

Оценка возможности применения прямого анализа образцов биотканей малой массы методом рентгенфлуоресцентного анализа с синхротронным возбуждением

В.А. Трунова^{1,2*}, А.В. Сидорина¹, В.В. Зверева¹

¹Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН, Российская Федерация, 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 3

²Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Российская Федерация, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова 2

*Адрес для переписки: Трунова Валентина Александровна, E-mail: valna-t@mail.ru

Поступила в редакцию 23 апреля 2015 г., после исправлений – 1 июня 2015 г.

Возможность прямого анализа цельных образцов биологической ткани малой массы является неоспоримым достоинством метода рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения (РФА-СИ). Метод РФА-СИ реализован на базе ИЯФ СО РАН в Сибирском центре синхротронного и терагерцового излучения. В данной работе анализировали цельные образцы печени, высушенные в виде пластинок плоско-параллельной формы. Известно, что минимизация процедур пробоподготовки сокращает потери и уровень загрязнений образца. Предложенный способ пробоподготовки исключал лиофильную сушку, растирание и прессование материала. Концентрации химических элементов в исследуемых образцах определяли по градуировочному графику, построенному на основе ряда биологических стандартных образцов. Результаты эксперимента показали, что концентрации определяемых химических элементов в случае прямого анализа плоско-параллельного фрагмента биоткани (печени) и в случае растирания того же образца (и приготовления из него таблеток) достоверно не различались. Для оценки воспроизводимости результатов измерений и неоднородности распределения химических элементов два цельных и один растертый образец печени были последовательно измерены по 5 раз. Проверка правильности полученных методом РФА-СИ результатов была проведена путем сравнения с данными, полученными другим независимым методом – атомно-эмиссионной спектроскопией с двухструйным дуговым плазматроном (ДДП-АЭС). Предложенный нами способ пробоподготовки может применяться для анализа биотканей малой массы по способу внешнего стандарта.

Ключевые слова: рентгенофлуоресцентный анализ, синхротронное излучение, пробоподготовка, биологические ткани, печень.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2015, vol. 19, no. 2, pp. 146-153

DOI: 10.15826/analitika.2015.19.2.008

The evaluation of the direct SRXRF analysis applicability on the small biological samples

V.A. Trunova^{1,2*}, A.V. Sidorina¹, V.V. Zvereva¹

¹A.V. Nikolaev Institute of Inorganic Chemistry SB RAS, Lavrentyev pr. 3, 630090, Novosibirsk, Russian Federation

²Novosibirsk State University, Pirogova ul.. 2, 630090, Novosibirsk, Russian Federation

*Corresponding author: Valentina A. Trunova, E-mail: valna-t@mail.ru

Submitted 23 April 2015, received in revised form 1 June 2015

The direct analysis of the biological tissue samples is a great advantage of the X-ray Fluorescent Technique with Synchrotron Radiation (SRXRF). SRXRF method is realized on the basis of INP SB RAS in Siberian Synchrotron and Terahertz Radiation Centre. In the present work, the whole liver tissue samples were dried under weight and analyzed in the form of parallel-plane fragments. The minimization of sample preparation procedures is known to significantly reduce the risks of the sample contamination and loss of analyte. The preparation procedure, which was used in the present work, was carried out without lyophilization, grinding and pelletizing of liver tissue samples. Elemental concentrations in the samples were calculated

using the calibration and constructed on the basis of biological certified reference materials. It was found that there weren't any significant differences between elemental concentrations in the case of the direct analysis of parallel-plane liver fragments and concentrations obtained for the same liver samples after grinding and pelletizing. Two unbroken samples and one grinded sample were measured 5 times to assess the reproducibility. The relative standard deviation for each sample was calculated, and it included both the assessment of the reproducibility and the heterogeneity of the elemental distribution in the sample. The validation of the results obtained by SRXRF method was estimated by the comparison with the results obtained by another method, namely by Two-Jet Plasma Atomic Emission Spectrometry (TJP-AES). Thereby the offered way of sample preparation procedure using external standard method for calculation of elemental concentrations can be applied for SRXRF analysis of biological samples.

Keywords: x-ray fluorescent analysis, synchrotron radiation, sample preparation, biological tissue, liver.

ВВЕДЕНИЕ

Метод рентгенофлуоресцентного анализа с использованием синхротронного излучения (РФА-СИ) благодаря высокой интенсивности СИ, многоэлементности, недеструктивности и экспрессности является эффективным методом для элементного анализа биологических тканей. Важным достоинством метода является отсутствие необходимости растворять анализируемую пробу, что снижает риски загрязнения и потерь анализируемых элементов, а также существенно сокращает время анализа. Использование синхротронного излучения в качестве источника возбуждения, благодаря высокой интенсивности и поляризации пучка СИ, позволяет снизить пределы обнаружения и использовать на порядок величины меньшее количество материала, по сравнению с традиционным методом РФА.

Очевидно, что этап пробоподготовки является крайне важным и изначально определяет качество и надежность анализа. Пробоподготовка образцов для определения микроэлементного состава в методе РФА-СИ во многом сходна с пробоподготовкой в методе РФА. Marguí, Queralt and Grieken [1] при описании типовых процедур пробоподготовки различных материалов для РФА анализа советуют отдавать предпочтение простым методам пробоподготовки или, если возможно, полностью исключить ее. При этом пробоподготовка стандартных и исследуемых образцов должна проводиться одинаковым образом.

Несмотря на возможность анализировать методом РФА твердые образцы биологических тканей, в некоторых работах используется предварительное разложение образцов и последующий анализ сухого минерального остатка на фильтрах или специальных подложках [2]. Предварительное разложение образца биологической ткани позволяет снизить влияние матрицы. Процедуры разложения органической матрицы и последующее осаждение анализируемых элементов требуют использования минеральных кислот, перекиси водорода, комплексобразователей и других реагентов [3], что существенно увеличивает риск загрязнения анализируемой пробы. Нагревание образцов биологических тканей на этапе разложения органической матрицы может привести к потере таких элементов, как As, Ge, Hg, Sb, Se, Sn и Te [3-5]. Концентрирова-

ние анализируемых элементов требует химически грамотного подхода к выбору используемых реагентов. Kwiatek и др. [6] при сравнении различных процедур пробоподготовки биологических тканей для РФА анализа показали, что способ влажного озоления не позволил определить концентрации К и Са, из-за того, что эти элементы не вступили в реакции комплексообразования с используемыми реагентами.

Таким образом, процедура разложения образцов биологических тканей может внести существенный вклад в общую погрешность анализа, является трудоемкой, длительной, а также требует использования дорогих высококачественных реагентов. Поэтому в практике РФА анализа предпочтение отдается способам пробоподготовки без предварительного разложения образца.

Обычно в РФА анализе образцы биологических тканей лиофилизируют, измельчают до порошкообразного состояния и прессуют в таблетки. При таком способе пробоподготовки можно добиться максимального соответствия физических и геометрических характеристик исследуемого и стандартных образцов, которые представляют собой сухой растертый лиофилизированный материал.

Недостатком лиофилизации является высокая стоимость оборудования и длительность процесса (до нескольких дней) [7]. Во многих работах отмечается необходимость строгого контроля условий и процессов лиофильной сушки для достижения требуемого состояния исследуемой ткани [8, 9]. Дальнейшее измельчение и растирание лиофилизированных образцов биологической ткани также сопряжено с трудностями. Основной из них является проблема загрязнения, источником которого служит используемое оборудование. Известно, что ступки и мельницы, детали которых изготовлены из агата или корунда, могут вносить значительные количества примесей Al, Si, Mg, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe и Pb, Ba, Cu и Zn [1, 10, 11]. Поскольку в РФА анализе размер частиц исследуемой пробы может влиять на величину интенсивности аналитических линий элементов, при растирании биологической ткани желательнее добиться того, чтобы размер частиц порошка исследуемого образца был как можно ближе к размерам частиц порошка стандартного образца (и был достаточно малым). Также необходимо обращать внимание на процессы слипания частиц и на

вариации плотности спрессованных таблеток, что может повлиять на результаты анализа [1].

Наиболее сложным случаем является анализ образцов биотканей малой массы, от десятков до нескольких миллиграмм. Эта проблема часто возникает при исследовании конкретных локальных участков ткани, затронутых патофизиологическими процессами, при исследовании материала биопсии или при работе с органами малых экспериментальных животных. В таком случае количество сухого образца биологической ткани может составлять менее 20 мг, последующее растирание и прессование таких образцов может быть вообще невозможно из-за неизбежных потерь материала.

Примеры работ, где количественный РФА-СИ анализ цельных образцов биологических тканей проводится напрямую, крайне немногочисленны. В данном случае проблема несоответствия характеристик стандартных и исследуемых образцов возникает особенно остро. Например, в работе Geraki et al. [12] анализировали цельные образцы тканей молочной железы без предварительных процедур пробоподготовки. В качестве стандартных образцов использовали водные растворы определяемых элементов. Для получения корректных результатов анализа необходимо было добиться соответствия между спектрами стандартных и исследуемых образцов. Для этого авторы проводили дополнительные дифракционные исследования анализируемой ткани и построение моделей рассеяния методом Монте-Карло.

Прямой анализ цельных образцов биологической ткани с минимальной пробоподготовкой является перспективной возможностью и неоспоримым достоинством метода РФА-СИ. Необходимо учитывать, что для получения правильных количественных данных, необходимо добиться подобия исследуемого и стандартного образцов.

Цель данной работы заключалась в оценке применимости пробоподготовки, исключающей лиофильную сушку, растирание и прессование, для количественного РФА-СИ анализа образцов биологической ткани.

Для этого было проведено сравнение результатов анализа одного и того же образца печени, при двух способах пробоподготовки:

- анализ цельного образца печени, после высушивания под грузом (минимальная пробоподготовка);
- анализ сухого, растертого образца печени, спрессованного в таблетку.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пробоподготовка образцов

Высушивание биологической ткани. Для анализа был взят фрагмент печени крысы линии *Wistar*, содержащейся в стандартных условиях вивария. После извлечения из организма образец был заморожен при $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ и в таком виде достав-

лен в аналитическую лабораторию, масса образца печени составляла 559.4 мг. После размораживания образец печени был помещен между двумя фторопластовыми пленками и помещен в чашку Петри. В таком виде образец был придавлен грузом массой 435 г и оставлен до высыхания. При выборе груза необходимо обращать внимание, чтобы его нижняя поверхность, прилегающая к образцу, была ровной и гладкой. Высыхание под грузом необходимо для придания фрагменту биологической ткани плоско-параллельной формы. Чтобы предотвратить биологическое разложение ткани и обеспечить нормальное удаление влаги, груз периодически убирала и снимала верхнюю пленку с образца. В таком «открытом» состоянии образец находился не более 10 минут, затем его снова закрывали пленкой и помещали под груз. Данную процедуру «проветривания» проводили несколько раз с интервалом в несколько часов. Частоту «проветривания» и его длительность определяли в соответствии с текущим состоянием образца. Важно следить, чтобы образец ткани не сворачивался во время «проветривания» и оставался эластичным перед следующим помещением под груз. Выдерживание под грузом и «проветривание» образца проводили в воздушной атмосфере при температуре $\approx 35\text{ }^{\circ}\text{C}$, которую обеспечивали нагревом от лампы накаливания.

Выдерживание образца печени под грузом с периодическим «проветриванием» позволило получить сухой образец ткани с относительно гладкой поверхностью, который представлял собой плоскую твердую пластину. В таком состоянии образец можно легко отделить от фторопластовых пленок и взвесить. Степень высушивания образца определяли достижением постоянного его веса, который не менялся при трех взвешиваниях с интервалом в одни сутки.

Длительность высушивания образца печени массой 559.4 мг в условиях эксперимента составила 14 дней. Конечная масса исследуемого образца составила 121.5 мг.

Изготовление исследуемых и стандартных образцов. При работе с образцами, соответствующим критериям «тонкого» и «промежуточного» слоя в РФА-СИ анализе, одним из основных требований является близость поверхностной плотности стандартного и исследуемого образца. Для оценочного расчета поверхностной плотности исследуемого образца необходимо знать его площадь. Для этого полученному образцу печени, с помощью скальпеля из нержавеющей стали была придана прямоугольная форма со сторонами $15 \times 15\text{ мм}^2$ (площадь образца составила 225 мм^2). Затем прямоугольный образец взвешивали, и рассчитывали поверхностная плотность образца (как масса образца, деленная на его площадь). Поверхностная плотность образца в данном случае составила 0.35 мг/мм^2 .

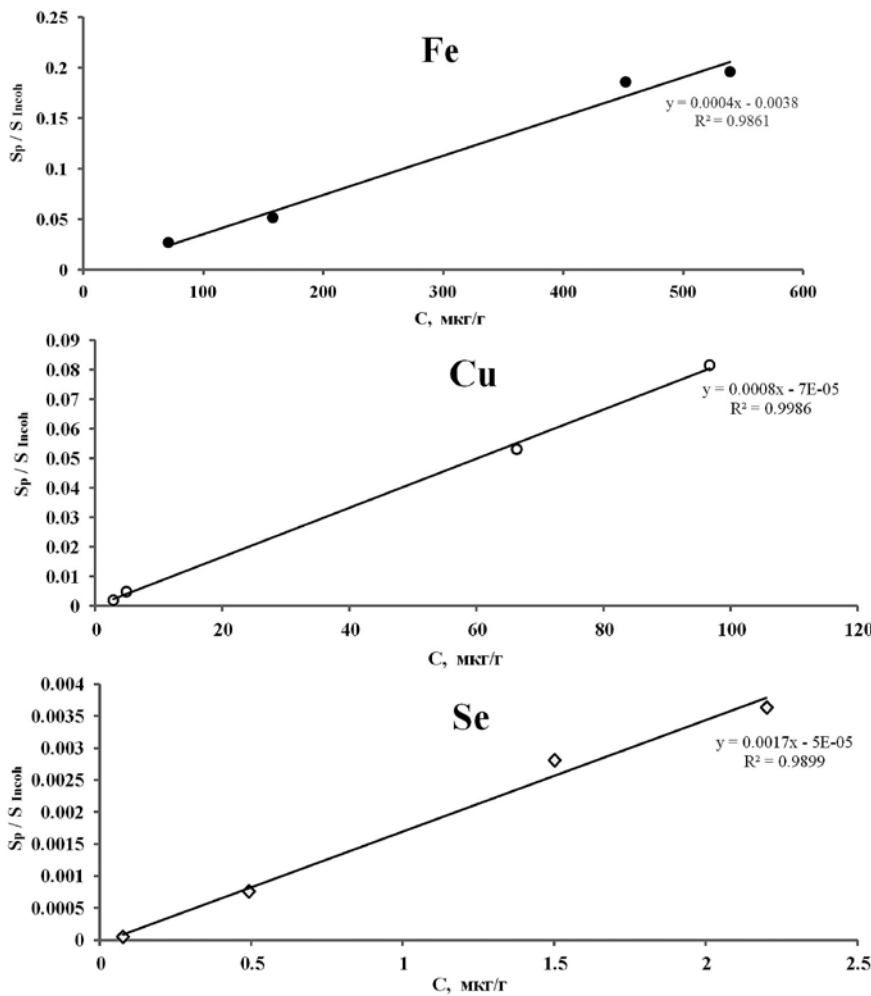


Рис. 1. Градуировочные графики для Fe, Cu и Se (C, мкг/г – концентрация химического элемента в стандартном образце, S_p / S_{Incoh} – отношение площади пика Ka-линии аналита к площади пика некогерентного (комптоновского) рассеяния)

Для количественного определения концентраций определяемых элементов (K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Se, Br, Rb и Sr) и построения градуировочных графиков [13] были выбраны следующие стандартные образцы: *NCSZC 85005 Beef liver* (говяжья печень), *NIES Certified Reference Material No.6 Mussel* (мидия), *NIST 1566a Oyster tissue* (ткань устрицы), *NIST 8414 Bovine muscle* (мышца быка). В качестве примера на рис. 1 приведены градуировочные графики для Fe, Cu и Se. Все стандартные образцы представляли собой сухой порошок лиофилизированного стандартного материала. Из порошка стандартных образцов прессовали таблетки диаметром 8 мм. Навеску порошка стандартного образца рассчитывали таким образом, чтобы поверхностная плотность

спрессованной таблетки примерно соответствовала поверхностной плотности исследуемого образца. Таким образом для достижения поверхностной плотности в 0.35 мг/мм² масса навески каждого стандартного образца составляла ≈ 17.4 мг.

Поскольку площадь полученного цельного образца печени (225 мм²) многократно превышала площадь пучка синхротронного излучения (10 мм²), для получения статистически более точных результатов анализа образец был разрезан скальпелем на 4 одинаковых прямоугольных фрагмента, каждый из которых анализировали отдельно. Исследуемые образцы, а также все таблетки стандартных образцов, помещали между двумя майларовыми пленками, закрепляли во фторопластовых кольцах и в таком виде использовали для измерения РФА-СИ спектров.

После измерений и расчета концентраций элементов в 4-х исследуемых образцах (фрагменты одного большого цельного образца печени), эти образцы вынимали из пленок и все вместе растирали в яшмовой ступке. Из растертых образцов путем прессования были получены три таблетки с поверхностной плотностью 0.35 мг/мм². Таблетки из растертых образцов печени вновь были проанализированы методом РФА-СИ. Схема изготовления исследуемых образцов для измерений показана на рис. 2.

Измерения

Все измерения проводили на экспериментальной станции элементного рентгенофлуоресцентного анализа [14] в Институте ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН, на накопителе встречных электрон-позитронных пучков (ВЭПП-3), с привлечением оборудования принадлежащего Центру коллективного пользования СЦСТИ при поддержке Министерства образования и науки Российской

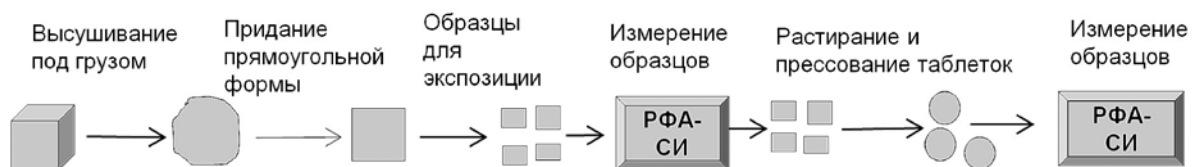


Рис. 2. Схема пробоподготовки

Федерации. Параметры ВЭПП-3: энергия электронов в накопителе $E = 2$ ГэВ; индукция магнитного поля $B = 2$ Т; сила тока $I_e = 100$ мА.

Измерения проводили на воздухе. Монохроматизация первичного возбуждающего излучения осуществляли при помощи двухкристалльного кремниевого монохроматора типа «бабочка», с рабочими плоскостями Si(111). Энергия возбуждающих квантов составляла 18 кэВ. Длительность измерения одного образца – 400 с. Площадь пучка синхротронного излучения на образце составляла 5×2 мм². Регистрацию характеристического флуоресцентного излучения от образцов осуществляли при помощи полупроводникового детектора Si(Li) *PentaFET (Oxford Instruments)*, с энергетическим разрешением 145 эВ (на линии 5.9 кэВ). Для разложения спектра по энергиям флуоресцентных квантов использовали многоканальный анализатор *OXFORD (Oxford Instruments Inc., USA)*. Обработку полученных спектров проводили при помощи программы *AXIL (Canberra Packard, Benelux)* [15]. Для учета незначительных вариаций толщины исследуемых и стандартных образцов интенсивности флуоресцентных линий анализируемых элементов нормировали на площадь пика комптоновского рассеяния [16].

Для оценки воспроизводимости измерений два цельных и один растертый образец печени были последовательно измерены 5 раз. При каждом последующем измерении образец поворачивали на угол $\approx 80^\circ$ в плоскости, перпендикулярной направлению пучка. Таким образом оценивали однородность распределения элементов по площади образца. По этим результатам измерений было рассчитано относительное стандартное отклонение, которое включало как оценку воспроизводимости, так и оценку неоднородности распределения химических элементов в образце.

Для проверки правильности используемого способа пробоподготовки (т.е. высушивание под грузом без растирания) дополнительно был проведен анализ образца печени крысы методом ДДП-АЭС [17]. Образец печени высушивали под грузом, как указано выше. Данный образец был проанализирован методом РФА-СИ. Затем этот же образец был проанализирован методом атомно-эмиссионной спектроскопии с двухструйным дуговым плазмотроном (ДДП-АЭС).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Концентрации К, Са, Мп, Fe, Cu, Zn, Se, Br, Rb и Sr были рассчитаны в каждом из четырех цельных образцов и в каждом из трех растертых. В табл. 1 представлены средние концентрации элементов в образце печени до и после растирания. Значимость различий проверяли по U-критерию Манна-Уитни, поскольку данный критерий позволяет сравнение выборок малого объема и не требует соблюдения нормальности распределения данных. Из табл. 1 следует отсутствие значимых различий ($p = 0.05$) и хорошее соответствие концентраций между цельными и растертыми образцами для всех элементов, кроме Са, Мп и Sr. Концентрации Са и Мп в растертых образцах превышали концентрации в цельных образцах на 43 и 66 % соответственно. Концентрация Sr в растертых образцах была более чем в 4 раза выше, чем в цельных. Причина данных различий заключается в неравномерном распределении Са, Мп и Sr в печени. Это хорошо видно из табл. 2, где показаны концентрации элементов в цельных образцах, измеренные при последовательном повороте образца. Поскольку пятно пучка имеет прямоугольную форму (5×2 мм²), а цельный образец составлял $\sim 8 \times 8$ мм², то при каждом повороте образца вокруг оси пучка область измерений захватывала новые участки на поверхности

Таблица 1

Доверительный интервал значений концентраций химических элементов в цельных и растертых образцах печени (мкг/г). $P = 0.95$.

Элемент	Цельные образцы, n = 4	Растертые образцы, n = 3
К	13000 ± 2230	14000 ± 1490
Са	370 ± 64	530 ± 67
Мп	4 ± 1.3	7 ± 1.2
Fe	700 ± 64	800 ± 124
Cu	8 ± 1.3	10 ± 2.5
Zn	77 ± 4.8	76 ± 2.5
Se	2.0 ± 0.13	1.9 ± 0.15
Br	42 ± 9.5	40 ± 2.0
Rb	37 ± 6.4	36 ± 2.5
Sr	0.3 ± 0.19	1.5 ± 0.75

Примечание: n – количество образцов.

Таблица 2

Результаты воспроизводимости РФА-СИ анализа для двух цельных образцов печени (мкг/г), n = 5

Образец	Параметр	К	Са	Мп	Fe	Cu	Zn	Se	Br	Rb	Sr
№ 1	Среднее значение	8200	480	4.4	658	7.3	70.3	2.27	36.6	29.4	0.25
	S _p , %	7	38	5	3	2	4	3	7	3	41
№ 2	Среднее значение	11700	337	5.4	715	7.9	66.3	2.19	46.3	36.3	0.10
	S _p , %	2	5	12	5	5	1	3	4	2	13

Таблица 3

Результаты воспроизводимости РФА-СИ анализа для растертого образца печени (мкг/г), $n = 5$

Параметр	K	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Se	Br	Rb	Sr
Среднее	13300	510	7.0	760	11.1	77.6	2.00	41.5	37.1	2.0
S_r , %	3	4	5	2	4	1	2	1	0.5	16

Таблица 4

Результаты анализа образца печени (мкг/г) методами ДДП-АЭС и РФА-СИ.

Метод	Ca	Mn	Fe	Cu	Zn	Sr
РФА-СИ	91 ± 21	5.4 ± 0.9	1290 ± 230	14.4 ± 2.7	98 ± 18	0.090 ± 0.018
ДДП-АЭС	86 ± 7	6.8 ± 0.5	1050 ± 90	11.0 ± 0.9	106 ± 11	0.110 ± 0.012

образца. Относительное стандартное отклонение (S_r) для концентраций Ca, Mn и Sr, измеренных в разных участках цельного образца, достигает 38, 12 и 41 % соответственно. Остальные элементы (K, Fe, Cu, Zn, Se, Br и Rb) распределены в печени более однородно, и величина относительного стандартного отклонения для их концентраций составляет 1-7 % (табл. 2).

Растирание образца приводит к более однородному распределению элементов. Это видно из табл. 3, где показаны результаты измерений в разных участках растертого образца, спрессованного в таблетку. Относительное стандартное отклонение для концентраций Ca, Mn и Sr в этом случае составляет 4, 5 и 16 % соответственно. S_r для остальных элементов не превышает 4 %.

Для проверки правильности используемого способа пробоподготовки образец печени, изготовленный при помощи высушивания под грузом, дополнительно был проанализирован методом ДДП-АЭС. Концентрации Ca, Mn, Fe, Cu, Zn и Sr, найденные методами РФА-СИ и ДДП-АЭС в одном и том же образце печени, представлены в табл. 4. Из табл. 4 видно отсутствие значимых различий ($p = 0.05$) между концентрациями определяемых элементов, полученными двумя методами.

В данной работе анализировали цельные образцы печени, высушенные в виде пластинок плоско-параллельной формы. При этом стандартные образцы представляли собой спрессованные таблетки из растертого лиофилизированного материала. При таком способе пробоподготовки исследуемые образцы не были идентичны по своей структуре стандартным образцам. Единственным критерием, который соблюдался при приготовлении образцов, было соответствие поверхностной плотности стандартного и исследуемого образцов. Результаты проведенного эксперимента свидетельствуют о том, что концентрации определяемых химических элементов в случае прямого анализа плоско-параллельного фрагмента биоткани (печени) и в случае растирания (того же) образца и приготовления из него таблеток достоверно

не различались. Таким образом, прямой анализ образца с минимальной пробоподготовкой правомерен. Единственные различия между цельными и растертыми образцами наблюдались в концентрациях Ca, Mn и Sr, что явилось следствием их неоднородного распределения в ткани печени. Близость химических свойств Ca и Sr [18] может говорить о том, что они выполняют одни и те же функции в тканях печени. Это обуславливает положительную корреляцию в распределении данных элементов по площади образца (табл. 2). Неоднородность распределения некоторых элементов можно учесть, подобрав оптимальный размер пучка или проанализировав исследуемый образец в нескольких областях с последующим усреднением.

Данные, полученные при сравнении результатов анализа методами РФА-СИ и ДДП-АЭС, подтверждают правильность используемой методики прямого РФА-СИ анализа образцов ткани печени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Используемый в данной работе способ пробоподготовки образцов биологической ткани (печени) является простым, доступным и эффективным. Проблема неоднородности распределения элементов в объеме образца, а также выбор массы используемого груза, условий высушивания и «протравивания» должны рассматриваться индивидуально в зависимости от типа биологической ткани.

Высушивание биоткани под грузом позволяет получить гладкий образец плоско-параллельной формы. Главным достоинством указанного способа пробоподготовки является минимальное количество операций и реагентов, применяемых к исследуемому образцу биоткани. Отсутствие дополнительных реагентов, растирания и нагревания снижает риск загрязнения и потерь определяемых элементов. Данный способ пробоподготовки может быть единственным доступным при необходимости количественного анализа образцов биотканей малой массы (менее 1 мг) [19], в особенности материала биопсии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Marguí E., Queralt I., Grieken R. Sample preparation for X-Ray fluorescence analysis // *encyclopedia of Analytical Chemistry*: New York, John Wiley & Sons. 2009.
2. Iron, copper, zinc and selenium in human liver tissue measured by X-ray fluorescence spectrometry / N. Milman [et al.] // *Scand. J. Clin. Lab. Inv.* 1983. V. 43. P. 691-697.
3. Subramanian K.S. Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques // *Spectrochim. Acta. Part B.* 1996. V. 51, № 3. P. 291-319.
4. 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 // *Anal. Chem.* 1985. V. 57, № 2. P. 427-431.
5. Deaker M., Maher W. Determination of Selenium in Seleno Compounds and Marine Biological Tissues Using Electrothermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry // *J. Anal. Atom. Spectrom.* 1995. V. 10, № 6. P. 423-431.
6. Trace element analysis by means of synchrotron radiation, XRF, and PIXE: selection of sample preparation procedure / W.M. Kwiatak [et al.] // *J. Alloy. Compd.* 2001. V. 328, № 1. P. 283-288.
7. Kasper J.C., Friess W. The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2011. V. 78, № 2. P. 248-263.
8. Warley A., Skepper J.N. Long freeze-drying times are not necessary during the preparation of thin sections for X-ray microanalysis // *J. Microsc.* 2000. V. 198, № 2. P. 116-123.
9. Friess W., Winter G. Meeting the challenges in freeze-drying of pharmaceuticals and biologicals // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2013. V. 85, № 2. P. 161.
10. Marguí E., Queralt I., Hidalgo M. Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material // *Trac-Trend. Anal. Chem.* 2009. V. 28, № 3. P. 362-372.
11. Hoenig M. Preparation steps in environmental trace element analysis – facts and traps // *Talanta.* 2001. V. 54, № 6. P. 1021-1038.
12. A synchrotron XRF study on trace elements and potassium in breast tissue / K. Geraki [et al.] // *Nucl. Instrum. Meth. B.* 2004. V. 213. P. 564-568.
13. Трунова В.А., Зверева В.В. Исследование методом РФА-СИ распределения макро- и микроэлементов в тканях миокарда и сосудов человека // *Ж. структурной химии. Приложение.* 2008. Т. 49. С. 211-216.
14. Trounova V.A., Zolotarev K.V., Baryshev V.B., Phedorin M.A. Analytical possibilities of SRXRF station at VEPP-3 SR source // *Nuclear Instruments and Methods A.* 1998. V. 405. P. 532-536.
15. Van Espen P., Janssens K., Nobels J. AXIL-PC, software for the analysis of complex X-ray spectra // *Chemometr. Intell. Lab.* 1986. V. 1, № 1. P. 109-114.
16. Сидорина А.В., Трунова В.А. Учет изменения интенсивности пучка синхротронного излучения при регистрации спектров биологических образцов методом РФА-СИ // *Аналитика и контроль.* 2013. Т. 17, № 1. С. 4-9.
17. Zaksas N.P., Nevinsky G.A. Solid sampling in analysis of animal organs by two-jet plasma atomic emission spectrometry // *Spectrochim. Acta. Part B.* 2011. V. 66. P. 861-865.
18. Saidak Z., Marie P. J. Strontium signaling: Molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis // *Pharmacol. Therapeut.* 2012. V. 136, № 2. P. 216-226.

19. Трунова В. А. Рентгено-флуоресцентный анализ с использованием синхротронного излучения: дис. ... канд. хим. наук. Новосибирск, 1997. 37 с.

REFERENCES

1. Marguí E., Queralt I. and Grieken R. *Sample Preparation For X-Ray Fluorescence Analysis*. Encyclopedia of Analytical Chemistry. New York, John Wiley & Sons, 2009. doi: 10.1002/9780470027318.a6806m.pub2.
2. Milman N., Laursen J., Pødenphant J., Staun-Olsen P. Iron, copper, zinc and selenium in human liver tissue measured by X-ray fluorescence spectrometry. *Scandinavian journal of clinical & laboratory investigation*, 1983, vol. 43, pp. 691-697.
3. Subramanian K.S. Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques. *Spectrochimica Acta. Part B: Atomic Spectroscopy*, 1996, vol. 51, no. 3, pp. 291-319. doi: 10.1016/0584-8547(95)01425-X.
4. 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, vol. 57, no. 2, pp. 427-431.
5. Deaker M., Maher W. Determination of Selenium in Seleno Compounds and Marine Biological Tissues Using Electrothermal Atomization Atomic Absorption Spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1995, vol. 10, no. 6, pp. 423-431. doi: 10.1039/JA9951000423.
6. Kwiatak W.M., Kubica B., Paluszkiwicz C., Galka M. Trace element analysis by means of synchrotron radiation, XRF, and PIXE: selection of sample preparation procedure. *Journal of alloys and compounds*, 2001, vol. 328, no. 1, pp. 283-288. doi: 10.1016/S0925-8388(01)01318-4.
7. Kasper J.C., Friess W. The freezing step in lyophilization: physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2011, vol. 78, no. 2, pp. 248-263. doi: 10.1016/j.ejpb.2011.03.010.
8. Warley A., Skepper J.N. Long freeze-drying times are not necessary during the preparation of thin sections for X-ray microanalysis. *Journal of microscopy*, 2000, vol. 198, no. 2, pp. 116-123. doi: 10.1046/j.1365-2818.2000.00693.x.
9. Friess W., Winter G. Meeting the challenges in freeze-drying of pharmaceuticals and biological. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2013, vol. 85, no. 2, p. 161. doi: 10.1016/j.ejpb.2013.06.025.
10. Marguí E., Queralt I., Hidalgo M. Application of X-ray fluorescence spectrometry to determination and quantitation of metals in vegetal material. *Trends in Analytical Chemistry*, 2009, vol. 28, no. 3, pp. 362-372. doi: 10.1016/j.trac.2008.11.011.
11. Hoenig M. Preparation steps in environmental trace element analysis—facts and traps. *Talanta*, 2001, vol. 54, no. 6, pp. 1021-1038. doi: 10.1016/S0039-9140(01)00329-0.
12. 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, vol. 213, pp. 564-568. doi: 10.1016/S0168-583X(03)01672-0.
13. Trunova V.A., Zvereva V.V. [XRFA-SR studies of the distribution of macro- and microelements in myocardium and vessel samples from cardiosurgery patients]. *Journal of Structural Chemistry. Supplement*, 2008, vol. 49, pp. 211-216 (in Russian).

14. Trunova V.A., Zolotarev K.V., Baryshev V.B., Phedorin M.A. Analytical possibilities of SRXRF station at VEPP-3 SR source. *Nuclear Instruments and Methods A*, 1998, vol. 405, pp. 532-536.
15. Van Espen P., Janssens K., Nobels J. AXIL-PC, software for the analysis of complex X-ray spectra. *Chemometrics and intelligent laboratory systems*, 1986, vol. 1, no. 1, pp. 109-114.
16. Sidorina A.V., Trunova V.A. [Compensation of synchrotron radiation beam intensity alteration while measuring spectra of biological samples with XRF SR method]. *Analytics and control*, 2013, vol. 17, no. 1, pp. 4-9 (in Russian).
17. Zaksas N.P., Nevinsky G.A. Solid sampling in analysis of animal organs by two-jet plasma atomic emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B*, 2011, vol. 66, pp. 861-865. doi: 10.1016/j.sab.2011.11.001.
18. Saidak Z., Marie P.J. Strontium signaling: Molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis. *Pharmacology & therapeutics*, 2012, vol. 136, no. 2, pp. 216-226. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.07.009.
19. Trunova V. A. *Rentgeno-fluorescentnyy analiz s ispol'zovaniem sinkhrotronnogo izlucheniia*. Diss. kand. khim. nauk [X-ray fluorescent analysis with synchrotron radiation. PhD. chem. sci. diss.]. Novosibirsk, 1997. 37 p. (in Russian).