

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ им. А. В. НИКОЛАЕВА  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК**

На правах рукописи

СИДОРИНА АННА ВЛАДИМИРОВНА

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

02.00.02 – аналитическая химия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Научный руководитель:  
кандидат химических наук  
Трунова Валентина Александровна

Новосибирск - 2014

## ОГЛАВЛЕНИЕ:

|   |           |
|---|-----------|
| ВВЕДЕНИЕ.....   | 6         |
| <b>ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....</b>   | <b>12</b> |
| 1.1. Химические элементы и взаимодействия между ними в жизнедеятельности организма.....   | 12        |
| 1.2. Современные количественные методы анализа биологических образцов.....  | 17        |
| 1.2.1. Рентгенофлуоресцентный метод анализа с использованием синхротронного излучения.....                                      | 24        |
| 1.3. Аналитические подходы и трудности при исследовании биообъектов методом РФА-СИ.....   | 28        |
| 1.3.1. Учет вариаций интенсивности возбуждающего излучения.....   | 29        |
| 1.3.2. Способ внешнего стандарта в анализе биологических объектов.....  | 34        |
| 1.3.3. Массовые коэффициенты ослабления рентгеновского излучения в различных материалах и способы их измерения.....             | 43        |
| 1.4. Влияние фиксации в растворе формалина на элементный состав образцов биологических тканей.....                              | 47        |
| ЗАДАЧИ И НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ.....  | 52        |
| <b>ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....</b>  | <b>57</b> |
| 2.1. Пробоподготовка образцов миокарда для исследования влияния фиксации раствором формалина на элементный состав биоткани..... | 57        |
| 2.2. Пробоподготовка стандартных образцов.....  | 58        |
| 2.3. Экспериментальная станция элементного рентгенофлуоресцентного анализа.....   | 59        |
| 2.4. Измерение спектров для оценки погрешности, обусловленной использованием синхротронного излучения.....                      | 61        |

|  |  |           |
|--|--|-----------|
| 2.5.   | Измерение массовых коэффициентов ослабления и рентгенофлуоресцентных спектров образцов с разными матрицами.....                | 62        |
| 2.6.   | Измерения спектров исследуемых образцов.....   | 64        |
| <b>ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ДЛЯ РФА-СИ АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ.....</b>  |  | <b>65</b> |
| 3.1.   | Оценка погрешности регистрации спектров, обусловленной использованием синхротронного излучения.....                            | 65        |
| 3.2.   | Определение массовых коэффициентов ослабления рентгеновского излучения с энергией 7-12 кэВ в образцах с разными матрицами..... | 68        |
| 3.3.   | Расчет концентраций химических элементов по способу внешнего стандарта с учетом и без учета поправки на поглощение.....        | 77        |
| 3.3.1.   | Нормировка спектров на площадь пика комптоновского рассеяния.....  | 77        |
| 3.3.2.   | Нормировка спектров на величину тока накопительного кольца за время измерений.....   | 82        |
| 3.3.3.   | Нормировка спектров на сигнал внешнего монитора интенсивности.....   | 85        |
| 3.4.   | Исследование изменений элементного состава образцов биологических тканей в результате фиксации раствором формалина.....        | 89        |
| <b>ГЛАВА 4. ЭЛЕМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ И РАСТИТЕЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ.....</b> |  | <b>93</b> |
| 4.1.   | Определение микроэлементного состава шиповника из разных мест произрастания методом РФА-СИ.....                                | 93        |
| 4.1.1.   | Пробопоотбор и пробоподготовка.....  | 94        |
| 4.1.2.   | Измерения.....   | 94        |
| 4.1.3.   | Результаты .....   | 94        |

|  |     |
|--|-----|
| 4.2. Исследование элементного состава и межэлементных корреляций в легких и печени крыс при алиментарном ожирении..... | 100 |
| 4.2.1. Экспериментальная часть.....  | 100 |
| 4.2.2. Пробоподготовка.....  | 100 |
| 4.2.3. Измерения.....  | 102 |
| 4.2.4. Результаты.....   | 102 |
| ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ.....  | 110 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....   | 112 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ   |     |

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

**РФА-СИ** – рентгенофлуоресцентный анализ с использованием синхротронного излучения

**РФА** – рентгенофлуоресцентный анализ

**СИ** – синхротронное излучение

**ААС** – атомно-абсорбционная спектрометрия

**АЭС** – атомно-эмиссионная спектрометрия

**МС** – масс-спектрометрия

**НАА** – нейтронно-активационный анализ

**ПААС** – пламенная атомно-абсорбционная спектрометрия

**ЭТААС** – электротермическая атомно-абсорбционная спектрометрия

**ИСП-АЭС** – атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

**ИСП-МС** – масс-спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой

**PIXE** – рентгеновский эмиссионный анализ, индуцированный частицами

**ЭД-РФА** – энергодисперсионный рентгенофлуоресцентный анализ

**TXRF** – рентгенофлуоресцентный анализ с полным внешним отражением

**EXAFS** – спектрометрия протяженной тонкой структуры рентгеновских спектров поглощения

**SD** – стандартное отклонение

**S<sub>r</sub>** – относительное стандартное отклонение

**ПДК** – предельно допустимая концентрация

**ДДП-АЭС** – атомно-эмиссионная спектрометрия с двухструйным дуговым плазматроном

**АО** – алиментарное ожирение

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы.** Развитие и усовершенствование аналитических методов исследования элементного состава позволяет получить знания о количественных соотношениях между микроэлементами в тканях различных органов. 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. О содержании химических элементов в организме накоплено много данных, но, несмотря на это, их физиологическая роль остается недостаточно изученной. Мало известно и о взаимовлиянии микроэлементов. Механизмы взаимодействия на молекулярном уровне между двумя или более элементами могут быть очень сложными и не однозначными, и знания в этой области ещё очень поверхностны. Корреляционный анализ концентраций химических элементов в организме отражает синергетические и антагонистические взаимодействия между элементами и представляет ценную информацию для дальнейшего изучения их метаболизма и взаимодействия.

Метод рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения (РФА-СИ) обладает такими преимуществами, как многоэлементность, относительная быстрота анализа, неdestructивность, не требует переведения анализируемой пробы в раствор. В отличие от традиционного РФА, метод РФА-СИ позволяет анализировать образцы малой массы (до 0,5 мг) и подбирать оптимальные условия для анализа интересующих элементов.

Несмотря на многие преимущества синхротронного излучения (СИ) по сравнению с излучением рентгеновской трубки, его использование вносит в анализ ряд особенностей, которые необходимо учитывать для получения достоверных количественных данных. Такими особенностями являются циклическая работа накопительного кольца, в результате чего происходит постепенное снижение интенсивности возбуждающего излучения, а также зависи-

мость сечения комптоновского рассеяния от степени поляризации СИ и некоторые другие. В связи с этим возникает проблема нормировки рентгенофлуоресцентных спектров. Выбор оптимального способа нормировки должен основываться на особенностях конкретной станции РФА-СИ анализа. Экспериментальные станции на источниках синхротронного излучения, благодаря определенному сочетанию характеристик используемого оборудования и геометрии измерений, зачастую являются уникальными и не имеют аналогов. Поэтому исследования, направленные на поиск оптимальной методики измерений в условиях конкретной станции являются необходимыми и важными.

При использовании способа внешнего стандарта в РФА анализе основным требованием является близость поглощающих и рассеивающих свойств матриц исследуемого и стандартного образца и их соизмеримый элементный состав. В связи с этим неоднократно отмечается проблема нехватки или отсутствия подходящих стандартных образцов. Использование способа внешнего стандарта с поправкой на поглощение позволяет использовать стандартные образцы, матрица которых по своим поглощающим свойствам отличается от матрицы исследуемого объекта. Это позволит вовлекать в анализ большее количество стандартных образцов и расширить круг элементов, определяемых количественно, что является актуальной задачей.

При изучении элементного состава биологических объектов необходимо исключить все возможные ошибки еще на стадии пробоотбора образцов. Для сохранения образцов биологических тканей после их изъятия из органов человека или экспериментальных животных применяют различные способы фиксации. В медицинской практике наиболее распространена фиксация биопсийного и аутопсийного материала растворами формалина. Известно, что степень изменения элементного состава в результате фиксации биоматериала в растворе формалина зависит от длительности фиксации и размера самого образца. Степень изменения элементного состава образцов биологической ткани малой массы (фрагменты органов экспериментальных животных,

материал биопсии) при сроках фиксации менее одной недели практически не исследована.

**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.

Для выполнения поставленной цели необходимо было решить **следующие задачи:**

- Исследовать степень изменения элементного состава образцов биологических тканей в результате фиксации раствором формалина.
- Оценить эффективность различных способов нормировки спектров в методе РФА-СИ.
- Измерить коэффициенты ослабления рентгеновского излучения в биологических материалах для учета матричных эффектов в образцах.
- Определить методом РФА-СИ элементный состав и наличие корреляций между концентрациями химических элементов в тканях печени и легких экспериментальных животных.

**Научная новизна работы:**

- впервые на экспериментальной станции РФА-СИ анализа (ВЭПП-3) 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;

- впервые исследована динамика изменения элементного состава образцов биологической ткани малой массы в результате коротких сроков фиксации в растворе формалина;
- впервые проводится 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;
- впервые 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 и геологических материалов 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.

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

**Апробация работы.** Результаты исследований докладывались на следующих Российских и международных конференциях: 1-ая зимняя мо-

лодежная школа-конференция с международным участием «Новые методы аналитической химии», 2013 г., Санкт-Петербург. 51-ая международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс», 2013 г., Новосибирск. European Conference on X-Ray Spectrometry «EXRS-2014», 2014 г., Болонья, Италия. XX Национальная конференция по использованию Синхротронного Излучения "СИ-2014", 2014 г., Новосибирск. VIII Всероссийская Конференция по рентгеноспектральному анализу, 2014 г., Иркутск. Конкурс молодых ученых Сибирского центра синхротронного и терагерцового излучения 2012 и 2014 г., Новосибирск. 6<sup>th</sup> International Conference “Charged & Neutral Particles Channeling Phenomena”, 2014 г., Капри, Италия.

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

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 8 тезисов докладов на российских и международных конференциях, 8 статей, 3 статьи направлены в журналы.

**Объем и структура работы.** Общий объем работы составляет 134 страниц, включая 22 таблицы. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов, списка цитируемой литературы, содержащего 186 наименования, и приложения.

## ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1. Химические элементы и взаимодействия между ними в жизнедеятельности организма

Организм человека в среднем состоит на 60 % из воды, на 34 % из органических веществ и на 6 % – из неорганических. В неорганических веществах человеческого организма обязательно присутствуют 22 химических элемента: Ca, P, O, Na, Mg, S, B, Cl, K, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cr, Si, I, F, Se [1]. Элементы, содержание которых не превышает  $10^{-3}\%$ , входят в состав ферментов, гормонов, витаминов и других жизненно важных соединений. Они образуют активные центры ферментов, оказывают сильное влияние на конформацию нуклеиновых структур и белка и, следовательно, на их функцию. Для белкового, углеводного и жирового обмена веществ необходимы Fe, Co, Mn, Zn, Mo, V, B, W; в синтезе белков участвуют Mg, Mn, Fe, Co, Si, Ni, Cr, в кроветворении – Co, Ti, Si, Mn, Ni, Zn ; в дыхании – Mg, Fe, Cu, Zn, Mn и Co [2]. Микроэлементы в составе ферментов ускоряют или замедляют разные биохимические процессы, т.е. выступают в роли катализаторов или ингибиторов. Это приводит к тому, что повышается или понижается концентрация отдельных белков, жиров, углеводов и других, необходимых для жизни веществ. Благодаря этому замедляется или ускоряется восстановление поврежденных тканей, рост и развитие клеток, возрастает или снижается насыщение организма кислородом, углекислым газом и пр. [1].

На протяжении многих десятилетий и по сегодняшний день проводятся исследования, направленные на выявление взаимосвязи между патологическими процессами и метаболизмом микроэлементов в живом организме. Круг заболеваний, при которых исследуются изменения элементного состава организма, чрезвычайно широк. К ним относятся сердечнососудистые, онкологические заболевания, сахарный диабет, ожирение, заболевания почек, нейродегенеративные заболевания и многие другие [3-7].

В настоящее время известно, что микроэлементы, как и прочие нутриенты и метаболиты присутствуют в организме в двух пулах – оборотном и резервном. В оборотном пуле микроэлемент напрямую вовлечен в одну или более функций организма. Резервный пул служит для пополнения оборотного пула в случае необходимости и для поддержания концентрации химического элемента на должном уровне. Размеры резервного и оборотного пулов значительно варьируют для разных элементов. При изучении активности метаболических процессов в организме необходимо измерить или оценить объем разных пулов, чтобы получить информацию о скорости и интенсивности биохимического процесса [8].

Учитывая наличие разных пулов микроэлементов, одни балансовые определения содержания химических элементов в организме, несмотря на их большую значимость, не могут в полной мере свидетельствовать о состоянии обменных процессов. Гораздо более информативным может оказаться изучение количественных соотношений между элементами и выявление корреляций между их содержанием. В одной биохимической реакции могут участвовать одновременно несколько микроэлементов. Значения атомных и ионных радиусов, энергий ионизации, координационных чисел, склонность к образованию связей с одними и теми же биополимерами обуславливают эффекты, наблюдаемые при взаимном замещении ионов: оно может происходить как с усилением (синергизм), так и с угнетением их биологической активности (антагонизм) [2].

Механизмы взаимодействия на молекулярном уровне между двумя и более элементами являются очень сложными и знания в этой области все еще очень поверхностны. Известно, что элементы с похожими химическими и физическими свойствами могут конкурировать за одни и те же сайты связывания на транспортных белках и ферментах [9].

Примером таких взаимодействий является антагонизм цинка и меди [10-17], а также селена и серы, причем на степень антагонизма влияет химическая форма элемента [13].

Существуют и другие взаимодействия между микроэлементами, называемые неконкурентными. Они проявляются, когда дефицит или избыток одного (или более) элемента влияет на метаболический путь другого элемента или вмешивается в биологические процессы, необходимые для полноценного проявления его активности. Примером неконкурентных взаимодействий элементов является влияние меди на протекание процесса кроветворения. Медьсодержащий белок ферроксидаза I, чья активность заметно подавляется при дефиците меди, необходим для мобилизации железа из его запасов перед тем, как оно встраивается в гемоглобин [13]. Большое поступление цинка с пищей провоцирует и усиливает дефицит меди, в результате чего угнетается функция железа и развивается анемия [9, 18, 19].

В некоторых работах сообщается, что влияние одних микроэлементов на содержание других неоднозначно в разных клетках организма [20] и в разных типах биологических тканей [21-23].

Особый интерес представляют взаимодействия между эссенциальными и неэссенциальными или токсическими микроэлементами. Было показано, что токсическое действие Cd, Hg и Pb может быть нейтрализовано эссенциальными элементами, такими как Se, Zn и в некоторых случаях Mn [24]. Также интересна корреляция между Cd и Co, обнаруженная в работе [25]. Co является эссенциальным элементом, и одна из его биологических функций заключается в образовании витамина B12. Cd, напротив, является токсическим элементом. Тесная корреляция между этими элементами может подразумевать, что витамин B12 способен действовать антагонистически по отношению к токсическому действию Cd.

В ряде исследований обнаружена корреляция между Fe и As в печени [25] и моче [26] человека. Корреляция между данными элементами была об-

наружена и в образцах болотистых почв [27]. Интересно отметить схожее соотношение этих двух элементов в окружающей среде и живом организме.

Для лучшего понимания роли элементов в биохимических процессах, а также выявления их синергических и антагонистических взаимодействий, может оказаться полезным исследование корреляций между концентрациями микроэлементов. Наибольшее внимание при изучении элементных корреляций уделяется печени – центральному органу химического гомеостаза организма. Сообщается о корреляциях, найденных в образцах печени, между Fe, Co и Sr [24]; Mn, Co, Cu и Zn [28]; Zn и Cd [29]; Se и Hg [30, 31] и рядом других элементов [25, 32] в организме млекопитающих.

О межэлементных корреляциях в других органах животных и человека известно очень мало. В исследовании С. Vanoeteren и др. [33] определялись концентрации 22 микроэлементов в легких человека. Полагалось, что Br, Cd, Co, Cr, Cs, Pb, Sc, Se и V аккумулируются в ткани легких из-за вдыхания частиц различных веществ (которые накапливаются в нерастворимой форме). В данной работе в ткани легких были обнаружены значимые корреляции между следующими элементами: Cs-Br, Ce-La, Sc-Co, Sc-Cr, Sc-Sb, Cr-Sb, K-Zn, Sc-V. Авторы предположили, что корреляции между элементами являются доказательством их схожего поведения в легких: Co, Cr, Sb, Sc и V имеют долгий период полувыведения, а Zn и K легко удаляются из биологической ткани. [33]. Необходимо отметить, что корреляции между различными химическими элементами не могут быть четко описаны и объяснены конкретным процессом. Они отражают очень сложную систему биохимических реакций, и могут быть только лишь сопутствующим явлением.

В некоторых работах обнаружена взаимосвязь между наличием корреляций микроэлементов, физиологическими и биохимическими параметрами организма [28, 32, 34]. Тем не менее, механизмы взаимодействия между исследуемыми элементами и их связь с биохимическими показателями остаются непонятными.

Обзор литературы показывает высокий интерес к изучению роли химических элементов в жизнедеятельности организма. Большое внимание уделяется исследованиям элементного состава и его изменениям, возникающим при наличии тех или иных заболеваний. Химические элементы участвуют в работе ферментов всех систем организма, а также в регуляции деятельности гормонов и играют важную роль в возникновении, подавлении и поддержании биохимических реакций. Знаний для детального описания механизмов участия микроэлементов в разных биохимических процессах еще недостаточно. Определение концентраций химических элементов непосредственно в тканях различных органов, где и протекают биохимические реакции, является важным для изучения молекулярных механизмов интересующих процессов, а также выявляет степень вовлеченности в эти процессы конкретных органов.

Многочисленные литературные данные говорят о сложных и многообразных взаимодействиях между химическими элементами, когда один элемент может не только замещать другой, но и полностью влиять на его усвояемость и метаболизм в организме. Также для нормального протекания многих биологических процессов требуется одновременное участие сразу нескольких химических элементов. Обмен одного микроэлемента регулируется другими, связанными с ним метаболически. Следовательно, микроэлемент не может самостоятельно, без взаимодействия с другими элементами, участвовать в биологических реакциях. Необходимо учитывать взаимосвязи между химическими элементами, которые отражают синергические и антагонистические отношения между ними. В живых системах эти отношения усложняются из-за многообразия химических реакций, протекающих одновременно. Поэтому в количественный элементный анализ биологических объектов необходимо вовлекать как можно больше элементов, особенно тех, которые выполняют активные биологические функции.

## 1.2. Современные количественные методы анализа биологических образцов

Биологические образцы, представляющие интерес для изучения элементного состава, отличаются исключительным разнообразием. К ним относятся все органы растений, сочетающие разные виды растительной ткани (покровная, образовательная, проводящая и др.); образцы органов и тканей животных (эпителиальная, костная, мышечная, хрящевая, нервная пр.); внутренние среды организма (кровь, лимфа и пр.); секреты желез (слизи, секреты растений и пр.); продукты жизнедеятельности. Очевидно, что разные органы растений и человека, а также биологические жидкости, различаются не только химическим составом, но и физическими свойствами. Общий химический состав образца, его агрегатное состояние, плотность, вязкость, однородность распределения анализируемых элементов и их химическая форма являются критерием выбора той или иной методики анализа [35]. При поиске наиболее адекватных и эффективных процедур пробоотбора, пробоподготовки, измерения и выбора образцов сравнения нередко возникает вопрос о правомерности применяемых действий. Сложность и разнообразие биологических объектов являются предпосылкой для создания новых методик анализа, либо для оптимизации существующих методик применительно к каждому конкретному объекту [36].

Большое значение при определении микроэлементов в биосубстратах имеет влияние матрицы. Как правило, биологические образцы отличаются сложным составом и большой вариабельностью матрицы. Для уменьшения влияния матрицы на анализ, ее часто необходимо устранять или разрушать. При этом возникают дополнительные источники погрешности, зависящие от конкретной методики пробоподготовки.

Сегодня при анализе биологических материалов в большинстве случаев определяют достаточно низкие концентрации элементов, соизмеримые с присутствием этих элементов в воздухе, воде, в земной коре, в применяемых

реактивах, используемой посуде. Отклонение результатов определения содержания микроэлементов в сторону завышения или занижения истинного значения может быть связано с двумя факторами – загрязнением или потерей, поскольку методы подготовки проб, такие как нагрев или кислотное разложение в открытых системах, могут привести к потере заметных количеств микроэлементов [37]. Анализ микроэлементного состава биологических образцов достаточно сложен, и для его проведения необходимо использовать высокочувствительные, надёжные, и по возможности, экономичные методы. Для определения уровней содержания макро- и микроэлементов в биологических образцах различного происхождения широко применяются такие методы количественного анализа, как ААС (атомно-абсорбционная спектрометрия), АЭС (атомно-эмиссионная спектрометрия), МС (масс-спектрометрия), НАА (нейтронно-активационный анализ), РФА (рентгенофлуоресцентный анализ) и различные их модификации. В табл. 1 представлены результаты анализа образцов печени с использованием разных методов.

На первом месте среди общих аналитических требований, предъявляемых к анализу биологических образцов, стоят правильность и воспроизводимость [38]. Количество биологического материала, которое можно взять на анализ у живого человека, как правило, не велико. Поэтому при выборе метода анализа всегда необходимо сопоставлять три наиболее важных фактора: объем пробы, ожидаемое содержание в ней определяемого компонента и чувствительность выбранного метода анализа. Минимизация матричных эффектов, более низкие пределы обнаружения, возможность анализа образцов малой массы – также являются критериями выбора того или иного метода при анализе биообъектов.

Т а б л и ц а 1

Концентрации элементов ( $\text{мкг}/\text{г} \pm \text{SD}$ ) в образцах печени, полученные разными методами

| Элемент | ИСП-МС [39]   | ИСП-АЭС [40] | НАА [41]        | ЭД-РФА [42]  | ААС [43]    |
|---------|---------------|--------------|-----------------|--------------|-------------|
| Na      |               | 3045 ± 409   | 3.360 ± 1.720   |              | 822 ± 169   |
| Mg      |               | 1240 ± 132   |                 |              | 257 ± 34    |
| P       |               | 17727 ± 1818 |                 |              | 3830 ± 280  |
| K       |               | 15000 ± 1363 |                 | 11000 ± 1800 | 2170 ± 280  |
| Ca      |               | 166 ± 20     | 270 ± 179       | 235 ± 100    | 204 ± 34    |
| Sc      |               |              | 0.0066 ± 0.0035 |              |             |
| V       | 0.33 ± 0.14   |              |                 |              |             |
| Cr      | 0.59 ± 0.94   |              | 0.27 ± 0.18     |              |             |
| Mn      | 8.11 ± 1.77   |              |                 | 8.9 ± 0.9    | 3.5 ± 0.6   |
| Fe      |               | 2718 ± 463   | 705 ± 401       | 768 ± 246    | 218 ± 38.7  |
| Co      | 0.044 ± 0.016 |              | 0.129 ± 0.032   | 4.9 ± 1.2    |             |
| Ni      |               |              |                 | 1.4 ± 0.2    |             |
| Cu      | 24.6 ± 5.10   |              |                 | 22 ± 4       | 16.1 ± 5.9  |
| Zn      | 116 ± 20.9    | 149 ± 16     | 204 ± 48        | 226 ± 27     | 98.2 ± 21.7 |
| As      |               |              | 0.060 ± 0.009   | ≤ 0.6        |             |
| Se      |               |              | 1.65 ± 0.24     | 2.9 ± 0.9    |             |
| Br      |               |              | 1.94 ± 0.58     | 8 ± 3        |             |
| Rb      | 0.412 ± 0.11  |              | 28.7 ± 7.5      | 18 ± 5       |             |
| Sr      | 2.32 ± 0.655  |              |                 | 1.0 ± 0.4    |             |
| Mo      | 4.46 ± 0.821  |              | 3.85 ± 0.55     |              |             |
| Ag      | 10 ± 3.6      |              |                 |              |             |
| Cd      | 18.4 ± 6.64   |              | 5.45 ± 1.56     |              |             |
| Sb      | < 0.01        |              | 0.068 ± 0.043   |              |             |
| Cs      | 0.09 ± 0.02   |              | 0.036 ± 0.009   |              |             |
| Ba      | 0.005 ± 0.002 |              |                 |              |             |
| La      |               |              | 0.147 ± 0.078   |              |             |
| Ce      |               |              | 0.27 ± 0.15     |              |             |
| Sm      |               |              | 0.0052 ± 0.0021 |              |             |
| Tl      | 0.010 ± 0.004 |              |                 |              |             |
| Pb      | 0.102 ± 0.067 |              |                 | 4 ± 1        |             |

Большое количество опубликованных результатов анализа биообъектов получены с использованием метода ААС. Этот метод отличается высокой

чувствительностью и избирательностью. Высокая чувствительность достигается тем, что элемент в атомизаторе при температуре 2500 – 3500 °С превращается в атомный пар. В этом температурном интервале почти все атомы находятся в основном (невозбужденном) состоянии, при котором значение сигнала абсорбции слабо зависит от температуры и оказывается достаточно высоким. В атомно-абсорбционной спектрометрии вероятность совпадения спектральных линий разных элементов относительно низка, и, соответственно, повышается селективность определений. Кроме того, для ламп с полым катодом характерны весьма простые спектры, имеющие малый фон.

Возможности метода ААС ограничены, прежде всего, одноэлементным характером анализа и недостаточными пределами обнаружения при использовании наиболее распространенного варианта с пламенным возбуждением. Применение электротермической атомизации снижает пределы обнаружения на 1–2 порядка. Важнейшим условием для получения правильных результатов в методе ААС является учет неселективного поглощения (коррекция фона) [37]. Поскольку для этого метода предпочтительна жидкая форма образца, наиболее часто анализируемыми объектами являются моча, кровь, сыворотка животных и человека [39-41]. Однако, используя различные приемы растворения, проводят анализ также и других тканей: сердце, мозг, печень, почка [40, 44-54]. Наиболее широко используются ПААС (пламенная атомно-абсорбционная спектрометрия) и ЭТААС (электротермическая атомно-абсорбционная спектрометрия). Необходимая масса образца для анализа методом ААС в зависимости от разновидности метода и процедуры пробоподготовки составляет 6 – 90 мг [49, 51, 52]. Поскольку ААС является одноэлементным методом, время проведения анализа заметно увеличивается, когда необходимо определение нескольких элементов.

В настоящее время получили широкое распространение и считаются весьма эффективными методы определения элементов в органах и биосредах человека с помощью атомно-эмиссионной спектрометрии и масс-

спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (ИСП-АЭС и ИСП-МС соответственно). Эти методы позволяют в одной пробе одновременно определять до 20 элементов, что очень важно при оценке взаимодействия элементов и их взаимовлияний в организме. Метод АЭС позволяет определять Na, Mg, P, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Hg, Pb в различных тканях животных: печени, почки, кишечника, сердца, артерий, поджелудочной железы, селезенки, головного мозга, мышцы, костной ткани, кожи, волос, и крови [55-60]. Атомно-эмиссионный анализ с дуговым возбуждением, наиболее старый среди методов многоэлементного эмиссионного анализа, нашел широкое применение благодаря относительной простоте операций, экономичности и доступности. Основным его достоинством является возможность одновременного определения с довольно высокой чувствительностью большого числа элементов. В оптимальных условиях при количественном анализе обычно определяют 10–15 элементов из одной пробы. Недостатком метода является сравнительно плохая воспроизводимость результатов, обусловленная нестабильностью дугового источника.

Нестабильность дугового источника возбуждения устранена в моделях с индуктивно связанной плазмой. Плазменная атомно-эмиссионная спектрометрия – многоэлементный метод, пригодный для одновременного определения многих элементов, в то время как в ААС можно определять лишь отдельные элементы. Данный метод перспективен для биомедицинских и экологических исследований. Достигаемые пределы обнаружения элементов лежат в интервале 0,1-100 мкг/л. К достоинствам данного метода следует отнести относительно малые матричные эффекты, высокую производительность (значительно выше, чем при использовании ААС), к недостаткам – вероятность появления спектральных помех, перекрывание эмиссионных линий некоторых элементов. При разработке методики атомно-эмиссионного анализа важнейшим этапом является процесс пробоподготовки, который имеет некоторую специфику в отношении биологических объектов. Определение микроэлементов в таких субстратах рекомендуется проводить после

минерализации исследуемых проб. Минерализацию осуществляют с помощью мокрого или сухого озоления, либо путем экстракции минеральными кислотами. Сухое озоление проводят в присутствии добавок  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{Mg}(\text{NO}_2)_2$ ,  $\text{KClO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и др. [56], которые способствуют более быстрому и полному разложению проб при более низких температурах. Иногда в пробу перед озолением добавляют этиловый спирт с целью деструкции органической матрицы и ускорения процесса озоления.

Биологические ткани являются наиболее сложными объектами для метода АЭС в плане селективности и достижения низких пределов обнаружения. Это объясняется составом матрицы препаратов, содержащих в высоких концентрациях соединения кальция. Поэтому анализ проб без одновременного использования аттестованных стандартных образцов тканей не имеет смысла. В то же время количество стандартных образцов биологических материалов, аттестованных на необходимый набор микроэлементов, ограничено из-за проблемы их соответствия анализируемым пробам [37].

Одним из самых чувствительных методов является масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой. В последние годы он считается наиболее перспективным методом для определения микро- и ультра-микроэлементов в биосубстратах, используется в научно-исследовательских и клинических лабораториях. К достоинствам данного метода относятся чрезвычайно низкие пределы обнаружения (по большинству элементов ниже 0,01 мкг/л) и высокая производительность. Чрезвычайно низкие пределы обнаружения должны сочетаться с соответствующими высокими трудозатратами во избежание загрязнения проб [37]. Основная трудность этого метода – влияние матричных эффектов и спектральные наложения в образцах многоэлементного состава [59].

Низкими пределами обнаружения для большинства элементов обладает инструментальный нейтронно-активационный метод. Это многоэлементный метод, который применяется главным образом в научных исследованиях.

Этим методом возможно определение до 30 элементов, снижена вероятность загрязнения за счет отсутствия этапа химического разложения пробы (недеструктивный метод). Используется при подтверждении результатов других, более производительных методов, например, для аттестации стандартных образцов и в арбитражном анализе. К достоинствам метода относятся: простая пробоподготовка, малый расход пробы, высокая селективность. Пределы обнаружения отдельных элементов достигают 0,001-1 нг/г. Недостатки: дорогостоящее оборудование и расходные материалы, значительные временные затраты [37].

Прямой анализ объектов окружающей среды и биообъектов в большинстве случаев становится невозможным из-за негативного влияния матрицы, высокой летучести некоторых химических элементов (таких как Se, Br, Hg и др.), а также ряда других причин. Такие методы, как ААС, АЭС и ИСП-МС подразумевают полное разрушение матрицы минеральными кислотами, что может привести к проблемам загрязнения используемыми реагентами или к потерям элементов из-за неполного растворения и/или испарения.

Многоэлементные и недеструктивные методы анализа обладают рядом преимуществ, в сравнении с одноэлементными методами и методами, требующими разложения пробы и перевода ее в раствор. В этом случае определение всех исследуемых элементов, концентрации которых могут колебаться в довольно широких пределах, происходит в процессе одного измерения.

Современные инструментальные методы, такие как РИХЕ (рентгеновский эмиссионный анализ, индуцированный частицами), ЭД-РФА (энергодисперсионный рентгенофлуоресцентный анализ), ТХRF (рентгенофлуоресцентный анализ с полным внешним отражением), РФА-СИ (рентгенофлуоресцентный анализ с синхротронным излучением) позволяют проводить прямой недеструктивный анализ биологических образцов [62].

Благодаря своей универсальности и возможности проводить многоэлементный анализ РФА-СИ широко используется для количественного и качественного анализа объектов окружающей среды. Количество биологической ткани, предоставляемой для анализа, бывает крайне ограничено (например, в случае биопсии). Метод РФА-СИ позволяет анализировать образцы очень малого объёма и малой массы (до 0.5 мг), а также проводить повторные измерения. Этот метод используется как для определения высокого содержания химических элементов в образцах, так и для определения низких уровней содержания с чувствительностью порядка мкг/г (и ниже) для большинства определяемых элементов.

### *1.2.1. Рентгенофлуоресцентный метод анализа с использованием синхротронного излучения*

Рентгеновское излучение представляет собой один из видов электромагнитного излучения, длины волн которого расположены в области спектра от 0,01 до 10 нм. Согласно квантовым представлениям рентгеновское излучение – это поток фотонов, энергия которых (кэВ) обратно пропорциональна длине волны  $\lambda$  (нм):

$$E = 1.24/\lambda$$

При облучении исследуемого образца первичным рентгеновским излучением возникает два типа вторичного рентгеновского излучения: рассеянное и флуоресцентное. Источниками первичного рентгеновского излучения могут служить:

- 1) рентгеновская трубка;
- 2) радиоактивные изотопы;
- 3) синхротронное излучение [63].

В рентгенофлуоресцентном анализе (РФА) о содержании химических элементов судят по их характеристическому рентгеновскому излучению, которое образуется, когда фотоны первичного (т.е. возбуждающего) рентгенов-

ского излучения выбивают из атомов анализируемого образца внутренние электроны. Вакансия, возникшая в одной из внутренних оболочек атома, заполняется электронами различных подоболочек. Этому соответствует переход атома с уровня большей энергии  $E_1$  начального состояния на уровень меньшей энергии  $E_2$  конечного состояния с одновременным излучением фотона с энергией  $\Delta E_{12}$ :

$$\Delta E_{12} = E_1 - E_2.$$

Все линии спектра, проявляющиеся при таких переходах, образуют одну серию линий, обозначаемую так же, как и оболочка, на которую совершался переход электронов. Относительная интенсивность линий определяется вероятностями соответствующих переходов, которые могут быть вычислены методами квантовой механики [63].

При прохождении через слой анализируемого вещества интенсивность рентгеновского излучения ослабевает за счёт процессов поглощения и рассеяния. При поглощении фотоны передают атому свою энергию и полностью исчезают. При рассеянии фотоны не исчезают, а лишь изменяют направление движения, при этом длина волны рассеянного излучения либо сохраняется (когерентное рассеяние), либо возрастает (некогерентное или комптоновское рассеяние) [63].

В настоящем исследовании использовался метод рентгенофлуоресцентного анализа с синхротронным излучением. Синхротронное излучение (СИ) — это электромагнитное излучение, которое испускается в результате движения релятивистских электронов по круговой орбите в магнитном поле. Интенсивность СИ на несколько порядков превышает интенсивность излучения традиционной рентгеновской трубки. СИ обладает непрерывным гладким спектром в широком диапазоне энергий, линейно поляризовано в плоскости орбиты электронов [64]. Малая угловая расходимость и направленная поляризация СИ открывают следующие возможности для рентгенофлуоресцентного анализа:

- анализ образцов очень малого объёма и малой массы (до 0.5 мг);
- значительное снижение пределов обнаружения;
- проведение анализа с вариацией энергии возбуждающих квантов.

Метод РФА-СИ позволяет проводить неразрушающий одновременный многоэлементный анализ как жидких, так и твердых образцов, определять содержание элементов на уровне мкг/г и ниже [65]. Для него также характерна простая пробоподготовка. Кроме того, данный метод, являясь неразрушающим, позволяет создавать банк данных из имеющихся образцов, что дает возможность анализировать один и тот же образец, меняя условия эксперимента (энергию возбуждения, время измерения).

К недостаткам данного метода следует отнести сложность приготовления тонких образцов, жёсткие требования к измельчению материала и его однородности, а также к выбору подходящих стандартных образцов или образцов сравнения.

Несмотря на общепризнанные достоинства метода РФА-СИ, примеры его использования в элементном анализе образцов биологических тканей относительно ограничены. Это объясняется привязкой метода к источникам синхротронного излучения, что снижает его доступность для проведения широкого круга рутинных исследований. В табл. 2 приведены примеры использования метода РФА-СИ для анализа образцов биологических тканей.

**Концентрации элементов (мкг/г ± SD) в образцах биологических тканей, анализированных методом РФА-СИ**

| Элемент   | Почки [66]  | Предстательная железа [67] | Молочная железа [68] | Сердце [69] |
|-----------|-------------|----------------------------|----------------------|-------------|
| <b>S</b>  | 895 ± 100   |                            |                      | 3380 ± 630  |
| <b>Cl</b> | 450 ± 50    |                            |                      | 840 ± 300   |
| <b>K</b>  | 4960 ± 1240 |                            | 438 ± 321            | 790 ± 220   |
| <b>Ca</b> | 820 ± 220   |                            |                      | 1350 ± 220  |
| <b>V</b>  |             | 7.0 ± 2.0                  |                      |             |
| <b>Cr</b> |             | 5.0 ± 1.0                  |                      | 1.0 ± 0.2   |
| <b>Mn</b> |             | 18.0 ± 3.0                 |                      | 2.4 ± 0.2   |
| <b>Fe</b> | 100 ± 18    | 25.0 ± 2.0                 | 14.1 ± 12.9          | 340 ± 30    |
| <b>Ni</b> |             |                            |                      | 0.4 ± 0.05  |
| <b>Cu</b> | 10 ± 1.8    | 2.0 ± 0.3                  | 0.33 ± 0.32          | 8.9 ± 0.7   |
| <b>Zn</b> | 185 ± 35    | 18.0 ± 3.0                 | 2.9 ± 2.0            | 360 ± 40    |
| <b>Se</b> | 5.9 ± 1.1   | 1.0 ± 0.4                  |                      | 0.7 ± 0.13  |
| <b>Br</b> |             |                            |                      | 12.3 ± 1.6  |
| <b>Rb</b> |             |                            |                      | 1.4 ± 0.2   |
| <b>Sr</b> | 3.1 ± 0.9   |                            |                      | 6.1 ± 0.7   |
| <b>Cd</b> | 180 ± 45    |                            |                      |             |

Особенности СИ и прогрессивные разработки в создании рентгеновской оптики послужили развитию микро-РФА-СИ анализа [70]. В настоящее время метод микро-РФА-СИ широко применяется для локального и сканирующего неdestructивного анализа биологических образцов. С помощью пучка СИ микронных размеров исследуется распределение элементов в патологических участках ткани и даже в отдельных клетках [71, 72]. Данный метод использовался для локального и сканирующего анализа образцов печени [73], мозга [74] и других биологических тканей [75, 76]. В основном в методе микро-РФА-СИ в качестве результатов анализа получают значения относительных интенсивностей линий анализируемых элементов, и переход непосредственно к концентрациям элементов не рассматривается [70].

### **1.3. Аналитические подходы и трудности при исследовании биообъектов методом РФА-СИ**

В задачи количественного рентгенофлуоресцентного анализа входит преобразование измеренных интенсивностей спектральных линий характеристического излучения в концентрации химических элементов, присутствующих в образце. Интенсивность линии характеристического излучения определяемого элемента зависит не только от концентрации данного элемента в образце, но и от других факторов: размер частиц образца, форма поверхности [77-79], содержание химических элементов, которые обуславливают матричные эффекты. Выбор соответствующего способа корректировки измеренной интенсивности и ее последующая связь с концентрацией является сложной задачей, которой традиционно уделяется много внимания [80-83].

Для получения правильных результатов количественного РФА-СИ анализа необходимо учитывать возможные ошибки, которые могут появляться в процессе измерения спектров. Источники СИ работают в циклическом режиме. Это означает, что со временем происходит постепенное снижение тока электронов в накопительном кольце, в результате чего наблюдается систематическое уменьшение интенсивности СИ.

Случайные ошибки в процессе измерения спектров РФА-СИ могут возникать из-за изменения спектральных характеристик возбуждающего излучения, к которым приводит нестабильность орбиты электронного пучка в накопительном кольце [84].

Данные особенности отличают метод РФА-СИ от традиционного РФА анализа с использованием излучения рентгеновской трубки. В РФА-СИ анализе появляется необходимость учета систематических и случайных изменений интенсивности возбуждающего излучения.

### 1.3.1. Учет вариаций интенсивности возбуждающего излучения

Существенные ошибки в процессе количественного рентгенофлуоресцентного анализа могут возникать из-за постепенного падения тока пучка электронов, что является особенностью работы накопительных колец. Постепенные потери электронного пучка происходят вследствие упругого и неупругого рассеяния на электронах и ядрах остаточного газа и внутривпучкового рассеяния (эффект Тушека) [85]. Количественной характеристикой потерь накопленного пучка является время жизни пучка  $\tau_{life}$ , т.е. время, в течение которого накопленное число частиц уменьшается в  $e$  раз [85]:

$$N_e(t) = N_0 \exp - \frac{t}{\tau_{life}} \quad (1)$$

Поток фотонов испускаемого синхротронного излучения с энергией  $E$  ( $\Phi_E$ ) является функцией параметров накопительного кольца и геометрических характеристик:

$$\Phi_E = f(E; W, B, I, \sum y, \Psi, d, a, b), \quad (2)$$

где  $E$  – энергия фотонов,  $W$  – энергия электронов,  $B$  – магнитная индукция,  $I$  – ток пучка электронов,  $\sum y$  – вертикальный размер источника,  $\Psi$  – вертикальный угол испускания;  $d$  – расстояние между источником излучения и апертурной диафрагмой размера  $a \times b$  [86]. Таким образом, интенсивность возбуждающего синхротронного излучения, попадающего на образец, а, следовательно, и интенсивность характеристического излучения определяемых элементов, непосредственно зависит от тока пучка электронов накопительного кольца.

Помимо циклической работы накопительного кольца, на интенсивность возбуждающего излучения в РФА-СИ анализе могут влиять случайные факторы, возникающие из-за особенностей используемого оборудования и свойств СИ. Например, может наблюдаться отклонение орбиты пучка электронов, что приведет к смещению пучка СИ относительно коллиматора. Учитывая

неоднородность распределения интенсивности в поперечном направлении пучка, это приведет к изменению интенсивности излучения, попадающего на образец.

Величину возможных ошибок, возникающих из-за вариаций интенсивности возбуждающего излучения, можно уменьшить с помощью нормировки измеренных спектров. В РФА-СИ анализе часто используется нормировка измеренных рентгенофлуоресцентных спектров на величину тока накопительного кольца и на величину тока ионизационной камеры, находящейся перед образцом [87-92]. В одной из работ предложен способ контроля интенсивности возбуждающего пучка через скорость счета детектора [87]. Была показана линейная зависимость скорости счета детектора от заряда, собранного ионизационной камерой, хотя некоторые результаты выбивались из этой зависимости, что может быть связано с флуктуациями в спектре первичного пучка, не зарегистрированными ионизационной камерой. В работе [88] при проведении микро-РФА-СИ для измерения интенсивности возбуждающего излучения авторы создали компактное устройство на основе Al фольги, принцип действия которого во многом аналогичен действию ионизационной камеры. В другой работе при анализе образцов печени, площади пиков анализируемых элементов были нормированы на площадь пика Ag, который существует только в воздухе в постоянной концентрации и присутствует на всех измеренных спектрах [93].

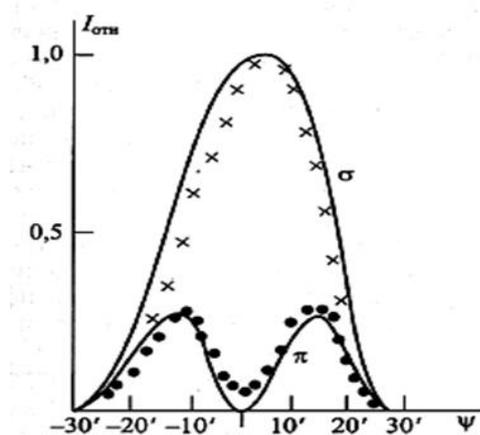
При использовании в РФА внешних стандартов более простым и целесообразным может оказаться проведение анализа в таком режиме, когда спектры исследуемых и стандартных образцов будут измеряться при близких интенсивностях возбуждающего излучения. Например, в работе [94] при исследовании образцов лунного грунта малой массы (1-3 мг) измерение и последующая компьютерная обработка образцов происходила в определенной последовательности, при которой минимизировались ошибки вследствие падения тока. Образцы чередовались таким образом, что спектры стандартных

и исследуемых образцов измерялись при малых отклонениях в токе и интенсивности возбуждающего излучения. Очевидно, что такой способ подходит только для учета систематического падения тока накопительного кольца и не позволяет учесть случайные факторы, влияющие на интенсивность возбуждающего излучения.

Для учета как случайных, так и систематических изменений интенсивности возбуждающего излучения, может использоваться нормировка площади пиков анализируемых элементов на площадь пика элемента, принятого в качестве стандарта. Например, при анализе стекла использовалась нормировка на внутренний стандарт, в качестве которого был выбран Са. Нормировка на внутренний стандарт позволила исключить не только вариации интенсивности пучка СИ, но и устранить ошибки, вызванные различной толщиной исследуемых образцов [95]. В ряде случаев использование нормировки на элемент-внутренний стандарт, добавляемый в пробу в известном количестве, затруднительно, особенно при анализе твердых проб. Это связано с пробоподготовкой образцов, где необходимо добиться гомогенного распределения добавляемого элемента, а также с выбором элемента-внутреннего стандарта, поскольку данный элемент не должен изначально присутствовать в пробах в заметных количествах. В качестве внутреннего стандарта можно использовать пик некогерентно рассеянного излучения, или комптоновский пик, который теоретически соотносится не только с интенсивностью возбуждающего излучения, но и с облучаемой массой образца.

Нормировка площадей пиков линий анализируемых элементов на площадь пика комптоновского рассеяния в основном используется для устранения вариаций толщины и плотности измеряемых образцов с органической матрицей [90-92, 96-98]. В рассмотренных работах нормировка на пик комптоновского рассеяния проводилась после нормировки всех интенсивностей на ток пучка электронов. Использование нормировки на площадь пика комптоновского рассеяния для устранения вариаций интенсивности возбуждаю-

щего излучения сопряжено с трудностями, в основе которых лежит сложная зависимость интенсивности комптоновского рассеяния от характеристик СИ и измеряемой пробы. Одна из таких особенностей – зависимость сечения комптоновского рассеяния от коэффициента поляризации СИ. Компонента линейной поляризации СИ с электрическим вектором, перпендикулярным плоскости орбиты ( $\pi$ -компонента) имеет угловое распределение с минимумом в плоскости орбиты электронов. Компонента с электрическим вектором, параллельным плоскости орбиты ( $\sigma$ -компонента), имеет максимум в плоскости орбиты электронов [99]. Распределение интенсивностей компонент СИ с линейной и перпендикулярной поляризацией показано на рис. 1 [100]:

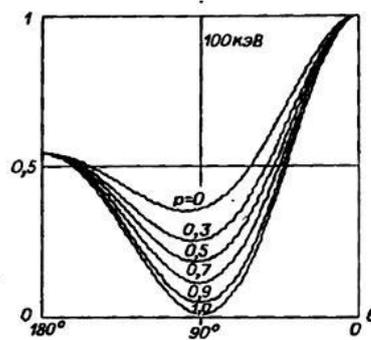


**Рис. 1.** Распределение компонент с линейной ( $\sigma$ ) и перпендикулярной ( $\pi$ ) поляризацией СИ в зависимости от угла наблюдения  $\psi$  с плоскостью орбиты электронов

Коэффициент поляризации СИ определяется соотношением компонент с  $\sigma$ - и  $\pi$ -поляризацией ( $I_\sigma$  и  $I_\pi$ ) в соответствии с формулой [101]:

$$p = \frac{I_\sigma - I_\pi}{I_\sigma + I_\pi} \quad (3)$$

Сечение комптоновского рассеяния при разных коэффициентах поляризации  $p$  в зависимости от угла  $\kappa$  направлению первичного излучения показано на рис. 2 [101]:



**Рис. 2.** Сечение комптоновского рассеяния при разных коэффициентах поляризации  $p$  для энергии 100 кэВ

Из этого следует, что при отклонении положения пучка в вертикальной плоскости меняется коэффициент поляризации излучения (соотношение интенсивностей компонент с перпендикулярной и параллельной поляризацией). Поскольку сечение комптоновского рассеяния напрямую зависит от коэффициента поляризации, интенсивность пика комптоновского рассеяния в регистрируемом спектре будет меняться при случайных отклонениях положения пучка. При этом интенсивность линий характеристического излучения анализируемых элементов останется без изменений.

Таким образом, при нормировке измеренных спектров на площадь пика комптоновского рассеяния в РФА-СИ анализе необходимо учитывать возникновение возможных случайных ошибок, возникающих из-за нестабильности положения пучка. Частота возникновения подобных флуктуаций зависит от качества и надежности системы стабилизации пучка СИ, которая используется на накопительном кольце.

Выбор оптимального способа нормировки для учета систематических и случайных изменений интенсивности возбуждающего излучения не является универсальным и должен основываться на особенностях конкретной станции РФА-СИ анализа. Экспериментальные станции на источниках синхротронного излучения, представляющие собой комплекс приборов, зачастую являются уникальными. Это обусловлено сочетанием характеристик используемого оборудования и геометрии измерений, к тому же экспериментальные станции

подвергаются модернизации и модификации различных сегментов. Поэтому исследования, направленные на поиск оптимальной методики измерений в условиях конкретной станции (и после каждой её модернизации) являются необходимыми и важными.

### *1.3.2. Способ внешнего стандарта в анализе биологических объектов*

Интенсивность флуоресцентного излучения зависит не только от концентрации элемента, но и от общего химического состава образца, что усложняет проведение количественного анализа. Матричные эффекты в РФА, влияющие на интенсивность измеряемой линии, включают поглощение первичного (возбуждающего) и характеристического излучения элементами матрицы, подвозбуждение анализируемого элемента, а также рассеяние излучения компонентами образца. Относительный вклад и степень указанных влияний варьируется в зависимости от вида образца и анализируемых элементов, поэтому выбор оптимального способа расчета измеренной интенсивности является сложной, многосторонней задачей, и зависит от химического состава пробы, а также от требований, предъявляемых к воспроизводимости и правильности результатов анализа. Преобразование измеренных интенсивностей характеристического излучения элементов в концентрации может проводиться по способу внутреннего стандарта, внешнего стандарта или с использованием различных уравнений связи.

Способ внутреннего стандарта подразумевает добавление к анализируемому образцу известного количества не содержащегося в нем элемента. Искомая концентрация рассчитывается с помощью соотношения интенсивностей анализируемого элемента и элемента-внутреннего стандарта. Однако в данном расчете необходимо знать коэффициент – отношение коэффициентов спектрометрической чувствительности для элемента сравнения и анализируемого элемента. Данный коэффициент находится с помощью образцов с известным содержанием обоих элементов. При выборе внутреннего стандарта, нужно стремиться к тому, чтобы различия краев поглощения и длин волн ха-

рактического излучения стандартного и анализируемого элемента было минимальным, а также, чтобы между их длинами волн не находились края поглощения других элементов [102]. В связи с этим использование внутреннего стандарта при проведении многоэлементного анализа образцов сложного состава становится малоприменимым. Также этот способ трудновыполним на практике, учитывая высокие требования к однородности образцов, и, как правило, его применение сводится к анализу жидкостей [103].

Следующие способы количественного РФА основаны на применении физических и математических моделей формирования аналитического сигнала. Сюда относятся метод фундаментальных параметров, метод альфа-коррекции и др. Метод фундаментальных параметров использует теоретическое выражение для интенсивности излучения анализируемого элемента с учетом физических констант, особенностей системы детектирования и влияния матричных элементов. Главное достоинство данного метода состоит в том, что он позволяет получить количественный результат без использования стандартных образцов анализируемого материала. Этот метод широко используется в современном РФА, в том числе и для анализа объектов биологического происхождения [104-106]. Однако данный метод нуждается в калибровке по спектрам чистых анализируемых элементов, либо, если есть такая возможность, в калибровке по спектру стандартного образца (образца сравнения) очень близкого по элементному составу к анализируемому объекту. В случае калибровки по стандартному образцу точность метода существенно улучшается по сравнению с калибровкой по спектрам чистых элементов [107, 108].

Если имеются подходящие стандартные образцы для калибровки, иногда более предпочтительным может оказаться метод альфа-коррекции. Этот метод учитывает матричные эффекты посредством коэффициентов влияния, которые можно определить теоретически (с использованием различных математических алгоритмов) [109] или эмпирически (используя регрессионный

анализ) [103]. Данные методы перспективны, но требуют применения очень сложного математического аппарата и глубоких знаний о составе и свойствах анализируемого вещества. К тому же приближенность используемых моделей и неопределенность в значениях физических констант могут ограничить применение данных методов и снизить точность анализа.

Многоэлементный анализ сложных, многокомпонентных образцов часто проводится по способу внешнего стандарта. При выборе образца сравнения необходимо учитывать возможное влияние матричных эффектов на интенсивность линии анализируемого элемента, как в исследуемом образце, так и в образце сравнения. При анализе образцов с легкой матрицей, эффект поглощения первичного и флуоресцентного излучения будет гораздо более существенным, по сравнению с эффектами подвозбуждения, рассеяния и эффектами, вызванными различием в размерах частиц исследуемого материала [110]. Данный вывод подтверждается результатами работы [111], где для образцов сухого молока были рассчитаны относительные вклады доминирующих матричных эффектов. Доля эффекта поглощения флуоресцентного излучения относительно эффектов подвозбуждения характеристическим и рассеянным излучением для элементов с атомными номерами 13 – 38 составила от 98,6 до 80,3 %. Чтобы пренебречь эффектом поглощения флуоресцентного излучения, необходимо приготовить образец таким образом, чтобы его толщина не превышала «тонкий слой» для анализируемого элемента. В этом случае матричные эффекты, влияющие на интенсивность характеристического излучения аналитической линии, будут несущественны. Иными словами интенсивность характеристического излучения будет линейно зависеть от концентрации анализируемого элемента [112]. Даже при работе с образцами биологического происхождения, которые имеют относительно легкую матрицу, сложно удовлетворить критерию «тонкого слоя» для всех анализируемых элементов. Например, для стандартного образца цельной крови толщина «тонкого слоя» в 10 % приближении для калия ( $E_{K\alpha} = 3.31$  кэВ) и кальция ( $E_{K\alpha} = 3.69$  кэВ) составляет всего 10 -15 мкм. Изготовить образец такой тол-

щины из сухого порошкообразного материала технически довольно трудно, если вообще возможно. Тогда, при анализе более толстых образцов, удовлетворяющих критериям «толстого» и «промежуточного слоя» для анализируемых элементов, необходимо, чтобы образец сравнения полностью соответствовал анализируемому образцу по своим поглощающим, рассеивающим свойствам и геометрии. Это требование существенно ограничивает количество образцов сравнения, пригодных для построения надежных калибровочных кривых, особенно в случае сильных вариаций элементного состава анализируемых объектов [112].

Методом РФА определяют элементный состав самых разнообразных материалов: образцов горных пород, металлических сплавов, биологических веществ, синтетических материалов и др., при этом набор имеющихся образцов сравнения, в том числе аттестованных стандартных образцов, ограничен. Далеко не всегда удается найти стандартный образец с аттестованными концентрациями интересующих элементов и матрицей, идентичной матрице анализируемого образца. В этом случае возникает вопрос о правомерности использования образца сравнения, если его матрица не является полностью идентичной матрице анализируемого объекта. Знание поглощающих и рассеивающих свойств стандартных и исследуемых образцов необходимо для уверенного выбора образцов сравнения и расширяет круг стандартных образцов, пригодных для анализа.

Снижение интенсивности характеристического излучения в результате процессов поглощения и рассеяния в материале образца описывается массовым коэффициентом ослабления. При прохождении рентгеновского излучения через образец плотности  $\rho$ , массовый коэффициент ослабления можно определить из следующего выражения:

$$I = I_0 e^{-\mu_m d}, \quad (4)$$

где  $I_0$  – исходная интенсивность фотонов с энергией  $E$ , падающих на образец;  $I$  – интенсивность фотонов с энергией  $E$  после прохождения через обра-

зец;  $\mu_m = \mu/\rho$  (см<sup>2</sup>/г) – массовый коэффициент ослабления, и  $d$  (г/см<sup>2</sup>) – поверхностная плотность образца. Значение  $\mu_m$  для многоэлементных веществ является суммой значений  $\mu_{mi}$  для каждого составляющего элемента:

$$\mu_m = \sum_i \omega_i(\mu_{mi}), \quad (5)$$

где  $\omega_i$  – массовая доля элемента  $i$ , а  $\mu_{mi}$  – массовый коэффициент ослабления излучения в элементе  $i$  [113].

В методе РФА-СИ поправка на поглощение часто осуществляется путем нормирования интенсивностей пиков характеристического излучения на интенсивность пика некогерентно рассеянного (комптоновского) излучения. Допущения, позволяющие использовать данный способ, изложены в работе [96]:

- возбуждающее излучение должно быть монохроматичным;
- интенсивность комптоновского рассеяния должна быть независима от концентрации анализируемого элемента, что обычно является случаем анализа тяжелых элементов в легкой матрице (например, состоящей из С, N, О и Н);
- интенсивность линии комптоновского рассеяния линейно соотносится с обратными значениями массовых коэффициентов поглощения для длины волны линий анализируемого элемента и для длины волны комптоновского рассеяния.

Известно, что сечение комптоновского рассеяния зависит от эффективного атомного номера  $Z_{eff}$  анализируемого материала. Было показано, что для чистых элементов с атомными номерами  $Z = 22-92$  соотношение интенсивностей когерентно и некогерентно рассеянного излучения медленно возрастает в диапазоне малых и средних  $Z$  и быстро увеличивается в области высоких  $Z$  [113]. Использование нормировки на комптоновское рассеяние для уменьшения различий в ослабляющих свойствах исследуемых матриц не является столь однозначным, поскольку на интенсивность пика комптоновского рас-

сеяния помимо эффективного атомного номера анализируемой матрицы влияют толщина образца, интенсивность возбуждающего излучения, размер частиц исследуемой пробы [103]. Этот способ корректировки давал хорошие результаты при использовании в качестве образцов сравнения материалы, близкие по составу к анализируемым [82, 103, 114].

В методах РФА и РФА-СИ в качестве образцов сравнения могут использоваться международные и государственные стандартные образцы или другие вещества с известным содержанием анализируемых элементов. В основном, используются образцы сравнения, которые имеют ту же природу происхождения, что и анализируемые объекты. Например, образцы почвы и фитомассы анализировались с использованием международных стандартных образцов фитомассы травы, золы биологических веществ и песчаной почвы [115-117]; анализ разных частей лекарственных растений (корневище, стебель, листья, цветки) проводился с использованием стандартных образцов клубней картофеля, злаковой травосмеси, зерен пшеницы, веток кустарника, веток и листьев тополя, листьев чая. Для анализа образцов почвы использовали стандартные образцы почв, донных осадков, илов, рыхлых отложений [118]. Для анализа образцов резины в качестве образцов сравнения использовались образцы резины с известными концентрациями определяемых элементов [119], а для анализа образцов картофельного крахмала использовались образцы сравнения, которые представляли собой образцы крахмала с известным содержанием анализируемых элементов [120]. В другой работе для анализа порошка из соевых бобов использовались стандартные образцы пшеничной и рисовой муки, листьев шпината, яблоки и томата [107].

Иногда используются образцы сравнения, которые имеют иную природу происхождения, нежели анализируемый объект, но матричный состав которых близок к матричному составу анализируемого образца. Так, например, для анализа порошка из семян кумина использовались международные стандартные образцы обезжиренного сухого молока. Авторы утверждают, что

пригодность данных стандартных образцов для анализа семян кумина была доказана ими ранее [121]. В работе [122] анализировались образцы кости, и в качестве образца сравнения был выбран стандартный образец осадочной горной породы – фосфорита. Чтобы приблизить свойства стандартного образца к свойствам костной ткани, он был разбавлен наполовину порошком поливинилового спирта.

Учитывая, что растительные и животные ткани на 98 % состоят из таких элементов, как Н, С, N и О [103, 122], для их анализа становится возможным изготовить искусственные образцы сравнения из растворов с известными концентрациями чистых элементов и органических материалов, например целлюлозы. С использованием образцов сравнения, приготовленных из целлюлозы, проводился анализ образцов мозга [74], меда [124], тканей миомы матки [106], растительных материалов [125]. Однако в данных работах исследуемые образцы подвергались методам озоления, и минеральный остаток образцов смешивался с целлюлозой, поэтому исследуемые образцы были идентичны образцам сравнения по своей матрице. Интересный вариант изготовления образцов сравнения предложен в работе [126]: для анализа стандартных образцов обезжиренного сухого молока, рисовой муки, пшеничной муки, волоса и лиофилизированной сыворотки крови (не подвергавшихся озолению) были изготовлены образцы сравнения, путем осаждения водных растворов анализируемых элементов на тефлоновых фильтрах. Принималось, что поглощающие свойства исследуемых биологических матриц идентичны свойствам углеводородной матрицы с соотношением водорода и углерода 2:1. Чтобы убедиться в этом, для некоторых образцов экспериментально определялся массовый коэффициент ослабления путем пропускания излучения через образцы. Не совсем обычный способ внешнего стандарта описан в работе [127]: свежемороженые образцы тканей молочной железы не подвергались никакой обработке перед анализом, а в качестве образцов сравнения использовались водные растворы определяемых элементов. При этом дополнительно проводились сложные эксперименты с использованием ди-

фракционных методов для моделирования фона рассеяния от образцов исследуемой биологической ткани и его последующего совмещения со спектрами водных растворов анализируемых элементов.

Таким образом, в некоторых случаях анализ биологических материалов может проводиться с использованием образцов сравнения, которые имеют иную природу происхождения, нежели исследуемый объект. Например, анализ растительных образцов с использованием образцов сравнения из сухого молока [121] или из тефлона [126]. То же самое утверждается в работе [82] где говорится, что можно получить отличные количественные результаты, например, при использовании стандарта листьев или печени для многоэлементного анализа большинства пищевых, растительных и животных материалов. Однако в этой же работе авторы отмечают риск такого подхода, который заключается в слишком опрометчивом и поспешном принятии данного положения для широкого круга образцов, некоторые из которых могут действительно иметь существенные различия в своих поглощающих и рассеивающих свойствах [83]. В работе [111] показано, что ошибка, возникающая при несоответствии матриц исследуемых образцов (в данном случае растительных материалов и сухого молока) может достигать 13 %, что существенно превышает величины погрешностей воспроизводимости результатов измерений, и соответственно, требует соответствующих процедур корректировки измеренной интенсивности.

Отсюда следует, что информация о поглощающих и рассеивающих свойствах различных матриц необходима для уверенного и обоснованного выбора соответствующего стандартного образца (либо образца сравнения). А зная численные значения массовых коэффициентов ослабления для анализируемого образца и образца сравнения, становится возможным скорректировать измеренные интенсивности аналитических линий даже в том случае, когда поглощающие характеристики исследуемых и стандартных образцов существенно различаются. Благодаря этому можно вовлекать в анализ большее

количество стандартных образцов, и, тем самым, расширить круг элементов, определяемых количественно.

Способом внешнего стандарта с поправками на поглощение можно анализировать материалы разнообразного химического состава, в которых отсутствуют элементы, вызывающие эффекты избирательного подвозбуждения анализируемых элементов. Если на образец толщиной  $d$  и с концентрацией анализируемого элемента А, равной  $C_A$ , падает монохроматическое излучение под углом  $\theta_0$ , то интенсивность линии флуоресцентного излучения элемента А, выходящего из образца под углом  $\theta_A$ , определяется по формуле:

$$I_A = K \frac{C_A}{\frac{\mu_0}{\sin\theta_0} + \frac{\mu_A}{\sin\theta_A}} \left( 1 - \exp -d \left( \frac{\mu_0}{\sin\theta_0} + \frac{\mu_A}{\sin\theta_A} \right) \right) \quad (6)$$

где  $\mu_0$  и  $\mu_A$  – коэффициенты ослабления для первичного и флуоресцентного излучения соответственно,  $K$  – коэффициент, включающий ряд физических констант для анализируемого элемента и параметры измерений [102]. Если на одном и том же приборе и в одинаковых условиях измеряют спектр образца с концентрацией элемента А равной  $C_x^A$  и образца сравнения с концентрацией элемента А равной  $C_{st}^A$ , то отношение интенсивностей аналитических линий пробы ( $I_x$ ) и образца сравнения ( $I_{st}$ ) примет вид:

$$\frac{I_x}{I_{st}} = \frac{C_x^A}{C_{st}^A} \cdot \frac{d_x^*}{d_{st}^*}, \quad (7)$$

$$\text{где } d^* = \frac{1 - \exp -d \left( \frac{\mu_0}{\sin\theta_0} + \frac{\mu_i}{\sin\theta_i} \right)}{\frac{\mu_0}{\sin\theta_0} + \frac{\mu_i}{\sin\theta_i}} \quad (8)$$

определяется для исследуемого ( $d_x^*$ ) и стандартного ( $d_{st}^*$ ) образца. Параметр  $d^*$ , представляющий собой толщину фактически излучающего слоя для каждого элемента в матрицах стандартного и исследуемого образца, далее по тексту упоминается как поправка на поглощение.

Возможность проведения РФА анализа по способу внешнего стандарта с поправкой на поглощение упоминается в пособии [102]. Результаты, полученные в работе [128] подтверждают эффективность применения способа

внешнего стандарта с поправкой на поглощение при анализе образцов растительного материала различного происхождения. К сожалению, нам не удалось найти других работ, где бы на практике использовался РФА анализ по способу внешнего стандарта с поправкой на поглощение.

### *1.3.3. Массовые коэффициенты ослабления рентгеновского излучения в различных материалах и способы их измерения*

Для проведения РФА анализа по способу внешнего стандарта с поправкой на поглощение, в соответствии с формулами (7) и (8), требуется знание массовых коэффициентов ослабления рентгеновского излучения в исследуемых материалах.

Значения массовых коэффициентов ослабления рентгеновских лучей используются во многих фундаментальных и прикладных областях науки. Знание данных коэффициентов требуется в ядерной и радиационной физике, дозиметрии, в биологических и медицинских исследованиях. Благодаря этому, существует большое число работ, посвященных экспериментальным и теоретическим расчетам массового коэффициента ослабления. Обычно массовый коэффициент ослабления определяют экспериментально, пропуская излучения через слой образца (урав. 4). В работе [129] перечислены требования и условия для корректного определения массового коэффициента ослабления. Образец должен иметь однородную толщину и плотность, а пучки излучения, регистрируемые на входе и выходе из образца должны быть коллимированы, монохроматичны и совпадать по направлению. В данной работе определены массовые коэффициенты ослабления для чистых элементов с атомными номерами  $Z = 6 - 15$ . В других работах также приводятся измеренные значения массовых коэффициентов ослабления для чистых элементов и их соединений при различных энергиях возбуждения [130-132]. В литературе можно найти данные по определению массовых коэффициентов ослабления рентгеновских лучей в таких материалах, как парафин, гипс, органические красители [133], полупроводниковые и сверхпроводниковые ма-

териалы [134], биологические ткани [135], роговица глаза и контактные линзы [133]. Помимо прямых методов измерения массовых коэффициентов ослабления пропусканием излучения через образец, имеются работы, где поглощающие характеристики образцов оцениваются косвенным образом. Например, известна эмпирическая связь между массовым коэффициентом ослабления рентгеновских фотонов с энергией  $E$  и атомным номером элемента  $Z$  (или эффективным атомным номером многокомпонентного вещества) [136]:

$$\mu(Z, E) = a(Z, E)Z^{b(Z, E)} \quad (9)$$

В работе [137] с помощью соотношения интенсивностей когерентно и некогерентно рассеянного излучения, а также других параметров, рассчитывались эффективные атомные номера ( $Z_{eff}$ ) для некоторых химических соединений и органических веществ. На основе измеренных  $Z_{eff}$  с помощью специальных компьютерных программ рассчитывались массовые коэффициенты ослабления анализируемых материалов. Полученные значения имели расхождения с экспериментальными (полученными путем пропускания излучения через образцы) вплоть до 16 %. Интересный метод для оценки поглощающих характеристик образцов биологического происхождения предложен в работе [82]. Авторы создали компьютерную программу, где расчет проводится методом итераций, и используется допущение, что матрица исследуемого образца состоит из двух элементов, которые наилучшим образом отражают ее свойства. Также для реализации данных расчетов необходимо знать интенсивности пиков когерентно и некогерентно рассеянного излучения, измеренных от тонких пленок исследуемых элементов.

В методе РФА массовые коэффициенты ослабления могут использоваться не только для корректировки измеренных интенсивностей линий характеристического излучения. С их помощью исследуются процессы взаимодействия излучения с веществом, необходимые для детального понимания механизмов данного метода анализа и его эффективного применения на

практике. Сделаны попытки установить соотношение между массовым коэффициентом ослабления ( $\mu_m$ ) и сечениями упругого ( $\sigma_c$ ) и неупругого рассеяния ( $\sigma_i$ ) рентгеновских лучей в веществе:

$$\mu_m = K_1(\sigma_c/\sigma_i)K_2, \quad (10)$$

где  $K_1 = 1,95$  для элементов с  $Z < 44$ ;  $K_1 = 0,28$  для элементов с  $Z > 43$ ; и  $K_2 = 1,675$  для всех элементов с  $Z > 4$  [138]. На основе измеренных массовых коэффициентов ослабления рассчитывались относительные вклады фотоэлектрического поглощения, Комптоновского и Рэлеевского рассеяния в серебряной фольге разной толщины в диапазоне энергий 15-50 кэВ [139]. В работе [134] для металлов Ti, Ni и их сплавов были определены массовые коэффициенты ослабления, и с их помощью рассчитаны атомные и электронные сечения, эффективный атомный и электронный номер исследуемых веществ при разных энергиях.

Учитывая имеющиеся данные по измерению массовых коэффициентов ослабления для чистых элементов, доступные в справочных материалах и базах данных, становится возможным рассчитать теоретические массовые коэффициенты ослабления для смесей и соединений с известным элементным составом. Опираясь на имеющиеся теоретические и полуэмпирические данные, А.Л. Финкельштейн и др. предложили вычислительные схемы для расчёта коэффициентов поглощения и рассеяния в области энергий рентгеновского излучения 0.1-100 кэВ для элементов с атомными номерами  $Z=1-92$  [140]. В работе [134] массовые коэффициенты ослабления для Ti, Ni и их сплавов были рассчитаны экспериментально (пропусканием излучения через образцы) и теоретически, с помощью программы WinXCom (модификация программы XCOM, созданной Berger и Hubbell в 1987 г.), которая широко используется для расчета коэффициентов ослабления и сечений взаимодействия рентгеновских лучей в веществах и смесях [141]. Результаты работы показали, что экспериментальные значения массового коэффициента ослабления почти для всех сплавов оказались меньше, чем их теоретические зна-

чения, рассчитанные по программе WinXCom. По мнению авторов, эти расхождения могут быть вызваны окислением на поверхности образцов, а также возникать вследствие особенностей эксперимента, возможных ошибок счета и т.д. Наряду с этим, в общую погрешность измеренных коэффициентов вносит вклад погрешность определения площадей пиков интенсивностей излучения до и после ослабления и погрешность измерения поверхностной плотности образцов. Нужно отметить, что и в других работах также наблюдались расхождения между экспериментальными и теоретическими данными. В работе [142] был измерен и рассчитан теоретически по программе WinXCom массовый коэффициент ослабления для глюкозы и ее изомеров при энергиях от 8 до 32 кэВ. Теоретически рассчитанные коэффициенты при высоких энергиях совпадали с экспериментальными значениями, а при низких энергиях расхождение между теоретическими и экспериментальными значениями составляло около 5%. В другой работе были измерены и рассчитаны по программе XCOM массовые коэффициенты ослабления для Ti, V, Fe, Co, Ni, Cu и Zn в диапазоне энергий 3,8 - 11 кэВ. Почти для всех исследуемых элементов на некоторых участках энергетического диапазона наблюдались расхождения между экспериментальными и теоретическими значениями в пределах 5 % [143]. При исследовании более сложных образцов, таких как растительные материалы, расхождение между теоретическими и экспериментальными значениями массовых коэффициентов ослабления достигало 16 % [144]. Таким образом, теоретический расчет массовых коэффициентов ослабления с помощью таблиц или специальных компьютерных программ представляет особые трудности при исследовании многокомпонентных веществ, таких как горные породы, почва и др., точный состав которых не известен.

Из имеющихся литературных данных видно, что определению массовых коэффициентов ослабления рентгеновских лучей в различных материалах уделяется много внимания. Из рассмотренных способов наиболее точным и простым представляется прямой метод определения массовых коэф-

фициентов ослабления, основанный на измерении интенсивностей рентгеновского излучения до и после прохождения через образец.

В методе РФА, какой бы способ количественного расчета ни использовался, оценка степени ослабления рентгеновских лучей в анализируемом образце является ключевым фактором, который во многом определяет получение достоверных количественных данных. При использовании способа внешнего стандарта знание поглощающих и рассеивающих характеристик исследуемого материала необходимо для выбора подходящих образцов сравнения, а с помощью известных значений массовых коэффициентов ослабления становится возможным скорректировать измеренную интенсивность характеристического излучения и использовать для количественных расчетов образцы сравнения, поглощающие характеристики которых отличаются от характеристик исследуемой пробы. Это может расширить круг анализируемых объектов и число элементов, определяемых количественно.

#### **1.4. Влияние фиксации в растворе формалина на элементный состав образцов биологических тканей**

Для получения достоверной количественной информации о концентрациях микроэлементов, содержащихся в биологической ткани, необходимо еще на стадии пробоотбора образцов исключить все возможные ошибки. Биоптаты тканей, отобранные во время операции или при вскрытии (аутопсии), помещаются в различного рода фиксаторы, подвергаются заморозке или сублимации. Сублимирование ткани может привести к потере или улетучиванию таких элементов, как Hg и Se [145, 146]. Химическая фиксация связана с использованием специальных химических фиксаторов – соединений, приводящих к быстрой остановке биохимических процессов в тканях и клетках, после извлечения их из организмов и органов. Извлеченные образцы тканей и органов человека используются для проведения клинических исследований. Одними из самых распространенных химических фиксаторов, позволяющих сохранить морфологию ткани для проведения гистологических и дру-

гих медицинских исследований, являются растворы на основе формалина [147]. Они препятствуют деятельности ферментов, подавляют размножение бактерий и плесени, приостанавливают обменные процессы. Фиксирующее действие формальдегида связано с его реакцией с тканевыми белками. Формальдегид вступает в реакцию с атомом водорода белка с образованием метиленового мостика. Реакция протекает в две стадии: (а) – образование промежуточного оксиметильного соединения; (б) – образование метиленового мостика между двумя молекулами белка.



С углеводами формальдегид не взаимодействует, стабилизация гликогена в ткани связана с влиянием формалина на белки, окружающие гликоген [147].

При анализе микроэлементного состава биологической ткани очень важно, чтобы фиксирование и хранение образцов существенно не изменяло концентрации определяемых микроэлементов. Необходимо учитывать возможность изменения концентраций микроэлементов в исследуемой ткани, как из-за их потери, так и из-за внешнего загрязнения во время фиксации и хранения. Выбор способа фиксации ткани и длительность хранения фиксированных образцов, является одним из решающих факторов для получения данных о качественном и количественном микроэлементном составе исследуемых тканей.

Существует относительно мало работ по изучению временных изменений содержания элементов в тканях, хранящихся в растворе формалина. Некоторые исследователи сообщают, что хранение в формалине не оказывает влияния на концентрации элементов в тканях [148-150]. Другие приходят к выводу, что образцы, хранившиеся в формалине, не пригодны для анализов, поскольку концентрации всех определяемых элементов оказываются значительно ниже, чем в свежих тканях [151-156]. Возможно, причины данных расхождений обусловлены особенностями проводимых экспериментов, та-

кими как тип исследуемой биологической ткани, масса образца, срок фиксации. В работе Valerie J. Bush и др. [148] определялось содержание токсических (Al, As, Cd, Hg, Mn, Pb) и эссенциальных (Ca, Cu, Fe, Mg, Zn) элементов в образцах тканей из различных органов (кора головного мозга, почки, печень, сердце, скелетные мышцы и кости). Масса каждого образца составляла не менее 5 г. Каждый образец ткани был разрезан на две части. Одна часть была сразу же проанализирована, а другая фиксировалась в растворе формалина 1 неделю. В результате не было обнаружено значимых различий между величинами концентраций в свежих образцах и фиксированных в растворе формалина в течение одной недели. В этой же работе сообщается, что было обнаружено существенное уменьшение содержания Mn и Al в тканях, хранящихся в растворе формалина более шести месяцев. Этому противоречат результаты работы Meldrum RD и др. [157], где сообщается, что концентрация Al и Co в фиксированных образцах ткани уменьшается уже через 10 дней.

Изменения элементного состава в результате фиксации в растворе формалина наиболее часто исследуются в образцах печени и почек, при этом в большинстве случаев сроки фиксации составляют несколько месяцев. Quan и др. [152] обнаружили, что после 4,5 месяцев хранения в формалине, значительно уменьшается содержание меди в образцах печени. John M и др. [155] определяли и сравнивали содержание селена в свежих, замороженных и фиксированных в формалине (от 2 до 28 дней) образцах печени. Между величинами концентраций в свежих и замороженных образцах различий не было. Средняя концентрация селена в формалин-фиксированных образцах составляла около 86% от средней концентрации Se в свежей и замороженной печени. В работе Koizumi N и др. [158] сравнивалось содержание Cd, Zn, Cu и Fe в свежих образцах почек и печени и в образцах, фиксированных в растворе формалина на протяжении  $18,8 \pm 4,3$  месяца. Содержание Cd, Zn, Cu и Fe во всех фиксированных образцах было уменьшено. Целью исследования A. N. Namir и др. [156], было определение изменения концентрации свинца в пе-

чени и почках в результате фиксации в растворе формалина. Фиксированные образцы анализировались после 1 и 16 месяцев фиксации. Результаты показали, что содержание свинца в формалин-фиксированных образцах почек и печени оказалось ниже, по сравнению с содержанием в замороженных тканях.

Интересные результаты получены в работе Sato I и др. [154], где сравнивалось содержание девяти элементов в образцах печени и почек до и после фиксации в растворе формалина. Размер каждого образца составлял приблизительно  $1 \times 1 \times 2 \text{ см}^3$ . После одного года хранения, поверхность (слой 3 мм) у хранившихся образцов была удалена, и концентрации Na, P, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Se анализировались во внутренней части образцов. Авторы пришли к выводу, что образцы, хранившиеся в нейтральном растворе формалина, могут быть пригодны для определения концентраций Fe, Cu, Zn и Se, при условии, что образцы достаточно большие, чтобы удалить их поверхность. Достоверное определение концентраций других элементов не возможно, поскольку их диффузия или инфильтрация происходят даже в глубоких слоях ткани.

Работы, где влияние фиксации в растворе формалина изучалось для других биологических тканей, очень ограничены. Gellein K и др. [151] определяли содержание 19 элементов в формалине, в котором образцы мозга хранились от 12 недель до нескольких лет. Было показано, что степень выщелачивания значительно варьирует между различными элементами. Величины концентрации As, Cd, Mg, Rb и Sb в формалине, в котором образцы человеческого мозга хранились в течение нескольких лет, были более чем в 100 раз выше, чем в свежем формалине. Для Cr и Ni выщелачивание было незначительным, а для эссенциальных элементов: Fe, Zn и Cu результаты были промежуточными. Также в этой работе было показано, что выщелачивание не является простой функцией от концентрации элемента: некоторые элементы, находящиеся в ткани в большом количестве, выщелачивались в малой степе-

ни, тогда как другие, присутствующие в относительно низких концентрациях, легко переходили в раствор. Авторы предположили, что подобные различия могли быть вызваны силой и способом связывания различных элементов в ткани. Например, металлы Ag, Hg, Ni и Pb, которые, как известно, сильно связаны с сульфгидрильными группами (широко присутствующими в белках), выщелачивались из ткани в формалин в меньшей степени, чем большинство других элементов. Hendrickx и др. [153] установили, что 14-дневное хранение в формалине значительно уменьшило (до 40%) содержание Cu в трех видах мокриц. Seemann J и др. [150] изучали содержание Cr и Ni в тканях легких, хранящихся в формалине, и обнаружили очень малое выщелачивание этих элементов в формалин. Boskey AL и др. [149] изучали воздействие фиксации в формалине на соотношение Ca/PO<sub>4</sub> в костной ткани. Образцы хранились в растворе формалина 3 или 11 суток. Данное соотношение не изменилось при краткой (3 дня) и продолжительной (11 дней) фиксации в растворе формалина. Chua-anusorn W и др. [159] определяли изменение содержания Fe в образцах селезенки (образцы объемом  $\approx 1,5 \text{ см}^3$ ), хранящихся в растворе формалина на протяжении 200 дней. В первые 60 дней железо выщелачивалось постоянно из ткани, пока потеря не составила 3%. После этого не было замечено дальнейшего снижения концентрации.

В большинстве рассмотренных работ сроки фиксации очень длительные и составляют несколько месяцев [151, 152, 154, 156, 158, 159], при этом анализируются либо целые органы, либо образцы с массой на уровне нескольких грамм. Также во многих работах внимание уделяется лишь одному-двум элементам [149, 150, 153, 155-157, 159]. Результаты большинства работ говорят о том, что при хранении образцов биологических тканей в растворе формалина более одной недели происходит значительное уменьшение концентраций большинства микроэлементов в ткани.

Патологические изменения (особенно на ранней стадии развития) часто затрагивают очень незначительные площади исследуемых тканей, соответ-

ственно, количество материала, предоставляемого для анализа, резко ограничено. В литературе не было найдено работ, где бы анализировались образцы массой в несколько миллиграмм при сроках фиксации менее одной недели. Такими образцами являются не только операционный и биопсийный материал, отобранный при жизни человека, а также фрагменты органов мелких экспериментальных животных. Масса данных образцов биологической ткани составляет от 10 до 0,5 мг, а временной интервал от пробоотбора до пробоподготовки может составлять всего несколько часов или суток. Перед проведением элементного анализа таких образцов, также необходимо знать, какие элементы, когда и в каком количестве могли перейти из ткани в раствор формалина.

## ЗАДАЧИ И НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Обзор литературы показал наличие высокого интереса к изучению изменений элементного состава различных органов при развитии в организме патологических процессов. Исследование метаболизма микроэлементов, которые являются функциональной и структурной основой ферментов, гормонов, витаминов и других жизненно важных соединений позволит лучше понять механизмы возникновения заболеваний, целенаправленно планировать дальнейшие исследования и лечение. Многочисленные литературные данные подчеркивают сложность взаимодействия микроэлементов в организме, когда обмен одного микроэлемента регулируется другими, связанными с ним метаболически. В связи с этим возрастает необходимость исследовать не только валовое содержание элемента в организме, но и его количественные соотношения с другими элементами. Это подтверждают наиболее поздние исследования, где внимание акцентируется на выявлении корреляционных связей между концентрациями микроэлементов в организме [23-26, 28-32, 34]. Особый интерес представляет выявление межэлементных связей непосредственно в тканях организма, обладающих выраженной метаболической активностью.

Метод РФА-СИ обладает достаточной чувствительностью и рядом преимуществ, которые обуславливают его широкое применение в элементном анализе биологических объектов. Использование СИ в качестве источника возбуждения позволяет анализировать образцы биологических тканей массой в несколько миллиграмм. Также для данного метода не требуется разложение образцов и переводение анализируемых элементов в раствор. Являясь неразрушающим методом, метод РФА-СИ позволяет анализировать один и тот же образец много раз, варьируя энергию возбуждения, время анализа и другие параметры для достижения наиболее оптимальных результатов измерений. Применение СИ в качестве источника возбуждения вносит в анализ ряд особенностей, которые необходимо учитывать. Сюда относятся снижение интенсивности возбуждающего излучения во время измерений в результате циклической работы накопительного кольца, а также зависимость сечения комптоновского рассеяния от степени поляризации СИ и некоторые другие. В связи с этим возникает проблема нормировки рентгенофлуоресцентных спектров для учета всех возможных погрешностей, обусловленных особенностями используемой системы. Следует отметить, что экспериментальная станция элементного анализа на базе накопительного кольца ВЭПП-3 (Институт ядерной физики им.Г.И.Будкера СО РАН) не имеет аналогов в России. Уникальность экспериментальных станций на специализированных источниках СИ обусловлена специфичностью комплекса используемого оборудования и геометрии. При проведении исследований необходимо учитывать особенности конкретной станции, в частности возникновение возможных случайных ошибок из-за нестабильности положения пучка, которые приводят к изменению характеристик измеряемых спектров.

В методе РФА-СИ самым простым способом определения концентраций химических элементов является использование внешних стандартов. Для применения способа внешнего стандарта необходимым условием является подобие матриц и близость концентраций определяемых элементов в образце

сравнения и анализируемом образце. Вопрос о степени близости матрицы стандартного образца к исследуемому, при которой не вносятся существенные погрешности в количественный анализ, до конца не изучен. При проведении рутинных измерений элементного состава биологических объектов авторы большинства работ не указывают чем обусловлен выбор того или иного внешнего стандарта. Лишь в немногих работах проводятся дополнительные исследования для проверки адекватности матриц стандартного и исследуемого образцов, либо отмечается необходимость таких исследований [82, 111, 126]. Литературный обзор показал, что в каждом случае выбор внешнего стандарта требует индивидуального подхода, который учитывает все особенности анализируемых объектов. Отсюда возникает задача сравнения поглощающих и рассеивающих свойств матриц различных материалов, с целью обоснованного выбора образца сравнения для анализа образцов биологических тканей и растительного материала, исследуемых в данной работе.

Сложность и разнообразие биологических объектов часто приводят к тому, что стандартный образец с подходящей матрицей и известным содержанием всех интересующих элементов отсутствует. Проблема нехватки качественных международных стандартных образцов для каждой исследуемой матрицы неоднократно отмечалась [111, 160-162]. Способ внешнего стандарта с поправкой на поглощение позволяет решить эту проблему и получить количественные результаты даже в том случае, когда матрицы стандартных и исследуемых материалов существенно различаются. Это значительно расширяет возможности метода РФА, позволяя проводить количественные определения элементного состава разнообразных объектов, расширять круг анализируемых элементов и вовлекать в анализ большее количество стандартных образцов, что делает анализ более надежным. Данный способ упоминается в литературе, но, по-видимому, из-за большей трудоемкости, его применение на практике практически не описано. Поскольку данный способ, несомненно, представляет практическую ценность и научный интерес, одна из задач дан-

ной работы состояла в оценке его применимости на практике для широкого круга материалов биологического и геологического происхождения. Для этого необходимо было измерить массовые коэффициенты ослабления рентгеновского излучения в анализируемых материалах для последующего расчета поправки к интенсивностям измеренных аналитических линий.

Образцы биологических тканей, представляющие интерес для изучения элементного состава, поступают в аналитическую лабораторию из медицинских учреждений, либо из исследовательских институтов соответствующего профиля. После забора из организма образцы биотканей часто фиксируются растворами формалина. Данный способ фиксации является простым, эффективным и очень распространен в медицинской практике. Влияние фиксации раствором формалина на элементный состав образцов биотканей неоднократно исследовалось. Противоречивость имеющихся данных объясняется многочисленными вариациями условий проведения эксперимента, а именно размером исследуемых образцов и длительностью сроков фиксации. Фрагменты тканей органов экспериментальных животных и биоптаты тканей человеческого организма имеют массу в несколько десятков миллиграмм и менее. Сроки фиксации таких образцов с момента забора до проведения анализа, как правило, не велики. В литературе не было найдено исследований образцов биотканей соизмеримой массы при коротких сроках фиксации в растворе формалина. Необходимость предвидеть и исключить возможные ошибки еще на стадии отбора образцов ставит задачу исследования изменений элементного состава биоткани в результате фиксации раствором формалина; и выбора наиболее оптимального способа фиксации.

Исходя из вышеизложенного в задачи исследования входило:

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

- оценить эффективность различных способов нормировки спектров в методе РФА-СИ;
- измерить коэффициенты ослабления рентгеновского излучения в биологических материалах для учета матричных эффектов в образцах;
- определить методом РФА-СИ элементный состав и наличие корреляций между концентрациями химических элементов в тканях печени и легких экспериментальных животных.

## ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Пробоподготовка образцов миокарда для исследования влияния фиксации раствором формалина на элементный состав биоткани

ГУ НИИ Региональной патологии и патоморфологии СО РАМН было предоставлено сердце крысы линии Вистар, содержащейся в стандартных условиях вивария. Масса целого органа составляла около 1,5 г. После изъятия сердце было заморожено и в таком виде доставлено в лабораторию для анализа. Орган был разморожен при комнатной температуре и разделен скальпелем на 25 образцов.

Из 25 образцов 9 не подвергались фиксации в растворе формалина. Они были помещены между двумя фторопластовыми пленками и в таком виде подвергнуты высушиванию под грузом, для придания образцам плоскопараллельной геометрии. 16 оставшихся образцов сразу же были помещены в стерильные пластиковые контейнеры объемом 1 мл. Контейнеры наполнялись раствором формалина марки № 05-01004/F, (Италия),  $pH = 7$ , который был предоставлен сотрудниками НИИ Патологии кровообращения им. Е.Н. Мешалкина. Данный раствор формалина традиционно используется для фиксации биологических материалов в медицинской практике. Каждый образец миокарда был окружен раствором формалина со всех сторон и оставался в таком состоянии до окончания срока фиксации. Образцы находились в растворе формалина различные промежутки времени: от четырех часов до шести суток. После окончания периода фиксации образцы вынимались из раствора и между двумя фторопластовыми пленками помещались под груз для высушивания при комнатной температуре до постоянного веса, как и свежие образцы. Итоговое количество образцов для каждого срока фиксации представлено ниже:

|                              |        |        |         |         |         |         |
|------------------------------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|
| <b>количество образцов</b>   | 9      | 3      | 4       | 4       | 2       | 3       |
| <b>длительность фиксации</b> | свежие | 4 часа | 1 сутки | 2 суток | 4 суток | 6 суток |

Образцы были взвешены, помещены между двумя майларовыми пленками (Mylar № 01865-AB, Structure Probe, Inc., USA), толщиной 2,5 мкм, и закреплены фторопластовыми кольцами. Масса образцов составляла от 1,2 до 9,8 мг (сухой вес).

## **2.2. Пробоподготовка стандартных образцов**

Для измерения массовых коэффициентов ослабления рентгеновского излучения были выбраны следующие международные и государственные стандартные образцы состава: 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), NCSZC 85005 Beef liver (говяжья печень), WEPAL IPE sample 899 Cabbage (листья капусты), ГСО 7126-94 Бил-1 (байкальский ил), ОСО 353-07 СГ-2 (аляскитовый гранит), IAEA Soil-7 (почва), NIST 8414 Bovine Muscle (мышца быка), NIST 1575 Pine Needles (иглы сосны), NIST 1571 Orchard Leaves (листья фруктовых деревьев), NIES №2 Pond Sediment (донные отложения).

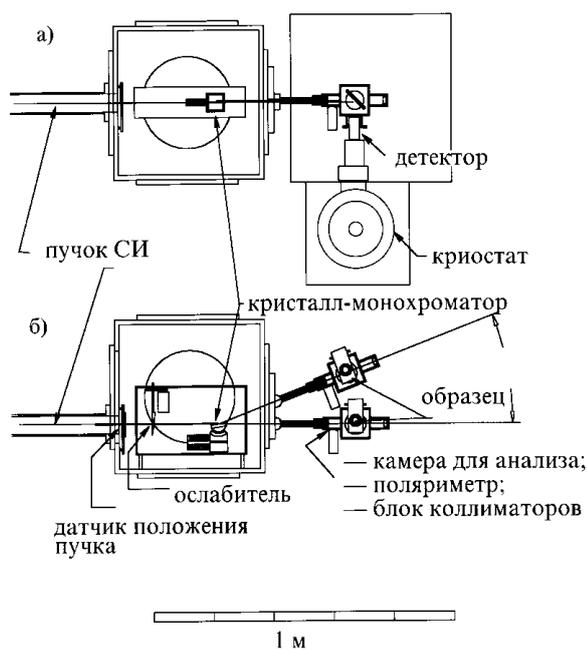
Все стандартные образцы были представлены в виде сухого порошка. Размер частиц порошка используемых материалов варьировался от 25 мкм (ГСО 7126-94 Бил-1) до 500 мкм (WEPAL IPE sample 899 Cabbage). Поскольку крупность частиц стандартного образца листьев капусты – WEPAL IPE sample 899 Cabbage, намного превосходила крупность частиц остальных образцов, данный стандартный образец дополнительно растирался в яшмовой ступке. Все стандартные образцы прессовались в таблетки диаметром 8 мм под давлением  $\approx 150$  кг/см<sup>2</sup>. Таблетки помещались между двумя майларовыми пленками и закреплялись во фторопластовые кольца.

Все инструменты, используемые в пробоподготовке образцов: скальпель (марка стали ЭИ-515), пинцет (с фторопластовым наконечником), обрабатывались этиловым спиртом марки “ОСЧ” (ГОСТ 10749-80). Перед упаковкой образцов в майларовые пленки последние также обрабатывались эти-

ловым спиртом. Содержание примесей в формалине и майларовой пленке используемых марок определялось ранее и оказалось незначительным [163].

### 2.3. Экспериментальная станция элементного рентгенофлуоресцентного анализа

Все измерения проводились на экспериментальной станции элементного рентгенофлуоресцентного анализа на базе Института ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН (ВЭПП-3М). Накопительное кольцо ВЭПП-3 имеет длину 74.4 м и работает в области энергий от 350 МэВ (инжекция) до 2000 МэВ (эксперимент). Ток электронов, ускоренный до максимальной энергии, может достигать 160 мА. Синхротронное излучение, принимаемое каналом станции рентгенофлуоресцентного анализа, исходит от вигглера (устройство, представляющее собой набор магнитов) с магнитным полем 2 Т. Ниже на рисунке 3 представлена схема станции:



**Рис. 3.** Схема станции элементного рентгенофлуоресцентного анализа

*вид сверху (а), вид сбоку (б)*

В качестве первичного источника возбуждения используется монохроматический пучок СИ. Для монохроматизации первичного «белого» пучка СИ используется монохроматор, типа «Бабочка» (Channel cut) с рабочими

плоскостями Si (111), который обеспечивает получение монохроматического излучения в диапазоне энергий 8 – 42 кэВ. Для проведения рентгенофлуоресцентного анализа из спектра СИ вырезается участок шириной  $\Delta E/E = 3\div 4 \times 10^{-4}$ . Монохроматизация осуществляется за счет дифракции узконаправленного пучка рентгеновского излучения, что убирает сплошной фон, образующийся за счет упруго рассеянного первичного излучения в области регистрируемых флуоресцентных линий исследуемых элементов.

Механизмы перемещения образца и поворота кристалла обеспечивают при сохранении положения точки фокуса на образце плавную перестройку энергии. Выбор энергии возбуждения определяется краем поглощения определяемого элемента с наибольшим атомным номером. Превышение энергии над краем поглощения задается в соответствии с «затуханием» комптоновского рассеяния возбуждающего излучения [64]. Регистрация характеристического флуоресцентного излучения от образца осуществляется при помощи полупроводникового детектора Si (Li) PentaFET (Oxford Instruments), который обеспечивает регистрацию флуоресцентного излучения с энергетическим разрешением  $\sim 135$  эВ (на линии 5.9 кэВ) при загрузках порядка 10 кГц. Толщина Be фольги составляет 7,62 мкм. Располагая детектор в плоскости поляризации монохроматизированного пучка СИ под углом  $90^\circ$  к этому пучку, можно уменьшить интенсивность упруго рассеянного и комптоновского пиков, а соответственно и высоту фонового плато [64]. Для разложения спектра по энергиям флуоресцентных квантов используется многоканальный анализатор OXFORD (номер 03.80.26-102061, Oxford Instruments Inc., USA). Набор спектра при измерении отображается при помощи OXFORD WINMCA, в режиме 2048 каналов.

Камера для анализа образцов и коллиматоры пучка СИ изготовлены из композиционного материала эльконайта. Максимальный диаметр анализируемого образца — 30 мм. Время измерения образцов составляет  $10\text{-}10^3$  с, рабочая среда — воздух. Диапазон определяемых химических элементов – от S

до U. Для всех источников синхротронного излучения свойственны циклическая работа ускорительного кольца.

Обработка полученных спектров осуществляется при помощи программы AXIL для флуоресцентных спектров (Canberra Packard, Benelux). Форма линии в ней описывается при помощи кривой Гаусса. Расчет спектров осуществляется в диалоговом режиме при помощи нелинейного метода наименьших квадратов.

#### 2.4. Измерение спектров для оценки погрешности, обусловленной использованием синхротронного излучения

Для эксперимента был выбран стандартный образец говяжьей печени NCS ZC 85005 Beef Liver. Масса таблетки спрессованного образца составляла 10 мг, диаметр – 8 мм. Анализ проводился при энергии возбуждения 18 кэВ. Длительность одного измерения составляла 500 с живого времени. Было проведено две серии последовательных измерений. Длительность каждой серии соответствовала времени между двумя накоплениями пучка электронов, то есть в каждой серии происходило постепенное падение тока электронов, вызванное естественными процессами в накопительном кольце. Диапазон изменений тока в одной серии составлял 120 – 60 мА, в другой – 150 – 75 мА (рис. 4).

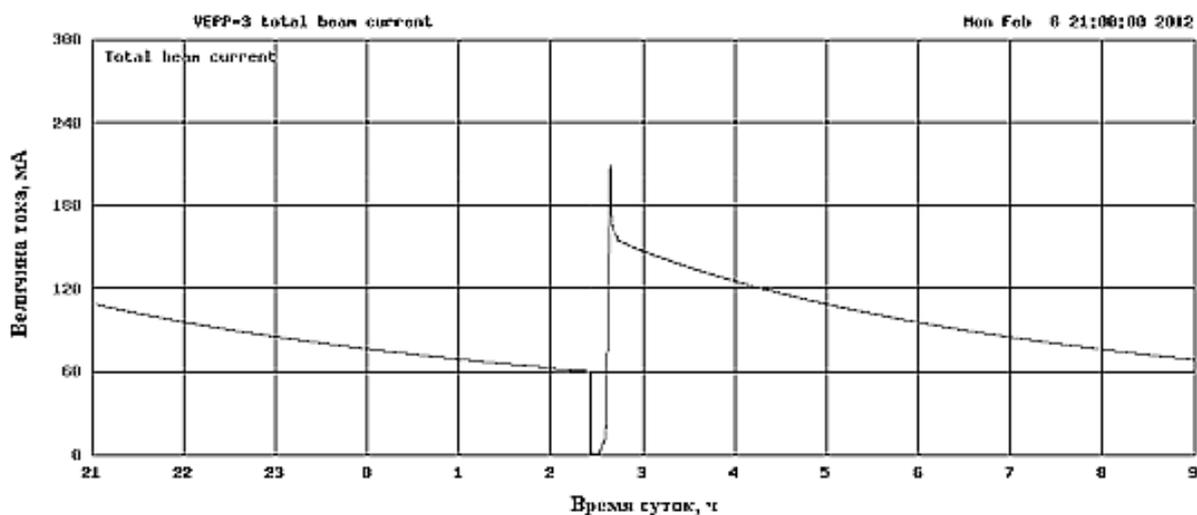


Рис. 4. График изменения тока накопительного кольца ВЭПП-3 за сутки

В течение каждой серии измерений образец не вынимался из камеры и постоянно находился в одном и том же положении. Таким образом, исключались случайные ошибки, которые могли возникнуть при перемещении образца, связанные с возможными вариациями в его геометрии или с неоднородностью распределения элементов. В первой серии, с изменением тока от 120 до 60 мА было измерено 43 спектра. Во второй серии, с падением тока от 150 до 75 мА было измерено 37 спектров.

## **2.5. Измерение массовых коэффициентов ослабления и рентгенофлуоресцентных спектров образцов с разными матрицами**

Для исследования были выбраны следующие 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), ГСО 7126-94 Бил-1 (байкальский ил), СОС 353-07 СГ-2, IAEA Soil-7 (почва). Также для измерения массовых коэффициентов ослабления были выбраны два образца исследуемых биологических тканей – печени и легких. Для каждого образца рассчитывалась поверхностная плотность путем деления массы навески на площадь таблетки. Поверхностные плотности полученных таблеток стандартных образцов лежали в диапазоне 0.060 – 0.125 г/см<sup>2</sup>. Поверхностная плотность фрагментов исследуемых биотканей измерялась путем деления массы образца на его площадь. Для измерения площади данным образцам изначально придавалась прямоугольная форма.

Коэффициенты ослабления  $\mu(E)$  рентгеновского излучения с энергией 7-12 кэВ для всех исследуемых образцов снимались на EXAFS-спектрометре Сибирского центра синхротронного и терагерцового излучения (СЦСТИ, Новосибирск) при энергии электронов накопительного кольца ВЭПП-3 2 ГэВ и среднем токе во время измерения 90 мА. Подробное описание используемого оборудования может быть найдено в работе [164]. В качестве монохроматора

использовался разрезной моноблочный кристалл-монокроматор Si(111). Подавление высших гармоник не производилось. Съемка спектров  $\mu(E)$  проводилась в односкановом режиме, время накопления сигнала в точке – 10 сек. Шаг изменения энергии при измерении спектров  $\mu(E)$  составлял 100 эВ. Для регистрации рентгеновского излучения использовались ионизационные камеры, заполненные гелием и аргоном: мониторирующая камера – смесь 5% Ar + 95% He; камера полного поглощения – 100% Ar. при атмосферном давлении.

Чтобы учесть поглощение майларовых пленок и рассеяния излучения на воздухе, был изготовлен «пустой» образец, т.е. две майларовые пленки без образца между ними, которые также закреплялись во фторопластовом кольце и использовались для измерения спектров  $\mu(E)$ .

После измерения массовых коэффициентов ослабления данные образцы использовались для измерения рентгенофлуоресцентных спектров на станции элементного рентгенофлуоресцентного анализа. Время измерения каждого спектра составляло 500 с, энергия возбуждения – 23 кэВ. При расчете концентраций полученные спектры нормировались для учета вариаций интенсивности возбуждающего излучения. Для нормировки использовалась одна из следующих величин: величина тока накопительного кольца за время измерения; площадь пика комптоновского рассеяния; сигнал от внешнего монитора, расположенного непосредственно перед измеряемым образцом. В качестве такого монитора служила майларовая пленка с напыленным на нее слоем Ni, толщиной 8 нм. Напыляемый никель был стандартизован (содержание никеля 99,9 %), использовался метод магнетронного напыления. Предварительно был измерен спектр используемой пленки с напыленным Ni для проверки наличия в ней возможных примесей определяемых элементов.

## **2.6. Измерения спектров исследуемых образцов**

Пробоотбор и пробоподготовка исследуемых образцов печени и легких, а также растительных материалов описаны в главе 4 в соответствующих разделах.

Анализ образцов тканей миокарда, печени и легких крыс проводился при энергии возбуждения 18 кэВ, время одного измерения составляло 500 с. При этом определялись концентрации следующих элементов: К, Са, Мп, Fe, Ni, Cu, Zn, Pb, Se, Br, Rb, Sr.

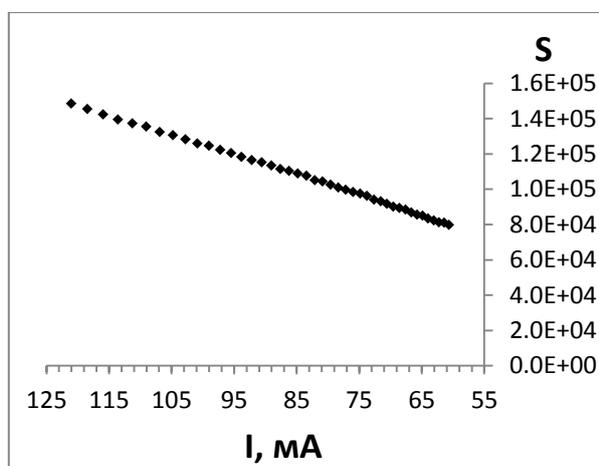
Исследуемые образцы шиповника и почвы анализировались при энергии возбуждения 23 КэВ. Время одного измерения – 400 с. Определялись концентрации К, Са, Мп, Fe, Ni, Cu, Zn, Pb, Se, Br, Rb и Sr. Как в случае образцов биологических тканей, так и в случае растительных образцов измерения проводились по следующей схеме: чередовались три анализируемых образца – три стандартных образца и т.д. Таким образом, достигались наиболее близкие условия измерений для стандартных и исследуемых образцов.

## ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ДЛЯ РФА-СИ АНАЛИЗА БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ

### 3.1. Оценка погрешности регистрации спектров, обусловленной использованием синхротронного излучения

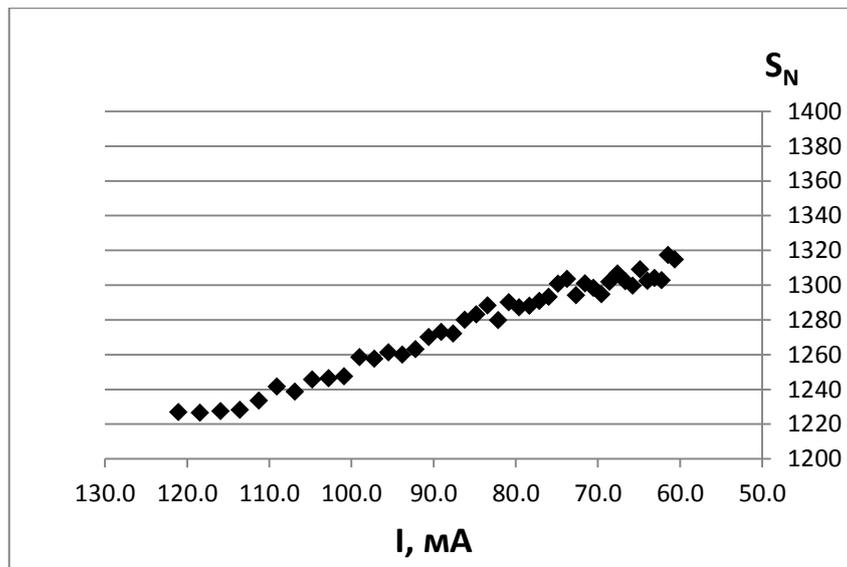
Для каждого спектра из серии последовательных измерений образца NCS ZC 85005 Beef Liver, проведенных при постепенном снижении интенсивности возбуждающего излучения, были определены площади  $K_{\alpha}$ -линий S, Cl, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Se, Br, Rb, Sr и площадь пика комптоновского рассеяния. После этого проводилась нормировка площадей пиков определяемых элементов на величину тока накопительного кольца за время каждого измерения и на площадь пика комптоновского рассеяния.

На рис. 5 показана зависимость площади пика  $K_{\alpha}$ -линии железа (количество импульсов) от величины тока накопительного кольца для 43 измерений образца.



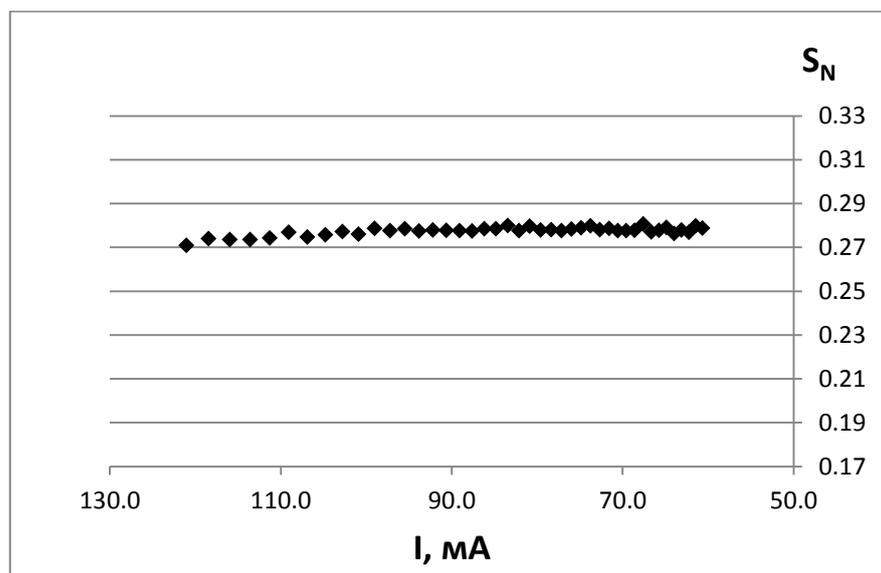
**Рис. 5.** Площадь пика  $K_{\alpha}$ -линии Fe при значениях тока 120-60 мА без нормировки. S – площадь пика (количество импульсов), I – величина тока

Из рис. 5 видно, что при падении тока от 120 до 60 мА площадь пика  $K_{\alpha}$ -линии также уменьшается. Характер изменения нормированной площади пика  $K_{\alpha}$ -линии железа при нормировках на величину тока и на площадь пика комптоновского рассеяния показан на рис. 6 и 7 соответственно:



**Рис. 6.** Площадь пика  $K_{\alpha}$ -линии железа при значениях тока 120-60 мА после нормировки на величину тока накопительного кольца.  $S_N$  – площадь пика (имп./мА);  $I$  – величина тока

При уменьшении тока от 120 до 60 мА наблюдается систематическое возрастание площади  $K_{\alpha}$ -линии железа, нормированной на величину тока накопительного кольца. Нормированная площадь линии при 60 мА на 7.2 % превосходит величину нормированной площади при 120 мА. Схожий характер изменения наблюдался и для остальных определяемых элементов.



**Рис. 7.** Площадь пика  $K_{\alpha}$ -линии железа при значениях тока 120-60 мА после нормировки на площадь пика комптоновского рассеяния.  $S_N$  – площадь пика (отн. ед.);  $I$  – величина тока

Из рис. 7 видно, что при использовании нормировки на площадь пика комптоновского рассеяния, возрастание величины нормированной площади менее выражено. Разница между значениями нормированной площади при 60 мА и 120 мА составила 2.9 %.

Для оценки случайной погрешности в величине нормированной площади пика при двух способах нормировки для каждого элемента было рассчитано относительное стандартное отклонение,  $S_r$  (%), результаты показаны в табл. 3.

Т а б л и ц а 3

Относительное стандартное отклонение ( $S_r$ , %) средней нормированной площади пиков элементов при разных способах нормировки

| Элемент | Режим измерения              |               |                              |               |
|---------|------------------------------|---------------|------------------------------|---------------|
|         | 120-60 мА                    |               | 150-75 мА                    |               |
|         | Способ нормировки            |               | Способ нормировки            |               |
|         | Пик комптоновского рассеяния | Величина тока | Пик комптоновского рассеяния | Величина тока |
| S       | 2                            | 3             | 2                            | 3             |
| Cl      | 3                            | 3             | 2                            | 3             |
| K       | 0.7                          | 2             | 1                            | 2             |
| Ca      | 3                            | 3             | 2                            | 3             |
| Mn      | 4                            | 4             | 3                            | 4             |
| Fe      | 0.7                          | 2             | 0.8                          | 3             |
| Cu      | 0.9                          | 2             | 0.9                          | 2             |
| Zn      | 0.9                          | 2             | 0.9                          | 2             |
| Se      | 8                            | 2             | 9                            | 2             |
| Br      | 2                            | 2             | 2                            | 3             |
| Rb      | 0.8                          | 2             | 1                            | 2             |
| Sr      | 4                            | 2             | 3                            | 2             |

При нормировке на площадь пика комптоновского рассеяния при двух рассматриваемых диапазонах тока  $S_r$  для большинства элементов составляет 1 – 2 %, за исключением Mn, Sr ( $S_r$  для каждого составляло 3 и 4 % для 120 – 60 мА и 150 – 75 мА соответственно) и Se, где  $S_r$  составило 8 и 9 % для 120 – 60 мА и 150 – 75 мА соответственно. Высокое относительное стандартное отклонение для этих элементов связано с их низкими концентрациями в об-

разце (табл. 3) и малыми величинами площадей пиков характеристического излучения, что может приводить к большей случайной ошибке во время компьютерной обработки спектров и количественных расчетов. При нормировке на величину тока накопительного кольца  $S_r$  для большинства элементов увеличивается в три раза.

В целом, на станции элементного анализа за 24 часа измерений, протекавших при снижении величины тока накопительного кольца в два раза и прерывающихся процессом перенакопления пучка электронов, не было обнаружено грубых случайных ошибок, которые могли возникнуть из-за нестабильности положения пучка СИ и привести к изменению степени поляризации возбуждающего излучения. Нормировка спектров на площадь пика комптоновского рассеяния может быть эффективно использована для устранения погрешностей, вызванных изменениями в интенсивности возбуждающего излучения, при анализе образцов с близкими рассеивающими и поглощающими свойствами. Результаты этой части работы опубликованы в журнале «Аналитика и контроль» [165].

Одним из объяснений появления систематической ошибки при нормировке на величину тока накопительного кольца является уменьшение тепловых нагрузок на кристалл монохроматор при снижении тока.

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

Массовые коэффициенты ослабления рентгеновского излучения в стандартных и исследуемых образцах тканей печени и легких рассчитывались по уравнению 4. В табл. 4, 5 и 6 показаны измеренные значения массовых коэффициентов ослабления ( $\mu$ , см<sup>2</sup>/г) и стандартное отклонение измеренных величин ( $SD$ ) для рентгеновского излучения с энергией 7-12 keV, в биологических, геологических и исследуемых образцах печени и легких соответственно.

Т а б л и ц а 4

Массовые коэффициенты ослабления (см<sup>2</sup>/г) в биологических образцах

| E,<br>кэВ   | Мидия |      | Кровь |      | Волос |      | Устрица |      | Печень |      | Листья ка-<br>пусты |      |
|-------------|-------|------|-------|------|-------|------|---------|------|--------|------|---------------------|------|
|             | $\mu$ | SD   | $\mu$ | SD   | $\mu$ | SD   | $\mu$   | SD   | $\mu$  | SD   | $\mu$               | SD   |
| <b>7.0</b>  | 16.2  | 0.3  | 14.9  | 0.3  | 15.9  | 0.3  | 15.5    | 0.3  | 12.51  | 0.25 | 23.5                | 0.5  |
| <b>7.1</b>  | 15.6  | 0.3  | 14.35 | 0.29 | 15.3  | 0.3  | 14.9    | 0.3  | 12.01  | 0.24 | 22.6                | 0.5  |
| <b>7.2</b>  | 15.0  | 0.3  | 14.7  | 0.3  | 14.71 | 0.29 | 14.46   | 0.29 | 11.68  | 0.23 | 21.7                | 0.4  |
| <b>7.3</b>  | 14.45 | 0.29 | 14.14 | 0.28 | 14.14 | 0.28 | 13.88   | 0.28 | 11.23  | 0.23 | 20.9                | 0.4  |
| <b>7.4</b>  | 13.88 | 0.28 | 13.57 | 0.27 | 13.57 | 0.27 | 13.34   | 0.27 | 10.79  | 0.22 | 20.1                | 0.4  |
| <b>7.5</b>  | 13.35 | 0.27 | 13.05 | 0.26 | 13.02 | 0.26 | 12.82   | 0.26 | 10.38  | 0.21 | 19.4                | 0.4  |
| <b>7.6</b>  | 12.85 | 0.26 | 12.54 | 0.25 | 12.54 | 0.25 | 12.33   | 0.25 | 9.99   | 0.20 | 18.6                | 0.4  |
| <b>7.7</b>  | 12.37 | 0.25 | 12.07 | 0.24 | 12.05 | 0.24 | 11.86   | 0.24 | 9.61   | 0.19 | 18.0                | 0.4  |
| <b>7.8</b>  | 11.91 | 0.24 | 11.62 | 0.23 | 11.60 | 0.23 | 11.42   | 0.23 | 9.26   | 0.19 | 17.3                | 0.3  |
| <b>7.9</b>  | 11.47 | 0.23 | 11.19 | 0.22 | 11.16 | 0.22 | 11.00   | 0.22 | 8.92   | 0.18 | 16.7                | 0.3  |
| <b>8.0</b>  | 11.06 | 0.22 | 10.79 | 0.22 | 10.75 | 0.22 | 10.60   | 0.21 | 8.61   | 0.17 | 16.1                | 0.3  |
| <b>8.1</b>  | 10.67 | 0.21 | 10.41 | 0.21 | 10.35 | 0.21 | 10.22   | 0.20 | 8.30   | 0.17 | 15.6                | 0.3  |
| <b>8.2</b>  | 10.29 | 0.21 | 10.05 | 0.20 | 9.98  | 0.20 | 9.86    | 0.20 | 8.01   | 0.16 | 15.0                | 0.3  |
| <b>8.3</b>  | 9.94  | 0.20 | 9.69  | 0.19 | 9.63  | 0.19 | 9.51    | 0.19 | 7.73   | 0.16 | 14.53               | 0.29 |
| <b>8.4</b>  | 9.60  | 0.19 | 9.36  | 0.19 | 9.30  | 0.19 | 9.19    | 0.18 | 7.47   | 0.15 | 14.05               | 0.28 |
| <b>8.5</b>  | 9.26  | 0.19 | 9.05  | 0.18 | 8.98  | 0.18 | 8.87    | 0.18 | 7.21   | 0.14 | 13.59               | 0.27 |
| <b>8.6</b>  | 8.93  | 0.18 | 8.75  | 0.18 | 8.68  | 0.17 | 8.57    | 0.17 | 6.98   | 0.14 | 13.15               | 0.26 |
| <b>8.7</b>  | 8.68  | 0.17 | 8.45  | 0.17 | 8.39  | 0.17 | 8.29    | 0.17 | 6.74   | 0.14 | 12.73               | 0.26 |
| <b>8.8</b>  | 8.39  | 0.17 | 8.18  | 0.16 | 8.11  | 0.16 | 8.02    | 0.16 | 6.52   | 0.13 | 12.33               | 0.25 |
| <b>8.9</b>  | 8.12  | 0.16 | 7.92  | 0.16 | 7.84  | 0.16 | 7.76    | 0.16 | 6.30   | 0.13 | 11.94               | 0.24 |
| <b>9.0</b>  | 7.87  | 0.16 | 7.68  | 0.15 | 7.61  | 0.15 | 7.54    | 0.15 | 6.13   | 0.12 | 11.58               | 0.23 |
| <b>9.1</b>  | 7.62  | 0.15 | 7.43  | 0.15 | 7.35  | 0.15 | 7.28    | 0.15 | 5.94   | 0.12 | 11.22               | 0.22 |
| <b>9.2</b>  | 7.38  | 0.15 | 7.20  | 0.14 | 7.12  | 0.14 | 7.06    | 0.14 | 5.75   | 0.12 | 10.89               | 0.22 |
| <b>9.3</b>  | 7.16  | 0.14 | 6.99  | 0.14 | 6.90  | 0.14 | 6.85    | 0.14 | 5.58   | 0.11 | 10.57               | 0.21 |
| <b>9.4</b>  | 6.94  | 0.14 | 6.78  | 0.14 | 6.68  | 0.13 | 6.63    | 0.13 | 5.40   | 0.11 | 10.26               | 0.21 |
| <b>9.5</b>  | 6.73  | 0.14 | 6.57  | 0.13 | 6.49  | 0.13 | 6.42    | 0.13 | 5.25   | 0.11 | 9.96                | 0.20 |
| <b>9.6</b>  | 6.52  | 0.13 | 6.38  | 0.13 | 6.29  | 0.13 | 6.23    | 0.13 | 5.09   | 0.10 | 9.68                | 0.19 |
| <b>9.7</b>  | 6.36  | 0.13 | 6.20  | 0.12 | 6.14  | 0.12 | 6.20    | 0.12 | 4.97   | 0.10 | 9.41                | 0.19 |
| <b>9.8</b>  | 6.18  | 0.12 | 6.02  | 0.12 | 5.97  | 0.12 | 6.07    | 0.12 | 4.83   | 0.10 | 9.15                | 0.18 |
| <b>9.9</b>  | 6.01  | 0.12 | 5.85  | 0.12 | 5.80  | 0.12 | 5.89    | 0.12 | 4.70   | 0.09 | 8.90                | 0.18 |
| <b>10.0</b> | 5.84  | 0.12 | 5.69  | 0.11 | 5.63  | 0.11 | 5.72    | 0.11 | 4.56   | 0.09 | 8.66                | 0.17 |
| <b>10.1</b> | 5.67  | 0.11 | 5.53  | 0.11 | 5.48  | 0.11 | 5.56    | 0.11 | 4.44   | 0.09 | 8.43                | 0.17 |
| <b>10.2</b> | 5.52  | 0.11 | 5.38  | 0.11 | 5.32  | 0.11 | 5.40    | 0.11 | 4.32   | 0.09 | 8.21                | 0.16 |
| <b>10.3</b> | 5.37  | 0.11 | 5.24  | 0.11 | 5.18  | 0.10 | 5.25    | 0.11 | 4.21   | 0.08 | 7.99                | 0.16 |
| <b>10.4</b> | 5.23  | 0.11 | 5.09  | 0.10 | 5.04  | 0.10 | 5.10    | 0.10 | 4.20   | 0.08 | 7.79                | 0.16 |
| <b>10.5</b> | 5.09  | 0.10 | 4.97  | 0.10 | 4.91  | 0.10 | 4.97    | 0.10 | 4.10   | 0.08 | 7.59                | 0.15 |
| <b>10.6</b> | 4.97  | 0.10 | 4.84  | 0.10 | 4.78  | 0.10 | 4.83    | 0.10 | 4.01   | 0.08 | 7.39                | 0.15 |
| <b>10.7</b> | 4.83  | 0.10 | 4.71  | 0.09 | 4.66  | 0.09 | 4.71    | 0.09 | 3.91   | 0.08 | 7.20                | 0.14 |
| <b>10.8</b> | 4.72  | 0.09 | 4.60  | 0.09 | 4.54  | 0.09 | 4.58    | 0.09 | 3.80   | 0.08 | 7.03                | 0.14 |
| <b>10.9</b> | 4.60  | 0.09 | 4.48  | 0.09 | 4.42  | 0.09 | 4.47    | 0.09 | 3.70   | 0.07 | 6.85                | 0.14 |
| <b>11.0</b> | 4.49  | 0.09 | 4.37  | 0.09 | 4.31  | 0.09 | 4.35    | 0.09 | 3.61   | 0.07 | 6.68                | 0.13 |
| <b>11.1</b> | 4.38  | 0.09 | 4.25  | 0.09 | 4.21  | 0.08 | 4.24    | 0.09 | 3.50   | 0.07 | 6.52                | 0.13 |
| <b>11.2</b> | 4.28  | 0.09 | 4.16  | 0.08 | 4.11  | 0.08 | 4.13    | 0.08 | 3.36   | 0.07 | 6.37                | 0.13 |
| <b>11.3</b> | 4.18  | 0.08 | 4.06  | 0.08 | 4.01  | 0.08 | 4.03    | 0.08 | 3.24   | 0.07 | 6.21                | 0.12 |
| <b>11.4</b> | 4.08  | 0.08 | 3.97  | 0.08 | 3.92  | 0.08 | 3.94    | 0.08 | 3.16   | 0.06 | 6.07                | 0.12 |
| <b>11.5</b> | 3.99  | 0.08 | 3.87  | 0.08 | 3.82  | 0.08 | 3.83    | 0.08 | 3.08   | 0.06 | 5.92                | 0.12 |
| <b>11.6</b> | 3.91  | 0.08 | 3.79  | 0.08 | 3.75  | 0.08 | 3.75    | 0.08 | 3.01   | 0.06 | 5.78                | 0.12 |
| <b>11.7</b> | 3.82  | 0.08 | 3.70  | 0.07 | 3.65  | 0.07 | 3.66    | 0.07 | 2.94   | 0.06 | 5.65                | 0.11 |
| <b>11.8</b> | 3.76  | 0.08 | 3.63  | 0.07 | 3.59  | 0.07 | 3.59    | 0.07 | 2.88   | 0.06 | 5.52                | 0.11 |
| <b>11.9</b> | 3.69  | 0.07 | 3.56  | 0.07 | 3.51  | 0.07 | 3.51    | 0.07 | 2.82   | 0.06 | 5.40                | 0.11 |
| <b>12.0</b> | 3.62  | 0.07 | 3.48  | 0.07 | 3.44  | 0.07 | 3.43    | 0.07 | 2.76   | 0.06 | 5.28                | 0.11 |

Т а б л и ц а 5

Массовые коэффициенты ослабления ( $\text{см}^2/\text{г}$ ) в геологических образцах

| E, кэВ | Байкальский ил |      | Аляскитовый гранит |      | Почва |     |
|--------|----------------|------|--------------------|------|-------|-----|
|        | $\mu$          | SD   | $\mu$              | SD   | $\mu$ | SD  |
| 7.0    | 42.9           | 0.9  | 48.7               | 1.0  | 49.5  | 1.0 |
| 7.1    | 41.4           | 0.8  | 47.0               | 0.9  | 47.7  | 1.0 |
| 7.2    | 53.5           | 1.1  | 48.6               | 1.0  | 58.9  | 1.2 |
| 7.3    | 51.4           | 1.0  | 46.9               | 0.9  | 56.0  | 1.1 |
| 7.4    | 49.3           | 1.0  | 45.2               | 0.9  | 53.6  | 1.1 |
| 7.5    | 47.4           | 0.9  | 43.7               | 0.9  | 51.4  | 1.0 |
| 7.6    | 45.6           | 0.9  | 42.1               | 0.8  | 49.4  | 1.0 |
| 7.7    | 43.9           | 0.9  | 40.8               | 0.8  | 47.6  | 1.0 |
| 7.8    | 42.3           | 0.8  | 39.4               | 0.8  | 45.8  | 0.9 |
| 7.9    | 40.8           | 0.8  | 38.1               | 0.8  | 44.2  | 0.9 |
| 8.0    | 39.4           | 0.8  | 36.8               | 0.7  | 42.7  | 0.9 |
| 8.1    | 38.0           | 0.8  | 35.6               | 0.7  | 41.2  | 0.8 |
| 8.2    | 36.7           | 0.7  | 34.5               | 0.7  | 39.9  | 0.8 |
| 8.3    | 35.5           | 0.7  | 33.4               | 0.7  | 38.5  | 0.8 |
| 8.4    | 34.4           | 0.7  | 32.3               | 0.6  | 37.3  | 0.7 |
| 8.5    | 33.2           | 0.7  | 31.3               | 0.6  | 36.1  | 0.7 |
| 8.6    | 32.1           | 0.6  | 30.3               | 0.6  | 34.9  | 0.7 |
| 8.7    | 31.1           | 0.6  | 29.4               | 0.6  | 33.8  | 0.7 |
| 8.8    | 30.1           | 0.6  | 28.5               | 0.6  | 32.7  | 0.7 |
| 8.9    | 29.2           | 0.6  | 27.6               | 0.6  | 31.7  | 0.6 |
| 9.0    | 28.2           | 0.6  | 26.8               | 0.5  | 30.8  | 0.6 |
| 9.1    | 27.4           | 0.5  | 26.0               | 0.5  | 29.8  | 0.6 |
| 9.2    | 26.6           | 0.5  | 25.2               | 0.5  | 28.9  | 0.6 |
| 9.3    | 25.8           | 0.5  | 24.5               | 0.5  | 28.1  | 0.6 |
| 9.4    | 25.0           | 0.5  | 23.8               | 0.5  | 27.2  | 0.5 |
| 9.5    | 24.3           | 0.5  | 23.1               | 0.5  | 26.4  | 0.5 |
| 9.6    | 23.6           | 0.5  | 22.4               | 0.4  | 25.7  | 0.5 |
| 9.7    | 22.9           | 0.5  | 21.8               | 0.4  | 25.1  | 0.5 |
| 9.8    | 22.3           | 0.4  | 21.2               | 0.4  | 24.4  | 0.5 |
| 9.9    | 21.6           | 0.4  | 20.6               | 0.4  | 23.7  | 0.5 |
| 10.0   | 21.0           | 0.4  | 20.0               | 0.4  | 23.0  | 0.5 |
| 10.1   | 20.4           | 0.4  | 19.5               | 0.4  | 22.4  | 0.4 |
| 10.2   | 19.9           | 0.4  | 19.0               | 0.4  | 21.8  | 0.4 |
| 10.3   | 19.3           | 0.4  | 18.5               | 0.4  | 21.2  | 0.4 |
| 10.4   | 18.8           | 0.4  | 18.0               | 0.4  | 20.6  | 0.4 |
| 10.5   | 18.3           | 0.4  | 17.5               | 0.4  | 20.1  | 0.4 |
| 10.6   | 17.8           | 0.4  | 17.0               | 0.3  | 19.6  | 0.4 |
| 10.7   | 17.4           | 0.3  | 16.6               | 0.3  | 19.1  | 0.4 |
| 10.8   | 16.9           | 0.3  | 16.2               | 0.3  | 18.6  | 0.4 |
| 10.9   | 16.5           | 0.3  | 15.8               | 0.3  | 18.1  | 0.4 |
| 11.0   | 16.0           | 0.3  | 15.4               | 0.3  | 17.6  | 0.4 |
| 11.1   | 15.6           | 0.3  | 15.0               | 0.3  | 17.2  | 0.3 |
| 11.2   | 15.3           | 0.3  | 14.63              | 0.29 | 16.8  | 0.3 |
| 11.3   | 14.9           | 0.3  | 14.27              | 0.29 | 16.4  | 0.3 |
| 11.4   | 14.51          | 0.29 | 13.93              | 0.28 | 16.0  | 0.3 |
| 11.5   | 14.15          | 0.28 | 13.60              | 0.27 | 15.6  | 0.3 |
| 11.6   | 13.80          | 0.28 | 13.28              | 0.27 | 15.3  | 0.3 |
| 11.7   | 13.47          | 0.27 | 12.97              | 0.26 | 14.9  | 0.3 |
| 11.8   | 13.15          | 0.26 | 12.66              | 0.25 | 14.6  | 0.3 |
| 11.9   | 12.84          | 0.26 | 12.37              | 0.25 | 14.2  | 0.3 |
| 12.0   | 12.54          | 0.25 | 12.10              | 0.24 | 13.9  | 0.3 |

Т а б л и ц а 6

Массовые коэффициенты ослабления ( $\text{см}^2/\text{г}$ ) в исследуемых образцах печени и легких

| E, кэВ | Образец легких |      | Образец печени |      |
|--------|----------------|------|----------------|------|
|        | $\mu$          | SD   | $\mu$          | SD   |
| 6.97   | 15.83          | 0.32 | 12.29          | 0.25 |
| 7.04   | 15.37          | 0.31 | 11.92          | 0.24 |
| 7.11   | 18.06          | 0.36 | 12.89          | 0.26 |
| 7.18   | 17.77          | 0.36 | 12.64          | 0.25 |
| 7.25   | 17.09          | 0.34 | 12.28          | 0.25 |
| 7.33   | 16.55          | 0.33 | 11.93          | 0.24 |
| 7.40   | 16.07          | 0.32 | 11.62          | 0.23 |
| 7.48   | 15.63          | 0.31 | 11.29          | 0.23 |
| 7.56   | 15.12          | 0.30 | 10.96          | 0.22 |
| 7.64   | 14.69          | 0.29 | 10.62          | 0.21 |
| 7.72   | 14.23          | 0.28 | 10.30          | 0.21 |
| 7.80   | 13.79          | 0.28 | 9.97           | 0.20 |
| 7.89   | 13.36          | 0.27 | 9.68           | 0.19 |
| 7.97   | 12.93          | 0.26 | 9.36           | 0.19 |
| 8.06   | 12.53          | 0.25 | 9.05           | 0.18 |
| 8.15   | 12.10          | 0.24 | 8.73           | 0.17 |
| 8.25   | 11.62          | 0.23 | 8.43           | 0.17 |
| 8.34   | 11.37          | 0.23 | 8.15           | 0.16 |
| 8.44   | 10.98          | 0.22 | 7.87           | 0.16 |
| 8.54   | 10.62          | 0.21 | 7.60           | 0.15 |
| 8.65   | 9.98           | 0.20 | 7.35           | 0.15 |
| 8.75   | 9.89           | 0.20 | 7.08           | 0.14 |
| 8.86   | 9.56           | 0.19 | 6.83           | 0.14 |
| 8.97   | 9.22           | 0.18 | 6.60           | 0.13 |
| 9.09   | 8.97           | 0.18 | 6.38           | 0.13 |
| 9.20   | 8.57           | 0.17 | 6.14           | 0.12 |
| 9.32   | 8.38           | 0.17 | 5.92           | 0.12 |
| 9.45   | 7.93           | 0.16 | 5.69           | 0.11 |
| 9.57   | 7.64           | 0.15 | 5.47           | 0.11 |
| 9.70   | 7.35           | 0.15 | 5.28           | 0.11 |
| 9.84   | 7.07           | 0.14 | 5.07           | 0.10 |
| 9.98   | 6.82           | 0.14 | 4.85           | 0.10 |
| 10.12  | 6.50           | 0.13 | 4.64           | 0.09 |
| 10.26  | 6.29           | 0.13 | 4.46           | 0.09 |
| 10.41  | 6.07           | 0.12 | 4.27           | 0.09 |
| 10.57  | 5.80           | 0.12 | 4.09           | 0.08 |
| 10.73  | 5.58           | 0.11 | 3.92           | 0.08 |
| 10.89  | 5.29           | 0.11 | 3.75           | 0.07 |
| 11.06  | 5.03           | 0.10 | 3.57           | 0.07 |
| 11.24  | 4.83           | 0.10 | 3.41           | 0.07 |
| 11.42  | 4.36           | 0.09 | 3.24           | 0.06 |
| 11.61  | 4.38           | 0.09 | 3.08           | 0.06 |
| 11.80  | 4.18           | 0.08 | 2.91           | 0.06 |

Погрешность измерения массовых коэффициентов ослабления рассчитывалась по формуле [133]:

$$\frac{\Delta\mu_m}{\mu_m} = \left[ \left( \frac{\Delta m}{m} \right)^2 + \left( \frac{\Delta I}{I_{\mu t}} \right)^2 + \left( \frac{\Delta I_0}{I_{0ut}} \right)^2 \right]^{1/2} \quad (11)$$

где  $\Delta m$  – погрешность при определении поверхностной плотности образцов, а остальные два слагаемых относятся к погрешности измерения сигнала ионизационных камер до и после прохождения излучения через образец. В данной работе ошибка измерения значений массовых коэффициентов ослабления не превышает 2 %.

Из табл. 4, где представлены коэффициенты ослабления для стандартных образцов биологических тканей, видно, что на исследуемом диапазоне энергий (7-12 кэВ) различие в ослабляющих свойствах для таких тканей, как кровь, волосы, ткань мидии и устрицы составляет 3-4 %. Стандартный образец печени отличается по своим свойствам от указанных выше тканей в среднем на 20-22 %. Образец листьев капусты имел самые высокие коэффициенты ослабления, среди биологических образцов. Разница в ослабляющих свойствах между образцом печени и листьев капусты составляет в среднем 47 %, и около 30 % при сравнении образца листьев капусты с остальными биологическими матрицами. Учитывая, что растительные и животные ткани на 98 % состоят из таких элементов, как Н, С, N и О [103], и ослабляющие свойства вещества определяются, как правило, матричными элементами, можно предположить, что отличия между исследуемыми биологическими матрицами вызваны различным соотношением матричных элементов (Н, С, N, О). Результаты измерений опубликованы в работе [166].

Массовые коэффициенты ослабления для исследуемого образца печени превышали коэффициенты для стандартного образца печени на 1-7 % (табл. 4 и б). Это может быть связано с различной концентрацией микроэлементов в образцах, а также с разным содержанием в них воды. Массовые коэффициенты ослабления в исследуемом образце легких оказались самыми высокими по

сравнению с коэффициентами для остальных животных тканей. Коэффициенты ослабления в образце легких превышали коэффициенты ослабления в образцах мидии, крови, волос и тканей устрицы на 6-17 % (табл. 4 и 6).

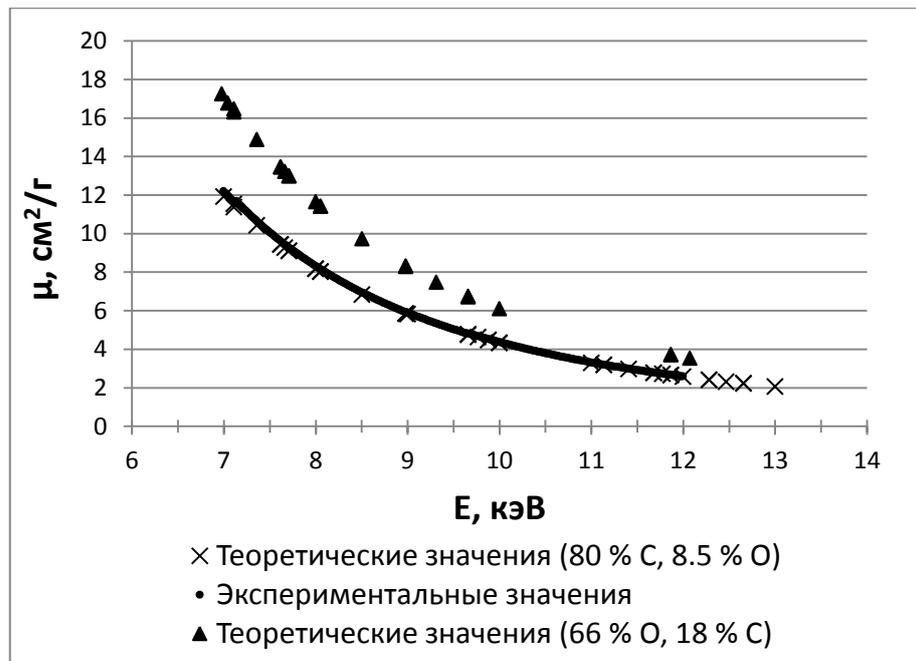
В табл. 5 представлены коэффициенты ослабления в стандартных образцах с геологическими матрицами. Исследуемые материалы представляют собой почву и две горные породы (осадочная и магматическая). Наибольшие коэффициенты ослабления обнаружены в образце почвы, а наименьшие – в магматической горной породе – аляскитовом граните. Разница коэффициентов ослабления между данными образцами достигает 17 %. Коэффициенты ослабления в образце ила, который представляет собой осадочную горную породу, практически на всем диапазоне энергий превышают коэффициенты ослабления для образца гранита в среднем на 5 %.

При исследовании коэффициентов ослабления рентгеновского излучения в геологических материалах особое внимание следует уделять наличию скачков поглощения, обусловленных высоким содержанием (на уровне %) отдельных химических элементов. Такими элементами являются Fe, Si, Ca, K и др. Скачек поглощения, величина которого зависит от концентрации элемента, может существенно повлиять на ход зависимости  $\mu(E)$ . Так, например, при энергии ниже *K*-края поглощения железа (7.1 кэВ) коэффициенты в образце ила становятся ниже коэффициентов в образце гранита на 13-14 %, хотя на протяжении всего остального диапазона энергий (7.2 – 12.0) коэффициенты в образце ила превышают коэффициенты в образце гранита (табл. 5).

Для образцов NCS ZC 85005 Beef liver (говяжья печень) и IAEA Soil-7 (почва) также были рассчитаны теоретические массовые коэффициенты ослабления в исследуемом диапазоне энергий с помощью программы WinX-Com. При расчетах использовались концентрации всех химических элементов, указанные в паспортах данных стандартных образцов. Концентрации основных матричных элементов – H, O, N, C в программу WinXCom задавались приблизительно, поскольку содержание данных элементов в паспортах стан-

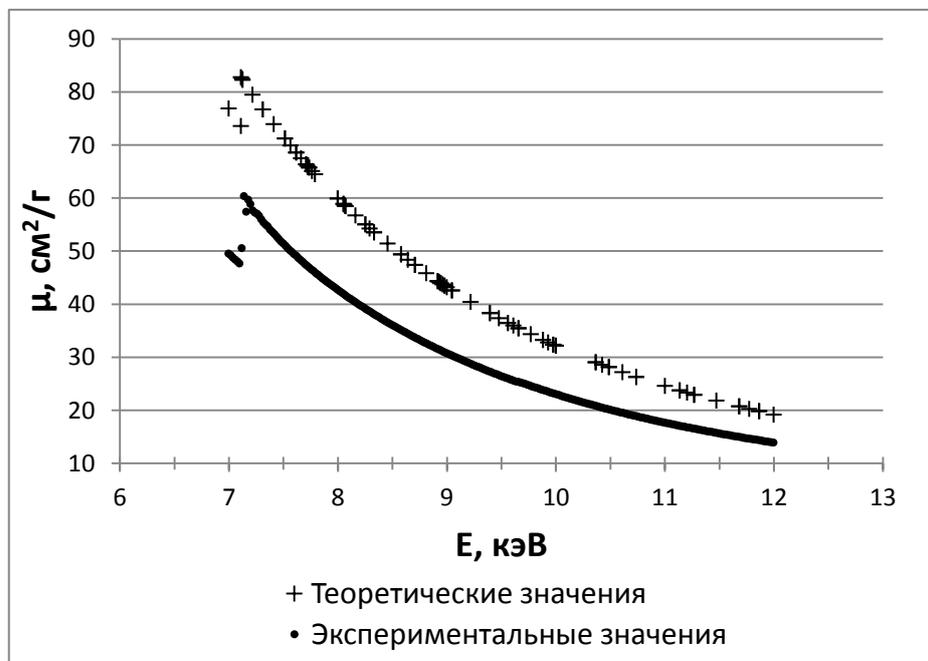
дартных образцов не указано. Также нам не удалось найти литературные данные о содержании Н, О, N, С в печени и почве. В базе данных National Institute of Standards and Technology (NIST) (Национальный институт стандартизации и технологии) указано содержание матричных элементов для некоторых биологических тканей: жировой ткани, ткани молочной железы, мозга, легких, скелетных мышц и др. [123]. В большинстве указанных биологических тканей содержание кислорода находится на уровне 70 %. В данной работе исследуемый стандартный образец печени представляет собой высушенный порошок, в то время как физическое состояние биологических тканей, представленных в базе данных NIST, не указано. Поэтому для моделирования матрицы Beef liver были взяты два варианта матричного состава, различающихся по соотношению С и О: а) Н – 10%, С – 18%, N – 3%, О – 66 %; б) Н – 0.5%, С – 80 %, N – 9 %, О – 8,5%. Для моделирования матричного состава образца почвы Soil 7 были взяты следующие содержания элементов: С – 3.6 %, N – 0.2 %, О – 51.4 %. При выборе данных содержаний мы руководствовались литературными данными о том, что наиболее обильными элементами в почве являются О и Si, в то время как содержание С и N незначительно, и соотношение C/N в почвах в среднем составляет 12.5 [167].

На рис. 8 и 9 показаны графики зависимости экспериментальных и теоретических массовых коэффициентов ослабления  $\mu$ , см<sup>2</sup>/г, от энергии рентгеновского излучения для образца печени и почвы соответственно. При использовании первого варианта матричного состава образца печени (66 % О и 18% С) теоретически рассчитанный коэффициент отличался от экспериментального на 27 - 41 % (рис. 8). Второй вариант матричного состава образца печени подразумевал содержание 80 % С и 8,5% О. При таком составе теоретические значения массового коэффициента ослабления отличались от экспериментальных на 1-3 % (рис. 8).



**Рис. 8.** Теоретические и экспериментальные значения массовых коэффициентов ослабления в стандартном образце печени

Использование двух вариантов состава при теоретическом расчете массовых коэффициентов ослабления наглядно показывает степень расхождений, которые могут возникнуть при отсутствии точной информации о соотношении матричных элементов в образце.



**Рис. 9.** Теоретические и экспериментальные значения массовых коэффициентов ослабления в стандартном образце почвы

При использовании для образца почвы матричного состава 51.4 % O, 3.6 % C и 0.2 % N теоретические значения массовых коэффициентов ослабления превышали экспериментальные значения в среднем на 29 % (рис. 9). Данные расхождения могут быть вызваны тем, что истинное содержание O, C, N и H в исследуемом образце почвы существенно отличается от того, что мы использовали для теоретического расчета. Полученные результаты опубликованы в работе [166].

Таким образом, при проведении теоретических расчетов массовых коэффициентов ослабления для таких сложных и многокомпонентных объектов, как почва, требуется проведение дополнительного анализа для определения концентраций всех химических элементов, составляющих образец. Следует также отметить, что несоответствие теоретических и экспериментальных величин массового коэффициента ослабления может быть вызвано погрешностью определения поверхностной плотности исследуемых образцов. Нам не известно распределение частиц и пустот в таблетках прессованных материалов, и не известна реальная толщина образца. Тем не менее, значения массовых коэффициентов ослабления, полученные экспериментальным путем в данной работе, хорошо согласуются с данными других исследователей, которые измеряли массовые коэффициенты ослабления рентгеновских лучей в данном диапазоне энергий в образцах волоса [168], растительных материалов [144], крови [169], гранита [170]. Литературных данных по исследованию остальных матриц в диапазоне энергий 7-12 кэВ мы не обнаружили.

Значения массовых коэффициентов ослабления, измеренные в данной работе, говорят о том, что разные биологические ткани могут существенно отличаться по своим поглощающим и рассеивающим свойствам, несмотря на то, что их матричный состав представлен одними и теми же биогенными элементами – H, C, N и O. В области энергий рентгеновского излучения 7-12 кэВ разница между поглощающими свойствами растительной и животной

ткани может достигать 47 %; и около 22 % при сравнении животных тканей разного типа. При проведении теоретических расчетов массовых коэффициентов ослабления отсутствие полной информации об элементном составе матрицы исследуемого объекта может приводить к существенным ошибкам. В случае сложных многоэлементных образцов, как, например, почва, расхождение между теоретическими и экспериментальными значениями в области энергий 7-12 кэВ может достигать 29 %.

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

#### 3.3.1. Нормировка спектров на площадь пика комптоновского рассеяния

Известно, что сечение комптоновского рассеяния зависит не только от поляризации первичного излучения, но и от эффективного атомного номера вещества [113]. С помощью программы WinXCom было рассчитано сечение комптоновского рассеяния для некоторых стандартных образцов различной природы, используемых в данной работе (рис. 10).

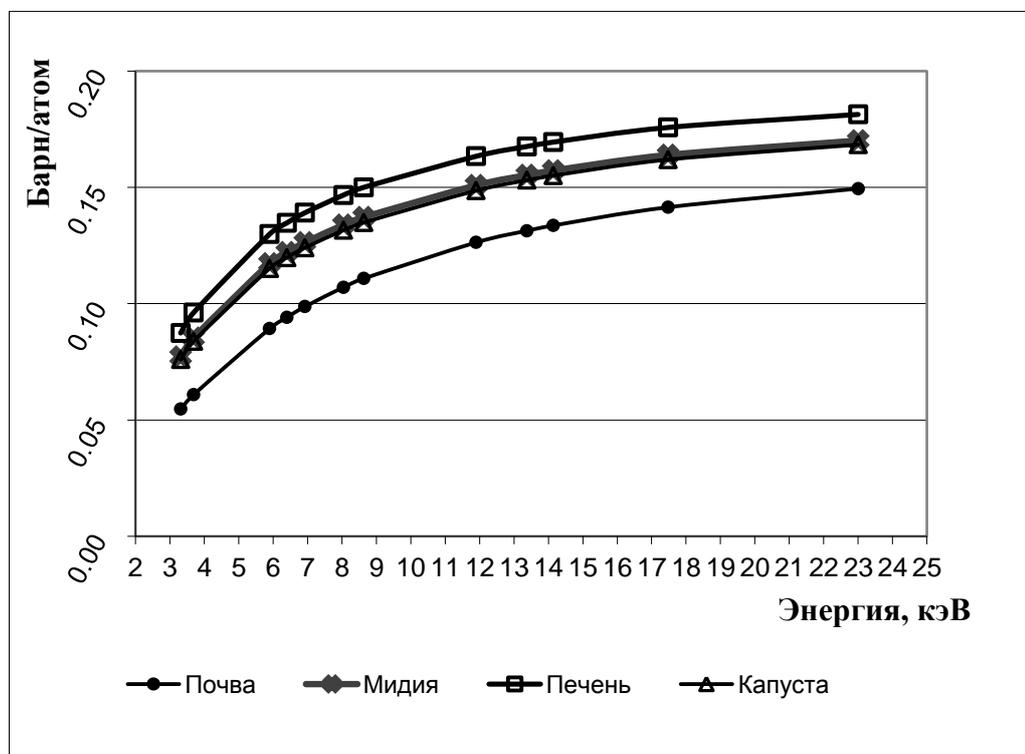


Рис. 10. Сечение комптоновского рассеяния в разных материалах природного происхождения

Из рисунка видно, что для образцов с более легкими, биологическими матрицам сечение комптоновского рассеяния выше, чем для геологических образцов (почва). Однако сечение комптоновского рассеяния отличается и для разных типов биологических тканей. Например, сечение комптоновского рассеяния в образце печени оказалось выше, чем в других биологических материалах (мидия и капуста). Подобные различия, приводящие в итоге к разной интенсивности пика комптоновского рассеяния в измеряемых спектрах, необходимо принять во внимание при использовании нормировки на пик комптоновского рассеяния в анализе образцов с разными матрицами.

Для расчета концентраций по способу внешнего стандарта с поправкой на поглощение (урав. 7 и 8) были выбраны образцы, матрицы которых отличались по своим поглощающим и рассеивающим свойствам (табл. 4 и 5). 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 поглощения данных образцов в исследуемом диапазоне энергий различались на 20-22 % (табл. 4).

Определялись концентрации K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Rb, Sr – элементов, содержание которых было аттестовано в паспортах обоих стандартных образцов. Массовые коэффициенты ослабления для элементов с энергией излучения менее 7 кэВ (K, Ca, Mn, Fe) и более 12 кэВ (Rb, Sr), а также для возбуждающего излучения (23 кэВ) находились с помощью аппроксимации полученных экспериментальных зависимостей  $\mu(E)$  степенной функцией с ее последующей экстраполяцией в область соответствующих энергий.

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. В табл. 7 представлены концентрации химических элементов ( $\pm SD$ ), рассчитанные в образце печени относительно образца тканей устрицы с учетом и без учета поправки на поглощение.

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>K</b>  | 9800 ± 600    | <b>10000 ± 800</b> | 13100 ± 800             |
| <b>Ca</b> | 260 ± 26      | <b>185 ± 11</b>    | 350 ± 40                |
| <b>Mn</b> | 10.7 ± 1.4    | <b>9.08 ± 0.93</b> | 16.4 ± 2.1              |
| <b>Fe</b> | 560 ± 16      | <b>452 ± 37</b>    | 880 ± 25                |
| <b>Cu</b> | 110 ± 7       | <b>96.7 ± 5.4</b>  | 180 ± 12                |
| <b>Zn</b> | 173 ± 12      | <b>165 ± 12</b>    | 284 ± 20                |
| <b>Rb</b> | 22.7 ± 0.7    | <b>23.6 ± 2.7</b>  | 38.2 ± 1.2              |
| <b>Sr</b> | 1.26 ± 0.15   | <b>1.03 ± 0.12</b> | 2.14 ± 0.21             |

$C_{cert}$  – паспортная концентрация элемента;

$C_i$  – рассчитанная концентрация элемента.

Стандартное отклонение найденных концентраций рассчитывалось на основе стандартных отклонений площадей пиков определяемых элементов и стандартных отклонений величин концентраций используемого внешнего стандарта. Использовалась нормировка на площадь пика комптоновского рассеяния. Видно, что концентрации, рассчитанные с учетом поправки на поглощение, совпадают с паспортными. Исключение составили только концентрации Fe и Ca. Возможно, расхождение для этих элементов связано с загрязнением образца, неравномерностью распределения данных элементов, а также с неточностью математической модели, используемой для нахождения массовых коэффициентов ослабления в данном диапазоне энергий. Значения концентраций, рассчитанные без учета поправки на поглощение, в среднем превышают паспортные в 2 раза.

В табл. 8 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.

Концентрации химических элементов в образце Beef liver (*печень*), рассчитанные относительно образца Cabbage (*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.

Для данных материалов массовые коэффициенты ослабления различались более чем на 40 % (табл. 4). Результаты, найденные с учетом поправки на поглощение, для всех элементов кроме K и Ca попадают в интервал паспортных значений. По-видимому, для K и Ca, 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 K, Ca, Mn, Fe, Cu и Zn превышают паспортные значения в несколько раз. Концентрации Br, Sr и Mo, рассчитанные без учета поправки, попадают в интервалы паспортных значений. Вероятно, это связано с тем, что излучение Br, Sr и Mo обладает достаточно высокой энергией и слабо поглощается в данных матрицах, т.е. толщина обоих образцов соответствует «тонкому слою» для данных элементов, когда наблюдается прямая зависимость интенсивности излучения от количества элемента. При этом разная поверхностная плотность таблеток

(или толщина) учитывается при нормировке на пик комптоновского рассеяния, который пропорционален массе излучателя [96].

В табл. 9 и 10 представлены результаты расчетов концентраций ( $\pm SD$ ) химических элементов в образце печени NCS ZC 85005 Beef liver относительно стандартных образцов с геологической матрицей: ОСО 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 9**

**Концентрации химических элементов в образце Beef liver (печень), рассчитанные относительно образца СГ-2 (алюскитовый гранит) 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 $\pm$ 90   | <b>10000 <math>\pm</math> 800</b> | 22750 $\pm$ 280         |
| <b>Ca</b> | 225 $\pm$ 25    | <b>185 <math>\pm</math> 11</b>    | 700 $\pm$ 80            |
| <b>Mn</b> | 14.1 $\pm$ 2.7  | <b>9.08 <math>\pm</math> 0.93</b> | 38 $\pm$ 4              |
| <b>Fe</b> | 426 $\pm$ 17    | <b>452 <math>\pm</math> 37</b>    | 1050 $\pm$ 40           |
| <b>Cu</b> | 95 $\pm$ 15     | <b>96.7 <math>\pm</math> 5.4</b>  | 180 $\pm$ 30            |
| <b>Zn</b> | 170 $\pm$ 40    | <b>165 <math>\pm</math> 12</b>    | 290 $\pm$ 70            |
| <b>Rb</b> | 20.3 $\pm$ 2.7  | <b>23.6 <math>\pm</math> 2.7</b>  | 18.7 $\pm$ 2.5          |
| <b>Sr</b> | 0.84 $\pm$ 0.23 | <b>1.03 <math>\pm</math> 0.12</b> | 0.73 $\pm$ 0.20         |

$C_{cert}$  – паспортная концентрация элемента;

$C_i$  – рассчитанная концентрация элемента.

Из табл. 4 и 5 видно, что массовые коэффициенты ослабления указанных геологических образцов превышают массовые коэффициенты ослабления образца печени в 4-6 раз. Тем не менее, концентрации К, Са, Мп, 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.9, 10).

Концентрации химических элементов в образце Beef liver (*печень*), рассчитанные относительно образца Soil-7 (*почва*) 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.

С ростом атомного номера определяемого элемента степень различий снижается, и концентрации Rb и Sr соответствуют паспортным значениям даже без учета поправки на поглощение (табл.9, 10). Это связано с низкой степенью поглощения характеристического излучения (13.4 и 14.1 кэВ) данных элементов в рассматриваемых матрицах.

В целом, при использовании нормировки на площадь пика комптоновского рассеяния в анализе по способу внешнего стандарта с поправкой на поглощение можно добиться достоверных количественных результатов даже при анализе материалов, чьи поглощающие и рассеивающие свойства различаются в несколько раз.

### 3.3.2. Нормировка спектров на величину тока накопительного кольца за время измерений

В табл. 11 показаны значения концентраций ( $\pm SD$ ), найденные в образце печени NCS ZC 85005 Beef liver (поверхностная плотность 0.022 г/см<sup>2</sup>) от-

носителем образца листьев капусты WEPAL IPE sample 899 Cabbage (поверхностная плотность 0.051 г/см<sup>2</sup>) при использовании нормировки на ток накопительного кольца.

Т а б л и ц а 11

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.

В целом, 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: для Fe, Cu, Br и Mo, с учетом стандартных отклонений, различия между паспортными и рассчитанными значениями минимальны. Тем не менее, результаты, полученные для этих же образцов с использованием нормировки на площадь пика комптоновского рассеяния, были гораздо ближе к паспортным для всех элементов (табл. 8).

Результаты, полученные с нормировкой на ток и без учета поправки на поглощение (табл. 11), превышают паспортные концентрации для K, Ca, Mn; ниже паспортных – для Zn, Br, Sr, Mo; и идеально совпадают с паспортными

концентрациями для Fe и Cu. Тенденция изменения полученных результатов с ростом атомного номера определяемого элемента очень интересна и связана, по-видимому, с переходом от «насыщенного слоя» к «промежуточному» и «тонкому». Показанная зависимость между атомным номером и измеряемой интенсивностью, которая служит средством для расчета концентрации, очень сложна и вряд ли может быть использована на практике. Сюда вносят вклад как степень различия массовых коэффициентов ослабления стандартного и исследуемого образца, так и толщина образцов.

В табл. 12 и 13 представлены результаты расчетов концентраций ( $\pm SD$ ) химических элементов в образце печени NCS ZC 85005 Beef liver относительно стандартных образцов с геологической матрицей: ОСО 353-07 СГ-2 (алюскитовый гранит) и IAEA Soil-7 (почва).

**Т а б л и ц а 12**

**Концентрации химических элементов в образце Beef liver (печень), рассчитанные относительно образца СГ-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 $\pm$ 180 | <b>10000 <math>\pm</math> 800</b> | 45100 $\pm$ 600         |
| <b>Ca</b> | 446 $\pm$ 50    | <b>185 <math>\pm</math> 11</b>    | 1400 $\pm$ 160          |
| <b>Mn</b> | 28 $\pm$ 3      | <b>9.08 <math>\pm</math> 0.93</b> | 74 $\pm$ 8              |
| <b>Fe</b> | 840 $\pm$ 30    | <b>452 <math>\pm</math> 37</b>    | 2080 $\pm$ 80           |
| <b>Cu</b> | 189 $\pm$ 30    | <b>96.7 <math>\pm</math> 5.4</b>  | 350 $\pm$ 60            |
| <b>Zn</b> | 340 $\pm$ 90    | <b>165 <math>\pm</math> 12</b>    | 570 $\pm$ 140           |
| <b>Rb</b> | 40 $\pm$ 5      | <b>23.6 <math>\pm</math> 2.7</b>  | 37 $\pm$ 5              |
| <b>Sr</b> | 1.7 $\pm$ 0.4   | <b>1.03 <math>\pm</math> 0.12</b> | 1.4 $\pm$ 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. Расхождение минимально лишь для концентраций Br и Sr, полученных с учетом поправки на поглощение. Нужно отметить, что результаты, полученные для тех же самых образцов при использовании нормировки на пик комптоновского рассеяния, соответствовали паспортным для всех определяемых элементов.

### 3.3.3. Нормировка спектров на сигнал внешнего монитора интенсивности

В качестве внешнего монитора интенсивности возбуждающего излучения использовалась майларовая пленка с напыленным на нее слоем Ni, толщиной 8 нм. Пленка располагалась непосредственно на поверхности измеряемого образца. Подобный монитор для контроля интенсивности возбуждающего излучения использовался в работе [88] и был изготовлен из тонкой алюминиевой фольги. Функция данного монитора аналогична функции

ионизационной камеры. Он измеряет интенсивность излучения непосредственно перед образцом, и 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 – на величину тока накопительного кольца; на площадь пика комптоновского рассеяния; на сигнал от внешнего монитора (интенсивность  $K_{\alpha}$ -линии Ni). Разница между коэффициентами ослабления образцов мидии и капусты составляла около 30 % (табл. 4). Величины концентраций ( $\pm SD$ ), рассчитанные с учетом поправки на поглощение при трех способах нормировки, представлены в табл. 14.

В данном эксперименте использовались образцы с одинаковой поверхностной плотностью – 0.025 г/см<sup>2</sup>. Из табл. 14 видно, что результаты, полученные с поправкой на поглощение при трех разных способах нормировки, мало отличаются между собой. Также они очень близки к результатам, полученным с нормировкой на площадь пика комптоновского рассеяния без учета поправки на поглощение ( $C^x$ ).

Нужно отметить, что отсутствие расхождений в расчетах с использованием и без использования поправки на поглощение наблюдалось лишь для образцов с близкой поверхностной плотностью и близкими матрицами (различие массовых коэффициентов ослабления  $\leq 30$  %). Поскольку использование нормировки на интенсивность внешнего монитора не привело к существенному изменению результатов, его применение вряд ли целесообразно по сравнению с более простыми средствами – нормировкой на площадь пика комптоновского рассеяния или на величину тока накопительного кольца.

**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> |
| $C_i$ ,<br>мкг/г   | 35600 ±<br>1400 | 47000 ±<br>4000 | 20.1 ±<br>2.4 | 234 ± 12      | 3.2 ± 0.3      | 22.1 ±<br>1.3 | 183       |
| $C_{cert.}$ ,<br>мкг/г                                     | 26940 ±<br>1513 | 46894 ±<br>2605 | 21 ±<br>2.58  | 227 ±<br>29.8 | 2.79 ±<br>1.01 | 17.5 ±<br>1.8 | 169*      |
| $C^x$ ,<br>мкг/г   | 25000 ±<br>1000 | 33700 ±<br>2650 | 16.1 ±<br>2.0 | 202 ± 11      | 2.94 ±<br>0.28 | 20.5 ±<br>1.2 | 178       |
| <b>Нормировка на площадь Kα-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> |
| $C_i$ ,<br>мкг/г   | 34700 ±<br>1400 | 46000 ±<br>4000 | 19.8 ±<br>2.3 | 230 ± 120     | 3.1 ± 0.3      | 21.5 ±<br>1.3 | 178       |
| $C_{cert.}$ ,<br>мкг/г                                     | 26940 ±<br>1513 | 46894 ±<br>2605 | 21 ±<br>2.58  | 227 ±<br>29.8 | 2.79 ±<br>1.01 | 17.5 ±<br>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> |
| $C_i$ ,<br>мкг/г   | 34200 ±<br>1300 | 45000 ±<br>4000 | 19.6 ±<br>2.2 | 225 ± 12      | 3.1 ± 0.3      | 21.2 ±<br>1.3 | 176       |
| $C_{cert.}$ ,<br>мкг/г                                     | 26940 ±<br>1513 | 46894 ±<br>2605 | 21 ±<br>2.58  | 227 ±<br>29.8 | 2.79 ±<br>1.01 | 17.5 ±<br>1.8 | 169*      |

\* - опорные значения концентраций;

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

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

$C^x$  - концентрация элемента, рассчитанная без учета поправки на поглощение.

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). При этом стандартный и исследуемый образец могут иметь разную поверхностную плотность.

При проведении способа внешнего стандарта с поправкой на поглощение нормировка измеренных спектров на площадь пика комптоновского рассеяния оказалась наиболее эффективной при анализе образцов с разными

матрицами и разной поверхностной плотностью. Зависимость сечения комптоновского рассеяния от эффективного атомного номера матрицы (рис. 10) не внесла существенной погрешности в анализ биологических объектов даже при использовании образца с геологической матрицей в качестве внешнего стандарта. Статьи по результатам данной части работы направлены в журналы «Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования»; X-Ray Spectrometry.

Зависимость интенсивности пика комптоновского рассеяния от массы образца и эффективного атомного номера матрицы, вероятно, дополнительно корректируют измеренные интенсивности аналитических линий от образца и внешнего стандарта. Поэтому нормировка на интенсивность пика комптоновского рассеяния показала лучший результат при нахождении концентраций элементов. Величина тока и сигнал внешнего монитора никак не связаны с толщиной и свойствами анализируемых образцов, и их использование в качестве нормировочных параметров не позволило получить удовлетворительные результаты даже с учетом поправки на поглощение.

При использовании в качестве внешнего стандарта образца, массовые коэффициенты ослабления которого и поверхностная плотность близки к таковым для исследуемого объекта, возможно проводить анализ с нормировкой на площадь пика комптоновского рассеяния без учета поправки на поглощение (табл. 13). Это относится к разным видам биологической ткани, поглощающие и рассеивающие свойства которых отличаются максимум на 30 % (табл. 4).

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.

### 3.4. Исследование изменений элементного состава образцов биологических тканей в результате фиксации раствором формалина

При энергии возбуждения 18 кэВ были определены величины концентрации 10 элементов: Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Se, Br, Rb, Sr в свежих образцах миокарда и в образцах, фиксированных в растворе формалина различные промежутки времени: от 4 часов до 6 суток. Найденные концентрации с указанием стандартного отклонения представлены в табл. 15. Значимость различий между концентрациями химических элементов определялась по U-критерию Манна-Уитни, который позволяет сравнение выборок малого объема.

Т а б л и ц а 15

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

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

Содержание Cl за первые четыре часа уменьшилось с 3400 до 50 мкг/г, в дальнейшем не наблюдалось значимых уменьшений. Различия величин концентраций данного элемента в образцах, хранившихся в растворе формалина 4 часа и 2 суток, обусловлены, по-видимому, изначально неравномерным содержанием Cl в тканях разных отделов сердца. Для содержания K в образцах наблюдаются значимые отличия между величинами концентраций в

свежих образцах и во всех образцах, хранившихся в растворе формалина. Через четыре часа концентрация К составила 400 мкг/г, в свежих образцах концентрация К была на уровне 9000 мкг/г. Дальнейшего значимого уменьшения концентрации не наблюдалось. Вероятно, повышенная величина концентрации в образцах, хранившихся 2 суток, объясняется неравномерным распределением К в тканях разных отделов сердца. Для концентрации Са обнаружено значимое отличие между величинами концентраций в свежих образцах и в образцах хранившихся в растворе формалина. В свежих образцах содержание Са составляло 280 мкг/г, в образцах хранившихся 4 часа - 79 мкг/г. Дальнейшее значимое уменьшение величины концентрации Са наблюдается на шестые сутки, когда концентрация составила 31 мкг/г. Величины концентраций Fe в свежих образцах и в образцах, хранившихся 4 часа, не показали значимых отличий. Значимое уменьшение концентрации происходит в образцах, хранившихся в растворе формалина 1 сутки и более. Величина концентрации Си в образцах, хранившихся в формалине 4 часа, не имеет значимых отличий от величины концентрации в свежих образцах. Значимые отличия от содержания Си в свежих образцах наблюдаются для образцов, хранившихся в растворе формалина 1 сутки. Дальнейшее значимое уменьшение содержания Си происходит для образцов, хранившихся в растворе формалина 6 суток. Содержание Zn в образцах, хранившихся в растворе формалина 4 часа и 1 сутки, не имеет значимых отличий от содержания в свежих образцах. Для образцов, хранившихся в растворе формалина 2 суток и более, имеются значимые отличия от содержания в свежих образцах. Содержание Se во всех образцах, хранившихся в растворе формалина, не показало значимых отличий от содержания в свежих образцах.

Содержание Вг в образцах, хранившихся в формалине 4 часа, имеет значимые отличия от содержания в свежих образцах. В свежих образцах величина концентрации Вг составляла 29 мкг/г, в образцах, хранившихся 4 часа – 5.1 мкг/г. Дальнейшего значимого уменьшения величины концентрации Вг не наблюдалось. Различия в концентрациях между образцами, хранившимися

в растворе формалина, вызваны неравномерным распределением Вг в тканях сердца. Содержание Rb в образцах, хранившихся 4 часа, также имеет значимые отличия от содержания в свежих образцах. В свежих образцах величина концентрации Rb составляла 16 мкг/г, в образцах хранившихся 4 часа – 2.5 мкг/г. Величина концентрации Sr в образцах, хранившихся в растворе формалина 4 часа, имела значимые отличия от концентраций в свежих образцах. В свежих образцах содержание Sr составляло 0.45 мкг/г, в образцах, хранившихся в формалине 4 часа, – 0.28 мкг/г.

Резкое уменьшение содержания K, Ca, Cl, Rb, Sr, Вг вызвано биологической ролью ионов этих элементов в живом организме. Потоки ионов K, Ca и Cl через мембрану клетки обеспечивают возникновение и передачу электрического потенциала, что является основой для сократительной работы сердца. В организме эти ионы обладают высокой подвижностью, способностью проходить через мембрану клетки. Rb, Sr и Вг по своим физико-химическим свойствам близки к K, Ca и Cl и являются их спутниками или аналогами.

Ионы Fe, Cu, Zn, Se являются компонентами некоторых ферментов и белков. Большая часть Fe в организме находится в форме гемопротеинов, также Fe связано с негемовыми ферментами и негемовыми протеинами, которые являются необходимыми для транспорта Fe (трансферрины) и для его хранения (ферритин) в организме. Медь является кофактором ряда важных металлоферментов, включая супероксид дисмутазу. Уровни свободного внутриклеточного Zn очень низки, он находится, в основном, в связанном с белками состоянии. Основной протеин, связывающий  $Zn^{2+}$  (у млекопитающих) – металлотионеин, который обеспечивает доставку Zn к ферментам и факторам транскрипции. Se входит в состав фермента антиоксидантной защиты глутатион пероксидазы. Поскольку, при выполнении своих функций Zn, Se, Fe и Cu в основном оказываются окруженными комплексами больших белковых

молекул, это позволяет им дольше задерживаться в ткани. Полученные результаты опубликованы [171].

Таким образом, в образцах биологической ткани (миокарда) массой порядка 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 не отличается от концентрации в свежей ткани даже через 6 суток фиксации в растворе формалина. Несмотря на то, что концентрации таких важных эссенциальных элементов, как Fe, Cu, Zn и Se могут быть достоверно определены в образцах биологических тканей при соблюдении определенных условий фиксации в растворе формалина, для получения наиболее полной картины об элементном составе исследуемой ткани целесообразно использовать заморозку образцов.

## ГЛАВА 4. ЭЛЕМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ ОБРАЗЦОВ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ И РАСТИТЕЛЬНЫХ МАТЕРИАЛОВ.

### 4.1. Определение микроэлементного состава шиповника из разных мест произрастания методом РФА-СИ

#### 4.1.1. Пробоотбор и пробоподготовка

Исследовались зрелые плоды шиповника собачьего (*Rosa Canina*), собранные с растений, произраставших в г. Истаравшане (Таджикистан), в Горном Алтае и в г. Новосибирске. Исследуемые растения в г. Новосибирске произрастали в зонах с разной техногенной нагрузкой: плоды одних растений (три особи) собраны в лесной зоне Центрального сибирского ботанического сада (ЦСБС СО РАН); плоды других растений (три особи) – на расстоянии 3-х метров от перекрестка двух автодорог - пересечения улицы Пирогова и Университетского проспекта, в Советском районе г. Новосибирска. В городе Новосибирске с исследуемых растений, кроме плодов, были отобраны листья (из среднего яруса кустов), и взяты образцы почвы из прикорневой зоны со слоя глубиной 15-20 см. Плоды и листья тщательно промывались деионизованной водой. Каждый плод был разделен на мякоть и семена. Образцы мякоти, семян, листьев и почвы сушили при температуре 45 °С до постоянного веса. Затем они измельчались и растирались в яшмовой ступке. Полученный порошок сушили при температуре 45 °С до постоянного веса.

Из образцов листьев, мякоти и семян прессовали таблетки массой 15-20 мг. Из образцов почвы прессовали таблетки массой 30 мг. Все таблетки имели диаметр 8 мм и прессовались под давлением 150 кг/см<sup>2</sup>.

Для расчета концентраций К, Са, Мn, Fe, Ni, Cu, Zn, Pb, Se, Br, Rb и Sr в плодах, листьях шиповника и почвы из мест его произрастания использовались следующие международные стандартные образцы: NIST 1575 Pine Needles – иглы сосны, В 215 Cabbage leaf – лист капусты, NIST 1571 Orchard Leaves – листья фруктовых деревьев, NIES №2 Pond Sediment – донные от-

ложения, БИЛ-1 №381-9 Байкальский ил, IAEA (Soil-7) – почва. Таблетки, приготовленные из исследуемых и стандартных образцов, имели одинаковую поверхностную плотность. Как показано в разделе 3.3 при использовании стандартных и анализируемых образцов с одинаковой поверхностной плотностью допускается различие коэффициентов ослабления стандартной и исследуемой матрицы не более 30 %. Матрицы указанных стандартных образцов соответствуют матрицам исследуемых образцов.

Все инструменты, используемые в пробоподготовке образцов: скальпель (марка стали ЭИ-515), пинцет (с фторопластовым наконечником), обрабатывались этиловым спиртом марки “ОСЧ” (ГОСТ 10749-80). Перед упаковкой образцов в майларовые пленки последние также обрабатывались этиловым спиртом. Содержание примесей в формалине и майларовой пленке используемых марок определялось ранее и оказалось незначительным [163].

#### *4.1.2. Измерения*

Режим измерения спектров РФА-СИ и параметры станции описаны в разделах 2.6 и 2.3 соответственно.

Все измеренные спектры стандартных и исследуемых образцов нормировались на площадь пика комптоновского рассеяния, поскольку данный способ нормировки оказался наиболее эффективным, как для учета падения величины тока накопительного кольца (разд. 3.1) так и для определения концентраций по способу внешнего стандарта (разд. 3.3).

#### *4.1.3. Результаты*

Для проверки правильности метода РФА-СИ рассчитывались концентрации исследуемых химических элементов в стандартных образцах В 215 Cabbage leaf (листья капусты), NIST 1575 Pine Needles (иглы сосны) и NIST 1571 Orchard leaves (листья фруктовых деревьев) относительно друг друга. В таблице 16 представлены паспортные ( $C_{cert}$ ) и найденные ( $C$ ) концентрации химических элементов с указанием стандартного отклонения. Рассчитанные

концентрации исследуемых элементов попадают в доверительный интервал паспортных значений.

Т а б л и ц а 16

Паспортные ( $C_{cert}$ ) и найденные ( $C$ ) концентрации химических элементов в образце В 215 Cabbage leaf

| Элемент               | $C_{cert}$ , мкг/г         | $C$ , мкг/г                |
|-----------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>К</b>              | $(2.7 \pm 1.5) \cdot 10^4$ | $(2.7 \pm 0.1) \cdot 10^4$ |
| <b>Ca</b>             | $(4.7 \pm 2.6) \cdot 10^4$ | $(4.8 \pm 0.2) \cdot 10^4$ |
| <b>Mn</b>             | 21 $\pm$ 3                 | 20 $\pm$ 1                 |
| <b>Fe</b>             | $(23 \pm 3) \cdot 10$      | $(24 \pm 5) \cdot 10$      |
| <b>Cu</b>             | 2.8 $\pm$ 1.0              | 2.3 $\pm$ 0.8              |
| <b>Zn</b>             | 17.5 $\pm$ 1.75            | 21.4 $\pm$ 2.8             |
| <b>Br</b>             | 53.1*                      | 69                         |
| <b>Sr</b>             | 169*                       | 210                        |
| <b>Pb</b>             | 0.909 $\pm$ 0.319          | 0.884 $\pm$ 0.206          |
| <b>Rb<sup>×</sup></b> | 12.0*                      | 11.4                       |

\* - опорные значения концентраций;

× - концентрация Rb рассчитана для стандартного образца NIST 1571 Orchard leaves.

Сходимость результатов анализа оценивалась на основе 8 измерений образца мякоти плодов шиповника (табл. 17). При оценке сходимости при каждом следующем измерении образец поворачивался на угол  $\approx 45^0$  по отношению к предыдущему положению.

Т а б л и ц а 17

Сходимость результатов анализа

| Элемент   | $C$ , мкг/г      | $S_r$ , % |
|-----------|------------------|-----------|
| <b>К</b>  | $1.6 \cdot 10^4$ | 4         |
| <b>Ca</b> | $6.5 \cdot 10^3$ | 5         |
| <b>Mn</b> | 12               | 2         |
| <b>Fe</b> | 20               | 15        |
| <b>Cu</b> | 3.0              | 3         |
| <b>Zn</b> | 9.7              | 2         |
| <b>Br</b> | 2.7              | 7         |
| <b>Rb</b> | 4.9              | 2         |
| <b>Sr</b> | 20               | 1         |

Относительное стандартное отклонение изменяется от 1 до 7 % для всех определяемых элементов. Для железа относительное стандартное отклонение составляет 15 %, что, по-видимому, объясняется его неравномерным распределением в образце.

Пределы обнаружения с доверительной вероятностью 90 % рассчитывались по стандартным образцам В 215 Cabbage leaf и NIST 1575 Pine Needles по формуле [172]:

$$C_{MIN}^{P=0.90} = 3.29 \cdot C_{STD} \cdot \frac{\sqrt{N_{BGR}}}{N_P - N_{BGR}}, \quad (12)$$

где  $N_P$  – интегральная площадь пика линии ( $K_{\alpha,2}$ ) определяемого элемента в стандартном образце,  $N_{BGR}$  – интегральная площадь фона,  $C_{STD}$  – концентрация определяемого элемента в стандартном образце. Найденные пределы обнаружения показаны в табл. 18.

Как видно из табл. 18, значения варьируются в зависимости от элемента и используемого стандартного образца. В РФА-СИ анализе величина пределов обнаружения зависит от атомного номера элемента, энергии возбуждения образца, типа используемой аналитической линии и ее положения на спектре. В целом, заметно снижение пределов обнаружения при переходе от легких элементов (К) к более тяжелым (Se).

Пределы обнаружения ( $C_{min}$ ) при энергии возбуждения 23.0 кэВ для международных стандартных образцов NIST 1575 Pine Needles (*иглы сосны*); В 215 Cabbage leaf (*листья капусты*)

| Элемент   | $C_{ref}$ , Cabbage leaf, мкг/г | $C_{min}$ Cabbage leaf, мкг/г | $C_{ref}$ , Pine Needles, мкг/г | $C_{min}$ Pine Needles, мкг/г |
|-----------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| <b>K</b>  | $2.7 \cdot 10^4$                | 60                            | $3.7 \cdot 10^3$                | 15                            |
| <b>Ca</b> | $4.7 \cdot 10^4$                | 25                            | $4.1 \cdot 10^3$                | 10                            |
| <b>Cr</b> | 1.2                             | 0.8                           | 2.6                             | 2                             |
| <b>Mn</b> | 21                              | 1.4                           | $68 \cdot 10$                   | 1                             |
| <b>Fe</b> | $23 \cdot 10$                   | 2                             | $20 \cdot 10$                   | 1                             |
| <b>Ni</b> | 0.37                            | 0.1                           | 3.5                             | 0.5                           |
| <b>Cu</b> | 2.8                             | 0.85                          | 3                               | 0.47                          |
| <b>Zn</b> | 18                              | 0.7                           | н/а                             | -                             |
| <b>As</b> | 0.58                            | 0.3                           | н/а                             | -                             |
| <b>Se</b> | 0.04                            | 0.01                          | н/а                             | -                             |
| <b>Br</b> | 53                              | 4                             | 9                               | 1.3                           |
| <b>Rb</b> | н/а                             | -                             | 11.7                            | 0.2                           |
| <b>Sr</b> | $17 \cdot 10$                   | 0.23                          | 4.8                             | 0.15                          |
| <b>Mo</b> | 2.4                             | 0.7                           | н/а                             | -                             |
| <b>Cd</b> | 0.22                            | 0.06                          | н/а                             | -                             |
| <b>Sb</b> | н/а                             | -                             | 0.2                             | 0.08                          |
| <b>Pb</b> | 0.91                            | 0.9                           | 10.8                            | 2                             |

$C_{ref}$  – паспортное значение концентрации элемента в стандартном образце;  
н/а – концентрация химического элемента не аттестована.

Концентрации элементов в мякоти и семенах плодов шиповника приведены на рис. 1-6 приложения. Из представленных диаграмм видно, что формирование более богатого комплекса микроэлементов происходит в мякоти плодов шиповника, произрастающего в г. Истаравшане (Таджикистан). Для данных образцов средние концентрации К, Са, Мп, Fe, Cu и Zn в плодах превышают концентрации этих элементов в плодах растений из других территорий. Возможно, это связано с наличием в почве больших концентраций биодоступных форм указанных элементов. В мякоти плодов растений, произрастающих возле автодороги, (Новосибирск) концентрации эссенциальных элементов: Мп, Fe – в несколько раз ниже, по сравнению с остальными ис-

следуемыми территориями. В плодах шиповника с автодороги обнаружены также достоверно более низкие концентрации Rb и Sr (рис. 2 прил.). О биологической роли Rb, Sr и Br известно крайне мало, хотя данные элементы присутствуют во всех живых организмах. Информация о концентрациях микроэлементов, роль которых в живом организме плохо изучена (Rb, Sr, Br), поможет выяснить биохимические функции данных элементов и корректно использовать лекарственные растения в лечебной практике.

Интересно отметить, что в мякоти и семенах плодов шиповника со всех исследуемых территорий между содержанием Cu и Zn имеется постоянное соотношение – 1 : 2 (рис. 3, 5, 6 прил.).

Содержание химических элементов в семенах (рис. 4-6 прил.) совершенно другое, чем в мякоти, поскольку их функция в растении иная. Семена – источник питательных веществ для развивающегося растения. Наибольшее содержание Mn и Fe находится в семенах растений, произрастающих в лесной зоне г. Новосибирска. Данные элементы крайне важны в жизни растения и являются активными участниками процесса фотосинтеза [173, 174], следовательно, закладка достаточных концентраций этих элементов в семенах необходима для нормального развития зародыша.

На рис. 7-8 приложения приведены концентрации химических элементов в листьях растений, произрастающих на территории города Новосибирска в зонах с разной техногенной нагрузкой (лесная зона и зона возле автодороги). Следует отметить, что в листьях шиповника из лесной зоны концентрация Mn в 4 раза выше, чем концентрация Mn в листьях шиповника с автодороги. Содержание остальных элементов либо не имеет достоверных отличий, либо отличается незначительно.

На рис. 9-11 приложения представлен элементный состав почвы лесной зоны и зоны возле автодороги (Новосибирск), на которых произрастал исследуемый шиповник. Содержание химических элементов в почве лесной зоны и зоны возле автодороги не имело достоверных различий по всем элементам,

кроме свинца. Концентрация свинца в почве возле автодороги превышала концентрацию свинца в почве лесной зоны в 6 раз. Несмотря на это, количество свинца в листьях, плодах и семенах шиповника, выросшего на почве с повышенной концентрацией свинца, было ниже предела обнаружения (0.9 мкг/г) и не превышало ПДК.

Как видно из результатов работы, элементный состав плодов шиповника, отобранных с растений из разных мест произрастания, варьируется в той или иной степени для разных элементов. Концентрации Mn, Fe и Sr между разными территориями отличаются в разы, а концентрации K, Ca, Cu, Zn, Rb и Br не имеют подобных ярко выраженных отличий (рис. 1-6 прил.).

Обнаружение более низких концентраций эссенциальных элементов: Mn, Fe в плодах и листьях растений, произраставших возле автодороги (г. Новосибирск), хорошо согласуется с литературными данными, которые говорят о снижении концентраций органических форм железа в придорожных почвах и об общем ухудшении их плодородных качеств [175].

Элементный анализ плодов шиповника показал наличие более высоких концентраций эссенциальных элементов (K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn) в плодах шиповника из г. Истаравшан (Таджикистан). Наибольшее содержание Mn и Fe (элементов, необходимых для процесса фотосинтеза) находится в семенах растений из лесной зоны (Новосибирск). У шиповника, произраставшего возле автомобильной дороги, несмотря на повышенную концентрацию Pb в почве, содержание Pb в листьях и плодах не превышает ПДК и находится ниже предела обнаружения (0.9 мкг/г). Но у этих же растений, концентрации эссенциальных элементов: Mn, Fe в мякоти плодов и листьях в несколько раз ниже, по сравнению с растениями из остальных исследуемых территорий. Результаты опубликованы [176].

## **4.2. Исследование элементного состава и межэлементных корреляций в легких и печени крыс при алиментарном ожирении**

### *4.2.1. Экспериментальная часть*

ГУ НИИ Региональной патологии и патоморфологии СО РАМН для исследования элементного состава печени и легких крыс при алиментарном ожирении были предоставлены фрагменты тканей легких и печени от крыс линии Вистар контрольной и опытных групп. Контрольная группа животных содержалась на рационе вивария, а в двух опытных группах к этому рациону добавляли свиное сало, которое было доступно на протяжении всего эксперимента. Крысам 1-ой опытной группы в питьевую воду не добавляли цинк. Крысы 2-ой опытной группы получали серноокислый цинк с питьевой водой из расчета 151 мг цинка на 1 литр (т.е. за 1 сутки каждая крыса дополнительно получала 0.22-0.30 мг цинка). Крысы получали добавку цинка, поскольку известно его терапевтическое влияние при ожирении у людей. В эксперименте участвовали 93 особи (по 31 в каждой группе). Через 3.5 месяца каждую из трех групп животных разделили на две подгруппы. В одной из них крыс перед выведением из эксперимента не кормили в течение 12 ч., а в другой за 2 часа до умерщвления животные съедали свиное сало из расчета 1 г на 100 г массы тела. Животные забивались под этаминаловым наркозом (4мг/100 г массы тела) кровопусканием. Фрагменты легочной ткани и печени для определения макро- и микроэлементного состава в каждом случае забирались из одной и той же зоны органов.

Эксперимент был проведен в соответствии с правилами гуманного обращения с животными на основе Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации.

### *4.2.2. Пробоподготовка*

Всего от ГУ НИИ Региональной патологии и патоморфологии СО РАМН было получено 186 образцов тканей печени и легких. Образцы тканей

после изъятия их из организма замораживали при температуре  $-23^{\circ}\text{C}$  и хранили в замороженном состоянии не более 1 недели. Для сохранения образцов был выбран именно этот способ фиксации (заморозка), поскольку использование раствора формалина приводит к существенным потерям некоторых элементов (раздел 3.4).

Образцы поступали в аналитическую лабораторию в замороженном состоянии и размораживались при комнатной температуре. После размораживания фрагменты биотканей помещались между фторопластовыми пленками и выдерживались под грузом для придания им плоскопараллельной геометрии при комнатной температуре до постоянного веса сухой ткани. После высушивания под грузом образцы биотканей представляли собой пластинки с гладкой поверхностью. Масса образцов составляла не более 20 мг (на сухой вес). Малое количество анализируемой биологической ткани не позволяет растереть каждый образец и спрессовать из него таблетку с известной поверхностной плотностью. Поэтому высушенным образцам с помощью скальпеля придавалась прямоугольная форма. Далее для каждого прямоугольного образца определялась площадь (как произведение длин двух смежных сторон образца) и измерялась масса. После этого для каждого образца рассчитывалась поверхностная плотность, как отношение массы образца к его площади. Средняя поверхностная плотность для 93 образцов легких составила  $0.21 \pm 0.04$  мг/мм<sup>2</sup>. Для 93 образцов печени –  $0.33 \pm 0.06$  мг/мм<sup>2</sup>. Образцы помещались между двумя майларовыми пленками и закреплялись фторопластовыми кольцами.

Для расчета концентраций K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br и Sr в образцах печени и легких использовались стандартные образцы NIES Certified Reference Material No.6 Mussel (мидия), NIST 1566a Oyster tissue (ткань устрицы), NCS ZC 85005 Beef liver (говяжья печень). Используемые стандартные образцы имеют матрицы близкие к исследуемым образцам, что подтверждается результатами измерений массовых коэффициентов ослабления в

стандартных и исследуемых материалах (табл. 4 и 6 в разделе 3.2). Разница в коэффициентах не превышает 30 %, что позволяет использовать способ внешнего стандарта без учета поправки на поглощение при близкой поверхностной плотности стандартных и исследуемых образцов. Из стандартных образцов изготавливались таблетки диаметром 8 мм. Масса навески стандартного образца выбиралась таким образом, чтобы поверхностная плотность таблетки соответствовала поверхностной плотности образца анализируемой ткани. Т.е. для анализа образцов легких использовались таблетки из стандартных образцов массой  $\approx 10$  мг, а для анализа образцов печени –  $\approx 15$  мг.

Все инструменты, используемые в пробоподготовке образцов: скальпель (марка стали ЭИ-515), пинцет (с фторопластовым наконечником), обрабатывались этиловым спиртом марки “ОСЧ” (ГОСТ 10749-80). Перед упаковкой образцов в майларовые пленки последние также обрабатывались этиловым спиртом. Содержание примесей в формалине и майларовой пленке используемых марок определялось ранее и оказалось незначительным [163].

#### *4.2.3. Измерения*

Режим измерения спектров РФА-СИ и параметры станции описаны в разделах 2.6 и 2.3 соответственно.

Все измеренные спектры стандартных и исследуемых образцов нормировались на площадь пика комптоновского рассеяния, поскольку данный способ нормировки оказался наиболее эффективным, как для учета падения величины тока накопительного кольца (разд. 3.1) так и для определения концентраций по способу внешнего стандарта (разд. 3.3).

#### *4.2.4. Результаты*

В образцах печени и легких крыс контрольных и опытных групп были определены концентрации K, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br и Sr. Полученные данные обрабатывали методами вариационной статистики с использованием

критериев Фишера и Стьюдента. В каждой подгруппе животных для концентраций элементов в печени и легких рассчитывались коэффициенты корреляции Спирмена с помощью программы Statistica 6.1 (StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA).

Правильность анализа оценивалась с помощью определения концентраций химических элементов в образце NIES No.6 Mussel относительно двух других стандартных образцов (Bovine Liver и Oyster tissue). Полученные данные представлены в табл. 19.

Т а б л и ц а 19

**Концентрации химических элементов в стандартном образце NIES Mussel №6, рассчитанные относительно других стандартных образцов**

| Элемент   | $C_{ref}$ , мкг/г | $X_{cp} \pm SD$ по Bovine Liver, мкг/г | $X_{cp} \pm SD$ по Oyster Tissue, мкг/г |
|-----------|-------------------|--|---|
| <b>S</b>  | н/а               |  |   |
| <b>Cl</b> | н/а               |  |   |
| <b>K</b>  | 5400±200          | 5400±700                               | 6100±800                                |
| <b>Ca</b> | 1300±100          |  | 1450±150                                |
| <b>Cr</b> | 0,63±0,07         |  | 0,76±0,08                               |
| <b>Mn</b> | 16,3±1,2          | 18,3±0,9                               | 15,9±0,7                                |
| <b>Fe</b> | 158±8             | 175±13                                 | 170±12                                  |
| <b>Ni</b> | 0,93±0,06         |  |   |
| <b>Cu</b> | 4,9±0,3           |  | 5,3±0,4                                 |
| <b>Zn</b> | 106±6             |  | 113±8                                   |
| <b>As</b> | 9,2±0,5           |  | 10,0±0,3                                |
| <b>Se</b> | 1,5*              | 1,96±0,05                              | 1,89±0,05                               |
| <b>Br</b> | н/а               |  |   |
| <b>Rb</b> | н/а               |  |   |
| <b>Sr</b> | 17*               |  | 18,5±0,9                                |

$C_{ref}$  – паспортные концентрации в стандартном образце NIES No.6 Mussel;

$X_{cp}$  – рассчитанная концентрация;

\*- опорное значение;

н/а – концентрация элемента в стандартном образце не аттестована.

Рассчитанные концентрации попадают в интервалы паспортных значений.

Кроме того для проверки правильности было проведено сравнение результатов РФА-СИ анализа исследуемого образца печени, с результатами анализа того же образца методом атомно-эмиссионной спектроскопии с двухструйным дуговым плазматроном (ДДП-АЭС). Значения найденных концентраций с указанием стандартного отклонения представлены в табл. 20.

**Т а б л и ц а 20**

**Сравнение результатов анализа исследуемого образца печени методами РФА-СИ и АЭС-ДДП**

| Элемент   | РФА-СИ, мкг/г | АЭС-ДДП, мкг/г |
|-----------|---------------|----------------|
| <b>K</b>  | 5400 ± 600    | -              |
| <b>Ca</b> | 91 ± 21       | 86 ± 7         |
| <b>Mn</b> | 5.4 ± 0.9     | 6.8 ± 0.5      |
| <b>Fe</b> | 1290 ± 230    | 1050 ± 90      |
| <b>Cu</b> | 14.4 ± 2.7    | 11.0 ± 0.9     |
| <b>Zn</b> | 98 ± 18       | 106 ± 11       |
| <b>Se</b> | 5.0 ± 0.9     | -              |
| <b>Br</b> | 30 ± 3        | -              |
| <b>Rb</b> | 30 ± 5        | -              |
| <b>Sr</b> | 0.090 ± 0.018 | 0.110 ± 0.012  |

Из табл. 20 видно отсутствие значимых различий между концентрациями химических элементов, полученными двумя независимыми методами.

Для оценки сходимости результатов анализа было проведено 9 измерений для одного исследуемого образца печени и 10 измерений для одного исследуемого образца легких. Средние значения концентраций и их относительные стандартные отклонения приведены в табл. 21.

## Сходимость результатов анализа для исследуемых образцов печени и легких

| Элемент   | Печень           |                          | Легкие           |                          |
|-----------|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|
|           | <i>C</i> , мкг/г | <i>S<sub>r</sub></i> , % | <i>C</i> , мкг/г | <i>S<sub>r</sub></i> , % |
| <b>K</b>  | 7400             | 12                       | 5500             | 15                       |
| <b>Ca</b> | 98               | 23                       | 95               | 27                       |
| <b>Mn</b> | 5                | 16                       | 0.8              | 22                       |
| <b>Fe</b> | 580              | 18                       | 220              | 21                       |
| <b>Cu</b> | 10               | 19                       | 1.7              | 18                       |
| <b>Zn</b> | 68               | 18                       | 28               | 18                       |
| <b>Se</b> | 3.1              | 18                       | 0.5              | 17                       |
| <b>Br</b> | 19               | 11                       | 29               | 18                       |
| <b>Rb</b> | 28               | 17                       | 9                | 17                       |
| <b>Sr</b> | 0.11             | 20                       | 0.14             | 23                       |

При оценке сходимости при каждом следующем измерении образец поворачивался на угол  $\approx 45^0$  по отношению к предыдущему положению. Минимальное значение относительного стандартного отклонения получено для брома в образце печени – 11 %, а максимальное, 27 %, – для кальция в образце легких. В среднем относительное стандартное отклонение для определяемых элементов составляет около 20 % в обоих типах исследуемых образцов. Данная случайная ошибка, скорее всего, является следствием неоднородности поверхности и толщины исследуемых образцов, а также может объясняться неомогенным распределением элементов в объеме образца.

Пределы обнаружения определяемых элементов при энергии возбуждения 18 кэВ в стандартном образце печени NCS ZC 85005 Beef liver рассчитывались по формуле (12). Результаты представлены в табл. 22.

Из таблицы видно снижение пределов обнаружения при переходе от легких элементов к более тяжелым. Это связано с тем, что с увеличением атомного номера увеличивается энергия *K*-края поглощения элемента. Чем ближе энергия возбуждения находится к краю поглощения элемента, тем эф-

фактивнее происходит возбуждение его флуоресценции, а, следовательно, снижается предел обнаружения.

Т а б л и ц а 22

Пределы обнаружения определяемых элементов

| Элемент   | $N_P$ , имп. | $N_{BGR}$ , имп. | $C_{STD}$ , мкг/г | $C_{MIN}$ , мкг/г |
|-----------|--------------|------------------|-------------------|-------------------|
| <b>K</b>  | 54994        | 1377             | 10000             | <b>22</b>         |
| <b>Ca</b> | 2552         | 809              | 185               | <b>6.8</b>        |
| <b>Mn</b> | 791          | 415              | 9.08              | <b>0.77</b>       |
| <b>Fe</b> | 57714        | 605              | 452               | <b>0.63</b>       |
| <b>Cu</b> | 14917        | 1197             | 96.7              | <b>0.74</b>       |
| <b>Zn</b> | 32188        | 1533             | 165               | <b>0.66</b>       |
| <b>Se</b> | 111          | 236              | 0.49              | <b>0.22</b>       |
| <b>Br</b> | 1626         | 280              | 3.85              | <b>0.13</b>       |
| <b>Rb</b> | 10517        | 481              | 23.6              | <b>0.16</b>       |
| <b>Sr</b> | 554          | 401              | 1.03              | <b>0.12</b>       |

Максимальный предел обнаружения получен для калия – 22 мкг/г, а минимальный – для стронция: 0.12 мкг/г. Таким образом, при необходимости можно менять энергию возбуждения, добиваясь снижения пределов обнаружения интересующих элементов.

Средние значения концентраций химических элементов в печени и легочной ткани крыс представлены в табл. 1 приложения. В таблице указано среднее содержание элементов с доверительным интервалом ( $p=0.05$ ). Концентрации большинства элементов (K, Ca, Fe, Zn, Se, Br, Rb, Sr) в органах крыс опытных групп не имели достоверных отличий от концентраций у контрольных животных. Это говорит о том, что легкая форма ожирения и умеренное избыточное потребление цинка не влияют на концентрацию химических элементов в печени и легочной ткани.

Исключение составили Cu и Mn, для концентраций которых наблюдались значимые различия между исследуемыми группами животных. Вскоре после употребления свиного сала концентрация меди в легком у крыс с АО

оказалась выше, чем в контрольной группе (табл. 1 приложения). Это указывает на особенности жирового обмена в легочной ткани у крыс с АО. У крыс с алиментарным ожирением, дополнительно принимавших цинк, после еды увеличилась концентрация Mn ( $p = 0.05$ ) в легких. Это указывает на активное участие марганца в переключении метаболизма, возникшего вскоре после приема пищи у крыс данной группы.

Концентрации исследуемых химических элементов между тканями печени и легких сопоставимы (табл. 1 приложения). Тем не менее, во всех подгруппах животных в печени отмечаются более высокие концентрации Fe, Zn, Mn, Cu, Se и Rb, а в легких – Ca, Br, и Sr.

Как в печени, так и в легких обнаружены сильные корреляции между концентрациями химических элементов, характер которых в каждой изучаемой группе животных имел свои особенности. Достоверные значения коэффициентов корреляции Спирмена (с указанием критического значения –  $r$ ) для всех групп животных представлены в табл. 2 и 3 приложения. Из приведенных таблиц видно, что межэлементные корреляции в печени в состоянии физиологического голода в каждой группе крыс отличались характером сочетаний химических элементов, а в группе с АО, не получавших Zn, кроме того, возросло их количество. После употребления свиного сала у крыс контрольной группы и с АО, не получавших цинк, существенно снизилось общее число корреляций, а у крыс, дополнительно принимавших Zn, напротив, оно несколько увеличилось. Результаты работы опубликованы [177-180] и направлены для публикации в журнал «Trace Elements in Medicine and Biology».

В проведенном эксперименте установлено изменение, как сочетаний межэлементных корреляций, так и их общего числа в тканях печени и легких в группах животных с АО. Это свидетельствует об устойчивом изменении метаболизма, вызванного как избыточным поступлением жира, так и цинка, в организм животных. Перераспределение корреляционных связей между хи-

мическими элементами под влиянием различных факторов, воздействующих на метаболизм, происходит за счет оборотного пула химических элементов в организме. Интерпретация конкретной роли биоэлемента в метаболизме на основании межэлементных корреляций затруднена, т.к. каждый химический элемент может активно участвовать во многих биохимических процессах. Межэлементные корреляции целесообразно изучать у максимально большого числа биоэлементов. Выявление межэлементных корреляций позволяет более целенаправленно планировать дальнейшие исследования по изучению метаболизма.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что концентрации химических элементов, а также количество, характер и сила межэлементных корреляций в печени сопоставимы с теми же показателями для легких. Это подтверждает активную роль легких в метаболических процессах [181-186]. Особенности сочетания межэлементных корреляций и их сила в печени и легких изменяются различным образом под влиянием рациона питания, обогащенного жирами, и избытка цинка в питьевой воде.

**В результате проведенного эксперимента установлен ряд наблюдений:**

- в тканях печени и легких здоровых крыс в состоянии физиологического голода формируются сильные межэлементные корреляции;
- у крыс с АО в состоянии физиологического голода происходит увеличение общего числа корреляций в печени и уменьшение их в легких по сравнению с контрольной группой животных. Это перераспределение указывает на стойкое нарушение метаболизма;
- продолжительный прием цинка крысами существенно изменил общее число и характер межэлементных корреляций в печени и легких в состоянии физиологического голода, при этом также происходит устойчивое изменение метаболизма;

- подтверждается положение о том, что биоэлемент в биохимических процессах действует не только самостоятельно, но и опосредованно через химические элементы, метаболически связанные с ним;
- после употребления жирной пищи концентрация химических элементов в печени и легких не изменялась, однако крысы, получавшие цинк и содержащиеся на высокожировом рационе, составили исключение - у них в легочной ткани после еды достоверно увеличивалась концентрация Mn;
- общее число межэлементных корреляций в легких и печени при АО было иным, чем у здоровых животных. У здоровых животных в состоянии физиологического голода это различие незначительное между органами, а у крыс с АО, особенно получавших цинк, общее число межэлементных корреляций по сравнению со здоровыми животными было значительно выше в печени;
- число межэлементных корреляций повышалось в легких и резко снижалось в печени после употребления свиного сала у контрольных крыс и у крыс с АО, не получавших цинк. У крыс, получавших цинк, после приема жирной пищи общее число межэлементных корреляций возросло как в печени, так и в легких. Это отражает динамическую взаимосвязь между метаболическими функциями печени и легких и свидетельствует об активном участии легких в метаболизме пищевого жира. У крыс с АО по сравнению с контрольными животными снижается функция легких в обмене пищевого жира;
- впервые показано активное участие Br, Rb и Sr в образовании корреляционных связей в легких и печени, что отражает их важную роль в метаболизме, а между тем биологическое значение этих химических элементов остается слабо изученным.

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. В результате экспериментов по сравнению эффективности нормировок РФА-спектров показано преимущество использования нормировки на площадь пика комптоновского рассеяния.
2. 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.
3. Поправочные коэффициенты, рассчитанные на основе измеренных коэффициентов ослабления, позволили уменьшить ошибку количественного анализа при различии поглощающих и рассеивающих характеристик стандартного и исследуемого образца.
4. 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.
5. Обоснованы методические подходы для определения K, Ca, V, Cr, Mn, 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.
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.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Скальный А.В. Микроэлементный человек // Химия и жизнь. – 2008. – № 1. – С. 38 – 41.
2. Жолнин А.В. Химия биогенных элементов: конспект лекций по общей химии. Челябинск: ЧелГМА, 2001. – 38 с.
3. Millos J., Costas-Rodríguez M., Lavilla I., Bendicho C. Multielemental determination in breast cancerous and non-cancerous biopsies by inductively coupled plasma-mass spectrometry following small volume microwave-assisted digestion // *Analytica chimica acta*. – 2008. – V. 622. – N 1. – P. 77-84.
4. Flores C.R., Puga M.P., Wrobel K., Sevilla M.E.G., Wrobel K. Trace elements status in diabetes mellitus type 2: possible role of the interaction between molybdenum and copper in the progress of typical complications // *Diabetes research and clinical practice*. – 2011. – V. 91. – N 3. – P. 333-341.
5. Trunova V.A., Zvereva V.V., Churin B.V., Astashov V.V., Anzyreva Yu.A. Macro–micro elementary content of liver and lungs in rats with alimentary adiposity (SRXRF) // *X-Ray Spectrometry*. – 2010. – V. 39. – N 1. – P. 57-62.
6. Tomat A.L., Costa M. Á., Arranz C. T. Zinc restriction during different periods of life: influence in renal and cardiovascular diseases // *Nutrition*. – 2011. – V. 27. – N 4. – P. 392-398.
7. Кос Е.Р., Айтурк З., Илхан А., Акар В., Гурлер М., Бодур М.С. Hair and Serum Trace Element Levels in Alzheimer'S Disease // *Neurobiology of Aging*. – 2014. – V. 35. – N 3. – P. 723-723.
8. Gibney M.J., Macdonald I. A., Roche H.M. Nutrition and metabolism. – Blackwell publishing. – 2003. – 448 с.
9. Hill C.H., Matrone G. Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition elements // *Federation proceedings*. – 1970. – V. 29. – N 4. – P. 1474.

10. Magee, A.C., Matrone, G. Studies on the growth, copper metabolism and iron metabolism of rats fed high levels of zinc // *Journal of nutrition* – 1960. – V. 72. – P. 233-242.
11. Smith S.E., Larson E.J. Zinc toxicity in rats antagonistic effects of copper and liver // *Journal of Biological Chemistry*. – 1946. – V. 163. – N 1. – P. 29-38.
12. Van Reen R. Effects of excessive dietary zinc in the rat and the interrelationship with copper // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 1953. – V. 46. – N 2. – P. 337-344.
13. Mills C.F. Dietary interactions involving the trace elements // *Annual review of nutrition*. – 1985. – V. 5. – N 1. – P. 173-193.
14. L'Abbé M.R., Fischer P.W. The effects of high dietary zinc and copper deficiency on the activity of copper-requiring metalloenzymes in the growing rat // *The Journal of nutrition*. – 1984. – V. 114. – N 5. – P. 813-822.
15. Murthy L., Klevay L.M., Petering H. G. Interrelationships of zinc and copper nutrition in the rat // *The Journal of nutrition*. – 1974. – V. 104. – N 11. – P. 1458-1465.
16. Reinstein N.H., Lonnerdal B., Keen C.L., Hurley L.S. Zinc-copper interactions in the pregnant rat: fetal outcome and maternal and fetal zinc, copper and iron // *The Journal of nutrition*. – 1984. – V. 114. – P. 1266-1279.
17. Hall A.C., Young B.W., Bremner I. Intestinal metallothionein and the mutual antagonism between copper and zinc in the rat // *Journal of inorganic biochemistry*. – 1979. – V. 11. – N 1. – P. 57-66.
18. Cox D.H., Harris D.L. Reduction of liver xanthine oxidase activity and iron storage proteins in rats fed excess zinc // *The Journal of nutrition*. – 1962. – V. 78. – N 4. – P. 415-418.
19. Settlemire C.T., Matrone G. In vivo effect of zinc on iron turnover in rats and life span of the erythrocyte // *The Journal of nutrition*. – 1967. – V. 92. – N. 2. – P. 159-164.

20. Tapia L. Suazo M., Hodar C., Cambiazo V., Gonzales M. Copper exposure modifies the content and distribution of trace metals in mammalian cultured cells //Biometals. – 2003. – V. 16. – N 1. – P. 169-174.
21. Shackelford M.E., Collins T.F.X., Black T.N., Ames M.J., Dolan S., Sheikh N.S., Chi R.K., O'Donnell M.W. Mineral interactions in rats fed AIN-76A diets with excess calcium //Food and chemical toxicology. – 1994. – V. 32. – N 3. – P. 255-263.
22. Golub M.S., Han B., Keen C.L., Gershwin M.L. Developmental patterns of aluminum in mouse brain and effects of dietary aluminum excess on manganese deficiency //Toxicology. – 1993. – V. 81. – N 1. – P. 33-47.
23. Cui X., Okayasu R. Arsenic accumulation, elimination, and interaction with copper, zinc and manganese in liver and kidney of rats //Food and chemical toxicology. – 2008. – V. 46. – N 12. – P. 3646-3650.
24. 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. – N 1. – P. 87-98.
25. Zhang P., Chen C., Horvat M., Jacimovic R., Falnoga I., Logar M., Li B., Zhao J., Chai Z. Element content and element correlations in Chinese human liver //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2004. – V. 380. – N 5-6. – P. 773-781.
26. Huang T.H.L., Wang M.Y. Arsenic species in drinking water, hair, fingernails, and urine of patients with blackfoot disease //Journal of Toxicology and Environmental Health Part A. – 1998. – V. 53. – N 2. – P. 85-93.
27. La Force M.J., Fendorf S. Solid-phase iron characterization during common selective sequential extractions //Soil Science Society of America Journal. – 2000. – V. 64. – N 5. – P. 1608-1615.
28. Kim E.Y., Goto R., Tanabe S., Tanaka H., Tatsukawa R. Distribution of 14 elements in tissues and organs of oceanic seabirds //Archives of Environmental Contamination and Toxicology. – 1998. – V. 35. – N 4. – P. 638-645.

29. Torra M., To-Figueras J., Rodamilans M., Brunet M., Corbella J. Cadmium and zinc relationships in the liver and kidney of humans exposed to environmental cadmium //Science of the total environment. – 1995. – V. 170. – N 1. – P. 53-57.
30. Seixas T.G., Kehrig H.A., Costa M., Fillmann G., Benedetto A.P., Secchi E.R., Souza C.M., Malm Ol., Moreira I. Total mercury, organic mercury and selenium in liver and kidney of a South American coastal dolphin //Environmental pollution. – 2008. – V. 154. – N 1. – P. 98-106.
31. Agusa T., Nomura K., Kunito T., Anan Y., Iwata H., Nobuyuki M., Tatsukawa R., Tanabe S. Interelement relationships and age-related variation of trace element concentrations in liver of striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Japanese coastal waters //Marine pollution bulletin. – 2008. – V. 57. – N 6. – P. 807-815.
32. Ciesielski T., Szefer P., Bertenyi Zs., Kuklik I., Skora K., Namiesnik J., Fodor P. Interspecific distribution and co-associations of chemical elements in the liver tissue of marine mammals from the Polish Economical Exclusive Zone, Baltic Sea //Environment international. – 2006. – V. 32. – N 4. – P. 524-532.
33. Vanoeteren C., Cornelis R., Versieck J. Evaluation of trace elements in human lung tissue I. Concentration and distribution //Science of the total environment. – 1986. – V. 54. – P. 217-230.
34. Badzinski S.S., Flint P.L., Gorman K.B., Petrie S.A. Relationships between hepatic trace element concentrations, reproductive status, and body condition of female greater scaup //Environmental Pollution. – 2009. – V. 157. – N 6. – P. 1886-1893.
35. Welna M., Szymczycha-Madeja A., Pohl P. A comparison of samples preparation strategies in the multi-elemental analysis of tea by spectrometric methods //Food Research International. – 2013. – V. 53. – N 2. – P. 922-930.

36. Ревенко А.Г. Развитие рентгенофлуоресцентного анализа в России в 1991-2010 годах // Журнал аналитической химии. – 2011. – Т. 66. – № 11. – С. 1174-1187.
37. Лисецкая, Л.Г. Методологические вопросы анализа микроэлементов в биосредах // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. –2005. – № 1. – С. 168-173.
38. Moens L. Applications of mass spectrometry in the trace element analysis of biological materials //Fresenius' journal of analytical chemistry. – 1997. – V. 359. – N 4-5. – P. 309-316.
39. Subramanian K.S. Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques //Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. – 1996. – V. 51. – N 3. – P. 291-319.
40. Kwiatek W.M., Kubica B., Grybos R., Krosniak M., Dutkiewicz E.M., Hajduk R. Determination of vanadium in animal tissues by PIXE and AAS //Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. – 2001. – V. 247. – N 1. – P. 175-178.
41. Симонова И.Н., Антонюк М.В., Минеева Е.Е. Микроэлементозы как предикторы развития кардиореспираторной патологии //Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2006. – № 23. – С. 76-79.
42. Carvalho M.L., Marques A.F. X-ray fluorescence spectrometry: applications in trace elements studies in human tissues from patients with cirrhosis //X-Ray Spectrometry. – 2001. – V. 30. – N 6 – P. 397-402.
43. Tomović V.M., Petrovic L.S., Tomovic M.S., Kevresan Z.S., Dzinic N.R. Determination of mineral contents of semimembranosus muscle and liver from pure and crossbred pigs in Vojvodina (northern Serbia) //Food Chemistry. – 2011. – V. 124. – N 1. – P. 342-348.
44. Huang M.D., Krivan V. A direct solid sampling electrothermal atomic absorption spectrometry method for the determination of silicon in biological materials // Spectrochimica Acta Part B. – 2007. – N 62. – P. 297–303.
45. Karadjova I.B., Petrov P.K., Serafimovski I., Stafilov T., Tsalev D.L. Arsenic in marine tissues — The challenging problems to electrothermal and hy-

- dride generation atomic absorption spectrometry // *Spectrochimica Acta Part B*. – 2007. – N 62. – P. 258–268.
46. Maduro G., Vale S., Alves M., Galesio R. Determination of Cd and Pb in biological reference materials by electrothermal atomic absorption spectrometry: A comparison of three ultrasonic-based sample treatment procedures // *Talanta*. – 2006. – N 68. – P. 1156–1161.
47. Lue M., Marco P., Edwin A. Determination of manganese in brain samples by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry // *Talanta*. – 2003. – N 59. – P. 897-904.
48. Soylak M., Onal G. Determination of trace metals by atomic absorption spectrometry after coprecipitation with europium hydroxide // *Journal of Hazardous Materials*. – 2006. – N 137. – P. 1130–1134.
49. Huang R.-J., Zhuang Z.-X., Wang Y.-R., Huang Z.-Y., Wang X.-R., Lee F.S. An analytical study of bioaccumulation and the binding forms of mercury in rat body using thermolysis coupled with atomic absorption spectrometry // *Analytica Chimica Acta*. – 2005. – N 538. – P. 313–321.
50. Bugallo R.A., Segade S.R., Gomez E.F. Comparison of slurry sampling and microwave-assisted digestion for calcium, magnesium, iron, copper and zinc determination in fish tissue samples by flame atomic absorption spectrometry // *Talanta*. – 2007. – N 72. – P. 60–65.
51. Yebra-Biurrun M.C., Cancela-Perez S., Moreno-Cid-Barinaga A. Coupling continuous ultrasound-assisted extraction, preconcentration and flame atomic absorption spectrometric detection for the determination of cadmium and lead in mussel samples // *Analytica Chimica Acta*. – 2005. – N 533. – P. 51–56.
52. Zimmermann S., Messerschmidt J., Bohlen A., Sures B. Determination of Pt, Pd and Rh in biological samples by electrothermal atomic absorption spectrometry as compared with adsorptive cathodic stripping voltammetry and total-reflection X-ray fluorescence analysis // *Analytica Chimica Acta*. – 2003. – N 498. – P. 93–104.

53. Gonchara A.M., Kolmogorov U.P., Gladkikh E.A., Shuvaeva O.V., Beisel N.F., Kolosova N.G. The estimation of the possibilities of synchrotron radiation X-ray fluorescent analysis and atomic spectrometry for the bone's elemental composition determination // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A*. – 2005. – N 543. – P. 271–273.
54. Fairhurst J., Lloyd B., Delves H.T. Determination of selenium in human tissues by atomic absorption spectrometry // *Analytica Chimica Acta*. – 1987. – N 197. – P. 97-104.
55. Elsenhans B., Schmolke G., Kolb K., Stokes J., Forth W. Metal-metal interactions among dietary toxic and essential trace metals in the rat // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 1987. – N 14. – P. 275-287.
56. Shiraishi K., Tanaka G.-I., Kawamura H. Simultaneous multielement analysis of various human tissues by inductively-coupled plasma atomic-emission spectrometry // *Talanta*. – 1986. – N 33. – P. 861-865.
57. Yang Z., Hou X., Jones B.T, Sane D.C., Thomas M.J., Schwenke D.C. Determination of calcium, iron and magnesium in rabbit arteries by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry // *Microchemical Journal*. – 2002. – N 72. – P. 49-54.
58. Zhou J.L., Salvador S.M., Liu Y.P., Sequeira M. Heavy metals in the tissues of common dolphins (*Delphinus delphis*) stranded on the Portuguese coast // *The Science of The Total Environment*. – 2001. – N 273. – P. 61-76.
59. Grotti M., Abelmoschi M.L., Riva S., Soggia F., Frache R. Determination of lead in bone tissues by axially viewed inductively coupled plasma multi-channel-based emission spectrometry // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2005. – N 381. – P. 36-42.
60. Cui Y., Chang X., Zhu X., Jiang N., Hu Z., Lian N. Nanometer SiO<sub>2</sub> modified with 5-sulfosalicylic acid as selective solid-phase extractant for Fe(III) determination by ICP-AES from biological and natural water samples // *Microchemical Journal*. – 2007. – N 86. –P. 23–28.

61. Moens L. Applications of mass-spectrometry in the trace element analysis of biological materials // *Fresenius Journal of Analytical chemistry*. – 1997. – N 359. – P. 309-316.
62. Пашкова Г.В., Смагунова А.Н., Ловцова Н.В., Коржова Е.Н. Изучение возможности использования РФА для контроля содержания никеля в саломасе при производстве маргарина // *Аналитика и контроль*. – 2012. – Т. 6. – № 4. – С. 432-438.
63. Лосев, Н.Ф., Смагунова А.Н. Основы рентгеноспектрального флуоресцентного анализа // М: Химия, 1982. – 208 с.
64. Трунова, В.А. Рентгено-флуоресцентный анализ синхротронным излучением. – Новосибирск: издательство СО РАН, 1997. – 160 с.
65. Okuneva G.N., Karaskov A.M., Trunova V.A., Zvereva V.V., Kliever Ye.E., Volkov A.M., Vlasov Yu.A. Chemical Elements and Structural/Molecular Properties of Myocardium in Infants with Transposition of Great Arteries // *Congenital Heart Disease - Selected Aspects*. ISBN 978-953-307-472-6 Hard cover. Edited by: P. Syamasundar Rao. Publisher: InTech. – 2012. – Chapter 15. – P. 331-348.
66. Kwiatek W.M., Drewniak T., Lekka M., Wajdowicz A. Investigation of trace elements in cancer kidney tissues by SRIXE and PIXE // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. – 1996. – V. 109. – P. 284-288.
67. Banaś A., Kwiatek W. M., Zajac W. Trace element analysis of tissue section by means of synchrotron radiation: the use of GNU PLOT for SRIXE spectra analysis // *Journal of alloys and compounds*. – 2001. – V. 328. – N 1. – P. 135-138.
68. Geraki K., Farquharson M.J., Bradley D.A. Hugtenburg R.P. A synchrotron XRF study on trace elements and potassium in breast tissue // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*. – 2004. – V. 213. – P. 564-568.

69. Trunova V.A., Zvereva V.V., Okuneva G.N., Levicheva E.N. The alteration of interelemental ratios in myocardium under the congenital heart disease (SRXRF) //Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment. – 2007. – V. 575. – N 1. – P. 202-205.
70. Revenko A.G. Specific features of X-ray fluorescence analysis techniques using capillary lenses and synchrotron radiation //Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. – 2007. – V. 62. – N 6. – P. 567-576.
71. Ektessabi A., Yoshida S., Takada K. Distribution of iron in a single neuron of patients with Parkinson's disease //X-Ray Spectrometry. – 1999. – V. 28. – N 6. – P. 456-460.
72. Huiying Y., Jingxia Z., Xiankang W., Jieqing Z., Xianzhou Z. Element distributions and quantitative analysis of a single cell by micro-PIXE and synchrotron radiation XRF //Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. – 1993. – V. 75. – N 1. – P. 563-566.
73. Kinoshita H., Hori Y., Fukumoto T., Ohigashi T., Shinohara K., Hoyashi Y., Ku Y. Novel assessment of hepatic iron distribution by synchrotron radiation X-ray fluorescence microscopy //Medical molecular morphology. – 2010. – V. 43. – N 1. – P. 19-25.
74. Rubio M., Perez R.D., Perez C.A., Eynard A.H., Bongiovanni G.A. Synchrotron microscopic X-ray fluorescence analysis of the effects of chronic arsenic exposure in rat brain //Radiation Physics and Chemistry. – 2008. – V. 77. – N 1. – P. 1-8.
75. Ide-Ektessabi A., Fujisawa S., Sugimura K., Kitamura Y., Gotoh A. Quantitative analysis of zinc in prostate cancer tissues using synchrotron radiation microbeams //X-Ray Spectrometry. – 2002. – V. 31. – N 1. – P. 7-11.
76. Arora M., Kennedy B.J., Ryan C.G., Boadle R.A., Walker D.V., Harland C.L., Lai B., Cai Z., Vogt S., Zoellner H, Chan S.W. The application of synchrotron radiation induced X-ray emission in the measurement of zinc and

- lead in Wistar rat ameloblasts //Archives of oral biology. – 2007. – V. 52. – N 10. – P. 938-944.
77. Van Dyck P., Markowicz A., Van Grieken R. Influence of sample thickness, excitation energy and geometry on particle size effects in XRF //X-Ray Spectrometry. – 1985. – V. 14. – N 4. – P. 183-187.
78. Smith R.D., Campbell J. A., Nielson K. K. Concentration dependence upon particle size of volatilized elements in fly ash //Environmental Science & Technology. – 1979. – V. 13. – N 5. – P. 553-558.
79. Mzyk Z., Baranowska I., Mzyk J. Research on grain size effect in XRF analysis of pelletized samples //X-Ray Spectrometry. – 2002. – V. 31. – N 1. – P. 39-46.
80. Hołyńska B., Markowicz A. Correction method for the particle-size effect in the x-ray fluorescence analysis of 'Thin' and monolayer samples //X-Ray Spectrometry. – 1982. – V. 11. – N 3. – P. 117-120.
81. Markowicz A. Evaluation of a correction method for the particle-size effect in x-ray fluorescence analysis of 'Thin' and monolayer samples //X-Ray Spectrometry. – 1983. – V. 12. – N 4. – P. 134-137.
82. Nielson K.K. Matrix corrections for energy dispersive x-ray fluorescence analysis of environmental samples with coherent/incoherent scattered x-rays //Analytical chemistry. – 1977. – V. 49. – N 4. – P. 641-648.
83. Rousseau R.M. Corrections for matrix effects in X-ray fluorescence analysis—A tutorial //Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. – 2006. – V. 61. – N 7. – P. 759-777.
84. Klockenkämper R., Raith B., Divoux S., Gonsior B., Bruggerhoff S., Jackwerth E. Comparison of different excitation methods for X-ray spectral analysis //Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie. – 1987. – V. 326. – N 2. – P. 105-117.
85. Гладких П.И., Гревцев В.Г., Зелинский А.Ю., Карнаухов И.М., Мочешников Н.И., Мыцыков А.О. Зависимость времени жизни пучка электронов в накопителе НЕСТОР от давления остаточного газа

- //Вісник Харківського Національного Університету ім. ВН Каразіна, серія фізична: Ядра, частинки, поля. – 2007. – № 777. – С. 79-83.
86. Thornagel R., Klein R., Ulm G. The electron storage ring BESSY II as a primary source standard from the visible to the the X-ray range //Metrologia. – 2001. – V. 38. – N 5. – P. 385.
87. Gigante G.E., Gonsior B. Comparison of different excitation methods for X-ray spectral analysis: the case of synchrotron radiation //Fresenius' journal of analytical chemistry. – 2000. – V. 368. – N 7. – P. 644-648.
88. Hayakawa S., Kobayashi K., Gohshi Y. A compact x-ray beam intensity monitor using gas amplified sample current measurement //Review of Scientific Instruments. – 2000. – V. 71. – N 1. – P. 20-22.
89. Kanngießner B., Mantouvalou I., Malzer W., Wolff T., Hahn O. Non-destructive, depth resolved investigation of corrosion layers of historical glass objects by 3D Micro X-ray fluorescence analysis //Journal of Analytical Atomic Spectrometry. – 2008. – V. 23. – N 6. – P. 814-819.
90. Chen T., Huang Z., Huang Y., Xie H., Liao X. Cellular distribution of arsenic and other elements in hyperaccumulator *Pteris nervosa* and their relations to arsenic accumulation //Chinese Science Bulletin. – 2003. – V. 48. – N 15. – P. 1586-1591.
91. Hokura A., Omuma R., Terada Y., Kitajima N., Abe T., Saito H., Yoshida S., Nakai I. Arsenic distribution and speciation in an arsenic hyperaccumulator fern by X-ray spectrometry utilizing a synchrotron radiation source //Journal of Analytical Atomic Spectrometry. – 2006. – V. 21. – N 3. – P. 321-328.
92. Wang X., Qian J., He R., Wei L., Liu N., Zhang Z., Huang Y., Lei H. Delayed changes in T1-weighted signal intensity in a rat model of 15-minute transient focal ischemia studied by magnetic resonance imaging/spectroscopy and synchrotron radiation X-ray fluorescence //Magnetic resonance in medicine. – 2006. – V. 56. – N 3. – P. 474-480.

93. Gao Y., Chen C., Zhang P., Chai Z., He W., Huang Y. Detection of metalloproteins in human liver cytosol by synchrotron radiation X-ray fluorescence after sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis //Analytica chimica acta. – 2003. – V. 485. – N 1. – P. 131-137.
94. Kudryashova A.F., Tarasov L.S., Ulyanov A.A. Some methodical peculiarities of analysis of small-mass samples by SRXFA //Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment. – 1989. – V. 282. – N 2. – P. 673-676.
95. Koepke J., Behrens H. Trace element diffusion in andesitic melts: an application of synchrotron X-ray fluorescence analysis //Geochimica et Cosmochimica Acta. – 2001. – V. 65. – N 9. – P. 1481-1498.
96. Wang H.J., Wang M., Meng X., Wang Y., Li M., Feng W., Zhao Y., Chai Z. Quantitative imaging of element spatial distribution in the brain section of a mouse model of Alzheimer's disease using synchrotron radiation X-ray fluorescence analysis //Journal of Analytical Atomic Spectrometry. – 2010. – V. 25. – N 3. – P. 328-333.
97. Geraki K., Farquharson M. J., Bradley D. A. Concentrations of Fe, Cu and Zn in breast tissue: a synchrotron XRF study //Physics in medicine and biology. – 2002. – V. 47. – N 13. – P. 2327.
98. Farquharson M. J., Geraki K. The use of combined trace element XRF and EDXRD data as a histopathology tool using a multivariate analysis approach in characterizing breast tissue //X-Ray Spectrometry. – 2004. – V. 33. – N 4. – P. 240-245.
99. Михайлин В.В. Синхротронное излучение в спектроскопии. – М. : Унив. кн., 2007. – 160 с.
100. Фетисов Г.В. Синхротронное излучение. Методы исследования структуры веществ //М.: Физматлит. – 2007. – Т. 501. – С. 672.
101. Аношин Г.Н., Кулипанов Г. Н. (ред.). Синхротронное излучение в геохимии: Сборник научных трудов. – Наука. Сиб. отд-ние, 1989. – № 752. – 151 с.

102. Черноруков Н.Г., Нипрук О.В. Теория и практика рентгенофлуоресцентного анализа. Электронное учебно-методическое пособие. Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского. Нижний Новгород. – 2012. – 57 с.
103. Marguí E., Queralt I., Hidalgo M. Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material //TrAC Trends in Analytical Chemistry. – 2009. – V. 28. – N 3. – P. 362-372.
104. Nečemer M., Kump P., Scancar J., Jacimovic R., Simcic J., Pelicon P., Budnar M., Jeran Z., Pongrac P., Regvar M., Vogel-Mikus K. Application of X-ray fluorescence analytical techniques in phytoremediation and plant biology studies //Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. – 2008. – V. 63. – N 11. – P. 1240-1247.
105. Laursen K., Adamsen C.E., Laursen J., Olsen K., Moller J. Quantification of zinc-porphyrin in dry-cured ham products by spectroscopic methods: Comparison of absorption, fluorescence and X-ray fluorescence spectroscopy //Meat science. – 2008. – V. 78. – N 3. – P. 336-341.
106. Ekinci N., Ingeç M. The analysis of leiomyomata uteri and uterus using energy-dispersive X-ray fluorescence spectrometry //Applied Radiation and Isotopes. – 2008. – V. 66. – N 8. – P. 1117-1122.
107. Otaka A., Hokura A., Nakai I. Determination of trace elements in soybean by X-ray fluorescence analysis and its application to identification of their production areas //Food chemistry. – 2014. – V. 147. – P. 318-326.
108. Han X.Y., Zhuo S.J., Shen R.X., Wang P.L., Ji A. Comparison of the quantitative results corrected by fundamental parameter method and difference calibration specimens in x-ray fluorescence spectrometry //Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer. – 2006. – V. 97. – N 1. – P. 68-74.

109. Чупарина Е.В., Гуничева Т.Н. Оценка эффективности учета матричных эффектов способами, используемыми при прямом РФА растений // Аналитика и контроль. – 2004. – Т. 8. – № 2. – С. 152-159.
110. Van Dyck P.M., Van Grieken R.E. Absorption correction via scattered radiation in energy-dispersive X-ray fluorescence analysis for samples of variable composition and thickness //Analytical chemistry. – 1980. – V. 52. – N 12. – P. 1859-1864.
111. Пашкова Г.В., Гуничева Т.Н. Влияние неадекватности органической матрицы стандартных образцов растительных материалов и порошков молока при неdestructивном рентгенофлуоресцентном анализе молока //Аналитика и контроль. – 2006. – Т. 10. – № 2. – С. 200-204.
112. Van Grieken R., Markowicz A. (ed.). Handbook of X-ray Spectrometry. – CRC Press, 2001. – 984 с.
113. Söğüt Ö., Küçükönder A., Büyükkasap E. Dependence on average atomic number of coherent/incoherent scattering intensity ratios in compounds //Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer. – 2004. – V. 87. – N 1. – P. 15-23.
114. Potts P.J., Webb P.C., Williams-Thorpe O. Investigation of a correction procedure for surface irregularity effects based on scatter peak intensities in the field analysis of geological and archaeological rock samples by portable X-ray fluorescence spectrometry //Journal of Analytical Atomic Spectrometry. – 1997. – V. 12. – N 7. – P. 769-776.
115. Kutsenogyi K.P., Makarikova R.P., Milyutin L.I., Tarakanov V.V., Chankina O.V. The use of X-ray fluorescence analysis with synchrotron radiation to measure elemental composition of phytomass and soils //Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment. – 2007. – V. 575. – N 1. – P. 214-217.
116. Храмова Е.П., Боярских И.Г., Чанкина О.В., Куценогий К.П. РФА-СИ для исследования растений в зоне геологической неоднородности

- //Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. – 2012. – № 5. – С. 1-5.
117. Лобанова И. Е., Чанкина О. В. Элементный состав *Astragalus glycyphyllos* //Химия растительного сырья. – 2012. – № 2. – С. 93-99.
118. Чупарина Е.В., Айсуева Т.С., Жапова О.И., Анцупова Т.П. Определение металлов Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Sr, Ba и Pb в лекарственных растениях методом рентгенофлуоресцентного анализа // Аналитика и контроль.– 2008. – С. 2-10.
119. Miskolczi N., Nagy R., Bartha L., Halmos P., Fazekas B. Application of energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry as multielemental analysis to determine the elemental composition of crumb rubber samples //Microchemical journal. – 2008. – V. 88. – N 1. – P. 14-20.
120. Noda T., Tsuda S., Mori M., Takigawa S., Matsuura-Endo C., Kim S., Hashimoto N, Yamauchi H. Determination of the phosphorus content in potato starch using an energy-dispersive X-ray fluorescence method //Food Chemistry. – 2006. – V. 95. – N 4. – P. 632-637.
121. Hondrogiannis E., Peterson K., Zapf C.M., Roy W., Blackney B., Dailey K. The use of wavelength dispersive X-ray fluorescence and discriminant analysis in the identification of the elemental composition of cumin samples and the determination of the country of origin //Food chemistry. – 2012. – V. 135. – N 4. – P. 2825-2831.
122. Gonchar A.M., Kolmogorov U.P., Gladkikh E.A., Shuvaeva O.V., Beisel N.F., Kolosova N.G. The estimation of the possibilities of synchrotron radiation X-ray fluorescent analysis and atomic spectrometry for the bone's elemental composition determination //Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment. – 2005. – V. 543. – N 1. – P. 271-273.
123. NIST <http://physics.nist.gov/PhysRefData/XrayMassCoef/tab2.html>

124. Khuder A., Ahmad M., Hasan R., Saour G. Improvement of X-ray fluorescence sensitivity by dry ashing method for elemental analysis of bee honey //Microchemical Journal. – 2010. – V. 95. – N 2. – P. 152-157.
125. De Jesus E.F. O., Simabuco S.M., dos Anjos M.J., Lopes R.T. Synchrotron radiation X-ray fluorescence analysis of trace elements in Nerium oleander for pollution monitoring //Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. – 2000. – V. 55. – N 7. – P. 1181-1187.
126. Giauque R.D., Jaklevic J. M., Thompson A. C. Biological trace-element measurements using synchrotron radiation //Biological trace element research. – 1987. – V. 12. – N 1. – P. 185-198.
127. Geraki K., Farquharson M. J., Bradley D. A. X-ray fluorescence and energy dispersive x-ray diffraction for the quantification of elemental concentrations in breast tissue //Physics in medicine and biology. – 2004. – V. 49. – N 1. – P. 99.
128. Ковальская Г. А. Количественная интерпретация результатов измерения интенсивности линий характеристического спектра биологических образцов //Сибирский экологический журнал. – 2000. – Т. 1. – С. 93-96.
129. Millar R.H., Greening J.R. Experimental X-ray mass attenuation coefficients for materials of low atomic number in the energy range 4 to 25 keV //Journal of Physics B: Atomic and Molecular Physics. – 1974. – V. 7. – N 17. – P. 2332.
130. İçelli O., Erzeneoğlu S., Boncukçuoğlu R. Measurement of mass attenuation coefficients of some boron compounds and the trommel sieve waste in the energy range 15.746–40.930 keV //Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer. – 2003. – V. 78. – N 2. – P. 203-210.
131. Chantler C.T., Tran C.Q., Barnea Z., Paterson D., Cookson D.J., Balaic D.X. Measurement of the x-ray mass attenuation coefficient of copper using 8.85–20 keV synchrotron radiation //Physical Review A. – 2001. – V. 64. – N 6. – P. 062506-1 - 062506-15.

132. McCrary J.H., Plassamnn E.H., Puckett J.M., Conner A.L., Zimmermann G.W. X-ray attenuation-coefficient measurements //Physical Review. – 1967. – V. 153. – N 2. – P. 307.
133. Ekinci N., Astam N. Measurement of mass attenuation coefficients of biological materials by energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry //Radiation measurements. – 2007. – V. 42. – N 3. – P. 428-430.
134. Han I., Demir L. Mass attenuation coefficients, effective atomic and electron numbers of Ti and Ni alloys //Radiation Measurements. – 2009. – V. 44. – N 3. – P. 289-294.
135. Akar A., Baltas H., Cevik U., Korkmaz F., Okumusoglu N.T. Measurement of attenuation coefficients for bone, muscle, fat and water at 140, 364 and 662 keV  $\gamma$ -ray energies //Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer. – 2006. – V. 102. – N 2. – P. 203-211.
136. Szaloki I., Somogyi A., Braun M., Toth A. Investigation of geochemical composition of lake sediments using ED-XRF and ICP-AES techniques //X-Ray Spectrometry. – 1999. – V. 28. – N 5. – P. 399-405.
137. Pereira M.O., Carvalho Conti C., dos Anjos M.J., Lopes R.T. Correction of radiation absorption on biological samples using Rayleigh to Compton scattering ratio //Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. – 2012. – V. 280. – N 1. – P. 39-44.
138. Bothe H.K. Energy dispersive XRFA of samples with an unknown low atomic number matrix in an unknown intermediate thickness (A tool for a quick trace element determination in geochemical and environmental investigations) //Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie. – 1986. – V. 324. – N 1. – P. 27-32.
139. Tran C.Q., Jonge M.D., Barnea Z., Chantler C.T. Absolute determination of the effect of scattering and fluorescence on x-ray attenuation measurements //Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics. – 2004. – V. 37. – N 15. – P. 3163.

140. Финкельштейн А.Л., Фарков П.М. Аппроксимации коэффициентов ослабления рентгеновского излучения в области энергий 0.1-100 кэВ // Аналитика и контроль. – 2002. – Т. 6. – № 4. С. 377-382.
141. Gerward L., Guilbert N., Jensen K.B., Leving H. WinXCom—a program for calculating X-ray attenuation coefficients //Radiation physics and chemistry. – 2004. – V. 71. – N 3. – P. 653-654.
142. Kerur B.R., Manjula V.T., Lagare M.T., Anil Kumar S. Mass attenuation coefficient of saccharides for X-rays in the energy range from 8 keV to 32 keV //Radiation Measurements. – 2009. – V. 44. – N 1. – P. 63-67.
143. Ménesguen Y., Lépy M.C. Mass attenuation coefficients in the range, K fluorescence yield and  $K\beta/K\alpha$  relative X-ray emission rate for Ti, V, Fe, Co, Ni, Cu and Zn measured with a tunable monochromatic X-ray source //Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms. – 2010. – V. 268. – N 16. – P. 2477-2486.
144. Morabad R. B., Kerur B. R. Mass attenuation coefficients of X-rays in different medicinal plants //Applied Radiation and Isotopes. – 2010. – V. 68. – N 2. – P. 271-274.
145. Welz B., Melcher M. Decomposition of marine biological tissues for determination of arsenic, selenium, and mercury using hydride-generation and cold-vapor atomic absorption spectrometries //Analytical chemistry. – 1985. – V. 57. – N 2. – P. 427-431.
146. Deaker M., Maher W. Determination of selenium in seleno compounds and marine biological tissues using electrothermal atomization atomic absorption spectrometry //J. Anal. At. Spectrom. – 1995. – V. 10. – N 6. – P. 423-431.
147. Буданцев А. Ю. Основы гистохимии: учеб. пособие. – Пушино, 2008. – 58 с.

148. Bush V. J., Moyer T.P., Batts K.P., Parisi J.E. Essential and toxic element concentrations in fresh and formalin-fixed human autopsy tissues //Clinical chemistry. – 1995. – V. 41. – N 2. – P. 284-294.
149. Boskey A. L., Cohen M. L., Bullough P. G. Hard tissue biochemistry: a comparison of fresh-frozen and formalin-fixed tissue samples //Calcified tissue international. – 1982. – V. 34. – N 1. – P. 328-331.
150. Seemann J., Wittig P., Kollmeier H. Trace metal analysis of chromium and nickel in lung tissue fixed and stored in formalin //Pathology-Research and Practice. – 1990. – V. 186. – N 1. – P. 197-201.
151. Gellein K., Flaten T.P., Erikson K.M., Aschner M., Syversen T. Leaching of trace elements from biological tissue by formalin fixation //Biological trace element research. – 2008. – V. 121. – N 3. – P. 221-225.
152. Quan M., Mulders M. S., Meltzer D. G. A. The effect of storage conditions on samples for the evaluation of copper status in blesbok (*Damaliscus pygargus phillipsi*) //Journal of the South African Veterinary Association. – 2002. – V. 73. – N 3. – P. 111-114.
153. Hendrickx F., Maelfait J.P., Mayer A.D., Tack F.M.G., Verloo M.G. Storage mediums affect metal concentration in woodlice (Isopoda) //Environmental Pollution. – 2003. – V. 121. – N 1. – P. 87-93.
154. Sato I., Sera K., Suzuki T., Kobayashi H., Tsuda S. Effects of formalin-preservation on element concentrations in animal tissues //The Journal of toxicological sciences. – 2006. – V. 31. – N 3. – P. 191-195.
155. Sullivan J.M., Pando K.M., Everson R.J., Robinson F.R. The effect of formalin fixation on the concentration of selenium in porcine liver //Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. – 1993. – V. 5. – N 1. – P. 131-133.
156. Hamir A.N., Galligan D.T., Ebel J.G., Manzell K.L., Niu H.S., Rupprecht C.E. Lead concentrations in frozen and formalin-fixed tissues from raccoons (*Procyon lotor*) administered oral lead acetate //Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. – 1995. – V. 7. – N 4. – P. 580-582.

157. Meldrum R.D. Erroneous aluminum and cobalt tissue concentrations from using formalin //Journal of biomedical materials research. – 2001. – V. 57. – N 1. – P. 59-62.
158. Koizumi N., Hatayama F., Sumino K. Problems in the analysis of cadmium in autopsied tissues //Environmental research. – 1994. – V. 64. – N 2. – P. 192-198.
159. Chua-anusorn W., Webb J., Macey D.J., Pootrakul P., Pierre T.G.S. The effect of histological processing on the form of iron in iron-loaded human tissues //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease. – 1997. – V. 1360. – N 3. – P. 255-261.
160. Greaves E.D., Bernasconi G., Wobrauschek P., Strelci C. Direct total-reflection X-ray fluorescence trace element analysis of organic matrix materials with a semiempirical standard //Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. – 1997. – V. 52. – N 7. – P. 923-933.
161. Marguá E., Hidalgo M., Queralt I. Multielemental fast analysis of vegetation samples by wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry: Possibilities and drawbacks //Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. – 2005. – V. 60. – N 9. – P. 1363-1372.
162. Гуничева Т.Н., Васильева И.Е. Изучение распределения элементов в материале стандартного образца состава мышечной ткани Байкальского окуня БОК-2 методом рентгенофлуоресцентного анализа //Аналитика и контроль. – 2012. – Т. 16. – № 3. – С. 318-324.
163. Зверева В.В. Разработка методических подходов для элементного анализа тканей сердца и сосудов человека методом рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения: дис. к.х.н.: 02.00.02. Место защиты: Новосибирск, ИНХ СО РАН, 2009. 131 с.
164. Кочубей Д.И. EXAFS спектроскопия катализаторов. – Наука. Новосибирск, 1992. – 146 с.

165. 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.
166. 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 // Applied Radiation and Isotopes. – 2014. – DOI: 10.1016/j.apradiso.2014.09.017.
167. Papanicolaou A.N., Fox J.F., Marshall J. Soil fingerprinting in the Palouse Basin, USA, using stable carbon and nitrogen isotopes //International Journal of Sediment Research. – 2003. – V. 18. – N 2. – P. 278-284.
168. Kubo H. A simple method of X-ray fluorescence analysis in hair //Physics in medicine and biology. – 1981. – V. 26. – N 5. – P. 867.
169. Hubbell J.H., Seltzer S.M. Tables of x-ray mass attenuation coefficients and mass energy-absorption coefficients //National Institute of Standards and Technology. – 1996.
170. Camargo Moreira A., Roberto Appoloni C. Mass attenuation coefficient of the Earth, Moon and Mars samples over 1keV–100GeV energy range //Applied radiation and isotopes. – 2006. – V. 64. – N 9. – P. 1065-1073.
171. 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 //Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2013. – V. 27. – N 1. – P. 76-77.
172. Вольдсет, Р. Прикладная спектрометрия рентгеновского излучения. Пер. с англ. канд.тех.наук В.П. Варварицы и канд. тех.наук К.И. Щекинаю – М.: Атомиздат, 1977. – 192 с.
173. Ducic T., Polle A. Transport and detoxification of manganese and copper in plants //Brazilian Journal of Plant Physiology. – 2005. – V. 17. – N 1. – P. 103-112.
174. Briat J.F., Curie C., Gaymard F. Iron utilization and metabolism in plants //Current opinion in plant biology. – 2007. – V. 10. – N 3. – P. 276-282.

175. Юрченко В.А., Михайлова Л.С., Беспалова М.В. Исследование влияния автомобильной дороги на экосистемы придорожного пространства // Вестн. Харьковского национального автомобильно-дорожного ун-та. – 2008. – № 43. – С. 29-33.
176. 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.
177. 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 // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2012. – Т. 154. – № 8. – С. 168-171.
178. 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.
179. Чурин Б.В., Трунова В.А., Зверева В.В., Сидорина А.В., Асташов В.В. Влияние цинка на содержание химических элементов в печени крыс на ранних этапах развития ожирения // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 156. – № 8. – С. 161-165.
180. Чурин Б.В., Трунова В.А., Зверева В.В., Сидорина А.В., Асташов В.В. Влияние цинка на содержание химических элементов в легочной ткани при ожирении в эксперименте // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 158. – № 10. – С. 421- 427.
181. Гриппи М.А. // Патофизиология легких. М.: Спб. Издательство БИНОМ. Невский диалект. 1999. – 344 с.
182. Зильбер А.И. // Этюды респираторной медицины. М.: МЕДпресс-информ. 2007. – 792 с.
183. Крыжановский Г.Н. // Основы общей патофизиологии. М.: Медицинское информационное агенство. 2011. – 256 с.

184. Лепеха Л.Н. Система сурфактанта в норме и при патологии органов дыхания с. 156 – 165 в кн.: Респираторная медицина: в 2 т, под ред. Чучалина А.Г. – М.: ГЭОТАР – Медиа, 2007. – Т.1. – 800 с.
185. Сыромятникова И.В., Гончарова В.А., Котенко Т.В. Метаболическая активность легких. Л.: «Медицина». 1987. – 168 с.
186. Триннер К.С. Теплообразовательная функция и щелочность реакции легочной ткани. М.: Издательство Академии наук СССР, 1960. – 107 с.

# Приложение

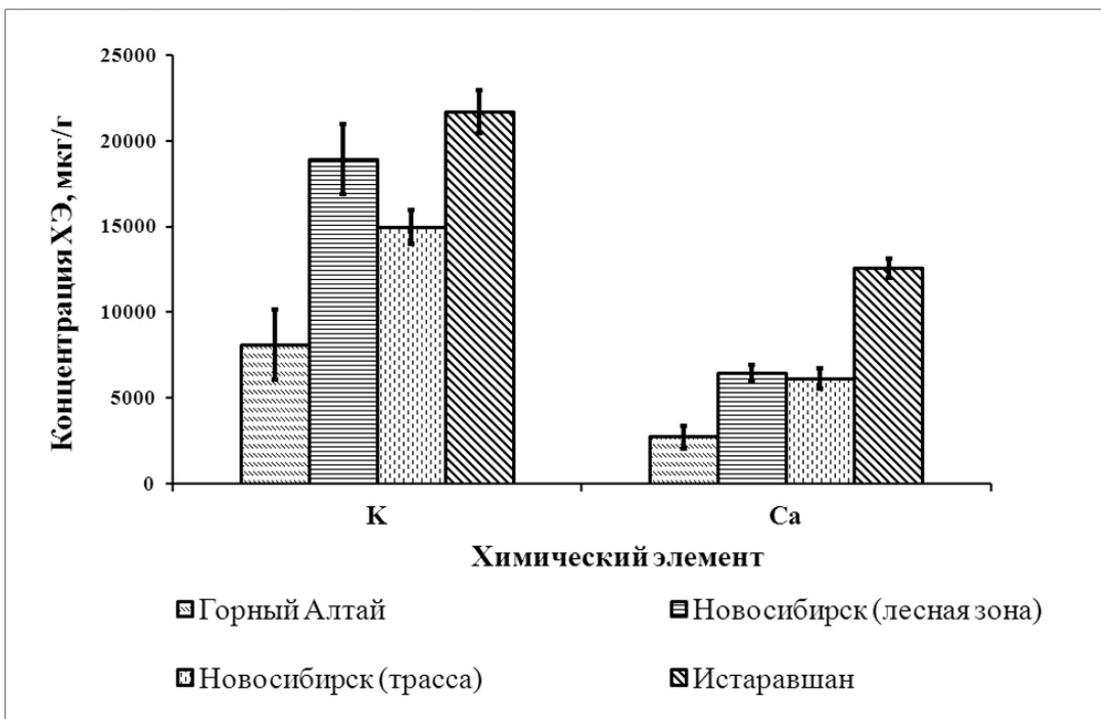


Рис. 1. Концентрации K, Ca в мякоти плодов шиповника, мкг/г

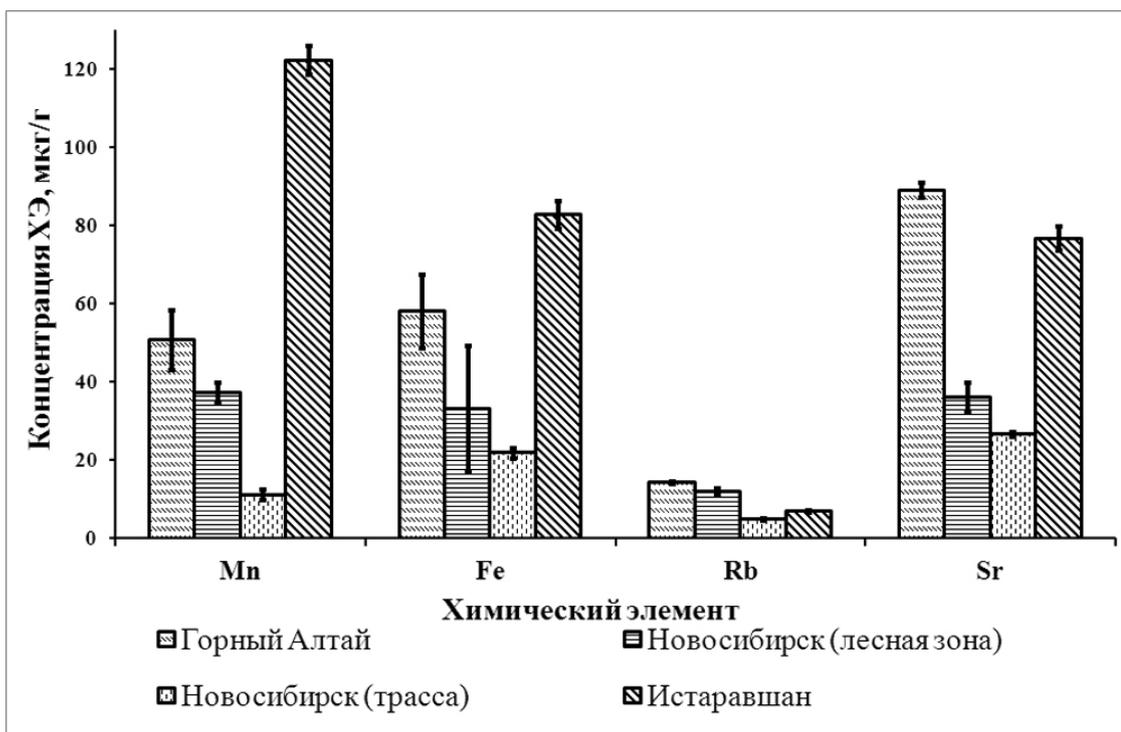


Рис. 2. Концентрации Mn, Fe, Rb, Sr в мякоти плодов шиповника, мкг/г

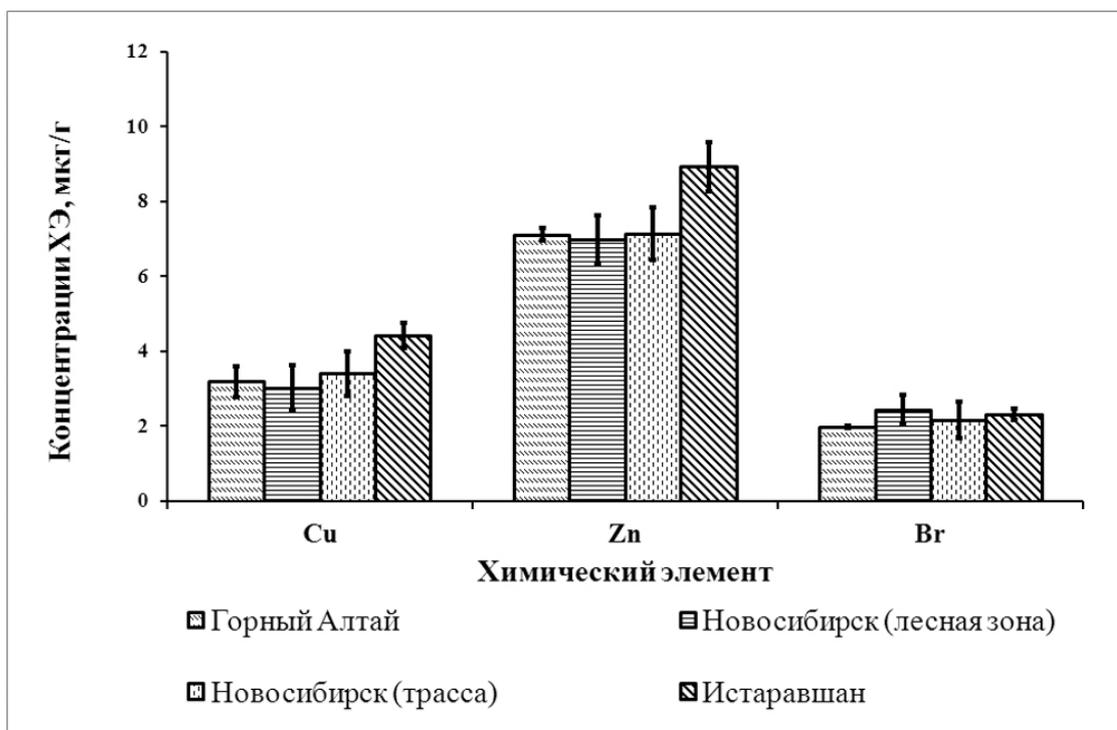


Рис. 3. Концентрации Cu, Zn, Br в мякоти плодов шиповника, мкг/г

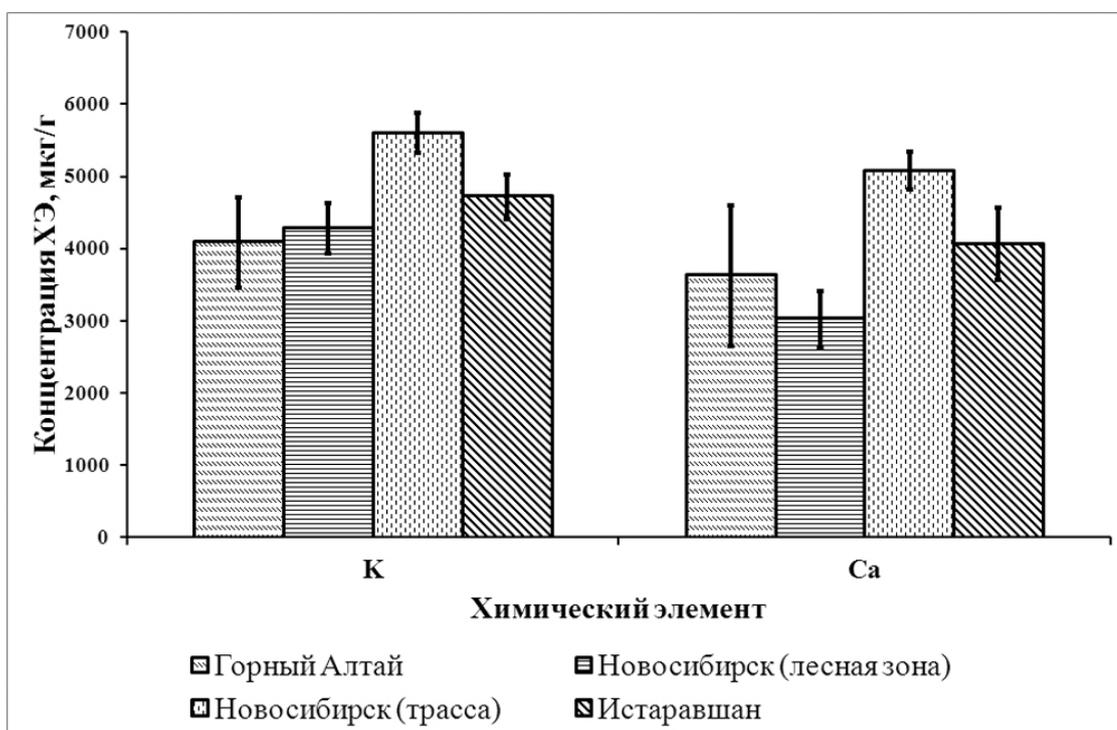


Рис. 4. Концентрации K, Ca в семенах плодов шиповника, мкг/г

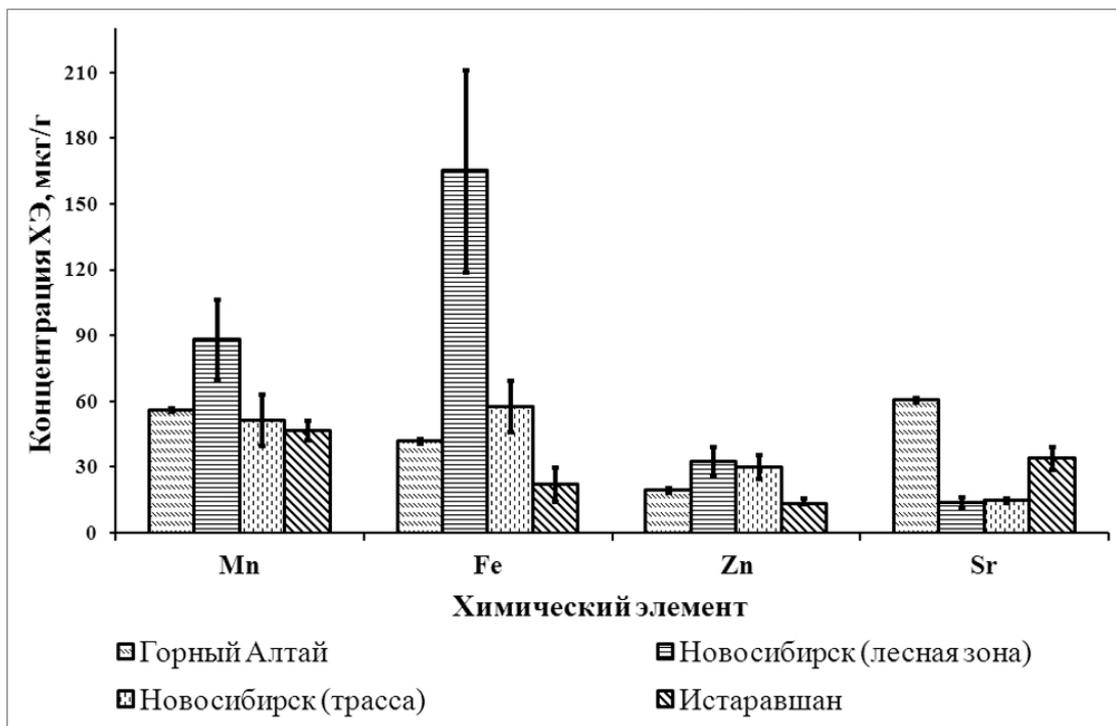


Рис. 5. Концентрации Mn, Fe, Zn, Sr в семенах плодов шиповника, мкг/г

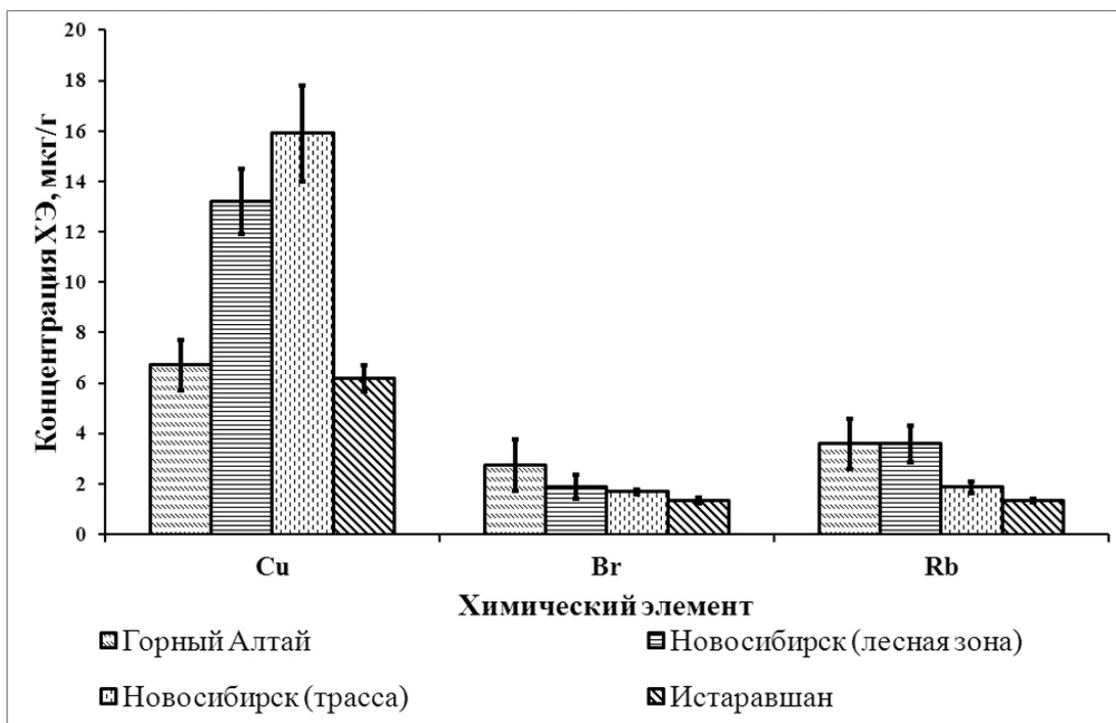


Рис. 6. Концентрации Cu, Br, Rb в семенах плодов шиповника, мкг/г

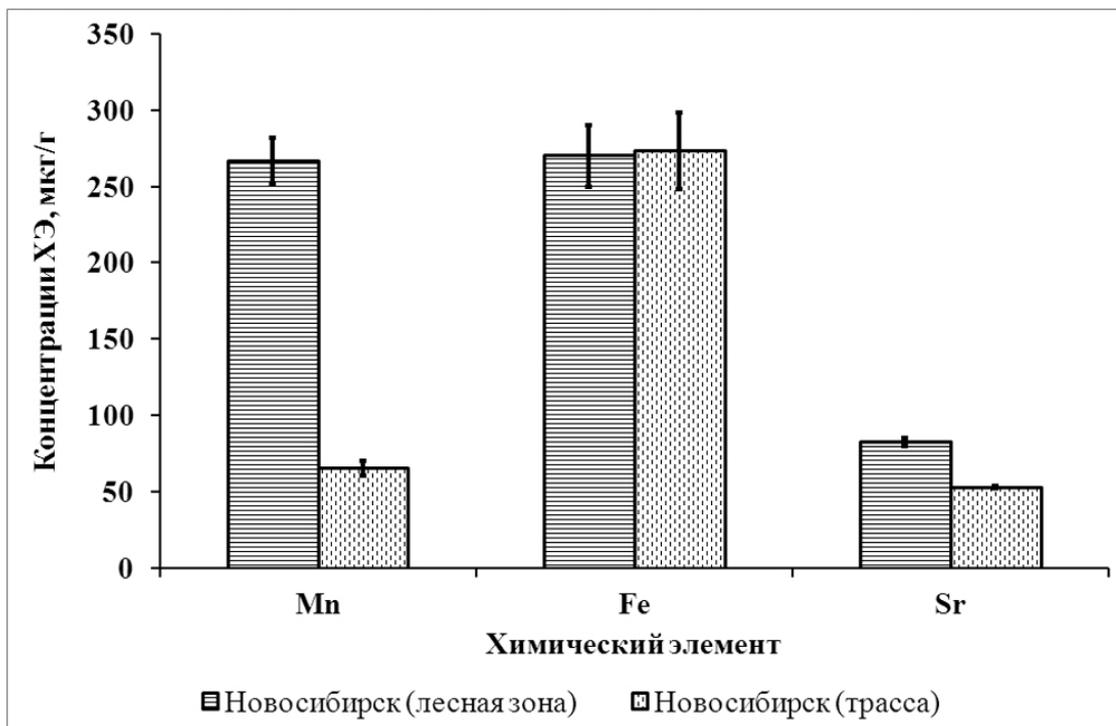


Рис. 7. Концентрации Mn, Fe, Sr в листьях шиповника, мкг/г

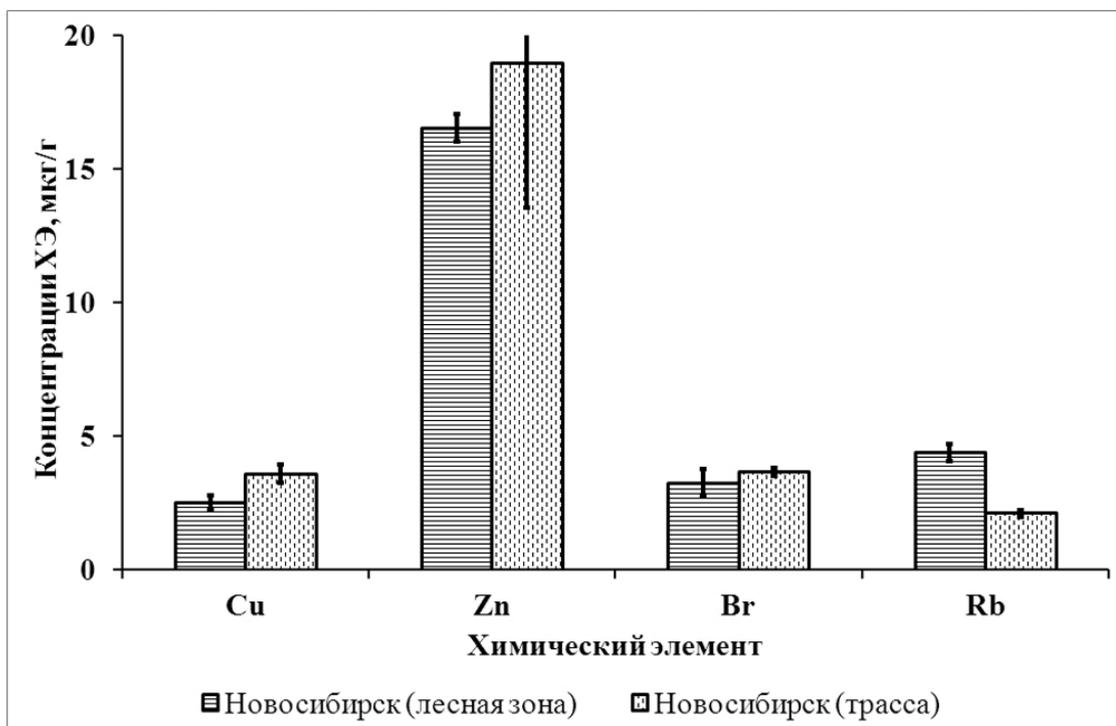


Рис. 8. Концентрации Cu, Zn, Br, Rb в листьях шиповника, мкг/г

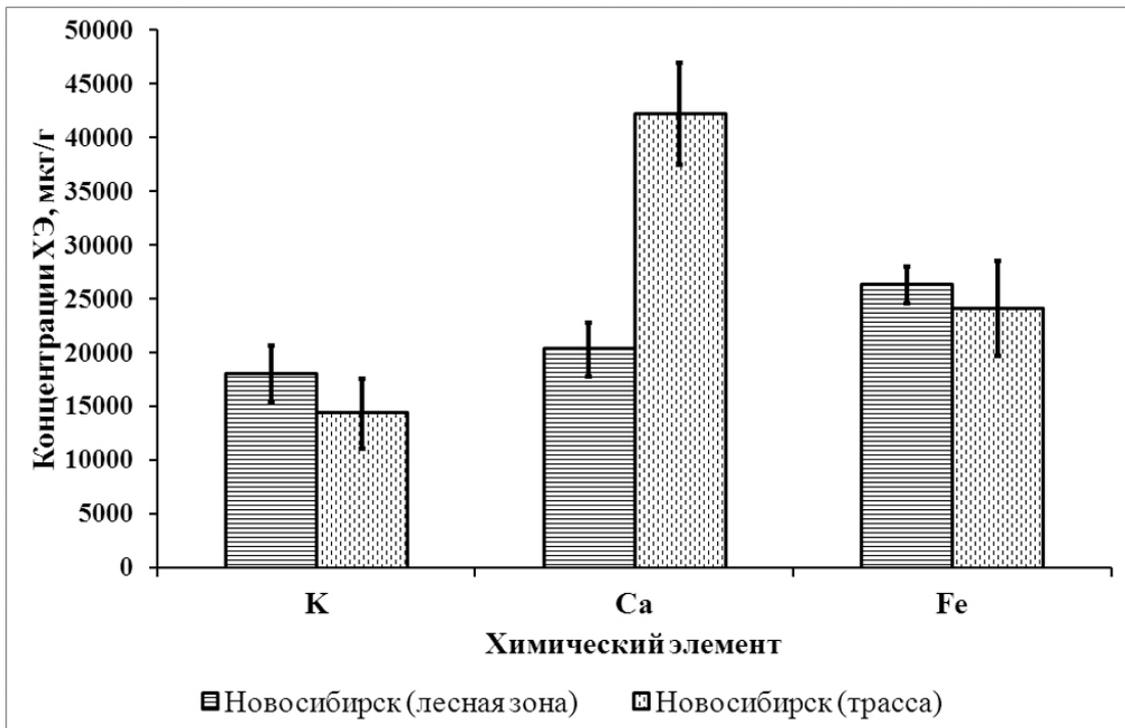


Рис. 9. Концентрации K, Ca, Fe в почве, мкг/г

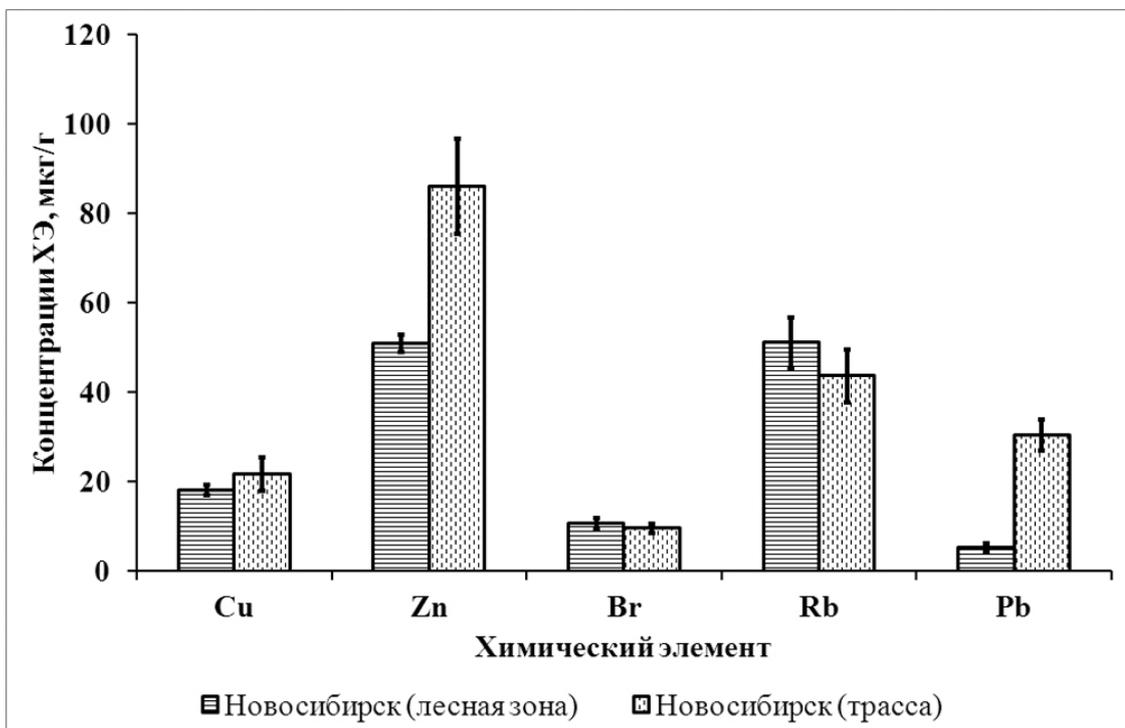
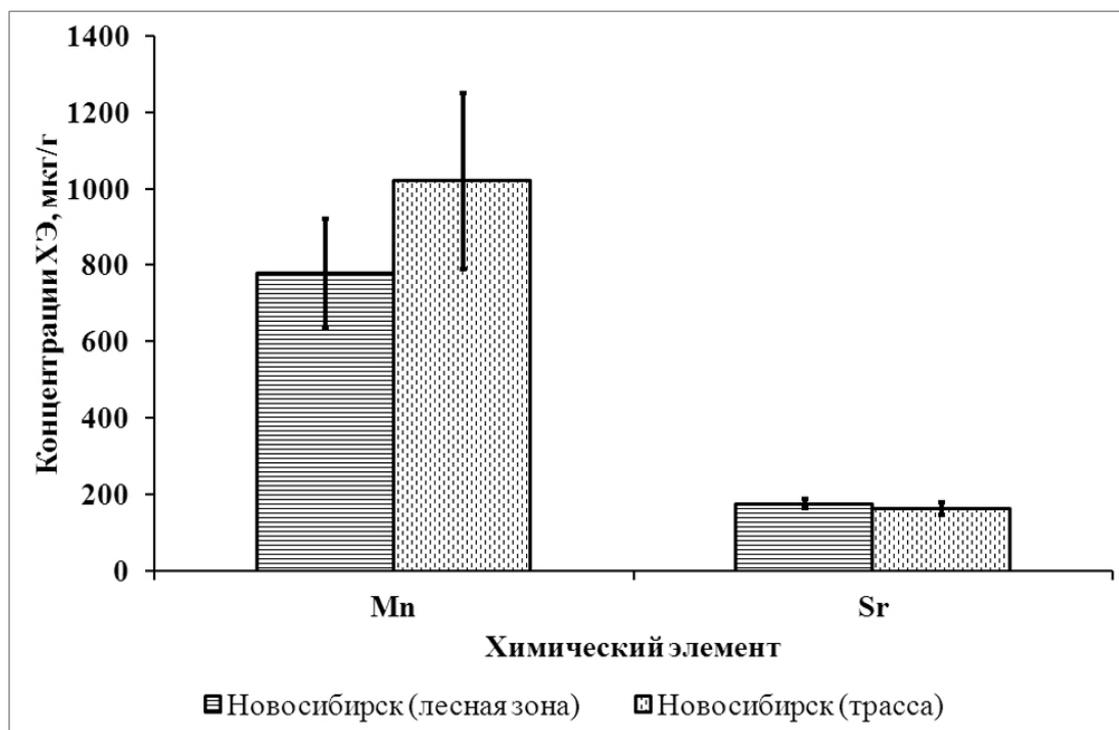


Рис. 10. Концентрации Cu, Br, Rb, Pb в почве, мкг/г



*Рис. 11.* Концентрации Mn, Sr в почве, мкг/г

Средние концентрации (мкг/г) химических элементов в печени и в легких крыс исследуемых групп

| Натошак                  |              |              |             |                   |                   |                              |
|--------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------------|-------------------|------------------------------|
| мкг/г                    | Печень       |              |             | Легкие            |                   |                              |
|                          | контроль     | АО           | АО + Zn     | контроль          | АО                | АО + Zn                      |
| <b>K</b>                 | 9590 ± 1610  | 10460 ± 1740 | 9140 ± 2200 | 8650 ± 1710       | 8940 ± 820        | 8860 ± 1420                  |
| <b>Ca</b>                | 110 ± 29     | 100 ± 29     | 98 ± 21     | 257 ± 80          | 269 ± 30          | 265 ± 46                     |
| <b>Mn</b>                | 7.5 ± 2.1    | 6.2 ± 2.0    | 5.3 ± 1.7   | 1.1 ± 0.3         | 1.1 ± 0.4         | <b>0.9 ± 0.2<sup>#</sup></b> |
| <b>Fe</b>                | 1160 ± 454   | 1050 ± 430   | 840 ± 382   | 478 ± 180         | 470 ± 110         | 423 ± 107                    |
| <b>Cu</b>                | 13 ± 4       | 12 ± 3       | 10 ± 3      | 4.0 ± 1.3         | 3.8 ± 0.9         | 3.9 ± 1.3                    |
| <b>Zn</b>                | 116 ± 33     | 116 ± 29     | 100 ± 30    | 59 ± 16           | 64 ± 10           | 62 ± 14                      |
| <b>Se</b>                | 4.6 ± 1.4    | 3.7 ± 0.9    | 3.1 ± 0.9   | 1.3 ± 0.3         | 1.3 ± 0.2         | 1.4 ± 0.4                    |
| <b>Br</b>                | 42 ± 14      | 38 ± 9       | 38 ± 10     | 89 ± 29           | 90 ± 12           | 93 ± 22                      |
| <b>Rb</b>                | 56 ± 20      | 55 ± 20      | 45 ± 16     | 24 ± 8            | 22 ± 4            | 26 ± 7                       |
| <b>Sr</b>                | 0.10 ± 0.04  | 0.19 ± 0.10  | 0.12 ± 0.03 | 0.26 ± 0.08       | 0.37 ± 0.13       | 0.31 ± 0.07                  |
| После приема жирной пищи |              |              |             |                   |                   |                              |
| мкг/г                    | Печень       |              |             | Легкие            |                   |                              |
|                          | контроль     | АО           | АО + Zn     | контроль          | АО                | АО + Zn                      |
| <b>K</b>                 | 11200 ± 2010 | 8500 ± 1350  | 9280 ± 1540 | 7370 ± 1780       | 8640 ± 1240       | 8120 ± 1160                  |
| <b>Ca</b>                | 128 ± 19     | 109 ± 35     | 96 ± 19     | 258 ± 67          | 315 ± 84          | 317 ± 74                     |
| <b>Mn</b>                | 6.5 ± 1.3    | 4.7 ± 1.0    | 5.5 ± 1.4   | 1.1 ± 0.4         | 1.3 ± 0.4         | <b>1.6 ± 0.4<sup>#</sup></b> |
| <b>Fe</b>                | 1030 ± 300   | 795 ± 203    | 788 ± 254   | 376 ± 78          | 505 ± 84          | 474 ± 96                     |
| <b>Cu</b>                | 11 ± 2       | 9 ± 2        | 10 ± 4      | <b>2.9 ± 0.8*</b> | <b>5.1 ± 0.8*</b> | 4.2 ± 1.0                    |
| <b>Zn</b>                | 91 ± 18      | 76 ± 12      | 90 ± 22     | 50 ± 11           | 67 ± 10           | 60 ± 9                       |
| <b>Se</b>                | 3.7 ± 0.9    | 2.6 ± 0.5    | 2.7 ± 0.8   | 1.1 ± 0.2         | 1.5 ± 0.3         | 1.3 ± 0.3                    |
| <b>Br</b>                | 37 ± 6       | 32 ± 9       | 31 ± 4      | 71 ± 19           | 86 ± 17           | 85 ± 16                      |
| <b>Rb</b>                | 41 ± 8       | 32 ± 6       | 39 ± 10     | 16 ± 3            | 23 ± 5            | 21 ± 5                       |
| <b>Sr</b>                | 0.12 ± 0.03  | 0.17 ± 0.09  | 0.09 ± 0.04 | 0.29 ± 0.12       | 0.62 ± 0.37       | 0.35 ± 0.15                  |

АО - группа с алиментарным ожирением, не принимавшая дополнительно цинк

АО + Zn - группа с алиментарным ожирением, принимавшая дополнительно цинк

\*При сравнении концентраций элементов между группами имелись значимые различия ( $p = 0.05$ )

<sup>#</sup> При сравнении концентраций элементов в состоянии натошак и после еды в каждой подгруппе, имелись значимые различия ( $p=0.05$ )

**Коэффициенты корреляции Спирмена ( $p=0.01$ ) для концентраций химических элементов в печени крыс исследуемых групп**

|    | Ca   | Mn   | Fe   | Cu   | Zn   | Se   | Br   | Rb   | Sr   |
|----|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
| K  | 0.74*<br>0.58 <sup>o</sup><br>0.65 <sup>†</sup><br>0.70 <sup>×</sup> | 0.63*<br>0.74 <sup>†</sup><br>0.71 <sup>×</sup><br>0.67 <sup>#</sup> | 0.64 <sup>#</sup>  |  | 0.59*<br>0.62 <sup>†</sup><br>0.74 <sup>×</sup><br>0.67 <sup>#</sup>   |  | 0.68 <sup>†</sup><br>0.64 <sup>×</sup><br>0.64 <sup>#</sup>          | 0.60*<br>0.72 <sup>†</sup><br>0.73 <sup>×</sup><br>0.86 <sup>#</sup>   | -0.58 <sup>†</sup>   |
| Ca |  | 0.59*<br>0.76 <sup>†</sup>   |  |  | 0.74 <sup>†</sup><br>0.60 <sup>×</sup>   | 0.57 <sup>†</sup>  | 0.66 <sup>†</sup><br>0.56 <sup>◇</sup><br>0.65 <sup>×</sup>          | 0.66 <sup>†</sup>  | -0.58 <sup>†</sup>   |
| Mn |  |  | 0.85*<br>0.62 <sup>†</sup><br>0.55 <sup>×</sup><br>0.97 <sup>#</sup> | 0.81*<br>0.81 <sup>†</sup><br>0.91 <sup>#</sup>  | 0.88*<br>0.85 <sup>o</sup><br>0.91 <sup>†</sup><br>0.61 <sup>◇</sup><br>0.69 <sup>×</sup><br>0.92 <sup>#</sup> | 0.82*<br>0.86 <sup>†</sup><br>0.55 <sup>×</sup><br>0.87 <sup>#</sup>   | 0.88*<br>0.87 <sup>†</sup><br>0.87 <sup>#</sup>                      | 0.87*<br>0.70 <sup>o</sup><br>0.90 <sup>†</sup><br>0.64 <sup>◇</sup><br>0.75 <sup>×</sup><br>0.88 <sup>#</sup> | -0.81 <sup>†</sup><br>-0.59 <sup>#</sup>                       |
| Fe |  |  |  | 0.86*<br>0.66 <sup>o</sup><br>0.75 <sup>†</sup><br>0.58 <sup>◇</sup><br>0.86 <sup>×</sup><br>0.93 <sup>#</sup> | 0.90*<br>0.68 <sup>◇</sup><br>0.72 <sup>×</sup><br>0.92 <sup>#</sup>   | 0.91*<br>0.68 <sup>o</sup><br>0.75 <sup>†</sup><br>0.66 <sup>◇</sup><br>0.91 <sup>×</sup><br>0.85 <sup>#</sup> | 0.91*<br>0.87 <sup>#</sup>   | 0.81*<br>0.59 <sup>◇</sup><br>0.82 <sup>×</sup><br>0.88 <sup>#</sup>   | -0.72 <sup>†</sup><br>-0.79 <sup>×</sup><br>-0.62 <sup>#</sup> |
| Cu |  |  |  |  | 0.89*<br>0.79 <sup>†</sup><br>0.88 <sup>◇</sup><br>0.81 <sup>×</sup><br>0.84 <sup>#</sup>                      | 0.97*<br>0.98 <sup>o</sup><br>0.97 <sup>†</sup><br>0.91 <sup>◇</sup><br>0.91 <sup>×</sup><br>0.88 <sup>#</sup> | 0.79*<br>0.75 <sup>†</sup><br>0.84 <sup>#</sup>                      | 0.86*<br>0.73 <sup>†</sup><br>0.81 <sup>◇</sup><br>0.85 <sup>×</sup><br>0.84 <sup>#</sup>                      | -0.73 <sup>†</sup><br>-0.68 <sup>×</sup><br>-0.64 <sup>#</sup> |
| Zn |  |  |  |  |  | 0.88*<br>0.62 <sup>o</sup><br>0.85 <sup>†</sup><br>0.85 <sup>◇</sup><br>0.87 <sup>×</sup><br>0.83 <sup>#</sup> | 0.86*<br>0.95 <sup>†</sup><br>0.83 <sup>×</sup><br>0.73 <sup>#</sup> | 0.93*<br>0.84 <sup>o</sup><br>0.88 <sup>†</sup><br>0.96 <sup>◇</sup><br>0.93 <sup>×</sup><br>0.89 <sup>#</sup> | -0.63 <sup>†</sup><br>-0.57 <sup>#</sup>                       |
| Se |  |  |  |  |  |  | 0.87*<br>0.82 <sup>†</sup><br>0.57 <sup>×</sup><br>0.77 <sup>#</sup> | 0.87*<br>0.79 <sup>†</sup><br>0.71 <sup>◇</sup><br>0.88 <sup>×</sup><br>0.75 <sup>#</sup>                      | -0.77 <sup>†</sup><br>-0.62 <sup>×</sup><br>-0.69 <sup>#</sup> |
| Br |  |  |  |  |  |  |  | 0.86*<br>0.71 <sup>o</sup><br>0.94 <sup>†</sup><br>0.67 <sup>×</sup><br>0.84 <sup>#</sup>                      | -0.57*<br>-0.68 <sup>†</sup>                                   |
| Rb |  |  |  |  |  |  |  |  | -0.82 <sup>†</sup><br>-0.67 <sup>#</sup>                       |

\* контрольные натощак,  $r \geq 0.47$

<sup>o</sup> контрольные после приема жирной пищи,  $r \geq 0.40$

<sup>†</sup> алиментарное ожирение натощак,  $r \geq 0.46$

<sup>◇</sup> алиментарное ожирение после приема жирной пищи,  $r \geq 0.41$

<sup>×</sup> алиментарное ожирение + Zn натощак,  $r \geq 0.46$

<sup>#</sup> алиментарное ожирение + Zn после приема жирной пищи,  $r \geq 0.41$

**Коэффициенты корреляции Спирмена ( $p=0.01$ ) для концентраций химических элементов в легких крыс исследуемых групп**

|    | Ca                      | Mn | Fe                       | Cu                               | Zn   | Se   | Br   | Rb   | Sr                       |
|----|-------------------------|----|--------------------------|----------------------------------|--|--|--|--|--------------------------|
| K  | 0.57*<br>0.53°<br>0.57◇ |    | 0.58*<br>0.47°           | 0.67*                            | 0.85*<br>0.67°                                     | 0.68*<br>0.56°                                     | 0.91*<br>0.54°                                     | 0.88*<br>0.74°<br>0.61†                            |                          |
| Ca |                         |    | 0.84*<br>0.67°<br>-0.52× |                                  | 0.49°<br>0.54◇                                     | 0.50°  | 0.60*<br>0.68°<br>0.55◇<br>0.55×                   |  | 0.72°<br>0.65◇<br>0.58#  |
| Mn |                         |    |                          | 0.63°<br>0.56#                   | 0.60†<br>0.73#                                     |  |  | 0.55°<br>0.49◇<br>0.48#                            | 0.69†                    |
| Fe |                         |    |                          | 0.68*<br>0.77◇<br>0.54×<br>0.73# | 0.64*<br>0.61°<br>0.54×<br>0.78#                   | 0.73*<br>0.87°<br>0.65†<br>0.73◇<br>0.85×<br>0.88# | 0.75*<br>0.79°<br>0.69†<br>0.53◇<br>0.82×<br>0.90# | 0.59*<br>0.66°<br>0.34◇<br>0.56×<br>0.81#          | 0.51°                    |
| Cu |                         |    |                          |                                  | 0.88*<br>0.62°<br>0.64†<br>0.67◇<br>0.85×<br>0.88# | 0.97*<br>0.85†<br>0.89◇<br>0.69×<br>0.86#          | 0.80*<br>0.69†<br>0.52◇<br>0.53×<br>0.88#          | 0.89*<br>0.50°<br>0.70†<br>0.62◇<br>0.72×<br>0.88# | 0.61°                    |
| Zn |                         |    |                          |                                  |  | 0.88*<br>0.74°<br>0.64†<br>0.73◇<br>0.70×<br>0.88# | 0.86*<br>0.52°<br>0.71◇<br>0.87#                   | 0.93*<br>0.81°<br>0.68◇<br>0.77×<br>0.87#          | -0.55*<br>0.75°<br>0.54† |
| Se |                         |    |                          |                                  |  |  | 0.84*<br>0.82°<br>0.79†<br>0.58◇<br>0.86×<br>0.91# | 0.90*<br>0.78°<br>0.71†<br>0.80◇<br>0.84×<br>0.92# |                          |
| Br |                         |    |                          |                                  |  |  |  | 0.92*<br>0.55°<br>0.86†<br>0.59◇<br>0.79×<br>0.93# |                          |
| Rb |                         |    |                          |                                  |  |  |  |  | 0.59°                    |

\* контрольные натощак,  $r \geq 0.47$

° контрольные после приема жирной пищи,  $r \geq 0.40$

† алиментарное ожирение натощак,  $r \geq 0.44$

◇ алиментарное ожирение после приема жирной пищи,  $r \geq 0.41$

× алиментарное ожирение + Zn натощак,  $r \geq 0.44$

# алиментарное ожирение + Zn после приема жирной пищи,  $r \geq 0.41$