

На правах рукописи

СИДОРИНА Анна Владимировна

**ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА  
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ МЕТОДОМ РФА-СИ**

02.00.02 – аналитическая химия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Новосибирск – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН, ФАНО

**Научный руководитель**

кандидат химических наук, старший научный сотрудник  
Трунова Валентина Александровна

**Официальные оппоненты:**

доктор геолого-минералогических наук, профессор,  
главный научный сотрудник  
Аношин Геннадий Никитович  
ФГБУН Институт геологии и минералогии им. В.С. Соболева СО РАН  
г. Новосибирск

кандидат химических наук, научный сотрудник  
Пашкова Галина Валерьевна  
Аналитический центр ФГБУН Института земной коры СО РАН  
г. Иркутск

**Ведущая организация**

ФГБУН Институт геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН  
г. Иркутск

Защита состоится «29» апреля 2015 г. в 10.00  
на заседании диссертационного совета Д 003.051.01  
в ФГБУН Институте неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН  
по адресу: просп. Акад. Лаврентьева, 3, Новосибирск, 630090

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке  
ФГБУН Института неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН  
и на сайте <http://niic.nsc.ru/institute/councils/dissert/>

Автореферат разослан «27» февраля 2015 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор физико-математических наук

В.А. Надолинный

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Интерес к изучению элементного состава биологических тканей в норме и патологии обусловлен активным участием микроэлементов в деятельности ферментов, гормонов и в процессах регуляции систем организма. Механизмы взаимодействия на молекулярном уровне между элементами являются сложными и не однозначными. Корреляционный анализ концентраций химических элементов позволяет увидеть синергические и антагонистические взаимодействия между элементами в организме. Для получения правильных количественных данных необходимо подобрать оптимальные условия на каждом этапе методики РФА-СИ-анализа биологических объектов.

Процедуры, применяемые при пробоотборе биологических тканей, изначально влияют на качество результатов анализа. Существует несколько способов фиксации биологического материала. Наиболее распространенным способом является фиксация биологического материала растворами формалина. Степень изменения элементного состава фрагментов биологической ткани малой массы в результате фиксации раствором формалина практически не исследована.

Несмотря на многие преимущества синхротронного излучения (СИ) его использование вносит в анализ ряд особенностей. Циклическая работа накопительного кольца приводит к постепенному снижению интенсивности возбуждающего излучения в течение цикла. Поэтому методики РФА-СИ-анализа предусматривают проведение нормировок рентгенофлуоресцентных спектров. Исследования, направленные на поиск оптимального способа нормировки в условиях конкретной станции являются необходимыми и важными.

Методики анализа биологических тканей методом РФА-СИ основаны на способе внешнего стандарта. Количество имеющихся стандартных образцов биологических тканей ограничено. Способ внешнего стандарта с поправкой на поглощение позволяет использовать стандартные образцы, матрица которых по своим поглощающим и рассеивающим свойствам отличается от матрицы исследуемого объекта.

**Цель работы** заключалась в оптимизации методики определения элементного состава образцов биологических материалов растительного и животного происхождения методом РФА-СИ, основываясь на применении способа внешнего стандарта.

Эффективность методических подходов, применяемых для РФА-СИ-анализа образцов печени и легких крыс, а также растительных материалов оценивалась на стандартных образцах с биологическими и геологическими матрицами, и образцах миокарда крысы.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

- исследование изменения элементного состава образцов биологических тканей в результате фиксации раствором формалина;

- оценка эффективности различных способов нормировки спектров в методе РФА-СИ;
- измерение коэффициентов ослабления рентгеновского излучения в биологических материалах для учета матричных эффектов в образцах;
- определение методом РФА-СИ элементного состава и наличие корреляций между концентрациями химических элементов в тканях печени и легких экспериментальных животных.

### **Научная новизна:**

- на экспериментальной станции РФА-СИ-анализа проведено сравнение эффективности нормировок РФА-спектров на величины тока накопительного кольца и интенсивности пика комптоновского рассеяния;
- впервые определено содержание химических элементов в биологических материалах относительно стандартных образцов с геологической матрицей по способу внешнего стандарта с поправкой на поглощение на основе измеренных коэффициентов ослабления;
- исследована динамика изменения элементного состава образцов биологической ткани малой массы в результате коротких сроков фиксации в растворе формалина;
- проведено исследование элементного состава тканей легких у животных с алиментарным ожирением;
- предложен новый подход к выявлению обменных нарушений в организме, основанный на изучении корреляций между концентрациями химических элементов непосредственно в тканях организма, обладающих выраженной метаболической активностью;
- показано активное участие малоизученных элементов: Br, Rb и Sr в образовании корреляционных связей в легких и печени, что отражает их важную роль в метаболизме.

**Практическая значимость** работы состоит в оптимизации методики анализа биологических материалов методом РФА-СИ с целью определения концентраций химических элементов (K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Se, Br, Rb и Sr) в образцах биологических тканей (печени и легких) и растительных материалов способом внешнего стандарта. Исследуемые подходы применены для определения концентраций химических элементов в образцах печени и легких для разработки диагностических критериев контроля обменных нарушений с целью ранней диагностики метаболического синдрома и эффективности проводимого лечения на моделях крыс с алиментарным ожирением. По степени отклонений межэлементных корреляционных связей в тканях организма можно будет диагностировать развитие заболевания на более ранних этапах и более точно оценивать эффективность лечения. Изучение межэлементных взаимосвязей в тканях организма позволит

не только судить о нарушении метаболизма и его выраженности, но и более целенаправленно планировать дальнейшие исследования. Предлагаемый подход может быть применен при изучении других заболеваний, в основе которых лежат нарушения обменных процессов.

#### **На защиту выносятся:**

- использование нормировки рентгенофлуоресцентных спектров на площадь пика комптоновского рассеяния для учета вариаций интенсивности возбуждающего излучения при проведении РФА-СИ-анализа биологических объектов по способу внешнего стандарта;
- методика выбора внешнего стандарта для определения широкого диапазона концентрации химических элементов (от К до Sr) методом РФА-СИ в биологических материалах с помощью международных стандартных образцов с матрицами различных типов;
- результаты определения концентраций химических элементов по способу внешнего стандарта с поправкой на поглощение в биологических международных стандартных образцах;
- оптимизация условий пробоподготовки образцов биологических тканей малой массы при фиксации раствором формалина;
- методические подходы к анализу образцов печени, легких и растительного материала методом РФА-СИ.

**Апробация работы.** Основные результаты работы представлены и обсуждались на следующих Российских и международных конференциях: 1-ая зимняя молодежная школа-конференция с международным участием «Новые методы аналитической химии» (Санкт-Петербург, 2013), 51-ая международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс» (Новосибирск, 2013), European Conference on X-Ray Spectrometry «EXRS-2014» (Болонья, Италия, 2014), XX Национальная конференция по использованию Синхротронного Излучения "СИ-2014" (Новосибирск, 2014), VIII Всероссийская Конференция по рентгеноспектральному анализу (Иркутск, 2014), Конкурс молодых ученых Сибирского центра синхротронного и терагерцового излучения (Новосибирск, 2012 и 2014), 6<sup>th</sup> International Conference «Charged & Neutral Particles Channeling Phenomena» (Капри, Италия, 2014).

Работа награждена дипломом Второй степени в конкурсе молодых ученых Сибирского центра синхротронного и терагерцового излучения в 2014 г.

**Личный вклад автора** Автором была проведена экспериментальная работа, касающаяся пробоотбора, пробоподготовки исследуемых материалов и измерения рентгенофлуоресцентных спектров; проведены расчеты, необходимые для оценки поглощающих и рассеивающих свойств матрицы, определены массовые коэффициенты ослабления и построены соответствующие кривые; рассчитаны пределы обнаружения и концентрации химических эле-

ментов; проведена оценка метрологических характеристик. Автор принимал активное участие в апробации разработанных методик на биообъектах, наряду с научным руководителем и соавторами участвовал в написании всех имеющихся публикаций, обсуждении результатов и выводов.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 8 статей в рецензируемых журналах, 8 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

**Объем и структура работы.** Диссертация изложена на 134 страницах машинописного текста, содержит 10 рисунков и 22 таблицы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (гл. 1), экспериментальной части (гл. 2), разработки методических подходов для РФА-СИ анализа биологических тканей (гл. 3), элементного анализа образцов биологических тканей и растительных материалов (гл. 4), основных результатов и выводов, списка цитируемой литературы (186 наименований) и приложения.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во *введении* раскрыта актуальность темы, определены цели и задачи исследований, сформулирована научная новизна, практическая значимость работы и положения, выносимые на защиту.

*Первая глава* содержит литературный обзор, в котором показана актуальность изучения элементного состава организма. Представлен обзор современных методов элементного анализа биологических объектов. Рассмотрены аналитические подходы и трудности при исследовании биообъектов методом РФА-СИ. Представлены имеющиеся способы нормировок РФА-СИ спектров для учета систематических и случайных изменений интенсивности возбуждающего излучения. Показаны подходы к выбору образцов сравнения и критерии, ограничивающие этот выбор. Проведен обзор литературы по теоретическим и практическим способам определения коэффициентов ослабления рентгеновского излучения. Рассмотрен способ пробоподготовки образцов биологических тканей с помощью фиксации раствором формалина.

На основании анализа литературы сделан вывод о необходимости дальнейших исследований с целью оптимизации отдельных этапов методики РФА-СИ-анализа биологических объектов.

*Вторая глава* содержит характеристики используемых материалов и оборудования. Описана пробоподготовка образцов миокарда для исследования влияния фиксации раствором формалина на элементный состав биоткани; пробоподготовка стандартных образцов. Даны характеристики экспериментальной станции элементного рентгенофлуоресцентного анализа. Описаны условия измерения РФА-СИ спектров. Приведена подробная методика измерения массовых коэффициентов ослабления в исследуемых материалах.

В *третьей главе* представлены результаты по оптимизации отдельных этапов методики анализа биологических объектов методом РФА-СИ, касающихся пробоотбора образцов биологических тканей, нормировки измеренных РФА-СИ спектров, количественного определения концентраций химических элементов с учетом измеренных коэффициентов ослабления рентгеновских лучей в анализируемых материалах.

***Исследование изменений элементного состава образцов биологических тканей в результате фиксации раствором формалина***

При энергии возбуждения 18 кэВ были определены концентрации Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Se, Br, Rb, Sr в свежих образцах миокарда и в образцах, фиксированных в растворе формалина от 4 часов до 6 суток. Найденные концентрации с указанием стандартного отклонения представлены в табл. 1:

Т а б л и ц а 1

**Концентрации химических элементов (мкг/г) в свежих и фиксированных образцах миокарда**

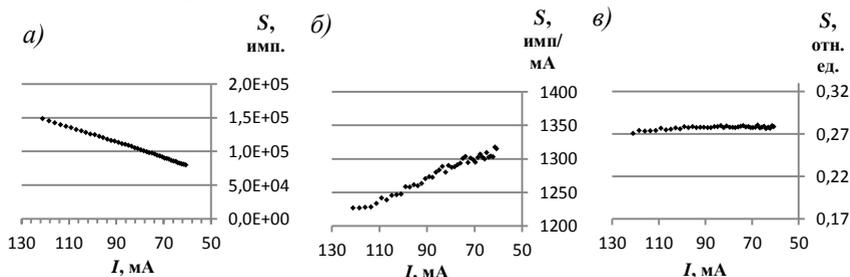
Элемент	Свежие, <i>n</i> =9	4 часа, <i>n</i> =3	1 сутки, <i>n</i> =4	2 суток, <i>n</i> =4	4 суток, <i>n</i> =2	6 суток, <i>n</i> =3
<b>Cl</b>	3400 ± 500	50 ± 30	130 ± 80	150 ± 18	70 ± 30	80 ± 30
<b>K</b>	9000 ± 1000	400 ± 100	700 ± 300	960 ± 190	440 ± 120	400 ± 120
<b>Ca</b>	280 ± 130	79 ± 14	53 ± 5	74 ± 8	80 ± 20	31 ± 6
<b>Fe</b>	240 ± 50	230 ± 30	160 ± 17	160 ± 20	180 ± 20	120 ± 12
<b>Cu</b>	22.1 ± 2.1	21.2 ± 1.3	18.9 ± 1.6	16.1 ± 1.1	16.2 ± 1.4	12.4 ± 1.6
<b>Zn</b>	100 ± 20	82 ± 8	73 ± 12	60 ± 5	53 ± 19	39 ± 4
<b>Se</b>	1.38 ± 0.21	1.61 ± 0.28	1.44 ± 0.27	1.35 ± 0.20	1.37 ± 0.25	1.10 ± 0.05
<b>Br</b>	29 ± 5	5.1 ± 0.3	6.9 ± 1.1	8.0 ± 1.1	6.1 ± 0.6	5.8 ± 0.6
<b>Rb</b>	16 ± 4	2.5 ± 0.6	4.0 ± 1.5	5.6 ± 1.4	3.01 ± 0.22	3.5 ± 0.9
<b>Sr</b>	0.45 ± 0.05	0.28 ± 0.05	0.22 ± 0.04	0.23 ± 0.04	0.272 ± 0.021	0.181 ± 0.023

*n* – количество образцов.

В образцах биологической ткани массой ≈ 10 мг наблюдается значимое уменьшение концентраций Cl, K, Ca, Br, Rb и Sr уже через 4 часа после фиксации раствором формалина. Тем не менее, данные образцы могут быть пригодны для определения концентраций Fe и Cu, если они находились в растворе формалина не более суток, и определения концентрации Zn при нахождении в растворе не более двух суток. Концентрация Se значимо не отличается от концентрации в свежей ткани даже через 6 суток фиксации в растворе формалина. Во избежание значимых потерь анализируемых элементов пробоотбор образцов малой массы не должен включать фиксацию в растворе формалина.

## Оценка погрешности регистрации спектров, обусловленной использованием синхротронного излучения

За полный цикл работы накопительного кольца было измерено 43 спектра стандартного образца печени NCS ZC 85005 Beef Liver. В течение цикла происходило постепенное снижение интенсивности возбуждающего излучения в результате падения тока накопительного кольца. Площади  $K\alpha$ -линий исследуемых элементов: S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Se, Br, Rb, Sr нормировались на площадь пика комптоновского рассеяния и на величину тока накопительного кольца. На рис. 1 показана зависимость площади пика  $K\alpha$ -линии железа (количество импульсов) от величины тока накопительного кольца до и после нормировок.



**Рис. 1.** Площадь пика  $K\alpha$ -линии Fe при значениях тока 120-60 мА до нормировки (а), после нормировки на величину тока накопительного кольца (б), после нормировки на площадь пика комптоновского рассеяния (в).  $S$  – площадь пика;  $I$  – величина тока

После нормировки на величину тока накопительного кольца наблюдается систематическое возрастание площади  $K\alpha$ -линии железа. Площадь линии при 60 мА оказалась на 7.2% выше, чем площадь линии при 120 мА (рис. 1 б).

При использовании нормировки на площадь пика комптоновского рассеяния возрастание величины нормированной площади менее выражено (рис. 1 в). В этом случае разница между значениями нормированной площади при 60 мА и 120 мА составила 2.9%. Схожий характер изменения наблюдался и для остальных определяемых элементов.

Для оценки случайной погрешности было рассчитано относительное стандартное отклонение  $S_r$  (%) величины нормированной площади пика для каждого элемента при двух способах нормировки. При нормировке на площадь пика комптоновского рассеяния  $S_r$  для большинства элементов составило 1 – 2%, за исключением Mn, Sr и Se, где  $S_r$  составило 3 – 9%. Высокое относительное стандартное отклонение для этих элементов связано с их низкими концентрациями в образце. При нормировке на величину тока накопительного кольца  $S_r$  для большинства элементов увеличилось в три раза.

Нормировка спектров на площадь пика комптоновского рассеяния может быть эффективно использована для уменьшения погрешностей, вызванных

изменениями в интенсивности возбуждающего излучения, при анализе образцов с близкими рассеивающими и поглощающими свойствами.

### **Определение массовых коэффициентов ослабления рентгеновского излучения с энергией 7-12 кэВ в образцах с разными матрицами**

Для исследования были выбраны следующие международные и государственные стандартные образцы: NIES Certified Reference Material No.6 Mussel (мидия), IAEA A-13 Animal blood (кровь), NCS ZC 81002b Human hair (человеческий волос), NIST 1566a Oyster tissue (ткань устрицы), NCS ZC 85005 Beef liver (говяжья печень), WEPAL IPE sample 899 Cabbage (листья капусты), GCO 7126-94 Бил-1 (Байкальский ил), OCO 353-07 СГ-2 (аляскитовый гранит), IAEA Soil-7 (почва). Массовые коэффициенты ослабления рентгеновского излучения рассчитывались по уравнению:

$$I = I_0 e^{-\mu_m d} \quad (1)$$

где  $I_0$  – исходная интенсивность фотонов с энергией  $E$ , падающих на образец;  $I$  – интенсивность фотонов с энергией  $E$  после прохождения через образец;  $\mu_m = \mu/\rho$  (см<sup>2</sup>/г) – массовый коэффициент ослабления, и  $d$  (г/см<sup>2</sup>) – поверхностная плотность образца. Поверхностная плотность рассчитывалась как масса навески образца деленая на площадь спрессованной таблетки.

Различие в коэффициентах ослабления для таких тканей, как кровь, волосы, ткань мидии и устрицы составило 3-4%. В стандартном образце печени коэффициенты ослабления были на 20-22% ниже, чем в остальных биологических матрицах животного происхождения. Коэффициенты для образца листьев капусты на 47% превышали коэффициенты для образца печени; и на 30% превышали коэффициенты для остальных образцов с биологическими матрицами.

Среди геологических образцов наибольшие коэффициенты ослабления обнаружены в образце почвы, а наименьшие – в аляскитовом граните. Разница коэффициентов ослабления между образцом почвы и гранита – 17%. Коэффициенты ослабления в образце ила превышали коэффициенты ослабления для образца гранита в среднем на 5%.

Для образцов NCS ZC 85005 Beef liver (печень) и IAEA Soil-7 (почва) были рассчитаны теоретические массовые коэффициенты ослабления в исследуемом диапазоне энергий с помощью программы WinXCom.

Значения массовых коэффициентов ослабления, экспериментально полученные в данной работе, показали, что в области энергий рентгеновского излучения 7-12 кэВ разница между ослабляющими свойствами растительной и животной ткани достигает 47%; и 22% при сравнении животных тканей разного типа. При проведении теоретических расчетов массовых коэффициентов ослабления для сложных многоэлементных образцов (почва) расхож-

дение между теоретическими и экспериментальными значениями в области энергий 7-12 кэВ достигает 29%.

**Расчет концентраций химических элементов по способу внешнего стандарта с учетом и без учета поправки на поглощение**

Концентрации химических элементов рассчитывались в соответствии с уравнением:

$$\frac{I_x}{I_{st}} = \frac{C_x^A}{C_{st}^A} \cdot \frac{d_x^*}{d_{st}^*} \quad (2)$$

где  $d^* = \frac{1 - \exp\left[-d\left(\frac{\mu_0}{\sin\theta_0} + \frac{\mu_A}{\sin\theta_A}\right)\right]}{\frac{\mu_0}{\sin\theta_0} + \frac{\mu_A}{\sin\theta_A}}$  – поправка на поглощение, определяется

для исследуемого ( $d_x^*$ ) и стандартного ( $d_{st}^*$ ) образца;  $C_x^A$  и  $C_{st}^A$  – концентрации анализируемого элемента А в исследуемом и стандартном образце соответственно;  $I_x$  и  $I_{st}$  – интенсивности линии анализируемого элемента в исследуемом и стандартном образце;  $\mu_0$  и  $\mu_A$  – коэффициенты ослабления для первичного и флуоресцентного излучения;  $\theta_0$  и  $\theta_A$  – углы направления первичного и флуоресцентного излучения по отношению к плоскости образца.

Корректность способа внешнего стандарта с поправкой на поглощение оценивалась путем анализа стандартных образцов с аттестованными концентрациями определяемых элементов. Стандартные образцы выбирались таким образом, чтобы степень различия ослабляющих свойств между анализируемым образцом и образцом сравнения варьировала. Массовые коэффициенты ослабления для элементов с энергией излучения менее 7 кэВ и более 12 кэВ, а также для возбуждающего излучения (23 кэВ) находились с помощью аппроксимации экспериментально-полученных зависимостей  $\mu(E)$  степенной функцией с ее последующей экстраполяцией в область соответствующих энергий. Стандартное отклонение найденных концентраций рассчитывалось на основе стандартных отклонений площадей пиков определяемых элементов и стандартных отклонений величин концентраций используемого внешнего стандарта.

Зависимость сечения комптоновского рассеяния от эффективного атомного номера образца могла повлиять на результаты анализа при нормировке РФА-СИ-спектров. Поскольку в задачу входило исследование анализируемого образца и образца сравнения с принципиально разными матрицами, анализ проводился при трех разных способах нормировки.

*Способ внешнего стандарта с поправкой на поглощение при нормировке спектров на площадь пика комптоновского рассеяния.* В образце печени NCS ZC 85005 Beef liver были рассчитаны концентрации химических элементов с учетом и без учета поправки на поглощение относительно образца тканей устрицы NIST 1566a Oyster tissue. Массовые коэффициенты ослабления данных образцов в исследуемом диапазоне энергий различались на 20-22%. Поверхностная плотность измеряемых образцов была различной и составляла 0.034 г/см<sup>2</sup> для образца печени и 0.020 г/см<sup>2</sup> для образца тканей устрицы.

Определялись концентрации К, Са, Мп, Fe, Cu, Zn, Rb, Sr – элементов, содержание которых было аттестовано в паспортах обоих стандартных образцов.

В табл. 2 представлены концентрации химических элементов ( $\pm$ SD) рассчитанные в образце печени относительно образца тканей устрицы с учетом и без учета поправки на поглощение.

Т а б л и ц а 2

**Концентрации химических элементов в образце Beef liver (печень),  
рассчитанные относительно образца Oyster tissue (устрица)  
с нормировкой на площадь пика комптоновского рассеяния**

Элемент	$C_i$ , мкг/г	$C_{cert}$ , мкг/г	Без учета $\mu$ , мкг/г
<b>К</b>	9800 $\pm$ 600	<b>10000 <math>\pm</math> 800</b>	13100 $\pm$ 800
<b>Са</b>	260 $\pm$ 26	<b>185 <math>\pm</math> 11</b>	350 $\pm$ 40
<b>Мп</b>	10.7 $\pm$ 1.4	<b>9.08 <math>\pm</math> 0.93</b>	16.4 $\pm$ 2.1
<b>Fe</b>	560 $\pm$ 16	<b>452 <math>\pm</math> 37</b>	880 $\pm$ 25
<b>Cu</b>	110 $\pm$ 7	<b>96.7 <math>\pm</math> 5.4</b>	180 $\pm$ 12
<b>Zn</b>	173 $\pm$ 12	<b>165 <math>\pm</math> 12</b>	284 $\pm$ 20
<b>Rb</b>	22.7 $\pm$ 0.7	<b>23.6 <math>\pm</math> 2.7</b>	38.2 $\pm$ 1.2
<b>Sr</b>	1.26 $\pm$ 0.15	<b>1.03 <math>\pm</math> 0.12</b>	2.14 $\pm$ 0.21

$C_{cert}$  – паспортная концентрация элемента;  $C_i$  – рассчитанная концентрация элемента.

Концентрации, рассчитанные с учетом поправки на поглощение, значимо не отличаются от паспортных величин. Исключение составили только концентрации Fe и Са. Расхождение для этих элементов может быть связано с неравномерностью распределения данных элементов, а также с неточностью математической модели, используемой для нахождения массовых коэффициентов ослабления. Значения концентраций, рассчитанные без учета поправки на поглощение, в среднем превышают паспортные в 2 раза.

В табл. 3 показаны значения концентраций ( $\pm$ SD), найденные в образце печени NCS ZC 85005 Beef liver (поверхностная плотность 0.022 г/см<sup>2</sup>) относительно образца листьев капусты WEPAL IPE sample 899 Cabbage (поверхностная плотность 0.051 г/см<sup>2</sup>) с учетом и без учета поправки на поглощение. Для данных материалов массовые коэффициенты ослабления различались более чем на 40%. Результаты, найденные с учетом поправки на поглощение, для всех элементов кроме К и Са попадают в интервал паспортных значений. По-видимому, для К и Са, энергия излучения которых существенно ниже 7 кэВ (3.3 и 3.7 кэВ соответственно), расхождения связаны с недостоверностью аппроксимации зависимости  $\mu(E)$  в данном диапазоне энергий.

Результаты, полученные без учета поправки для К, Са, Мп, Fe, Cu и Zn, превышают паспортные значения в несколько раз. Концентрации Вг, Sr и Мо,

рассчитанные без учета поправки, попадают в интервалы паспортных значений.

Т а б л и ц а 3

**Концентрации химических элементов в образце Beef liver (печень), рассчитанные относительно образца Sabbage (капуста) с нормировкой на площадь пика комптоновского рассеяния**

Элемент	$C_i$ , мкг/г	$C_{cert}$ , мкг/г	Без учета $\mu$ , мкг/г
<b>K</b>	6000 ± 300	<b>10000 ± 800</b>	22000 ± 1200
<b>Ca</b>	149 ± 9	<b>185 ± 11</b>	534 ± 31
<b>Mn</b>	12.1 ± 2.6	<b>9.08 ± 0.93</b>	25 ± 3
<b>Fe</b>	410 ± 50	<b>452 ± 37</b>	800 ± 100
<b>Cu</b>	109 ± 40	<b>96.7 ± 5.4</b>	160 ± 60
<b>Zn</b>	158 ± 16	<b>165 ± 12</b>	213 ± 22
<b>Br</b>	2.49*	<b>3.85 ± 0.25</b>	2.80*
<b>Sr</b>	0.97 ± 0.03	<b>1.03 ± 0.12</b>	1.04 ± 0.03
<b>Mo</b>	3.10 ± 1.20	<b>3.97 ± 0.28</b>	3.18 ± 1.20

\* – SD в стандартном образце не указано;  $C_{cert}$  – паспортная концентрация элемента;  $C_i$  – рассчитанная концентрация элемента.

В табл. 4 и 5 представлены результаты расчетов концентраций ( $\pm$ SD) химических элементов в образце печени NCS ZC 85005 Beef liver относительно стандартных образцов с геологической матрицей: OCO 353-07 СГ-2 (алюскитовый гранит) и IAEA Soil-7 (почва) с учетом и без учета поправки на поглощение.

Т а б л и ц а 4

**Концентрации химических элементов в образце печени Beef liver (поверхностная плотность 0.043 г/см<sup>2</sup>), рассчитанные относительно образца гранита СГ-2 (поверхностная плотность 0.074 г/см<sup>2</sup>) с нормировкой на площадь пика комптоновского рассеяния**

Элемент	$C_i$ , мкг/г	$C_{cert}$ , мкг/г	Без учета $\mu$ , мкг/г
<b>K</b>	7520 ± 90	<b>10000 ± 800</b>	22750 ± 280
<b>Ca</b>	225 ± 25	<b>185 ± 11</b>	700 ± 80
<b>Mn</b>	14.1 ± 2.7	<b>9.08 ± 0.93</b>	38 ± 4
<b>Fe</b>	426 ± 17	<b>452 ± 37</b>	1050 ± 40
<b>Cu</b>	95 ± 15	<b>96.7 ± 5.4</b>	180 ± 30
<b>Zn</b>	170 ± 40	<b>165 ± 12</b>	290 ± 70
<b>Rb</b>	20.3 ± 2.7	<b>23.6 ± 2.7</b>	18.7 ± 2.5
<b>Sr</b>	0.84 ± 0.23	<b>1.03 ± 0.12</b>	0.73 ± 0.20

$C_{cert}$  – паспортная концентрация элемента;  $C_i$  – рассчитанная концентрация элемента.

Таблица 5

**Концентрации химических элементов в образце печени Beef liver (поверхностная плотность  $0.0196 \text{ г/см}^2$ ), рассчитанные относительно образца почвы Soil-7 (поверхностная плотность  $0.0508 \text{ г/см}^2$ ) с нормировкой на площадь пика комптоновского рассеяния**

Элемент	$C_i$ , мкг/г	$C_{cert}$ , мкг/г	Без учета $\mu$ , мкг/г
<b>K</b>	9200 ± 600	<b>10000 ± 800</b>	70000 ± 4000
<b>Ca</b>	133 ± 4	<b>185 ± 11</b>	962 ± 27
<b>Mn</b>	9.1 ± 0.5	<b>9.08 ± 0.93</b>	35.8 ± 2.1
<b>Fe</b>	480 ± 10	<b>452 ± 37</b>	1560 ± 30
<b>Cu</b>	100 ± 20	<b>96.7 ± 5.4</b>	257 ± 50
<b>Zn</b>	163 ± 10	<b>165 ± 12</b>	360 ± 20
<b>Br</b>	4.2 ± 0.5	<b>3.85 ± 0.25</b>	5.9 ± 0.7
<b>Rb</b>	18.7*	<b>23.6 ± 2.7</b>	23.5*
<b>Sr</b>	0.94 ± 0.05	<b>1.03 ± 0.12</b>	1.13 ± 0.06

\* – SD в стандартном образце не указано;  $C_{cert}$  – паспортная концентрация элемента;  $C_i$  – рассчитанная концентрация элемента.

Массовые коэффициенты ослабления указанных геологических образцов превышают массовые коэффициенты ослабления образца печени в 4-6 раз. Тем не менее, концентрации K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Br, Rb и Sr в образце печени, рассчитанные с учетом поправки на поглощение относительно геологических материалов, хорошо соответствуют паспортным значениям. Концентрации, полученные без учета поправки, превышают паспортные в несколько раз (табл.4, 5).

С ростом атомного номера определяемого элемента степень различий снижается, и концентрации Rb и Sr соответствуют паспортным значениям даже без учета поправки на поглощение. Это связано с низкой степенью поглощения характеристического излучения (13.4 и 14.1 кэВ) данных элементов в рассматриваемых матрицах.

При использовании нормировки на площадь пика комптоновского рассеяния в анализе по способу внешнего стандарта с поправкой на поглощение можно добиться достоверных количественных результатов даже в том случае, когда поглощающие и рассеивающие свойства анализируемого образца и образца сравнения различаются в несколько раз.

*Способ внешнего стандарта с поправкой на поглощение при нормировке спектров на ток накопительного кольца.* В табл. 6 показаны значения концентраций ( $\pm SD$ ), найденные в образце печени NCS ZC 85005 Beef liver (поверхностная плотность  $0.022 \text{ г/см}^2$ ) относительно образца листьев капусты WEPAL IPE sample 899 Cabbage (поверхностная плотность  $0.051 \text{ г/см}^2$ ) при использовании нормировки на ток накопительного кольца.

Т а б л и ц а 6

Концентрации химических элементов в образце Beef liver (*печень*),  
рассчитанные относительно образца Cabbage (*капуста*)  
с нормировкой на величину тока за время измерений

Элемент	$C_i$ , мкг/г	$C_{cert}$ , мкг/г	Без учета $\mu$ , мкг/г
<b>K</b>	8100 ± 400	<b>10000 ± 800</b>	13600 ± 800
<b>Ca</b>	202 ± 12	<b>185 ± 11</b>	328 ± 19
<b>Mn</b>	16.1 ± 2.8	<b>9.08 ± 0.93</b>	15.9 ± 2.1
<b>Fe</b>	560 ± 70	<b>452 ± 37</b>	480 ± 60
<b>Cu</b>	150 ± 50	<b>96.7 ± 5.4</b>	100 ± 40
<b>Zn</b>	213 ± 22	<b>165 ± 12</b>	131 ± 13
<b>Br</b>	3.37*	<b>3.85 ± 0.25</b>	1.72*
<b>Sr</b>	1.32 ± 0.04	<b>1.03 ± 0.12</b>	0.645 ± 0.021
<b>Mo</b>	4.2 ± 1.6	<b>3.97 ± 0.28</b>	2.0 ± 0.8

\* - SD в стандартном образце не указано;  $C_{cert}$  – паспортная концентрация элемента;  $C_i$  – рассчитанная концентрация элемента.

Для всех определяемых элементов: K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Br, Sr, Mo, концентрации, рассчитанные с учетом поправки на поглощение и нормировкой на ток, превышают паспортные значения. Степень расхождения не одинакова для разных элементов. Результаты, полученные для этих же образцов с использованием нормировки на площадь пика комптоновского рассеяния, были гораздо ближе к паспортным для всех элементов.

В табл. 7 и 8 представлены результаты расчетов концентраций ( $\pm$ SD) химических элементов в образце печени NCS ZC 85005 Beef liver относительно стандартных образцов с геологической матрицей: OCO 353-07 CG-2 (*алюскитовый гранит*) и IAEA Soil-7 (*почва*).

Т а б л и ц а 7

Концентрации химических элементов в образце Beef liver (*печень*),  
рассчитанные относительно образца CG-2 (*алюскитовый гранит*)  
с нормировкой на величину тока за время измерений

Элемент	$C_i$ , мкг/г	$C_{cert}$ , мкг/г	Без учета $\mu$ , мкг/г
<b>K</b>	14900 ± 180	<b>10000 ± 800</b>	45100 ± 600
<b>Ca</b>	446 ± 50	<b>185 ± 11</b>	1400 ± 160
<b>Mn</b>	28 ± 3	<b>9.08 ± 0.93</b>	74 ± 8
<b>Fe</b>	840 ± 30	<b>452 ± 37</b>	2080 ± 80
<b>Cu</b>	189 ± 30	<b>96.7 ± 5.4</b>	350 ± 60
<b>Zn</b>	340 ± 90	<b>165 ± 12</b>	570 ± 140
<b>Rb</b>	40 ± 5	<b>23.6 ± 2.7</b>	37 ± 5
<b>Sr</b>	1.7 ± 0.4	<b>1.03 ± 0.12</b>	1.4 ± 0.4

\* - SD в стандартном образце не указано;  $C_{cert}$  – паспортная концентрация элемента;  $C_i$  – рассчитанная концентрация элемента.

**Концентрации химических элементов в образце Beef liver (печень),  
рассчитанные относительно образца Soil-7 (почва)  
с нормировкой на величину тока за время измерений**

Элемент	$C_i$ , мкг/г	$C_{cert}$ , мкг/г	Без учета $\mu$ , мкг/г
<b>K</b>	17200 ± 1100	<b>10000 ± 800</b>	59000 ± 4000
<b>Ca</b>	250 ± 7	<b>185 ± 11</b>	815 ± 23
<b>Mn</b>	17.2 ± 1.3	<b>9.08 ± 0.93</b>	30.1 ± 2.5
<b>Fe</b>	896 ± 19	<b>452 ± 37</b>	1320 ± 30
<b>Cu</b>	190 ± 40	<b>96.7 ± 5.4</b>	220 ± 40
<b>Zn</b>	306 ± 18	<b>165 ± 12</b>	305 ± 18
<b>Br</b>	8.0 ± 1.0	<b>3.85 ± 0.25</b>	5.0 ± 0.6
<b>Rb</b>	35*	<b>23.6 ± 2.7</b>	20*
<b>Sr</b>	1.76 ± 0.09	<b>1.03 ± 0.12</b>	0.96 ± 0.05

\* -  $SD$  в стандартном образце не указано;  $C_{cert}$  – паспортная концентрация элемента;  $C_i$  – рассчитанная концентрация элемента.

При использовании нормировки на ток результаты, полученные как с учетом поправки на поглощение, так и без нее, для всех определяемых элементов превышают паспортные в несколько раз. Результаты, полученные для тех же самых образцов при использовании нормировки на пик комптоновского рассеяния, соответствовали паспортным для всех определяемых элементов.

*Способ внешнего стандарта с поправкой на поглощение при нормировке спектров на сигнал внешнего монитора интенсивности.* В качестве внешнего монитора интенсивности возбуждающего излучения использовалась майларовая пленка с напыленным на нее слоем Ni. Пленка располагалась непосредственно на поверхности измеряемого образца. Функция данного монитора аналогична функции ионизационной камеры – его сигнал не зависит от степени поляризации СИ и эффективного атомного номера анализируемого вещества (как в случае с комптоновским рассеянием). В образце капусты WEPAL IPE sample 899 Cabbage рассчитывались концентрации K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, и Sr относительно образца мидии NIES Certified Reference Material No.6 Mussel с использованием трех способов нормировки измеренных спектров. Разница между коэффициентами ослабления образцов мидии и капусты составляла около 30%. Величины концентраций ( $\pm SD$ ), рассчитанные с учетом поправки на поглощение при трех способах нормировки, представлены в табл. 9.

Таблица 9

**Концентрации химических элементов в образце Cabbage (капуста),  
рассчитанные относительно образца Mussel (мидия)  
при трех разных способах нормировки**

<b>Нормировка на площадь пика комптоновского рассеяния</b>							
	<b>К</b>	<b>Ca</b>	<b>Mn</b>	<b>Fe</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Sr</b>
$C_i$ , МКГ/Г	35600 ± 1400	47000 ± 4000	20.1 ± 2.4	234 ± 12	3.2 ± 0.3	22.1 ± 1.3	183
$C_{cert.}$ , МКГ/Г	26940 ± 1513	46894 ± 2605	21 ± 2.58	227 ± 29.8	2.79 ± 1.01	17.5 ± 1.8	169*
$C^*$ , МКГ/Г	25000 ± 1000	33700 ± 2650	16.1 ± 2.0	202 ± 11	2.94 ± 0.28	20.5 ± 1.2	178
<b>Нормировка на площадь Ka-линии Ni (внешний монитор)</b>							
	<b>К</b>	<b>Ca</b>	<b>Mn</b>	<b>Fe</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Sr</b>
$C_i$ , МКГ/Г	34700 ± 1400	46000 ± 4000	19.8 ± 2.3	230 ± 120	3.1 ± 0.3	21.5 ± 1.3	178
$C_{cert.}$ , МКГ/Г	26940 ± 1513	46894 ± 2605	21 ± 2.58	227 ± 29.8	2.79 ± 1.01	17.5 ± 1.8	169*
<b>Нормировка на величину тока за время измерений</b>							
	<b>К</b>	<b>Ca</b>	<b>Mn</b>	<b>Fe</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Sr</b>
$C_i$ , МКГ/Г	34200 ± 1300	45000 ± 4000	19.6 ± 2.2	225 ± 12	3.1 ± 0.3	21.2 ± 1.3	176
$C_{cert.}$ , МКГ/Г	26940 ± 1513	46894 ± 2605	21 ± 2.58	227 ± 29.8	2.79 ± 1.01	17.5 ± 1.8	169*

\* – опорные значения концентраций;  $C_{cert.}$  – паспортная концентрация элемента;

$C_i$  – концентрация элемента, рассчитанная с учетом поправки на поглощение;

$C^*$  – концентрация элемента, рассчитанная без учета поправки на поглощение.

В данном эксперименте использовались образцы с одинаковой поверхностной плотностью – 0.025 г/см<sup>2</sup>. Из табл. 9 видно, что результаты, полученные с поправкой на поглощение при трех разных способах нормировки, мало отличаются между собой. Также они значимо не отличаются от результатов, полученных без учета поправки на поглощение ( $C^*$ ). Во всех случаях полученные концентрации не имели значимых отличий от паспортных значений.

Отсутствие расхождений в расчетах с использованием и без использования поправки на поглощение наблюдалось лишь для образцов с одинаковой поверхностной плотностью и близкими матрицами (различие массовых коэффициентов ослабления ≤ 30%).

Результаты работы показали, что с учетом поправки на поглощение в методе РФА-СИ можно использовать стандартные образцы, массовые коэффициенты ослабления которых отличаются от коэффициентов исследуемого образца в несколько раз (*биологические и геологические материалы*). Зависимость сечения комптоновского рассеяния от эффективного атомного номера матрицы не внесла существенной погрешности в анализ биологических объектов даже при использовании образца с геологической матрицей в качестве внешнего стандарта.

При расчете поправок на поглощение следует с осторожностью использовать массовые коэффициенты ослабления, полученные путём экстраполяции

функций  $\mu(E)$  в область далеко за пределами экспериментально исследуемого диапазона.

В *четвертой главе* представлены результаты элементного анализа образцов биологических тканей и растительных материалов, полученные с применением исследуемых методических подходов. Показаны вариации элементного состава в различных органах растений в зависимости от места произрастания и техногенной нагрузки на территорию.

Исследован элементный состав и межэлементные корреляции в легких и печени крыс при алиментарном ожирении. Показано изменение величины коэффициентов корреляций, общего количества корреляций и характера сочетания в них элементов в ответ на изменение пищевого рациона и метаболизма экспериментальных животных.

### **ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ**

1. Обоснованы методические подходы для определения К, Са, V, Сг, Мп, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Se, Br, Rb, Sr методом РФА-СИ в применении к биологическим образцам растительного и животного происхождения, позволяющие использовать в качестве внешнего стандарта образцы сравнения (государственные и международные стандартные образцы) матрица которых не идентична матрице анализируемого образца.
2. В результате экспериментов по сравнению эффективности нормировок РФА-СИ спектров показано преимущество использования нормировки на площадь пика комптоновского рассеяния.
3. Измерены коэффициенты ослабления рентгеновского излучения в образцах с биологическими матрицами. В области энергий 7-12 кэВ разница в коэффициентах между растительной и животной тканью может достигать 47%; и около 22% при сравнении животных тканей разного типа.
4. Поправочные коэффициенты, рассчитанные на основе измеренных коэффициентов ослабления, позволили уменьшить ошибку количественного анализа при различии поглощающих и рассеивающих характеристик стандартного и исследуемого образца.
5. Фиксация образцов биологических тканей малой массы ( $\approx 20$  мг) в растворе формалина приводит к значимому уменьшению концентраций химических элементов. Пробоотбор образцов малой массы не должен включать фиксацию в растворе формалина.
6. По результатам РФА-СИ анализа тканей печени и легких экспериментальных крыс с алиментарным ожирением установлена возможность ранней диагностики нарушений обменных процессов с помощью корреляционного анализа концентраций химических элементов. Показана динамическая взаимосвязь между метаболическими функциями печени и легких и активное участие легких в метаболизме пищевого жира. Обнаружены множественные корреляции для малоизученных элементов

(Br, Rb и Sr) в легких и печени, что может отражать их важную роль в метаболизме.

### **Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:**

1. Чурин Б.В., Трунова В.А., Зверева В.В., Сидорина А.В., Асташов В.В. Микроэлементы и макроэлементы в печени при алиментарном ожирении в эксперименте // Бюл. экспер. биол. и мед. – 2012. – Т. 154, № 8. – С. 168-171.

2. Чурин Б.В., Трунова В.А., Зверева В.В., Сидорина А.В., Асташов В.В. Макро-микроэлементный состав легочной ткани при алиментарном ожирении // Фундаментальные исследования. – 2012. – Т. 8, № 1. – С. 179-183.

3. Trunova V., Sidorina A, Zvereva V., Churin B. Changes in the elemental content of rat heart as a result of the fixation in formalin analyzed by synchrotron radiation X-ray fluorescent analysis // J Trace Elem Med Bio. – 2013. – V. 27, N 1. – P. 76-77.

4. Сидорина А.В., Трунова В.А. Учет погрешностей измерения спектров при анализе элементного состава биологических объектов методом РФА-СИ // Аналитика и контроль. – 2013. – Т. 1, № 17. – С. 4-9.

5. Чурин Б.В., Трунова В.А., Сидорина А.В., Зверева В.В., Асташов В.В. Влияние цинка на содержание химических элементов в печени крыс на ранних этапах развития ожирения // Бюл. экспер. биол. и мед. – 2013. – Т. 156, № 8. – С. 161-165.

6. Сидорина А.В., Трунова В.А., Алексеева А.Н. Определение микроэлементного состава шиповника собачьего (*Rosa canina*) из разных мест произрастания методом РФА-СИ // Химия в интересах устойчивого развития. – 2014. – Т. 22, № 2. – С. 181-186.

7. Чурин Б.В., Трунова В.А., Сидорина А.В., Зверева В.В., Асташов В.В. Влияние цинка на содержание химических элементов в легочной ткани при ожирении в эксперименте // Бюл. экспер. биол. и мед. – 2014. – Т. 158, № 10. – С. 421- 427.

8. Trunova V., Sidorina A., Kriventsov V. Measurement of X-ray mass attenuation coefficients in biological and geological samples in the energy range of 7-12 keV // Appl. Radiat. Isotopes. – 2015. – V. 95. – P. 48-52.

9. Сидорина А.В., Алексеева А.Н. «Исследование элементного состава биотканей после фиксации в растворе формалина методом рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения (РФА-СИ)» // 1-ая зимняя молодежная школа-конференция с международным участием «Новые методы аналитической химии»: Тез. докл. Санкт-Петербург, 2013. С. 101.

10. Алексеева А.Н., Сидорина А.В. «Определение микроэлементного состава шиповника методом рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения (РФА-СИ)» // 1-ая зимняя молодежная школа-конференция с международным участием «Новые методы аналитической химии»: Тез. докл. Санкт-Петербург, 2013. С. 28.

11. Алексеева А.Н., Сидорина А.В. «Исследование микроэлементного состава шиповника, произрастающего в зонах с разной экологической обстановкой, методом РФА-СИ» // 51-ая Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс»: Тез. докл. Новосибирск, 2013. С. 164.

12. Sidorina A., Trunova V., Zolotarev K., Kriventsov V. «The influence of attenuation properties of different materials on the results of X-ray fluorescence analysis» // European Conference on X-Ray Spectrometry «EXRS-2014»: Abstract. Bologna, Italy, 2014. P. 31.

13. Степанова О.Г., Трунова В.А., Зверева В.В., Сидорина А.В., Федотов А.П. «Реконструкция динамики ледника Перетолчина (Восточный Саян) в XX веке на примере изучения донных осадков прогляциального озера Эхой» // XX Национальная конференция по использованию синхротронного излучения «СИ-2014»: Тез. докл. Новосибирск, 2014. С. 91.
14. Сидорина А.В., Трунова В.А., Золотарев К.В., Кривенцов В.В. «Способы улучшения метрологических характеристик рентгенофлуоресцентного анализа» // XX Национальная конференция по использованию синхротронного излучения «СИ-2014»: Тез. докл. Новосибирск, 2014. С. 88.
15. Сидорина А.В., Трунова В.А., Золотарев К.В. «Влияние поглощающих свойств разных матриц на результаты рентгенофлуоресцентного анализа» // VIII Всероссийская конференция по рентгеноспектральному анализу: Тез. докл. Иркутск, 2014. С. 116.
16. Trunova V., Sidorina A., Zolotarev K. Kriventsov V. «The influence of attenuation properties of different materials on the results of X-ray fluorescence analysis» // The 6th International Conference «Charged & Neutral Particles Channeling Phenomena»: Abstract. Capri, Italy, 2014. P. 206.

СИДОРИНА Анна Владимировна

**ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
ЭЛЕМЕНТНОГО СОСТАВА  
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ МЕТОДОМ РФА-СИ**

Автореф. дисс. на соискание учёной степени кандидата химических наук  
Изд. лиц. ИД № 04060 от 20.02.2001.

---

Подписано к печати и в свет 19.02.2015.

Формат 60×84/16. Бумага № 1. Гарнитура “Times New Roman”

---

Печать оперативная. Печ. л. 1,2. Уч.-изд. л. 1,1. Тираж 120. Заказ № 25  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН  
Просп. Акад. Лаврентьева, 3, Новосибирск, 630090)