., Федорик С.Д.. Техніка лабораторних робіт.- Чернівці, 2003.- 83 с.
12. Воскресенская Е.И. Техника лабораторных работ (пособие для лаборантов). — М.: Химия, 2005. — 345 с.
13. Техніка лабораторних робіт. Модуль 1. Частина 1. Організація роботи лабораторії : практикум для самостійної аудиторної та позааудиторної роботи студентів I курсу медичного факультету зі спеціальності: 6.120102 «Лабораторна діагностика» / уклад. К. В. Александрова [та ін.]. - Запоріжжя : ЗДМУ, 2014. - 157 с.
14. Александрова К.В. Білоконь Л.Є., Рудько Н.П. Приготування розчинів реагентів, їх виправлення, способи вираження концентрації Методичні вказівки для студентів медичного факультету, спеціальності 6.120 102 - Лабораторна діагностика, Запоріжжя, 2009 р.
15. Рожнева І.Л. Фіксація та забарвлення мазків. Методичні вказівки для студентів медичного факультету, Дніпропетровськ, 2014 р.