ФГБОУ ВПО «САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ» (СПБГУ)

На правах рукописи

Савинов Сергей Сергеевич

НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДУГОВОЙ АТОМНО-ЭМИССИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ ДЛЯ ПРЯМОГО АНАЛИЗА ЖИДКИХ БИОПРОБ

Специальность 02.00.02 – Аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
проф., д. ф.-м. н. Дробышев А.И.

Санкт-Петербург – 2014

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ..... 5

1 МИКРОЭЛЕМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ 9

1.1. Объекты анализа, определяемые элементы и области применения результатов анализа 9

1.1.1. Классификация элементов, присутствующих в организме человека 9

1.1.2. Биомониторинг как функция клинической медицины 11

1.1.3. Связь содержаний элементов в организме с состоянием здоровья человека14

1.2. Возможности и ограничения различных биоматриц для определения микроэлементов в организме 18

1.2.1. Жидкие биологические пробы 20

1.2.1.1. Кровь..... 20

1.2.1.2. Жидкость ротовой полости (слюна)..... 22

1.2.2. Твердые биологические пробы 29

1.2.2.1. Ногти..... 29

1.3. Методы анализа, применяемые для определения содержания микроэлементов в жидких пробах 31

1.3.1. Методы атомной спектрометрии 37

2. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДУГОВОГО АТОМНО-ЭМИССИОННОГО СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА ЖИДКИХ БИОПРОБ..... 43

2.1. Экспериментальная установка для дуговой атомно-эмиссионной спектрометрии 43

2.2. Подготовка угольных электродов к анализу 48

2.2.1. Влияние формы электрода на аналитический сигнал 49

2.2.2. Предварительная очистка электродов обжигом в дуговом разряде 52

2.2.3. Создание защитной пленки на электроде 56

2.3. Оптимизация условий атомизации и возбуждения спектра сухого остатка пробы с торца угольного электрода 59

2.3.1. Выбор оптимального межэлектродного расстояния 60

2.3.2. Легкоионизируемая добавка и ее влияние на отношение сигнал/шум 61
2.3.3. Выбор рабочей силы тока дугового разряда 66
2.3.4. Влияние оптимизированных параметров на кинетику возбуждения элементов и параметры плазмы 68
2.3.5. Спектральный фон и его зависимость от условий возбуждения спектра . 74
2.4. Исследование аппаратных параметров спектрального прибора 77
2.4.1. Влияние ширины входной щели на форму и ширину спектральных линий78
2.4.2. Зависимость реальной разрешающей способности от ширины входной щели спектрального прибора 83
2.4.3. Влияние ширины входной щели на светосилу спектрального прибора и отношение сигнал/шум 86
2.5. Исследование особенностей фотодиодной регистрации спектра 92
2.5.1. Оптимизация способа расчета аналитического сигнала 92
2.5.2. Выбор базового и полного времени экспозиции спектра 98
2.6. Построение градуировочных зависимостей для многоэлементного анализа жидких проб 102
2.6.1. Приготовление стандартных растворов 102
2.6.2. Схема анализа 103
2.6.3.Выбор аналитических линий. Характеристики градуировочных зависимостей 104
2.6.4. Характеристики сходимости разработанной методики 110
2.6.5. Проверка стабильности градуировочных зависимостей 113
2.6.6. Влияние основного аниона и кислотности 114
3. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РАЗРАБОТАННОЙ МЕТОДИКИ116
3.1. Анализ жидких биологических образцов 116
3.1.1. Анализ сыворотки крови 116
3.1.2. Анализ слюны 119
3.1.2.1. Проверка отсутствия матричного влияния 119
3.1.2.2. Оценка влияния условий пробоподготовки и хранения образцов на результаты элементного анализа 122

3.1.2.3. Схема анализа 125
3.1.2.4. Среднестатистические концентрации микроэлементов в слюне 127
3.1.2.5. Выявление влияния субпопуляционных факторов на содержание элементов 131
3.1.2.5.1. Зависимость содержания элементов от пола 131
3.1.2.5.2. Зависимость содержания элементов от курения 133
3.1.2.5.3. Зависимость содержания элементов от количества пломб в зубах ... 134
3.1.2.6. Межэлементные корреляции 136
3.2. Анализ твердых биологических образцов 137
3.2.1. Анализ ногтей 137
3.2.1.1. Схема анализа 138
3.2.1.2. Среднестатистические концентрации микроэлементов в ногтях 140
3.2.1.3. Выявление влияния субпопуляционных факторов на содержание элементов 142
3.2.1.3.1. Зависимость содержания элементов от пола 142
3.2.1.3.2. Зависимость содержания элементов от курения 143
3.2.1.4. Межэлементные корреляции содержаний элементов 144
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 146
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 148
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 150

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для проведения элементного анализа жидких биологических проб наиболее востребованными методами атомной спектрометрии являются атомно-эмиссионная спектрометрия (АЭС) с индуктивно-связанной плазмой (ИСП) и атомно-абсорбционная спектрометрия (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.

Большей универсальностью по сравнению с каждым из указанных методов обладает дуговая АЭС сухого остатка (Д-АЭС-СО) жидкой пробы с торца угольного электрода. Этот многоэлементный метод позволяет, как известно, анализировать малые объемы неорганических проб от 10 мкл (как в методе ААС-ЭТА) и с чувствительностью определений на субнанограммовом уровне, т.е. близкой к методу АЭС-ИСП. Существенным достоинством метода является возможность проведения прямого анализа жидких неорганических проб. Использование высокоинформативной системы фотодиодной регистрации позволяет, в общем случае, увеличить скорость проведения анализа. Однако, в связи с меньшей пороговой чувствительностью полупроводникового детектора (по сравнению с фотоэлектронным умножителем (ФЭУ)) и, как следствие, невозможностью 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. Кроме этого, при использовании оптимизированных для регистрации с ФЭУ параметров 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.

Цель диссертационной работы – расширение аналитических возможностей Д-АЭС 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 аппаратурно-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).

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 – 10^6 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.

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.

1 МИКРОЭЛЕМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

1.1. Объекты анализа, определяемые элементы и области применения результатов анализа

1.1.1. Классификация элементов, присутствующих в организме человека

Элементы, присутствующие в организме человека, можно классифицировать по двум признакам. В целях диагностики здоровья человека их разделяют в соответствии с концентрациями, в которых они находятся в биологических жидкостях и тканях [1, 2]:

- элементы, которые находятся в концентрациях выше 10 мг/л в жидкостях или 100 мкг/г в тканях, рассматриваются как *макроэлементы*;
- *микроэлементы* находятся в концентрациях от 10 до 100 мкг/л в жидкостях или от 0,01 до 100 мкг/г в тканях;
- некоторые элементы находятся в концентрациях ниже 10 мкг/л в жидкостях и ниже 0,01 мкг/г в тканях и классифицируются как *ультрамикроэлементы*.

По способу оказываемого влияния на организм человека элементы разделяются на *эссенциальные* и *токсичные*. Эссенциальные элементы – элементы, необходимые организму для нормального жизненного цикла; большинство таких элементов являются ключевыми компонентами металлоферментов или включены в критические биологические функции (транспортировка кислорода, избавление от свободных радикалов, гормональная активность) [2]. Многие неэссенциальные элементы настолько распространены в окружающей среде, что легко обнаруживаются в биожидкостях и тканях. Некоторые из них безвредны, другие, особенно тяжелые металлы (Pb, Cd, Hg, As), крайне токсичны, т.е. оказывают негативное влияние как на состояние отдельных органов, так и на организм в целом, причем уже при крайне малом содержании [2, 3]. Некоторые элементы (As, Cr, Ni) признаются канцерогенами, при этом токсичность ряда металлов может быть изменена экспозицией другими металлами [4].

Наиболее интересные для клинической медицины и токсикологии элементы (как эссенциальные, так и токсичные) представлены на Рисунке 1.

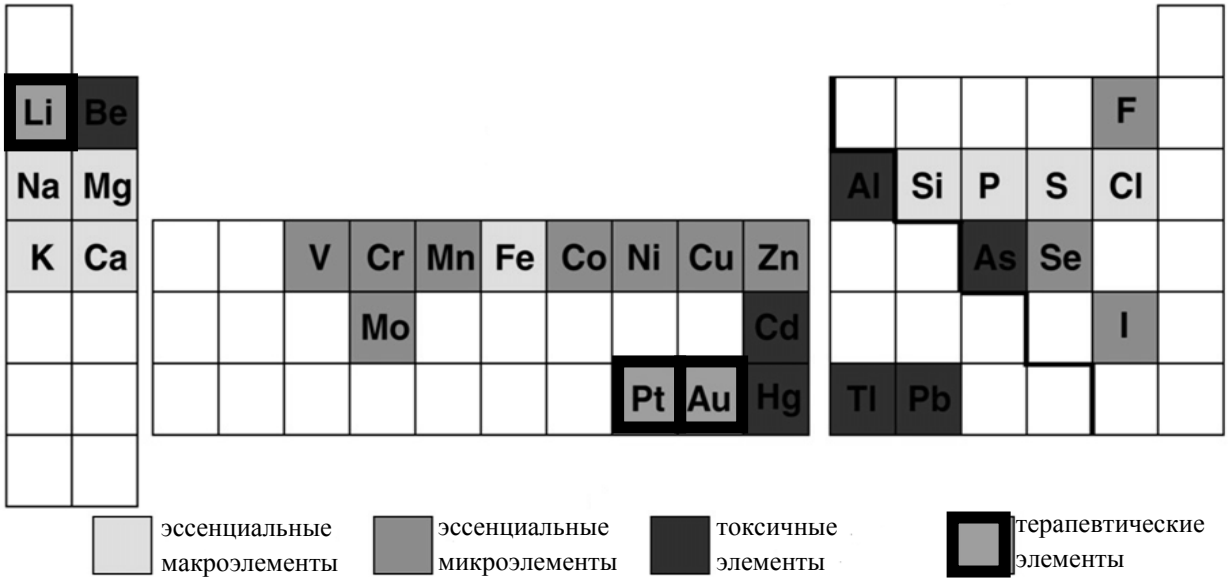

Рисунок 1. Элементы, имеющие большое значение в клинической медицине и охране здоровья [2]

Когда эссенциальный элемент присутствует в концентрации меньше критически необходимой, то возникает его дефицит с вредными для здоровья последствиями [5, 6]. Однако, стоит учитывать, что все элементы (в том числе эссенциальные) могут вызывать токсичный эффект, если они присутствуют в содержаниях больше критической пороговой концентрации [6]. Таким образом, для эссенциальных элементов существуют нижняя и верхняя границы допустимого диапазона; для токсичных элементов определяется только верхняя граница допустимого содержания в организме. Кроме этого, токсичность любого элемента зависит от его концентрации, длительности и способа экспозиции (подверженности источником поступления), а также химической формы, в которой он присутствует [2]. Дефицит питательных веществ также способен вызвать гиперчувствительность к некоторым тяжелым металлам: витамин C – Cd, Cr, Pb; витамин E – Cd, Pb, Cr; Fe – Pb, Mn, Cd; Mg – Cd; P – Pb; Zn – Cd, Pb [4]. Для патологических процессов, вызванных дефицитом, избытком и дисбалансом элементов в организме предлагается обобщающий термин – «микроэлементозы» [7].

Разработка аналитической стратегии для получения качественной и количественной информации об элементах, их формах, взаимодействии и функциях в биологических системах крайне важна для понимания токсикологии и метаболических путей токсичных и эссенциальных элементов [8].

1.1.2. Биомониторинг как функция клинической медицины

В настоящее время скорость увеличения антропогенного воздействия и интенсивность его влияния уже выходят за пределы биологической адаптации экосистем к изменениям окружающей среды и создают прямую угрозу жизни и здоровью человека [9]. Вследствие расширения набора предметов постоянного пользования, увеличения отходов промышленности, интенсификации технологических процессов, производства новых препаратов резко возросла химическая нагрузка на биосферу. Все это открывает возможность экспозиции токсичными металлами не только в рабочих зонах, но и в естественной среде обитания [4]. Загрязнение тяжелыми металлами вызывает особую озабоченность, поскольку их потенциальная аккумуляция в окружающей среде и живых организмах приводит к долгосрочным токсическим эффектам [10].

Связь между экспозицией популяции загрязнителем и результирующим биологическим эффектом является важным аспектом в эпидемиологии окружающей среды [4]. Мониторинг и оценка экспозиции токсичными элементами являются критическими функциями современной клинической диагностики. Данная оценка производится на основе измерения содержания элементов (или их метаболитов) в биологических образцах и называется биомониторингом (БМ). БМ определяется как повторяемое контролируемое измерение химического или биохимического маркера в биообразцах субъектов, подверженных экспозиции в рабочей зоне или в общедоступной окружающей среде [11]. БМ осуществляется согласно стандартизированному протоколу, нацеленному на периодическое детектирование ранних (желательно обратимых)

признаков, которые указывают на действующую экспозицию, способную привести к нарушению здоровья.

Для выявления первых признаков токсичности необходим подходящий биологический маркер (биомаркер) [4]. Под биомаркером экспозиции понимают любой измеряемый параметр, который указывает уровень экспозиции выбранного токсичного вещества; изменения, связанные с данной экспозицией, должны наблюдаться постоянно и при этом количественно, должно иметь место значимое различие между экспонированной и контрольной группами [11-13]. Биомаркеры являются незаменимыми инструментами для идентификации экспозиции, поскольку определение воздействия часто является самым слабым звеном при оценке рисков [4]. Биомаркеры особенно полезны при оценке прогрессирующих заболеваний, симптомы которых появляются вскоре после воздействия токсиканта, поскольку традиционные (ранние) симптомы развития болезни могут отсутствовать, а клинические - быть необратимыми. В качестве примеров типичных биомаркеров экспозиции тяжелыми металлами можно привести содержание Pb в крови, Ni в моче и плазме [4], Cr в моче и сыворотке крови [14], Cd в моче и крови [4, 15], Mn в крови [16, 17], слюне и волосах [13].

Для косвенного измерения экспозиции человека традиционно используется мониторинг окружающей среды, однако, в отличие от БМ, он не дает информацию об обобщенном итоговом потреблении токсичного вещества различными путями, оценке текущей (а, в некоторых случаях и прошлой) экспозиции, и возможности организма противостоять воздействию, вследствие чего оценка рисков может быть менее корректной [11]. Однако, БМ и мониторинг окружающей среды – не альтернативы, а дополняющие друг друга инструменты.

Поскольку антропогенное загрязнение окружающей среды вызывает серьёзную проблему своими негативными последствиями для здоровья человека, БМ стал важным инструментом в медицине. В частности, обнаружены увеличения содержаний Cd, Cr, Ni и Pb в плаценте женщин, проживающих поблизости от завода по рециклингу электронных отходов [18]; Al, As, Ga, In и Sb – в крови и моче работников оптоэлектронной

промышленности [19]; Pb – в крови детей, живущих в зонах с развитым производством свинцовых батарей [20]. Выявлено завышенное содержание As, Cd, Co, Cu, Pb и U в моче лиц, живущих в вблизи рудников и заводов по добыче полезных ископаемых [21]; Pb – в крови детей, проживающих рядом с рудниками [22]; Gd, La, Lu, Nd, Sc и Y – в волосах детей, проживающих в районе добычи редкоземельных элементов [23]. Проживание в густонаселенном городе связано с высокими значениями Mn и Pb в крови и Cd в волосах [10]; крайне высокая концентрация Cd в моче 3-месячных малышей (0,30 мкг/л) и значимая корреляция с уровнем Cd в моче и слюне матерей могут указывать на влияние внутриутробной экспозиции даже в три месяца [24]. Однако, в последние годы наблюдается значительное уменьшение загрязнения тяжелыми металлами во многих индустриальных странах, что может быть причиной значимого снижения их содержания в человеческом организме [10]. Например, допустимый уровень Pb в крови в США был значительно снижен с 600 мкг/л в 1970 для текущего значения 100 мкг/л, который принят центром контроля и предотвращения заболеваний [25].

Однако, окружающая среда является не единственным источником поступления элементов в организм. В настоящее время важно определять металлы и неметаллы в медикаментах, продуктах питания, напитках, поскольку обнаружено, в частности, увеличение концентраций Pb, Cr, Cu, Fe, Ni и Zn в крови у пациентов, которые использовали различные пищевые добавки [26].

Определение содержания отдельных элементов находит применение в медицинской диагностике при изучении влияния медицинских препаратов на основе металлокомплексов [27]. Например, Pt-содержащие препараты, которые используются при лечении определенных видов рака, обладают побочными эффектами (высокой нефротоксичностью, тошнотой и рвотой), поэтому необходим мониторинг уровня Pt в биожидкостях и тканях [28, 29]. Sb-содержащие препараты используются для лечения лейшманиоза, однако, токсичные соединения Sb (III) могут присутствовать в лекарстве как примесь, поэтому необходим как контроль качества, так и исследование принципа их

действия на организм [30]. Li-содержащие препараты находят применение для снятия острого психического возбуждения, однако способны приводить к мышечной слабости, тремору рук, адинамии, диспепсии, вследствие чего также необходим контроль содержания препарата в организме [7].

Другое важное применение биомаркеров (кроме оценки экспозиции) – использование для корректной интерпретации клинических анализов, поскольку они обычно более специфичны и чувствительны, чем большинство клинических тестов, и могут быть более эффективными (например, для выявления связи между ухудшением здоровья и экспозицией токсичными веществами, когда случай впервые фиксируется) [11]. Использование биомаркеров для оценки аккумуляции химических веществ в организме может быть полезно для выявления прошедшей экспозиции, ранних неблагоприятных эффектов и индивидуальной гиперчувствительности, т.е. особенно полезно для оценки и контроля риска долгосрочных последствий [4, 31].

БМ в настоящее время является одним из наиболее развивающихся инструментов, используемых для предупреждения негативного влияния на здоровье, оказываемого экспозицией химическими веществами; он уже широко применяется в медицине во многих европейских странах, в Азии часто используется в токсикологии и оценке здоровья [11, 32].

1.1.3. Связь содержаний элементов в организме с состоянием здоровья человека

Как уже было отмечено выше, дисбаланс элементов в организме приводит к микроэлементозам. Избыток Al способствует образованию в нейронах мозга нейрофибрилл, развитию энцефалопатии, ятрогенной алюминиевой остеодистрофии, алюминозу [7]; содержание Al в эмали здоровых зубов значительно выше по сравнению с кариозными и запломбированными зубами [33]. Хотя B участвует в минерализации костной ткани, влияет на синтез РНК в клетках фибробластов [34], в больших концентрациях он токсичен

(общеклеточный яд); актуальность определения B в крови обусловлена, в том числе, применением B-нейтронозахватной терапии при лечении рака [35]. Ca и P являются основными компонентами диологического апатита (неорганической фазы костей), они играют эссенциальную роль в образовании и восстановлении костной ткани, поэтому используются в качестве терапевтических агентов (наряду с Si, Sr, Zn, Cu, Mg и B) [34, 36]. Экспозиция Cd приводит к поражению почек, костей, эндокринной системы, раку [37-41]; Cd способен заменять эссенциальные элементы (Ca, Zn, Se, Cr и Fe), ингибирует синтез протеинов и ферментов [42-45], отрицательная связь обнаружена между экспозицией Cd матерей и размером ребенка, что может быть связано с аккумуляцией Cd в плаценте с ухудшением поступления к младенцу эссенциальных элементов [46]. Cr входит в состав ДНК, участвует (как и Co) в метаболических процессах и влияет на баланс прооксидантов в крови [47]; в больших содержаниях Cr способен вызывать генные мутации, увеличивает риск рака легких [4, 48], приводит к аллергическому контактному дерматиту (как и Co) [49]. Cu играет эссенциальную роль в биохимических и физиологических процессах, являясь составной частью ферментов и кофакторов (а также Zn и Se) [50, 51], однако при избытке приводит к сердечнососудистым заболеваниям, атеросклерозу, повреждению центральной нервной системы, анемии [52]. Установлен дефицит Mg в моче, крови, слюне, волосах при заболеваниях, связанных с недифференцированной дисплазией соединительной ткани (первичный пролапс митрального клапана, пролапс гениталий, артериальная гипертензия у беременных, эклампсия, преждевременные роды) [53], при ишемии головного мозга уровень внеклеточного Mg сокращается до 41% [54]. Mn участвует в реализации клеточных метаболических механизмов, защите от перекисного окисления липидов, но повышенное потребление связано с серьезными неврологическими ухудшениями [55, 56], в серьезных случаях наблюдается экстрапирамидальные расстройства (нарушение походки или тремор) [57], выявлена зависимость между содержанием Mn в крови и показателями умственного развития младенцев [58]. Стоит отметить, что

симптомы интоксикации Mn, впервые зафиксированные, обычно прогрессируют и становятся необратимыми, вследствие чего ранняя диагностика критична для предотвращения интоксикации [59]. Ni считается одним из основных источников аллергического контактного дерматита [60], обладает канцерогенным свойством [7]. При высоких уровнях экспозиции Pb вызывает энцефалопатию, когнитивное расстройство, нарушение поведения, повреждение почек, анемию, токсичен для репродуктивной системы [61], может приводить к раку почек, желудка, кишечника [62]; увеличение содержания Pb в крови детей связано с сокращением умственного развития [63]. Si отвечает за прочность и упругость тканей, синтез коллагена [7]; существует озабоченность по поводу риска кормления грудью в случае наличия силиконовых биоматериалов (однако, доказательств повышенного содержания Si в молоке женщин с имплантатами выявлено не было) [64]. Sn при тяжелой интоксикации приводит к стойким головным болям, рвоте, психическим нарушениям [7]; неорганические соединения Sn считаются нетоксичными, в отличие от органических [8]. Ti считается малотоксичным элементом, однако, способен откладываться в организме [7]; в связи с высокой стойкостью является основным компонентов имплантатов, однако содержание Ti в тканях крыс с имплантатом было повышено по сравнению с базовым уровнем [65]. Zn участвует в синтезе белка, ДНК, РНК, необходим для активации гормонов тимуса (зобной железы) [66], играет важную роль в защите от опухолей [50, 67]; выявлено, что в нормальных тканях простаты концентрация Zn значительно выше, чем в тканях, пораженных раком [68], содержание Zn во всех отделах мозга значительно занижено у лиц с болезнью Альцгеймера [69].

Помимо одноэлементных определений, в область интересов медицинской диагностики входит многоэлементный анализ. Уровни Ca, Cu и Se в сыворотке крови у пациентов с сахарным диабетом 2 типа ниже, в то время как Si - выше, чем у здоровых людей [70]. Уровни Mg и Mn в конденсате выдыхаемого воздуха увеличиваются во время обострения хронической обструктивной болезни легких на 20% и 50% [71]. Выявлено десятикратное увеличение Al и Si в тканях

головного мозга пациентов с болезнью Бехчета [72]. Концентрации Cd, Cr, Cu, Pb и V в крови пациентов на гемодиализе были увеличены по сравнению с контрольной группой, в то время как уровни Mn, Se и Zn были ниже [73]. Выявлено, что соотношение Zn/Cu и концентрация Cu в сыворотке крови могут быть полезными инструментами для диагностики рака [74]. Концентрации Cr, Mo и Se (поступающих из табачного дыма) были связаны в образцах панкреатического сока с наличием рака поджелудочной железы [75]. Замечено, что Pb и Zn совместно локализуются на участках между кальцинированными и не кальцинированными хрящами и могут быть связаны с остеоартритом [76]. Содержание Cu и Zn в сыворотке крови у голодающих детей значительно ниже по сравнению с контрольной группой; микроэлементный дефицит связан со снижением деятельности супероксиддисмутазы и анемией [77]. Установлено, что содержание Al, Fe, S и Zn в сыворотке пациентов с болезнью Паркинсона снижено, в то время как Cu, K, Mg и P – увеличено по сравнению с контрольной группой [78]. По сравнению с нормой в миокарде левого желудочка больных с ишемической болезнью сердца был отмечен разной степени выраженности дисбаланс микроэлементов (Se, Rb, K, Sr, Ca, Cr, Mn, Fe, Cu, Ni, Zn) [79]. Значительно снижено содержание Zn, Cu и завышено Sr в костной ткани альвеолярного отростка челюстей у больных при хроническом генерализованном пародонтите [80]. Обнаружена высокая отрицательная значимость повышенного содержания Pb и Cd, уровня тревожности, произвольного внимания, объема и прочности памяти; от уровня Zn, Fe и Cu положительно зависят уровень тестостерона и соотношение тестостерона и эстрогена, а также уровень тревожности; уровень кортизола в слюне у подростков обнаруживает положительную связь с концентрацией Cd и Pb в волосах и ногтях, отрицательную – с содержанием Zn в волосах [81]. У литейщиков наблюдается повышенное содержание Mn в различных биообразцах и заниженное – Fe в плазме и эритроцитах, вследствие чего предлагается комбинирование этих параметров для увеличения чувствительности оценки экспозиции Mn [82, 83].

В большинстве тканей (мозг, мозжечок, сердце, печень, поджелудочная железа, селезенка) уменьшение концентраций эссенциальных микроэлементов имеет следующий порядок: Fe> Zn> Cu> Mn> Se> Cr> Co [84]. Наблюдается определенная зависимость концентраций микроэлементов внутри и между различными тканями: Fe-Co были соотнесены в большинстве тканей, Cd-Zn, Cu-Mn, Cu-Zn и Mn-Zn сильно коррелируют в почках, мозге [85]. Отклонения от установленных распределений могут указывать на влияние внешних факторов [86].

Помимо эпидемиологии и клинической медицины, элементный анализ находит применение в судебно-медицинской экспертизе (с места происшествия могут быть взяты, например, отломки костей, кусочки внутренних органов и тканей, различные предметы со следами крови; из лечебных учреждений могут быть направлены биопсийные материалы, моча, кровь, волосы, ногти, – объекты, имеющие важное токсикологическое значение) [87].

Несмотря на возрастающую роль БМ в здравоохранении, все еще существуют сложности, связанные с корректным использованием и интерпретацией различных биомаркеров, поскольку им (так же как любому клиническому тесту) присуща концепция индивидуальной переменчивости [11]. Разработка новых биомаркеров, в том числе с использованием новых биологических образцов и современных методов анализа, является актуальной задачей, поскольку может позволить проводить более информативную оценку экспозиции [4].

1.2. Возможности и ограничения различных биоматриц для определения микроэлементов в организме

Методологические сложности БМ связаны с процедурой планирования исследования, пробоотбором, химическим анализом [88]. Тип биообразца, время отбора, используемые контейнеры, консерванты, температура хранения, способ транспортировки и его продолжительность могут повлиять на качество и

стабильность биомаркеров; по этой причине разработка стандартных процедур и контроль качества являются гарантией достоверности получаемых результатов [11, 89].

Для корректного применения биомаркеров необходимо учитывать ряд факторов, таких как: пол, возраст, диета, социально-экономический статус, условия экспозиции, генная изменчивость и чувствительность [4]. В качестве примеров, иллюстрирующих влияние популяционных факторов, можно привести увеличенное содержание концентраций многих микроэлементов в различных тканях мужчин (за исключением Mn в передней доле мозга и сердце и Sr в печени) [84]. При анализе Ca, Mg, Sr, Zn, Cu и Pb в зубах обнаружены различия в содержании для разных возраста и пола, для Sr – для разных типов зубов [90]; содержание Cu и Zn в определенных местах сетчатки человека меняется с возрастом и зависит от пола (а так же связано с накоплением Cd) [91]. Содержание Ca, Cu, Fe, Mg и Zn в волосах молодых женщин положительно коррелирует с массой тела [92], женщины имеют большее содержание Cr и Ni в биообразцах (кровь, моча, волосы, слюна) и меньшее Mn (по сравнению с мужчинами) [10]. Уровень Mn в сыворотке почти в три раза выше у молодых лиц, чем у пожилого населения [93]. Cd аккумулируется в почках, поэтому его концентрация в моче возрастает с возрастом [24], а также в крови и слюне [10].

На содержание элементов в организме оказывает влияние и рацион питания [94-96]. Потребление свежей рыбы приводит к повышению содержания Cd в волосах, потребление свинины – Cd в слюне, Cr в крови и Pb в моче, курицы – Mn в крови [10].

Большинство клинических методов, которые используются в диагностике дисбаланса микроэлементов или в оценке экспозиции токсичными элементами, полагаются на анализ крови/сыворотки/плазмы и/или мочи. Однако, выбор подходящего образца зависит от ряда факторов, таких как токсикокинетика (время появления и время пребывания биологического параметра), удобство и инвазивность процедуры отбора, возможность загрязнения образца [2]. Инвазивные методы основаны на использовании образцов крови, тканей легких,

костного мозга, амниотической жидкости, тканей печени, костей, фолликулярной жидкости и жировых тканей; неинвазивные методы предполагают использование выдыхаемого воздуха, слюны, семенной жидкости, мочи, мокроты, волос, ногтей, экскрементов, грудного молока [4, 11, 97-99]. Несмотря на большую предпочтительность пациентами неинвазивных образцов, важно использовать весь потенциал доступных биоматриц. Однако, когда выполняются инвазивные тесты (или тесты, которые способны нанести риск здоровью испытуемого или оператора), БМ должен быть выполнен на высочайшем профессиональном уровне [11].

1.2.1. Жидкие биологические пробы

Жидкие биологические среды (кровь, моча, слюна), состав которых отражает кратковременные изменения, являются более информативными при клинической диагностике последствий профессионального воздействия и клинически выраженных дисэлементозов (патологий человека, обусловленных дефицитом эссенциальных элементов, избытком как эссенциальных, так и токсических микроэлементов, а также дисбалансом макро- и микроэлементов) [100, 101].

1.2.1.1. Кровь

Кровь является наиболее широко распространенным образцом для определения большинства химических веществ, в том числе микроэлементов, из-за того, что она имеет постоянный контакт с внутренними органами; микроэлементный состав крови первым реагирует на изменение уровня содержания тяжелых металлов [102].

Несмотря на то, что определение содержания ряда макро- и микроэлементов в крови не может в полной мере отражать их концентрации в организме ввиду деятельности эндокринной, вегетативной и других систем, обеспечивающих гомеостаз, определение токсичных элементов в крови важно в диагностике

интоксикации, имеющейся в момент пробоотбора [103]. БМ элементов в образцах человеческой крови является важным инструментом для оценки состояния здоровья; для определения наиболее значимых элементов в крови (таких как Pb, Cd, Zn, Se, Hg) аналитические методики разработаны и апробированы, установлен набор референтных данных для различных географических регионов [104-109].

В настоящее время интерес исследователей направлен на определение микроэлементов (в том числе тяжелых металлов) как в цельной крови, так и в ее фракциях. Из последних наибольшую значимость представляют плазма крови – жидкая часть крови, в которой находятся форменные элементы (обычно получаемая путем центрифугирования цельной крови), и сыворотка крови – жидкая часть крови (плазма) без форменных элементов и фибрина, (образующаяся при их отделении в процессе свёртывания крови вне организма) [110].

Кровь (и ее компоненты) – наиболее широко используемая матрица для мониторинга экспозиции тяжелыми металлами в профессиональной токсикологии и эпидемиологии окружающей среды [31]. По сравнению со всеми биожидкостями и тканями содержание Se в сыворотке является лучшим индикатором кратковременного статуса элемента и отражает поступление, связанное с приемом пищи [111]. Типичные биомаркеры тяжелых металлов, позволяющие измерить усвоенную организмом дозу: содержание Pb в крови, Hg в крови, моче, Ni в моче, плазме [4], Cr в сыворотке и моче [14]. Обычно концентрация элементов в крови отражает текущую экспозицию, как, например, Cd (хотя также является индикатором нагрузки Cd на организм) [15, 47], Pb (уровень в костях, отражающих 90-95% нагрузку на организм у взрослых, может быть более подходящим биомаркером) [4]. Исследования биомаркера Mn также сфокусированы на концентрации Mn в крови (на примере крыс выявлен факт значительного повышения концентрации после введения Mn с пищей) [16, 17]. Показано, что изменения в содержании Mn в слюне и в крови являются воздействие-доза связанными (выявлено значительное (p<0,05)

завышение содержания Mn в группе сварщиков с 5-10 летним стажем, чем у сварщиков со стажем меньше 5 лет) [59].

К недостаткам крови как биоматрицы для микроэлементного анализа стоит отнести существенно влияние субпопуляционных и индивидуальных факторов. Курильщики имеют завышенное значение Cd в крови по сравнению с некурящими ($C_{г.с.}$=0,67 мкг/л (n=48) и 0,29 мкг/л (n=82) соответственно), найдена корреляция между концентрацией Au и золотыми стоматологическими вставками (2,9 и 0,85 мкг/л Au у тех, кто имел 8 и 4 вставок), между Hg и Ag в крови и стоматологическими амальгамными вставками ($C_{г.с.}$=0,067мкг/л Ag и 1,6 мкг/л Hg у людей со вставками (n=81) против 0,029 мкг/л и 1,0 мкг/л (n=49) соответственно), у людей (n=27), употреблявших морепродукты за 48 часов до взятия образцов, концентрация As составила 1,2 мкг/л (против 0,5 мкг/л в контрольной группе (n=103)) [112].

Существенным недостатком использования крови (в том числе для микроэлементного анализа) является инвазивность отбора проб, в связи с чем интерес исследователей в настоящее время смещается в сторону использования других биоматриц.

1.2.1.2. Жидкость ротовой полости (слюна)

Идеальный клинико-диагностический метод заключается в достоверном определении диагноза по результатам анализа, простом и недорогом методе отбора проб, вызывающем минимальный дискомфорт для пациента, простой диагностической платформе [113]. Одним из неинвазивных образцов, пригодных для биомониторинга, является слюна.

Большая часть ротовой жидкости выделяется из трех пар основных слюнных желез, каждая производит отдельные жидкости (околоушная – серозную, подчелюстная – серозно-слизистую, подъязычная – слизистую); минорными источниками, влияющими на состав ротовой жидкости, являются десневые щели и слюнные каналы (расположенные на языке, щечной слизистой оболочке и небе)

и носоглотка [114]. Вследствие этого, анализ цельной (смешанной) слюны обычно более предпочтителен, поскольку в определенной мере снимает указанные различия в составе [10].

В естественных условиях, здоровый взрослый человек производит 500-1500 мл слюны в день со скоростью 0,05 мл/мин во время сна, 0,5 мл/мин при бодрствовании и 1-6 мл/мин при жевании [115]. Основным компонентом слюны (98%) является вода, в состав также входят органические и неорганические вещества [116]. Из электролитов в слюне больше всего Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cl^-, HCO_3^-, HPO_3^{2-} [117, 118]; они выделяются слюнными железами из плазмы посредством фильтрации, но из-за различной энергии реабсорбции содержание некоторых ионов в слюне изменяется, т.е. слюна не просто является копией плазмы, а имеет собственные химические и биохимические свойства (что открывает новые возможности ее использования в клинической диагностике) [59, 116]. Органические компоненты слюны (мочевая кислота, креатинин, глюкоза, холестерин, лактат), в том числе белки, ферменты (амилаза, альбумин) и гормоны (кортизол, тестостерон) образуются секреторными клетками [117, 118]. Перенос соединений из плазмы в слюну может также происходить посредством ультрафильтрации через пустоты между клетками, просачивания через десны и слизистую оболочку, селективного транспорта через клеточные мембраны [10, 118].

Некоторые системные заболевания, медицинские препараты и психотропные вещества, влияющие на центральную и периферическую нервные системы, способны изменять состав слюны [115]. Циркадный (суточный) ритм определяет объем слюны, ее количественный и качественный состав; диета, возраст, психологический статус, гигиена полости рта, физические упражнения, гормональные изменения тоже привносят вклад в состав слюны [119, 120]. Как следствие, состав слюны меняется как количественно, так и качественно – это основное различие между ротовой жидкостью и плазмой крови (в которой концентрация различных компонентов обычно изменяется в узком диапазоне). Перечисленные факторы в определенной степени ограничивают использование

слюны, однако, они могут быть и достоинствами, т.к. имеется возможность выявлять каждый из перечисленных факторов при условии неизменности остальных [11].

Хотя слюне «не хватает драматизма крови, искренности пота и эмоциональной привлекательности слез» [121], в настоящее время возрастает спрос на недорогие, неинвазивные и простые в использовании объекты. Слюна отражает уровень веществ, введенных в организм, является индикатором эмоционального, гормонального, иммунологического, неврологического статусов, питания и нарушения обмена веществ [113]. Слюна может быть использована для исследований и диагностики оральных и системных заболеваний, связанных со слюнными железами (синдром Шегрена, синдром Беше, доброкачественные и злокачественные опухоли полости рта, заболевания пародонта, кариес), стала полезным инструментом для изучения некоторых основных проблем в области физиологии [43, 113, 122, 123]. Комплексный анализ слюны может иметь важное значение для патологии и диагностики системных заболеваний, т.о. слюна является дополнительным (а иногда и альтернативным) источником медицинской информации, повышающим точность диагноза [124]. Многие компоненты крови также присутствуют в слюне, делая ее индикатором состояния крови, а также остальных частей тела (обнаружены корреляции между содержанием элементов в слюне и в других биопробах, в частности Cd в волосах (ρ=0,201 p<0,01), Cr в моче (ρ=0,179, p<0,05), Ni в волосах (ρ=0,248, p<0,05) [10], Hg в волосах (ρ=0,887, p<0,001) [125], Mn (r=0,545 p<0,05) и Cu (r=0,504 p<0,05) в сыворотке [59]). Вещества, используемые в качестве биомаркеров или индикаторов биологических условий, могут быть обнаружены в слюне [117, 124]. Определение в слюне тяжелых металлов может использоваться в мониторинге влияния окружающей среды и профессиональных загрязнителей [10, 11, 126].

Интерес исследователей к слюне вызван рядом преимуществ ее использования по сравнению с другими биообъектами [59, 113, 115, 127]:

- неинвазивность пробоотбора (слюна является более легкополучаемым образцом в случаях, когда донорами выступают дети, инвалиды, пожилые люди и тревожные пациенты);
- простота пробоотбора (не требуется специальной классификации лаборанта, меньший риск заражения ВИЧ или гепатитом);
- легкость производимых манипуляций (отсутствие свертываемости);
- меньшая стоимость хранения и транспортировки;
- возможность отбора большего объема пробы;
- возможность частого пробоотбора (осуществления мониторинга).

Одной из функций слюны является защита от кариеса, вследствие чего элементный анализ слюны находит широкое применение в стоматологии. Обнаружено, что соли некоторых металлов (Cu, Ni, Mg, Co, Mn, Al, Fe, Cr, Ag, Au) способны предотвратить или подавить образование кислот (т.е. обладают кариостатическими свойствами) [128]. Замечено, что в присутствии ионов Cu значительно уменьшается растворение Ca и P из зубов [129]. Показано, что содержание Cu и Co влияет на размножение штаммов Lactobacillus Acidophilus (кислотопродуцирующих лактобацилл) [130]. Выявлено, что среднее содержание Cu, Pb и Na значительно выше в группе лиц, имеющих кариес [131]. Исследование [132] показало в группах детей с кариесом снижение содержания Ca, содержание в смешанной слюне неорганического P достоверно увеличивается в группах детей с суб- и декомпенсированными формами кариеса (по сравнению с группой детей с интактными формами), уровни экскреции Na и K превышают физиологические пределы. Обнаружено, что содержание Cu возрастает с увеличением пораженных кариесом зубов (также показано, что у мальчиков содержание Mn в слюне больше, чем у девочек, уровень Mn положительно коррелирует с возрастом) [133].

Слюна нашла применение в мониторинге прочих болезней полости рта. Выявлено, что концентрации Ca и Zn в слюне и жидкостях из десневых щелей

различны в группах пациентов с остеопорозом и остеопатией (что может отражать статус костных заболеваний) [134]. Коэффициент Ca/P является одним из маркеров для определения степени тяжести и эффективности лечения больных хроническим генерализованным пародонтитом [135]. В слюне обследуемых пациентов с заболеваниями полости рта после лечения существенно возросло содержание электролитов (Ca^{2+}, PO_4^{3-}, Cl^-), выявлена тесная связь состояния полости рта и желудочной секреции [136].

В стоматологической практике широко используются различные виды зубных протезов для замены естественных зубов, однако, будучи помещенными на длительный период времени, они подвергаются воздействию слюны, пищи и напитков, вследствие чего возможно высвобождение из них тяжелых металлов. Обнаружено, что выдерживание в искусственной слюне стоматологических композитов на основе стекла вызвало выщелачивание Ba и Sr [137]. Сплавы на основе Ti и Cr в искусственной слюне подвержены коррозии (особенно при увеличении доли Cr) [138]. Сразу после стоматологических процедур увеличивается содержание Cr и Ni в слюне (при этом различий между типами используемых ортодонтических аппаратов не выявлено) [139]. Hg является основным (порядка 50%) компонентом зубных амальгам, вследствие чего последние могут быть источником экспозиции Hg [140]: обнаружено, что при увеличении количества амальгам возрастает содержание Hg в слюне [141]; при этом концентрации Hg в слюне людей, имеющих стоматологические амальгамы, значительно выше (и положительно зависели от количества амальгам), чем в образцах волос [125].

В качестве примеров использования микроэлементного анализа слюны для выявления прочих заболеваний можно привести следующие. В [142] показано, что в группе людей с расстройствами вкуса концентрация Cu и Zn была значительно ниже, чем в контрольной. Изучение состава слюны позволило выявить дисбаланс микроэлементов при поверхностном гастродуодените: содержание эссенциальных Zn и Cu в слюне было сниженным, установлено снижение экскреции Pb, аналогичные закономерности наблюдались и для

сыворотки крови [143]. В [144] отмечено усиление агрессивности слюны детей с хроническим гастродуоденитом, достоверно увеличивается соотношение Cd/Zn. В [53] у больных с элонгацией шейки матки выявлено достоверное, в сравнении с контрольной группой, снижение Mg в слюне и в волосах, подтверждающее высокую степень его значения в патогенезе нарушения формообразовательных процессов в соединительной ткани.

Как уже было сказано ранее, антропогенный фактор оказывает влияние на содержание элементов в биообразцах. Авторы [145] выявили, что среднее содержание Pb в слюне детей из загрязненных районов значительно выше, чем у детей из экологически чистого региона, что подтверждает возможность использования слюны как биоматрицы для оценки экспозиции Pb. Найдена положительная корреляция между уровнем Pb в слюне и крови у жителей, живущих рядом со Pb-загрязненной зоной [146]. Обнаружены соединения As у лиц, живущих в области с почвой, естественно богатой As (а также у лиц, принявших As_2O_3 при неудачной попытке самоубийства и получивших противоядие) [8]. В работе [147] было установлено, что дети в районном центре Саракташ (Оренбургская область) отличаются повышенным содержанием в слюне K (в 1,5 раза) и пониженным – P (в 1,1 раза) по сравнению с значениями, установленными для детей Москвы (т.о. имеются отклонения в соотношениях концентраций Ca/P и K/Na в слюне). В той же работе выявлено увеличенное содержание Fe, Zn, Mn, Si, Ti в слюне и Fe и Mn, Cr, Mg, Ca, Al, Pb, Si, Ni в волосах, что, как предполагают авторы, может быть связано с геохимическими особенностями района, а также антропогенными источниками загрязнения (однако, учитывая транспортный поток и экологическую нагрузку на Москву, последнее утверждение вызывает сомнения). В [148] выявлено наличие взаимосвязи между содержанием металлов в слюне и химическим составом питьевой воды: для Ca слюны наблюдалась обратная корреляция с Zn слюны и прямая с сульфатами, хлоридами, жесткостью и Mg минеральной воды, для Mg, Cu и Cd слюны характер зависимости оказался аналогичным, а для Zn – противоположным. В работе [59] обнаружено, что концентрации в

слюне Mn и Cu были значительно выше у сварщиков, чем в контрольной группе, в то время как уровень Zn был значительно ниже (p<0,05), а Cd и Pb – неизменными; содержание в слюне Mn было выше среди сварщиков с 5-10 летним стажем работы (p<0,05); обнаружены межэлементные корреляции в слюне (Mn-Cu, Mn-Zn). Т.о. концентрация Mn в слюне является индикатором профессиональной экспозиции из воздуха рабочей зоны. Чем больше стаж работы металлургов, тем выше содержание Mn и Ni в слюне, которая предполагается как альтернатива крови и мочи при биомониторинге в случае профессиональной экспозиции [10].

Поскольку концентрации определяемых веществ, в том числе металлов, в слюне обычно ниже, чем в крови [10], информативный анализ может быть затруднительным в связи с недостаточно низкими ПО используемых методов, но эта проблема постепенно преодолевается; многие методики, разработанные для анализа сыворотки или плазмы, подходят для слюны с внесением незначительных дополнений [113]. Для слюны как биообразца есть дополнительный ряд ограничений: возможность загрязнения кровью при пробоотборе, отсутствие стандартных образцов и надежных референтных интервалов, низкие концентрации металлов [99, 120].

Хотя определение тяжелых металлов в слюне может рассматриваться как альтернатива анализу крови или слюны [10, 149], эта биожидкость еще не принята широко как инструмент БМ, поэтому рядом исследователей продолжается разработка методик определения биомаркеров в слюне. В частности, ведутся работы по установлению возможности использования слюны для измерения уровня тяжелых металлов с интерпретацией получаемых данных для оценки воздействия на организм [118]. Слюнная диагностика рассматривается как один из наиболее перспективных клинических и коммерческих методов неинвазивного мониторинга статуса здоровья, определения начала заболевания и прогресса лечения [113].

1.2.2. Твердые биологические пробы

К твердым биопробам относятся ткани различных органов, костный мозг, кости, жировые ткани, волосы, ногти, экскременты [4, 11, 97-99]. Из твердых неинвазивных биообразцов наибольший интерес среди исследователей вызывают волосы и ногти человека. Вследствие особого поступления микроэлементов в данные образцы они открывают новые возможности, а именно, позволяют проследить динамику прошедшей экспозиции, чего не могут дать жидкие биологические пробы.

1.2.2.1. Ногти

Ногти (как и волосы) служат информативным материалом из-за особого механизма поступления в них микроэлементов: в период роста они подпитываются циркулирующей кровью, лимфой, внеклеточной жидкостью, к моменту выхода из ростковой зоны затвердевают и жестко фиксируют состав и соотношение накопленных за фазу роста веществ и микроэлементов [150].

Ногти (как и волосы) имеют ряд преимуществ для микроэлементного анализа:

•Неинвазивность пробоотбора (по сравнению с отбором образцов крови и тканей). Выбор образца с неинвазивным пробоотбором немаловажен при обследовании больших групп населения, в случае анализа проб детей и новорожденных [151]. Большое значение выбору неивазивного биообразца уделяется в связи с необходимостью БМ большой группы детей в Кении, где число ВИЧ- инфицированных детей к 2000 году увеличилось на 40 % [152].

•Простота транспортировки. Для образцов крови необходимо использовать специальные емкости с реагентами, разрушающими форменные элементы крови, антикоагулянты (гепарин, ЭДТА, цитрат натрия) [150]; для образцов мочи используют стерильные одноразовые емкости с азотной кислотой для предотвращения бактериального разложения [151].

•Возможность длительного хранения образцов ногтей без специальных условий, в отличие от жидких образцов, таких как кровь, моча, слюна (которые специально хранят в темноте при температуре ниже 4 °C и транспортируют в термоконтейнерах, а при необходимости более длительного хранения пробы охлаждают до -20 °C) [151].

•Возможность оценки долгосрочного воздействия, выявление динамики накопления токсикантов [120, 153]. Из-за малой скорости роста (0,05-1,2 мм в неделю [152]), ногти способны выявить историю экспозиции (в отличие от образцов крови, мочи, слюны) [154].

Ногти имеют преимущества перед волосами, поскольку элементный состав последних зависит от цвета, что ограничивает использование данного биообразца [120, 150]. Так, в частности, уровень Pb, Ni, Cd, Co, Cu значительно выше в темных волосах, окрашенные волосы содержат больше Sr (в 4 раза), Ba, Ca, Mg, W (≈ в 2,5 раза), Mo, Ag и Mn(≈ в 1,5 раза) и меньше V, Zr (≈ в 8 раз), Pb, As, Si, K и Hg (≈ в 2 раза), чем неокрашенные [155] (однако, указанное уменьшение содержания элементов вызывает сомнения, поскольку при окрашивании металлы должны привноситься в волосы из компонентов краски).

Кроме этого, ногти отличаются высоким уровнем бионакопления: содержание ряда металлов (Pb, Cd, Cr, Al, Sn) в ногтях превышает аналогичный параметр в волосах, что используется для БМ воздействия токсичных металлов на организм человека и служит одним из критериев оценки загрязнения окружающей среды [120, 156-159]. Содержание соединений As в ногтях и волосах можно использовать как биомаркер экспозиции As [160].

К достоинствам использования образцов ногтей в медицинской диагностике также относятся выявленные корреляции между уровнями содержаний ряда металлов в ногтях и наличием некоторых заболеваний [161]. Например, выявлена корреляция между содержанием в ногтях Cd, Mn, Cu и наличием гипертонии; психические расстройства коррелируют с повышенными уровнями таких металлов, как Cd, Pb, Mn, Ni, Zn; кожные заболевания – с Cr, Mn, Fe, Ni; диабет – с Cr, Mn, Ni [162, 163].

К недостаткам ногтей как биоматрицы для микроэлементного анализа можно отнести возможность загрязнений вследствие постоянного контакта с окружающей средой и необходимостью пробоподготовки (т.к. большинство аналитических методов ориентировано на анализ жидких проб). Тем не менее, в настоящее время определение микроэлементного состава производных эпидермиса (волосы, ногти) является одним из основных методов оценки элементного статуса популяции [164].

1.3. Методы анализа, применяемые для определения содержания микроэлементов в жидких пробах

БМ, в том числе благодаря развитию аналитических методов, в настоящее время является одним из наиболее развивающихся инструментов, используемых для оценки влияния экспозиции элементами на здоровье [11]. Понимание важности микро- и ультрамикроэлементов в физиологии человека привело к увеличивающейся необходимости в быстрых и точных аналитических методах анализа биологических жидкостей, поскольку аналитическая информация, получаемая с их помощью, дает ценные данные для медицины, фармации и экологии [165]. Один из важных элементов в разработке подходящего биомаркера – качество используемого метода [11]. Улучшение ПО, достоверности, воспроизводимости аналитических методов до сих пор является вызовом для аналитиков. Определение эссенциальных и токсичных элементов при их очень низких содержаниях в различных биологических объектах и объектах окружающей среды требует улучшения аналитических процедур [28]. Другие важные факторы, которые нужно учитывать – время и стоимость анализа, сложность методологии, стоимость и содержание оборудования, опыт оператора [11].

Для определения элементного состава жидких биологических проб используются различные аналитические методы, такие как АЭС-ИСП, масс-спектрометрия (МС) с ИСП, ААС-ЭТА и с пламенной атомизацией (ПА),

рентгенофлуоресцентный анализ (РФА), спектрофотомерия, электрохимические методы [2, 121, 165]; на Рисунке 2 показаны наиболее часто используемые методы при определении некоторых биомаркеров.

Однако, несмотря на аналитические возможности перечисленных выше методов, ни один из них не отвечает всем критериям, чтобы быть многоэлементным, простым, чувствительным, дешевым, пригодным для рутинного анализа [165].

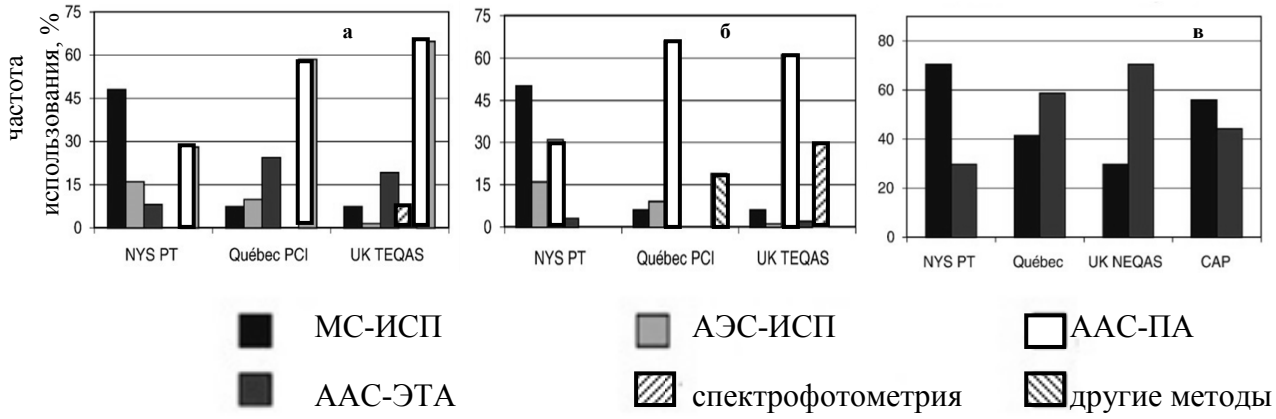

Рисунок 2. Основные методы, используемые для определения Cu в сыворотке (а), Zn в сыворотке (б), Cd в крови (в) различными лабораториями (Национальный институт общественного здравоохранения Квебека (Quebec PCI), Национальная служба внешней оценки качества Соединенного королевства UK TEQAS, Государственный департамент здравоохранения Нью-Йорка NYS PT) [2]

В качестве примера использования **химических методов** можно привести определение Na в сыворотке, основанное на осаждении тройного ацетата Na-U и двухвалентного металла после удаления белков (путем кислотного разложения, либо осаждения трихлоруксусной кислотой), либо одновременном осаждении Na и белков с помощью спиртового раствора уранилацетата Mg с последующим спектрофотометрическим определением уменьшения интенсивности соединения U с ферроцианидом K (возможно также гравиметрическое и титриметрическое определения) [166]. Как показано в той же работе, анализу не мешают избытки (кратность указана в скобках) Ca (60), K (100), NH_4^+ (65) мочевины (600), глюкозы (600), но фосфаты приводят к завышению результатов. В настоящее

время классические химические методы используются крайне редко, поскольку уступают инструментальным по скорости, трудоемкости, возможности потерь и достигаемым ПО; но они полезны при получении высокоточных результатов или в качестве арбитражного метода.

Находит применение и **спектрофотометрия** [135, 138, 167]. Однако, метод не всегда обладает требуемыми ПО даже с применением наиболее чувствительных фотометрических реакций. Еще одним недостатком является одноэлементность, вследствие чего для каждого элементоопределения необходимо проводить отдельный опыт с использованием специфичных реакций, что увеличивает трудоемкость пробоподготовки и время анализа.

Применение **биохимических и биологических реакций** обсуждается в [133]. Благодаря специфичности используемых веществ, этот метод отличается высокими ПО и селективностью, может быть свободен от матричных влияний, но по тем же самым причинам он является одноэлементным и имеет значительную стоимость.

Наиболее простым в исполнении **электрохимическим методом** является потенциометрия с использованием ион-селективных электродов. Данный способ применялся в работе [134] для определения Ca. В настоящее время Na и K в сыворотке рутинно измеряются с использованием автоматизированных анализаторов на основе ион-селективных электродов [2]. Однако, метод имеет ряд недостатков, а именно: неудовлетворительные ПО, невысокая чувствительность при определении микроконцентраций и необходимость сложной пробоподготовки для избавления от органических компонентов, резко ухудшающих работоспособность электродов, а зачастую делающих их использование невозможным.

Электрохимические методы анализа, инверсионная вольтамперометрия (ИВА) в частности, широко используются в определении микроконцентраций токсичных металлов. ИВА обладает рядом преимуществ: низкими ПО (за счет встроенного этапа концентрирования), селективностью, низкой стоимостью и компактностью приборов, возможностью выполнения измерений в реальном

времени. Основная проблема при анализе биологических образцов заключается в адсорбции органических соединений на поверхности электродов, поэтому зачастую необходимо использовать разложение проб [168]. Однако, в [169] представлены пленочные графитовые одноразовые электроды, для использования которых химическое разложение пробы не является обязательным, показана возможность определения Pb и Cd в крови с использованием данных электродов. Для неивазивного биомониторинга разрабатываются микрофлюидные электрохимические приборы, позволяющие, например, проводить определение Pb [126]. Применение в [170] Bi-пленочного электрода для определения Ni и Co в модельных образцах слюны и пота и в реальных образцах необработанной водянистой влаги (внутриглазной жидкости) и спинномозговой жидкости также происходит без пробоподготовки; однако, анализируемые пробы имеют достаточно простую матрицу, лишенную больших количеств органических веществ. В публикациях использование электрохимических методов чаще всего демонстрируется на примере искусственной слюны, воспроизводящей в основном неорганическую составляющую реального образца [52, 145]. Также, несмотря на то, что метод многоэлементный, определение зачастую ограничивается 2-5 металлами.

МС-ИСП добилась значительных успехов в клинической биологии и медицине, вследствие чего многие лаборатории переходят с ААС для определения элементного состава биопроб [2]. Это связано с использованием чрезвычайно эффективного оборудования, что позволяет тщательно устанавливать состояние каждого пациента для целей клинического и судебно-токсикологического определения металлов и металлоидов. Метод позволяет выявить случаи достаточно редкой интоксикации [171]. К достоинствам МС-ИСП относятся многоэлементность вместе с очень низкими ПО, возможность получения информации об изотопах [2]. Сегодня МС выбирается более чем в половине всех исследований, проводимых специально для определения форм элементов [172, 173]. Например, при определении форм As в слюне и моче

достигнуты ПО на уровне мкг/л для каждого из четырех определяемых соединений (As(III), As(V), монометил-As и диметил-As) [8].

Однако, МС-ИСП имеет ряд ограничений. Высокие концентрации органической матрицы и неорганических компонентов в биожидкостях часто приводят к тому, что имеют место матричное влияние и спектральные наложения (особенно при определении элементов с атомной массой меньше 80 – As, Zn, Fe); биоматрица может забить распылитель после продолжительного использования [2, 112]. Поэтому определение элементов в биожидкостях требует стадии пробоподготовки: десятикратного разбавления слюны 1% азотной кислотой для определения Mn, Cu, Zn, Cd и Pb (ПО (мкг/л) составили 0,07 0,18 0,64 0,05 0,14 соответственно) [59], разбавления сыворотки крови для определения Pt [174], 10-кратного разбавления крови аммиаком (ПО, мкг/л: Ag – 0,017, B – 0,06, Cd – 0,1, Co – 0,01, Cu – 0,08, Mn – 0,08, Mo – 0,05, Ni – 0,05, Pb – 0,008, Sn – 0,04, V – 0,015), сухого или мокрого озоления азотной и хлорной кислотами крови для определения Pt [175, 176], микроволнового разложения азотной кислотой грудного молока для определения Cd (ПО=0,02 мкг/л) [24]. Комбинация разбавления образца, особых распылителей и низкой скорости всасывания чаще всего могут уменьшить забивание распылителя и осаждение матрицы на плазменной горелке и конусах [2].

Для уменьшения спектральных наложений используется секторное магнитное поле или МС высокого разрешения; однако, в некоторых случаях использование наивысшей разрешающей силы может привести к потере чувствительности, на практике лишь единичные лаборатории используют секторное поле для клинических целей из-за его высокой сложности и стоимости приборов и содержания [2]. В последние годы столкновительные и реакционные ячейки, а также математическая коррекция часто используются в МС-ИСП для уменьшения наложений при одно- и многоэлементных определениях [2, 24, 112].

Помимо указанных выше недостатков, МС-ИСП, несмотря на многоэлементность, зачастую требует специальных параметров анализа для достижения необходимых метрологических характеристик, которые различны для

разных элементов [112]. Кроме этого, сложность оборудования и методик определения мешают широкому применению метода в рутинном анализе.

В последние годы увеличивается применение рентгеновских методов анализа, особенно **РФА**, который в общем случае является неразрушительным для образцов, обладает достаточно низкими ПО, позволяет проводить микроанализ [177, 178]. Хотя раньше метод использовался преимущественно для анализа твердых образцов, растет число исследований [94, 134, 179], в которых используется принцип полного внешнего отражения (ПВО) флуоресцентного излучения от жидких объектов. РФА-ПВО в настоящее время считается мощным инструментом для анализа многих типов образцов. Метод обладает такими достоинствами, как эффективное возбуждение образцов, крайне низкое фоновое излучение, одновременное детектирование практически всех элементов, простая пробоподготовка или ее отсутствие, малый объем пробы (несколько мкл) [111, 165]. Поскольку форма и расположение капли для разных проб могут различаться вследствие различного поверхностного натяжения, не исключено образование пузырьков (особенно в случае анализа крови), сухие остатки могут быть ассиметричны. Такая неуниверсальность нанесения пробы приводит к интенсивности флуоресценции, обладающей существенным разбросом и плохой воспроизводимостью. Для нивелирования указанного явления предполагается использование внутреннего стандарта [180]. Тем не менее, в [180] при определении Cu, Zn, Fe, Se в сыворотке, разбавленной раствором V в соотношении 1:1, показано, что в качестве внутреннего стандарта может быть использован как вносимый V, так и комптоновский пик, т.е. внесение внутреннего стандарта в пробу не обязательно.

Прямое возбуждение биожидкостей, хотя и не такое эффективное, как после их химической обработки (вследствие увеличения фонового излучения из-за рассеивания фотонов органической матрицей), используется, поскольку оно просто, экспрессно и минимизирует риск загрязнения образца [165]. Однако, в [111] при анализе 10 мкл образца (смесь 200 мкл сыворотки и 10 мкл раствора иттрия – внутреннего стандарта) ошибка определения доходила до 40%; несмотря

на потенциальную многоэлементность, проводилось определение лишь Se. В [165] показана необходимость разбавления образца для одновременного определения элементов с сильно отличающимися концентрациями; при анализе 5 мкл разбавленной раствором Ga (внутренний стандарт) сыворотки крови, высушенной под инфракрасной (ИК) лампой (при высушивании под вакуумом происходило образовании пены) достигнуты следующие ПО (мг/л) Ca 0,42, Fe 0,063, Cu,034, Zn 0,029.

1.3.1. Методы атомной спектрометрии

Развитие современных методов аналитической атомной спектрометрии за последние 40 лет напрямую ответственно за текущее понимание значимости микро- и ультрамикроэлементов в здоровье и болезнях человека [181]. В настоящее время для проведения элементного анализа жидких биологических проб наиболее востребованными являются такие методы атомной спектрометрии как АЭС-ИСП и ААС-ЭТА.

Атомно-флуоресцентный анализ с генерацией гидридов дает альтернативный подход к определению гидридообразующих элементов (As, Se) в биожидкостях с лучшими ПО по сравнению с ААС и АЭС-ИСП [2]. Хотя рутинный опыт применения данного метода ограничен вследствие его одноэлементности и высокой стоимости анализа, он может быть с успехом применен в особых случаях [182, 183].

До недавнего времени **ААС** была основным методом в большинстве клинических лабораторий, специализирующихся на элементном анализе [2]. ААС по-прежнему используется в ситуациях, когда необходимо обеспечить высокую точность результатов. В частности, несмотря на то, что в клинической лабораторной медицине одобряется определение ионов Ca, измерение общего Ca остается клинически востребованным [2], а применение ААС-ПА для измерения общего Ca в сыворотке рассматривается как арбитражный метод [184]. К достоинствам ААС также относятся относительно низкая стоимость

оборудования и меньшие требования к квалификации оператора (по сравнению с методами с ИСП) [2].

Использование химических модификаторов, в частности W [185] или смеси нитратов Pd и Mg [186], вводимых в графитовую печь, позволяет в ряде случаев не прибегать к дополнительной стадии разложения пробы. Разбавление пробы на порядок с успехом используется для создания подобной со стандартными растворами вязкости, как, например, при определении Cu и Zn в сыворотке методом ААСА-ПА [2]. Коррекция фона на основе эффекта Зеемана необходима для точного определения микроэлементов в биологических образцах, для стабилизации температуры используется поперечный нагрев печи с платформой Львова, благодаря чему достигаются изотермические условия [47].

ААС является одним из самых чувствительных методов. Так в [10, 149] при использовании ЭТА, зеемановской коррекции и модификатора ПО (мкг/л) для Cd, Cr, Mn, Ni и Pb составили 0,03 0,19 0,12 0,24 0,83 соответственно в случае анализа слюны. В настоящее время ЭТА в большинстве случаев вытеснила ПА [131, 133, 139, 143, 187, 188], кроме определения щелочных и щелочноземельных металлов [43]. Для определения Hg крайне чувствительной является ААС холодного пара, позволяющая определять содержание Hg в слюне до 0,001 мкг/л с достаточной точностью (отклонения при анализе стандартных образцов не превышали 3%) [125, 141, 189]. Однако, даже при анализе слюны требуется кислотная минерализации в автоклаве [141].

Тем не менее, отмечаются трудности при определении ряда элементов: в [1] из-за ПО Pb, равного 1,5 мкг/л, авторам не удалось определить содержание элемента в большинстве образцов слюны детей, проживающих в районах с повышенным автомобильным потоком. Современные разработки, делающие источники сплошного спектра более доступными, открывают возможности для проведения многоэлементной ААС, однако, его использование еще далеко от рутинного клинического анализа [2]. Т.е. ААС все еще остается одноэлементным методом, что требует увеличения времени и количества пробы при

необходимости определения нескольких элементов. Поэтому в последнее время использование ААС в анализе биологических образцов постепенно сокращается.

Методы **АЭС** не потеряли своей актуальности. Данные методы, как правило, просты, экспрессны, легко поддаются механизации и автоматизации, т.е. подходят для рутинных массовых анализов; при использовании специальных методик ПО отдельных элементов, включая некоторые неметаллы, чрезвычайно низки, что делает эти методики пригодными для определения микроколичеств веществ. Точность АЭС удовлетворяет практическим требованиям в большинстве случаев анализа биожидкостей. Несмотря на достаточно высокие первоначальные капиталовложения, они быстро окупаются благодаря высокой производительности.

Наиболее распространен вариант с использованием ИСП. Применение пробоподготовки (например, мокрая минерализация в случае анализа крови [190]) все же необходимо, чтобы избежать матричных эффектов, которые проявляются в различии процессов подачи проб в плазму [191]. Кроме этого метод обычно требует использования нескольких миллилитров пробы. Вследствие разбавления пробы на стадии пробоподготовки в ряде случаев требуется концентрирование микроэлементов для снижения ПО (например, при мицеллярном концентрировании металлов из 1 мл слюны ПО (мкг/л) составили: Cd 0,08, Cu 0,1, Mn 0,1, Ni 3, Pb 0,5, т.е. не уступали ААС-ЭТА [192]). Тем не менее, АЭС-ИСП рекомендована для анализа биологических жидкостей и препаратов МинЗдравСоцРазвития [193].

Интересна возможность использования лазерной искровой спектрометрии для определения элементов в фармацевтических препаратах [194]. Li рутинно измеряется с использованием пламенной фотометрии для терапевтического мониторинга антидепрессантов [2]. Использование двухструйного дугового плазмотрона позволяет проводить анализ твердых природных и биологических проб после их простого смешения с угольным порошком и спектральным буфером [195, 196].

Из всех источников излучения (кроме ИСП) Д-АЭС (постоянного или переменного тока) с полным испарением СО анализируемых образцов является наиболее подходящим для целей общего спектрального анализа. Атомные спектры, получаемые в этом источнике, относительно просты; при температуре дуговой плазмы достаточно легко возбуждаются последние линии многих элементов, поэтому ПО оказываются удовлетворительными [197]. Поскольку время пребывания элементов в дуге переменного тока больше, чем в дуге постоянного тока, большая продолжительность жизни частиц и достаточная скорость их поступления в плазму позволяют успешно использовать этот источник для определения очень малых абсолютных содержаний элементов. Д-АЭС доказала свою эффективность в анализе аэрозолей [198], неорганических жидкостей [199-201], минерализованных крови [202], волос [203], органов [204].

Применение перечисленных выше методов (в том числе АЭС-ИСП, ААС-ЭТА, МС-ИСП, электрохимических методов) для реальных объектов ограничено матричными эффектами [205]. Справиться с данной проблемой призваны разнообразные способы подготовки пробы: кислотная минерализация [180] (которая существенно упрощается и ускоряется при использовании радиолиза, ультразвука, микроволнового разложения [27, 96]), различные варианты экстракции (с применением наноматериалов [179, 188], капиллярного электрофореза [124, 206], хроматографии [8]). Кроме этого, ограниченный объем биологических образцов заставил исследователей разрабатывать аналитические процедуры, которые требуют малого количества материала для анализа. Неправильные отбор и подготовка проб могут привести к загрязнению или потере аналитов (данные отрицательные эффекты в определенной степени уменьшаются при использовании проточных методов [178, 192, 205, 207]). Естественно, что все эти процедуры увеличивают продолжительность, сложность и стоимость анализа [180].

В случае Д-АЭС существует возможность концентрирования жидких проб путем выпаривания на графитовом коллекторе или последовательного нанесения капель пробы на торец угольного электрода и последующего

анализа СО [199, 200]; последний способ наиболее предпочтителен, поскольку не требует применения дополнительных реагентов, а значит, возможность загрязнения пробы минимальна. Метод нанесения тонкого слоя СО на торец электрода, предложенный Х.И. Зильберштейном [208], является наиболее чувствительным, экспрессным и простым по сравнению с другими способами возбуждения спектра [167]. Данный факт послужил причиной выбора именно этого метода для анализа образцов биологических жидкостей. Д-АЭС-СО позволяет, как известно [200], анализировать малые объемы неорганических проб от 10 мкл (как в ААС-ЭТА) с ПО на уровне мкг/л, т.е. близкими к АЭС-ИСП; существенным достоинством метода является возможность проведения прямого анализа жидких неорганических проб. Использование высокоинформативной системы фотодиодной регистрации изображения спектра – многоканального анализатора эмиссионных спектров (МАЭС) [209, 210] – позволяет, в общем случае, увеличить скорость проведения анализа. Однако, в связи с меньшей пороговой чувствительностью полупроводникового детектора (по сравнению с ФЭУ) и, как следствие, невозможностью 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. Кроме этого, при использовании оптимизированных для регистрации с ФЭУ параметров [200, 201] 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. Последнее подтверждает Таблица 1, из которой видно, что использование данного способа с детектором МЭАС и параметрами, оптимизированными для ФЭУ, невозможно при определении в биожидкостях таких элементов, как Mn, Cd, Pb.

Таблица 1. Сравнение ПО Д-АЭС с МАЭС и параметрами анализа из [200, 201] и диапазонов содержаний элементов в биологических пробах, мкг/л

элемент	ПО	диапазон содержаний	
		слюна [10, 211]	кровь [157]
Ag	30	-	3-2700
Ca	200	6000-12000	-
Cd	100	0,02-2	0,3-15
Mg	200	4000-9000	-
Mn	40	1-70	1,6-75
Pb	200	0,4-100	15-270

- данные отсутствуют

Таким образом, для расширения аналитических возможностей Д-АЭС-СО, а именно, для возможности ее использования в анализе жидких биологических проб необходимо разработать новые подходы и методологию анализа, которые позволят существенно увеличить отношение сигнал/шум и, соответственно, снизить ПО широкого круга элементов до уровней, позволяющих определять все значимые эссенциальные и основные токсичные элементы в реальных биологических объектах минуя стадию пробоподготовки. На достижение указанной цели направлена данная работа.

2. РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ДУГОВОГО АТОМНО-ЭМИССИОННОГО СПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА ЖИДКИХ БИОПРОБ

2.1. Экспериментальная установка для дуговой атомно-эмиссионной спектрометрии

Проведение съемок атомно-эмиссионных спектров анализируемых проб, возбуждаемых в дуге переменного тока, производилось на экспериментальной установке, оптическая схема которой представлена на Рисунке 3.

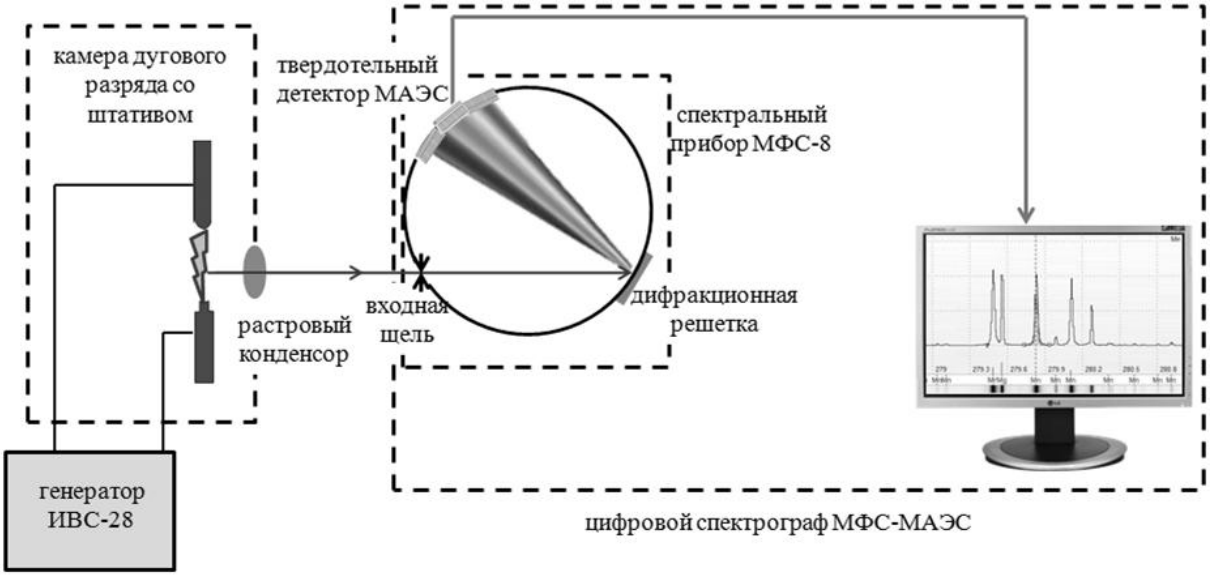

Рисунок 3. Блок-схема спектральной установки с МФС-МАЭС

Суть известной методики Д-АЭС-СО [200] неорганической пробы состоит в следующем: на торец подготовленного (обожженного и с нанесенной защитной пленкой) нижнего угольного электрода 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.

Камера дугового разряда представляет собой специальный металлический шкаф, внутри которого находится штатив, обеспечивающий крепление двух угольных электродов, вертикально расположенных друг под другом. Держатель с

нижним электродом может перемещаться в пределах 40 мм в трех направлениях, перпендикулярных оптической оси, цена деления механизма перемещения нижнего электрода 0,01 мм, воспроизводимость установки аналитического промежутка ±2% [212]. Установка верхнего электрода на оптическую ось производится с помощью выдвижного штатива. Шкаф оборудован системой вытяжной вентиляции для предотвращения попадания в воздух лабораторного помещения вредных для здоровья человека продуктов испарения и окисления материалов электродов и пробы, образующихся в плазме дуги. В процессе горения дуги происходит испарение СО с торца угольного электрода, его атомизация и возбуждение образовавшихся атомов с последующим излучением квантов света.

Электрическое питание дугового разряда переменного тока производилось с помощью генератора ИВС-28, который позволяет создавать разряд с силой тока от 3 А до 10 А с внутренним и до 20 А с внешним реостатами соответственно [213]. Принцип действия источника заключается в преобразовании электрической энергии в импульсы разрядного тока, возбуждающие между электродами аналитического промежутка низкотемпературную плазму. С помощью ИВС-28 можно создавать два различных режима дугового разряда: режим униполярной дуги и режим дуги переменного тока с меняющейся полярностью электродов. Так же возможны два варианта включения генератора: внутренний, при котором пуск и остановка работы генератора осуществляется кнопками, расположенными на его корпусе, и внешний, когда операции осуществляются подачей сигналов от подсоединенных внешних устройств, в частности от управляющего компьютера.

Излучение плазмы дугового разряда, включающее спектр анализируемой пробы, с помощью растрового конденсора фокусируется на входную щель спектрального прибора. Спектральный прибор представляет собой модернизированный полихроматор квантометра МФС-8 с оптической системой Пашена-Рунге с вогнутой дифракционной решеткой (с нарезкой 1800 штрих/мм и обратной линейной дисперсией D_l^{-1}=0,55 нм/мм). Поскольку кроме входной щели

спектральный прибор содержит только один оптический элемент (дифракционную решетку), происходит уменьшение количества рассеянного света и искажения спектра в сравнении с другими оптическими схемами (оптической системой со скрещенной дисперсией, оптической системой Черни-Тернера) [214]. Вогнутая дифракционная решетка и входная щель спектрального прибора расположены на окружности, диаметр которой равен радиусу кривизны решетки (1 м), – круге Роуланда.

Модернизация спектрального прибора МФС-8 заключалась в замене блока выходных щелей и регистрирующих ФЭУ на твердотельный фотодиодный детектор МАЭС (ВМК-Оптоэлектроника) [209, 210]. МАЭС в комплекте с компьютером и программным обеспечением "Атом" [215] является современным средством регистрации спектров, и измерения интенсивностей спектральных линий, зарегистрирован в Государственном реестре средств измерений РФ под №21013-01 и допущен к применению. МАЭС включает в себя многокристальную сборку, блок электронной регистрации, блок питания (Рисунок 4) [216]. Многокристальная сборка длиной 25,6 см состоит из 8 кристаллов фотодиодных линеек, установленных на единое термостабилизированное основание. Стабилизация фотоэлектрических параметров ячеек сборки и снижение порога их чувствительности осуществляются за счет уменьшения температуры линеек и ее флуктуаций с помощью микрохолодильника Пельтье. Каждая линейка (Рисунок 5) содержит 2580 детектирующих фотоэлементов (пикселей), имеющих высоту 1 мм и ширину 12,5 мкм, основу которых составляет полностью открытый фотодиод, определяющий высокую чувствительность в УФ-диапазоне излучения (вплоть до 160 нм). Фокусировка получаемого от вогнутой решетки спектра происходит на детекторе МАЭС, кристаллы линеек которого расположены также на окружности Роуланда, спектральный интервал регистрируемого излучения имеет протяженность от 190 до 340 нм. В течение времени базовой экспозиции (250-15000 мс) на каждом фотодиоде происходит интегрирование заряда, возникшего при падении фотонов регистрируемого излучения, далее накопленные заряды одновременно и быстро переносятся на входные емкости усилителей,

после чего начинается новый цикл накопления сигнала в интеграторах и, одновременно, последовательное считывание выходных сигналов усилителей на выходе линейки с помощью коммутатора. Полученные таким образом сигналы с помощью 16-разрядного аналого-цифрового преобразователя трансформируются в цифровые значения, которые передаются в компьютер и подвергаются дальнейшей обработке уже как цифровое изображение спектра [216-218].

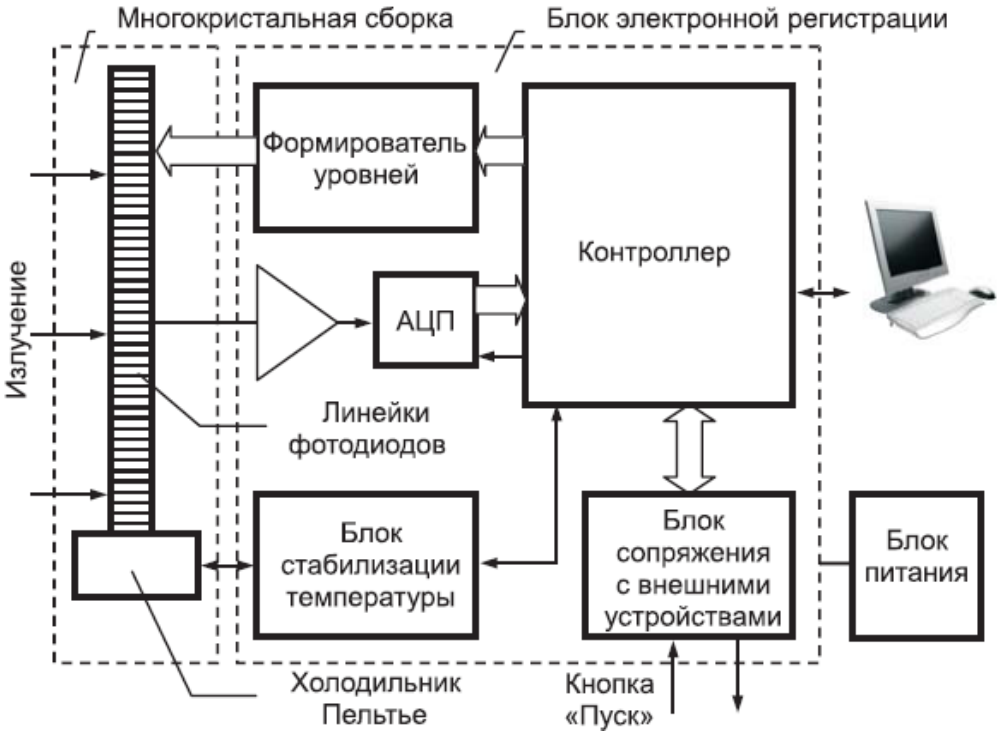

Рисунок 4. Блок-схема анализатора МАЭС и принцип действия [209]

Информация, получаемая с помощью фотодиодного детектора, в определенной степени схожа с данными, которые могут быть получены как с фотопластинки при помощи сканирующего микрофотометра, так и при использовании сканирующего монохроматора с ФЭУ: обычно это большой массив чисел, каждое из которых является результатом измерения интенсивности света на очень малом участке спектра, соответствующем фоточувствительному элементу [218].

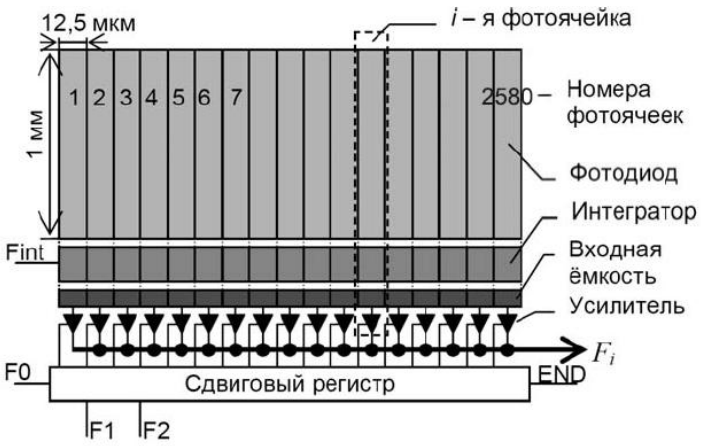

Рисунок 5. Схема линейки фотодиодов [219]

Основные преимущества МАЭС перед фотопластинкой [218, 219]:

- ✓ высокая квантовая эффективность;
- ✓ повышение автоматизации проводимого анализа;
- ✓ прямая регистрация спектра и его визуализация;
- ✓ отсутствие ошибок ручной обработки результатов;
- ✓ широкий динамический диапазон;
- ✓ многофункциональный программный сервис;
- ✓ длительное и просто хранение полученного спектра;
- ✓ существенное сокращение времени анализа.

Основные преимущества перед ФЭУ [218, 219]:

- ✓ высокая квантовая эффективность;
- ✓ одновременная регистрация всего спектрального диапазона;
- ✓ идентификация элемента по нескольким спектральным линиям;
- ✓ возможность анализа формы линии;
- ✓ возможность корректировки способа подсчета площади линии;
- ✓ возможность учета интенсивности фона под линией;
- ✓ возможность автоматической коррекции температурного сдвига.

Важным достоинством фотодиодной регистрации является возможность автоматического учета уровня светового потока фона под спектральной линией, т.е. реализуется возможность измерения ее «чистой» интенсивности *I*. Следует отметить, что использование в качестве аналитического сигнала логарифма

«чистой» интегральной (по всему контуру спектральной линии) *I*, которая прямо пропорциональна величине светового потока спектральной линии, невозможно при использовании прочих детектирующих систем (фотопластинок, ФЭУ).

Поскольку регистрация и визуализация изображения спектра осуществляется на основе цифровых технологий, данный модернизированный экспериментальный спектральный прибор можно назвать цифровым спектрографом, а направление его применения в оптической спектроскопии можно обозначить как атомно-эмиссионная цифровая спектрография. Цифровой спектрографии присущи все достоинства спектрометрического и классического спектрографического методов [197], при этом она во многом лишена их недостатков. Фотодиодная регистрация даёт возможность реализовать разработки, направленные на оптимизацию условий многоэлементного анализа с использованием разных параметров, а также на повышение точности анализа и снижения ПО элементов, что и было осуществлено в работе.

2.2. Подготовка угольных электродов к анализу

Очень удобным материалом для электродов является уголь, поскольку такие электроды легко обрабатываются, производятся в виде продукта высокой чистоты и имеют бедный линиями спектр, а так же обладают хорошей электропроводностью, термоустойчивостью, и, что немаловажно, низкой стоимостью [220, 221]. Использование угольных электродов позволяет во многих случаях достигнуть более низких ПО по сравнению с электродами из других материалов. С угольными электродами, в отличие от металлических, возможно получить высокую температуру плазмы, благодаря высокому потенциалу ионизации и высокой температуре сублимации углерода. В данной работе для изготовления электродов использовались угольные заготовки («Искра» D6x300 0,063 (F), Карботек), имеющие диаметр 6 мм и длину 30 см.

2.2.1. Влияние формы электрода на аналитический сигнал

Угольные стержни нарезаются на электроды длиной ≈ 7 см (меньшая длина электрода неэкономична, поскольку при многократном использовании быстро достигается минимально возможная используемая длина (≈ 1,5 см), электроды большей длины неудобны в использовании в связи с конструкционными особенностями камеры дугового разряда) и обрабатываются с помощью фигурных резцов (фрез) соответствующих форм. Операцию заточки, особенно при массовом анализе, рекомендуется выполнять в один прием – введением конца электрода в направляющую трубку, установленную перед фрезой, которая укреплена на валу электромотора [222]. Необходимо тщательно вытачивать электроды, чтобы на их поверхности не оставалось неровностей и выступов, в противном случае на них может локализоваться разряд, что отрицательно сказывается на процессах испарения пробы и, следовательно, на качестве получаемых результатов. При установке электродов в держателе штатива должны выполняться следующие требования: продольные оси обоих электродов должны совпадать между собой и располагаться перпендикулярно оптической оси спектрального прибора, расстояние между краями электродов должно быть во всех опытах одним тем же [221].

Известно, что форма и размеры угольных электродов влияют на скорость испарения пробы, параметры плазмы и интенсивность линий определяемых элементов [223]. Температура электрода и скорость испарения пробы будет тем больше при одной и той же силе тока, чем меньше диаметр электрода. Уменьшение диаметра электрода также способствует снижению отвода тепла от электродного промежутка, устранению распространения дуги на боковые поверхности электрода. Поэтому опытным путем необходимо было выяснить, какая форма электрода окажется оптимальной.

Для этих целей были изготовлены электроды разной формы и размеров. Верхнему электроду придавалась конусообразная форма (Рисунок 6а). Торцевая часть одного из нижних электродов представляла собой вогнутую поверхность с

диаметром 6 мм (максимальная глубина которой составляла 2 мм) для удобства нанесения на торец капель и предотвращения их скатывания («лунка», Рисунок 6б). Два других типа нижних электродов имели поверхность с диаметром 3 мм с небольшим углублением на торце («усеченный», Рисунок 6в) и с выточенным углублением («усеченная лунка», Рисунок 6г). Поскольку угольные электроды подлежат многократному использованию, при обновлении поверхности путем повторной заточки форма электрода не менялась, как рекомендуется в [221].

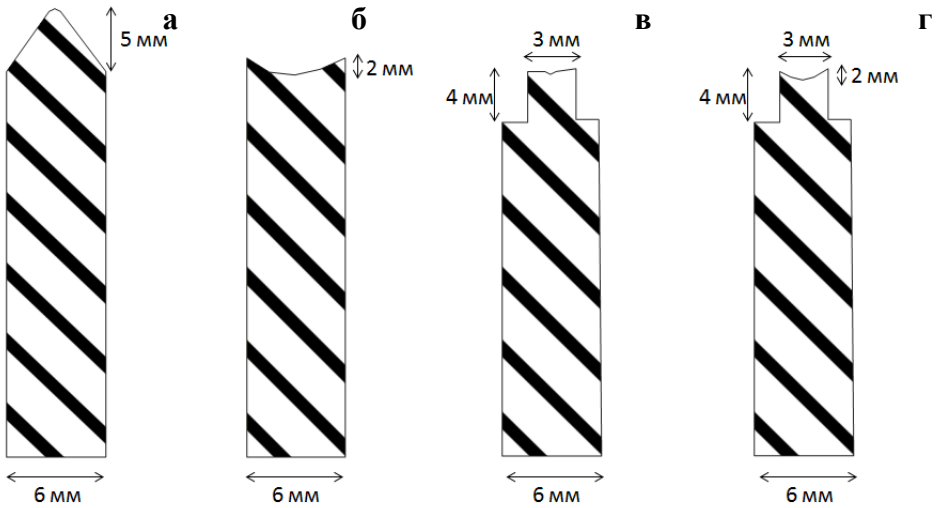

Рисунок 6. Сечения использованных электродов: верхний электрод «конусообразный» (а), нижние: «лунка» (б), «усеченный» (в), «усеченная лунка» (г)

В опыте на каждый из трех типов нижних электродов наносилось одинаковое количество анализируемого водного раствора солей элементов и снимались спектры СО при идентичных условиях по приведенной выше схеме. На Рисунке 7 представленные аналитические сигналы определяемых элементов, полученные при возбуждении СО проб с каждого из трех типов электродов.

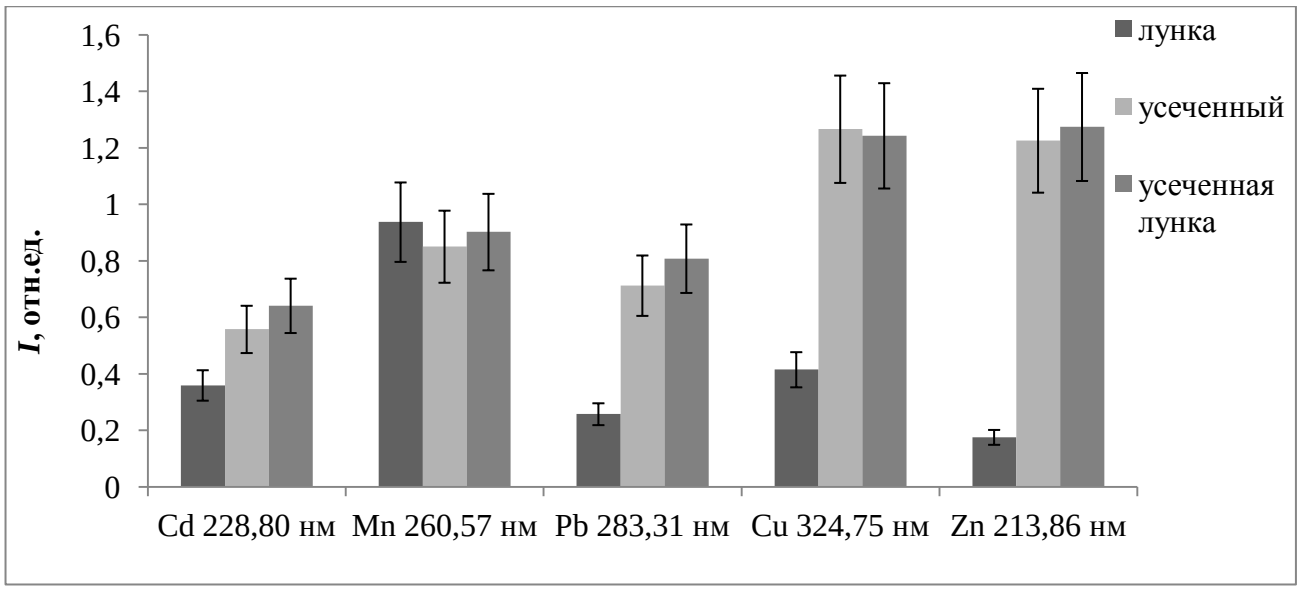

Рисунок 7. Гистограммы интенсивностей *I* спектральных линий ряда элементов для различных форм нижнего электрода

Как видно из Рисунка 7, оптимальной формой нижнего электрода можно признать «усеченный» и «усеченная лунка», так как для этих случаев наблюдаются существенно более высокие значения *I* спектральных линий. Данный факт можно объяснить увеличением плотности тока за счет уменьшения диаметра по сравнению с электродом типа «лунка» при одном и том же значении силы тока (что способствует понижению абсолютных ПО в 4-20 раз [208]). Разница между интенсивностями линий атомов пробы, возбужденной на электродах «усеченный» и «усеченная лунка» незначительна; однако, в последнем случае наносить капли пробы на электрод для получения СО намного удобнее, что и явилось доводом в пользу выбора данной формы.

Еще одним параметром формы электрода является высота усеченной части. Как уже было сказано, при уменьшении диаметра электрода происходит увеличение плотности тока, что приводит к увеличению аналитического сигнала. В связи с чем встал вопрос о выборе оптимальной высоты усеченной части, сравнение проводилось между 4 и 6 мм. В опыте также на электроды каждого типа наносилось одинаковое количество анализируемого водного раствора солей элементов и снимались спектры СО при идентичных условиях. Результаты эксперимента представлены на Рисунке 8.

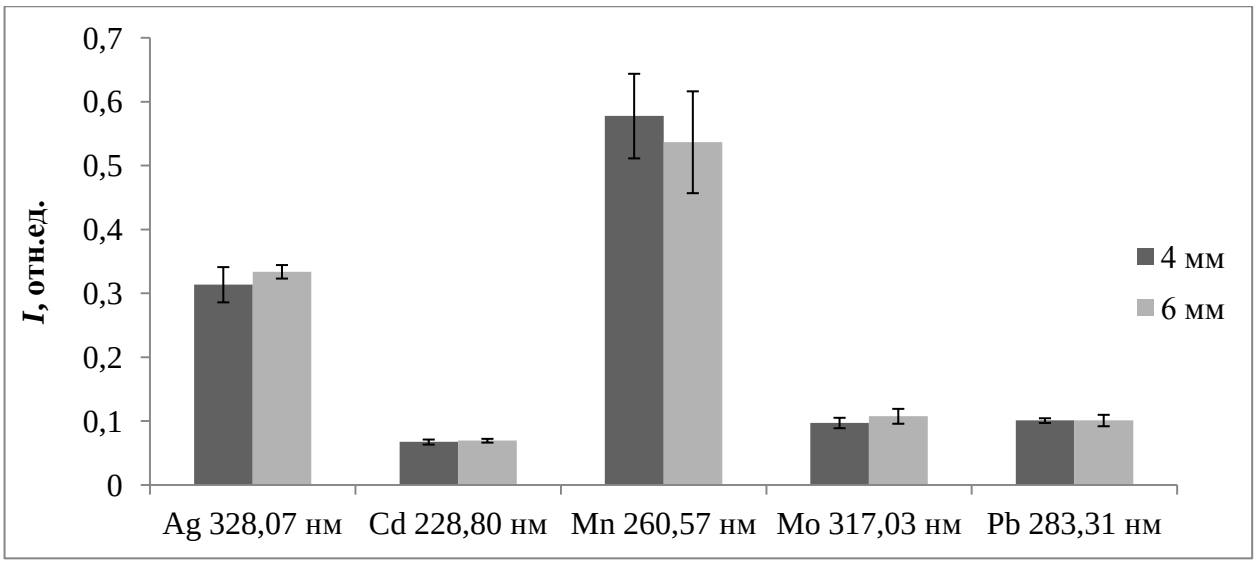

Рисунок 8. Гистограммы интенсивностей *I* спектральных линий ряда элементов для разных высот усеченной части электрода

Из Рисунка 8 видно, что высота усеченной части электрода не влияет на *I* спектральных линий, поэтому невозможно отдать предпочтение какому-либо из двух типов. Однако, электроды с меньшей высотой усеченной части экономичны в использовании, поскольку в этом случае они используются в течение более длительного срока (вследствие уменьшения расходуемой части при выполнении операции перезаточки электродов).

В результате проведенного исследования для последующей работы изготавливались электроды типа «конусообразный» (верхний электрод) и «усеченная лунка» с высотой усеченной части 4 мм (нижний электрод).

2.2.2. Предварительная очистка электродов обжигом в дуговом разряде

Подготовка электродов к работе заключается в очистке заточенной поверхности от возможных загрязнений путем обжига электродов в дуговом разряде для уменьшения величины сигнала «холостого опыта» [201, 221]. Объективное суждение о степени чистоты угольных электродов и эффективности очистки можно получить с помощью кривых выгорания – гистограмм (зависимостей *I* аналитической линии элемента от порядкового номера *N*

зарегистрированного спектра в течение горения дуги). Предварительные эксперименты показали, что часть электродов изначально загрязнена набором элементов, среди которых Cu, Mg, Fe, Ca, Al, Si, B, Ti, Mn. Причем степень загрязненности разными элементами зависит от марки электродов, что видно на Рисунке 9, на котором для примера представлена гистограмма выгорания Mg из электродов различных марок. По результатам сравнительного анализа чистоты электродов были выбраны электроды марки «Искра».

Следует иметь в виду, что различные электроды, даже принадлежащие к одной и той же марке, также могут отличаться по присутствующим в них загрязнениям [224].

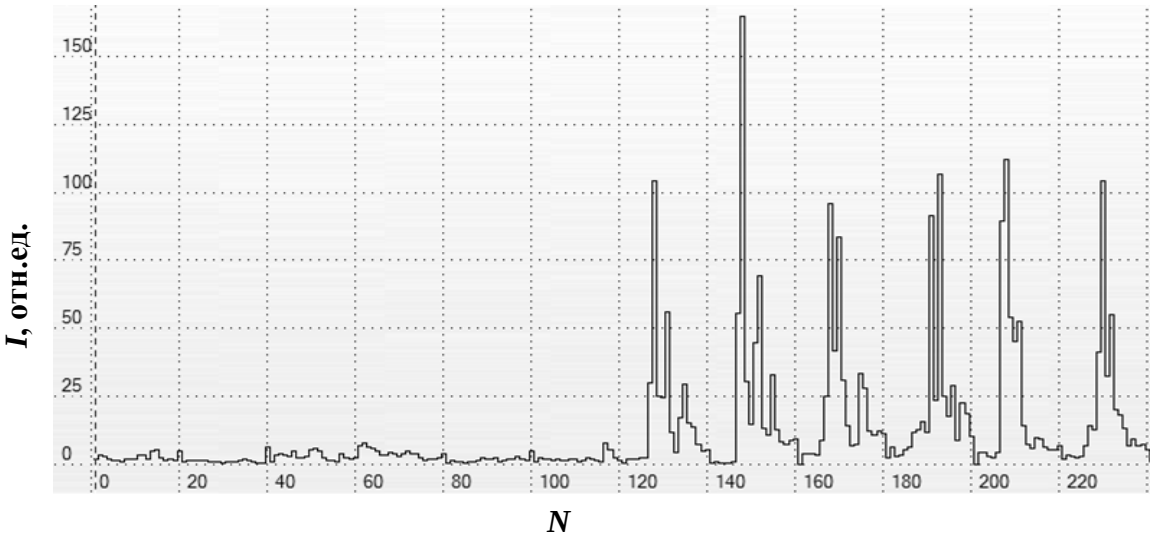

Рисунок 9. Гистограммы выгорания Mg из 18 угольных электродов (6 электродов марки «Искра»; 6 электродов марки «Graphi») при обжиге каждого из них в течение 20 с при силе тока 20 А (каждый спектр *N* соответствует 1 с)

Также в работе была исследована зависимость *I* линий в «холостом опыте» (без нанесения раствора элементов на электрод) от времени предварительного обжига $T_{обж}$, которая представлена на Рисунке 10.

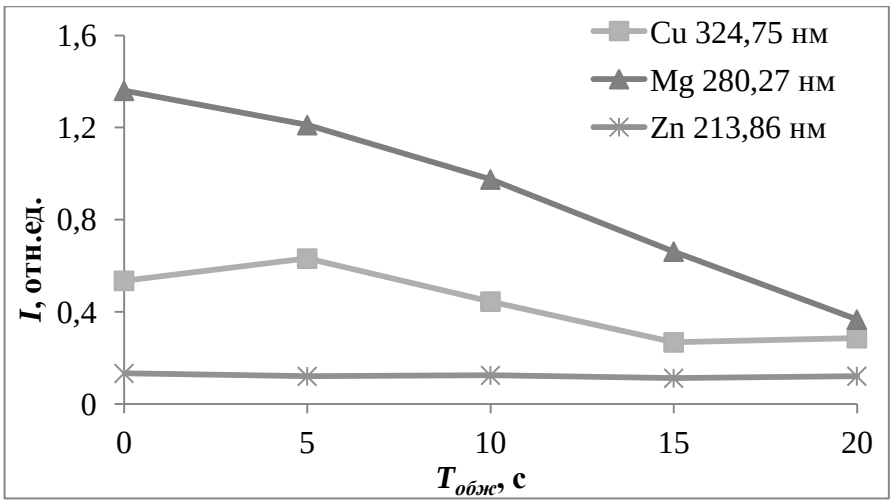

Рисунок 10. Зависимость интенсивностей *I* спектральных линий ряда элементов в «холостом опыте» от времени предварительного обжига $T_{обж}$

Как видно из Рисунка 10, оптимальным $T_{обж}$ можно признать 20 с, т.к. в этом случае крайние части электродов достаточно эффективно очищаются от содержащихся в них примесей. Дальнейшее увеличение $T_{обж}$ нежелательно, поскольку длительное воздействие дугового разряда на электрод негативно сказывается на структуре его поверхностного слоя.

В процессе исследования различных условий обжига было обнаружено, что на *I* аналитических линий элементов-примесей существенно влияет высота электрода над зажимом штатива (Рисунок 11). Данный факт может быть объяснен тем, что в случае большей высоты нижнего электрода над зажимом в плазму начинают поступать элементы из более глубоких слоев электрода, что благоприятно сказывается на результатах очистки электродов. По этой причине регистрацию спектров пробы следует производить с электродом, расположенным на меньшей высоте над штативом, по сравнению с высотой электрода при предварительном обжиге (в противном случае начнется поступление элементов из глубоких неочищенных слоев электрода, что приведет к завышению аналитического сигнала). При этом не следует располагать электроды на высоте менее 1 см от штатива, т.к. в этом случае возможно поступление в плазму элементов из материала штатива [225].

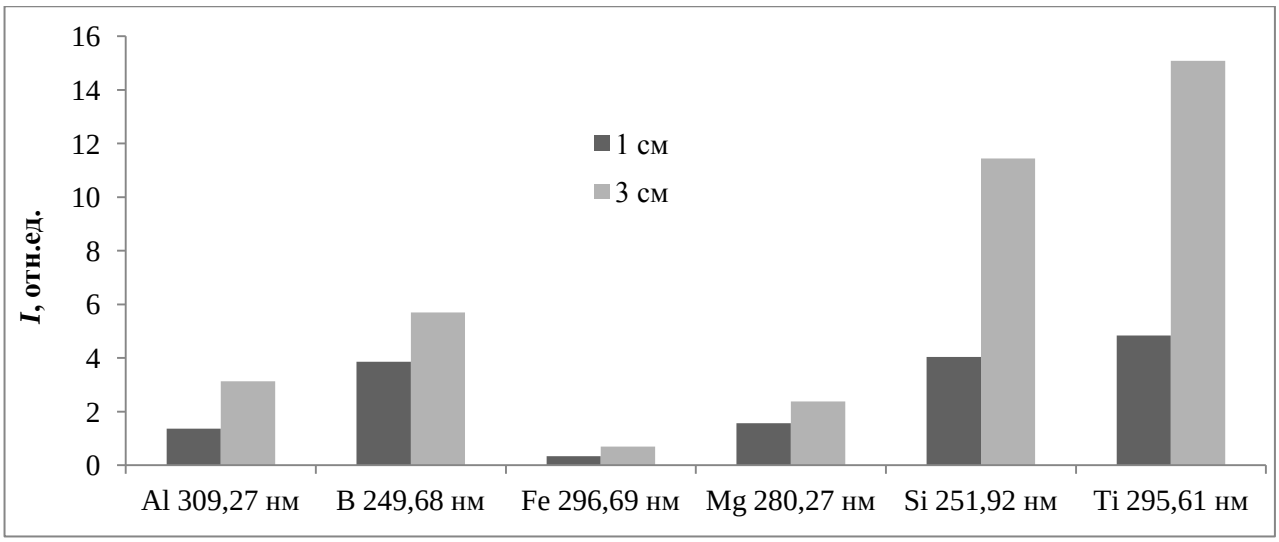

Рисунок 11. Гистограммы интенсивностей *I* аналитических линий ряда элементов, зарегистрированных при обжиге с различной высотой нижнего электрода над зажимом штатива

Также было замечено, что при многократном использовании вне зависимости от типа анализируемых проб возрастает доля загрязненных различными элементами электродов (Рисунок 12). Это может быть обусловлено тем, что при каждом включении питания дуги часть примесей распространяется вглубь электродов, где при многократном использовании последних может накапливаться, а при обновлении поверхности путем стачивания поступать впоследствии в плазму. Однако, несмотря на это, даже многие «грязные» электроды можно использовать, поскольку обжига в течение 20 с достаточно для удаления примесей (эффективность обжига при использовании «грязных» электродов показана также в [226]). Количество «грязных» электродов можно существенно уменьшить, если увеличить длину стачиваемой поверхности до 5 мм. Отдельно стоит отметить, что, согласно [87, 208], рекомендуется обжигать электроды непосредственно перед их дальнейшим использованием.

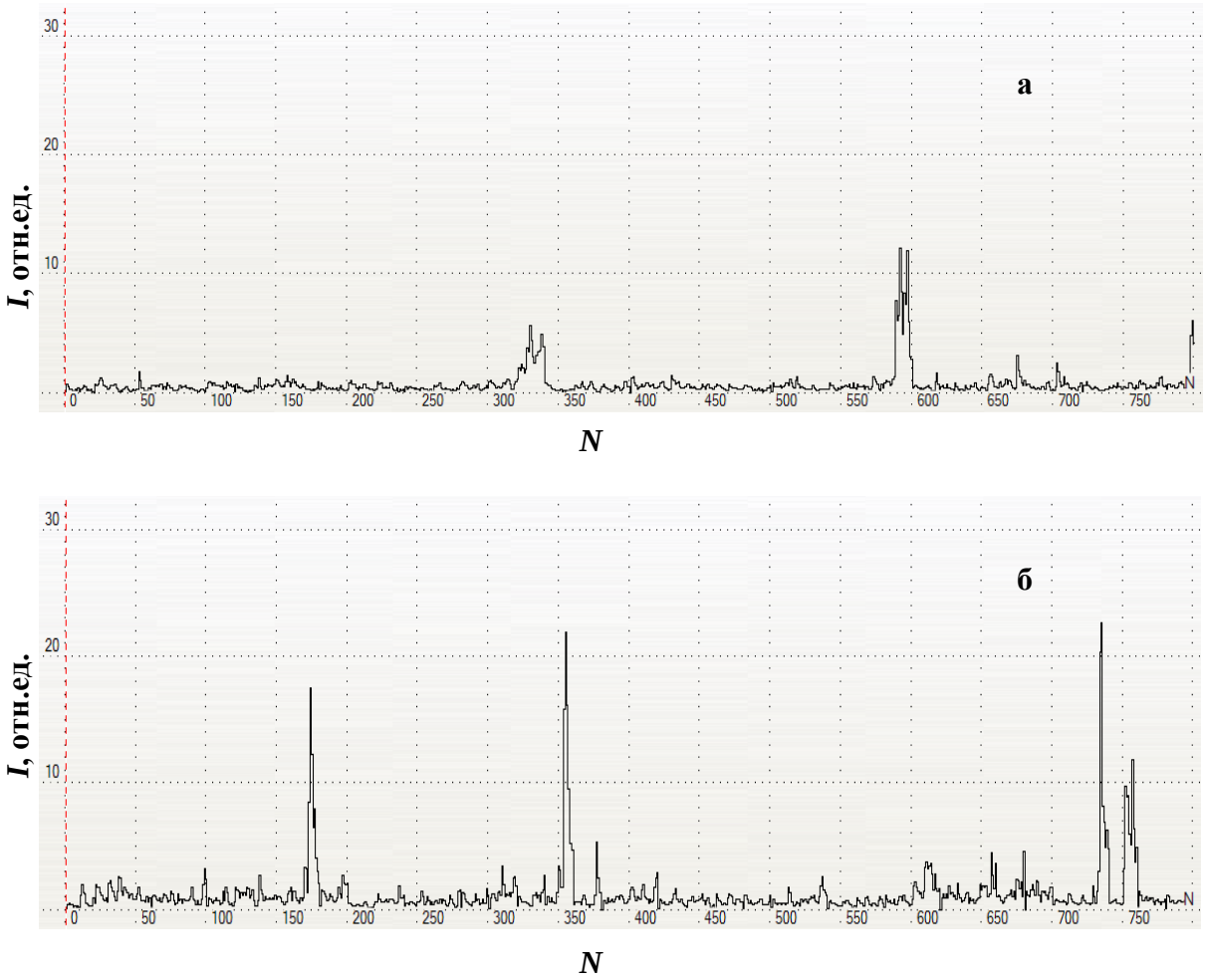

Рисунок 12. Гистограммы выгорания Si из 40 новых (а) и бывших в употреблении (б) угольных электродов при обжиге каждого из них в течение 20 с при силе тока 20 А (каждый спектр *N* соответствует 1 с)

2.2.3. Создание защитной пленки на электроде

Известно, что при выпаривании капли жидкой пробы на торце угольного электрода происходит проникновение определяемых элементов вглубь поверхностного слоя [227, 228]. Глубина проникновения пробы увеличивается при предварительном обжиге торцов угольных электродов, поскольку в процессе обжига повышается пористость поверхностного слоя. Исключить проникновение анализируемого раствора можно обработкой электрода пластиками, создающими сплошную непроницаемую защитную пленку. Обработка заключается в пропитке электрода раствором высокомолекулярного органического соединения в летучем

растворителе. Такая пленка (как показали предварительные испытания) также способствует лучшему удерживанию капли анализируемой биопробы на поверхности торца электрода, предотвращая ее стекание. Наиболее универсальной считается полистирольная защита, поскольку блочный полистирол имеет достаточно высокий класс химической чистоты, а его пленка препятствует проникновению нейтрального и слабокислого растворов, а при определенной толщине – концентрированных кислот [208].

В данной работе использовался раствор полистирола ХЧ в толуоле ОСЧ 22-5 (Вектон), который в виде капли объемом 20 мкл наносился на торец угольного электрода типа «усеченная лунка». Была исследована зависимость I аналитических линий ряда элементов и их относительного среднеквадратичного отклонения (ОСКО) s_r при возбуждении спектров проб СО водных растворов солей элементов от концентрации $C_{полист}$ полистирола в капле раствора, создающего защитную пленку на электроде (Рисунок 13).

Как видно из приведенных на Рисунок 13 зависимостей, оптимальным диапазоном $C_{полист}$ является 0,3-0,9 % масс. При меньшей концентрации плотность образующейся пленки недостаточна для предотвращения проникновения металлов вглубь электрода (что отрицательно сказывается на аналитическом сигнале и его воспроизводимости). Большие концентрации нежелательны, поскольку при этом вносится дополнительное количество органических веществ (способных оказывать влияние на параметры плазмы) и возможен вынос крупных кусков полистирольной пленки с нанесенной на нее пробой из зоны плазмы вследствие воздействия дугового разряда.

Поскольку данный опыт проводился на водных растворах, макросостав которых существенно отличается от состава биопроб, необходимо было убедиться, что результаты опыта будут аналогичны в случае возбуждения спектра СО реальных объектов. Как и следовало ожидать (рис 14), общая форма зависимостей при возбуждении спектра СО слюны не изменилась, однако увеличились значения I и уменьшились значения их s_r для случая $C_{полист}$=0 % (отсутствия защитной пленки), что можно объяснить созданием органическими

компонентами слюны собственной пленки (но при этом не достаточной для полного предотвращения проникновения пробы в глубь электрода).

На основании полученных данных в качестве оптимальной $C_{полист}$ в капле объемом 20 мкл наносимого раствора полистирола в толуоле были выбраны 0,3 % масс.

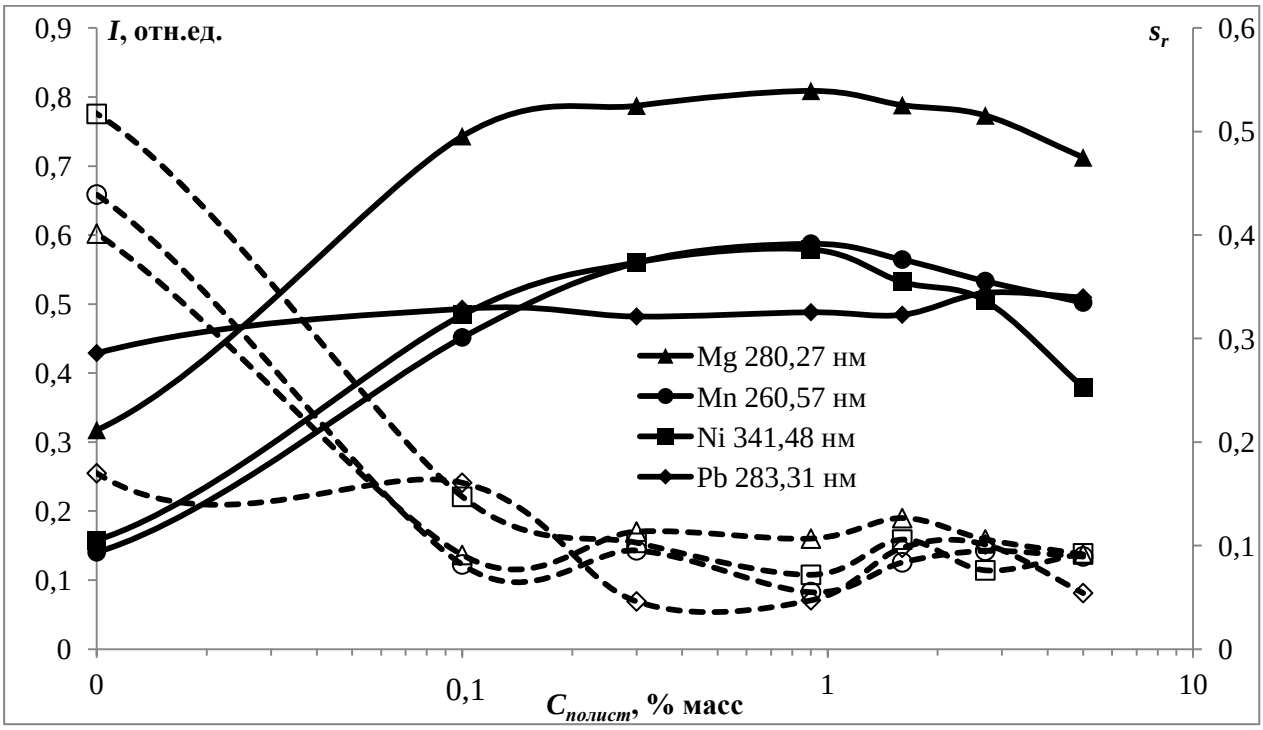

Рисунок 13. Зависимость интенсивностей *I* аналитических линий ряда элементов (—) и их ОСКО s_r (- - -) от концентрации $C_{полист}$ наносимого раствора полистирола (в логарифмическом масштабе) при возбуждении пробы раствора

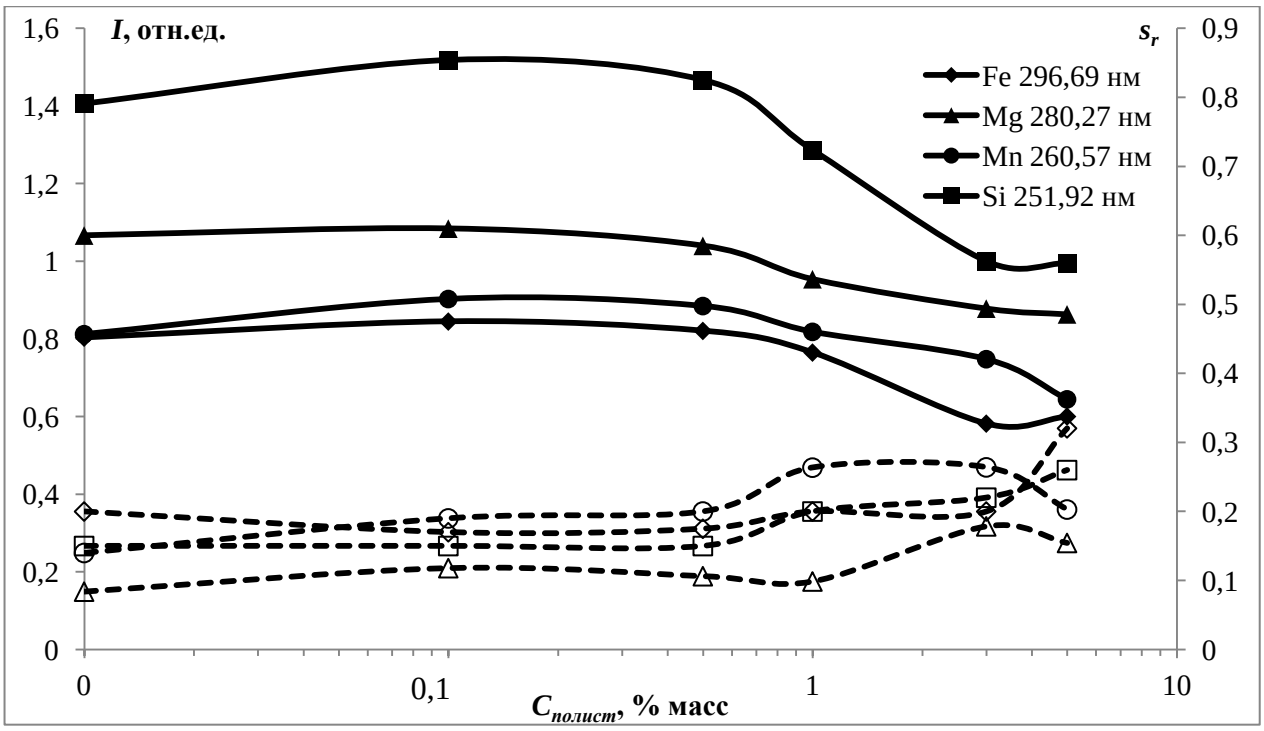

Рисунок 14. Зависимость интенсивностей *I* аналитических линий ряда элементов (—) и их ОСКО s_r (- - -) от концентрации $C_{полист}$ наносимого раствора полистирола (в логарифмическом масштабе) при возбуждении пробы слюны

2.3. Оптимизация условий атомизации и возбуждения спектра сухого остатка пробы с торца угольного электрода

Д-АЭС-СО в варианте фотоэлектрической с ФЭУ регистрацией позволяет проводить прямой анализ неорганических жидких проб малого объема с низкими ПО [200, 201]. Однако, данному методу свойственны матричные влияния макроосновы биологических проб, нивелирование которых за счет пробоподготовки приводит к увеличению ПО невозможности определения ряда эссенциальных и токсичных элементов в образцах (Таблица 1). В то же время, использование большой силы тока *i* (вместе с значительным количеством спектрального буфера $m_{буф}$) в варианте регистрации с ФЭУ или фотопластинкой для нивелирования влияния макросостава приводит к ухудшению отношения сигнал/шум *I/S*, что также отрицательно сказывается на ПО. Применение фотодиодной регистрации изображения спектра с помощью МАЭС потенциально

может снять последнее ограничение и позволить осуществить оптимизацию условий атомизации и возбуждения спектра СО.

Полупроводниковые детекторы, как уже было сказано, 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 известных методик Д-АЭС-СО [200, 201].

По этим причинам одной из задач работы являлось исследование параметров, влияющих на условия атомизации и возбуждения пробы, к которым относятся i и $m_{буф}$, с целью увеличения I/S и нивелирования матричных эффектов.

2.3.1. Выбор оптимального межэлектродного расстояния

Как известно из [208], на условия возбуждения спектра пробы влияет величина межэлектродного промежутка h дугового разряда. Увеличение h угольной дуги в воздушной атмосфере сопровождается увеличением объема облака разряда, но это изменение в присутствие легкоионизируемых элементов мало. Одновременно происходит рост общей мощности дуги, уменьшение температуры разряда, электронной концентрации [229]. Сравнительно большая h сдвигает максимум интенсивности атомных линий в область более низких температур. Однако, все эти факторы сказываются при существенном увеличении h (более 3 мм). Поскольку данные факторы неоднозначны, было проведено исследование с целью выявления оптимального значения h. Опыт был произведен как с водным раствором солей элементов, так и с биопробой (слюной). Поскольку ход зависимости оказался идентичен для указанных типов проб, на Рисунке 15 приведены результаты только для случая возбуждения спектра СО образца слюны.

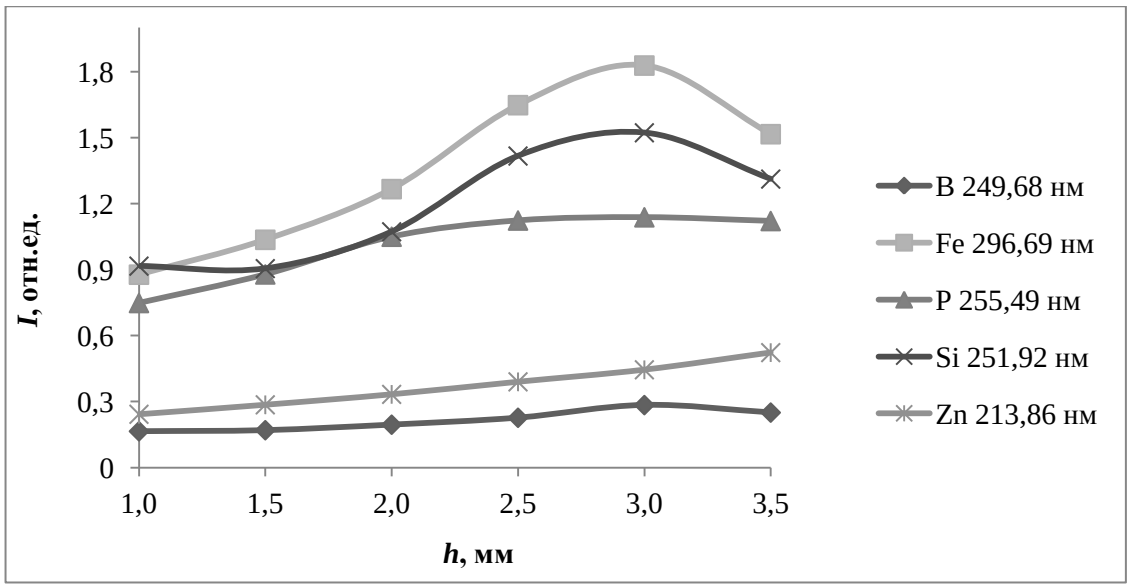

Рисунок 15. Зависимость интенсивностей *I* аналитических линий ряда элементов от величины межэлектродного промежутка *h* при возбуждении пробы слюны

Из приведенных на Рисунке 15 зависимостей видно, что оптимальной *h* являются 3 мм, дающие максимальный аналитический сигнал. Это значение было выбрано для дальнейших исследований.

2.3.2. Легкоионизируемая добавка и ее влияние на отношение сигнал/шум

Трудности в спектроаналитической практике обусловлены взаимным влиянием элементов [221]. Анализируемые пробы, особенно биологической природы, содержат неопределяемые вещества, качественный и количественный состав которых меняется в широких пределах [118]. При этом, параметры плазмы дугового разряда определяются, помимо прочего, основными компонентами, присутствующими в ней. Естественно, что изменение этих компонентов приведет к изменению параметров плазмы и, как следствие, к изменению условий возбуждения и регистрируемой *I* спектральных линий определяемых элементов. Если же при расчете концентраций в пробе учитывать взаимное влияние элементов и макрокомпонентов, то это приводит к усложнению процесса получения результата, поскольку, с одной стороны, нужно определить концентрацию мешающих элементов, а с другой – опытным путем установить

величину сдвига и изменения наклона градуировочных графиков. Зачастую проделать данные операции на практике чрезвычайно сложно, поэтому во многих работах (например, в [199, 200]) вместо учета влияния компонентов на параметры плазмы предлагается их стабилизировать. С последним обстоятельством связано широкое применение в эмиссионном спектральном анализе введения различных легкоионизируемых добавок. В литературе [221, 230, 231] отмечается, что действие носителей связано с увеличением скорости поступления элементов в плазму спектрального источника, снижением температуры плазмы (обеспечивается эмиссия главных атомных линий и снижение интенсивности циановых полос, уменьшение роли диффузионных и конвекционных процессов [167]), повышением концентрации электронов (что ведет к уменьшению степени ионизации элементов, увеличению электропроводимости плазмы [223]), равномерным распределением в плазме атомов, уменьшением выноса частиц из разряда (т.е. увеличению их содержания в столбе дуги [208]). В результате увеличиваются значения I аналитических линий и уменьшаются их s_r, что позволяет достичь более низких ПО. Кроме того, легкоионизируемая добавка является и спектральным буфером, значительно уменьшающим матричные эффекты (в [232] разбавление образцов промышленных отходов буфером существенно снизило влияние матричного состава на результаты). Однако, для этого буфер должен оказывать большее влияние, чем все прочие элементы, т.е. $m_{буф}$ должно значительно превосходить количество прочих мешающих компонентов (он фактически должен стать новой матрицей).

Одним из наиболее часто применяемых и эффективных носителей являются галогениды щелочных металлов, как вещества, обладающие низкой температурой кипения и низким потенциалом ионизации. В [233] изучалось влияние в рядах катионов от Li к Cs и анионов от F к I, оптимальным было признано применение хлорида и фторида Na. Последние стали объектами исследования данной работы. Было изучено влияние концентрации хлорида и фторида Na (ОСЧ), наносимых с помощью микрошприца М-10Н (Агат) в виде капли 10 мкл их водных растворов на торец угольного электрода после выпаривания пробы, на аналитический

сигнал. Поскольку характер данных влияний оказался аналогичен для обоих галогенидов, зависимости далее приведены только для NaCl.

Из приведенных в качестве примера на Рисунке 16 для линии Pb зависимостей видно, что при увеличении $m_{буф}$ от 0 до 0,15 мг уровень фонового излучения *I* и его среднеквадратичное отклонение *S* остаются на одном уровне, однако, имеет место рост *I* спектральной линии, что приводит к увеличению *I/S* (в 1,5-4 раза для различных элементов). На основании этих результатов была выбрана величина $m_{буф}$=0,15 мг NaCl (что соответствует нанесению на электрод 10 мкл водного раствора NaCl с концентрацией 15 г/л).

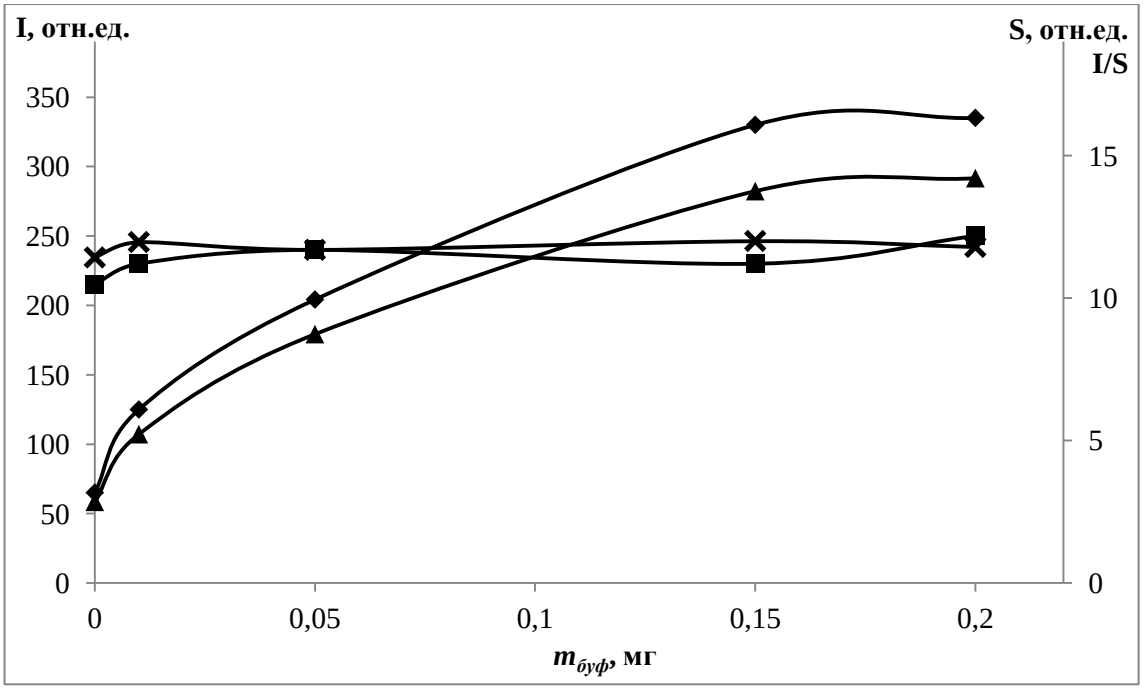

Рисунок 16. Зависимость интенсивности *I* аналитической линии Pb 283,31 нм (♦) и фонового излучения (■), среднеквадратичного отклонения *S* фонового излучения (×) и отношения сигнал/шум *I/S* (▲) от массы NaCl $m_{буф}$ на торце электрода

Как уже говорилось, макросостав биологических жидкостей и модельных растворов (водных растворов солей элементов) заметно отличается, причем отличие заключается как в наличии в реальной пробе биоорганических компонентов, так и в заметных количествах солей Na (для слюны, например, среднее значение составляет 200 мг/л [147]). Естественно, Na, содержащийся в

биопробах, также будет выступать как легкоионизируемый элемент. Однако, как было экспериментально выявлено, данный факт вносит лишь вклад в начальный ход зависимости *I* спектральной линии от $m_{буф}$, а именно: отсутствует резкий скачок при переходе от точки, соответствующей нулевому содержанию (отсутствию) спектрального буфера к минимально добавляемому количеству соли (Рисунок 17).

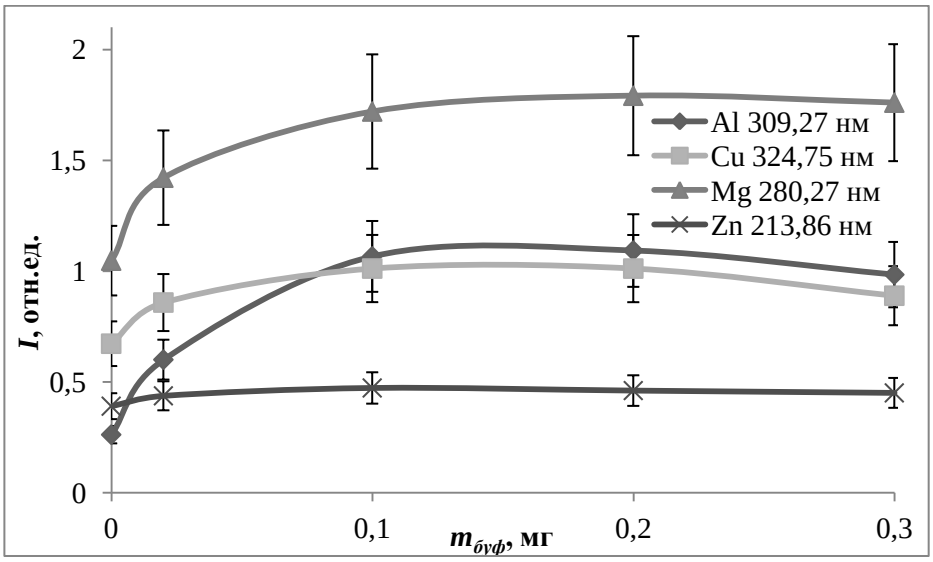

Рисунок 17. Зависимость интенсивностей *I* аналитических линий ряда элементов от массы NaCl $m_{буф}$ на торце электрода при возбуждении пробы слюны

Стоит отметить, что при нанесении на электрод 15 капель по 10 мкл слюны с содержанием Na 200 мг/л на электроде оказывается 0,03 мг. Однако, как показали экспериментальные данные (Рисунки 16-17), изменение $m_{буф}$ в диапазоне 0,15-0,30 мг не сказывается на *I* аналитических линий. Таким образом, при проведении эксперимента с данной $m_{буф}$ (0,15 мг) нет необходимости учитывать добавку соли, привносимую биопробами.

При выборе типа галогенида – хлорид или фторид – было обнаружено, что оба аниона практически одинаково сказываются на изменении аналитического сигнала. Однако, в случае, когда в качестве спектрального буфера использовался NaCl, *I* спектральных линий определяемых элементов были несколько больше, чем в случае NaF. Поскольку при этом уровень фонового излучения был одинаков

для обоих галогенидов, в качестве спектрального буфера в дальнейшем был использован NaCl.

Поскольку Na, как легкоионизируемый элемент, попадает в плазму и ионизируется в ней одним из первых, встал вопрос о порядке нанесения капли раствора NaCl на электрод. Был проведен сравнительный анализ *I* спектральных линий (Рисунок 18), полученных при возбуждении проб слюны со следующим порядком нанесения компонентов:

1. 10 мкл раствора NaCl, проба слюны
2. 5 мкл раствора NaCl, проба слюны, 5 мкл раствора NaCl
3. проба слюны, 10 мкл раствора NaCl

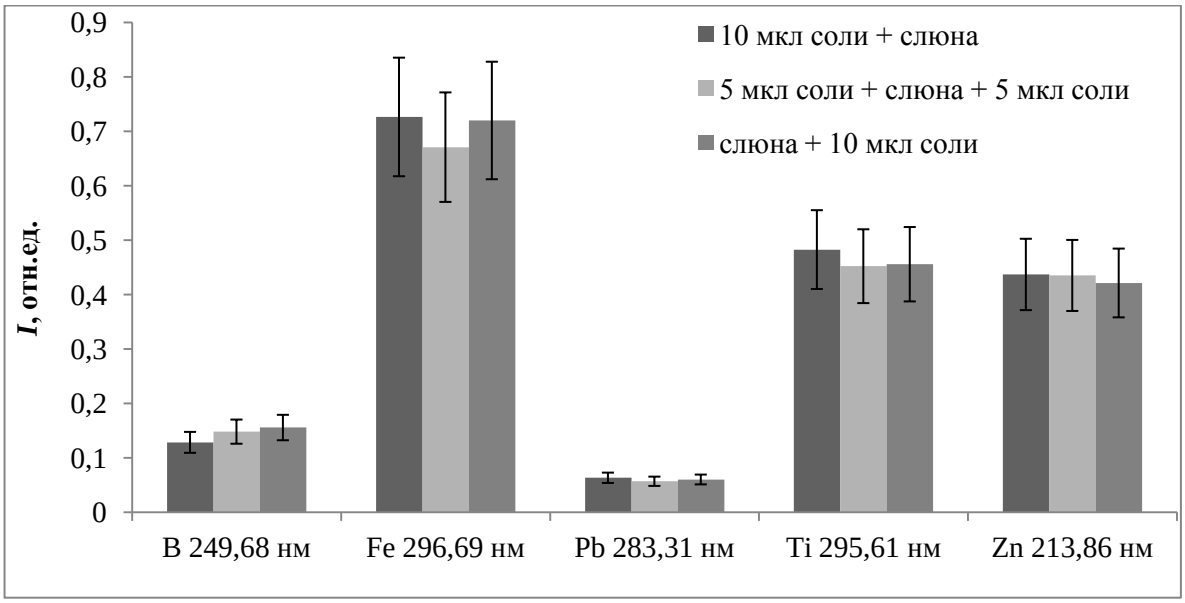

Рисунок 18. Гистограмма интенсивностей *I* аналитических линий ряда элементов при различном порядке нанесения NaCl на электрод

Из представленной гистограммы (Рисунок 18) видно, что порядок нанесения соли принципиально не сказывается на *I* аналитических линий элементов пробы. Однако, в последнем случае (нанесение капли раствора соли после пробы), как показали дополнительные исследования, немного уменьшается время появления максимума *I* аналитических линий (что, возможно, связано с ускоренным поступлением спектрального буфера в плазму дугового разряда). В связи с чем было решено наносить каплю объемом 10 мкл водного раствора NaCl с

концентрацией 15 г/л (что соответствует $m_{буф}$=0,15 мг) последней, т.е. после выпаривания капель пробы.

2.3.3. Выбор рабочей силы тока дугового разряда

Известно, что от величины *i* зависит как *I* спектральных линий определяемых элементов, так и излучение сплошного фона. Практически, с увеличением *i* от 6 до 15 А происходит возрастание *I* линий (поскольку увеличение *i* и мощности ведет к более сильному нагреву электрода и пробы) и, следовательно, возможность их обнаружения увеличивается; одновременно происходит уменьшение флуктуаций *I* линий, которые обязаны своим происхождением, главным образом, нестабильности поступления пробы из электрода в разряд [223, 234]. Однако, дальнейшее увеличение *i* дугового разряда при фотографической и фотоэлектрической с ФЭУ регистрацией при анализе СО жидких проб обычно не используется, потому что в этом случае крайне сложно выделить полезный сигнал при большой *I* фонового излучения, что приводит к уменьшению *I/S*. В то же время, при малых значениях *i* 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. Поэтому в случае регистрации с полупроводниковыми детекторами представляется целесообразным использовать большие значения *i*.

Как видно из Рисунка 19, увеличение *i* с 8 до 20 А приводит к увеличению аналитического сигнала как по амплитуде, так и по абсолютному значению. Можно заметить также, что при *i*=20 А происходит быстрое «импульсное» поступление элемента в зону плазмы дугового разряда и его возбуждение, т.е. имеет место уменьшение времени, необходимого для поступления элементов пробы в плазму, что позволяет уменьшить время регистрации спектра.

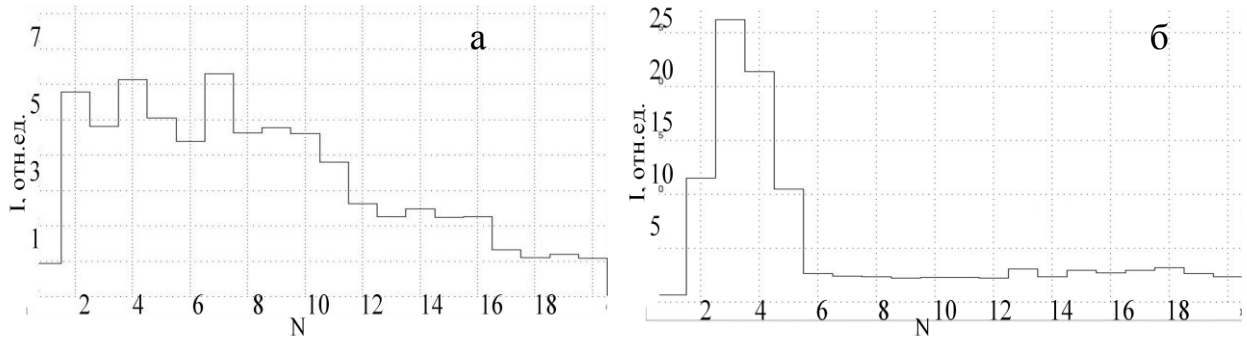

Рисунок 19. Гистограммы выгорания (зависимости интенсивности *I* от порядкового номера *N* спектра) Zn при силе тока 8 А (а) и 20 А (б) в течение 40 с (каждый спектр *N* соответствует 2 с)

При горении дуги при *i*=11 А на 6-8 с наблюдалась смена обычного разряда дуги переменного тока на «шипящий» разряд. При дальнейшем увеличении *i* время появления такого разряда уменьшалось, как и время появления максимального значения *I* аналитической линии. Данный тип разряда можно назвать самостоятельным, т.е. не требующим активизации, дуговым разрядом переменного тока. Причиной его возникновения может случить значительный разогрев электродов в процессе горения из-за большой *i*, вследствие чего катодное пятно не успевает остыть при смене полярности электродов [235] и эмиссия электронов происходит постоянно. За счет этого поддерживается необходимая концентрация пространственного заряда в межэлектродном промежутке, поскольку известно, что угольная дуга переменного тока горит устойчиво только при повышенной величине *i* и при испарении проб, содержащих летучие соединения атомов с низким ионизационным потенциалом [87].

Таким образом, увеличение *i* с 8 до 20 А приводит к существенному увеличению *I/S*, что подтверждается на примере линии Zn, приведенном на Рисунке 20. На основании этого в качестве рабочей *i* были выбраны 20 А, которые являются максимально возможными для используемого генератора и дают максимальное значение *I/S* (увеличение *I/S* в 1,5-3 раза для разных элементов по сравнению с 8 А).

При дублировании данного эксперимента со слюной в качестве анализируемого объекта также было обнаружено, что максимальные значения интенсивностей достигаются при *i*=20 А, поэтому она была выбрана в качестве рабочей.

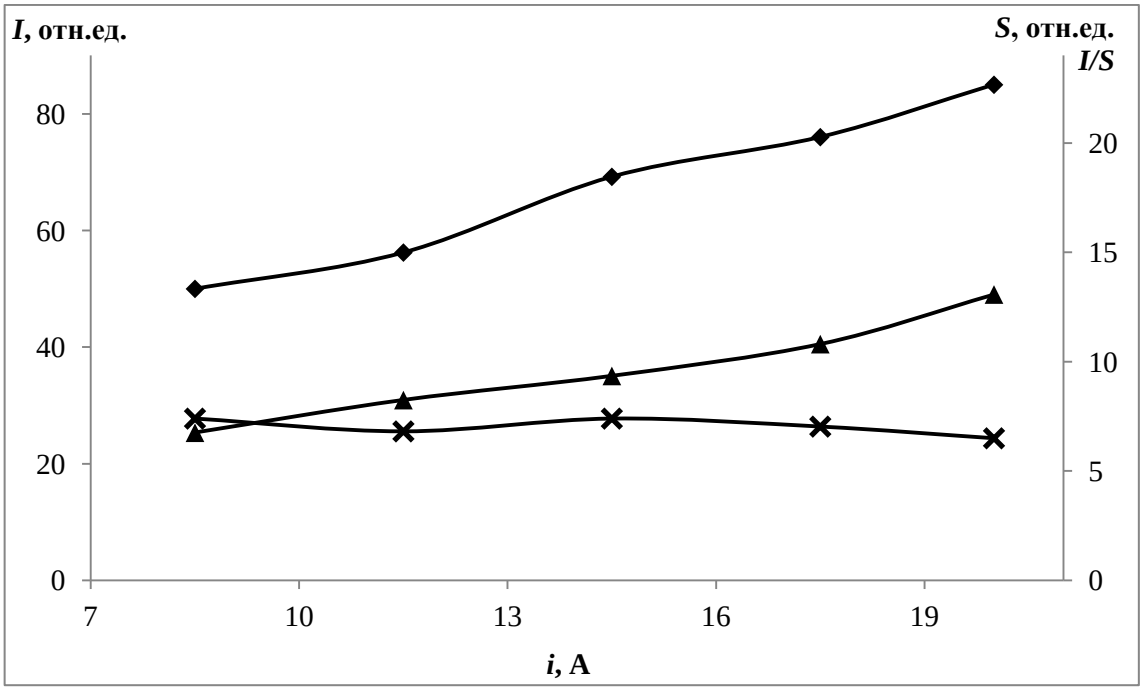

Рисунок 20. Зависимость интенсивности *I* аналитической линии Zn 213,86 нм (♦), среднеквадратичного отклонения *S* фонового излучения (×) и отношения сигнал/шум *I/S* (▲) от силы тока *i* дугового разряда

2.3.4. Влияние оптимизированных параметров на кинетику возбуждения элементов и параметры плазмы

Из вышеприведенных результатов видно, что совместное использование большой *i* (20 А) и значительного $m_{буф}$ (0,15 мг NaCl) позволяет существенно увеличить *I/S*. Однако, остается вопрос о возможном матричном влиянии, которое проявляется в изменении физических параметров плазмы и, следовательно, невозможности использования стандартных водных растворов солей элементов для построения градировочных зависимостей и последующего определения содержания микроэлементов в различных биологических жидкостях.

Обычно данная проблема устраняется введением дополнительной стадии – пробоподготовки.

В случае Д-АЭС нивелирование влияния основы может быть достигнуто за счет одновременного использования большой i и значительного $m_{буф}$, которые стабилизируют температуру плазмы $T_{пл}$ и концентрацию электронов N_e 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. В качестве первого подтверждения данного предположения на рис 21 приведены гистограммы выгорания Mn и Cu при возбуждении спектра CO в единых условиях, полученного при нанесении на торец электрода 10 мкл водного раствора солей элементов, 150 мкл (15 капель по 10 мкл) цельной слюны, 30 мкл (3 капли по 10 мкл) цельной крови.

Из Рисунка 21 видно, что вне зависимости от типа анализируемого образца кинетика поступления пробы, ее атомизации и возбуждения элементов идентична, что служит доводом в пользу правильности предположения и нивелировании матричного влияния (аналогичным образом отсутствие данного влияния подтверждалось в [236] при анализе примесей в чистых редких и цветных металлах).

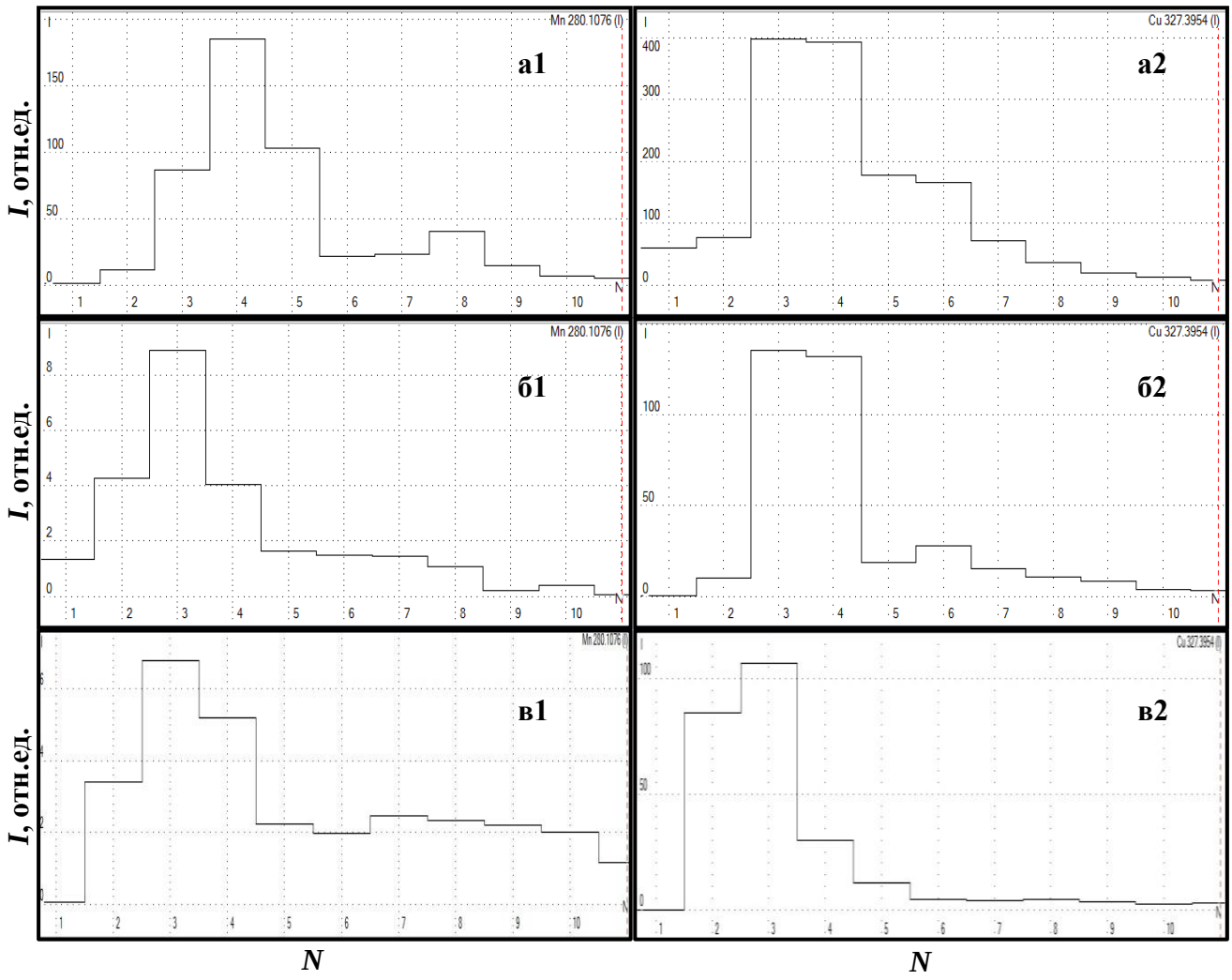

Рисунок 21. Гистограммы выгорания (зависимости интенсивности *I* от порядкового номера *N* спектра) Mn (1) и Cu (2) при возбуждении пробы водного раствора (а), слюны (б) и крови (в) в течение 22 с (каждый спектр *N* соответствует 2 с)

Для дополнительной проверки предположения об отсутствии влияния макросостава на параметры плазмы, последние были определены экспериментально. Для расчета $T_{пл}$ использовался метод Орнштейна, заключающийся в построении зависимости логарифма отношения *I* пар спектральных линий Fe с учетом атомных констант к разности энергий возбуждения этих линий и нахождении $T_{пл}$ по углу наклона графика [237, 238]:

$$(\varepsilon_1 - \varepsilon_2) = \frac{T_{пл} \cdot \left[\lg[(gA)_1/(gA)_2] - \lg(\lambda_1/\lambda_2) - \lg(I_1/I_2)\right]}{5040}$$

где ε - энергия возбужденного состояния;

g – статистический вес уровня;

A – коэффициент вероятности спонтанного перехода;

λ – длина волны;

I – интенсивность спектральной линии;

$T_{пл}$ – температура плазмы;

коэффициенты *1* и *2* соответствуют каждой линии Fe в паре.

N_e рассчитывалась для атомной (a) и ионной (i) линий Mg по формуле [223]:

$$\lg N_e = -\lg\frac{I_i}{I_a} + \lg\frac{(gAv)_i}{(gAv)_a} - \frac{5040}{T}(U_i + \varepsilon_i - \varepsilon_a) + \frac{3}{2}\lg T + 15{,}684$$

где N_e – концентрация электронов;

U_i – потенциал ионизации.

Справочные данные для расчета были взяты из [239, 240]. Для определения N_e использовались линии Mg II 279,55 нм, Mg I 277,98 нм, для определения $T_{пл}$ использовались 33 линии Fe. На Рисунке 22 приведен пример графика для расчета $T_{пл}$, близость свободного члена в уравнении зависимости к нулю и коэффициента корреляции r к единице свидетельствуют о правильности выбора спектральных линий.

Таким образом, для определения параметров плазмы необходимо в спектрах проб зарегистрировать набор спектральных линий Fe и Mg. Для этого на электроды после нанесения пробы наносилось 10 мкл раствора Fe и Mg (приготовленный из одноэлементных стандартных растворов для ААС путем последовательного разбавления деионизированной водой) с концентрациями $2\cdot10^{-5}$ г/л и $2\cdot10^{-3}$ г/л соответственно. Концентрации подбирались таким образом, чтобы можно было достоверно зарегистрировать все интересующие спектральные

линии Fe и Mg, но при этом не оказать влияния на параметры плазмы, т.е. использовались минимальные необходимые концентрации Fe и Mg.

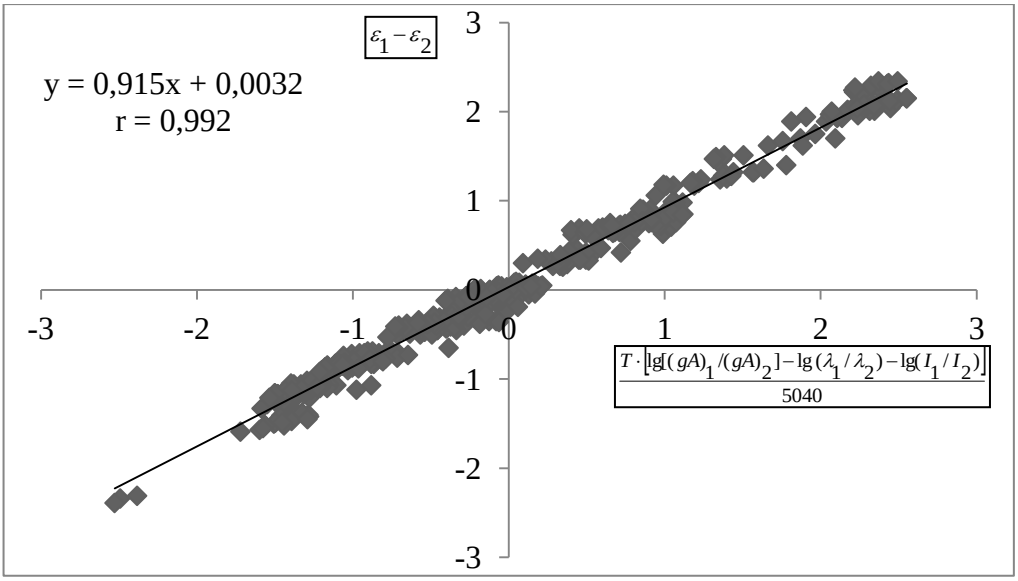

Рисунок 22. Пример экспериментального графика для расчета $T_{пл}$

Результаты определения параметров плазмы в случае нанесения на торец электрода для получения СО 10 мкл водного раствора солей элементов, 150 мкл (15 капель по 10 мкл) цельной слюны, 30 мкл (3 капли по 10 мкл) цельной крови представлены в Таблице 2. Из нее видно, что вне зависимости от типа пробы параметры плазмы остаются постоянными, что свидетельствует о достижении нивелирования влияния на них макросостава пробы.

Таблица 2. Параметры плазмы дугового разряда в случае возбуждения спектров проб различной природы

Тип объекта	$T_{пл}$, К	N_e*10^{13}, см$^{-3}$
водный раствор	4800±400	11±6
слюна	4700±400	10±5
цельная кровь	4900±400	15±8

Для выявления основного фактора (i или $m_{буф}$), стабилизирующего параметры плазмы, был проведен дополнительный эксперимент, в котором по приведенной выше схеме возбуждался спектр СО водного раствора, слюны, а также спектр

между чистыми угольными электродами (без нанесения пробы, но с нанесением раствора Fe и Mg) при чередовании крайних условий, а именно: i=8/20 А, $m_{буф}$=0/0,15 мг. Для каждого из указанных случаев были рассчитаны параметры плазмы дугового разряда, которые представлены в Таблице 3.

Таблица 3. Параметры плазмы дугового разряда $T_{пл}$ и N_e в случае возбуждения спектров проб при различных условиях

	слюна		раствор		без пробы	
	$T_{пл}$, К	N_e*10^{13}, см$^{-3}$	$T_{пл}$, К	N_e*10^{13}, см$^{-3}$	$T_{пл}$, К	N_e*10^{13}, см$^{-3}$
i=20 А, m=0,15 мг	4700±400	10±5	4800±400	11±6	4600±400	9±4
i=20 А, m=0 мг	4700±400	8±3	4700±400	8±4	4100±500	0,9±0,3
i=8 А, m=0,15 мг	3800±500	0,6±0,3	4200±500	0,5±0,3	4200±400	5±3
i=8 А, m=0 мг	4000±400	1±0,4	3600±600	0,2±0,1	3700±600	0,5±0,3

Как можно заметить из Таблицы 3, при анализе параметров плазмы, полученных при возбуждении спектра СО слюны и водного раствора, основной вклад в стабилизацию параметров вносит использование большой i. Однако, влияние $m_{буф}$ может не прослеживаться в данном случае, поскольку и модельный раствор, и слюна содержали определенное количество Na. В случае возбуждения спектра между электродами, на которые не наносилась проба, также видно значимое влияние i на $T_{пл}$, однако, существенный вклад в стабилизацию N_e вносит введение $m_{буф}$. Таким образом, лишь синергетическое воздействие большой i=20 А и значительного $m_{буф}$=0,15 мг позволяют нивелировать матричные влияния и использовать для микроэлементного анализа биологических проб градуировочные зависимости, полученные с помощью водных растворов солей элементов.

2.3.5. Спектральный фон и его зависимость от условий возбуждения спектра

При исследовании спектров, зарегистрированных при анализе слюны при оптимизированных выше параметрах, было обнаружено (Рисунок 23), что в процессе горения дуги в течение первых 8 секунд происходит существенное увеличение уровня фонового излучения (одновременно с этим за первые 5-8 с происходит выход *i* до рабочего значения 20 А), далее рост замедляется и затем прекращается. Аналогичные зависимости получены для водного раствора солей элементов.

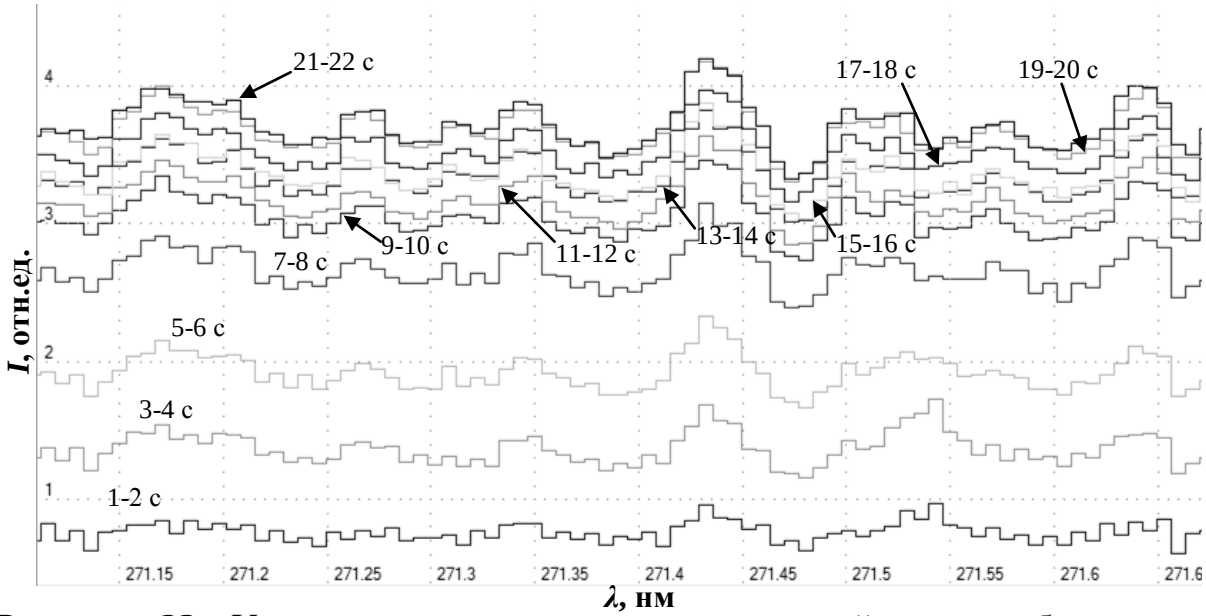

Рисунок 23. Участок спектра, зарегистрированный при возбуждении пробы слюны в разные моменты горения дуги (каждые две секунды выделены отдельным спектром)

Кроме этого, обращает на себя внимание наличие определенной «структуры» фонового излучения, которая формируется в первые секунды горения дугового разряда, а далее остается постоянной. При дальнейшем рассмотрении данного факта выяснилось, что «структурой» обладают также спектры водного раствора, «холостого опыта» (когда на электрод наносился только раствор полистирола в толуоле и водный раствор NaCl) и чистых электродов (когда на них не наносилось никаких компонентов). Причем «структура» фона идентична для всех четырех указанных случаев во всем исследуемом спектральном диапазоне (Рисунок 24).

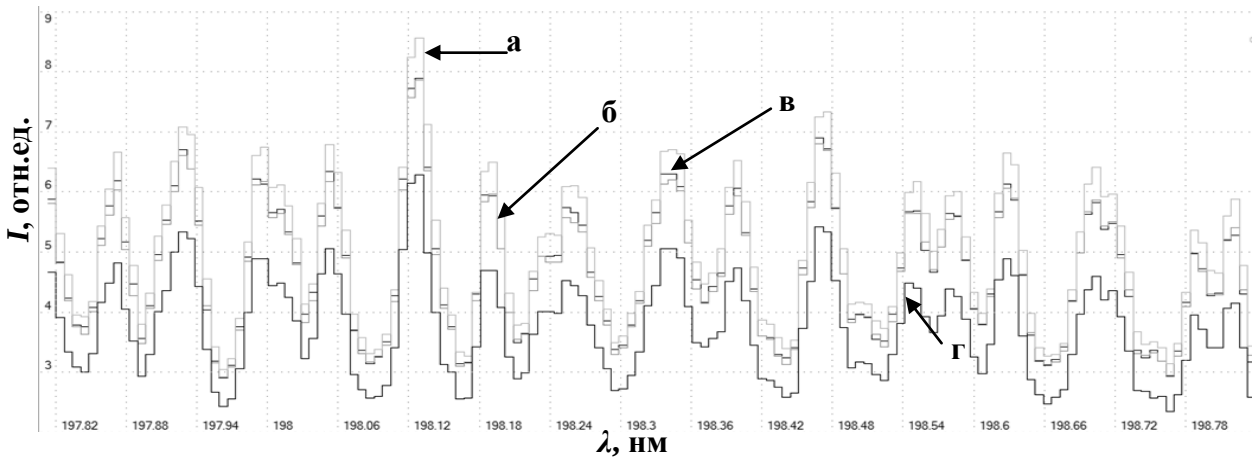

Рисунок 24. Участок спектра при возбуждении пробы слюны (а), водного раствора (б), холостой пробы (в), чистых электродов (г)

Поскольку, как видно из Рисунка 24, различный макросостав проб, а также спектральный буфер не оказывают влияния на вид спектрального фона, за «структуру» фонового излучения могут быть ответственны материал электрода и/или *i*. Для проверки первого предположения были зарегистрированы спектры, возбуждаемые в плазме между двумя угольными электродами, двумя медными электродами, а также одним угольным и одним медным электродами при одинаковой *i*=20 А (Рисунок 25). Из сравнения данных можно сделать вывод, что спектры от чистого металла не характеризуются определенной «структурой» фона, в отличие от спектра, получаемого при использовании угольных электродов. Вариант, когда один электрод был металлическим, а другой – угольным, является промежуточным, поскольку в данном случае наблюдаются схожие «пики» со спектром угольных электродов, однако «структура» не так ярко выражена. Таким образом, можно заключить, что спектральный фон определяется, в том числе, материалом электродов и не наблюдается в случае использования металлических электродов.

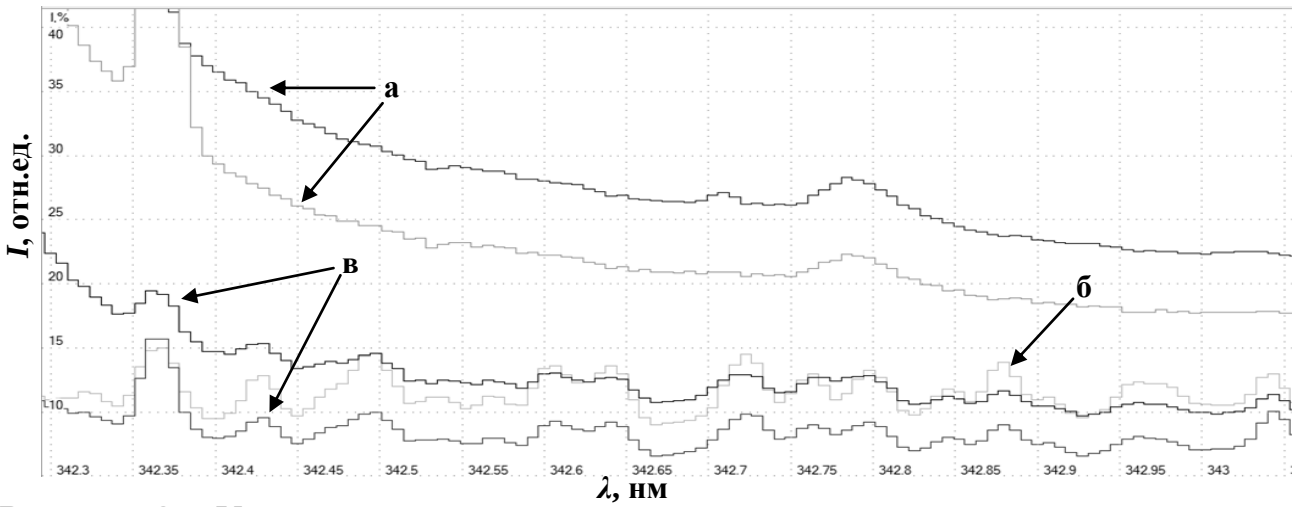

Рисунок 25. Участок спектра, зарегистрированный при создании плазмы между медными (а), угольными (б) и медном и угольном (в) электродами

Далее предстояло определить, вносит ли *i* вклад в формирование «структуры» фонового излучения. Для этого были зарегистрированы спектры при возбуждении пробы слюны, модельного раствора, «холостого опыта» при *i* 4 и 20 А (Рисунок 26). Из сравнения спектров видно, что при малой *i* «структурированность» спектрального фона практически отсутствует, в отличие от спектров, снятых при 20 А (вне зависимости от типа пробы). Данный факт объясняется тем, что, как было сказано ранее, при малом значении *i* уровень фонового излучения настолько мал, что не может быть зарегистрирован на фоне шумов полупроводникового детектора. Таким образом, *i* оказывает влияние как на уровень (интенсивность) фонового излучения, так и на его «структуру». Детальное выяснение природы «структуры» фонового излучение не входило в задачи данной работы, однако, выявленный факт требует учета при расчете *I* спектральных линий определяемых элементов и учете фонового излучения, особенно в случае низких содержаний определяемых элементов, когда *I* спектральных линий малы и не всегда отчетливо видны на фоне пиков «структуры» фона.

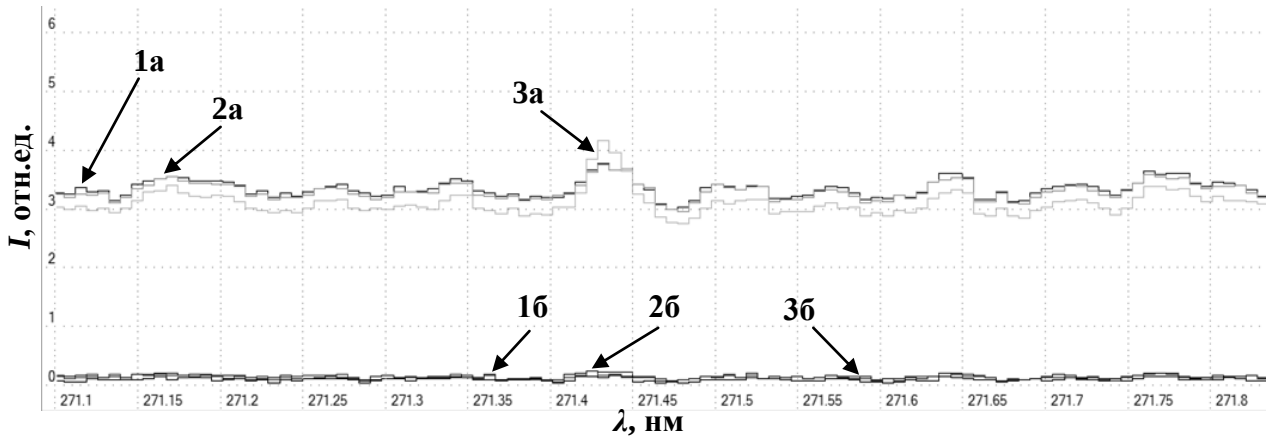

Рисунок 26. Участок спектра, зарегистрированный при возбуждении холостой пробы (1), модельного раствора (2), слюны (3) при силе тока 20 А (а) и 4 А (б)

2.4. Исследование аппаратных параметров спектрального прибора

Важным достоинством фотодиодных детекторов является существенное сокращение времени, необходимого для обработки спектральной информации после окончания экспозиции спектра, включая его визуализацию, а также измерение, расчет и представление данных об интенсивностях фрагментов и деталей спектра. Обычно это время составляет несколько секунд. По этой причине такие детекторы нашли широкое применение на промышленных предприятиях для повышения экспрессности и увеличения производительности АЭС различных материалов [241-244]. При этом, зачастую используются ранее разработанные спектроаналитические методики, оптимизированные для фотоэлектрической с ФЭУ или для фотографической регистрации, которые регламентируют не только режим работы источников возбуждения спектра и время его экспозиции, но и весьма важный эксплуатационный параметр спектрального прибора, а именно, ширину его входной щели *a*. От последней, как известно [245, 246], зависит форма и ширина аппаратной функции (АФ), а также связанная с ней реальная разрешающая способность (РРС), которая во многом определяет возможность использования того или иного прибора для решения конкретных задач не только аналитической, но и в целом оптической спектроскопии. К сожалению, в публикациях [209], посвященных приборным

разработкам, а также практическому применению фотодиодной регистрации, не уделяется должного внимания исследованию АФ. В связи с этим одной из задач работы являлось экспериментальное исследование формы и ширины АФ, а также РРС спектрального прибора с полупроводниковым детектором в зависимости от *a*.

Для исследования АФ и РРС использовался маломощный дуговой разряд переменного тока (7 А) между W-электродами. Излучение этого источника света содержит большое число спектральных линий, среди которых есть как одиночные, пригодные для исследования формы АФ и ее ширины, так и "сдвоенные" (близко расположенные друг к другу) линии, которые можно использовать для экспериментального определения РРС спектрального прибора при разных *a*.

2.4.1. Влияние ширины входной щели на форму и ширину спектральных линий

На Рисунке 27, для примера, приведены три контура одной и той же спектральной линии W 289,825 нм, которые были зарегистрированы при разных *a*. Контуры линии аппроксимированы с помощью ПО "Атом" распределением Гаусса. Из Рисунка 27 видно, что не только при небольшой *a*=10 мкм, но и при более широких *a* 50 мкм и 80 мкм (это более, чем в 8 и в 13 раз превышает нормальную ширину щели для МФС, равную 7,5 мкм) регистрируемая спектральная линия имеет колоколообразный контур с максимумом посередине. Очевидно, что такая форма АФ при большой *a* не соответствует общепринятой теоретической модели, согласно которой при увеличении *a* у контура спектральной линии вместо максимума должно появиться достаточно широкое плато, являющееся проявлением прямоугольного инструментального контура геометрического изображения входной щели [245].

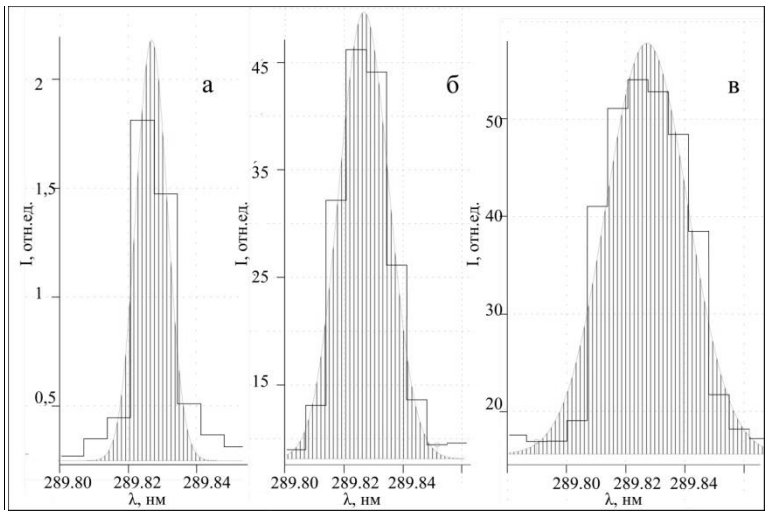

Рисунок 27. Цифровые изображения спектральной линии W 289,825 нм при ширине входной щели *a* 10 мкм (а), 50 мкм (б), 80 мкм (в) и аппроксимирующие их контуры Гаусса

Кроме того, обращает на себя внимание заметное различие форм зарегистрированных и аппроксимирующих контуров при различных *a*. При малых (менее 20 мкм) *a* (Рисунок 27а) верхняя и средняя части цифрового изображения контура линии хорошо аппроксимируются функцией Гаусса, а нижняя часть имеет более широкий профиль по сравнению с ней. При большой (более 60 мкм) *a* (Рисунок 27в) верхняя часть реального контура шире аппроксимирующей функции, а нижняя часть – несколько уже. Что касается средней (30 – 60 мкм) *a* (Рисунок 27б), то аппроксимация функцией Гаусса всех частей цифрового изображения контура спектральной линии весьма хорошая, что дает основание в данном случае использовать ее для математического описания контуров линий и, благодаря этому, производить учет взаимного переложения соседних линий в зарегистрированном спектре при расчете их интенсивностей.

Как известно [245], АФ спектрального прибора формируется комбинацией, а математически описывается сверткой дифракционного и щелевого инструментальных контуров с учетом инструментального контура регистрирующего устройства, который в рассматриваемом случае обусловлен дискретной структурой (пикселями) фотодиодной линейки. Поскольку диспергирующий элемент, параметры которого определяют ширину

дифракционного контура, и размер пикселя фотодиодной линейки (равный 12,5 мкм) являются неизменными конструктивными деталями спектрального прибора и, следовательно, не подлежат каким-либо изменениям, то была исследована зависимость ширины контура регистрируемой спектральной линии *b* от *a*.

ПО "Атом" при установке соответствующих опций позволяет не только аппроксимировать контур зарегистрированной спектральной линии распределением Гаусса, как показано на Рисунке 27, но и производить расчет *b* на полувысоте, а также определять *b* без какой-либо аппроксимирующей функции путем интерполяции экспериментальных данных о зарегистрированных световых потоках теми пикселями, которые формируют контур спектральной лини. На Рисунке 28 приведены результаты измерения *b* более 20 спектральных линий дугового спектра W для девяти *a* в интервале от 3 до 100 мкм. Отбор спектральных линий осуществлялся по признаку отсутствия наложений на них соседних линий. Погрешность измерения *b* отдельных спектральных линий, как показала статистическая обработка экспериментальных данных, характеризуется s_r<0,05. Таким образом, наблюдаемый разброс результатов обусловлен не погрешностью измерения, а статистически достоверно различающимися значениями *b*. В связи с этим, зависимость представлена не линией, проведенной по средним значениям ширин АФ, а полосой между верхней и нижней границами интервалов вариаций *b*.

Причиной интервального разброса значений *b* является фактор дискретности по длинам волн при регистрации спектра с помощью фотодиодной линейки. Для иллюстрации сказанного, на Рисунке 29 приведены цифровые изображения двух спектральных линий и аппроксимирующие их контуры Гаусса при *a*=10 мкм. Одна из линий W 300,20 нм попала на пиксель симметрично его середине и поэтому имеет ширину контура Гаусса 12 мкм, т.е. практически равную ширине пикселя. Другая линия W 296,96 нм попала симметрично на границу между пикселями и поэтому ширину контура Гаусса для нее равна 18 мкм, т.е. в полтора раза больше. Таким образом, фактор дискретности цифровой регистрации спектра

и ширина пикселя определяют не только ход представленной на Рисунке 28 зависимости *b*, но и интервал вариации (неопределенности).

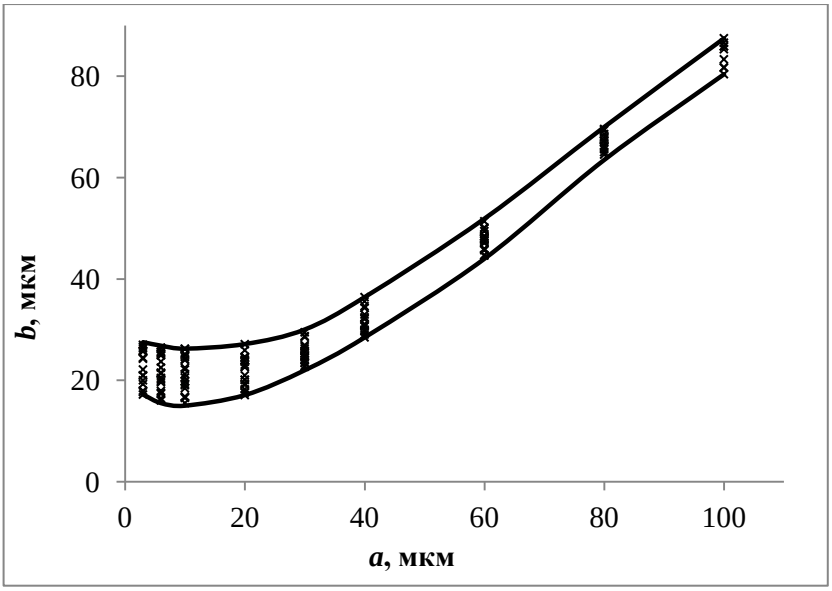

Рисунок 28. Зависимость ширины *b* интерполирующих контуров для линий вольфрама в области 290 – 310 нм от ширины *a* входной щели

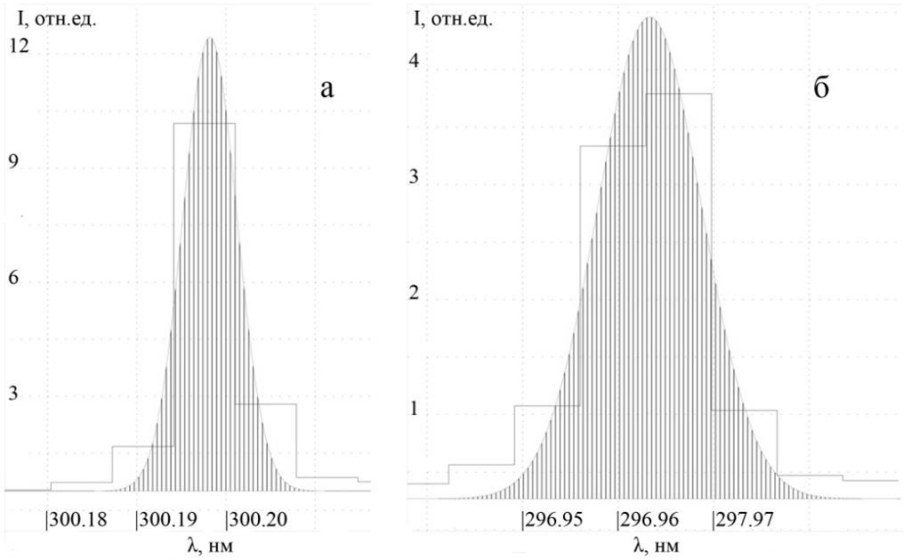

Рисунок 29. Цифровые изображения двух спектральных линий W 300,20 нм (а) и W 296,96 нм (б), отличающиеся различной симметрией расположения относительно границы между пикселями фотодиодной линейки, при ширине входной щели *a*=10 мкм

Из Рисунка 28 следует, что при увеличении *a* более 30 мкм зависимость приобретает вид прямолинейной полосы, которая имеет угол наклона

приблизительно равный величине arctg (0,8), то есть около 40°. При уменьшении *a* от 20 до 3 мкм *b* остается практически "неизменной" в одном и том же интервале ее вариаций, проявляя тенденцию к увеличению при *a* 6 мкм и 3 мкм.

На Рисунке 30 приведены две теоретические зависимости *b*, соответствующие когерентному и некогерентному освещению входной щели спектрографа [245, 247, 248], и экспериментальная зависимость реальной *b* (по средним значениям из Рисунка 28) от *a*. По осям отложены относительные значения ширин, нормированных на наименьшую усредненную реальную b_{min}=22 мкм. Из сравнения кривых видно, что экспериментальная зависимость находится между теоретическими и, следовательно, может быть отнесена к случаю частично когерентного освещения входной щели, возможность которого была предсказана академиком Д.С. Рождественским [249] (коэффициент некогерентности освещения входной щели, введенный Д.С. Рождественским, в проведенном эксперименте равен 1, в то время как при когерентном он равен 0, а при некогерентном ∞). Следует отметить, что возможность практической реализации частично когерентного освещения теоретически обсуждалась в целом ряде публикаций [247, 248, 250, 251], но не находила достаточно убедительного экспериментального подтверждения и поэтому была отвергнута для случая некогерентных источников света [246].

Полученные экспериментальные данные, представленные на Рисунке 28, при *a* от 3 до 20 мкм хорошо согласуются с результатами работы [252], в которой для цифрового спектрографа МФС–МАЭС среднее значение *b*, названное авторами "пределом разрешения", для области 300 нм составило 0,012 нм, что в пересчете на ширину интерполирующего контура составляет 22 мкм.

Таким образом, минимальная (усредненная) экспериментально измеренная ширина АФ спектрального прибора МФС-8 с детектором МАЭС составляет 22 мкм и реализуется при *a* от 5 до 30 мкм. В связи с этим величину 30 мкм можно назвать экспериментальной нормальной шириной входной щели вышеназванного спектрального прибора.

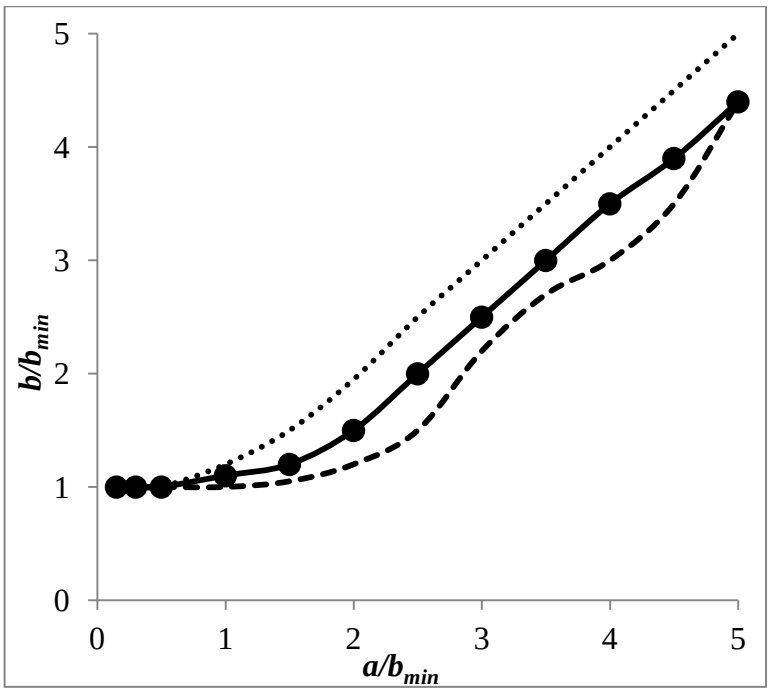

Рисунок 30. Экспериментальная (●-●) и теоретические зависимости ширины изображения *b* спектральных линий для когерентного (- - -) и некогерентного (•••) освещения входной щели от ее ширины *a*

2.4.2. Зависимость реальной разрешающей способности от ширины входной щели спектрального прибора

Поскольку экспериментальное определение ширины АФ разными способами (аппроксимацией функцией Гаусса и интерполяцией по экспериментальным точкам) приводит к количественно различающимся результатам, то оценка и, тем более, расчет РРС по этим результатам будут некорректны. В связи с этим, была разработана методика прямого экспериментального определения РРС, основанная на рекомендации в монографии [245].

Для экспериментального определения РРС было использовано излучение дуги переменного тока с W-электродами, поскольку спектр этого источника света, как указывалось выше, отличается значительным числом "сдвоенных" спектральных линий, расположенных на близких и при этом различных расстояниях друг от друга. Для иллюстрации процедуры определения РРС на Рисунке 31 приведены цифровые изображения двух накладывающихся друг на

друга спектральных линий вольфрама W 299,05 нм и W 299,07 нм ($\Delta\lambda$=0,02 нм), которые зарегистрированы при a=40 мкм (Рисунок 31а) и 30 мкм (Рисунок 31б). На первой цифровой спектрограмме спектральные линии не разрешаются, а на второй наблюдается их хорошее разрешение, которое при дальнейшем уменьшении a улучшается. Из этого факта следует, что РРС спектрального прибора, определяемая формулой $R=\lambda/\Delta\lambda$, для длины волны 299 нм при a=30 мкм составляет не менее 14950.

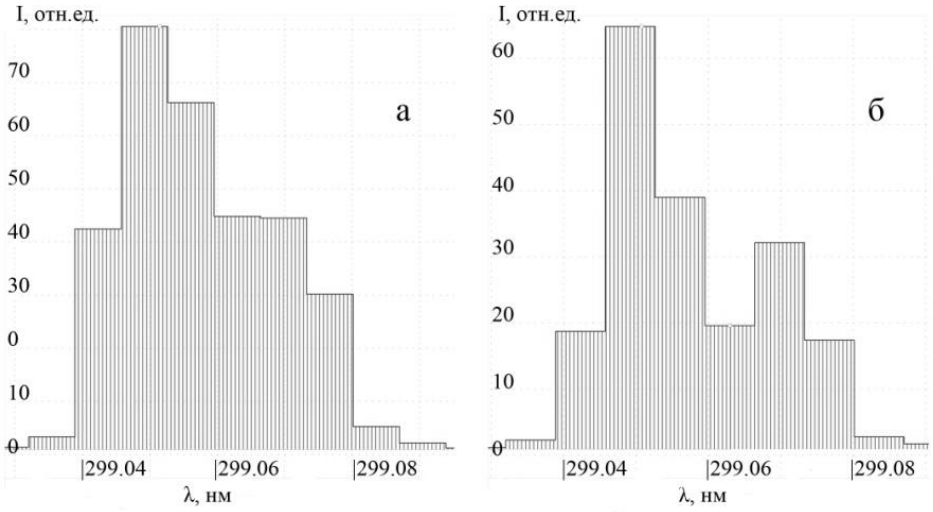

Рисунок 31. Иллюстрация к методике определения РРС

Подобные пары спектральных линий, для которых известна разность длин волн $\Delta\lambda$, и которые наблюдаются раздельно с провалом I между их максимумами около 20 %, использовались для определения РРС при соответствующей a. На основании полученных таким образом экспериментальных данных для 18 пар линий была построена зависимость РРС от a спектрального прибора на базе полихроматора МФС-8 с детектором МАЭС, которая приведена на Рисунке 32.

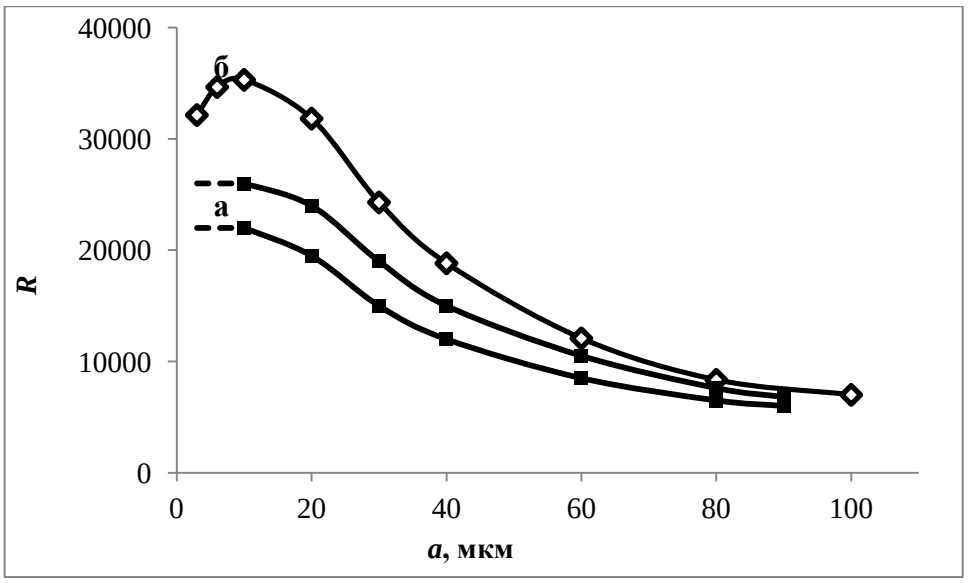

Рисунок 32. Зависимость реальной разрешающей способности *R* цифрового спектрографа МФС – МАЭС (а) и отношения длины волны спектральных линий к интерполяционной ширине их контура (б) от ширины *a* входной щели

На Рисунке 32, как и в случае измерения ширины АФ (Рисунок 28), зависимость представлена в виде полосы неопределенности между нижней и верхней границами вариаций, что также связано с различным расположением изображения используемых пар линий относительно пикселей фотодиодной линейки. Отсутствие на Рисунке 32 экспериментальных точек для *a* 6 мкм и 3 мкм объясняется тем, что разрешение спектральных линий при этих *a* точно такое же, как при *a*=10 мкм, что подтверждается представленными на Рисунке 33 изображениями перекрывающихся контуров двух линий W 302,6672 нм и W 302,6788 нм. На основании практически полного совпадения цифровых изображений на Рисунке 33, полученных при *a* 10 мкм, 6 мкм и 3мкм, границы РРС для этих *a* на Рисунке 32 проведены пунктиром параллельно оси абсцисс.

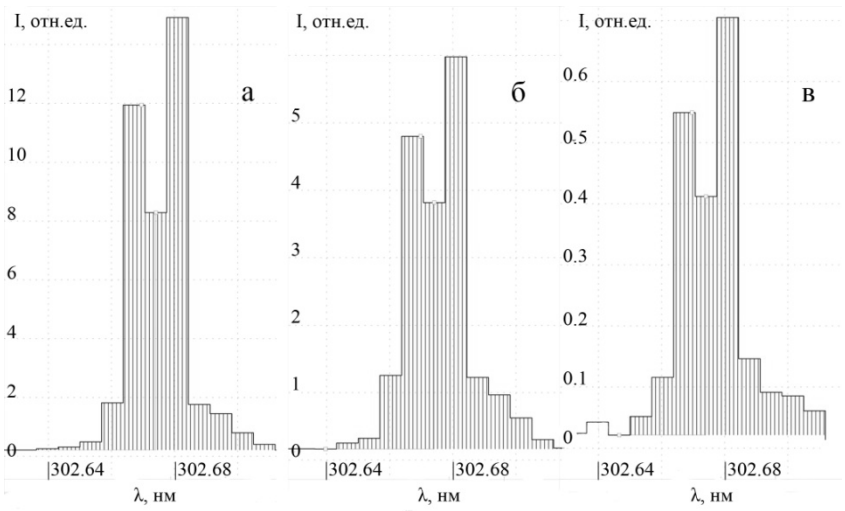

Рисунок 33. Цифровые изображения перекрывающихся спектральных линий W 302,6672 нм и W 302,6788 нм при *a* 10 мкм (а), 6 мкм (б) и 3 мкм (в)

На Рисунке 32, для сравнения, изображена зависимость отношения длины волны спектральных линий к ширине (в нм) их интерполяционного контура (по данным Рисунка 28) для верхней границы вариаций ширины АФ. Как видно, такой расчет РРС, рекомендованный в [246], дает завышенные по сравнению с экспериментальными данными значения РРС, хотя ход зависимости имеет схожий характер (за исключением интервала от 3 мкм до 10 мкм, где проявилась тенденция увеличения ширины АФ при уменьшении *a*).

Необходимо отметить, что наибольшее экспериментально установленное значение РРС спектрального прибора на базе МФС-8 с фотодиодной линейкой МАЭС для λ вблизи 300 нм реализуется при *a* от 3 мкм до 10 мкм и составляет 26000. Это почти в 3 раза меньше теоретической разрешающей способности для рассматриваемого прибора (МФС-8), которая по критерию Рэлея равна 72000.

2.4.3. Влияние ширины входной щели на светосилу спектрального прибора и отношение сигнал/шум

Общепринятая в настоящее время теория рассматривает светосилу спектральных приборов для линейчатого спектра в предположении строго монохроматической линии в зависимости от способа регистрации и

фотометрирования спектра. При этом приборы подразделяются на спектрографы, в которых светосила характеризует освещенность спектральной линии, изображение которой регистрируется фотоэмульсией, и спектрометры (монохроматоры и полихроматоры), светосила которых характеризует световой поток спектральной линии, регистрируемый за выходной щелью прибора с помощью, например, ФЭУ. Теоретические описания (формулы) зависимостей светосилы по линейчатому спектру от *a* для этих двух типов спектральных приборов отличаются друг от друга. Однако, общим является вывод о том, что увеличение *a* более так называемой «нормальной» ширины практически не увеличивает регистрируемую *I* спектральных линий, а ведет лишь к повышению *I* сплошного спектра и к увеличению *b*, то есть к уменьшению РРС спектрального прибора. Для разных приборов нормальная ширина щели, величина которой обусловлена дифракцией параллельного пучка света на диспергирующем элементе, составляет обычно от 5 до 10 мкм. Именно эта ширина и рекомендуется в качестве оптимальной, то есть позволяющей реализовать максимально возможную светосилу спектрографа для линейчатого спектра при минимальной ширине его аппаратной функции [245, 246, 253].

Необходимо заметить, что прямых экспериментальных подтверждений или опровержений указанных выше теоретических выводов и рекомендаций в научных публикациях нет. Данный факт может быть объяснен тем, что ни фотографическая регистрация изображения спектра с последующим фотометрированием спектральных линий в нем с помощью микрофотометра, ни фотоэлектрическая регистрация *I* спектральных линий через выходную щель постоянной ширины не позволяют провести необходимые для этого эксперименты. Фотодиодная регистрация, в свою очередь, снимает данное ограничение.

В качестве источника света использовалась заполненная Ne лампа тлеющего разряда в полом катоде, применяемая в спектрофотометрах для ААС, которая отличается высокой стабильностью излучения спектральных линий и малой шириной их физического контура. На Рисунке 34 изображены экспериментально

полученные зависимости *I* спектральной линии Ne от *a* для нескольких способов ее измерения. Зависимости 1–3 построены для *I*, измеренных по одному центральному пикселю (кривая 1), по сумме трех (кривая 2) и по сумме пяти (кривая 3) центральных пикселей контура спектральной линии соответственно (подробнее о способах измерения будет говориться в п. 2.5.1). Во всех трех случаях, когда фотометрирование производится по фиксированному числу центральных пикселей из числа формирующих изображение спектральной линии, при увеличении *a* наблюдается либо выход кривой на плато (кривая 1), либо тенденция к прекращению роста интенсивности (кривые 2 и 3).

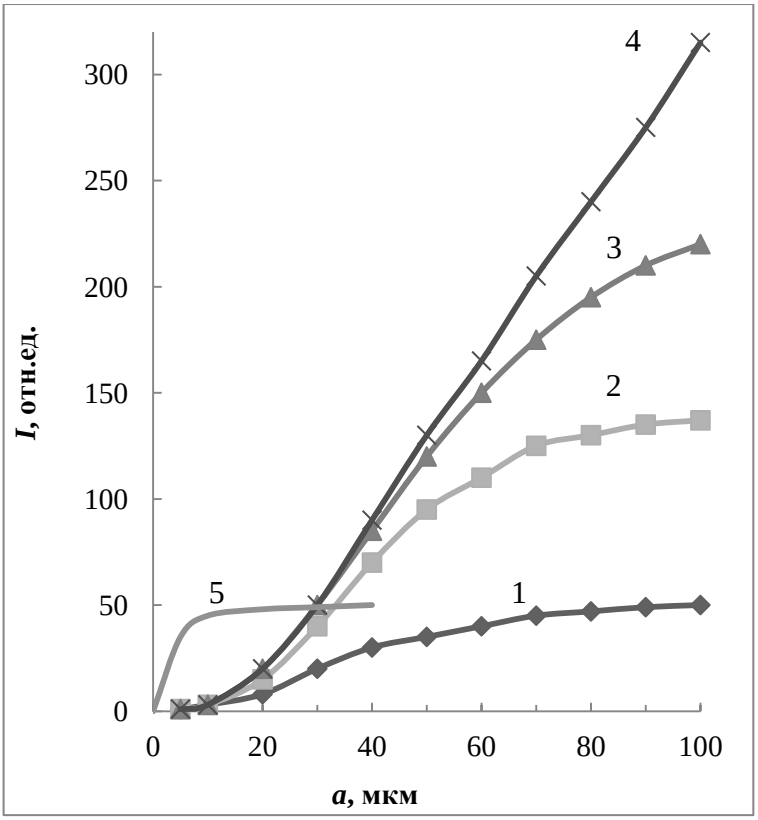

Рисунок 34. Зависимость интенсивности *I* линии Ne 332,37 нм от ширины входной щели *a* при различных способах измерения *I* (1 – по одному пикселю, 2 – по трем пикселям, 3 – по пяти пикселям, 4 – интеграл по всему контуру) и теоретическая зависимость освещенности 5, взятая из [245]

Ход зависимостей 1–3 для измеряемых *I*, величина которых прямопропорциональна освещенности центральных частей контура спектральной линии, формально соответствует выводам из теории спектральных приборов о

светосиле спектрографа для линейчатого спектра. При этом, однако, между теорией и экспериментом наблюдается существенное расхождение в величине *a*, при которой происходит выход на плато измеряемой *I* линии. Это различие хорошо видно из сравнения экспериментальной зависимости *I* центрального пикселя (кривая 1) с теоретической зависимостью (кривая 5) освещенности в центре линии, заимствованной из [245]. Если по общепринятой теории замедление роста *I* линии и выход ее на плато должны происходить при нормальной ширине входной щели, то есть при 7,5 мкм для рассматриваемого спектрального прибора, то экспериментальная кривая выходит на плато при *a* около 60 мкм. Кроме того, сравнивая ход кривых 1–3 между собой видно, что при большем числе центральных пикселей, используемых для измерения *I* линии, зависимости выходят на плато при более широких *a*.

Наряду с измерением освещенности центральной части контура спектральной линии, регистрация с помощью МАЭС позволяет измерять интегральный поток света по всему контуру спектральной линии. На Рисунке 34 приведена зависимость интегрального светового потока, измеренного по всем пикселям, которые формируют контур спектральной линии (кривая 4). Как видно, при таком способе измерения *I* изображения спектральной линии наблюдается ее непрекращающийся рост при увеличении *a* вплоть до 100 мкм. Таким образом, очевидно, что для измерения *I* “слабых” линий следует использовать их интегральный световой поток, а при съемке спектра *a* нужно увеличивать до возможно большей величины, так как при этом будет достигаться большая светосила прибора для линейчатого спектра. Естественным и очевидным ограничением для *a* в данном случае является лишь возможное переложение исследуемой линии с соседними по спектру линиями.

Выявленные несоответствия между теоретической и экспериментальными зависимостями светосилы спектрографа для линейчатого спектра от *a* связаны с тем, что теоретическая модель описывает АФ спектрографа в предположении, что регистрируемая спектральная линия абсолютно монохроматична, и что дифракция параллельного пучка света этой линии на диспергирующем элементе

является единственным фактором, уширяющим ее изображение. На практике, во-первых, физическая ширина спектральной линии вносит определенный вклад в суммарную ширину ее регистрируемого изображения. В частности, в рассматриваемом случае линия Ne 332,37 нм, излучаемая тлеющим разрядом в полом катоде, имеет такую физическую ширину доплеровского контура, которой соответствует ширина ее изображения в спектре около 2 мкм. Во-вторых, ширина изображения линии зависит от разрешающей способности регистрирующего устройства. В случае использования МАЭС минимальная ширина регистрируемой линии не может быть меньше ширины одного пикселя, то есть 12,5 мкм. Кроме указанных причин, ширину изображения спектральной линии увеличивают различные аберрации оптической системы спектрального прибора [245, 246, 253].

Таким образом, экспериментальный контур регистрируемого изображения линии является сверткой, по крайней мере, трех контуров: физического контура излучения линии неона шириной около 2 мкм, дифракционного контура шириной 7,5 мкм, создаваемого диспергирующим элементом, и инструментального контура пикселя фотодиодной линейки шириной 12,5 мкм [254]. На основании приведенных данных минимальную ширину суммарного контура наблюдаемой спектральной линии можно оценить величиной, равной 22 мкм, а с учетом дискретности цифрового изображения – величиной, равной сумме ширин двух пикселей, то есть 25 мкм.

Сопоставляя экспериментальные зависимости светосилы по световому потоку (кривая 4 на Рисунке 34) и b (Рисунок 28) от a, становится совершенно очевидно, что a=7,5 мкм (теоретическая нормальная ширина входной щели спектрального прибора МФС-8) не является оптимальной, особенно для регистрации низкоинтенсивных линий. Увеличение a до 30 мкм позволяет увеличить регистрируемую I линии более чем в 25 раз практически без увеличения ее b. А при увеличении a до 50 мкм регистрируемая I линии увеличится еще в 2,5 раза при увеличении b лишь в 1,5 раза.

Для оценки влияния a на I/S был произведен эксперимент, в котором регистрировались спектры СО водных растворов элементов при различных a.

Результаты эксперимента представлены на рис 35, из которого видно, что в случае измерения интегральной *I* линии наблюдается ее непрекращающийся рост при увеличении *a* вплоть до 100 мкм. Одновременно с этим, естественно, увеличивается уровень фонового излучения и его *S*, но не так интенсивно. Вследствие чего увеличение *a* с 20 мкм – рекомендованного значения для МФС-8 – до 50 мкм позволяет увеличить *I/S* с сохранением приемлемой величины РРС (Рисунок 32), что означает существенное (в 1,5-3 раза) снижение ПО.

В качестве оптимальной *a* была выбрана величина 50 мкм, позволяющая, с одной стороны, получить высокие значения *I/S* и, с другой стороны, иметь возможность регистрировать спектрально разрешенные линии определяемых элементов в случае относительно бедного линиями спектра биологических проб, либо использовать математическую обработку (с аппроксимацией контуров функцией Гаусса) в случае их неполного разрешения (см. п. 2.4.1.).

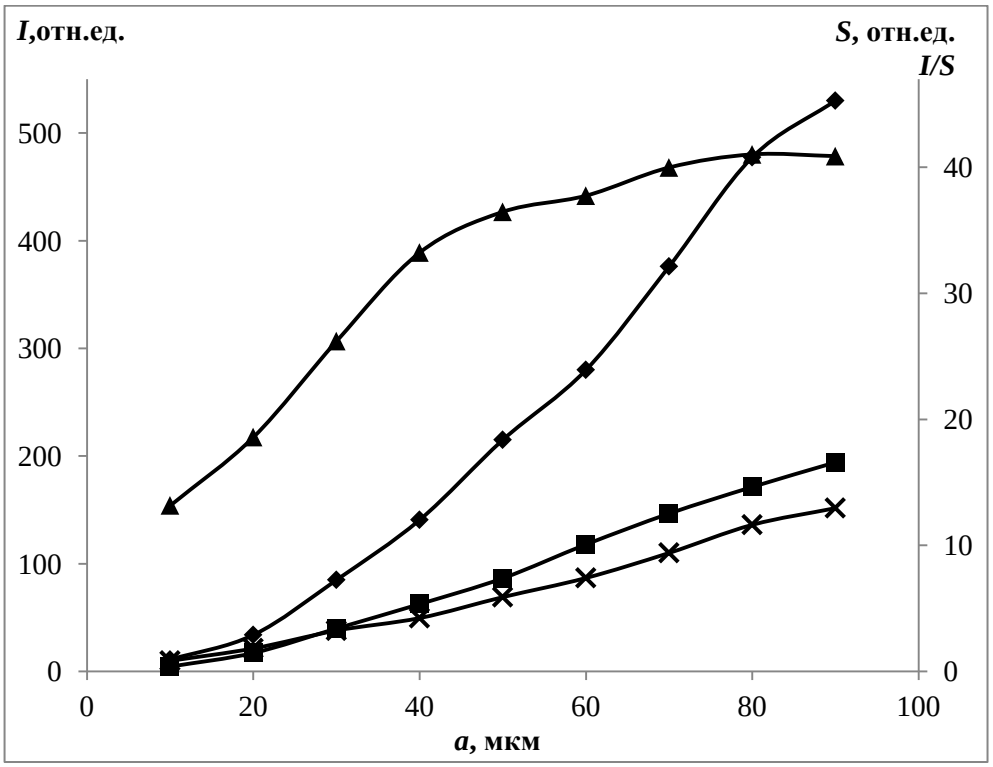

Рисунок 35. Зависимость интенсивности *I* аналитической линии В 249,68 нм (♦) и фонового излучения (■), его среднеквадратичного отклонения *S* (×) и отношения сигнал/шум *I/S* (▲) от ширины *a* входной щели

2.5. Исследование особенностей фотодиодной регистрации спектра

Специфика фотодиодной регистрации изображения спектра заключается в том, что условия экспозиции спектров, а также выбор аналитического сигнала задаются целым рядом параметров. При этом целенаправленная и осознанная установка этих параметров позволяет оптимизировать условия проведения анализа для решения той или иной аналитической задачи с улучшенными показателями, такими как, например: концентрационная чувствительность, воспроизводимость, диапазон определяемых содержаний элементов, по сравнению с методиками, разработанными для фотографической или фотоэлектрической с ФЭУ регистрации спектра

2.5.1. Оптимизация способа расчета аналитического сигнала

Фон в спектре излучения дуги, I и S которого играют важную роль в отношении возможности обнаружения слабых аналитических линий определяемых элементов, бывает двоякого рода [220, 223]. Сплошной бесструктурный фон – континуум – возникает из неквантуемых переходов (при торможении электронов в электрическом поле ионов). Линейчато-полосатый фон в спектре угольной дуги, горящей в атмосфере воздуха, обязан своим происхождением излучению возбужденных молекул CN, O_2, C_2, N_2, CH, NH, OH, присутствующих в разряде (однако, этот структурированный фон обычно вносит значимый вклад при λ<350 нм).

Важным достоинством фотодиодной регистрации изображения спектра является возможность автоматического учета уровня светового потока фона под спектральной линией при измерении ее I [255]. На Рисунке 36а, в качестве примера, приведено цифровое изображение спектральной линии с I в максимуме 4,3 отн.ед., включая вклад фонового излучения плазмы с I на уровне 1 отн.ед. Точное определение уровня фона программным обеспечением «Атом» производится путем измерения его усредненной I для заданного числа пикселей

фотодиодной линейки справа и/или слева от линии и последующей интерполяции ее под контур линии. При измерении *I* в максимуме спектральной линии по одному пикселю получаемое значение после вычета фона равно 3,3 отн.ед. Таким образом, при использовании полупроводниковых детекторов реализуется возможность измерения «чистой» *I*, регистрируемой каждым пикселем изображения спектральной линии так, как это показано на Рисунке 36а для центрального пикселя (максимума) линии.

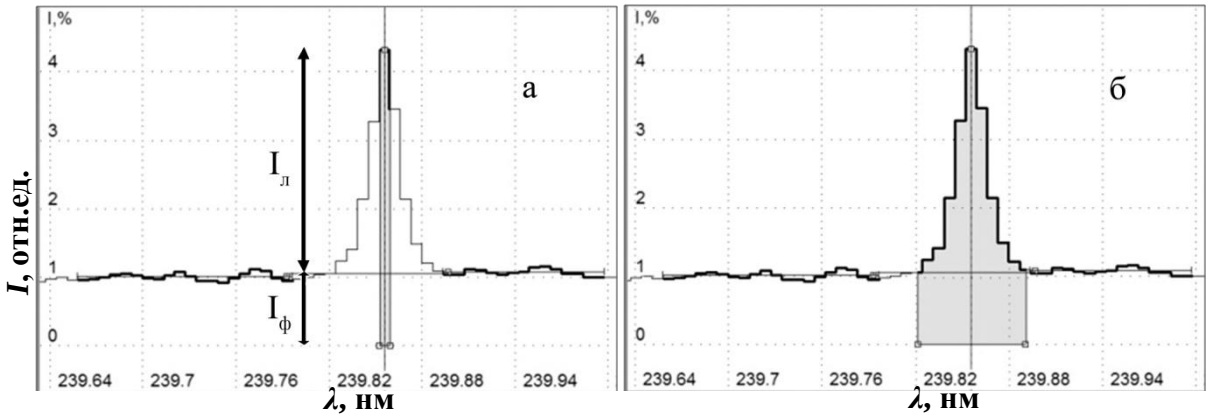

Рисунок 36. Схема измерений для расчета "чистой" интенсивности *I* аналитической линии Са 239,86 нм по центральному фотодиоду (а) и по всему контуру (б)

Использование режима измерения «чистой» *I* линий при автоматическом вычитании фонового излучения позволяет расширить диапазон линейности градуировочного графика, построенного в координатах *lg I – lg m*, в область малых содержаний определяемых элементов, что очевидно из сравнения графиков на Рисунке 37. Съемка спектров стандартных образцов для построения этих графиков производилась с учетом оптимизированных выше условий возбуждения спектра СО раствора солей элементов с торца угольного электрода в дуге переменного тока.

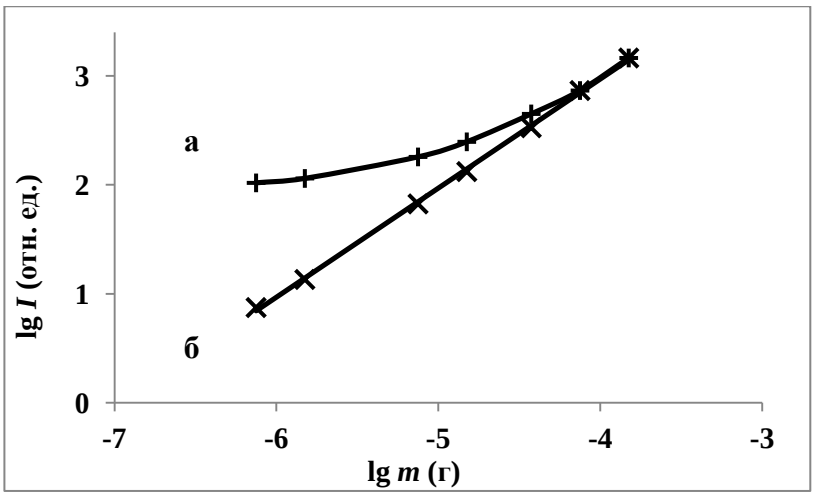

Рисунок 37. Градуировочные зависимости по линии Р 255,49 нм, построенные без учета (а) и с учетом (б) фонового излучения плазмы

Очевидно, что выполнить подобную коррекцию измеряемого аналитического сигнала при регистрации его с помощью полихроматора и ФЭУ невозможно, а в фотоспектрографии для этого требуются некоторые преобразования измеряемых плотностей почернений спектральных линий и фона [256].

Как было показано ранее (п. 2.3.5), фоновое излучение в случае возбуждения спектров в дуговом разряде между угольными электродами при большой *i* имеет «структуру», которая не зависит от типа пробы, т.е. сохраняется как в случае возбуждения спектра стандартных водных растворов, так и в случае реальных биопроб. Поскольку данная работа нацелена на определение микроконцентраций элементов, спектральные линии при таких содержаниях отличаются малой *I*. Соответственно, в данном случае при усреднении фонового излучения по определенному числу точек слева и/или справа от линии возможно занижение аналитического сигнала или его полная потеря. Данный факт иллюстрируется градуировочной зависимостью (Рисунок 38), построенной при вычитании фонового излучения, усредненного по трем точкам с обеих сторон спектральной линии Pb, и при вычитании минимального значения фонового излучения под спектральной линией (как показано на Рисунке 39).

Как видно из Рисунка 38, при больших содержаниях элемента в пробе (следовательно, больших *I* спектральной линии) оба способа учета уровня фона

дают идентичный аналитический сигнал. Однако, при уменьшении концентрации элемента усреднение фонового излучения начинает оказывать влияние на итоговый аналитический сигнал спектральной линии, занижая его. Затем, когда *I* становится слишком малой, процедура усреднения не позволяет выделить спектральную линию из «кажущихся» флуктуаций фонового излучения. Вычитание минимального значения уровня фонового излучения позволяет продлить диапазон линейности градуировочного графика в область малых содержаний, т.е. уменьшает ПО.

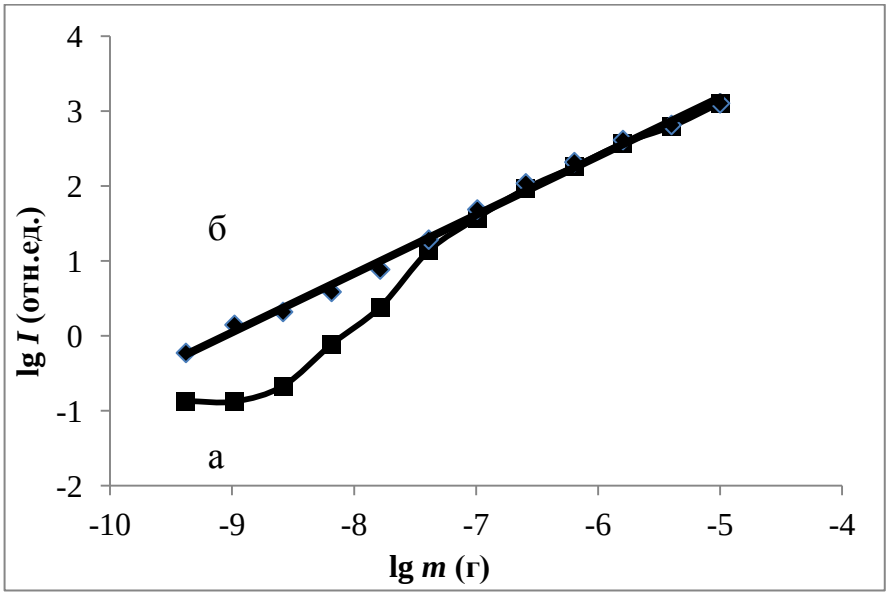

Рисунок 38. Градуировочные зависимости по линии Pb 283,31 нм, построенные при вычитании усредненного (а) и минимального (б) значения уровня фона

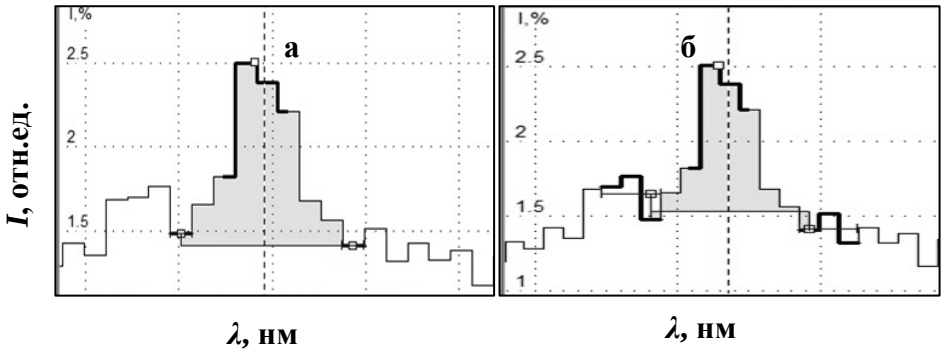

Рисунок 39. Способ учета фонового излучения путем вычитания усредненного (а) и минимального (б) значения

На Рисунке 36б приведена спектрограмма, которая иллюстрирует измерение светового потока спектральной линии по всему контуру. В этом случае в расчет принимаются все пиксели фотодиодной линейки, создающие изображение линии, а *I* линии равна сумме *I*, зарегистрированных этими пикселями. Представленные на Рисунках 36а и 36б варианты измерения и расчета *I* линии являются крайними случаями, поскольку *I* за вычетом уровня фона можно измерять и по одному, и по двум, и по большему числу пикселей в пределах контура линии (как это было реализовано на Рисунке 34).

С помощью разработанной методики возбуждения спектра были построены градуировочные графики, представленные на Рисунке 40, для определения содержания В при использовании разных аналитических сигналов, а именно: *I*, измеренной по одному пикселю в максимуме спектральной линии, по сумме *I* трех центральных пикселей и по интегральной *I* всего контура спектральной линии.

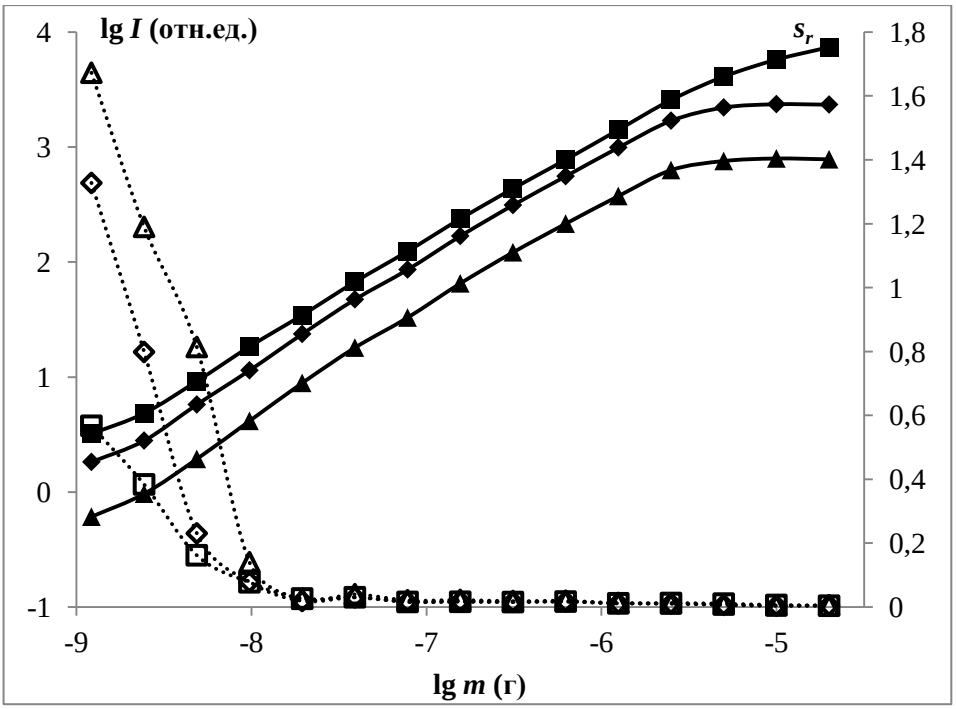

Рисунок 40. Зависимость логарифма интенсивности *I* аналитической линии В 249,68 нм (–) и ее ОСКО s_r (···) от логарифма массы *m* аналита на электроде при расчете интенсивности по одному фотодиоду (▲), по сумме трех фотодиодов (♦) и по интегральной интенсивности (■)

Из градуировочных графиков, построенных при использовании указанных аналитических сигналов (Рисунок 40), видно, что интегральная *I* позволяет продлить диапазон линейности в область больших содержаний, а также улучшает воспроизводимость результатов в области малых содержаний. Таким образом, оптимальным способом расчета аналитического сигнала является использование интегральной *I* по всему контуру спектральной линии.

Следует отметить, что рассмотренный вариант построения градуировочного графика, а именно, по аналитическому сигналу, представляющему собой логарифм "чистой" интегральной *I*, которая прямопропорциональна величине светового потока спектральной линии, невозможен ни в спектрометрическом (с ФЭУ), ни в фотоспектрографическом варианте АЭС. Это связано с тем, что в этих способах регистрации измеряемой интенсивностью является усредненная освещенность либо по ширине выходной щели спектрометра, либо по ширине фотометрической щели микрофотометра, соответственно.

В ряде случаев, а именно, при перекрывании соседних спектральных линий, указанный способ расчета аналитического сигнала не может достоверно передать значение *I* аналитической линии (рис 41). В этом случае корректное значение *I* аналитической линии можно получить, представляя зарегистрированный спектр как сумму кривых Гаусса, каждая из которых соответствует одной их налагающихся спектральных линий [257]. Заложенные в программу «Атом» модули в автоматическом режиме определяют данные кривые, позволяя оценить вклад каждой из линий в общую интенсивность и после математической обработки получить интересующий сигнал. Данный способ в подавляющем большинстве случаев позволяет использовать неразрешенные спектральные линии для определения содержания элементов.

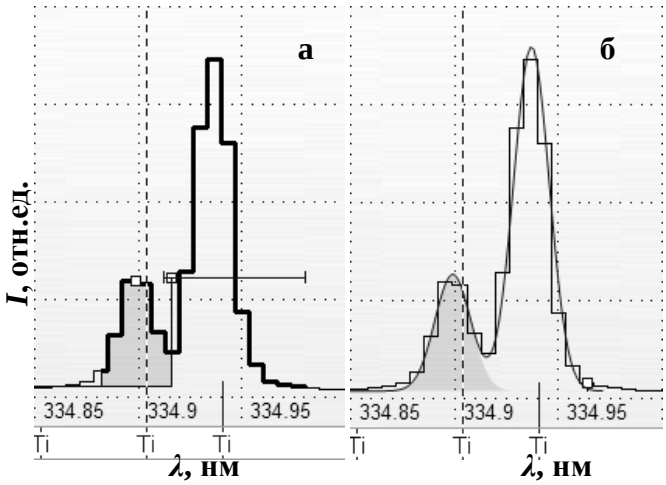

Рисунок 41. Вид аналитической линии Ti 334,9 нм и способы расчета интенсивности *I*: интеграл по пяти диодам (а) и аппроксимация Гаусса (б)

2.5.2. Выбор базового и полного времени экспозиции спектра

Регистрация спектра с помощью МАЭС предполагает установку двух параметров экспозиции [217]. Это, во-первых, время базовой экспозиции спектра $T_Б$, в течение которого производится накопление фотоэлектрического заряда на каждом пикселе фотодиодного детектора с последующей передачей информации об этом заряде в компьютер. Вторым параметром экспозиции является число спектров *N*, зарегистрированных с $T_Б$, которые затем усредняются, а результат представляется как спектр, зарегистрированный за время полной экспозиции $T_П$:

$$T_П = N \cdot T_Б$$

Таким образом, каждый зарегистрированный за $T_П$ спектр представляет собой упорядоченный по λ (или по порядковым номерам пикселей) ряд усредненных по *N* измерениям (за $T_П$) значений потоков электромагнитного излучения, регистрируемых каждым фотодиодом детектора за $T_Б$.

Для изучения влияния $T_Б$ на *I* спектральных линий был проведен эксперимент, в котором регистрировались спектры, возбуждаемые в дуге переменного тока с медными электродами при силе тока 3 А. $T_П$ во всех случаях было равно 20 с, а *N* было различным, а именно, 80, 40, 20, 10 и 4, что соответствует различным $T_Б$, равным 0.25 с, 0.5 с, 1 с, 2 с и 5 с. На Рисунке 42а

представлена зависимость интегральной *I* спектральной линии Cu от $T_Б$. Как видно, увеличение $T_Б$ ведет к прямопропорциональному росту регистрируемой *I* спектральной линии. Следует отметить, что этот рост происходит при одних и тех же условиях возбуждения спектра и при одном и том же $T_П$. Таким образом, при проведении анализа вблизи нижней границы области определяемых содержаний элемента возможно увеличение «чистой» *I* его аналитической линии за счет увеличения $T_Б$.

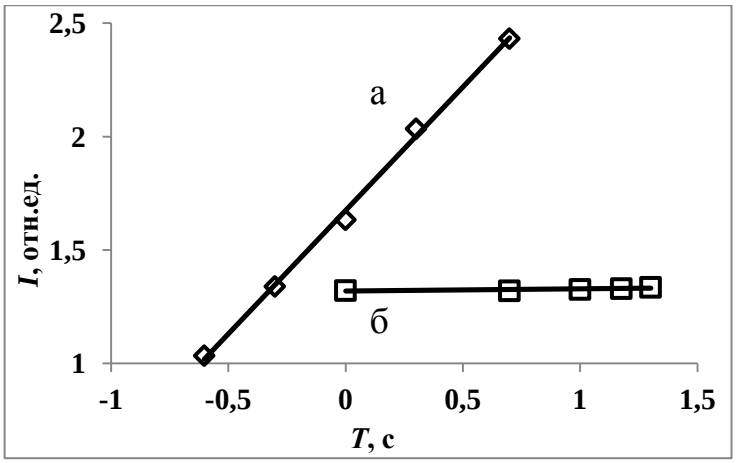

Рисунок 42. Зависимость интенсивности линии Cu 223,01 нм от $T_Б$ при неизменном $T_П$=20 с (а) и от $T_П$ при неизменном $T_Б$=0,5 с (б)

На Рисунке 42б представлена зависимость регистрируемой *I* от $T_П$ при одном и том же $T_Б$=0,5 с. Как и следовало ожидать, увеличение $T_П$ не ведет к увеличению регистрируемого сигнала.

Специфика анализа по методу СО заключается в «импульсном» поступлении элемента в плазму (по сравнению с описанным выше анализом металлов и сплавов) – в этом случае *I* спектральной линии в течение $T_П$ проходит через максимум (Рисунок 19б). Для учета этой специфики в качестве аналитического сигнала была использована не усредненная (как предлагается программой «Атом»), а суммарная (за $T_П$) *I* спектральных линий. Несмотря на то, что вариант расчета аналитического сигнала как суммарной *I* не предусмотрен в программном обеспечении, которым комплектуется детектор МАЭС, в нем реализован экспорт данных в сторонние программы (в частности, в MS Excel), поэтому определение суммарной *I* не является проблемой.

Естественно предполагать, что при использовании суммарной *I* изменение $T_Б$ не должно приводить к изменению аналитического сигнала. Однако, экспериментальные исследования показали, что при увеличении $T_Б$ происходит рост «чистых» *I* спектральных линий с последующим выходом на плато (Рисунок 43а). Аналогичным образом происходит и изменение уровня фонового излучения. В то же время, изменение $T_Б$ оказывает менее значимое влияние на флуктуации уровня фонового излучения, поэтому зависимость *I/S*, показанная на Рисунке 43б, имеет аналогичный вид. Таким образом, увеличение $T_Б$ со значения 250 мс, обычно используемого с детектором МАЭС, до 2 с приводит к увеличению *I/S* в 1,5-2 раза.

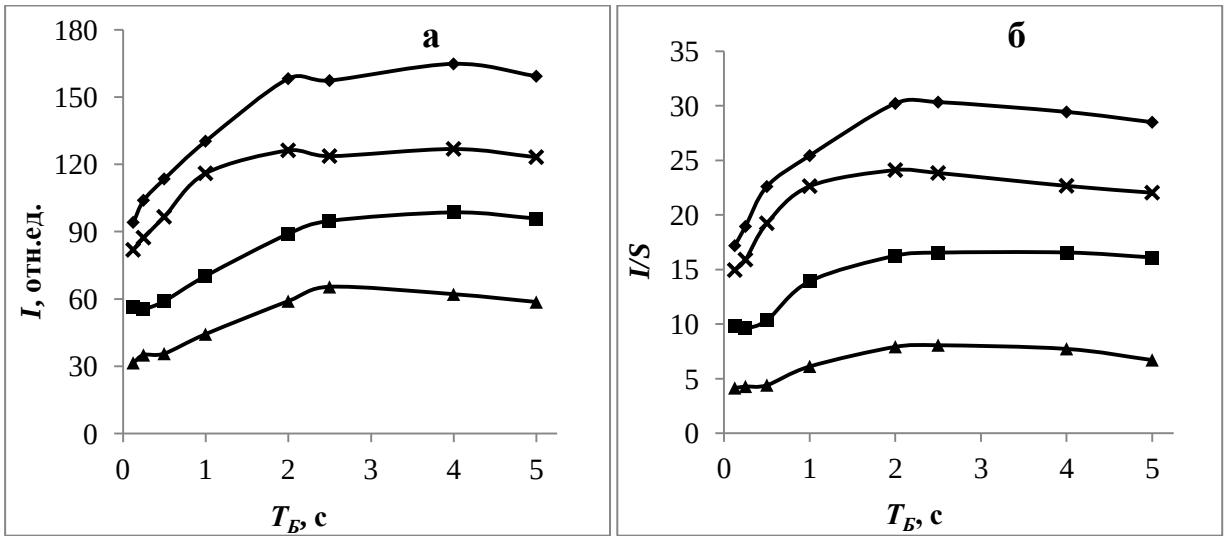

Рисунок 43. Зависимость интенсивностей *I* (а) аналитических линий Cd 228,80 нм (♦), Pb 283,31 нм (■), Ti 295,61 нм (▲), Zn 213,86 нм (×) и отношения сигнал/шум *I/S* (б) от времени базовой экспозиции $T_Б$ при $T_П$=20 с

Однако, возможности увеличения $T_Б$ ограничены максимально возможным количеством заряда, который способен накапливать каждый фотодиод; продолжительная экспозиция фотодиода световым потоком начиная с определенного момента не только не приводит к увеличению регистрируемой *I*, но может вызвать «обнуление» заряда (Рисунок 44).

При регистрации спектров СО проб слюны было обнаружено, что для ряда элементов (Na, Mg, Ca, Si, P) в связи с их большим содержанием в пробах происходит «зашкаливание» значений *I* наиболее сильных спектральных линий, и

данные линии становятся непригодными к использованию. Однако, указанные элементы обладают набором слабых линий (285,28 нм, 208,27 нм 317,27 нм, 251,92 нм, 255,49 нм для Na, Mg, Ca, Si, P соответственно), что позволяет использовать большие $T_Б$ для снижения ПО прочих элементов. Поэтому в качестве оптимального значения $T_Б$ выбраны 2 с, дающие существенный выигрыш в *I/S* с сохранением возможности определения макроэлементов.

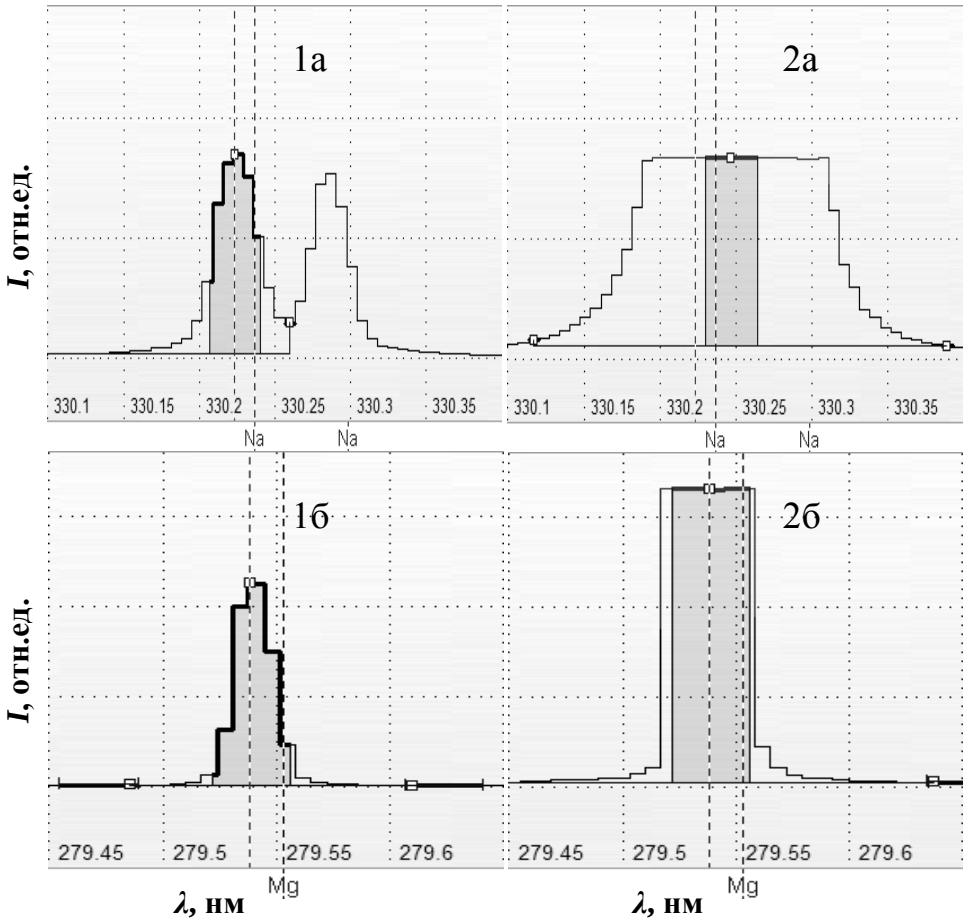

Рисунок 44. Вид аналитических линий Na (а), Mg (б), зарегистрированных при возбуждении спектра пробы слюны при $T_Б$=0,5 с (1) и 2 с (2)

Помимо определения оптимального $T_Б$, в работе было проведено исследование по выбору $T_П$. Зависимость суммарной *I* от $T_П$ приведена на Рисунке 45. В этом случае аналитический сигнал при увеличении $T_П$ выходит на постоянное максимальное значение, при этом происходит уменьшение его флуктуаций. В качестве $T_П$ в данном случае удобно брать время полного испарения наиболее труднолетучего элемента, чтобы иметь возможность зарегистрировать весь полезный сигнал. В качестве оптимального $T_П$ были

выбраны 20 с, гарантирующие полное поступление элементов (как при малых, так и при больших содержаниях) как в случае анализа стандартных растворов, так и биологических жидкостей со сложной органической основой.

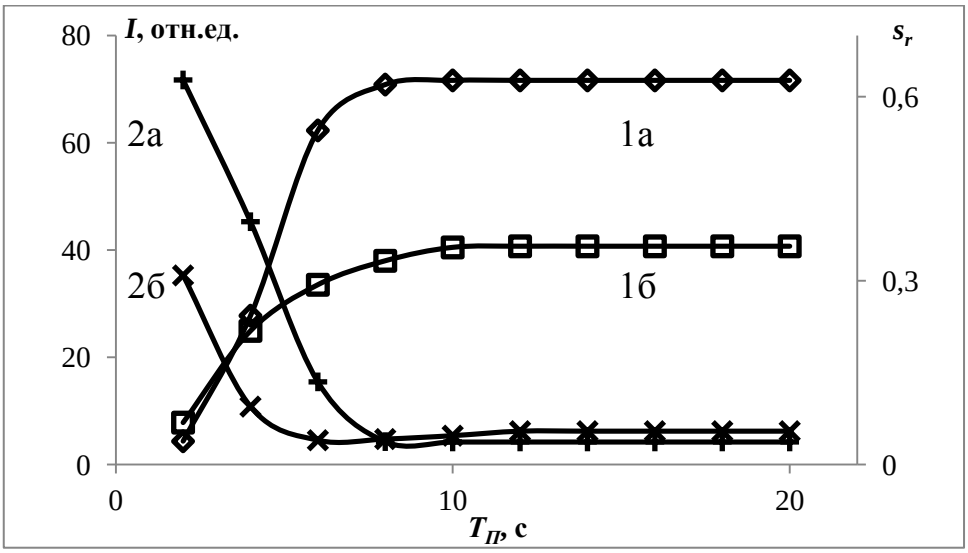

Рисунок 45. Зависимость суммарной интенсивности *I* (1) спектральных линий Pb 283,31 нм (а), Ti 295,61 нм (б) и их ОСКО s_r (2) от времени $T_П$

2.6. Построение градуировочных зависимостей для многоэлементного анализа жидких проб

2.6.1. Приготовление стандартных растворов

Для приготовления градуировочных растворов использовался стандартный многоэлементный раствор CertiPUR IV (Merck), содержащий 23 элемента (Ag, Al, B, Ba, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sr, Tl, Zn) с концентраций 1 г/л. Для приготовления растворов Sn, Ti, Mo использовались металлы СПЧ, которые отбирались с помощью кусачек, предварительно протертых спиртом (согласно [87]), измельчались и очищались от возможных поверхностных загрязнений сначала шкуркой, а потом этиловым спиртом «Экстра» (Вектон), как рекомендовано в [212, 221]. Затем на аналитических весах (Ohaus Pioneer) с точностью до 0,1 мг бралась определенная навеска из расчета 0,1 г элемента на 100 мл раствора и переносилась в термостойкий стаканчик. Разбавленные соляная (5 М) и азотная (6М) кислоты готовились из

концентрированных кислот ОСЧ (Вектон) разбавлением деионизированной водой (18,2 MΩ·см, Аквилон). Согласно общим рекомендациям [258-260], металлы растворялись при нагревании на электроплитке под действием разбавленных азотной и соляной (для Sn), концентрированной серной кислоты ОСЧ (Вектрон) с добавлением азотной (для Ti, Mo) кислот. Затем растворы упаривались до состояния влажных солей, чтобы удалить избыток кислоты, и вновь растворялись при добавлении небольшого количества воды, после этого количественно переносились в мерную колбу и доводились до объема 100 мл. Для приготовления раствора P использовался дигидрофасфат калия (перекристаллизованный из водного раствора). Раствор Si был получен при сплавлении силиката с плавнем (смесью соды и буры) [261]. Вся используемая посуда (колбы, пипетки, стаканы) была предварительно вымыта с порошковым моющим средством для удаления поверхностных загрязнений, затем сполоснута дистиллированной водой, далее вымыта горячей моющей смесью в соотношении 1:1 соляной кислоты (1:1) и пероксида водорода ОСЧ (НеваРеактив) (1:5), после этого трижды сполоснута дистиллированной водой и один раз деионизированной.

В результате описанных процедур получались растворы с содержанием элементов 1 г/л. Для построения градуировочных зависимостей использовались растворы элементов в диапазоне концентраций от 1 до 10^{-7} г/л (для каждого элемента диапазон различен и соответствует предполагаемому содержанию в биожидкостях). При приготовлении градуировочных растворов использовался способ последовательного разбавления с уменьшением концентраций в 2,5 раза для каждого элемента. Растворы с концентрацией до 1 мг/л хранились не более трех дней, растворы с меньшей концентрацией использовались в день приготовления.

2.6.2. Схема анализа

Угольные стержни марки «Искра» обтачивались с помощью металлических фрез для придания им нужной формы («конусообразный» верхний электрод и

«усеченная лунка» - нижний). Полученные электроды обжигались в дуге переменного тока при i=20 А в течение $T_П$=20 с. Затем на нижний электрод наносилась капля 20 мкл раствора полистирола в толуоле с $C_{полист}$=0,3% масс. После испарения толуола на электрод последовательно наносилась капля объемом 10 мкл градуировочного раствора соответствующей концентрации с помощью микрошприца М-10Н, которая высушивалась под ИК-лампой (использовать электроплитку не рекомендуется, т.к. она сильно загрязняет пробы такими элементами как Fe, Ni и Cr [208]). Далее наносилась капля водного раствора NaCl объемом 10 мкл с концентрацией 15 г/л (что соответствует $m_{буф}$=0,15 мг) и выпаривалась по аналогичной схеме. После этих процедур электроды устанавливались в камеру, с помощью микрометрического винта выставлялось h=3 мм. Затем производилось возбуждение пробы при i=20 А в течение $T_П$=20 с. Регистрация спектров производилась с $T_Б$=2 с (N=10). После этого данные из программного обеспечения «Атом» экспортировались в MS Excel, где рассчитывалась суммарная I.

2.6.3.Выбор аналитических линий. Характеристики градуировочных зависимостей

При определении микроэлементов случается, что анализируемый материал и плазма источника часто загрязняются теми же элементами, которые подлежат определению [221]. Мешающее действие может быть обусловлено примесями в добавках (полистирол, NaCl), электродах, воздухе, окружающем плазму. При этом I излучения от примесей, так же как и I фона, добавляется к I аналитических линий элементов пробы, что приводит к ухудшению ПО и s_r, искривлению градуировочных графиков, построенных в координатах lgI - lgm. О необходимости внесения поправки и ее влиянии на форму градуировочной зависимости сообщается в ряде работ [216, 255].

Указанное мешающее действие можно исключить введением поправки «холодного опыта» (который производился по указанной выше схеме с

нанесением деионизированной воды вместо стандартного раствора). В этом случае *I*, измеренная в «холостом опыте», вычитается из общего аналитического сигнала, даваемого пробой. Данный эффект иллюстрирует Рисунок 46, из которого видно, что вычитание из аналитического сигнала пробы сигнала «холостого опыта» приводит к увеличению линейного диапазона градуировочного графика. Аналогичные эффекты обнаружены при построении градуировочных зависимостей всех элементов. Если же даже после учета «холостого опыта» остается загиб на графике, то это свидетельствует о неучтенных примесях [226]. Поскольку электроды в процессе многократного использования могут аккумулировать примеси, «холостой опыт» необходимо периодически повторять, чтобы учесть данный потенциальный источник дополнительных загрязнений.

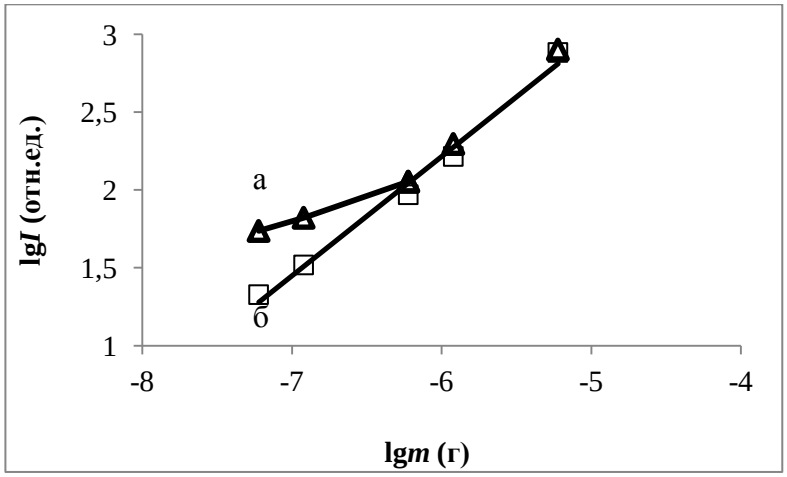

Рисунок 46. Градуировочная зависимость для линии Si 251,43 нм, построенная без учета (а) и с учетом (б) «холостого опыта»

После регистрации спектров градуировочных растворов предстояла процедура выбора аналитических линий для построения градуировочной зависимости. Выбор осуществлялся на основе таблиц [239] и встроенной в программное обеспечение базы данных.

Как указывалось выше (п. 2.5.2), для ряда элементов (Na, Ca, Mg, P, Si) использование наиболее интенсивных линий невозможно, поскольку, при $T_Б$=2 с происходит выход за рамки динамического диапазона фотодиодов. Однако,

перечисленные элементы обладают рядом менее сильных линий, поэтому их определение не является проблемой. В качестве аналитических линий в общем случае использовались наиболее чувствительные, по возможности свободные от перекрывания спектральные линии, градуировочные графики по которым обладают наибольшим диапазоном линейности, углом наклона, коэффициентом корреляции. Для К аналитические линии лежат за границами используемого спектрального диапазона, поэтому данный элемент был исключен из определения.

Количественный спектральный анализ основан на соотношении Ломакина-Шейбе, согласно которому логарифм интенсивности линии определяемого элемента изменяется пропорционально логарифму содержания этого элемента [235]:

$$lgI = B \cdot lgm + lgA$$

где I – интенсивность спектральной линии;

m – масса определяемого элемента на торце электрода;

A, B – параметры, зависящие от условий испарения, атомизации и возбуждения пробы.

В качестве аналитического сигнала использовался логарифм разности «чистых» (за вычетом минимального значения фонового излучения) интегральных (по всему контуру спектральной линии) суммарных (за все время экспозиции) I спектральных линий из спектров стандартных растворов и «холостого опыта». Градуировочные графики строились по 10 параллельным определениям для каждой концентрации. На Рисунке 47 в качестве примера приведена градуировочная зависимость для Cd, из которого видно, что диапазон линейности графика составляет 6 порядков величины содержания, хотя традиционно считается, что для всех источников, кроме ИСП, данный диапазон не может превышать двух-трех порядков.

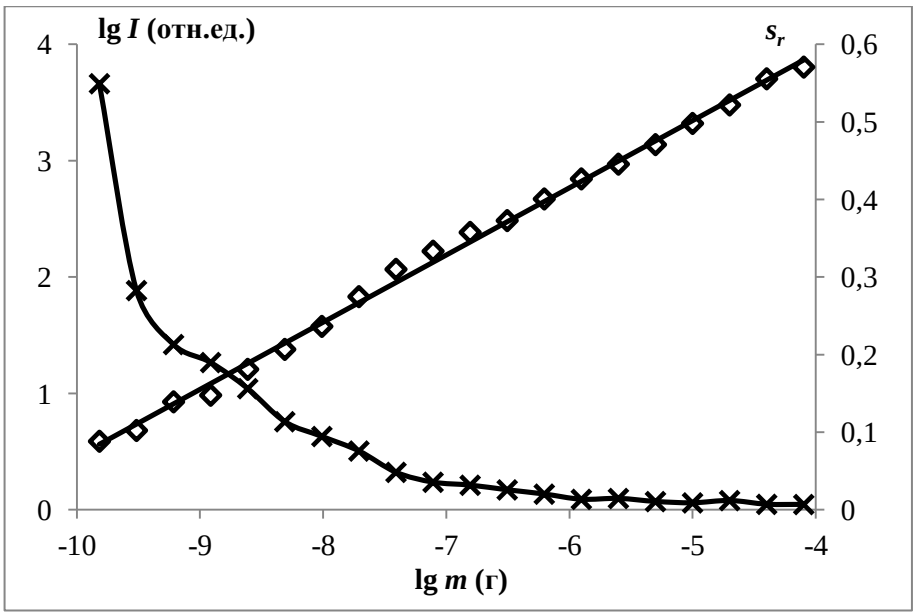

Рисунок 47. Зависимость аналитического сигнала (□) и его ОСКО s_r (×) от логарифма массы *m* Cd на электроде (для спектральной линии Cd 228,80 нм)

В Таблице 4. представлены некоторые характеристики градуировочных графиков, а именно коэффициенты их уравнений *K* (*K*=lg*A*), *B* (и их среднеквадратичные отклонения *ΔK*, *ΔB*), коэффициенты корреляции *r*, абсолютные $ПО_{абс}$, рассчитанные по 3S-критерию (S – СКО логарифма интенсивности «холостого опыта»), минимально определяемое содержание $m_{мин}$ (минимальное содержание, для которого s_r аналитического сигнала меньше 0,03 (аналогично [199, 200]) и концентрационные $ПО_{конц}$ (исходя из условия нанесения на электрод 100 мкл пробы).

Как видно из Таблицы 4, градуировочные зависимости всех элементов близки к линейной прямой (коэффициент корреляции *r* составляет 0,99), а абсолютный $ПО_{абс}$ элементов на торце электрода находится на субнанограммовом уровне. Разработанная методика не уступает по ПО методике анализа СО с фотоэлектрической с ФЭУ регистрацией [201], которая была взята за основу (Таблица 5), но выгодно отличается от нее возможностью прямого анализа биологических проб.

Таблица 4. Характеристики градуировочных зависимостей

элемент	λ, нм	K	ΔK	B	ΔB	r	$ПО_{абс}$, нг	$m_{мин}$, нг	$ПО_{конц}$, мкг/л
Ag	328,07	10,6	0,3	1,03	0,04	0,99	0,08	2	0,8
Al	309,27	7,1	0,1	0,62	0,02	0,99	0,01	2	0,1
B	249,68	8,8	0,1	0,91	0,02	0,99	1	5	10
Ba	233,53	7,73	0,07	0,88	0,01	0,99	3	100	30
Bi	306,77	8,6	0,2	0,87	0,03	0,99	0,5	2	5
Ca	317,93	8,0	0,1	0,89	0,01	0,99	1	40	1
Cd	228,80	6,23	0,05	0,577	0,007	0,99	0,03	1	0,3
Co	252,14	6,37	0,08	0,65	0,01	0,99	0,4	2	4
Cr	283,56	7,51	0,07	0,76	0,01	0,99	0,3	10	3
Cu	324,75	10,4	0,2	0,96	0,03	0,99	0,03	1	0,3
Fe	296,69	7.,12	0,08	0,7	0,01	0,99	0,1	20	1
Ga	294,36	11,4	0,3	1,20	0,04	0,99	0,5	2	5
In	303,93	10,7	0,2	1,15	0,02	0,99	0,8	2	8
Li	323,26	13,0	0,6	1,58	0,08	0,99	8	40	80
Mg	280,27	7,1	0,1	0,60	0,02	0,99	0,1	2	1
Mn	260,57	7,43	0,06	0,713	0,003	0,99	0,01	0,6	0,1
Na	285,28	11,0	0,4	1.54	0,07	0,99	80	100	800
Ni	341,48	6,67	0,06	0,60	0,01	0,99	0,02	10	0,2
P	255,49	6,8	0,1	1,04	0,02	0,99	10	1000	100
Pb	283,31	7,1	0,1	0,74	0,01	0,99	0,6	2	6
Si	251,92	6,8	0,4	0,79	0,06	0,99	30	1000	300
Sn	303,41	4,8	0,2	0,48	0,02	0,99	3	3	30
Sr	338,07	8,7	0,2	0,97	0,03	0,99	1	40	10
Ti	295,61	8,7	0,6	1,01	0,07	0,99	2	40	20
Tl	276,79	7,2	0,1	0,78	0,02	0,99	2	10	20
Zn	213,86	6,06	0,04	0,563	0,005	0,99	0,04	2	0,4

При сравнении ПО разработанной методики и наиболее часто используемых методов элементного анализа биологических жидкостей (Таблица 6) видно, что данная методика по ПО не уступает АЭС-ИСП и близка к ААС-ЭТА. В то же время разработанный способ определения элементного состава биологических

жидкостей отличается методической универсальностью и возможностью проведения анализа минуя стадию пробоподготовки.

Таблица 5. Сравнение $ПО_{абс}$ разработанной методики и методики анализа СО с регистрацией с ФЭУ [201], нг

элемент	данная работа	[201]
Cd	0,03	0,1
Cu	0,03	0,05
Mn	0,01	0,01
Ni	0,02	0,2
Pb	0,6	0,2
Zn	0,04	0,03

Таблица 6. Сравнение ПО разработанного способа с ПО других методов элементного анализа биожидкостей, мкг/л

элемент	данная работа	ААС-ЭТА				АЭС-ИСП			МС-ИСП				
		[149]	[262]	[207]	[192]	[192]*	[263]	[264]	[59]	[265]	[266]	[267]	[268]
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

* со стадией предварительного концентрирования

- данные отсутствуют

2.6.4. Характеристики сходимости разработанной методики

Поскольку аналитическим сигналом в АЭС является *lg I* спектральной линии, то, в соответствии с математической статистикой, в этом случае можно вычислить среднеарифметическое значение величин *lgm*, которое задается соотношением [269]:

$$\overline{lgm} = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} lgm_i$$

где индекс *i* означает *i*-е измерение;

n – число параллельных определений.

Следовательно, относительное среднеквадратичное отклонение следует вычислять по формуле:

$$s_{lgm} = \pm\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} lg^2 m_i - n\,\overline{lgm^2}}{n-1}}$$

Для вычисления доверительного интервала используется формула:

$$lgm = \overline{lgm} \pm \Delta\left(\overline{lgm}\right) = \overline{lgm} \pm t(P,f)\frac{s_{lgm}}{\sqrt{n}}$$

где *t* – коэффициент Стьюдента, задаваемый с вероятностью *P* и числом степеней сфобобы *f* (*f*=*n*-1).

После преобразования логарифмов результат количественного спектрального анализа характеризуется соотношением:

$$\overline{lgm}/\Delta\left(\overline{lgm}\right) < \overline{lgm} < \overline{lgm}\cdot\Delta\left(\overline{lgm}\right)$$

$$\overline{lgm}\frac{\sqrt{n}}{t(P,f)s_{lgm}} < \overline{lgm} < \overline{lgm}\frac{t(P,f)s_{lgm}}{\sqrt{n}}$$

$$\overline{m}/10^{t(P,f)\cdot S_{lgm}/\sqrt{n}} \le \overline{m} \le \overline{m}\cdot 10^{t(P,f)\cdot S_{lgm}/\sqrt{n}}$$

В Таблице 7 приведено содержание элементов в одном из проанализированных образцов слюны с указанием значений, полученных для девяти параллельных.

Несмотря на то, что в качестве среднего значания для набора параллельных измерений в АЭС следует использовать $C_{г.с.}$, на практике наиболее распространено применение среднего арифметического значения $C_{а.с.}$. При малом

объеме выборки данные средние обычно отличаются друг от друго незначимо. В Таблице 7 также приведены значения $C_{а.с.}$, доверительные границы его случайной погрешности ε и s_r, рассчитанные по формулам:

$$C_{\text{а.с.}} = \bar{C} = \frac{\sum_{i=1}^{n} C_i}{n}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(C_i - \bar{C})^2}{n-1}}$$

$$\varepsilon = \frac{t(P,f) \cdot S}{\sqrt{n}}$$

$$s_r = \frac{S}{\bar{C}}$$

Как видно из Таблицы 7 $C_{а.с.}$ и $C_{г.с.}$ практически совпадают, поэтому при расчете среднего значения можно использовать любой из указанных способов представления результата анализа.

Из Таблицы 7 видно, что для большинства элементов s_r не превышает 0,2, что является приемлемым для разработанного способа анализа биожидкостей. Более того, для некоторых элементов s_r<0,1. Также видно, что для Ag и Pb расхождение результатов между паралельными значительно, что объясняется близостью определяемых содержаний с ПО методики. Подобные характеристики результатов определения содержаний микроэлементов получены для всех образцов слюны.

Таблица 7. Результаты определения содержаний элементов (среднее геометрическое $C_{г.с.}$, среднее арифметическое $C_{а.с.}$) и их разброс (верхняя $C_в$ и нижняя $C_н$ границы для $C_{г.с.}$, доверительные границы ε и ОСКО s_r для $C_{а.с.}$) в девяти параллельных пробах одного из образцов слюны

	Na	P	Ca	Mg	Si	Zn	Fe
№ пар.	содержание в слюне, мг/л						
1	246	384	166	13,7	0,80	0,26	0,14
2	274	366	166	13,9	0,83	0,26	0,17
3	231	376	160	13,2	0,64	0,21	0,15
4	317	395	175	11,8	0,79	0,25	0,16
5	296	397	177	14,7	0,62	0,24	0,18
6	257	383	168	13,8	0,70	0,25	0,15
7	271	374	169	14,5	0,75	0,23	0,19
8	224	360	154	13,8	0,63	0,24	0,14
9	306	340	174	11,9	0,45	0,21	0,21
$C_в$	294	389	173	14,3	0,79	0,25	0,18
$C_{г.с.}$	267	375	167	13,4	0,68	0,24	0,16
$C_н$	243	361	162	12,7	0,59	0,22	0,15
$C_{а.с.}$	269	375	168	13,5	0,69	0,24	0,16
ε	25	14	6	0,8	0,09	0,01	0,02
s_r	0,12	0,05	0,04	0,08	0,17	0,08	0,15
	B	Mn	Cr	Cu	Co	Ag	Pb
№ пар.	содержание в слюне, мг/л						
1	0,095	0,007	0,033	0,031	0,009	0,0010	0,014
2	0,113	0,007	0,038	0,019	0,009	0,0012	0,012
3	0,106	0,006	0,037	0,020	0,008	0,0008	0,012
4	0,086	0,005	0,038	0,024	0,012	0,0010	0,017
5	0,086	0,005	0,040	0,021	0,012	0,0009	0,012
6	0,109	0,005	0,031	0,029	0,010	0,0008	0,009
7	0,100	0,004	0,049	0,031	0,010	0,0012	0,013
8	0,103	0,007	0,040	0,031	0,011	0,0013	0,012
9	0,104	0,007	0,040	0,028	0,013	0,0008	0,008
$C_в$	0,107	0,007	0,042	0,030	0,012	0,0010	0,014
$C_{г.с.}$	0,100	0,006	0,038	0,025	0,010	0,0010	0,012
$C_н$	0,093	0,005	0,034	0,022	0,009	0,0009	0,010
$C_{а.с.}$	0,100	0,006	0,038	0,026	0,010	0,0010	0,012
ε	0,007	0,001	0,004	0,004	0,001	0,0002	0,002
s_r	0,09	0,19	0,13	0,19	0,17	0,20	0,20

2.6.5. Проверка стабильности градуировочных зависимостей

В практике АЭС широко распространена процедура переградуировки (или проверки градуировки по реперным точкам) в течение продолжительного времени работы. Однако, в случае Д-АЭС-СО это влечет за собой необходимость использования большого числа электродов и стандартных образцов. По этой причине была сделана проверка стабильности градуировочных зависимостей, которая осуществлялась путем анализа водного раствора солей элементов с известной концентрацией в различные промежутки времени после построения градуировочной зависимости. Результаты определения некоторых элементов в растворах с концентрацией 50 и 500 мкг/л для примера представлены в Таблице 8, из которой видно, что даже по прошествии двух месяцев с момента построения градуировочных зависимостей наблюдается удовлетворительная стабильность получаемых данных в пределах относительной погрешности метода s_r=0,2.

Таблица 8. Результаты определения ряда элементов в стандартных растворах через разные промежутки времени после построения градуировочных зависимостей

элемент	концентрация стандарта, г/л			
	$(5,0\pm0,2)*10^{-5}$		$(5,0\pm0,1)*10^{-4}$	
	через неделю	через 2 мес.	через неделю	через 2 мес.
	найденная концентрация, г/л			
Al	$(5,9\pm1,0)*10^{-5}$	$(5,0\pm1,0)*10^{-5}$	$(4,4\pm0,8)*10^{-4}$	$(5,0\pm0,8)*10^{-4}$
Cd	$(4,9\pm1,0)*10^{-5}$	$(4,2\pm0,8)*10^{-5}$	$(5,9\pm0,8)*10^{-4}$	$(5,0\pm1,0)*10^{-4}$
Cu	$(5,0\pm0,9)*10^{-5}$	$(6,0\pm1,0)*10^{-5}$	$(4,2\pm0,8)*10^{-4}$	$(4,2\pm0,8)*10^{-4}$
Mn	$(5,6\pm1,0)*10^{-5}$	$(4,0\pm0,8)*10^{-5}$	$(4,4\pm1,0)*10^{-4}$	$(5,6\pm0,8)*10^{-4}$
Pb	$(4,8\pm1,0)*10^{-5}$	$(4,7\pm0,9)*10^{-5}$	$(4,2\pm0,8)*10^{-4}$	$(4,5\pm0,9)*10^{-4}$
Zn	$(5,2\pm1,0)*10^{-5}$	$(5,0\pm0,9)*10^{-5}$	$(4,1\pm0,8)*10^{-4}$	$(4,2\pm0,8)*10^{-4}$

2.6.6. Влияние основного аниона и кислотности

Несмотря на то, что разработка методики на многих этапах включала в себя предварительный анализ биопроб, ее применимость для количественного определения элементов в реальных объектах необходимо подтвердить. Одним из этапов проверки являлся анализ растворов с одинаковой концентрацией в них определяемых элементов, но с разными основными анионами с целью выявить влияние последних на получаемые результаты (Рисунок 48). Из литературных источников [208] известно, что характер расположения и прочность осадка на электроде меняются при изменении основного аниона раствора, поэтому интенсивность ряда элементов при нанесении растворов разных солей может быть различной. В данной работе было изучено влияние нитрат-, хлорид- и сульфат-ионов.

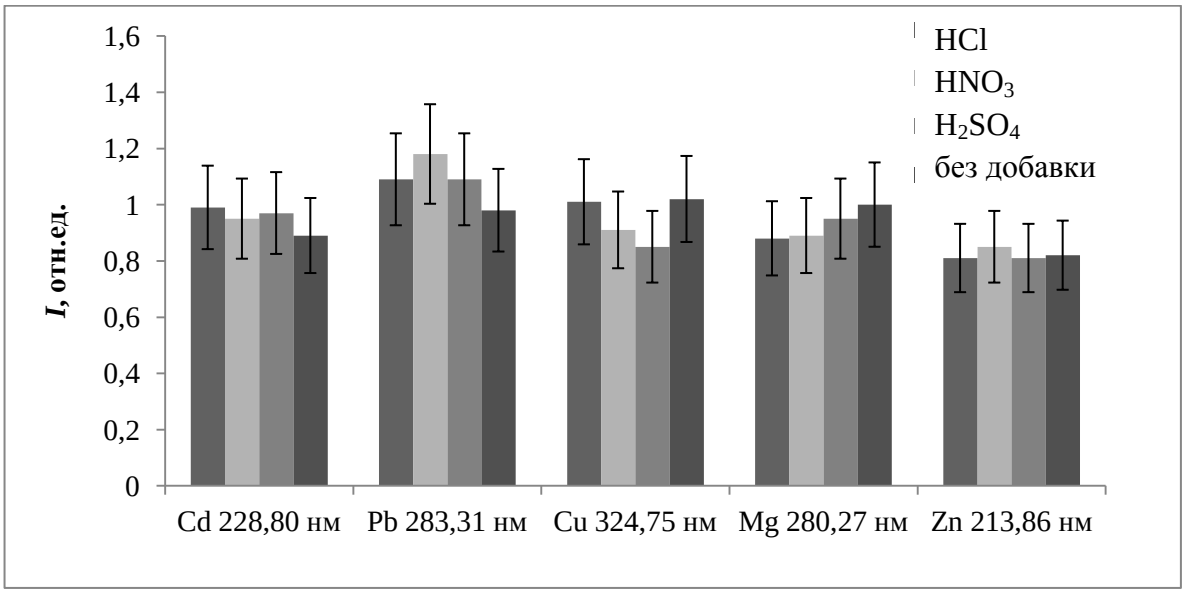

Рисунок 48. Зависимость интенсивностей *I* аналитических линий ряда элементов от природы основного аниона

Как видно из результатов сравнения аналитических сигналов (Рисунок 48), природа аниона не оказывает значимого влияния на аналитический сигнал, что можно объяснить использованием большого количества спектрального буфера, задающего новую матрицу пробы.

Помимо влияния основного аниона, изучалось влияние pH анализируемой пробы на результаты анализа в интервале от 2 до 7 единиц pH. Для этого к исходному водному раствору солей элементов прибавлялось определенное количество разбавленных HCl и/или NaOH, после чего все растворы доводились до равного объема деионизированной водой, чтобы концентрации определяемых элементов были идентичны во всех случаях. В данном эксперименте полученные значения *I* спектральных линий также имеют определенный разброс, однако, отклонение результатов для различных pH растворов (Таблица 9) меньше относительной погрешности анализа s_r (которая составляет 0,2). Таким образом, нет необходимости модифицировать методику при работе с жидкими пробами, имеющими различную кислотность.

Таблица 9. ОСКО (s_r) значений *I* спектральных линий ряда элементов в случае изменения pH раствора в диапазоне от 2 до 7 единиц

	Cd	Cu	Mn	Pb	Zn
s_r	0,06	0,05	0,04	0,12	0,08

3. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РАЗРАБОТАННОЙ МЕТОДИКИ

3.1. Анализ жидких биологических образцов

Определение микроэлементов в пробах, содержащих органические соединения, проводят, главным образом, после их предварительного озоления [167]. При этом обычно требуется значительное количество первоначального вещества (несколько мл) для получения достаточного анализируемого материала; минерализация пробы наносит огромный урон экспрессности метода и является существенным источником потерь и загрязнений. Поэтому изыскание возможностей избежать этой стадии было одной из приоритетных задач данной работы.

Описанная выше разработка методики Д-АЭС-СО жидких проб на многих этапах включала проверку сделанных выводов на анализе биожидкостей, однако, применимость данной методики для прямого (без минерализации) определения микроэлементного состава реальных биопроб необходимо дополнительно подтвердить.

3.1.1. Анализ сыворотки крови

Цельная кровь, а также ее компоненты (плазма и сыворотка) в настоящее время являются самыми распространенными объектами для оценки экспозиции организма человека тяжелыми металлами. При этом стадия пробоподготовки в связи с наличием большого числа органических компонентов для анализа крови является обязательной. Разработанная выше методика определения элементов в биожидкостях теоретически дает возможность проведения прямого анализа крови и ее компонентов. Однако, в ее применимости для данной цели нужно удостовериться непосредственно.

Образцы венозной крови отбирались вечером в 4 пластиковые медицинские пробирки (BD Vacutainer) с гелем-разделителем и активатором свертывания (объем крови в каждой пробирке составлял ≈5 мл); пробоотбор осуществлялся

специализированным медперсоналом. Образцы хранились в течение ночи при температуре +4 °С до анализа. На следующий день пробы были оставлены при комнатной температуре в течение 2-х часов для выравнивания температуры, далее были отцентрифугированы на центрифуге High Speed Centrifuge Type 310 (Mechanika Precyzyjna) при 3600 об/мин в течение 10 минут для разделения фаз (при этом гель-разделитель перемещался вверх по пробирке, пропуская через себя эритроциты и задерживая сыворотку крови). После этого, сыворотки из всех четырех пробирок были объединены в одну пробу. 1 мл этой пробы использовался для проведения прямого анализа по разработанному способу Д-АЭС-СО, а 6 мл данной пробы были минерализированы в микроволновой печи MDS-6 Digestion/ExtractionSystem (Shanghai Sineo Microwave Chemistry Technology) при добавлении 7,5 мл концентрированной азотной кислоты ОСЧ (Вектон) и 2,5 мл концентрированного пероксида водорода ОСЧ (НеваРактив) в политетрафторэтиленовых автоклавах. Разложение пробы проводилось при давлении 1,2 МПа в течение 10 минут, время остывания системы составляло 20 минут. Полученный раствор был количественно перенесен в предварительно вымытую мерную колбу, доведен деионизированной водой до объема 25 мл и затем хранился в пластиковой посуде. Часть полученной по данной схеме пробы была проанализирована методом Д-АЭС-СО, а другая – методами АЭС-ИСП, ААС-ЭТА, РФА-ПВО (исследования проведены с использованием оборудования ресурсного центра СПбГУ «Методы анализа состава вещества» с применением стандартных методик определения металлов в жидких объектах). Часть сыворотки крови из объема 1 мл была подвергнута прямому анализу по разработанному способу, при этом на электроды наносилось различное количество капель пробы, а именно 1 и 5 по 10 мкл каждая (нанесение большего количества сыворотки крови осложнено образованием пузырей и твердой корки после высыхания, которая выносится из зоны плазмы при пробое дугового разряда); анализ проводился по 9 параллельным измерениям. Результаты определений ряда элементов (в пересчете на исходную сыворотку) указаны в Таблице 10, там же указаны допустимые диапазоны содержания в

плазме/сыворотке (согласно [157]) за исключением Pb, для которого указан диапазон содержаний в крови.

Таблица 10. Результаты определения содержания ряда элементов в сыворотке крови различными методами и допустимые диапазоны содержаний

метод	проба	элемент					
		Cd	Cu	Fe	Mg	Pb	Zn
		концентрация, мг/л					
ДЭАСА 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
ДЭАСА 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
ДЭАСА 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
АЭСА с ИСП	минерализованная сыворотка	<0,005	0,60 ±0,06	1,5 ±0,1	16 ± 1	<0,04	0,14 ±0,01
ААСА с ЭТА ГП	минерализованная сыворотка	0,0038 ±0,0002	0,65 ±0,04	-	-	0,035 ±0,002	0,12 ±0,01
РФА с ПВО	минерализованная сыворотка	-*	0,8 ±0,1	1,0 ±0,2	-	-*	-*
диапазон допустимых содержаний [157]		0,0001-0,0052	0,7-1,55	0,6-1,6	-	0,015-0,269	0,55-1,3

- элемент не определялся

-* элемент не был определен (отсутствовал аналитический сигнал)

Как видно из Таблицы 10, результаты анализа минерализованной сыворотки методом Д-АЭС-СО находятся в удовлетворительном согласии с результатами, полученными референтными методами, что говорит о правильности метода. Кроме этого, наблюдается согласие между содержаниями, полученными при прямом анализе сыворотки крови по разработанной методике и при анализе минерализированной сыворотки, что подтверждает отсутствие матричного влияния органического макросостава пробы и возможность проведения прямого анализа биопроб. Из Таблицы 10 также видно, что полученные данные удовлетворительно согласуются с референтными интервалами содержаний, установленными для определяемых элементов.

3.1.2. Анализ слюны

Поскольку одной из задач данного исследования является определение элементов в серии проб слюны с использованием в качестве образцов сравнения водных растворов солей определяемых элементов, необходимо убедиться в отсутствии матричных влияний данного биообразца, т.е. аналитический сигнал, получаемый при разных концентрациях биоматрицы (в том числе и при нулевой концентрации, что соответствует образцам сравнения), должен оставаться одним и тем же.

3.1.2.1. Проверка отсутствия матричного влияния

Для подтверждения универсальности разработанной методики были проведены сравнительные измерения *I* спектральных линий при возбуждении спектра минерализованного образца слюны и того же образца слюны, но разбавленного деионизированной водой (для равенства объемов конечных проб). Минерализация пробы (2,5 мл) производилась в микроволновой печи MDS-6 Digestion/ExtractionSystem (Shanghai Sineo Microwave Chemistry Technology) при добавлении 1,5 мл концентрированной азотной кислоты ОСЧ (Вектон) и 0,5 мл концентрированного пероксида водорода ОСЧ (НеваРеактив) в режиме, который ранее был использован для минерализации сыворотки крови. Результаты анализа для ряда элементов представлены на Рисунке 49, из которого видно, что в пределах погрешности метода аналитические сигналы от обеих проб равны, следовательно, макросостав пробы не оказывает влияния на результаты определения.

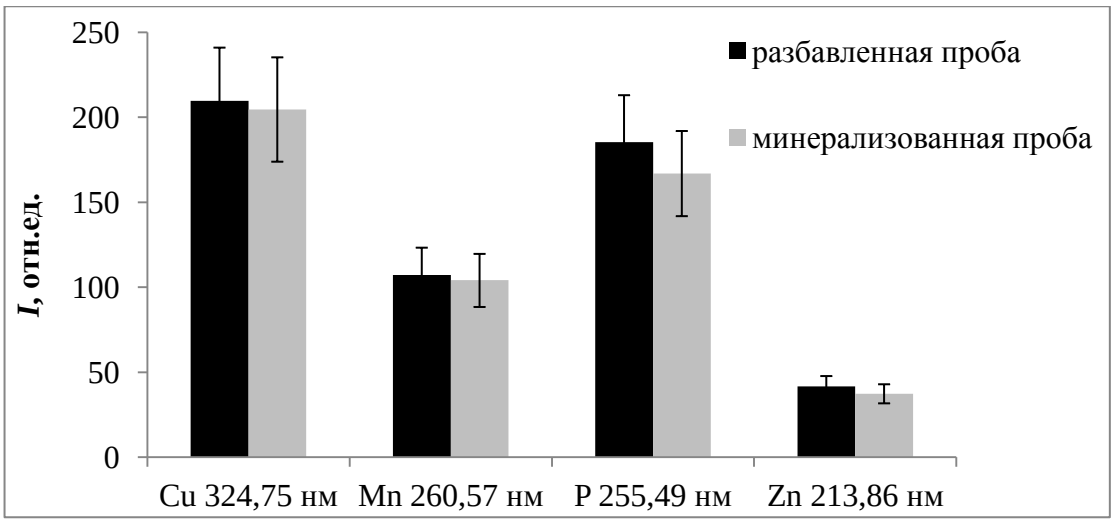

Рисунок 49. Гистограмма интенсивностей *I* (за вычетом холостого опыта) спектральных линий ряда элементов для случая прямого анализа (после разбавления) пробы слюны и анализа минерализированной пробы

Кроме этого, проверка разработанной методики осуществлялась с помощью "метода разбавления и добавок", в ходе которого анализу был подвергнут исходный образец слюны, тот же образец, разбавленный деионизированной водой, и разбавленный образец с внесенной добавкой определяемых элементов. По градуировочным графикам были посчитаны концентрации элементов в исходном образце, а концентрации в разбавленном образце и образце с добавкой были определены с учетом степени разбавления и количества добавки. В частности, на Рисунке 50 на примере Ti 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 мг/л; точка 3). Из Рисунка 50 видно, что экспериментальные точки удовлетворительно легли на градуировочную прямую, что подтверждает правильность разработанного способа и отсутствие матричного влияния.

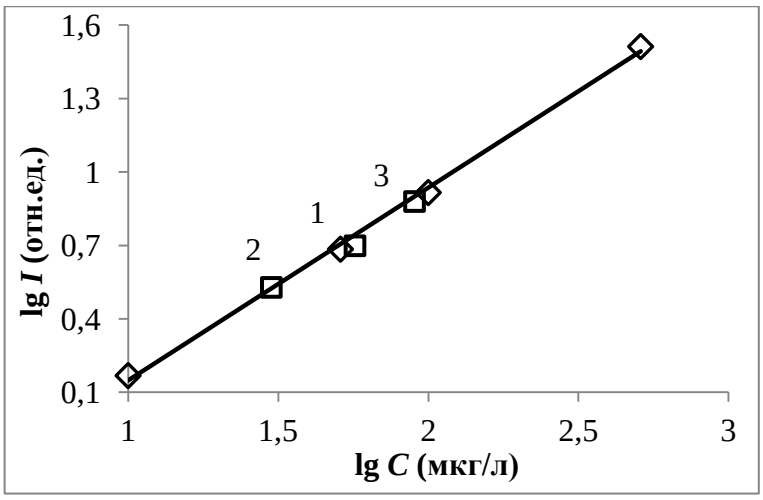

Рисунок 50. Участок градуировочного графика для Ti (по линии 295,61 нм) (◊) с точками (□), полученными при анализе исходной пробы слюны (1), разбавленной пробы (2) и пробы с добавкой (3)

Также был проведен опыт, в котором на электрод наносилось различное количество капель пробы слюны, а именно 10, 15 и 20 (по 10 мкл каждая), с целью выявить, скажется ли избыточное присутствие органических компонентов в плазме дугового источника на пропорциональности увеличения *I* линий определяемых элементов. На основании содержаний, определенных по градуировочным графикам для первой точки (10 капель) были рассчитаны содержания на электроде элементов в случае нанесения 15 и 20 капель (теоретически рассчитанные) и сравнены с содержаниями, полученными по градуировочным графикам (практически найденные) (Рисунок 51).

Как видно из Рисунка 51, практически найденное содержание на электроде Al и Mn соответствует теоретически рассчитанному (зависимости выходят из нуля и имеют угол наклона 45°). Это не только подтверждает отсутствие влияния макросостава слюны на результаты количественного определения, но и открывает возможность увеличения ПО посредством нанесения большего количества пробы на электрод, что было реализовано, к примеру, в [233] для определения микросодержаний элементов в природных водах. В дальнейших экспериментах для определения содержания элементов в слюне на каждый электрод наносилось 15 капель пробы (по 10 мкл каждая).

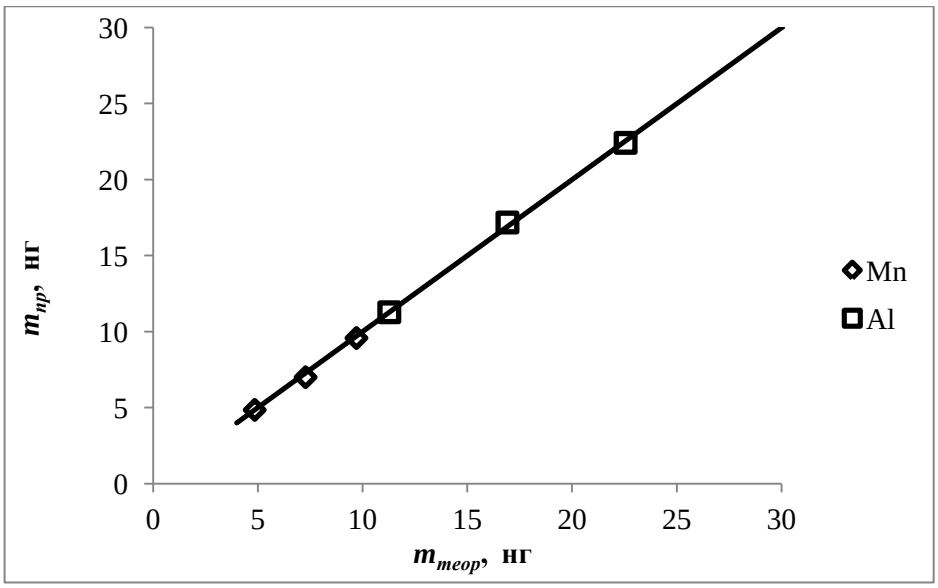

Рисунок 51. Зависимость содержания практически найденного количества $m_{пр}$ Al и Mn на электроде от теоретически рассчитанного количества $m_{теор}$

3.1.2.2. Оценка влияния условий пробоподготовки и хранения образцов на результаты элементного анализа

В публикациях, подробно рассмотренных в гл. 1, после пробоотбора образцы слюны центрифугируют с целью удалить клеточный дебрис (отмершие клетки), муцин (высокомолекулярные гликопротеины, содержащие кислые полисахариды) и другие крупные молекулы и частицы. При удалении компонентов, содержащихся в слюне и кажущихся мешающими при анализе, изменяется и вязкость слюны (поэтому отцентрифугированная слюна напоминает водный раствор). Хотя существуют данные, указывающие на уменьшение содержания гормонов и белков [270, 271], информация о влиянии центрифугирования на содержание элементов в слюне отсутствует. Кроме этого, отобранные образцы слюны при масштабных исследованиях обычно охлаждают или (что чаще) замораживают. Замораживание является одним из наиболее простых и доступных способов сохранения пробы на длительный срок, так как слюна на 98% состоит из воды, поэтому она легко кристаллизуется при минусовых температурах [118]. К замораживанию прибегают в случае, когда невозможно или нецелесообразно проводить анализ сразу после пробоотбора (такие ситуации часто связаны с

необходимостью накопления проб, чтобы снизить стоимость одного измерения). При консервации проб путем замораживания в [272] было установлено, что хранение слюны при температуре от -20 ^{o}C до -80 ^{o}C значительно увеличивает ошибку определения концентрации гормонов тестостерона и эстрадиола; при определении малонового диальдегида, сиаловой кислоты и общего уровня белков рекомендуется проводить анализ только что отобранных образцов. В связи с вышесказанным встает необходимость выявления влияния центрифугирования образцов слюны и их замораживания на результаты определения в них элементов.

Для оценки влияния центрифугирования были проанализированы 14 различных образцов слюны, каждый из которых после пробоотбора был разделен на две части. Первая часть была отцентрифугирована в течение 15 минут при 6000 об/мин с последующим отделением супернатанта (надосадочной жидкости), вторая часть не подвергалась никаким воздействиям. Обе части были подвергнуты анализу по разработанному выше способу.

В результате эксперимента удалось выделить три группы элементов по степени изменения их содержания. Первая группа – это элементы, *I* спектральных линий которых не изменяются, к ней относятся Na, P, Ca, B, Cr, Pb. Вторая группа – Ti, Si, Mn – элементы, *I* спектральных линий которых уменьшаются в 1,2 и более раз в супернатанте слюны по сравнению с образцами цельной слюны для подавляющего числа проб (например, для Mn на Рисунке 52). Третья группа – Ag, Al, Cu, Fe, Mg , Zn – элементы, для которых не удалось выявить четкую зависимость (снижение *I* спектральных линий зафиксировано лишь в некоторых образцах).

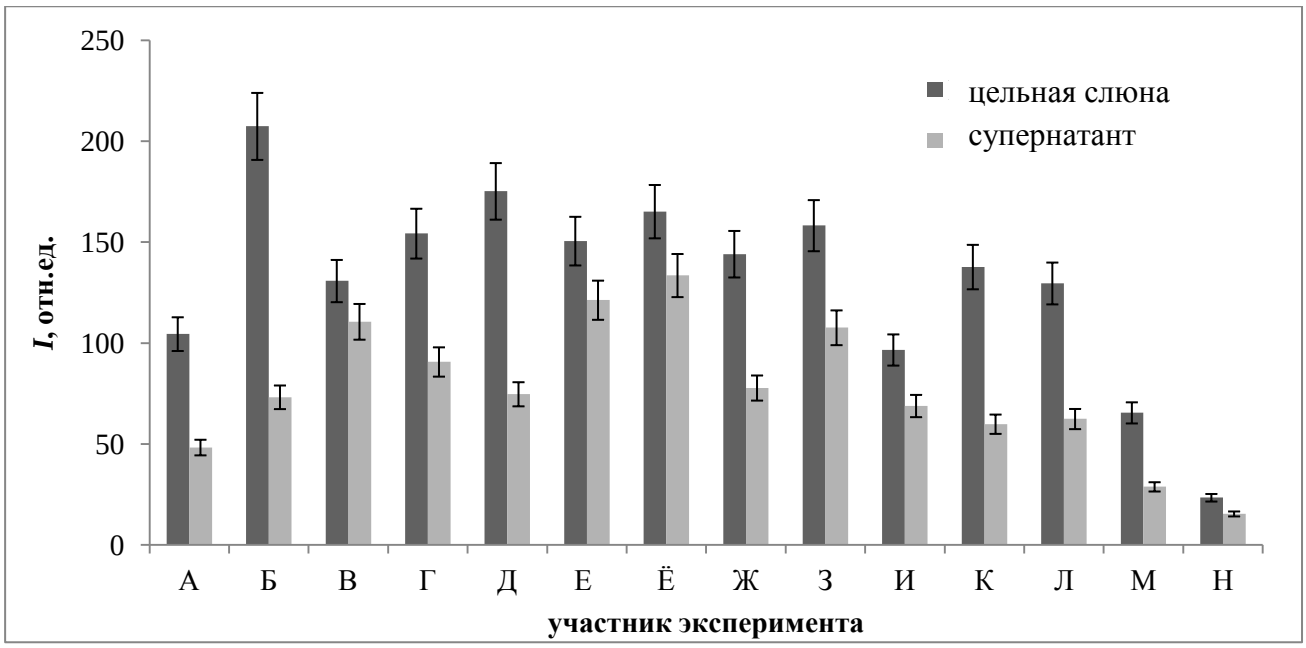

Рисунок 52. Интенсивности *I* спектральной линии Mn 260,57 нм при анализе цельной слюны и её супернатанта различных доноров

Для оценки влияния хранения проб в замороженном состоянии на результаты определения содержания микроэлементов были проанализированы образцы от 11 доноров. Каждый из образцов был разделен на две части: первая была заморожена при температуре -10 °С, вторая часть была сразу же проанализирована. Спустя несколько дней замороженный образец был разморожен при комнатной температуре, в ходе размораживания образовывался видимый мутный белковый сгусток, напоминающий разделение фаз при центрифугировании. Для анализа была взята прозрачная часть пробы.

При сравнении результатов анализа выделено три группы элементов. Первая группа – элементы, *I* спектральных линий которых не изменяются в подавляющем большинстве проб; к ним относятся Na, B и Al. Вторая группа – Ca, Fe, Mn, P, Pb, Si, Ti – элементы, *I* спектральных линий которых уменьшаются при анализе слюны после замораживания по сравнению с анализом исходной слюны (Рисунок 53), в эту группу входят Ca, Fe, Mn, P, Pb, Si, Ti. Третья группа – это элементы (Ag, Cu, Cr, Mg, Zn), для которых не удалось выявить четкую зависимость.

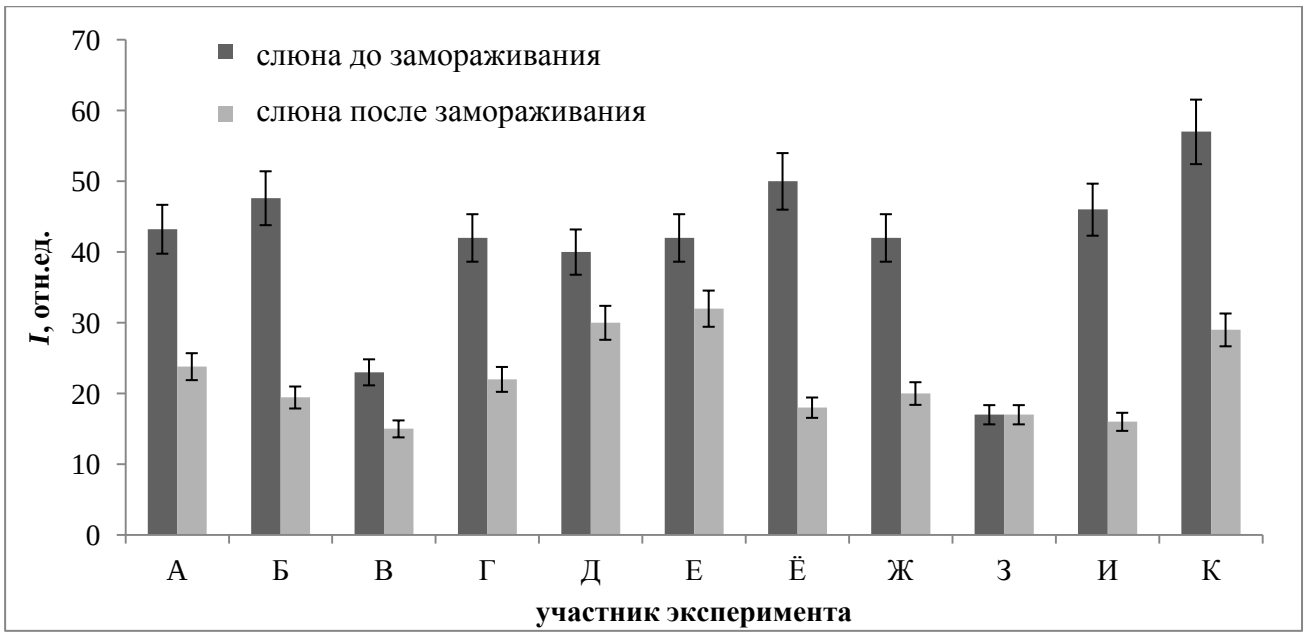

Рисунок 53. Интенсивности *I* спектральной линии Ca 317,93 нм при анализе цельной слюны различных доноров и тех же образцов цельной слюны после замораживания

Таким образом, вследствие того, что процедуры центрифугирования и замораживания образцов слюны способны приводить к уменьшению содержания некоторых элементов (при этом влияние указанных операций сложно оценить количественно), в дальнейших экспериментах анализу подвергались только что отобранные образцы цельной слюны.

3.1.2.3. Схема анализа

Для определения содержания элементов по разработанной методике было проанализировано 60 различных образцов слюны. Все волонтеры (студенты и аспиранты Института химии СПбГУ) были заранее предупреждены о дате и кратко проинструктированы. Отбор проб осуществлялся с 12 до 14 часов, чтобы свести к минимуму циркадные изменения состава слюны. Волонтеры перед отбором проб не принимали пищи как минимум в течение полутора часов и воздерживались от курения, если это необходимо, в течение получаса. Перед непосредственным пробоотбором доноры ополаскивали ротовую полость

деионизированной водой. Слюна, образованная в течение первой минуты после ополаскивания ротовой полости, не использовалась для анализа. Далее волонтеры занимали удобное положение, им были предоставлены стаканчики с достаточно широким горлом, предварительно вымытые по описанной в п. 2.6.1. схеме, в которые посредством сплевывания отбиралось около 2 мл слюны. В среднем, этот процесс занимал от пяти до пятнадцати минут (в редких случаях доходил до получаса). При сборе слюны не производилось какой-либо стимуляции. Затем волонтерам было предложено заполнить анкету (Таблица 11), чтобы в дальнейшем использовать полученный статистический материал для выявления возможных корреляций.

Таблица 11. Образец заполняемой анкеты

Дата	**Время**
ФИО	
пол	**Дата рождения**
Проживание последний год (подчеркнуть): СПб, Петергоф, другое	
Витамины и минералы (подчеркнуть): Принимаю регулярно, принимаю иногда, не принимаю	
Курение (подчеркнуть): Не курю вообще, бросил(а), курю регулярно, курю иногда **Марка сигарет** **Стаж курения**	
Пломбы в зубах (подчеркнуть) Нет, одна, более одной, более трех	

Далее слюна переливалась в пластиковую пробирку (также предварительно вымытую) так, чтобы пена над жидкостью оставалась в стаканчике. Затем из пробирок на заранее подготовленные электроды (обожженные и с нанесенной полистирольной пленкой; 9 параллельных определений на одну пробу) последовательно наносилось 15 капель (каждая объемом 10 мкл) слюны, которые

выпаривались под ИК-лампой для уменьшения затрачиваемого времени. Далее анализ происходил по разработанной схеме.

Из 60 волонтеров в возрасте от 19 до 24 лет 25 были юношами, 35 – девушками. 42 волонтера сообщили в анкетах, что они не курят (в дальнейшем эти волонтеры были объединены в группу «некурящие»), 7 – курят регулярно, 7 – периодически, 4 – недавно бросили (группа «курящие», 18 человек). 9 волонтеров сообщили о регулярном приеме витаминов и минеральных комплексов, а 36 – о нерегулярном, 15 волонтеров не употребляли витамины. При заполнении анкеты волонтерам также было предложено указать количество запломбированных зубов (что рассматривалось как предрасположенность к кариесу), в результате среди 60 испытуемых 14 волонтеров не имели пломб вообще или имели по одной пломбе (слабая предрасположенность – «группа СлП»), 13 волонтеров имели 2-3 пломбы (средняя предрасположенность – «группа СрП»), 33 волонтера имели более 3 пломб (сильная предрасположенность – «группа СиП»).

3.1.2.4. Среднестатистические концентрации микроэлементов в слюне

После определения концентраций элементов по указанному выше способу полученные данные были подвергнуты статистическому анализу с целью выяснения закона распределения. Для проверки распределения каждого элемента в генеральной выборке (n=60 проб) был использован критерий Пирсона (χ^2–критерий), число концентрационных интервалов k, на которые разбивалась выборка, равно 8 ($\sqrt{n}\approx 8$) [269]. Сравнение рассчитанной величины χ^2 с критическим значением, равным 11,1 (для P=0,95; f=k-3=5), позволяло сделать вывод о верности предполагаемого вида распределения. Для статистической обработки данных использовался программный пакет «Statistica».

При построении экспериментальных распределений содержаний элементов в слюне с целью проверки нормального закона выяснилось, что для данных распределений для большинства элементов (Fe, Na, Mg, Si, Al, Cu, Ti, Zn, Mn)

значение χ^2–критерия существенно больше критической величины (Таблица 12). По этой причине предположение о нормальном распределении было отвергнуто и далее производилась проверка логнормального распределения – нормального распределения логарифмов содержаний элементов в слюне. В этом случае внешний вид зависимости соответствовал нормальному распределению, а значение χ^2–критерия было меньше критического (Таблица 12). Естественно, что, поскольку содержание элементов подчиняется логнормальному закону, то в качестве среднего значения будет правильно использовать не $C_{а.с.}$, как это традиционно принято [273], а $C_{г.с.}$ (среднее арифметическое логарифма). При этом, данные значения и их интервалы заметно отличаются (Таблица 12). Далее в работе под средними значениями содержаний элементов в слюне понимаются $C_{г.с.}$.

Таблица 12. Характеристики распределений содержания Fe в слюне

	среднее значение содержания, мг/л	интервал содержаний, мг/л	значение χ^2–критерия
нормальное распределение	0,28	±0,35	132641
логнормальное распределение	0,15	(0,05; 0,48)	4

При этом, как было обнаружено, для некоторых элементов (Mn, Ti, Si, Cu, Zn) значение χ^2–критерия было близко к критическому, что позволяло предполагать, что такие распределения состоят из нескольких логнормальных распределений, соответствующих различным факторам влияния. В то же время распределения содержаний P и Ca в слюне подчиняются не логнормальному, а нормальному закону.

Затем рассчитывались средние содержания тех элементов, которые были получены во всех образцах. Такое ограничение, согласно [167], необходимо, поскольку при вычислении среднего содержания только для тех проб, в которых

элемент был определен, средний результат оказывается завышенным, а если же при усреднении учитывать образцы, где элемент не обнаружен, принимая его содержание за нуль, то получаются заниженные результаты. Для элементов, которые не удалось достоверно обнаружить в подавляющем числе образцов, указана медиана и верхняя граница диапазона (Таблица 13).

При анализе полученных данных было выявлено, что для некоторых элементов (Al, Cu, Fe, Ti, Zn) в четырех проб наблюдаются значительные отклонения (в область больших содержаний). При дополнительном опросе волонтеров был выявлен факт наличия металлических вставок в полости рта. При расчете среднего значения содержания указанных элементов данные пробы не учитывались.

Из сравнения результатов, полученных в данной работе и в других (Таблица 13), можно сделать вывод, что, хотя для большинства элементов в литературе наблюдается существенный разброс в их содержаниях в слюне, значения, полученные в данной работе, удовлетворительно сопоставляются с данными других исследователей. Исключение составляют Mg, Ca, P, для которых в данной работе получены завышенные результаты (однако, в сравниваемых работах образцы слюны центрифугировали и хранили в замороженном состоянии, а, как показано в п. 3.1.2.2, данные операции приводят к уменьшению содержания указанных элементов). Стоит отметить, что для некоторых элементов данные о содержаниях в слюне отсутствуют. Кроме этого, в единичных случаях в спектрах проб были обнаружены линии Ni, Mo и W (в пробах волонтеров, сообщивших о наличии металлических вставок).

Таблица 13. Средние значения и интервалы содержания элементов в слюне, мг/л

данная работа		[147]	[148]	[143]	[118]	[211]	[133]	[59]	[10]	[274]
Na	455	206	-	-	-	-	-	-	-	100
	127-1209	-	-	-	115-1840	-	-	-	-	62-233
Zn	0,29	1,3	0,057	0,17	-	-	-	0,26	-	-
	0,014-1,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mn	0,049	0,042	-	-	-	-	0,025	0,003	0,007	-
	0,009-0,67	-	-	-	-	-	0,009-0,042	-	0,0001-0,07	-
Cu	0,01	0,05	0,33	0,07	-	-	0,005	0,02	-	-
	0,0002-0,72	-	-	-	-	-	0,000-0,012	-	-	-
Mg	22	6,76	4,73	-	4,8	6	-	-	-	-
	7,2-140	-	-	-	-	4-9	-	-	-	-
Fe	0,18	0,44	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,012-1,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ca	240	47	22	-	-	8	-	-	-	42
	52-400	-	-	-	40-160	6-12	-	-	-	38-72
P	223	138	-	-	-	153	-	-	-	84
	29-470	-	-	-	-	110-200	-	-	-	37-142
Ti	0,086	0,758	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,013-1,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Si	2,1	5,36	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,5-18,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cr	0,049	0,03	-	0,05	-	-	-	-	0,003	-
	0,008-0,12	-	-	-	-	-	-	-	0,0001-0,099	-
Ag	0,0008	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<0,077	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cd	0,0002	-	-	-	-	-	-	0,00043	0,00014	-
	<0,003	-	-	-	-	-	-	-	0,00002-0,002	-
Pb	0,004	-	-	-	-	-	-	0,026	0,003	-
	<0,2	-	-	-	-	-	-	-	0,0004-0,12	-

- данные о содержании элемента отсутствуют

3.1.2.5. Выявление влияния субпопуляционных факторов на содержание элементов

В данной работе выявление влияния различных факторов выполнялось с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA (Analysis of variance)) в программе «Statistica».

Удалось обнаружить влияние на содержания ряда элементов пола, вредных привычек, количества пломб в зубах. Существенной разницы между содержанием элементов в слюне волонтеров, проживающих в Санкт-Петербурге и Петергофе не выявлено, скорее всего в связи с тем, что эти города расположены достаточно близко, из-за чего экологическая обстановка в них практически идентична. Обнаружить влияние приема витаминов и минералов не удалось, поскольку не было возможности достоверно разделить всю опытную группу на несколько подгрупп (в связи с тем, что большинство волонтеров принимали витаминные комплексы нерегулярно). Также, в связи с близостью волонтеров по возрасту не удалось обнаружить значимого влияния данного фактора (зафиксировано лишь незначительное (p>0,05) уменьшение содержаний Mg и Zn с возрастом).

3.1.2.5.1. Зависимость содержания элементов от пола

Было выявлено, что средние значения логарифмов содержания Mn, Ti и Si различны (p<0,05) для юношей (n=25) и девушек (n=35). Для визуального отображения этих зависимостей на примере Si были построены частотные распределения логарифмов содержаний для всей группы волонтеров (Рисунок 54а), а также отдельно для девушек и для юношей (Рисунки 54б и 54в соответственно).

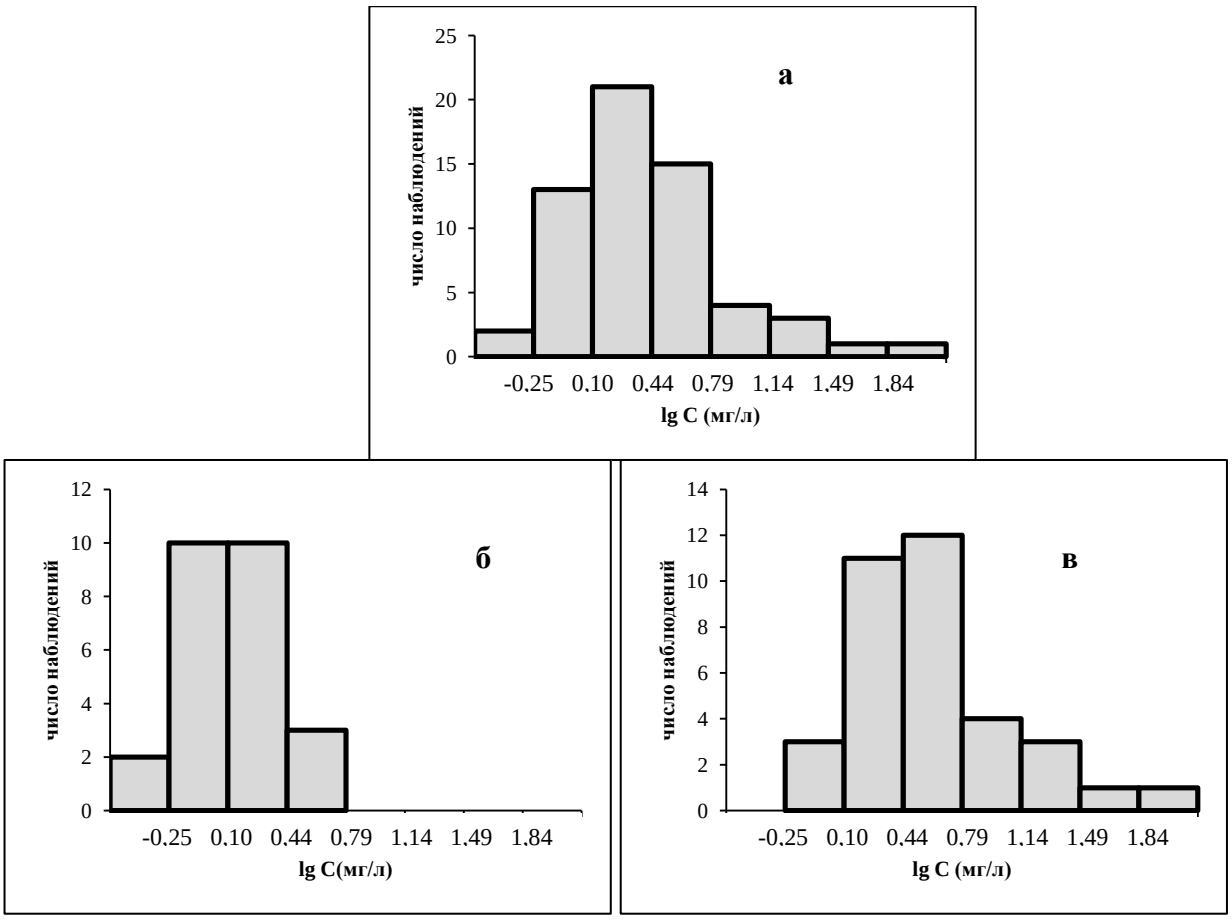

Рисунок 54. Частотное распределение логарифма содержания Si в слюне (мг/л) в общей группе волонтеров (а), в подгруппе юношей (б) и девушек (в)

При анализе малых ($10<n<50$) выборок возможность применения распределения Стьюдента (проверка нормального закона распределения) осуществлялась с помощью составного критерия [269]. На основании полученных результатов рассчитывалась величина:

$$d_x = \frac{\sum_{i=1}^{n}|x_i - \bar{x}|}{S_x\sqrt{n(n-1)}}$$

Вид распределения не противоречит нормальному, если $d_{1\text{-}q/2} \leq d_x \leq d_{q/2}$ (где $d_{1\text{-}q/2}$ и $d_{q/2}$ граничные значения величины d_x, зависящие от n и P_1 (P_1=0,95). Далее рассчитывалось число результатов m, удовлетворяющих условию:

$$|m_i - \bar{x}| > 2{,}5S_x$$

Если $m \leq 1$ (при $n \leq 20$) или $m \leq 2$ (при $n \leq 50$), то с P_2=0,98 вид распределения не противоречит нормальному. Таким образом, при выполнении обоих критериев распределение является нормальным с $P=(P_1+P_2-1)=0{,}93$.

Как видно из представленных распределений (Рисунок 54), наблюдается смещение максимумов влево и вправо (для подгруппы юношей и девушек соответственно) относительно общего распределения. Стоит отметить, что распределение в каждой из этих подгрупп (юноши и девушки), так же не противоречит логнормальному распределению. Для группы юношей n=25 $d_{1-q/2}$=0,74, d_x=0,76, $d_{q/2}$=0,87, m=0; для группы девушек n=35 $d_{1-q/2}$=0,75, d_x=0,76, $d_{q/2}$=0,85, m=1. Подобные закономерности наблюдаются и для Ti, а для Mn проявляется обратная тенденция (Таблица 14). При этом в литературе встречается упоминание зависимости от пола только для Mn (среднее содержание Mn в слюне юношей также больше, чем девушек [133]).

Таблица 14. Среднее геометрическое содержание $C_{г.с.}$ Si, Ti и Mn в слюне с указанием границ интервалов (максимального и минимального содержания) в различных исследуемых группах, мг/л

		Вся группа	Юноши	Девушки
Si	$C_{г.с.}$	2,64	1,56	3,73
	интервал	0,48-75,5	0,48-4,35	0,58-75,5
Ti	$C_{г.с.}$	0,092	0,028	0,201
	интервал	0,003-7,151	0,003-0,224	0,016-7,151
Mn	$C_{г.с.}$	0,052	0,068	0,043
	интервал	0,009-0,670	0,015-0,670	0,009-0,338

3.1.2.5.2. Зависимость содержания элементов от курения

Пагубное влияние на организм подтверждено многими научными исследованиями, выявлено воздействие табачного дыма на слюну и болезни полости рта [275]. Однако, о влиянии на содержание микроэлементов в слюне упоминается только для Cd. В данной работе имелась возможность оценить это влияние и для других элементов. Вся опытная группа была поделена на две: некурящие (43 человека) и курящие, а также недавно бросившие (15 человек).

Как видно из Рисунка 55, на котором представлены результаты количественного анализа для указанных групп, среднее содержание Ag, несмотря на перекрывание интервалов, в слюне курящих людей несколько больше, чем в слюне некурящих (p<0,05).

Кроме этого, в группе курящих доноров вероятность обнаружения Pb и Cd выше, чем в группе некурящих (однако, достоверно определить различие в содержании данных элементов в группах не удалось в связи с недостаточно низким ПО).

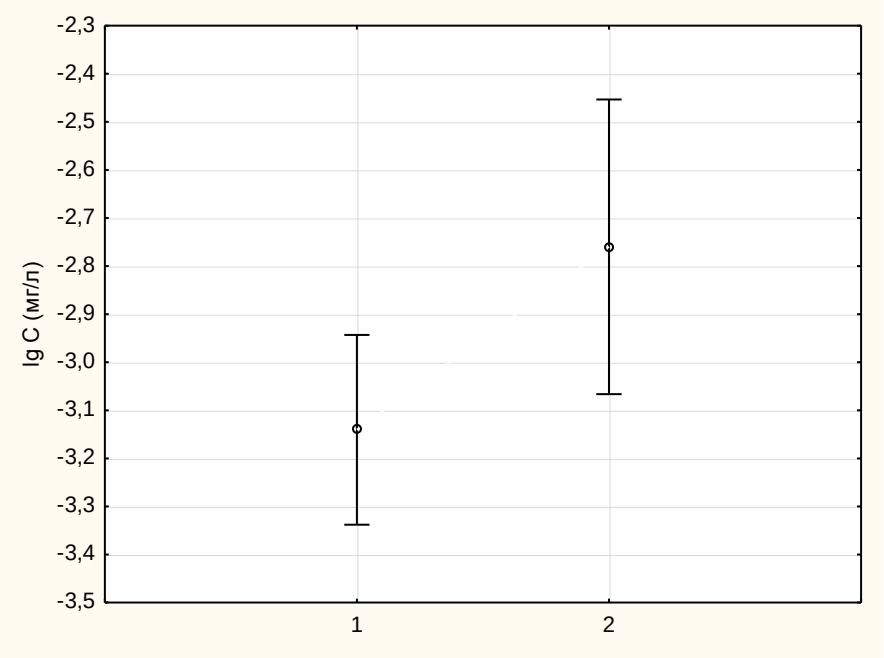

Рисунок 55. Различие логарифма содержаний Ag в образцах слюны курящих (1) и некурящих (2) волонтеров

3.1.2.5.3. Зависимость содержания элементов от количества пломб в зубах

В ряде публикаций [128, 133] отмечаются кариостатические свойства некоторых элементов – они способны подавлять рост бактерий, способствующих развитию кариеса. В связи с чем в данной работе был проведен статистический анализ полученных результатов с целью выяснить, изменяется ли содержание элементов в слюне от содержания пломб в зубах (что является показателем предрасположенности к кариесу). Для этого опытная группа была поделена на три

подгруппы: лица, не имеющие пломб или имеющие одну пломбу (*n*=13), лица, имеющие 2-3 пломбы (*n*=12), лица, имеющие более трех пломб (*n*=35). В связи с невозможностью проведения параллельного стоматологического осмотра, для статистического анализа использовались данные, полученные при анкетировании.

Как видно из распределений (Рисунок 56), при увеличении количества пломб (предрасположенности к кариесу), возрастает содержание Cu в слюне (максимум распределения при переходе от группы с отсутствием или одной пломбой к группам с большим количеством пломб смещается вправо). При этом каждое из распределений соответствует нормальному, что подтвердилось с помощью проверки составным критерием.

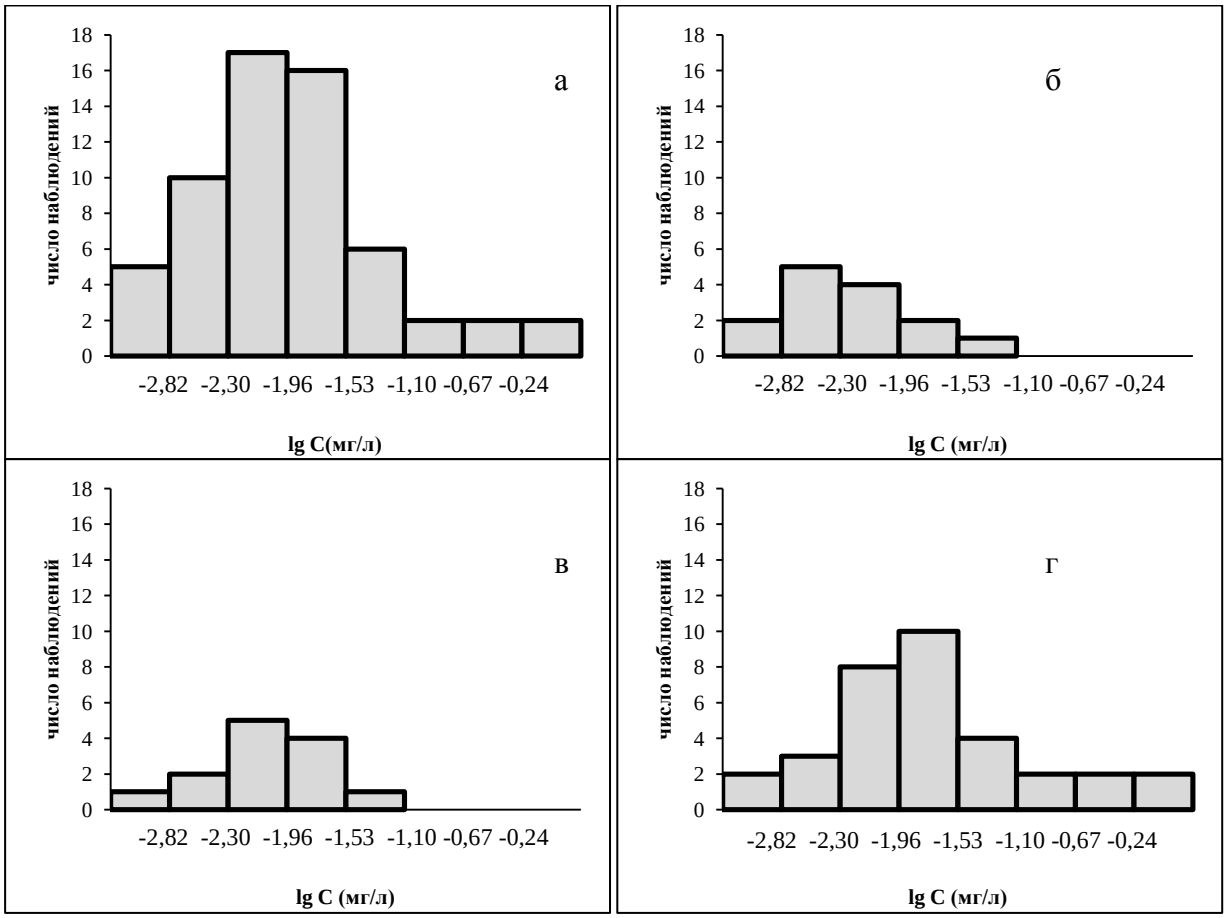

Рисунок 56. Распределение логарифма содержания Cu (мг/л) в слюне во всей группе (а), в группе лиц, имеющих не более одной пломбы (б), в группе лиц, имеющих 2-3 пломбы (в), в группе лиц, имеющих более трех пломб (г)

Подобные зависимости обнаружены также для Zn и Al (для всех трех элементов различие в логарифме содержания в слюне для группы лиц,

не имеющих пломб, и лиц, имеющих более трех пломб, статистически значимо (p<0,05)). Именно эти элементы в литературе определяются как имеющие кариостатические свойства. По-видимому, увеличение их содержания является ответом организма на возрастание количества кислотообразующих бактерий с целью подавить их рост и, как следствие, развитие кариеса.

3.1.2.6. Межэлементные корреляции

Проведенный статистический анализ полученных данных выявил не только влияние субпопуляционных факторов на содержание элементов в слюне, но и наличие межэлементных корреляций.

Наиболее яркий пример – взаимосвязь содержания Ca и P (Рисунок 57), что вполне ожидаемо, т.к. в стоматологии широко распространено использование коэффициента Ca/P [135].

Несмотря на то, что распределение среднестатистических значений содержаний этих элементов в слюне подчиняются нормальному закону, более точная линейная зависимость между ними получается для логнормальных содержаний (r=0,85 для логарифмов содержаний, r=0,79 для содержаний, p<0,05).

Также было обнаружено, что взаимно коррелируют логарифмы содержания Cu, Al и Zn (r (Al-Cu)=0,33, r (Al-Zn)=0,55, r (Cu-Zn)=0,57), скорее всего потому, что для этих элементов обнаружена одинакового характера зависимость от количества пломб в зубах.

Подобное выявление корреляций может помочь в понимании способов попадания элементов в организм и механизмов их влияния, а существенное несоблюдение корреляций в индивидуальных случаях – в обнаружении отклонений в организме [86].

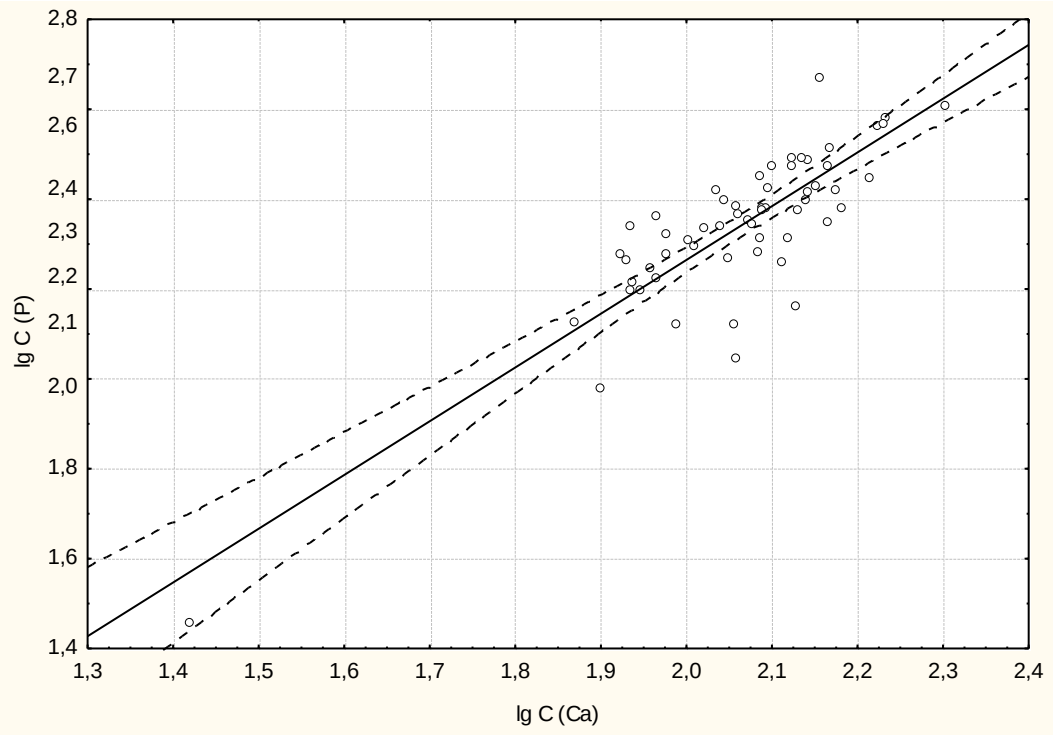

Рисунок 57. Диаграмма рассеяния для логарифма содержания Ca и P (мг/л)

3.2. Анализ твердых биологических образцов

3.2.1. Анализ ногтей

Несмотря на то, то основной целью данного исследования является разработка методики определения элементов в биологических жидкостях, твердые биологические объекты (такие как волосы и ногти) в большинстве описанных в п. 1.2.2.1 работ подвергаются анализу после проведения дополнительной стадии пробоподготовки проб, заключающейся в кислотной минерализации.

По этой причине в работе сделана попытка продемонстрировать возможности определения элементного состава ногтей с помощью Д-АЭС-СО и получения информации (после проведения статистической обработки данных) относительно влияния различных субпопуляционных факторов на содержания элементов в данном биологическом образце.

3.2.1.1. Схема анализа

В работе был произведен анализ 73 образцов ногтей волонтеров. Образцы ногтей отбирались путем среза стальными ножницами (предварительно обработанными этиловым спиртом) со всех пальцев обеих рук. Для хранения образцы помещались в чистый полиэтиленовый пакет, каждому образцу присваивался персональный номер.

Для удаления поверхностного загрязнения ногти промывались порцией деионизированной воды (~5мл) и порцией ацетона ОСЧ (Вектон) (~5мл), после чего высушивались в сушильном шкафу при 80 °С в течение 15 минут. Высушенные образцы взвешивались с точностью ± 0,1 мг (средняя масса навески по всем пробам составила 0,86 г).

Навеска ногтей помещалась в политетрафторэтиленовый автоклав, в который затем добавлялся 1 мл концентрированной азотной кислоты ОСЧ (Вектон) и 1 мл концентрированного пероксида водорода ОСЧ (НеваРеактив). Автоклав устанавливался в микроволновую печь MDS-6 Digestion/Extraction System (Shanghai Sineo Microwave Chemistry Technology Co). Разложение ногтей проводилось при давлении 1,2 МПа в течение 10 минут, время остывания системы составляло 20 минут. Полученный раствор количественно переносился в стеклянную пробирку на 2 мл (объем которой предварительно проверялся путем определения веса чистой воды [68]). Общий объем раствора доводился до метки деионизированной водой.

На подготовленные электроды наносилось 10 капель минерализата ногтей (по 10 мкл каждая), далее анализ проводился по стандартной схеме. Результаты определения ряда элементов в одном из образцов ногтей представлены в Таблице 15, из которой видно, в частности, что s_r не превышает 0,2.

После процедуры пробоотбора каждому волонтеру предлагалось заполнить анкету для предоставления личной информации (пол, возраст, отношение к курению, область проживания, наличие контакта с металлами (профессиональный, по медицинским причинам)). Волонтеры (n=73) – люди в

возрасте от 9 до 68 лет. Из них 35 мужчин и 38 женщин.14 человек – постоянно курящие со стажем от 3 до 35 лет. 42 человека проживают в Санкт-Петербурге или Ленинградской области более 5 лет.

Таблица 15. Средние значения и диапазоны содержаний элементов, определенных в одном из образцов ногтей, мкг/г

элемент	Ag	Al	Ca	Cu	Mg	Pb	Zn
$C_н$	0,8	10	520	2,7	66	4,1	300
$C_{г.с.}$	1,0	11	600	3,1	73	4,6	340
$C_в$	1,1	12	690	3,5	81	5,2	370
$C_{а.с.}$	1,0	11	610	3,1	73	4,6	340
s	±0,2	±2	±120	±0,5	±8	±0,6	±40
s_r	0,2	0,18	0,20	0,16	0,11	0,13	0,12

В связи с тем, что анализ ногтей по разработанной методике предполагает стадию пробоподготовки твердой пробы с помощью дополнительных реагентов, в эксперименте в некоторых пробах не удалось обнаружить ряд элементов (Таблица 16), что связано с недостаточной чистотой используемых реагентов (в которых содержание интересующих элементов превышает их содержание в биопробах).

Таблица 16. Число проб (из общей серии n=73 образца), в которых были достоверно определенны элементы

элемент	число проб
Ag	49
Al	73
Ca	73
Cd	60
Cr	12
Cu	73
Fe	18
Mg	73
Mn	17
Ni	24
Pb	67
Zn	73

3.2.1.2. Среднестатистические концентрации микроэлементов в ногтях

Для проверки гипотезы принадлежности выборки к определенному виду распределения использовался наиболее критерий Пирсона (χ^2-критерий). Определение производилось для элементов, которые были достоверно определены в большинстве проб ногтей (n>95 %) исходной серии. k=8 ($k=\sqrt{73}$ ~8), $f=k$-1=7, критическое значение χ^2=14,1 при P=0,95 [269]. Сравнение рассчитанной для каждого элемента величины χ^2 с критическим значением позволяло сделать вывод о верности предполагаемого вида распределения (Таблица 17). Для статистической обработки данных использовался программный пакет «Statistica».

Таблица 17. Значения χ^2-критерия для различных видов распределения (нормальное/логнормальное) и вид распределения для ряда элементов

элемент	χ^2(для нормального распределения)	χ^2(для логнормального распределения)	вид распределения
Al	31,95	1,76	Логнормальное
Ca	19,34	2,82	Логнормальное
Mg	1,18	-	Нормальное
Cu	12,31	-	Нормальное
Pb	100,9	13,29	Логнормальное
Zn	6,97	-	Нормальное

Аналогично статистической обработке содержаний элементов в слюне, если содержание элемента в ногтях подчиняется нормальному закону распределения, то среднее значение содержания данного элемента рассчитывалось как $C_{а.с.}$, если логнормальному – то как $C_{г.с.}$. Для элементов, которые достоверно обнаружены не во всех образцах (n<95%), рассчитывалась медиана, значение которой наиболее корректно будет отражать средний показатель содержания (согласно [276]), при этом при установлении диапазона содержаний указывалась только верхняя граница (Таблица 18).

Таблица 18. Средние значения и диапазон содержаний элементов в серии проб ногтей, мкг/г

	данная работа		[277]		[278]		[161]		[279]	
элемент	диапазон	среднее	диапазон	среднее[Б]	диапазон	среднее[В]	диапазон	среднее[В]	диапазон	среднее[А]
Ag	<8,31	0,193[А]								
Al	0,328-54,5	5,52[Б]	285-1936	837,4						
Ca	14,2-1274	337[Б]	420-5980	2311,6			28,5-344	96,8		
Cd	<17,6	0,15[А]			2,2-3,6	2,9	0-3,7	0,73	0,014-0,040	0,023
Cr	<20,8	11,7[А]	1,39-16,1	4,6	1,3-1,5	1,4			0,53-3,78	1,4
Cu	1,13-10,2	2,94[Б]	3,89-107	20,8	3-18,6	19,2			1,10-4,19	2,80
Fe	<58,1	16,0[А]	30,1-266	128,6			27,5-166	66,9	18-32	23
Mg	4,54-264	93,4[В]	129-3522	570,8						
Mn	<1,15	0,44[А]	1,5-13	4,58						
Ni	<12,6	2,95[А]	2,2-8,8	5,1						
Pb	<25,3	0,29[А]			1,9-38,8	8,5	7-77,5	27,5	0,201-1,08	0,513
Zn	175-446	259[В]	48,2-380	152	83-200	129	34,4-317	94,8	102-127	112

А-медиана;

Б- среднее геометрическое;

В- среднее арифметическое

Средние значения и диапазоны содержаний элементов в серии проб, полученные в данной работе, представлены в Таблице 18. Для сравнения в ней

указаны также содержания элементов в ногтях, найденные в других работах. Для всех элементов, определенных в данной работе, наблюдается удовлетворительная согласованность с литературными данными.

3.2.1.3. Выявление влияния субпопуляционных факторов на содержание элементов

В литературных данных есть сведения о наличии зависимости между уровнями микроэлементов и различными субпопуляционными факторами (пол, возраст, вредные привычки). В данной работе выявление влияния различных факторов выполнялось с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One-way ANOVA (Analysis of variance)) в программе «Statistica».

Их всех исследуемых факторов (возраст, пол, область проживания, отношение к курению), информация о которых была получена при анкетировании, удалось выявить достоверное влияние лишь пола и отношения к курению. Проследить изменение содержания элементов в ногтях лиц разного возраста не удалось в связи с незначительным объемом выборки (группы людей младше 20 и старше 30 лет составляли менее 10 человек). Влияние области проживания также не было обнаружено, поскольку большинство доноров постоянно находились в Санкт-Петербурге (в течение как минимум последних пяти лет, предшествующих отбору образов ногтей).

3.2.1.3.1. Зависимость содержания элементов от пола

Из литературных данных известно, что содержание ряда элементов в ногтях человека различно для мужчин и женщин. Например, в [158] указывается на различие концентраций Ca, Cu, Fe, Mg, Zn.

При выявлении влияния пола на содержание элементов в ногтях исследуемые образцы волонтеров (n=73) разбивались на две выборки по признаку «пол» (n=35 мужских и n=38 женских). В данной работе удалось обнаружить

достоверное различие между уровнями содержаний Cu в женских и мужских образцах с уровнем значимости $p<0,05$ (Рисунок 58).

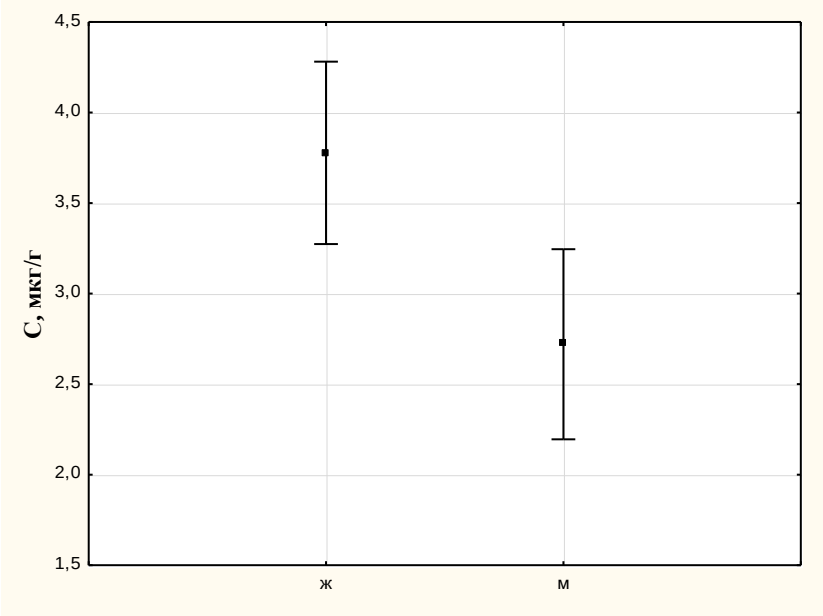

Рисунок 58. Различие содержаний Cu в мужских образцах (м) и женских образцах (ж) ногтей

3.2.1.3.2. Зависимость содержания элементов от курения

В литературе отмечается различие между содержаниями ряда элементов в ногтях курящих и некурящих людей. Например, в [161] достоверно ($p<0,05$) обнаружено различие в уровнях Ni.

Обнаружено (Рисунок 59), что содержание Pb в ногтях курящих людей (n=13) превышает аналогичный показатель у некурящих людей (n=60), но из небольшого числа проб курящих людей (что приводит к возникновению большого разброса), уровень значимости p данного различия составляет 0,07.

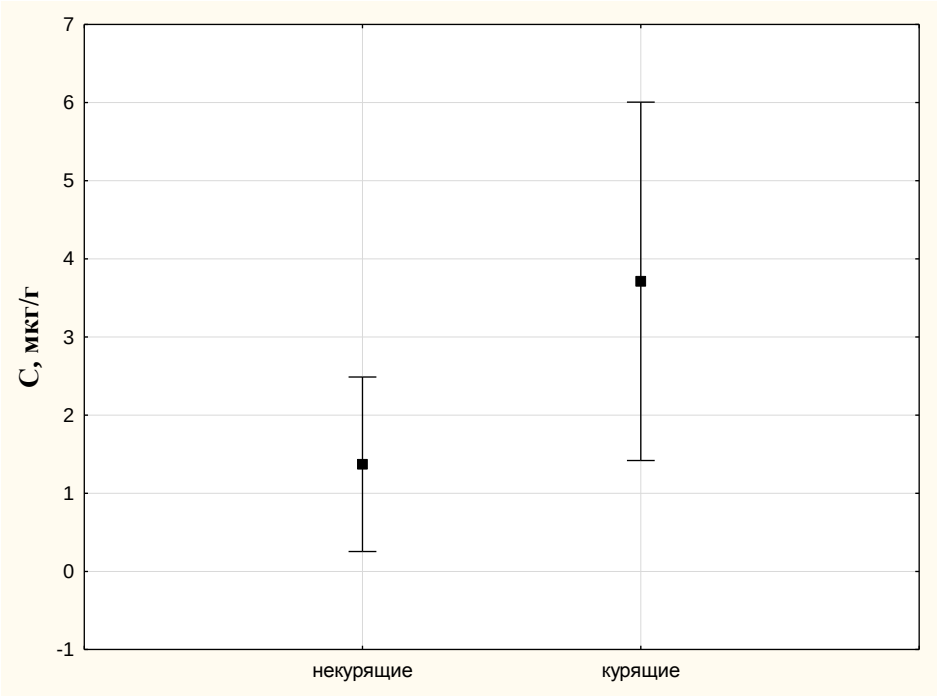

Рисунок 59. Различие содержаний Pb в образцах курящих и некурящих людей

3.2.1.4. Межэлементные корреляции содержаний элементов

В [152] показано, что уровни токсичных элементов (Pb, Cd) отрицательно коррелируют с уровнями содержаний эссенциальных элементов (Zn, Fe), при уровне значимости $p<0,05$ (Pb/Zn $r=-0,256$; Pb/Fe $r=-0,188$; Cd/Fe $r=-0,241$). В [280] обнаружена положительная корреляция между уровнями Cu и Zn в ногтях ($r=0,68$ при $p<0,001$).

В данной работе поиск межэлементных корреляций осуществлялся в программе «Statistica» с помощью построения корреляционной матрицы. Поиск был осуществлен для разных уровней значимости $p<0,001$, $p<0,05$. В Таблице 19 приведены все найденные корреляции. В качестве наглядных примеров на Рисунке 60 изображена связь содержаний Ca и Cd (при этом в литературе отмечается, то Cd, являясь токсичным элементом, способен замещать Ca в организме [43, 45], что объясняет найденную отрицательную корреляцию между содержаниями данных элементов).

Таблица 19. Коэффициенты корреляции *r* и уровни значимости *p* для найденных межэлементных корреляций

элемент 1	элемент 2	*r*	*p*
Ca[a]	Mg[a]	0,676	<0,001
Ca[a]	Al[a]	0,510	<0,001
Ca	Cd[a]	-0,338	<0,001
Cu	Ag	0,380	<0,001
Cd	Pb[a]	0,387	<0,001
Zn[a]	Cu[a]	0,259	<0,05
Al	Cu	0,292	<0,05

а – корреляция найдена для логарифма содержания

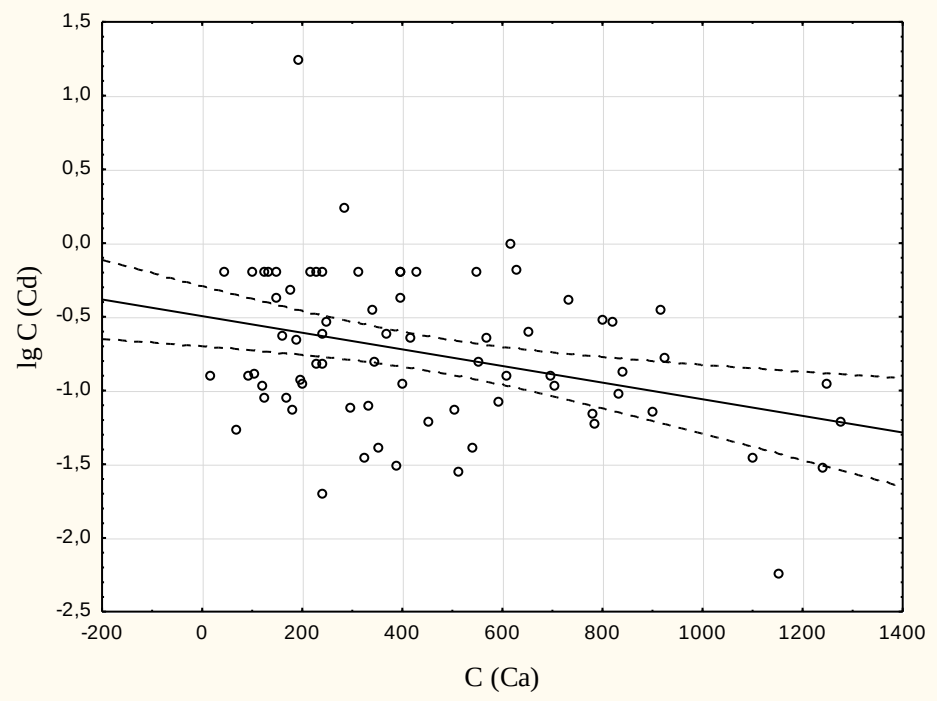

Рисунок 60. Связь содержаний Cd и Ca (мкг/г) в образцах ногтей

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам выполненной работы можно сделать следующие 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 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 спектрографа. 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.

4. На основании проведенных аппаратурно-методических исследований разработан способ определения концентраций элементов в жидких биопробах с ПО, сравнимыми с ПО современных спектральных многоэлементных 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 минерализированных образцов биожидкостей, а также сравнением с результатами, полученными другими методами.

6. Разработанный способ был использован для определения содержаний 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ААС – атомно-абсорбционная спектрометрия

АЭС – атомно-эмиссионная спектрометрия

АФ – аппаратная функция

БМ – биомониторинг

Д-АЭС – дуговая атомно-эмиссионная спектрометрия

ИВА – инверсионная вольтамперометрия

ИСП – индуктивно-связанная плазма

МАЭС – многоканальный анализатор эмиссионных спектров

МС – масс-спектрометрия

ОСКО – относительное среднеквадратичное отклонение

ПА – пламенная атомизация

ПВО – полное внешнее отражение

ПО – предел обнаружения

РРС – реальная разрешающая способность

РФА – рентгенофлуоресцентный анализ

СО – сухой остаток

ФЭУ – фотоэлектронный умножитель

ЭТА – электротермическая атомизация

a – ширина входной щели спектрального прибора

b – ширина контура спектральной линии

$C_{а.с.}$ – арифметическое среднее содержание/концентрация в серии проб

$C_{г.с.}$ – геометрическое среднее содержание/концентрация в серии проб

$C_{полист}$ – концентрация раствора полистирола в толуоле

f – число степеней свободы

h – величина межэлектродного промежутка

I – интенсивность

i – сила тока дугового разряда

I/S – отношение сигнал/шум

$m_{буф}$ – количество (масса) спектрального буфера

N – порядковый номер зарегистрированного спектра/число спектров

n – число образцов/число измерений

N_e – концентрация электронов в плазме

P – вероятность

p – уровень значимости

R – реальная разрешающая способность

r – коэффициент корреляции Пирсона

S – среднеквадратичное отклонение

s_r – воспроизводимость (относительное среднеквадратичное отклонение)

$t\ (P, f)$ – коэффициент Стьюдента

$T_Б$ – время базовой экспозиции спектра

$T_{обж}$ – время предварительного обжига электродов

$T_П$ – время полной экспозиции спектра

$T_{пл}$ – температура плазмы

ρ – коэффициент ранговой корреляции Спирмена

χ^2 – критерий Пирсона

λ – длина волны

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wilhelm M. et al. Concentrations of lead in blood, hair and saliva of German children living in three different areas of traffic density // Science of the Total Environment. – 2002. – V. 297, № 1-3. – P. 109-118.

2. Parsons P. J., Barbosa F. Jr. Atomic spectrometry and trends in clinical laboratory medicine // Spectrochimica Acta Part B. – 2007. – V. 62, № 9. – P. 992-1003.

3. Hu H. Exposure to metals // Primary Care. – 2000. – V. 27, № 4. – P. 983-986.

4. Kakkar P., Jaffery F. N. Biological markers for metal toxicity // Environmental Toxicology and Pharmacology. – 2005. – V. 19, № 2. – P. 335-349.

5. Patriarca M. et al.Recent developments in trace element analysis in the prevention, diagnosis, and treatment of diseases // Microchemical Journal. – 1998. – V. 59, № 2. – P. 194-202.

6. Savory J., Wills M. R. Trace-metals – essential nutrients or toxins // Clinical Chemistry. – 1992. – V. 38, № 8. – P. 1565-1573.

7. Микроэлементозы человека. Этиология, классификация, органопатология. / Авцын А. П. и др. – М: Медицина, 1991. – 496 с.

8. Dressler V. L. et al. A. As, Hg, I, Sb, Se and Sn speciation in body fluids and biological tissues using hyphenated-ICP-MS techniques: A review // International Journal of Mass Spectrometry. – 2011. – V. 307, № 1-3. – P. 149-162.

9. Эклогически опасные факторы. / Худолей В. В., Мизгирев И. В. – СПб: Банк Петровский, 1996. – 186 с.

10. Gil F. et al. Biomonitorization of cadmium, chromium, manganese, nickel and lead in whole blood, urine, axillary hair and saliva in an occupationally exposed population // Science of the Total Environment. – 2011. – V. 409, № 6. – P. 1172-1180.

11. Manno M. et al. Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA) Introduction // Toxicology Letters. – 2010. – V. 192, № 1. – P. 3-16.

12. Biologic Markers in Reproductive Toxicology / National Academy of Sciences. – Washington, D.C.: NationalAcademyPress, 1989. – 15-35 p.

13. Zheng W. et al. Biomarkers of manganese intoxication // Neurotoxicology. – 2011. – V. 32, № 1. – P. 1-8.

14. Bonde J. P., Christensen J. M. Chromium in biological samples from low-level exposed stainless-steel and mild-steel welders // Archives of Environmental Health. – 1991. – V. 46, № 4. – P. 225-229.

15. Jarup L., Elinder C. G., Spang G. Cumulative blood-cadmium and tubular proteinuria - a dose-response relationship // International Archives of Occupational and Environmental Health. – 1988. – V. 60, № 3. – P. 223-229.

16. Zheng W. et al. Chelation therapy of manganese intoxication with para-aminosalicylic acid (PAS) in Sprague-Dawley rats // Neurotoxicology. – 2009. – V. 30, № 2. – P. 240-248.

17. Tapin D. et al. Bioaccumulation and locomotor effects of manganese sulfate in Sprague-Dawley rats following subchronic (90 days) inhalation exposure // Toxicology and Applied Pharmacology. – 2006. – V. 211, № 2. – P. 166-174.

18. Guo Y. et al. Monitoring of lead, cadmium, chromium and nickel in placenta from an e-waste recycling town in China // Science of the Total Environment. – 2010. – V. 408, № 16. – P. 3113-3117.

19. Liao Y. H. et al. Biological monitoring of exposures to aluminium, gallium, indium, arsenic, and antimony in optoelectronic industry workers // Journal of Occupational and Environmental Medicine. – 2004. – V. 46, № 9. – P. 931-936.

20. Matte T. D. et al. Lead-poisoning among household members exposed to lead-acid-battery repair shops in Kingston, Jamaica // International Journal of Epidemiology. – 1989. – V. 18, № 4. – P. 874-881.

21. Banza C. L. N. et al. High human exposure to cobalt and other metals in Katanga, a mining area of the Democratic Republic of Congo // Environmental Research. – 2009. – V. 109, № 6. – P. 745-752.

22. Paoliello M. M. B. et al. Exposure of children to lead and cadmium from a mining area of Brazil // Environmental Research. – 2002. – V. 88, № 2. – P. 120-128.

23. Karahalil B., Rahravi H., Ertas N. Examination of urinary mercury levels in dentists in Turkey // Human and Experimental Toxicology. – 2005. – V. 24, № 8. – P. 383-388.

24. Kippler M. et al.Burden of cadmium in early childhood: Longitudinal assessment of urinary cadmium in rural Bangladesh // Toxicology Letters. – 2010. – V. 198, № 1. – P. 20-25.

25. Preventing Lead Poisoning in Young Children / Centers for Disease Control. – Atlanta: CDC, 1991. – 137 p.

26. van der Voet G. B. et al. Clinical and analytical toxicology of dietary supplements: A case study and a review of the literature // Biological Trace Element Research. – 2008. – V. 125, № 1. – P. 1-12.

27. Butler O. T. et al. Atomic spectrometry update. Environmental analysis // Journal of Analytical Atomic Spectrometry. – 2007. – V. 22, № 2. – P. 187-221.

28. Balcerzak M. Analytical methods for the determination of platinum in biological and environmental materials // Analyst. – 1997. – V. 122, № 5. – P. R67-R74.

29. McGahan M. C., Tyczkowska K. The determination of platinum in biological materials by electrothermal atomic-absorption spectroscopy // Spectrochimica Acta Part B. – 1987. – V. 42, № 5. – P. 665-668.

30. Miekeley N., Mortari S. R., Schubach A. O. Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2002. – V. 372, № 3. – P. 495-502.

31. Gil F., Pla A. Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure // Journal of Applied Toxicology. – 2001. – V. 21, № 4. – P. 245-255.

32. Schuhmacher M. et al. Biological monitoring of metals and organic substances in hazardous-waste incineration workers // International Archives of Occupational and Environmental Health. – 2002. – V. 75, № 7. – P. 500-506.

33. Tanaka T. et al. Aluminum concentrations in human deciduous enamel and dentin related to dental caries // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2004. – V. 18, № 2. – P. 149-154.

34. Hoppe A., Gueldal N. S., Boccaccini A. R. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics // Biomaterials. – 2011. – V. 32, № 11. – P. 2757-2774.

35. Linko S. et al. Boron detection from blood samples by ICP-AES and ICP-MS during boron neutron capture therapy // Scandinavian Journal of Clinical & Laboratory Investigation. – 2008. – V. 68, № 8. – P. 696-702.

36. Xynos I. D. et al. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass (R) 45S5 dissolution // Journal of Biomedical Materials Research. – 2001. – V. 55, № 2. – P. 151-157.

37. Zhu G. Y. et al. Environmental cadmium exposure and forearm bone density // Biometals. – 2004. – V. 17, № 5. – P. 499-503.

38. Alfven T., Jarup L., Elinder C. G. Cadmium and lead in blood in relation to low bone mineral density and tubular proteinuria // Environmental Health Perspectives. – 2002. – V. 110, № 7. – P. 699-702.

39. Cadmium and health: a toxicological and epidemiological appraisal. / Friberg L. et al. – Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 1985. – 209 p.

40. Satarug S. et al. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes // Environmental Health Perspectives. – 2010. – V. 118, № 2. – P. 182-190.

41. Jarup L., Akesson A. Current status of cadmium as an environmental health problem // Toxicology and Applied Pharmacology. – 2009. – V. 238, № 3. – P. 201-208.

42. Kippler M. et al. Factors influencing intestinal cadmium uptake in pregnant Bangladeshi women-A prospective cohort study // Environmental Research. – 2009. – V. 109, № 7. – P. 914-921.

43. Abdollahi M., Dehpour A., Kazemian P. Alteration by cadmium of rat submandibular gland secretory function and the role of the L-arginine/nitric oxide pathway // Pharmacological Research. – 2000. – V. 42, № 6. – P. 591-597.

44. Nath R. et al. Molecular-basis of cadmium toxicity // Progress in Food and Nutrition Science. – 1984. – V. 8, № 1-2. – P. 109-163.

45. Brzoska M. M., Moniuszko-Jakoniuk J. The influence of calcium content in diet on cumulation and toxicity of cadmium in the organism // Archives of Toxicology. – 1998. – V. 72, № 2. – P. 63-73.

46. Kippler M. et al. Accumulation of cadmium in human placenta interacts with the transport of micronutrients to the fetus // Toxicology Letters. – 2010. – V. 192, № 2. – P. 162-168.

47. Daftsis E. J., Zachariadis G. A. Analytical performance of ETAAS method for Cd, Co, Cr and Pb determination in blood fractions samples // Talanta. – 2007. – V. 71, № 2. – P. 722-730.

48. Chromium, Nickel and welding. IARC Monograph on the evaluation of carcinogenic risk to humans. – Lyon: IARC, 1990. – 687 p.

49. Fowler J. F. Occupational dermatology // Current Problems in Dermatology. – 1998. – V. 10, № 6. – P. 216.

50. Oyama T. et al. Efficiency of serum copper/zinc ratio for differential-diagnosis of patients with and without lung-cancer // Biological Trace Element Research. – 1994. – V. 42, № 2. – P. 115-127.

51. Riccio P. et al. Specificity of zinc-binding to myelin basic-protein // Neurochemical Research. – 1995. – V. 20, № 9. – P. 1107-1113.

52. Kalicanin B., Ajdukovic Z. Influence of saliva medium on freeing heavy metal ion from fixed dentures // Science of the Total Environment. – 2008. – V. 397, № 1-3. – P. 41-45.

53. Костючек Д. Ф., Клюковкина А. С., Лебедева Т. В. Содержание магния в слюне и волосах больных с элонгацией шейки матки // Журнал акушерства и женских болезней. – 2006. – Т. LV, № 3. – С. 45-48.

54. Yang D. Y.,et al. The determination of brain magnesium and zinc levels by a dual-probe microdialysis and graphite furnace atomic absorption spectrometry // Journal of the American College of Nutrition. – 2004. – V. 23, № 5. – P. 552S-555S.

55. Olanow C. W. Manganese-induced parkinsonism and Parkinson's disease // Redox-Active Metals in Neurological Disorders. – 2004. – V. 1012. – P. 209-223.

56. Wang J. D. et al. Mannese induced Parkinsonism - an outbreak due to an unrepaired ventilation control-system in a ferromanganese smelter // British Journal of Industrial Medicine. – 1989. – V. 46, № 12. – P. 856-859.

57. Jiang Y. M. et al. Effective treatment of manganese-induced occupational Parkinsonism with p-aminosalicylic acid: A case of 17-year follow-up study // Journal of Occupational and Environmental Medicine. – 2006. – V. 48, № 6. – P. 644-649.

58. Henn B. C. et al. Early postnatal blood manganese levels and children's neurodevelopment // Epidemiology. – 2010. – V. 21, № 4. – P. 433-439.

59. Wang D., Du X., Zheng W. Alteration of saliva and serum concentrations of manganese, copper, zinc, cadmium and lead among career welders // Toxicology Letters. – 2008. – V. 176, № 1. – P. 40-47.

60. Liden C., Norberg K. Nickel on the Swedish market. Follow-up after implementation of the nickel directive // Contact Dermatitis. – 2005. – V. 52, № 1. – P. 29-35.

61. Pagliuca A., Mufti G. J. Lead-poisoning - an age old problem // British Medical Journal. – 1990. – V. 300, № 6728. – P. 830-830.

62. Яды - вчера и сегодня. / Гадаскина И. Д., Толоконцев Н. А. – Л.: Наука, 1988. – 204 с.

63. Chandramouli K. et al. Effects of early childhood lead exposure on academic performance and behaviour of school age children // Archives of Disease in Childhood. – 2009. – V. 94, № 11. – P. 844-848.

64. Semple J. L. Breast-feeding and silicone implants // Plastic and Reconstructive Surgery. – 2007. – V. 120, № 7. – P. 123S-128S.

65. Sarmiento-Gonzalez A. et al. Titanium levels in the organs and blood of rats with a titanium implant, in the absence of wear, as determined by double-focusing ICP-MS // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2009. – V. 393, № 1. – P. 335-343.

66. Kandhro G. A. et al. Effect of zinc supplementation on the zinc level in serum and urine and their relation to thyroid hormone profile in male and female goitrous patients // Clinical Nutrition. – 2009. – V. 28, № 2. – P. 162-168.

67. Piccinini L. et al. A case-control study on selenium, zinc, and copper in plasma and hair of subjects affected by breast and lung cancer // Biological Trace Element Research. – 1996. – V. 51, № 1. – P. 23-30.

68. Ide-Ektessabi A. et al. Quantitative analysis of zinc in prostate cancer tissues using synchrotron radiation microbeams // X-Ray Spectrometry. – 2002. – V. 31, № 1. – P. 7-11.

69. Panayi A. E. et al. Determination of cadmium and zinc in Alzheimer's brain tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry // Journal of the Neurological Sciences. – 2002. – V. 195, № 1. – P. 1-10.

70. Durak R. et al. Determination of trace element levels in human blood serum from patients with type II diabetes using WDXRF technique: A comparative study // Journal of X-Ray Science and Technology. – 2010. – V. 18, № 2. – P. 111-120.

71. Corradi M. et al. Metallic elements in exhaled breath condensate and serum of patients with exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease // Metallomics. – 2009. – V. 1, № 4. – C. 339-345.

72. Aranyosiova M. et al. Behcet brain tissue identified with increased levels of Si and Al // Applied Surface Science. – 2008. – V. 255, № 4. – P. 1123-1125.

73. Tonelli M. et al. Trace elements in hemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis // BMC Medicine. – 2009. – V. 7, № 1. – P. 25.

74. Marco L. M.,et al. Determination of Zn/Cu ratio and oligoelements in serum samples by total reflection X-ray fluorescence spectrometry for cancer diagnosis // Spectrochimica Acta Part B. – 2001. – V. 56, № 11. – P. 2195-2201.

75. Carrigan P. E. et al. Distinctive heavy metal composition of pancreatic juice in patients with pancreatic carcinoma // Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention. – 2007. – V. 16, № 12. – P. 2656-2663.

76. Zoeger N. et al. Determination of the elemental distribution in human joint bones by SR micro XRF // X-Ray Spectrometry. – 2008. – V. 37, № 1. – P. 3-11.

77. Thakur S., Gupta N., Kakkar P. Serum copper and zinc concentrations and their relation to superoxide dismutase in severe malnutrition // European Journal of Pediatrics. – 2004. – V. 163, № 12. – P. 742-744.

78. Hegde M. L. et al. Serum trace element levels and the complexity of inter-element relations in patients with Parkinson's disease // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2004. – V. 18, № 2. – P. 163-171.

79. Чернявский А. М. и др. Содержание микроэлементов в миокарде левого желудочка больных ишемической болезнью сердца по данным рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения // Кардиология. – 2006. – Т. 10. – С. 13-17.

80. Мухамеджанова Л. Р., Галиев И. М. Микроэлементы костной ткани у больных генерализованным пародонтитом // Казанский медицинский журнал. – 2004. – Т. 85, № 2. – С. 123-124.

81. Губарева Л. И., Ермоленко Г. В. Концентрация металлов (Pb, Cd, Zn, Fe, Cu) в волосах и ногтях у подростков как маркер нарушений эндокринного статуса и психических функций // Психофармакология и биологическая наркология. – 2008. – Т. 8, № 1-2-2. – С. 2361.

82. Cowan D. M. et al. Manganese exposure among smelting workers: Relationship between blood manganese-iron ratio and early onset neurobehavioral alterations // Neurotoxicology. – 2009. – V. 30, № 6. – P. 1214-1222.

83. Cowan D. M. et al. Manganese exposure among smelting workers: blood manganese-iron ratio as a novel tool for manganese exposure assessment // Biomarkers. – 2009. – V. 14, № 1. – P. 3-16.

84. Rahil-Khazen R. et al. Multi-element analysis of trace element levels in human autopsy tissues by using inductively coupled atomic emission spectrometry technique (ICP-AES) // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2002. – V. 16, № 1. – P. 15-25.

85. Rahil-Khazen R., Bolann B. J., Ulvik R. J. Correlations of trace element levels within and between different normal autopsy tissues analyzed by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) // Biometals. – 2002. – V. 15, № 1. – P. 87-98.

86. Andrasi E. et al. Several methods to determine heavy metals in the human brain // Spectrochimica Acta Part B. – 1999. – V. 54, № 5. – P. 819-825.

87. Методы спектрального анализа в судебной медицине (практическое руководство). / Назаров Г. Н., Макаренко Т. Ф. – М МНПП "ЭСИ", 1994. – 360 с.

88. Barr D. B. et al. Biomonitoring of exposure in farmworker studies // Environmental Health Perspectives. – 2006. – V. 114, № 6. – P. 936-942.

89. Holland N. T. et al. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies // Mutation Research-Reviews in Mutation Research. – 2003. – V. 543, № 3. – P. 217-234.

90. Burguera E. et al. Determination of some cationic species in temporary teeth // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2002. – V. 16, № 2. – P. 103-112.

91. Wills N. K. et al. Copper and zinc distribution in the human retina: Relationship to cadmium accumulation, age, and gender // Experimental Eye Research. – 2008. – V. 87, № 2. – P. 80-88.

92. Wang C. T. et al. Concentrations of calcium, copper, iron, magnesium, and zinc in young female hair with different body mass indexes in Taiwan // Journal of Health Science. – 2005. – V. 51, № 1. – P. 70-74.

93. Torra M., Rodamilans M., Corbella J. Biological monitoring of environmental exposure to manganese in blood samples from residents of the city of Barcelona, Spain // Science of the Total Environment. – 2002. – V. 289, № 1-3. – P. 237-241.

94. Taylor A. et al. Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages // Journal of Analytical Atomic Spectrometry. – 2003. – V. 18, № 4. – P. 385-427.

95. Taylor A. et al. Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages // Journal of Analytical Atomic Spectrometry. – 2006. – V. 21, № 4. – P. 439-491.

96. Taylor A. et al. Atomic Spectrometry Update. Clinical and biological materials, foods and beverages // Journal of Analytical Atomic Spectrometry. – 2009. – V. 24, № 4. – P. 535-579.

97. Jaffery F. N., Misra V., Viswanathan P. N. Convergence of clinical toxicology and epidemiology in relation to health effects of chemicals // Environmental Toxicology and Pharmacology. – 2002. – V. 12, № 3. – P. 169-179.

98. Taylor A. Atomic spectrometry and the clinical chemistry of trace elements // Journal of Analytical Atomic Spectrometry. – 2006. – V. 21, № 4. – P. 381-383.

99. Barbosa F. et al. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: Advantages, limitations, and future needs // Environmental Health Perspectives. – 2005. – V. 113, № 12. – P. 1669-1674.

100. Скальный А. В. Микроэлементозы человека: гигиеническая диагностика и коррекция // Микроэлементы в медицине. – 2000. № 1. – С. 2-8.

101. Медико-экологическая оценка риска гипермикроэлементозов у населения мегаполиса. / Скальный А. В. и др. – Оренбург: РИК ГОУ ОГУ, 2003. – 134 с.

102. Нарушения минерального обмена у человека (методическое пособие для врачей). / Нагорная Н. В., Дубовая А. В. – Донецк, 2006. – 82 с.

103. Микроэлементозы человека (диагностика и лечение): Практическое руководство для врачей и студентов медицинских вузов /Скальный А. В. – М: КМК, 2001. – 96 с.

104. Wilhelm M., Ewers U., Schulz C. Revised and new reference values for some trace elements in blood and urine for human biomonitoring in environmental medicine // International Journal of Hygiene and Environmental Health. – 2004. – V. 207, № 1. – P. 69-73.

105. Second national report on human exposure to environmental chemicals / National Center for Environmental Health. Division of Laboratory Sciences. – Atlanta, Georgia, 2003. – 257 p.

106. Prohaska C., Pomazal K., Steffan I. Determination of Ca, Mg, Fe, Cu, and Zn in blood fractions and whole blood of humans by ICP-OES // Fresenius Journal of Analytical Chemistry. – 2000. – V. 367, № 5. – P. 479-484.

107. Benes B. et al. The concentration levels of Cd, Pb, Hg, Cu, Zn and Se in blood of the population in the Czech Republic // Central European journal of public health. – 2000. – V. 8, № 2. – P. 117-9.

108. Rukgauer M., Klein J., KruseJarres J. D. Reference values for the trace elements copper, manganese, selenium, and zinc in the serum/plasma of children, adolescents, and adults // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 1997. – V. 11, № 2. – P. 92-98.

109. Minoia C. et al. Trace-element reference values in tissues from inhabitants of the European Community. 1. A study of 46 elements in urine, blood and serum of Italian subjects // Science of the Total Environment. – 1990. – V. 95. – P. 89-105.

110. Российский энциклопедический словарь. – М.: Большая Российская энциклопедия, 2001. – 2015 с.

111. Buoso M. C. et al. Assessment of serum selenium levels in 2-month-old sucking calves using total reflection X-ray fluorescence technique // Spectrochimica Acta Part B. – 2001. – V. 56, № 11. – P. 2181-2186.

112. Heitland P., Koester H. D. Biomonitoring of 37 trace elements in blood samples from inhabitants of northern Germany by ICP-MS // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2006. – V. 20, № 4. – P. 253-262.

113. Lee J. M., Garon E., Wong D. T. Analyzing saliva to diagnose and monitor health status // Dental Abstracts. – 2011. – V. 56, № 1. – P. 53-54.

114. Aps J. K. M., Martens L. C. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva // Forensic Science International. – 2005. – V. 150, № 2-3. – P. 119-131.

115. Crouch D. J. Oral fluid collection: The neglected variable in oral fluid testing // Forensic Science International. – 2005. – V. 150, № 2-3. – P. 165-173.

116. Reznick A. Z. et al. Free radicals related effects and antioxidants in saliva and serum of adolescents with Type 1 diabetes mellitus // Archives of Oral Biology. – 2006. – V. 51, № 8. – P. 640-648.

117. Heflin L., Walsh S., Bagajewicz M. Design of medical diagnostics products: A case-study of a saliva diagnostics kit // Computers & Chemical Engineering. – 2009. – V. 33, № 5. – P. 1067-1076.

118. Chiappin S. et al. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation // Clinica Chimica Acta. – 2007. – V. 383, № 1-2. – P. 30-40.

119. Kocadereli I. et al. Salivary nickel and chromium in patients with fixed orthodontic appliances // Angle Orthodontist. – 2000. – V. 70, № 6. – P. 431-434.

120. Esteban M., Castano A. Non-invasive matrices in human biomonitoring: A review // Environment International. – 2009. – V. 35, № 2. – P. 438-449.

121. Mandel I. D. The diagnostic uses saliva // Journal of Oral Pathology & Medicine. – 1990. – V. 19, № 3. – P. 119-125.

122. Lloyd D. K. Capillary electrophoresis analysis of biofluids with a focus on less commonly analyzed matrices // Journal of Chromatography B. – 2008. – V. 866, № 1-2. – P. 154–166.

123. Edgar W. M. Saliva - its secretion, composition and functions // British Dental Journal. – 1992. – V. 172, № 8. – P. 305-312.

124. Vitali L., Favere V. T., Micke G. A. A new method to determine biological sample volume by short end multiple injection capillary electrophoresis: Application in determination of nitrate and thiocyanate in human saliva // Journal of Chromatography A. – 2011. – V. 1218, № 16. – P. 2327-2333.

125. Fakour H., Esmaili-Sari A., Zayeri F. Scalp hair and saliva as biomarkers in determination of mercury levels in Iranian women: Amalgam as a determinant of exposure // Journal of Hazardous Materials. – 2010. – V. 177, № 1-3. – P. 109-113.

126. Timchalk C. et al. Noninvasive biomonitoring approaches to determine dosimetry and risk following acute chemical exposure: Analysis of lead or organophosphate insecticide in saliva // Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues. – 2004. – V. 67, № 8-10. – P. 635-650.

127. Jacobs N. et al. Electronic monitoring of salivary cortisol sampling compliance in daily life // Life Sciences. – 2005. – V. 76, № 21. – P. 2431-2443.

128. Forbes J. C., Smith J. D. Studies on the effect of metallic salts on acid production in saliva. 1 // Journal of Dental Research. – 1952. – V. 31, № 1. – P. 129-131.

129. Brookes S. J. et al. Copper ions inhibit the demineralisation of human enamel // Archives of Oral Biology. – 2003. – V. 48, № 1. – P. 25-30.

130. Dreizen S., Spies H. A., Spies T. D. The copper and cobalt levels of human saliva and dental caries activity // Journal of Dental Research. – 1952. – V. 31, № 1. – P. 137-142.

131. Zahir S., Sarkar S. Study of trace elements in mixed saliva of caries free and caries active children // Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry. – 2006. – V. 24, № 1. – P. 27-9.

132. Малявская С. И. и др. Показатели фосфатно-кальциевого обмена и частота кариеса зубов у воспитанников учреждений закрытого типа города Архангельска // Экология человека. – 2009. № 12. – С. 55-59.

133. Watanabe K. et al. Mn and Cu concentrations in mixed saliva of elementary school children in relation to sex, age, and dental caries // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2009. – V. 23, № 2. – P. 93-99.

134. Abraham J. A. et al. mu X-ray fluorescence analysis of traces and calcium phosphate phases on tooth-tartar interfaces using synchrotron radiation // Spectrochimica Acta Part B. – 2007. – V. 62, № 6-7. – P. 689-694.

135. Булкина Н. В. и др. Биохимические изменения в слюне больных хроническим генерализованным пародонтитом под влиянием комбинированного действия бегущего переменного магнитного поля и лазерного излучения // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2009. – Т. 5, № 33. – С. 390-393.

136. Леонтьев В. К., Десятниченко К. С., Божко М. А. Взаимосвязь состава и свойств слюны у взрослых с характеристикой желудочной секреции, влияние лечения кариеса и протезирования зубочелюстной системы // Институт стоматологии. – 2007. – Т. 4, № 37. – С. 66-67.

137. Zhou M. S., Drummond J. L., Hanley L. Barium and strontium leaching from aged glass particle/resin matrix dental composites // Dental Materials. – 2005. – V. 21, № 2. – P. 145-155.

138. Hsu H.-C. et al. Electrochemical behavior of Ti-Cr alloys in artificial saliva // Journal of Alloys and Compounds. – 2009. – V. 487, № 1-2. – P. 439-444.

139. De Souza R. M., De Menezes L. M. Nickel, chromium and iron levels in the saliva of patients with simulated fixed orthodontic appliances // Angle Orthodontist. – 2008. – V. 78, № 2. – P. 345-350.

140. Sweeney M. et al. The release of mercury from dental amalgam and potential neurotoxicological effects // Journal of Dentistry. – 2002. – V. 30, № 5-6. – P. 243-250.

141. Pizzichini M. et al. Release of mercury from dental amalgam and its influence on salivary antioxidant activity // Science of the Total Environment. – 2002. – V. 284, № 1-3. – P. 19-25.

142. Watanabe M. et al. Measurements of several metallic elements and matrix metalloproteinases (MMPs) in saliva from patients with taste disorder // Chemical Senses. – 2005. – V. 30, № 2. – P. 121-125.

143. Барановская И. А. Роль микроэлементов в развитии воспалительных заболеваний пародонта на фоне хронического гастродуоденита у детей школьного возраста // Казанский медицинский журнал. – 2009. – V. 90, № 1. – P. 87-89.

144. Рылова Н. В. Дисбаланс микроэлементного обмена при гастродуоденальной патологии у детей // Казанский медицинский журнал. – 2004. – V. 85, № 6. – P. 437.

145. Costa de Almeida G. R. et al. Lead in saliva from lead-exposed and unexposed children // Science of the Total Environment. – 2009. – V. 407, № 5. – P. 1547-1550.

146. Barbosa F. Jr. et al. Evaluation of the use of salivary lead levels as a surrogate of blood lead or plasma lead levels in lead exposed subjects // Archives of Toxicology. – 2006. – V. 80, № 10. – P. 633-637.

147. Нотова С. В., Орджоникидзе Г. З., Нигматуллина Ю. Ф. Содержание химических элементов в слюне и волосах детей, проживающих в районном центре Саракташ Оренбургской области // Вестник ОГУ. – 2003. № 6. – С. 146-147.

148. Иванов А. В., Булатов В. П., Рылова Н. В. Минеральный состав питьевой воды и содержание макро- и микроэлементов в слюне детей // Казанский медицинский журнал. – 2003. – Т. 84, № 6. – С. 457-458.

149. Olmedo P. et al. Validation of a method to quantify chromium, cadmium, manganese, nickel and lead in human whole blood, urine, saliva and hair samples by electrothermal atomic absorption spectrometry // Analytica Chimica Acta. – 2010. – V. 659, № 1-2. – P. 60-67.

150. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории. Методические указания. МУ 4.2.2039-05. – М: Бюллетень нормативных и методических документов госсанэпиднадзора, № 2, 2005. – 66 с.

151. Состояние здоровья населения в связи с состоянием природной среды и условиями проживания населения. Использование биологических маркеров для оценки загрязнения среды обитания металлами в системе социально-гигиенического мониторинга. Методические указания МУ 2.1.10.2809-10. 2.1.10. – М: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. – 24 с.

152. Were F. H. et al. Use of human nails as bio-indicators of heavy metals environmental exposure among school age children in Kenya // Science of the Total Environment. – 2008. – V. 393, № 2-3. – P. 376-384.

153. Haynes E. N. et al. Environmental manganese exposure in residents living near a ferromanganese refinery in Southeast Ohio: A pilot study // Neurotoxicology. – 2010. – V. 31, № 5. – C. 468-474.

154. Katsikini M. et al. Fe distribution and speciation in human nails // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B. – 2010. – V. 268, № 3-4. – P. 420-424.

155. Chojnacka K., Gorecka H., Gorecki H. The effect of age, sex, smoking habit and hair color on the composition of hair // Environmental Toxicology and Pharmacology. – 2006. – V. 22, № 1. – P. 52-57.

156. Шугалей И. В. и др. Некоторые аспекты влияния алюминия и его соединений на живые организмы // Экологическая химия. – 2012. – Т. 21, № 3. – С. 172-186.

157. Токсикологическая химия. Аналитическая токсикология. / Еремин С. А. и др. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 752 с.

158. Przybylowicz A. et al. Examination of distribution of trace elements in hair, fingernails and toenails as alternative biological materials. Application of chemometric methods // Central European Journal of Chemistry. – 2012. – V. 10, № 5. – P. 1590-1599.

159. Oyoo-Okoth E. et al. Element profiles in hair and nails of children reflect the uptake from food and the environment // Environmental Toxicology and Chemistry. – 2012. – V. 31, № 7. – P. 1461-1469.

160. Mandal B. K., Ogra Y., Suzuki K. T. Speciation of arsenic in human nail and hair from arsenic-affected area by HPLC-inductively coupled argon plasma mass spectrometry // Toxicology and Applied Pharmacology. – 2003. – V. 189, № 2. – P. 73-83.

161. Mehra R., Juneja M. Fingernails as biological indices of metal exposure // Journal of Biosciences. – 2005. – V. 30, № 2. – P. 253-257.

162. Health and disease: role of micronutrients and trace elements. / Nath R. – New Delhi: APH Publishing Corp., 2000. – 640 p.

163. Sukumar A., Subramanian R. Elements in hair and nails of urban residents of New-Delhi - CHD, hypertensive, and diabetic cases // Biological Trace Element Research. – 1992. – V. 34, № 1. – P. 89-97.

164. Губарева Л. И., Ермоленко Г. В. Нарушение эндокринного статуса и развития познавательных способностей у подростков 13 лет при микроэлементозах, детерминированных экологическим неблагополучием // Успехи современного естествознания. – 2006. № 10. – С. 40-41.

165. Zarkadas C., Karydas A. G., Paradellis T. Applicability of direct total reflection X-ray fluorescence analysis in the case of human blood serum samples // Spectrochimica Acta Part B. – 2001. – V. 56, № 11. – P. 2219-2228.

166. Trinder P. A rapid method or the determination of sodium in serum // Analyst. – 1951. – V. 76, № 907. – P. 596-597.

167. Эмиссионный спектральный анализ объектов биосферы. / Карякин А. В., Грибовская И. Ф. – М.: Химия, 1979. – 207 с.

168. Garcia-Fernandez A. J. et al. Determination of lead and cadmium in blood and tissues by anodic stripping voltammetry // Toxicology Letters. – 1996. – V. 88. – P. 85-86.

169. Brainina K. et al. Determination of copper, lead and cadmium in whole blood by stripping voltammetry with the use of graphite electrodes // Analytica Chimica Acta. – 1996. – V. 330, № 2-3. – P. 175-181.

170. Hutton E. A. et al. Bismuth film microelectrode for direct voltammetric measurement of trace cobalt and nickel in some simulated and real body fluid samples // Analytica Chimica Acta. – 2006. – V. 557, № 1-2. – P. 57-63.

171. Goulle J. P. et al. Metal and metalloid multi-elementary ICP-MS validation in whole blood, plasma, urine and hair - Reference values // Forensic Science International. – 2005. – V. 153, № 1. – P. 39-44.

172. Yuan C. et al. Arsenic speciation analysis in human saliva // Clinical Chemistry. – 2008. – V. 54, № 1. – P. 163-171.

173. Hough R. L. et al. Lifetime exposure to arsenic in residential drinking water in Central Europe // International Archives of Occupational and Environmental Health. – 2010. – T. 83, № 5. – C. 471-481.

174. Casetta B. et al. Determination of platinum in biological fluids by ICP mass spectrometry // Atomic Spectroscopy. – 1991. – V. 12, № 3. – P. 81-86.

175. Tothill P. et al. Inductively coupled plasma mass-spectrometry for the determination of platinum in animaltissues and a comparison with atomic-absorption spectrometry // Journal of Analytical Atomic Spectrometry. – 1990. – V. 5, № 7. – P. 619-622.

176. Nygren O. V et al. Determination of platinum in blood by adsorptive voltammetry // Analytical Chemistry. – 1990. – V. 62, № 15. – P. 1637-1640.

177. Bertrand M., Weber G., Schoefs B. Metal determination and quantification in biological material using particle-induced X-ray emission // Trends in Analytical Chemistry. – 2003. – V. 22, № 4. – P. 254-262.

178. Evans E. H. et al. Atomic Spectrometry Update. Advances in atomic spectrometry and related techniques // Journal of Analytical Atomic Spectrometry. – 2009. – V. 24, № P. – C. 711-733.

179. Taylor A. et al. Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages // Journal of Analytical Atomic Spectrometry. – 2010. – V. 25, № 4. – P. 453-492.

180. Marco L. M., Greaves E. D., Alvarado J. Analysis of human blood serum and human brain samples by total reflection X-ray fluorescence spectrometry applying Compton peak standardization // Spectrochimica Acta Part B. – 1999. – V. 54, № 10. – P. 1469-1480.

181. Willis J. B. The early days of atomic absorption spectrometry in clinical chemistry // Spectrochimica Acta Part B. – 1999. – V. 54, № 14. – P. 1971-1975.

182. Wietecha R. et al. Simple method for simultaneous determination of selenium and arsenic in human hair by means of atomic fluorescence spectrometry with hydride generation technique // Microchimica Acta. – 2005. – V. 149, № 1-2. – P. 137-144.

183. Sabe R., Rubio R., Garcia-Beltran L. Selenium determination in urine with atomic fluorescence detection // Analytica Chimica Acta. – 2001. – V. 436, № 2. – P. 215-221.

184. A referee method for the determination of calcium in serum. NBS Special Publication 60-36. / Cali J. P. et al. – Washington, D.C.: National Bureau of Standarts, 1978. – 121 p.

185. Araujo R. G. O. et al. Comparison of direct solid sampling and slurry sampling for the determination of cadmium in wheat flour by electrothermal atomic absorption spectrometry // Talanta. – 2008. – V. 77, № 1. – C. 400-406.

186. Brand R. A. et al. Phonons in the icosahedral quasicrystal i-AlPdMn studied by coherent inelastic scattering of synchrotron radiation // Ferroelectrics. – 2001. – V. 250, № 1-4. – P. 233-236.

187. Agaoglu G. et al. Nickel and chromium levels in the saliva and serum of patients with fixed orthodontic appliances // Angle Orthodontist. – 2001. – V. 71, № 5. – P. 375-379.

188. Taylor A. et al. Atomic spectrometry update. Clinical and biological materials, foods and beverages // Journal of Analytical Atomic Spectrometry. – 2011. – V. 26, № 4. – P. 653-692.

189. Lalor G. et al. Blood lead levels in Jamaican school children // Science of the Total Environment. – 2001. – V. 269, № 1-3. – P. 171-181.

190. Dinoto V. et al. Determination of platinum in human blood using inductively-coupled plasma - atomic emission spectrometry with an ultrasonic nebulizer // Analyst. – 1995. – V. 120, № 6. – P. 1669-1673.

191. Bezerra M. A. et al. Internal standardization for the determination of cadmium, cobalt, chromium and manganese in saline produced water from petroleum industry by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after cloud point extraction // Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy. – 2007. – V. 62, № 9. – P. 985-991.

192. Menegario A. A., Gine M. F. Micro-scale flow system for on-line multielement preconcentration from saliva digests and determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry // Spectrochimica Acta Part B. – 2001. – V. 56, № 10. – P. 1917-1925.

193. Определение химических элементов в биологических средах и препаратах методами атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой и масс-спектрометрии: Методические указания (МУК 4.1.1482-03, МУК 4.1.1483-03). / Иванов С. И. и др. – М.: Федеральный Центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2003. – 56 с.

194. Arantes de Carvalho G. G. et al. Evaluation of laser induced breakdown spectrometry for the determination of macro and micronutrients in pharmaceutical tablets // Journal of Analytical Atomic Spectrometry. – 2010. – V. 25, № 6. – P. 803-809.

195. Заксас Н. П., Султангазиева Т. Т., Корда Т. М. Использование двухструйного дугового плазмотрона для определения микроэлементного состава порошковых биологических проб // Журнал аналитической химии. – 2006. – Т. 61, № 6. – С. 632-637.

196. Заксас Н. П., Шелпакова И. Р., Герасимов В. Г. Атомно-эмиссионное определение микроэлементов в порошковых пробах разной природы с возбуждением спектров в двухструйном дуговом плазмотроне // Журнал аналитической химии. – 2004. – Т. 59, № 3. – С. 254-260.

197. Эмиссионный спектральный анализ. Т. 2. / Терек Т., Мика Й., Гегуш Э. – М.: Мир, 1982. – 464 с.

198. Drobyshev A. I., Emelina O. I. Analysis of atmospheric aerosols by atomic emission spectrometry with electrical discharge sampling // Journal of Analytical Chemistry. – 2001. – V. 56, № 6. – P. 577-580.

199. Соломенцева Н. С., Шуваева О. В. Определение микроэлементов в природных водах методом атомно-эмиссионной спектрометрии сухих остатков на торцах графитовых электродов // Журнал аналитической химии. – 2007. – Т. 62, № 7. – С. 719-723.

200. Дробышев А. И., Емелина О. Е. Анализ вод и растворов атомно-эмиссионным методом на квантометре МФС-8 // Журнал аналитической химии. – 1999. – Т. 54, № 12. – С. 1300-1303.

201. Дробышев А. И., Емелина О. Е. Спектроаналитические возможности униполярной дуги переменного тока при фотоэлектрической регистрации спектра // Журнал аналитической химии. – 1996. – Т. 51, № 10. – С. 1047-1050.

202. Полякова Е. В., Шуваева О. В. Определение кальция, магния, железа, меди, цинка и фосфора в сыворотке крови методом дуговой атомно-эмиссионной спектрометрии // Журнал аналитической химии. – 2005. – Т. 60, № 10. – С. 1054-1058.

203. Гладких Э. А. и др. Применение атомно-эмиссионной спектрометрии с возбуждением спектров с дуге постоянного тока для оценки средних уровней содержания макро- и микроэлементов в волосах человека // Микроэлементы в медицине. – 2003. № 4 (3). – С. 20-24.

204. Дробышев А. И., Аладышкина А. Е. Атомно-эмиссионный спектральный анализ субстратов органов человека // Журнал аналитической химии. – 2011. – Т. 66, № 8. – С. 891-895.

205. Burguera J. L., Burguera M. Recent on-line processing procedures for biological samples for determination of trace elements by atomic spectrometric methods // Spectrochimica Acta Part B. – 2009. – V. 64, № 6. – P. 451-458.

206. Szoko E., Tabi T. Analysis of biological samples by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2010. – V. 53, № 5. – P. 1180-1192.

207. Burguera-Pascu M. et al. Flow injection on-line dilution for zinc determination in human saliva with electrothermal atomic absorption spectrometry detection // Analytica Chimica Acta. – 2007. – V. 600, № 1-2. – P. 214-220.

208. Спектральный анализ чистых веществ / под ред. Зильберштейна Х.И. – Л.: Химия, 1971. – 416 с.

209. Лабусов В. А., Гаранин В. Г., Шелпакова И. Р. Многоканальные анализаторы атомно-эмиссионных спектров. Современное состояние и аналитические возможности // Журнал аналитической химии. – 2012. – Т. 67, № 7. – С. 697-707.

210. Лабусов В. А. и др. Анализаторы МАЭС и их использование в качестве систем регистрации и обработки атомно-эмиссионных спектров // Аналитика и контроль. – 2005. – Т. 9, № 2. – С. 110-115.

211. Aizenbud D., Peri-Front Y., Nagler R. M. Salivary analysis and antioxidants in cleft lip and palate children // Archives of Oral Biology. – 2008. – V. 53, № 6. – P. 517-522.

212. Атомно-эмиссионная спектроскопия металлов и сплавов. / Буравлев Ю. М. – Донецк: ДонНУ, 2000. – 419 с.

213. Источник возбуждения спектров ИВС-28. Техническое описание и инструкция по эксплуатации. – М., 1979. – 52 с.

214. Бехтерев А. В. и др. Современные тенденции развития оборудования для атомно-эмиссионного спектрального анализа // IV Международный симпозиум «Применение анализаторов МАЭС в промышленности» – Новосибирск, 2003. – С. 4-9.

215. Гаранин В. Г., Неклюдов О. А., Петроченко Д. В. Программное обеспечение для автоматизации атомно-эмиссионного спектрального анализа – пакет «Атом» // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2007. – Т. 73, № спец.вып. – С. 18-25.

216. Гаранин В. Г., Шелпакова И. Р., Чанышева Т. А. Аналитические возможности многоканального анализатора эмиссионных спектров (МАЭС) в спектральном анализе // Аналитика и контроль. – 1998. – Т. 1, № 3. – С. 33-40.

217. Анализатор многоканальный атомно-эмиссионных спектров "МАЭС". Руководство пользователя ПО "АТОМ 3.3". ВМКО.157-3 РП. – Новосибирск, 2012.

218. Шелпакова И. Р., Гаранин В. Г., Лабусов В. А. Многоэлементные твердотельные детекторы и их использование в атомно-эмиссионном спектральном анализе (обзор) // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 1999. – Т. 65, № 10. – С. 3-16.

219. Лабусов В. А. Многоканальные оптические спектрометры для атомно-эмиссионного анализа. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора технических наук. – Новосибирск, 2009. – 35 с.

220. Analytical Chemistry: The Approved Text to the FECS Curriculum Analytical Chemistry. / Kellner R. et al. – Weinheim: Wiley-VCH, 1998. – 916 p.

221. Эмиссионный спектральный анализ. Т. 1. / Терек Т., Мика Й., Гегуш Э. – М.: Мир, 1982. – 286 с.

222. Определение микроэлементов в биологических объектах / под ред. Вальдмана А.Р. – Рига: Знание, 1968. – 171 с.

223. Спектральный анализ чистых веществ / под ред. Зильберштейна Х.И. – СПб.: Химия, 1994. – 336 с.

224. Эмиссионный спектральный анализ атомных материалов. / Зайдель А. Н. и др. – Л.: Государственное издательство физико-математической литературы, 1960. – 688 с.

225. Джугашвили А. А., Васильева И. Е., Шабанова Е. В. Определение примесей в трихлорсилане методом атомно-эмиссионной спектрометрии // IX Международный симпозиум «Применение анализаторов МАЭС в промышленности» – Новосибирск, 2008. – С. 50.

226. Путьмаков А. Н. Об ошибках в практике атомно-эмиссионного спектрального анализа // VII Международный симпозиум «Применение анализаторов МАЭС в промышленности» – Новосибирск, 2006. – С. 87-90.

227. Зильберштейн Х. И., Макаров Л. П. Об устранении пористости угольных электродов, применяемых для спектрального анализа растворов // Заводская лаборатория. – 1955. – Т. 21. – С. 342-344.

228. Дегтярева О. Ф., Островская М. Ф. Спектральный анализ свинца высокой чистоты // Журнал аналитической химии. – 1965. – Т. 20. – С. 814-821.

229. Decker R. S., Eve D. J. DC Arc in Emission Spectrography IV: Correction for Matrix Effects // Applied Spectroscopy. – 1969. – V. 23, № 5. – P. 497-501.

230. Лактионова Н. В., Карякин А. В., Агеева Л. В. Механизм действия хлорида натрия как носителя на интенсивность линий редкоземельных элементов при их химико-спектральном определении // Журнал аналитической химии. – 1975. – Т. 30. – С. 703-707.

231. Заякина С. Б., Чанышева Т. А., Юделевич И. Г. Исследование условий возбуждения и испарения в дуге постоянного тока, применяемой при анализе веществ высокой чистоты. 2. Влияние концентрации носителя и других факторов на пределы обнаружения микропримесей // Сибирский химический журнал. – 1991. № 3. – С. 52-57.

232. Липко С. В., Книжник А. В., Кюн А. В. Использование атомно-эмиссионной спектроскопии в алюминиевой промышленности // VII Международный симпозиум «Применение анализаторов МАЭС в промышленности» – Новосибирск, 2006. – С. 44-47.

233. Емелина О. И. Новые аналитические возможности атомно-эмиссионной спектроскопии с дуговым источником света. Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук. – СПб., 1996. – 125 с.

234. Кузнецова А. И., Райхбаум Я. Д., Малых В. Д. Влияние длины межэлектродного промежутка и силы тока на чувствительность определения

элементов при спектральном анализе // Журнал прикладной спектроскопии. – 1969. – Т. 10, № 3. – С. 393-399.

235. Основы атомного спектрального анализа. Учебное пособие. / Дробышев А. И. – СПб.: СПбГУ, 2005. – 200 с.

236. Петров А. М. Определение примесного состава чистых цветных и редких металлов методом дугового атомно-эмиссионного анализа с применением МАЭС. Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата технических наук. – М., 2012. – 33 с.

237. Спектральный метод измерения температуры плазмы. Лабораторный практикум. / Вуколов А. В. – Томск: ТПУ, 2008. – 14 с.

238. Principles of Plasma Spectroscopy. / Greim H. R. – Cambridge: Cambridge University Press, 1997. – 366 p.

239. Таблицы спектральных линий. / Зайдель А. Н., Прокофьев В. К., Райский С. М. – М.: Наука, 1977. – 798 с.

240. Вероятности переходов и силы осцилляторов 70 элементов. / Корлис Ч., Бозман У. – М.: Мир, 1968. – 562 с.

241. Кохановский А. Э. Применение анализатора МАЭС для идентификации марок резиновых смесей // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2012. – Т. 78, № 1 (2). – С. 98-100.

242. Чумакова Н. Л., Смирнова Е. В. Определение лантана, церия, неодима, иттербия и иттрия в геологических пробах с использованием многоканального анализатора атомно-эмиссионных спектров // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2010. – Т. 76, № 3. – С. 3-8.

243. Вернидуб О. Д., Ломакина Г. Е. Анализ материалов черной металлургии атомно-эмиссионным с ИСП методом с применением МАЭС // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2007. – Т. 73, № спец.вып. – С. 54-57.

244. Заякина С. Б., Путьмаков А. Н., Аношин Г. Н. Модернизация дифракционного спектрографа ДФС – 458: расширение возможностей атомно-эмиссионного спектрального анализа // Аналитика и контроль. – 2005. – Т. 9, № 2. – С. 212-219.

245. Техника и практика спектроскопии. / Зайдель А. Н., Островская Г. В., Островский Ю. И. – М.: Наука, 1976. – 392 с.

246. Оптика спектральных приборов. / Пейсахсон И. В. – Л.: Машиностроение, 1975. – 312 с.

247. Спектральные приборы и техника спектроскопии. / Нагибина И. М., Прокофьев В. К. – М.-Л.: ГНТИМЛ, 1963. – 272 с.

248. Mielenz K. D. Spectroscope slit images in partially coherent light // Journal of the Optical Society of America. – 1967. – V. 57, № 1. – P. 66-74.

249. Рождественский Д. С. Когерентные и некогерентные лучи при образовании изображения в микроскопе // Журнал экспериментальной и теоретической физики. – 1940. – Т. 10. – С. 305-330.

250. Пейсахсон И. В. Расчет аппаратных функций реальных спектральных приборов при частично когерентном освещении щели // Оптический журнал. – 1997. – Т. 64. – С. 87-89.

251. Новые спектральные приборы. Принципы работы /Толмачев Ю. А. – Л.: ЛГУ, 1976. – 128 с.

252. Лабусов В. А. и др. Новые многоканальные оптические спектрометры на основе анализаторов МАЭС // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2012. – Т. 78, № 1 (2). – С. 7-13.

253. Введение в экспериментальную спектроскопию. / Малышев В. И. – М.: Наука, ГРФМЛ, 1979. – 480 с.

254. Ващенко П. В., Лабусов В. А., Лихачев А. В. Восстановление распределения интенсивности излучения на поверхности многоэлементного твердотельного детектора // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2012. – Т. 78, № 1 (2). – С. 94-95.

255. Заякина С. Б., Аношин Г. Н. Различие способов вычисления аналитического сигнала при фотографической регистрации спектра и с помощью твердотельных детекторов // VI Международный симпозиум «Применение анализаторов МАЭС в промышленности» – Новосибирск, 2005. – С. 50-53.

256. Дробышев А. И., Туркин Ю. И. Об аналитическом сигнале в спектрографическом анализе вблизи предела обнаружения // Журнал прикладной спектроскопии –1979. – Т. 30, № 6. – С. 979-983.

257. Гаранин В. Г. Математическая обработка атомных спектров для учета спектральных наложений // IV Международный симпозиум «Применение анализаторов МАЭС в промышленности» – Новосибирск, 2003. – С. 46-48.

258. Неорганический синтез. / Ключников Н. Г. – М.: Просвещение, 1988. – 239 с.

259. Аналитическая атомно-абсорбционная спектроскопия. / Прайс В. – М.: Мир, 1976. – 355 с.

260. Приготовление растворов для химико-аналитических работ. / Коростелев П. П. – М.: Наука, 1964. – 399 с.

261. Методические указания к лабораторным работам по анализу природных и промышленных объектов. / Андреева И. Ю., Викулина В. В. – Л.: ЛГУ, 1989. – 68 с.

262. Dlugaszek M., Kaszczuk M., Mularczyk-Oliwa M. Magnesium, Calcium, and Trace Elements Excretion in 24-h Urine // Biological Trace Element Research. – 2011. – V. 142, № 1. – P. 1-10.

263. Eliades T. et al. Salivary metal levels of orthodontic patients: a novel methodological and analytical approach // European Journal of Orthodontics. – 2003. – V. 25, № 1. – P. 103-106.

264. Rahil-Khazen R. et al. Validation of inductively coupled plasma atomic emission spectrometry technique (ICP-AES) for multi-element analysis of trace elements in human serum // Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. – 2000. – V. 60, № 8. – P. 677-686.

265. Chicharro J. L. et al. Trace elements and electrolytes in human resting mixed saliva after exercise // British Journal of Sports Medicine. – 1999. – V. 33, № 3. – P. 204-207.

266. Menegario A. A., Packer A. P., Gine M. F. Determination of Ba, Cd, Cu, Pb and Zn in saliva by isotope dilution direct injection inductively coupled plasma mass spectrometry // Analyst. – 2001. – V. 126, № 8. – P. 1363-1366.

267. Batista B. L. et al. Reference Concentrations for Trace Elements in Urine for the Brazilian Population based on q-ICP-MS with a Simple Dilute-and-Shoot Procedure // Journal of the Brazilian Chemical Society. – 2009. – V. 20, № 8. – P. 1406-1413.

268. Ivanenko N. B. et al. Biomonitoring of 20 trace elements in blood and urine of occupationally exposed workers by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry // Talanta. – 2013. – V. 116. – P. 764-769.

269. Основы физико-химических измерений и химического анализа. / Родинков О. В., Бокач Н. А., Булатов А. В. – СПб.: ВВМ, 2010. – 132 с.

270. Durdiakova J. et al. The effects of saliva collection, handling and storage on salivary testosterone measurement // Steroids. – 2013. – V. 78, № 14. – P. 1325-1331.

271. Mohamed R. et al. The impact of saliva collection and processing methods on CRP, IgE, and Myoglobin immunoassays // Clinical and translational medicine. – 2012. – V. 1, № 1. – P. 19-19.

272. Toone R. J. et al. Measurement of steroid hormones in saliva: Effects of sample storage condition // Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. – 2013. – V. 73, № 8. – P. 615-621.

273. Дробышев А. И., Аладышкина А. Е., Исакова А. В. Разработка методики и анализ субстратов органов человека с использованием МАЭС // IX Международный симпозиум «Применение анализаторов МАЭС в промышленности» – Новосибирск, 2008. – С. 62-63.

274. Avsar A. et al. Evaluation of the relationship between passive smoking and salivary electrolytes, protein, secretory IgA, sialic acid and amylase in young children // Archives of Oral Biology. – 2009. – V. 54, № 5. – P. 457-463.

275. Hasnis E. et al. Synergistic effect of cigarette smoke and saliva on lympho-cytes - the mediatory role of volatile aldehydes and redox active iron and the possible implications for oral cancer // International Journal of Biochemistry and Cell Biology. – 2004. – V. 36, № 5. – P. 826-839.

276. Christensen J. M. Human exposure to toxic metals - factors influencing interpretation of biomonitoring results // Science of the Total Environment. – 1995. – V. 166, № 1-3. – P. 89-135.

277. Wilhelm M. et al. Monitoring of cadmium, copper, lead and zinc status in young-children using toenails - comparison with scalp hair // Science of the Total Environment. – 1991. – V. 103, № 2-3. – P. 199-207.

278. Sukumar A., Subramanian R. Relative element levels in the paired samples of scalp hair and fingernails of patients from New Delhi // Science of the Total Environment. – 2007. – V. 372, № 2-3. – P. 474-479.

279. Vinceti M. et al. Environmental exposure to trace elements and risk of cutaneous melanoma // Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology. – 2005. – V. 15, № 5. – P. 458-462.

280. Gerhardsson L. et al. Cadmium, copper and zinc in tissues of deceased copper smelter workers // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2002. – V. 16, № 4. – P. 261-266.