

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Савинов Сергей Сергеевич

**Новые возможности дуговой атомно-эмиссионной спектрометрии для
прямого анализа жидких биопроб**

Специальность 02.00.02 – аналитическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Санкт-Петербург – 2014

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Научный руководитель: доктор физико-математических наук,
профессор,
Дробышев Анатолий Иванович

Официальные оппоненты: **Зоров Никита Борисович**
доктор химических наук, профессор,
ФГБОУ ВПО «Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова»,
заведующий лабораторией лазерной диагностики

Лабусов Владимир Александрович
доктор технических наук,
ФГБУН «Институт автоматки и электрометрии» СО РАН,
заведующий лабораторией оптических информационных систем

Ведущая организация: ГНЦ «Государственный научно-исследовательский и проектный институт редкометаллической промышленности «Гиредмет»», г. Москва

Защита состоится «11» декабря 2014 г. в 17:00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.232.37 по защите докторских и кандидатских диссертаций на базе Санкт-Петербургского государственного университета по адресу: 199004, Санкт-Петербург, Средний проспект В.О., д. 41/43, Большая химическая аудитория.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке им. А.М. Горького Санкт-Петербургского государственного университета и на сайте <http://spbu.ru/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
к.ф.-м.н.

/В.В. Панчук/

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДИССЕРТАЦИИ

Актуальность темы диссертационной работы

В настоящее время для проведения элементного анализа жидких биологических проб наиболее востребованными методами атомной спектromетрии являются атомно-эмиссионная спектromетрия (АЭС) с индуктивно-связанной плазмой (ИСП) и атомно-абсорбционная спектromетрия (ААС) с электротермической атомизацией (ЭТА). АЭС-ИСП является многоэлементным методом, однако требует, как правило, больших объемов пробы, к которой предъявляются весьма жесткие требования в отношении вязкости и солевого макросостава. В связи с этим для объектов, имеющих биоорганическую природу, необходима стадия предварительной подготовки пробы (в простейшем случае ее существенное разбавление), что неизбежно ведет к увеличению пределов обнаружения (ПО). ААС-ЭТА обладает низкими ПО и возможностью использования весьма малых объемов проб (от 10 мкл). Однако для большинства объектов пробоподготовка также необходима; кроме этого, метод в общем случае является одноэлементным и, следовательно, при необходимости определения значительного числа аналитов требует кратного этому числу увеличения объема пробы и продолжительности анализа.

Большой универсальностью обладает дуговая атомно-эмиссионная спектromетрия сухого остатка (Д-АЭС-СО) жидкой пробы с торца угольного электрода. Этот многоэлементный метод позволяет напрямую анализировать малые объемы неорганических проб с низкими ПО. Однако, при использовании оптимизированных для регистрации с фотоэлектронными умножителями (ФЭУ) параметров¹ метод не позволяет проводить прямой анализ биопроб из-за наличия матричного влияния основы, нивелирование которого путем разбавления пробы приводит к увеличению ПО и невозможности определения микроэлементов в биологических жидкостях. Данное ограничение может быть снято при использовании системы фотодиодной регистрации. Однако, в связи с меньшей пороговой чувствительностью полупроводникового детектора (по сравнению с ФЭУ) и, как следствие, сложностью регистрации излучения (как сплошного спектра, так и спектральных линий) малой интенсивности, требуется исследование способа получения и обработки аналитического сигнала и путей увеличения интенсивности излучения плазмы для уменьшения ПО ряда микроэлементов при анализе биопроб. Кроме того, использование высокоинформативной системы фотодиодной регистрации позволяет увеличить скорость проведения анализа.

¹ Дробышев А.И., Емелина О.И. // Журнал аналитической химии. – 1999. – Т. 54, № 12. – С. 1300-1303.

Цель диссертационной работы

Расширение аналитических возможностей дуговой атомно-эмиссионной спектроскопии для прямого анализа жидких биологических проб путем разработки новых подходов и методологии для существенного увеличения отношения сигнал/шум и, соответственно, снижения ПО широкого круга элементов до уровней, позволяющих определять все значимые эссенциальные и основные токсичные элементы.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

- исследовать влияние величины силы тока дугового разряда и количества спектрального буфера на эффективность атомизации пробы и возбуждения спектра определяемых элементов с целью увеличения отношения сигнал/шум и нивелирования матричных влияний;
- установить взаимосвязь между параметрами фотодиодной регистрации и регистрируемой величиной аналитического сигнала с целью увеличения отношения сигнал/шум;
- изучить особенности влияния ширины входной щели спектрального прибора на форму и ширину аппаратной функции, разрешающую способность и интенсивность спектральных линий с целью увеличения отношения сигнал/шум при сохранении приемлемого разрешения;
- на основании результатов аппаратно-методических исследований разработать многоэлементный способ прямого атомно-эмиссионного спектрального определения микроэлементов в жидких биопробах с использованием единых градуировочных зависимостей, построенных по водным растворам солей элементов;
- оценить аналитические и метрологические характеристики разработанного способа и сравнить их с характеристиками высокочувствительных методик анализа жидких биопроб;
- продемонстрировать универсальность разработанного способа на примерах анализа биологических жидкостей.

Научная новизна

• Разработан способ прямого определения микроэлементов в жидких биологических пробах при использовании для градуировки водных стандартных растворов с ПО, достаточными для детектирования всех значимых эссенциальных и значительной части токсичных элементов.

• В результате использования большой силы тока и значительного количества спектрального буфера достигнуто существенное увеличение отношения сигнал/шум за счет повышения скорости испарения и эффективности возбуждения элементов пробы в дуге переменного тока и относительного снижения при этом роли аддитивных шумов фотодиодной линейки.

• Показана возможность значительного увеличения светосилы спектрального прибора и отношения сигнал/шум за счет увеличения ширины

входной щели без существенного ухудшения разрешающей способности (что может быть объяснено реализацией частично когерентного освещения щели).

Основные положения, выносимые на защиту:

- Существенное увеличение отношения сигнал/шум (в 2-10 раз) в дуге переменного тока, достигнутое за счет синергетического воздействия увеличенной силы тока дуги (20 А) и большого количества спектрального буфера (0,15 мг NaCl).
- Значительное (в 7-10 раз) увеличение интенсивности аналитических линий за счет увеличения ширины входной щели до шести «нормальных ширин» (50 мкм) без существенного ухудшения разрешающей способности, что дало возможность снизить ПО в 1,5-3 раза.
- Разработанный на основе проведенных аппаратурно-методических исследований способ прямого определения широкого набора элементов в жидких биологических образцах с ПО от 0,1 мкг/л при использовании для градуировки стандартных водных растворов солей элементов.

Практическая значимость работы

- Разработанный способ нивелирования матричного влияния может быть распространен на прочие спектральные приборы для проведения атомно-эмиссионного спектрального анализа сухих остатков жидких биообъектов.
- Разработан унифицированный высокопроизводительный способ прямого атомно-эмиссионного определения элементов в диапазоне содержаний 0,1 – 10⁶ мкг/л в жидких пробах различной природы.
- На основании результатов анализа биологических образцов по разработанной методике выявлены закономерности распределения содержаний микроэлементов, определены среднестатистические значения этих содержаний, которые для некоторых элементов коррелируют с индивидуальными и популяционными факторами (пол, возраст, заболевания), а также проявляют межэлементные корреляции.

Личный вклад соискателя

Автор принимал непосредственное участие в выполнении работы на всех этапах, начиная с установления цели и задач исследования, включая выполнение экспериментальных исследований и активное участие в обсуждении и интерпретации полученных результатов, написании статей, подготовке и представлении докладов на конференциях и симпозиумах.

Апробация работы

Материалы диссертации представлены на конференциях: International Student Conference "Science and Progress" (Санкт-Петербург, 2011), V Всероссийская конференция студентов и аспирантов «Химия в современном мире» (Санкт-Петербург, 2011), Всероссийский конкурс

научно-исследовательских работ студентов и аспирантов в области биологических наук в рамках Всероссийского фестиваля науки (Ульяновск, 2011), VI Всероссийская конференция молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев-2012» (Санкт-Петербург, 2012), IV Всероссийская конференция «Аналитические приборы» (Санкт-Петербург, 2012), Всероссийская конференция по аналитической спектроскопии (Краснодар, 2012), International Student Conference "Science and Progress" (Санкт-Петербург, 2012), I Зимняя молодежная школа-конференция с международным участием «Новые методы аналитической химии» (Санкт-Петербург, 2013), VII Всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием по химии и нанотехнологиям «Менделеев-2013» (Санкт-Петербург, 2013), XIV Міжнародна конференція студентів та аспірантів "Сучасні проблеми хімії" (Киев, 2013), IX Всероссийская конференция "Химия и медицина" (Уфа, 2013), International Student Conference "Science and progress" (Санкт-Петербург, 2013), VII Всероссийская конференция с международным участием молодых ученых по химии «Менделеев – 2014» (Санкт-Петербург, 2014), XIV Международный симпозиум «Применение анализаторов МАЭС в промышленности (Новосибирск, 2014).

Публикация результатов

Материалы диссертации опубликованы в трех статьях в научных журналах, включенных в перечень ВАК, и в форме тезисов докладов, представленных на 14 всероссийских и международных конференциях.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, общего обзора литературы (глава 1) по методам элементного анализа биологических сред с особым акцентом на определение микроэлементного состава жидких проб со сложной матрицей. Глава 2 посвящена аппаратурно-методическим исследованиям в области расширения аналитических возможностей АЭС для анализа жидких проб с торца угольного электрода в дуге переменного тока, которые завершаются разработкой универсального способа Д-АЭС-СО жидких биологических объектов. В главе 3 описываются примеры применения разработанного способа в анализе широкого круга объектов (сыворотки крови, цельной слюны, минерализата ногтей). Работа изложена на 166 страницах текста, содержит 19 таблиц и 60 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении кратко обосновывается актуальность разработки методики атомно-эмиссионного анализа жидких биологических проб сложного состава и малого объема с возбуждением спектра СО пробы с торца угольного электрода в дуге переменного тока. Формулируются цель и задачи исследования.

Глава 1. Обзор литературы

В первой главе представлен обзор литературы, в котором последовательно рассматриваются различные объекты анализа (такие как кровь, слюна, ногти) в отношении присутствующих в них микроэлементов, их влияния на организм человека и возможности использования информации о содержании элементов в указанных объектах для оценки состояния здоровья. В данной главе также рассматриваются различные методы анализа, используемые для определения содержания микроэлементов: электрохимические, рентгеновские, в том числе рентгенофлуоресцентный анализ с полным внешним отражением (РФА-ПВО), масс-спектральные (МС), оптические спектральные. Акцентируется внимание на характеристиках данных методов: необходимости стадии пробоподготовки, минимальном количестве исследуемого образца, ПО, простоте выполнения анализа. Отмечается, что все указанные методы для большинства образцов требуют стадии минерализации проб для нивелирования влияния органической матрицы на результаты анализа; кроме этого, чаще всего приводятся данные по использованию методов для определения ограниченного числа (2-5) элементов. В качестве возможной альтернативы рассмотренным методам предлагается АЭС с возбуждением спектра СО жидкой пробы в дуге переменного тока, которая обладает такими преимуществами как потенциальная возможность нивелирования матричного влияния (универсальность в отношении природы объектов), многоэлементность, возможность анализа малых объемов проб, отсутствие пробоподготовки, простота осуществления операций. В заключении этой главы обосновывается актуальность поиска методических решений, направленных на улучшение метрологических характеристик предлагаемого способа в варианте фотодиодной регистрации спектра для возможности определения элементов на уровне 0,1-1 мкг/л в пробах различной природы в единых условиях анализа.

Глава 2. Разработка методики АЭС жидких проб для определения в них микросодержаний элементов

АЭС с возбуждением спектра СО жидкой пробы с торца угольного электрода в дуге переменного тока осуществлялась на спектральной установке МФС-МАЭС, схема которой изображена на рис. 1. Суть известной методики Д-АЭС-СО неорганической пробы состоит в следующем: на торец подготовленного (обожженного и с нанесенной защитной пленкой) нижнего угольного электрода (марки «Искра» D6x300 0,063 (F)) наносится с помощью микрошприца жидкая проба в виде капли объемом 10 мкл, которая высушивается под инфракрасной лампой; далее наносится капля водного раствора NaCl – спектрального буфера, которая так же высушивается. Затем электрод в паре с верхним (заточенным на конус) электродом устанавливается в штативе камеры дугового разряда. На электроды от генератора дуги переменного тока (в качестве которого используется генератор ИВС-28) подается переменный ток, посредством которого

создается плазма дугового разряда; в результате происходит испарение пробы с торца электрода, ее атомизация и возбуждение атомов в плазме. Излучаемый атомами свет растровым конденсором направляется через входную щель в спектральный прибор МФС-8, в котором вогнутой дифракционной решеткой (с обратной линейной дисперсией 0,55 нм и радиусом кривизны 1 м) разлагается в спектр. Модернизация спектрального прибора заключается в замене блока выходных щелей с ФЭУ на твердотельный фотодиодный линейный детектор МАЭС (состоящий из 8 фотодиодных линеек, каждая из которых содержит 2580 пикселей размерами 12,5мкм×1мм), на котором фокусируется спектр в интервале длин волн от 190 до 340 нм. МАЭС в течение времени базовой экспозиции осуществляет накопление заряда, образованного в результате падающего на него излучения, и его последующую передачу в компьютер (с помощью установленного программного обеспечения «Атом») в виде цифрового изображения спектра, по которому далее происходят идентификация спектральных линий определяемых элементов, расчет их интенсивностей и определение концентраций с помощью предварительно построенных градуировочных графиков.

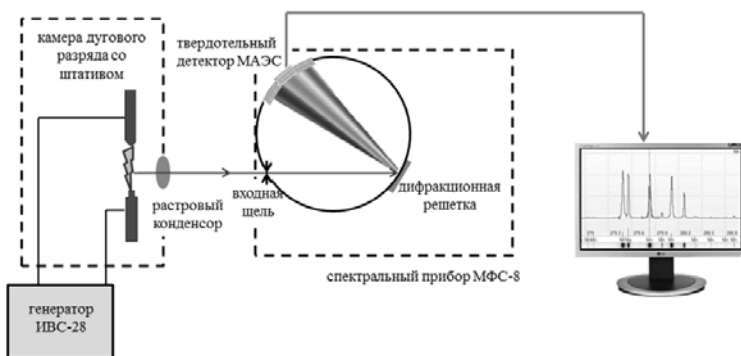


Рисунок 1. Блок-схема спектральной установки с МФС-МАЭС

Важным достоинством фотодиодной регистрации является возможность автоматического учета уровня светового потока фона под спектральной линией, т.е. реализуется возможность измерения ее «чистой» интенсивности. Следует отметить, что использование в качестве аналитического сигнала логарифма «чистой» интегральной (по всему контуру спектральной линии) интенсивности, которая прямо пропорциональна величине светового потока спектральной линии, невозможно при использовании прочих детектирующих систем (фотопластинок, ФЭУ). Однако, полупроводниковые детекторы по сравнению с ФЭУ характеризуются худшей пороговой чувствительностью, поэтому излучение малой интенсивности не может быть достоверно зарегистрировано на фоне шумов детектора, следствием чего являются высокие ПО при использовании стандартных условий методики Д-АЭС-СО.

По этой причине первой задачей работы являлось исследование параметров, влияющих на условия атомизации и возбуждения пробы, к которым относятся величина силы тока дугового разряда и количество спектрального буфера, с целью увеличения отношения сигнал/шум и нивелирования матричных эффектов.

Наиболее важным фактором, влияющим на эффективность атомизации и возбуждения, и, следовательно, на интенсивность излучаемых дуговым разрядом спектральных линий определяемых элементов, является сила тока. Однако, при увеличении силы тока значительно увеличивается уровень излучения сплошного спектра, в связи с чем токи более 10-15 ампер обычно не используются при фотографической регистрации или с помощью ФЭУ, поскольку в этом случае уменьшается отношение сигнал/шум. В то же время, при малых значениях силы тока в связи с недостаточной пороговой чувствительностью полупроводниковых детекторов (по сравнению с ФЭУ) уровень излучения фона плазмы не может быть достоверно зарегистрирован на фоне шумов детектора. Увеличение силы тока приводит к увеличению эффективности атомизации и уменьшению времени поступления элементов в плазму, что позволяет уменьшить время регистрации спектра. В этом случае имеет место существенное увеличение отношения сигнал/шум, что демонстрируют зависимости для линии Zn, приведенные на рис. 2. На основании этого в качестве рабочей была выбрана сила тока 20 А, которая является максимально возможной для используемого генератора и дает максимальное значение отношения сигнал/шум (увеличение отношения в 1,5-3 раза для разных элементов по сравнению с 8 А).

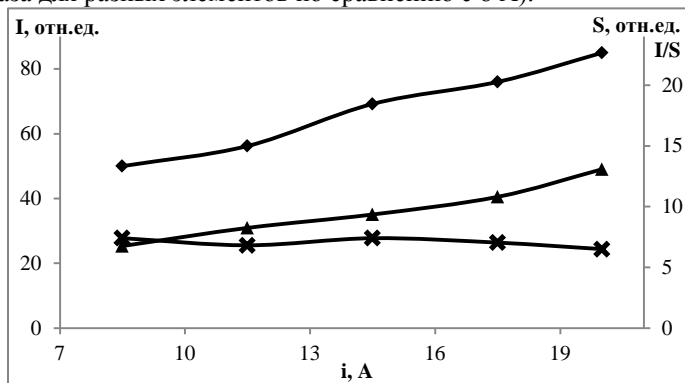


Рисунок 2. Зависимости интенсивности I аналитической линии Zn 213,86 нм (♦), среднеквадратичного отклонения S фонового излучения (x) и отношения сигнал/шум I/S (▲) от силы тока i дугового разряда

Известным способом, позволяющим повысить эффективность возбуждения атомов, является введение в анализируемую пробу легкоионизируемой добавки, в качестве которой был использован наиболее распространенный в практике спектрального анализа NaCl, наносимый на

торец электрода в виде водного раствора. Из приведенных в качестве примера на рис. 3 для линии Pb зависимостей видно, что при увеличении количества спектрального буфера от 0 до 0,15 мг уровень фонового излучения и его флуктуации остаются на одном уровне, однако, имеет место рост интенсивности спектральной линии, что приводит к увеличению отношения сигнал/шум (в 1,5-4 раза для различных элементов). На основании этих результатов была выбрана величина добавки 0,15 мг NaCl.

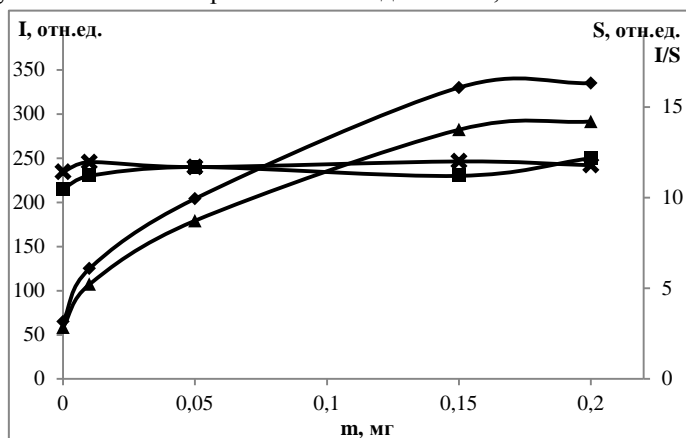


Рисунок 3. Зависимости интенсивности I аналитической линии Pb 283,31 нм (♦) и фонового излучения (■), среднего квадратического отклонения S фонового излучения (x) и отношения сигнал/шум I/S (▲) от массы m NaCl на торце электрода

Из вышеприведенных результатов видно, что совместное использование большой силы тока (20 А) и значительного количества спектрального буфера (0,15 мг NaCl) позволяет увеличить отношение сигнал/шум. Однако, остается вопрос о возможном матричном влиянии, которое проявляется в изменении физических параметров плазмы и, следовательно, чувствительности анализа в зависимости от макросостава проб. Обычно данная проблема устраняется введением дополнительной стадии – пробоподготовки. В случае Д-АЭС нивелирование влияния основы может быть достигнуто за счет одновременного использования большой силы тока и значительного количества спектрального буфера, которые стабилизируют температуру плазмы и концентрацию электронов в ней и делают их независимыми от макросостава анализируемых веществ. Таким образом, выбранные условия могут позволить создать универсальный способ анализа жидких объектов различной природы, в том числе биожидкостей, с использованием для градуировки стандартных водных растворов солей элементов. Для подтверждения данного предположения был проведен эксперимент по определению параметров плазмы дугового разряда при возбуждении спектра различных объектов в единых условиях. В качестве

объектов были выбраны: стандартный водный раствор солей элементов, цельная слюна, цельная кровь. Расчет температуры плазмы осуществлялся методом Орнштейна с использованием экспериментально измеренных интенсивностей 33 спектральных линий Fe. Расчет концентрации электронов осуществлялся по интенсивностям атомной и ионной линий Mg. Представленные в табл. 1 экспериментальные данные, полученные для разных объектов, удовлетворительно согласуются между собой. Следовательно, выбранные оптимальные параметры дугового разряда (20 А) и количества спектрального буфера (0,15 мг NaCl) позволяют не только увеличить отношение сигнал/шум, но и стабилизируют температуру плазмы и концентрацию электронов в ней при возбуждении проб, различающихся основным составом.

Таблица 1. Параметры плазмы дугового разряда в случае возбуждения спектров проб различной природы

Тип объекта	T плазмы, К	$N_e \cdot 10^{13}$, cm^{-3}
стандартный раствор	4800±400	11±6
слюна	4700±400	10±5
цельная кровь	4900±400	15±8

Фотодиодная регистрация спектра с помощью МАЭС предполагает установку двух параметров экспозиции: времени базовой экспозиции спектра T_B , в течение которого производится накопление фотоэлектрического заряда на каждом пикселе фотодиодной линейки с последующей передачей информации об этом заряде в компьютер, и числа спектров N , зарегистрированных со временем экспозиции T_B , которые затем усредняются, а результат представляется как спектр, зарегистрированный за время полной экспозиции $T_{\Pi} = N \cdot T_B$. Поскольку в случае возбуждения спектра сухого остатка при выбранных условиях происходит импульсное (в течение 5-10 с) поступление элементов в плазму дугового разряда, то для учета этой специфики в качестве аналитического сигнала использовалась не усредненная (как предлагается программой «Атом»), а суммарная за время полной экспозиции T_{Π} интенсивность спектральных линий. Естественно предполагать, что в этом случае изменение времени базовой экспозиции не должно приводить к изменению аналитического сигнала. Однако, экспериментальные исследования показали, что при увеличении времени базовой экспозиции происходит рост «чистых» интенсивностей спектральных линий с последующим выходом на плато (рис. 4а). Аналогичным образом происходит и изменение уровня фонового излучения. В то же время, изменение времени базовой экспозиции оказывает менее значимое влияние на флуктуации уровня фонового излучения, поэтому зависимость сигнал/шум, показанная на рис. 4б, имеет аналогичный вид. Таким образом, увеличение времени базовой экспозиции со значения 250 мс,

обычно используемого, до 2 с приводит к увеличению отношения сигнал/шум в 1,5-2 раза.

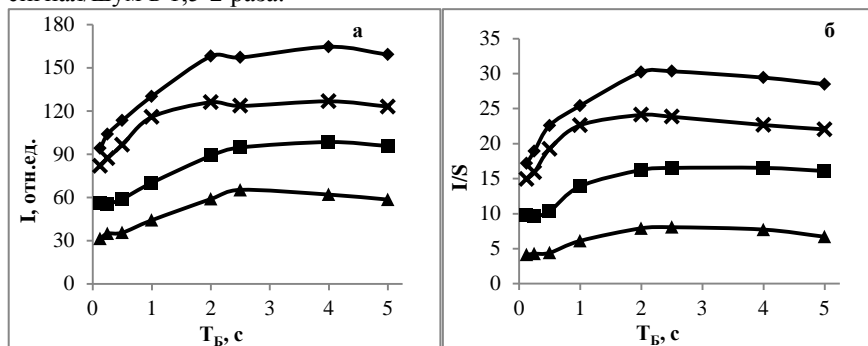


Рисунок 4. Зависимости интенсивностей I (а) и отношения сигнал/шум I/S (б) для аналитических линий Cd 228,80 нм (♦), Pb 283,31 нм (■), Ti 295,61 нм (▲), Zn 213,86 нм (x) от времени базовой экспозиции T_B при $T_{II} = 20$ с

Приборы с фотодиодной регистрацией в настоящее время нашли широкое применение для повышения экспрессности и увеличения производительности АЭС. При этом зачастую используются ранее разработанные методики, оптимизированные для фотоэлектрической с ФЭУ или для фотографической регистрации, которые регламентируют в том числе такой эксплуатационный параметр как ширину входной щели спектрального прибора. От нее зависят форма, интенсивность и ширина аппаратной функции (АФ), а также связанная с ней практическая разрешающая способность, которая определяет возможность использования спектрального прибора для анализа конкретных объектов методом АЭС. По этой причине одной из задач работы являлось изучение влияния ширины входной щели на указанные выше характеристики.

На рис. 5, для примера, приведены три контура одной и той же спектральной линии, зарегистрированные при разных ширинах входной щели и аппроксимированные (с помощью программного обеспечения "Атом") распределением Гаусса. Видно, что при всех ширинах входной щели регистрируемая спектральная линия имеет колоколообразный контур с максимумом посередине. Такая форма АФ при большой ширине входной щели не соответствует общепринятой теоретической модели, согласно которой у контура спектральной линии вместо максимума должно появиться достаточно широкое плато, являющееся проявлением прямоугольного инструментального контура геометрического изображения входной щели. Кроме того, обращает на себя внимание заметное различие форм зарегистрированных и аппроксимирующих контуров: лишь для средней ширины (30 – 60 мкм) щели (рис. 5б) аппроксимация функцией Гаусса всех частей цифрового изображения контура спектральной линии удовлетворительна, что дает основание использовать ее для математического

описания контуров линий и, благодаря этому, производить учет взаимного переложения соседних линий при определении их интенсивностей.

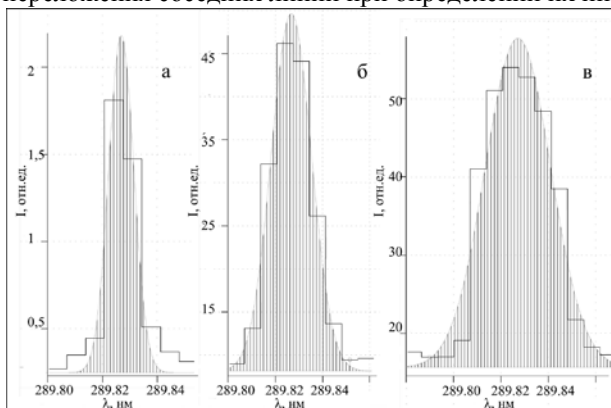


Рисунок 5. Цифровые изображения спектральной линии λ 289,825 нм при ширине входной щели спектрографа 10 мкм (а), 50 мкм (б), 80 мкм (в) и аппроксимирующие их контуры Гаусса

На рис. 6 представлены экспериментальные зависимости ширины **b** интерполирующего контура регистрируемой спектральной линии и реальной разрешающей способности **R**, которая определялась по специально разработанной для этого методике, от ширины входной щели.

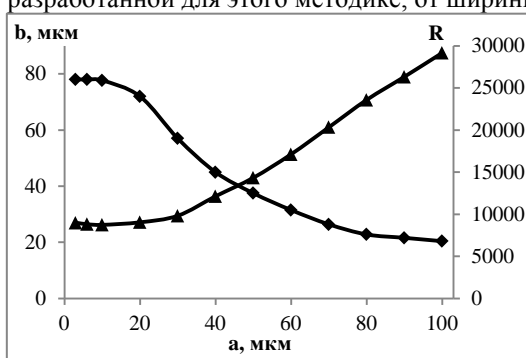


Рисунок 6. Зависимость ширины **b** интерполирующего контура (\blacktriangle) и реальной разрешающей способности **R** (\blacklozenge), измеренных по линиям λ в области 290-310 нм, от ширины **a** входной щели

Как следует из представленной на рис. 6 зависимости, при увеличении ширины щели от 3 до 30 мкм ширина регистрируемых линий **b** остается неизменной, а при дальнейшем увеличении щели оказывается меньше ширины щели. Одним из возможных объяснений данного экспериментального факта является реализация варианта частично когерентного освещения входной щели, теоретически предсказанного академиком Д.С. Рождественским в 1940 году.

Несмотря на то, что увеличение ширины входной щели ведет к уменьшению реальной разрешающей способности (рис. 6), в случае измерения интегральной интенсивности линии наблюдается ее непрекращающийся рост при увеличении ширины щели вплоть до 100 мкм. Это видно из рис. 7 на примере линии В. Одновременно с этим, естественно,

увеличивается уровень фонового излучения и его флуктуации. Однако увеличение ширины входной щели с 20 мкм – рекомендованного значения для МФС-8 – до 50 мкм позволяет увеличить соотношение сигнал/шум (в 1,5-3 раза для линий разных элементов) с сохранением приемлемой величины разрешающей способности.

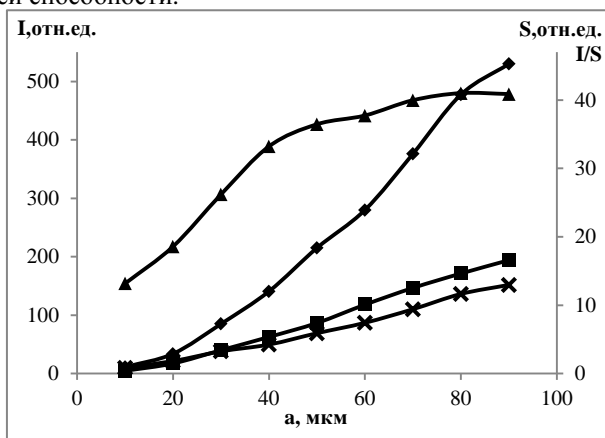


Рисунок 7. Зависимости интенсивности I аналитической линии В 249,68 нм (♦) и фонового излучения (■), а также среднеквадратичного отклонения S фонового излучения (x) и отношения сигнал/шум I/S (▲) от ширины a входной щели спектрального прибора

В результате реализации предложенных аппаратурно-методических подходов существенно увеличено отношение сигнал/шум, что в итоге позволило разработать способ прямого анализа жидких объектов различной природы, ПО которого (рассчитанные по 3σ критерию, где σ – среднеквадратичное отклонение логарифма интенсивности линии в холостом опыте) находятся на уровне мкг/л при нанесении на электрод 10 капель по 10 мкл каждая, что видно из табл. 2 на примере некоторых элементов.

Следует отметить, что диапазон линейности градуировочных графиков составляет более 4 порядков величины определяемых содержаний элементов, хотя принято считать, что для всех источников возбуждения спектра, кроме ИСП, данный параметр не может превышать 2-3 порядков. В табл. 2 приведены также ПО элементов, достигаемые другими спектральными методами, наиболее часто используемыми в анализе жидких биологических проб. Из сравнения представленных данных видно, что разработанный способ имеет сопоставимые ПО, а в некоторых случаях превосходит указанные методы. В то же время его преимуществами являются аппаратурно-методическая универсальность в отношении макросостава проб, а также возможность проведения прямого определения большого набора элементов в широком диапазоне содержаний в биологических жидкостях.

Таблица 2. Пределы обнаружения (мкг/л) разработанного способа и наиболее распространенных методик анализа биожидкостей

элемент	Д-АЭСА-СО данная работа	ААСА-ЭТА				АЭСА-ИСП				МС-ИСП			
		[1]	[2]	[3]	[4]	[4]*	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]
Mn	0,1	0,12	-	-	0,5	0,1	1	0,2	0,07	0,2	-	0,01	0,002
Pb	6	0,8	0,8	-	1	0,5	-	7	0,14	-	0,05	0,03	0,013
Cu	0,3	-	0,4	-	0,4	0,1	-	2	0,18	-	0,4	0,1	0,03
Fe	1	-	0,75	-	-	-	1	2	-	1,5	-	-	0,001
Cd	0,3	0,03	0,06	-	0,2	0,08	-	0,3	0,05	-	0,03	0,01	0,008
Ni	2	0,24	-	-	3	3	1	2	-	-	-	0,07	0,017
Zn	0,4	-	-	0,35	-	-	-	2	0,64	1,5	0,6	-	0,001
Cr	3	0,19	-	-	-	-	1	3	-	0,2	-	-	0,003

* с предварительным концентрированием

- данные отсутствуют

- 1.Olmedo P., Pla A. et al. // *Analytica Chimica Acta.* – 2010. – V.659. – P. 60–67.
- 2.Dlugaszek M., Kaszczuk M. et al. // *Biological Trace Element Research.* – 2011. – V.142. – P. 1–10.
- 3.Burguera-Pascu M., Rodriguez-Archilla A. et al. // *Analitica Chimica Acta.* -2007. – V.600. – P. 214-220.
- 4.Menegario A.A., Gine M.F. // *Spectrochimica Acta Part B.* – 2001. – V.56. – P. 1917-1925.
- 5.Eliades T., Trapalis C. et al. // *European Journal of Orthodontics.* – 2003. – V.25. – P. 103-106.
- 6.Rahil-Khazen R., Henriksen H. et al. // *Scand. J. of clinical and laboratory invest.* – 2000. – V.60. – P. 677-686.
- 7.Wang D., Du X., Zheng W. // *Toxicology Letters.* – 2008. – V.176. – P. 40–47.
- 8.Chicharro J.L., Serrano V., et al. // *British journal of Sports Medicine.* – 1999.– V. 33. – P. 204-207.
- 9.Menegario A.A., Packer A.P., Gine M.F. // *Analyst.* – 2001. – V.126. – P. 1363-1366.
- 10.Batista B.L., Rodrigues J.L. et al. // *Journal of Brazilian chemical society.* – 2009. – V.20. – P. 1406-1413.
- 11.Ivanenko N.B., Ivanenko A.A. et al. // *Talanta.* – 2013. – V. 116. – P. 764-769.

Глава 3. Применение разработанного способа для решения задач анализа жидких биологических объектов

Кроме сравнения параметров плазмы в случаях возбуждения спектра водных растворов элементов и реальных проб, отсутствие матричного влияния было также проверено путем сопоставления результатов, получаемых при прямом анализе сыворотки крови, когда на электрод наносилось различное число капель пробы (1 и 5 по 10 мкл каждая), что, естественно, соответствовало разному количеству биоматрицы в сухом остатке, и при анализе той же пробы (10 капель) после кислотной минерализации с необходимым для этого разбавлением пробы. Как видно из табл. 3, результаты, полученные в этих трех случаях, практически совпадают, что подтверждает универсальность методики в отношении анализа жидких биопроб с различным составом матрицы.

Для оценки правильности получаемых результатов с помощью разработанного прямого способа Д-ЭАС-СО было проведено их сравнение с результатами других методов, указанных в табл. 3 (с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ «Методы анализа состава вещества»), для которых образец необходимо было предварительно минерализовать в микроволновой печи. В этом случае (концентрации пересчитаны на исходный образец) также наблюдается удовлетворительная согласованность результатов.

Таблица 3. Результаты анализа образца сыворотки крови различными методами

метод	проба	элемент					
		Cd	Cu	Fe	Mg	Pb	Zn
		концентрация, мг/л					
Д-ЭАС-СО	исходная сыворотка, 10 мкл	0,005 ±0,002	0,8 ±0,2	1,5 ±0,3	18 ± 2	<0,06	0,11 ±0,03
Д-ЭАС-СО	исходная сыворотка, 50 мкл	0,0045 ±0,0009	0,6 ±0,1	1,2 ±0,2	18 ± 2	0,04 ±0,01	0,12 ±0,02
Д-ЭАС-СО	минерализованная сыворотка, 100 мкл	0,004 ±0,001	0,7 ±0,2	1,1 ±0,2	14 ± 2	<0,06	0,16 ±0,03
АЭС-ИСП	минерализованная сыворотка	<0,005	0,60 ±0,06	1,5 ±0,1	16 ± 1	<0,04	0,14 ±0,01
ААС-ЭТА		0,0038 ±0,0002	0,65 ±0,04	-	-	0,035 ±0,002	0,12 ±0,01
РФА-ПВО		-*	0,8 ±0,1	1,0 ±0,2	-	-*	-*

- элемент не определялся

-* элемент не был определен (отсутствовал аналитический сигнал)

Проверка разработанного способа так же была осуществлена по методу «разбавления и добавок» на примере анализа слюны. На рис. 8 для примера представлен участок градуировочного графика для Ti, построенный по стандартному водному раствору. На графике также показаны точки, полученные в результате анализа исходного образца цельной слюны (содержание Ti составило 57 мкг/л; точка 1), того же образца, но разбавленного водой в два раза (что приводит к уменьшению содержания как аналита, так и биоматрицы; точка 2), и исходного образца с внесенной в виде водного раствора добавкой определяемого элемента (увеличивающей концентрацию на 60 мкг/л; точка 3). Из рис. 8 видно, что экспериментальные точки удовлетворительно легли на градуировочную прямую, что подтверждает правильность разработанного способа и отсутствие матричного влияния.

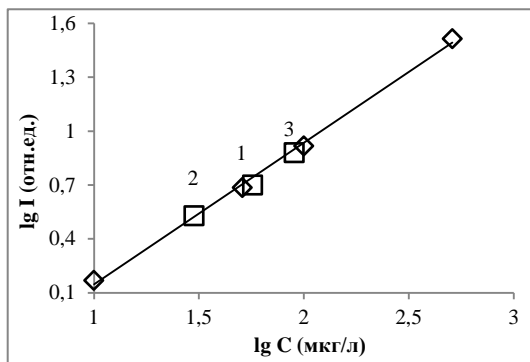


Рисунок 8. Участок градуировочного графика для Ti ($\lambda = 295,61$ нм) (\diamond) с точками, полученными при анализе исходной пробы слюны, разбавленной пробы и пробы с добавкой (\square).

Разработанным способом был проведен микроэлементный анализ 60 образцов слюны. Полученные данные были подвергнуты статистической обработке с целью выявления вида частотного распределения. При построении экспериментальных распределений содержаний элементов в слюне (рис. 9) и проверке гипотезы о нормальном законе выяснилось, что для большинства элементов (Fe, Na, Mg, B, Si, Al, Cu, Ti, Zn, Mn) значение χ^2 -критерия (для $n=60$, $f=k-3$, $k=8$, $P=0,95$) существенно больше критической величины, равной 11,1, что отвергает данную гипотезу (одновременно с этим, для Ca и P вид распределения не противоречит нормальному).

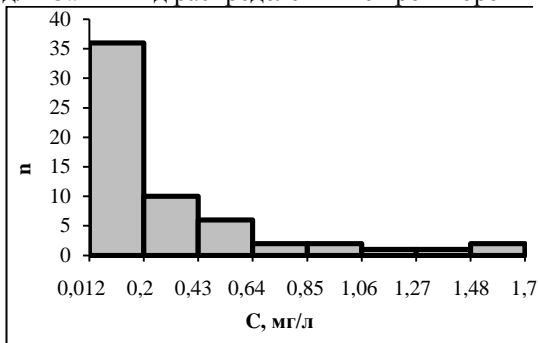


Рисунок 9. Частотное распределение (n – число наблюдений) содержания Fe С в слюне людей; $\chi^2=132641$.

По этой причине производилась проверка гипотезы о логнормальном распределении (нормальном распределении логарифмов содержаний). В этом случае (рис. 10) внешний вид зависимости соответствовал нормальному распределению, а значение χ^2 -критерия было меньше критического. Поскольку частотное распределение содержаний элементов подчиняется логнормальному закону, то в качестве среднего значения следует использовать среднее геометрическое (среднее арифметическое логарифмов).

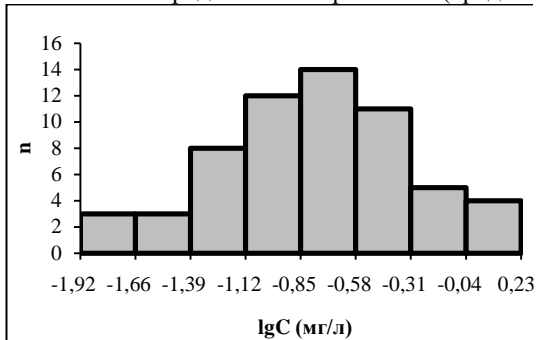


Рисунок 10. Частотное распределение (n – число наблюдений) десятичного логарифма содержания Fe С в слюне людей; $\chi^2=4$.

Полученные экспериментальные данные о содержаниях элементов в слюне были сопоставлены с литературными, что представлено в табл. 4. Из сравнения результатов можно сделать вывод, что, хотя для большинства элементов в литературе наблюдается существенный разброс содержаний, значения, полученные в данной работе, удовлетворительно согласуются с

литературными данными (за исключением Mg, P; однако, в сравниваемых работах образцы слюны центрифугировали и хранили в замороженном состоянии, а данные операции, как показали дополнительные исследования, приводят к уменьшению содержания указанных элементов). Кроме этого, в единичных случаях в спектрах проб были обнаружены линии Ni, Co, Mo и W.

При сопоставлении ПО разработанного способа с диапазонами содержаний элементов в биожидкостях (табл. 4) видно, что Д-АЭС-СО позволяет определять в них содержания всех значимых эссенциальных и значительную часть токсичных элементов.

Таблица 4. Средние значения и интервалы содержания некоторых элементов в биожидкостях и ПО разработанного способа, мг/л

элемент	слюна		плазма/сыворотка крови	цельная кровь	ПО
	данная работа	литературные данные	литературные данные [6]		данная работа
Zn	0,29	1,3 [1]; 0,26 [4]	0,55-1,3	4-8,6	0,0004
	0,014-1,2				
Mn	0,049	0,042 [1]; 0,025 [3]	0,0003-0,001	0,0016-0,075	0,0001
	0,009-0,67	0,0001-0,070 [3, 5]			
Cu	0,01	0,05 [1]; 0,005 [3]	0,7-1,6	0,8-1,3	0,0003
	0,0002-0,72	0,0001-0,012 [3]			
Fe	0,18	0,44 [1]	0,6-1,6	309-521	0,001
	0,012-1,7	-			
P	223	138 [1]; 153 [2]	-	-	0,1
	29-470	110-200 [2]			
Mg	22	6,8 [1], 6[2]	-	-	0,001
	7,2-140	4-9[2]			
Si	2,1	5,36 [1]	-	-	0,3
	0,5-18,3	-			
Ag	<0,077*	-	≈0,002	0,003-2,7	0,0008
Cd	<0,003*	0,00002-0,002 [4-5]	0,0001-0,005	0,0003-0,015	0,0003
Pb	<0,2*	0,0004-0,12 [4-5]	-	0,015-0,27	0,006

- данные отсутствуют

* указана только верхняя граница, т.к. элемент не удалось обнаружить во всех пробах

1. Нотова С.В., Орджоникидзе Г.З., и др. // Вестник ОГУ. – 2003. – Т.6. – С. 146-147.
2. Aizenbud D., Peri-Front Y., et al. // Archives of Oral Biology. – 2008. – V.53. – P.517-522.
3. Watanabe K., Tanaka T., et al. // J. of Trace elements in Medicine and Biology. – 2009. – V.23. – P. 93-99.
4. Wang D., Dua X., et al. // Toxicology Letters. – 2008. – V.176. – P. 40–47.
5. Gil F., Hernandez A.F., et al. // Science of the total environment. – 2011. – V.409. – P. 1172-1180.
6. Токсикологическая химия / под ред. Р.У. Хабриева, Н.И. Калетиной. М.: ГЭОТАР-Медиа 2010, 752 с.

Выводы

1. Использование высокотокового (20 А) дугового разряда между угольными электродами и большого содержания спектрального буфера (0,15 мг NaCl), вводимого на торец электрода, позволило при анализе жидких биологических объектов методом возбуждения спектра СО пробы не только существенно снизить ПО определяемых элементов, но и нивелировать матричное влияние различных биопроб на результаты анализа, проводимого по единому градуировочному графику.

2. Использование суммарной интенсивности (суммы всех интенсивностей, зарегистрированных в течение времен базовых экспозиций) учитывает специфику импульсного поступления элементов пробы в плазму, а увеличение времени базовой экспозиции до 2 с позволяет увеличить отношение сигнал/шум.

3. Продемонстрировано, что при увеличении ширины входной щели от 3 до 30 мкм ширина регистрируемых спектральных линий остается неизменной, а при дальнейшем расширении щели увеличивается, но при этом оказывается меньше ширины щели, что возможно объяснить реализацией частично когерентного освещения входной щели. Увеличение ширины входной щели с 15-20 мкм (рекомендуемого значения для МФС-8) до 50 мкм позволяет существенно увеличить отношение сигнал/шум без значимой потери в разрешающей способности спектрального прибора.

4. На основании проведенных аппаратурно-методических исследований разработан способ определения концентраций элементов в жидких биопробах с ПО, сравнимыми с ПО современных спектральных методов анализа, но при этом позволяющий определять аналиты из малых объемов жидких проб, минуя стадию пробоподготовки.

5. Универсальность (отсутствие матричных влияний) и правильность разработанного способа продемонстрированы путем сравнения результатов анализа исходных и минерализованных образцов биожидкостей, а также сравнением с результатами, полученными другими методами.

6. Разработанный способ использовался для определения содержания микроэлементов в биопробах, в частности, в 60 образцах слюны. При статистической обработке полученных данных выявлен характер распределения содержаний элементов в биологических пробах и определены их интервалы содержаний, которые находятся в удовлетворительном согласии с литературными данными.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список статей, опубликованных в журналах, содержащихся в перечне ВАК РФ:

1. Савинов С.С. О некоторых особенностях регистрации спектра и фотометрирования спектральных линий с помощью цифрового спектрографа на базе МФС-МАЭС / Дробышев А.И., Савинов С.С. //

Приборы и техника эксперимента. – 2013. – № 6. – С. 56-59.

2. Савинов С.С. Возможности атомно-эмиссионной цифровой спектроскопии с дуговым возбуждением спектра в анализе жидких объектов / Савинов С.С., Дробышев А.И. // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 4: Физика. Химия. – 2013. – № 3. – С. 98-102.

3. Савинов С.С. Экспериментальное исследование аппаратной функции и разрешающей способности оптического цифрового спектрографа на базе полихроматора МФС / Дробышев А.И., Савинов С.С. // Оптический журнал. – 2014. – Т. 81, № 1. – С. 44-53.

Список других работ:

1. Савинов С.С. Атомно-эмиссионный цифровой спектрографический анализ слюны // V Всероссийская конференция студентов и аспирантов «Химия в современном мире». – Санкт-Петербург – 18-21 апреля 2011 г. – Тезисы докладов. – С. 31-32.

2. Savinov S. Digital spectrographic analysis of human biological fluids for determination of microelements // International Student Conference "Science and Progress". – Saint Petersburg – 14-18 November 2011. – Conference proceedings. – P. 15-18.

3. Савинов С.С. Атомно-эмиссионный цифровой спектрографический анализ слюны на содержание микроэлементов // Всероссийский конкурс научно-исследовательских работ студентов и аспирантов в области биологических наук в рамках Всероссийского фестиваля науки / Под ред. Б.П. Чуракова. – Ульяновск – 2011 г. – Сборник материалов конкурса. Т. 1. – С. 490-493.

4. Савинов С.С. Влияние параметров фотодиодной регистрации на метрологические характеристики в атомно-эмиссионной цифровой спектроскопии // Шестая Всероссийская конференция молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием «Менделеев-2012». – Санкт-Петербург – 3-6 апреля 2012 г. – Сборник тезисов. Аналитическая химия Т. 1. – С. 278-279.

5. Савинов С.С. Цифровой спектрограф. Особенности регистрации атомно-эмиссионных спектров и фотометрирования спектральных линий / Дробышев А.И., Савинов С.С. // 4 Всероссийская конференция «Аналитические приборы». – Санкт-Петербург – 26-30 июня 2012. – Тезисы докладов. – С. 64.

6. Савинов С.С. Оптимизация параметров регистрации спектра в аналитической атомно-эмиссионной цифровой спектроскопии / Дробышев А.И., Савинов С.С. // Всероссийская конференция по аналитической спектроскопии с международным участием. – Краснодар – 23-29 сентября 2012 г. – Материалы конференции. – С. 119.

7. Savinov S. Study on the effect of sampling and sample preparation on results of trace element content in saliva / Anisimov A., Savinov S. // International Student Conference "Science and Progress". – Saint Petersburg – 12-16 November 2012. – Conference abstracts. – P. 12.

8. Савинов С.С. Возможности цифровой спектрографии с дуговым разрядом в анализе жидких объектов методом сухого остатка / Савинов С.С., Дробышев А.И. // Первая зимняя молодежная школа-конференция с международным участием «Новые методы аналитической химии». – Санкт-Петербург – 17-22 февраля 2013 г. – Сборник тезисов. – С. 97.

9. Савинов С.С. Влияние аппаратных параметров спектрального прибора на аналитический сигнал в аналитической атомно-эмиссионной цифровой спектрографии // Седьмая всероссийская конференция молодых ученых, аспирантов и студентов с международным участием по химии и нанотехнологиям «Менделеев-2013». – Санкт-Петербург – 25 апреля 2013 г. – Тезисы докладов. Аналитическая химия. – С. 154-156.

10. Савинов С.С. Разработка методики пробоподготовки образцов ногтей для цифрового спектрографического определения микроэлементов / Будаляева Р.М., Савинов С.С., Дробышев А.И. // Чотирнадцята міжнародна конференція студентів та аспірантів "Сучасні проблеми хімії". – Киев – 15-17 мая 2013 г. – Збірка тез доповідей. – С. 200.

11. Савинов С.С. Возможности атомно-эмиссионного цифрового спектрального анализа микроэлементного состава слюны как средства клинической диагностики / Савинов С.С., Дробышев А.И. // IX Всероссийская конференция "Химия и медицина" с Молодежной научной школой по органической химии. – Уфа – 4-8 июня 2013 г. Тезисы докладов. – С. 269-270.

12. Savinov S. Optical digital spectrography with arc discharge in microelement analysis of liquid samples // International Student Conference "Science and progress". – Saint Petersburg. – 30 September–4 October 2013. – Conference abstracts. – P. 15.

13. Савинов С.С. Новые возможности атомно-эмиссионной цифровой спектрографии с дуговым возбуждением спектра в анализе жидких проб со сложной матрицей / Савинов С.С., Дробышев А.И. // Восьмая всероссийская конференция с международным участием молодых ученых по химии «Менделеев – 2014». – Санкт-Петербург – 1-4 апреля 2014 г. – Тезисы докладов, Т. 1. – С. 326-327.

14. Савинов С.С. Дуговой атомно-эмиссионный цифровой спектрографический анализ жидких биопроб с использованием МАЭС / Дробышев А.И., Савинов С.С. // XIV Международный симпозиум «Применение анализаторов МАЭС в промышленности». – Новосибирск – 19-21 августа 2014 г. – Материалы симпозиума. – С. 100-104.