

И. Н. Мусин, Ф. С. Шарифуллин, И. С. Разина

**ПРИБОРЫ И АППАРАТУРА ДЛЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ МЕТОДОВ АНАЛИЗА В МЕДИЦИНЕ**

*Ключевые слова: фотометрия, колориметр фотоэлектрический, фотоэлементы, спектрофотометр, фотоприемник, полимерные комплексы.*

*В статье приведены физико-химические методы анализа малых количеств веществ. Рассмотрено оборудование, их принципиальные схемы, порядок работы, преимущества и недостатки.*

*Keywords: photometry, photo-electric colorimeter, photo cells spectrophotometry, photodetector, polymer complexes.*

*In article physical and chemical methods of the analysis of small quantities of substances are resulted. The equipment, their circuit diagrams, an operating procedure, advantages and lacks is considered.*

Методы количественного определения химического состава веществ, основанные на измерении их физических свойств, называются физико-химическими методами анализа. Все эти измерения связаны с использованием соответствующих приборов и поэтому их часто называют инструментальными методами анализа.

Фотометрические и спектрофотометрические методы получили широкое распространение в лабораториях. Эти методы позволяют относительно быстро определять весьма малые количества веществ. Имеется определенная закономерность в поглощении части светового спектра окрашенным раствором. Например, раствор, окрашенный в желтый цвет, поглощает синюю часть света, т. е. дополнительный цвет [1].

Величина светопоглощения в фотометрии выражается величиной оптической плотности  $D$  (экстинкция или поглощение раствора иногда обозначается  $E$ ). Величина, обратная плотности, называется прозрачностью, или пропусканием раствора, обозначается  $T$  и выражается в процентах.

Основным законом колориметрии и абсорбиметрии является объединенный закон Бугера — Ламберта — Бера. Из этого закона следует, что оптическая плотность раствора, или экстинкция, прямо пропорциональна концентрации поглощающего вещества, толщине слоя раствора и молярному коэффициенту погашения. Закон имеет следующее выражение:

$$D = E = \epsilon_{\lambda} C l, \quad (1)$$

где  $D$  — плотность или  $E$  — экстинкция;  $\epsilon_{\lambda}$  — молярный коэффициент погашения;  $C$  — концентрация вещества, поглощающего свет;  $l$  — толщина поглощающего слоя окрашенного раствора.

Молярный коэффициент погашения представляет собой оптическую плотность 1М раствора, помещенного в кювету с толщиной слоя 1 см.

Фотоэлектроколориметрия - это определение концентрации вещества в растворе по изменению тока в фотоэлементе при попадании на него луча, прошедшего через исследуемый раствор. Степень поглощения света (коэффициент экстинкции) прямо пропорциональна концентрации вещества в растворе. Концентрацию растворенного вещества определяют путем сравнения силы тока в фотоэлементе через

исследуемый раствор с силой тока на выходном ФЭ при прохождении луча через контрольную жидкость - бесцветный растворитель.

Нефелометрия - это тоже, что и фотоэлектроколориметрия, но оценивается не степень поглощения или экстинкции, а степень рассеивания света в эмульсиях и взвесьях.

Спектрофотометрия - это тоже, что фотоэлектроколориметрия и нефелометрия, но предназначенная для измерения светопоглощения или рассеивания строго определенной длины волн.

Фотометр предназначен для качественной или количественной оценки результатов иммуноферментного анализа и широко используется в медицине, биологии, фармакологии, пищевой промышленности, сельском хозяйстве и ветеринарии и в службах санэпиднадзора (СЭС).

Примеры лабораторных исследований, проводимых посредством фотометрических приборов [2]:

- концентрацию гемоглобина в специальном растворе крови определяют в спектрофотометре при зеленом светофильтре с  $\lambda = 500 \dots 560$  нм в кювете с рабочей шириной 10 мм;

- процесс агрегации тромбоцитов исследуют в ФЭК, перемешивая смесь плазмы крови и специального раствора в течение 16 мин;

- исследуя в ФЭК кровь в кислотном физиологическом растворе, строят эритрограммы - зависимости коэффициента экстинкции от времени в течение 10 мин - и делают выводы о кислотности резидентности крови;

- белок в моче дает помутнение при добавлении в нее специального раствора, это помутнение регистрируется ФЭК, расчет ведут по калибровочному графику;

- для определения сахара в моче исследуют цветную реакцию мочи и щелочи (светофильтр зеленый, ширина кюветы - 5 мм), смесь нагревают в водяной бане, сахар определяют по калибровочной кривой;

- диагностику онкологических заболеваний (выявление онкомаркеров), фотодинамические методы используются в терапии метастазов рака молочной железы и меланомы [3].

Актуально применение фотометрических методов анализа в контроле качества лекарственных

препаратов [4 - 7]. Расширение арсенала лекарственных средств сопровождается развитием новых методов их анализа. Это связано с тем, что выход и качество конечных продуктов химико-фармацевтического производства зависит не только от строгого проведения процесса согласно технологическому регламенту, от качества исходного сырья, но и от применения надежных методов поэтапного контроля. Физико-химические методы все шире внедряются в фундаментальные фармацевтические исследования и в практику фармацевтического анализа. Они используются для идентификации и количественного определения различных групп лекарственных веществ, их стандартных образцов, а также таблеток, мазей, инъекционных растворов, капель и других многокомпонентных лекарственных смесей [8]. Наиболее доступны для использования в фармацевтическом анализе фотометрические методы, в частности спектрофотометрия в ИК- и УФ-областях, фотометрия в видимой области спектра и их различные модификации [9].

Интересен фотометрический экспресс-метод определения светозащитных свойств упаковки для лекарственных средств [10].

В [11] представлен обзор основных подходов, применяемых для определения гидразина и его производных спектрофотометрическими и флуориметрическими методами. Приведены примеры определения в объектах. Обсуждены достоинства и недостатки предложенных схем анализа, рассмотрены тенденции развития методов.

Как известно, принципиально новые возможности для решения практических задач дают полимер – коллоидные комплексы, поскольку по своим физико-химическим свойствам они существенно отличаются от индивидуальных компонентов [12]. Системы, содержащие неионные ПАВ и водорастворимые полимеры, широко используются в нефтяной, фармацевтической и других отраслях промышленности.

Взаимодействие полимолекулярных ансамблей в частности мицелл с макромолекулами, такими как полимеры, могут мимикрировать действие определенных биоструктур и поэтому они также интересны с теоретической точки зрения.

В работе [13] были рассмотрены особенности формирования полимер – коллоидных комплексов в системе неионное ПАВ – полимер. В качестве неионного ПАВ выбраны алкилполиэтоксифенолы (неонолы) с различной длиной оксигетилированной цепи ( $AF_{9-12}$ ,  $AF_{9-10}$ ,  $AF_{9-8}$ ,  $AF_{9-6}$ ), а в качестве полимера – полиэтиленимин (ПЭИ) высокомолекулярный (молярной массы 10000) и низкомолекулярный молярной массы 1200).

Спектрофотометрическим методом показано, что реакция в системе  $AF_{9-12}$  – ПЭИ<sub>1200</sub> (0.02 моль/л) – вода идет в двух направлениях, т.е. идут две параллельные реакции, причем с близкими скоростями. Полученные данные по каталитической активности полимер – коллоидных композиций позволяют предположить, что в системе на основе неионных ПАВ и полиэтилениминов формируются нанореакторы [14,

15]. Это можно использовать для разработки эффективных каталитических систем на основе неионных ПАВ с регулируемой активностью, моделирующих принципы функционирования биокатализаторов и действующих в мягких условиях. Это имеет важное значение при решении экологических проблем по уничтожению токсичных соединений.

Разработана фотометрическая методика определения дифенгидрамина гидрохлорида в капсулах Антигриппин-АНВИ [7], основанная на реакции лекарственного вещества с кислотным красителем бромтимоловым синим. Изучены оптимальные условия образования окрашенного комплекса и его спектральные характеристики.

В настоящее время бурно развивается направление получения аналитической информации в лабораторной диагностике, которое все более успешно конкурирует с традиционной фотометрией: применение видеоцифровых систем на основе ПЗС-камер и сканеров [16]. Микропланшеты для иммуноферментного анализа (ИФА) являются традиционным объектом измерений специализированных вертикальных фотометров (ИФА-ридеров). Целью работы [17] являлось сопоставление аналитических характеристик сканерной видеоцифровой системы Эксперт-Лаб при использовании в качестве фотометра и обычного высококласного ИФА-ридера.

Примеры промышленных фотометров:

- колориметры фотоэлектрические концентрационные КФК-2, КФК-1 [3];
- колориметр фотоэлектрический однолучевой КФО;
- фотоэлектроколориметр ФЭК-56м, ФЭК-М;
- спектрофотометры СФ-4, СФ-16;
- минифотометры Metertech (Тайвань);
- модель SP-810 (на 330...1000 нм содержит аналоговый индикатор-самописец);
- модель SP-870 (на 300...1000 нм, включает клавиатуру, дисплей, 30 ячеек памяти для программы измерений).

Фотометры классифицируют:

- по количеству каналов (одноканальные и многоканальные фотометры);
- по типу источников света (с лампами накаливания, с водородными и ртутными лампами);
- по типу фотоприемников (с фоторезисторами, селеновыми фотоэлементами, фотодиодами и с фототранзисторами);
- по устройству индикации (стрелочные, цифровые и микрометрические).

Фотоэлектрический колориметр ФЭК-М применяется в медицинских лабораториях всех направлений (рис. 1).

Технические характеристики прибора:

- количество каналов 2;
- диапазон исследуемых коэффициентов экстинкции 2...100%;
- погрешность прибора 1%;
- длины волн фильтров (зеленый, синий, красный) 300...700 нм.

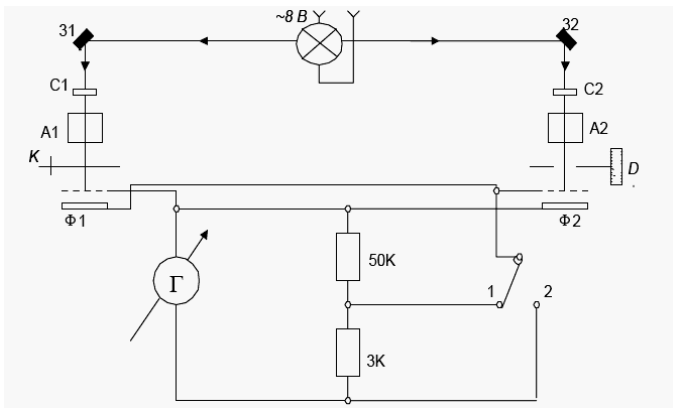


Рис. 1 - Схема ФЭК-М: 31, 32 – зеркала, С1, С2 – светофильтры, А1, А2 – кюветы с исследуемым и контрольным растворами, Ф1, Ф2 – фотоэлементы селеновые, К - клин (заслонка), применяемый для изменения светового потока по оптическому каналу, D - диафрагма с микрометрическим винтом, отградуированным в единицах коэффициентов экстинкции, Г - гальванометр

Фотоэлементы Ф1, Ф2 включены дифференциально, поэтому при идентичных каналах световые токи фотоэлементов вычитаются и гальванометр показывает нуль. Идентичность каналов обеспечивается идентичностью фотоэлементов и световых потоков. Переключатель в первом положении обеспечивает меньшую чувствительность гальванометра, во втором – полную.

Этапы работы с прибором следующие. В кюветы А1 и А2 помещают контрольный раствор. Диафрагму устанавливают на 100%. Регулируя клин (левый световой поток), обеспечивают идентичность каналов по нулю гальванометра, в кювету А1 ставят исследуемый раствор. Гальванометр показывает не нуль. Изменяя переключателем чувствительность гальванометра и вращая лимб диафрагмы D, устанавливают стрелку гальванометра на нуль. На лимбе читают коэффициент экстинкции.

Колориметр фотоэлектрический одноканальный (КФО) используется в аналитических лабораториях для измерения коэффициента пропускания через раствор света определённых длин волн.

Технические характеристики:

- коэффициент пропускания 5... 100%;
- погрешность измерения коэффициента пропускания 1...5%;
- разделение на цвета длин волн: 415 нм – синий, 500 нм - сине-зеленый, 530 нм - зеленый, 600 нм – оранжевый, 630 нм – красный, 320...720 нм - нейтральный.

В приборе используются лампа накаливания и селеновый фотоприемник. Оптический принцип работы устройства – одноканальный (эталонный и исследуемый раствор анализируется последовательно во времени).

Принципиальная схема устройства приведена на рис. 2.

Работа с прибором заключается в следующем. Затемнив фотоприемник, потенциометром R2 стрелку прибора устанавливают на нуль, затем вводят кювету с контрольным раствором с коэффициентом

пропускания  $\lambda = 5...100\%$  и потенциометром R5 добиваются максимума шкалы, соответствующей Ф<sub>0</sub>. После этого устанавливают исследуемый раствор, измеряют Ф<sub>изм</sub> и по формуле  $\lambda = \text{Физм}/\text{Ф}_0$  рассчитывают  $\lambda$ .

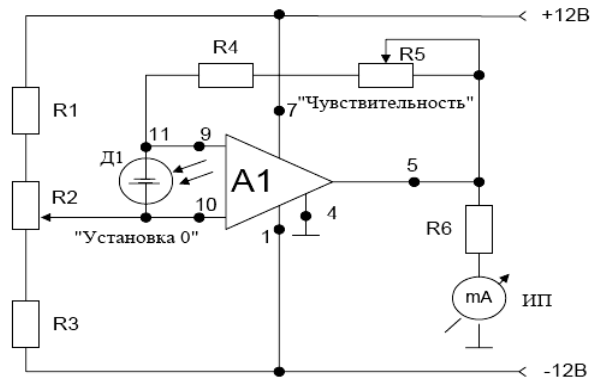


Рис. 2 - Схема КФО: Д1 - селеновый фотоприемник, А1 - операционный усилитель, R1, R2, R5 - сопротивление установки на нуль, ИП - измерительный прибор, R4, R5 – цепь отрицательной обратной связи (ООС) для регулировки чувствительности ИП

Спектрофотометры КФК-3 [18], КФК-2МП предназначены для измерения коэффициента пропускания, оптической плотности растворов и твердых образцов, скорости изменения оптической плотности и концентрации вещества в растворах. Физико-химические методы и биотестирование применяются для системного анализа качества водных объектов [19], эти методы также могут использоваться при анализе археологических объектов, в частности находок из металла [20], загрязняющих веществ в объектах окружающей природной среды [21].

Технические показатели прибора КФК-3:

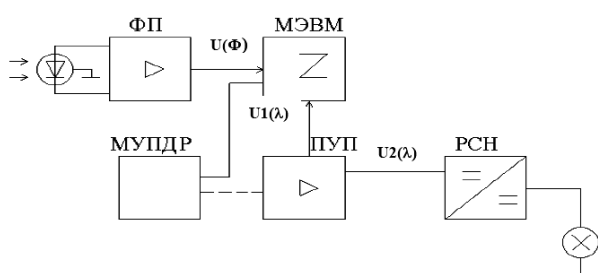
- коэффициент пропускания 0,1...100%;
- погрешность измерения коэффициента пропускания 5%;
- длины волн 315...990 нм;
- разрешение по длине волны 7 нм;
- оптическая плотность 0...3.

Оптическая схема двухканальная (раствор и растворитель исследуются одновременно). Лампа галогенная, фотоприемник фотодиодный. В этом приборе в качестве дифрагирующего элемента используется дифракционная решетка (рис.3).

Технические характеристики прибор КФК-2МП:

- коэффициент пропускания 1... 100%;
- погрешность измерения коэффициента пропускания 1%;
- длины волн 315...980 нм;
- оптическая плотность 0...2.

В приборе используются оптическая схема одноканальная, лампа галогенная, фотоприемники фотодиодные (Ф26 - для 315...500 нм, ФД-24К - для 500...980 нм), дифрагирующие элементы - светофильтры.



**Рис. 3 - Схема КФК-3: ФП – фотоприемник, МУПДР - механизм угла поворота дифракционной решётки, МЭВМ – микроЭВМ, ПУП - преобразователь угла поворота, РСУ - регулируемый стабилизатор напряжения**

Свет от лампы попадает на фотодиод Д через раствор. Фотоприемник формирует напряжение  $U(\Phi)$ , которое вводится через АЦП в микроЭВМ.

Механизм управления углом поворота дифракционной решетки изменяет длину волны света, проходящего через раствор. Это изменение (механическое) устройством ПУП преобразуется в напряжения  $U_1$  и  $U_2$ , пропорциональные длине волны.  $U_1$  поступает в МЭВМ через второй АЦП, а  $U_2$  преобразуется в напряжение питания лампы так, чтобы на нижней длине волны 315 нм это напряжение было равно 12 В, а на верхней - 10 В. При этом осуществляется коррекция силы света от длины волны.

В МЭВМ вводятся  $U(\Phi)$  и  $U_1(\lambda)$  в автоматическом режиме, а градуировочный коэффициент  $K_g$  - с клавиатуры. Кроме этого, в МЭВМ имеется таймер, который дает информацию об интервале времени  $t$  между замерами последовательных коэффициентов пропускания. Благодаря этому в МЭВМ рассчитываются такие параметры:

$\lambda = (\Phi_{\text{изм}}/\Phi_0) \cdot 100\%$  - коэффициент пропускания;

$D = \lg(1/\lambda)$  - оптическая плотность;

$A = (D_{\text{кон}} - D_{\text{нач}})/t$  - скорость изменения оптической плотности;

$C = D \cdot K_g$  - концентрация, где  $K_g$  - градуировочный коэффициент.

Кроме этого, МЭВМ управляет механизмом угла поворота дифракционной решетки и переключает оптический путь луча через эталонный и исследуемый растворы. Процесс измерения параметров осуществляется по программе, заложенной в МЭВМ.

Фотометр КФК-2МП работает аналогично КФК-3, но в нем отсутствует блок МУПДР, а содержится кассета с одиннадцатью фильтрами. Смена фильтров осуществляется дискретно по команде МЭВМ.

Специалист всегда стремится получить максимум полезной информации с помощью наиболее безопасных для пациента методик диагностики, к которым относятся лабораторные анализы крови, мочи, кала, мокроты и слизи, содержимого мазков и соскобов, к таким методам и относят фотометрические и спектрофотометрические методы анализа. Данные методы позволяют относительно быстро определять весьма малые количества веществ. Отличаясь простотой, хорошей чувствительностью и высокой скоростью анализа, они находят применение, как в

повседневной практике, так и в исследовательской работе. Фотометрический анализ является одним из наиболее удобных методов определения малых количеств вещества, так как существует практически неограниченная возможность превращения вещества в раствор, сильно поглощающий свет

Достоинство фотометров заключается в том, что обеспечивается автоматизированный режим измерения параметров (благодаря наличию МЭВМ), а недостаток - в сложности устройств. Однако, обширная область применения фотометров - лаборатории научно-исследовательских институтов, лечебно-профилактических и санитарно-эпидемиологических учреждений, лаборатории контроля пищевых продуктов и мониторинга окружающей среды перекрывают все их недостатки.

### Литература

1. Любина А.Я., Ильичева А.П. Катасонова Т.В., Петросова С.А., Методы клинических лабораторных исследований. М., 1984.
2. Двухлучевые фотометрические системы для клинико-физиологических исследований. Учебное пособие. Е.П. Попечителей, Б.И. Чигирев - Л: Издательство Ленинградского университета, 1991.
3. Филинов В.Л., Сдвижков А.М., Борисов В.И. Фотодинамическая терапия метастазов рака молочной железы и меланомы / Паллиативная медицина и реабилитация. 2004. № 3. С. 19-23.
4. Бодренкова Н.А. Применение физических и физико-химических методов для анализа щелочных и щелочноземельных катионов в лекарственных препаратах / автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Харьков, 1996
5. Сафонова Е.Ф., Сливкин А.И., Вязова Д.С., Дзюба В.Ф. Сравнительная оценка физико-химических методов контроля качества метронидазола / Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2008. № 1. С. 159-162.
6. Марахова А.И. Применение физико-химических методов в анализе настоев из сырья лекарственных растений семейства яснотковых / автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Пермская государственная фармацевтическая академия. Пермь, 2009
7. Тыжигирова В.В., Лапшина М.П. Фотометрическое определение дифенгидрамина гидрохлорида в лекарственном препарате антигриппин-анви / Сибирский медицинский журнал (г. Иркутск). 2011. Т. 106. № 7. С. 73-75.
8. Арзамасцев А.П., Печенников В.М., Родионова Г. М. и др. Анализ лекарственных смесей. М.: Компания Спутник, 2000, 275с.
9. В. Г. Беликов Анализ лекарственных веществ фотометрическими методами. Опыт работы отечественных специалистов / Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева), 2002, т. XLVI, № 4
10. Карпенко Т.А., Артемьев А.И. Фотометрический экспресс-метод определения светозащитных свойств упаковки для лекарственных средств / Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. 2000. № 2. С. 64-70.
11. Смоленков А.Д., Родин И.А., Шпигун О.А. Спектрофотометрические и флуориметрические методы определения гидразина и его метилированных аналогов / Журнал аналитической химии. 2012. Т. 67. № 2. С. 133.

12. Смирнова Н.А. Фазовое поведение и формы самоорганизации растворов смесей поверхностно – активных веществ // Успехи химии.- 2005. -Т.74. -№2. -С. 138 – 154.
13. Бакеева Р.Ф. Агрегационные и каталитические свойства мицеллярных систем полиэтиленмин+нонилфенол+вода / Р.Ф. Бакеева, И.С. Разина, Ю.С. Ковалев, А. И. Куклин, Т.С. Горбунова, В.Ф. Сопин // Вестник Казанского технол. ун-та.2009. -№5. -С. 296-303.
14. Бакеева Р.Ф. Коллоидные свойства мицелл в системе полиэтиленмин (М. 1200) – нонилфенол – вода / Р.Ф. Бакеева, И.С. Разина, Т.С. Горбунова, А. Раевска, Ю. Ковалев, В.Ф. Сопин // Вестник Казанского технол. ун-та.- 2004. -№1-2. -С. 234-240.
15. Бакеева Р.Ф. Полимер-коллоидные ассоциаты в системе полиэтиленмин (ВМ) – нонилфенол – вода / Р.Ф. Бакеева, И.С. Разина, Т.С. Горбунова, В.Ф. Сопин // Вестник Казанского технол. ун-та. -2006. -№1. -С. 49-53.
16. Старовойтова Т.А., Стериополо Н.А., Зайко В.В., Мартынкила Л.П., Калачева О.С., Кутвицкий В.А., Тугалуков А.Е., Волощук С.Г., Венгеров Ю.Ю., Тогузов Р.Т. Исследование характеристик сканерной видеодигитальной системы эксперт-лаб для регистрации результатов иммуноферментного анализа / Клиническая лабораторная диагностика. 2007. № 9. С. 30b-31.
17. Иноземцев Я. О., Воробьев А. Б., Матюшин Ю. Н. Калориметр для контроля эффективности энергоемких систем и калорийности энергоресурсов / Вестник Казанского технол. ун-та. - 2010.-№ 1.- С. 71-74
18. Бункин С. Б., Гурушкина З. И. Фотометры КФК-3-«ЗОМЗ» - традиции и качество / Интеграл.-2008.-№4.- С. 6-7
19. Беднаржевский С.С., Еськов В.М., Захариков Е.С., Кузнецов Д.И., Мамедов Р.М., Пушкарев Н.С., Шевченко Н.Г. Применение физико-химических методов и биотестирования для системного анализа качества водных объектов в районах нефтедобычи / Вестник новых медицинских технологий. 2008. Т. 15. № 03. С. 38-39.
20. Цыбульская О.Н., Буравлев И.Ю., Юдаков А.А., Никитин Ю.Г. Использование физико-химических методов анализа при изучении археологических объектов / Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук. 2010. № 5. С. 85-90
21. Воронич С.С., Тимощук С.П. Современные физико-химические методы анализа загрязняющих веществ в объектах окружающей природной среды / Экологические системы и приборы. 2008. № 7. С. 18-21.

---

© **И. Н. Мусин** - к.т.н., зав. каф. технологического оборудования медицинской и легкой промышленности КНИТУ, imusin@kstu.ru; **Ф. С. Шарифуллин** - д.т.н., доц. каф. плазмохимических и нанотехнологий высокомолекулярных материалов КНИТУ, sharifullin80@mail.ru; **И.С. Разина** - к.х.н., асс. каф. технологического оборудования медицинской и легкой промышленности КНИТУ, ira-a82@mail.ru.