

УДК 543.422.8

РЕНТГЕНСПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КРОВИ БЕЗ ОТДЕЛЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКОЙ СОСТАВЛЯЮЩЕЙ

**О.И. Лямина¹, Т.А. Куприянова¹, И.П. Столяров¹,
М.Н. Филиппов¹, А.А. Вирюс²**

¹Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН
119991, Москва, ГСП-1, Ленинский просп., д.31
lyam@iqic.ras.ru

²Институт экспериментальной минералогии РАН,
142432, Моск. обл., Ногинский р-н, г.Черноголовка, ул.Академика Осипьяна, д.4

Поступила в редакцию 15 февраля 2013 г.,
после исправления – 14 марта 2013 г.

Исследована возможность рентгеноспектрального анализа крови и плазмы крови без предварительного отделения органической составляющей. Учет влияния органической матрицы осуществлен путем определения общего содержания Н, С, N и S методом органического элементного анализа, О и Na определены методом электронно-зондового рентгеноспектрального микроанализа, элементы, начиная с Mg, – методом локального рентгенофлуоресцентного анализа.

Ключевые слова: рентгеноспектральный анализ, матричные эффекты, неопределяемые элементы, кровь и ее составляющие, биологические объекты.

Лямина Ольга Игоревна – к.т.н., старший научный сотрудник лаборатории химического анализа ФБГУН Института общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН.
Область научных интересов: рентгенофлуоресцентный анализ медицинских и биологических объектов.

Автор 40 публикаций.

Куприянова Татьяна Александровна – д.т.н., ведущий научный сотрудник лаборатории химического анализа ФБГУН Института общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН.

Область научных интересов: локальный рентгеноспектральный анализ, электроннозондовый микроанализ.

Автор более 120 публикаций.

Столяров Игорь Павлович – к.х.н., старший научный сотрудник лаборатории металлокомплексного катализа ФБГУН Института общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН.

Область научных интересов: аналитическая химия, элементный анализ органических веществ.

Филиппов Михаил Николаевич – д.ф.-м.н., заведующий лабораторией химического анализа ФБГУН Института общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН.

Область научных интересов: электронная микроскопия, рентгеноспектральный анализ, электроннозондовый микроанализ, анализ поверхности, метрология химического анализа.

Автор более 120 публикаций.

Вирюс Алла Аргынбековна – к.т.н., старший научный сотрудник лаборатории физических исследований ФБГУН Института экспериментальной минералогии РАН.

Область научных интересов: электроннозондовый микроанализ, анализ геологических и природных объектов.

Автор 10 публикаций.

Введение

Применение рентгеноспектрального анализа (РСА) для исследования медико-биологических объектов имеет ряд преимуществ: возможность в одной пробе определять большой набор элементов,

широкий диапазон определяемых содержаний. Однако определенную трудность при анализе медико-биологических объектов представляет органическая матрица, как правило, неизвестного состава. Поскольку основными компонентами та-

кой матрицы являются неопределяемые и трудно определяемые в РСА элементы, это затрудняет проведение количественного анализа. По этой причине большинство существующих способов анализа медико-биологических объектов основано на предварительном удалении органической составляющей [1]. Для этого обычно проводят озоление пробы. Удаление органической составляющей позволяет в РСА улучшить пределы определения элементов, как за счет концентрирования пробы, так и за счет уменьшения фоновой составляющей аналитического сигнала, связанной с рассеянием рентгеновского излучения на атомах легких элементов. С другой стороны, различные виды озоления проб, используемые в аналитической практике, увеличивают время анализа и могут влиять на его правильность. В работе [2] пробы биологического происхождения анализировали методом рентгенофлуоресцентного анализа (РФА) без удаления органической составляющей с использованием адекватных стандартных образцов. При отсутствии стандартных образцов для проведения РФА без удаления органической составляющей

необходимо изучение влияния на его результаты неадекватности составов органической матрицы проб и образцов сравнения [3].

В данной работе исследована возможность получения элементного состава проб цельной крови и плазмы крови методами РСА без удаления органической составляющей при простом высушивании исходных (жидких) проб.

Объекты исследования

Пробы цельной крови и плазмы крови были предоставлены филиалом ГОУ ВПО РГМУ Росздрава «Научно-клинический центр геронтологии». Исходную пробу объемом 50-100 мкл наносили на стекло и медленно высушивали на воздухе, при этом фиксировали потерю массы. Доля сухого остатка от первоначальной массы для цельной крови составила 15-23 %, для плазмы крови – 9-10 %. Полученные после высушивания проб частицы имели форму пластинок размерами 1-2 мм для цельной крови и 0.5-1 мм для плазмы крови. На рис. 1 приведены изображения частиц цельной

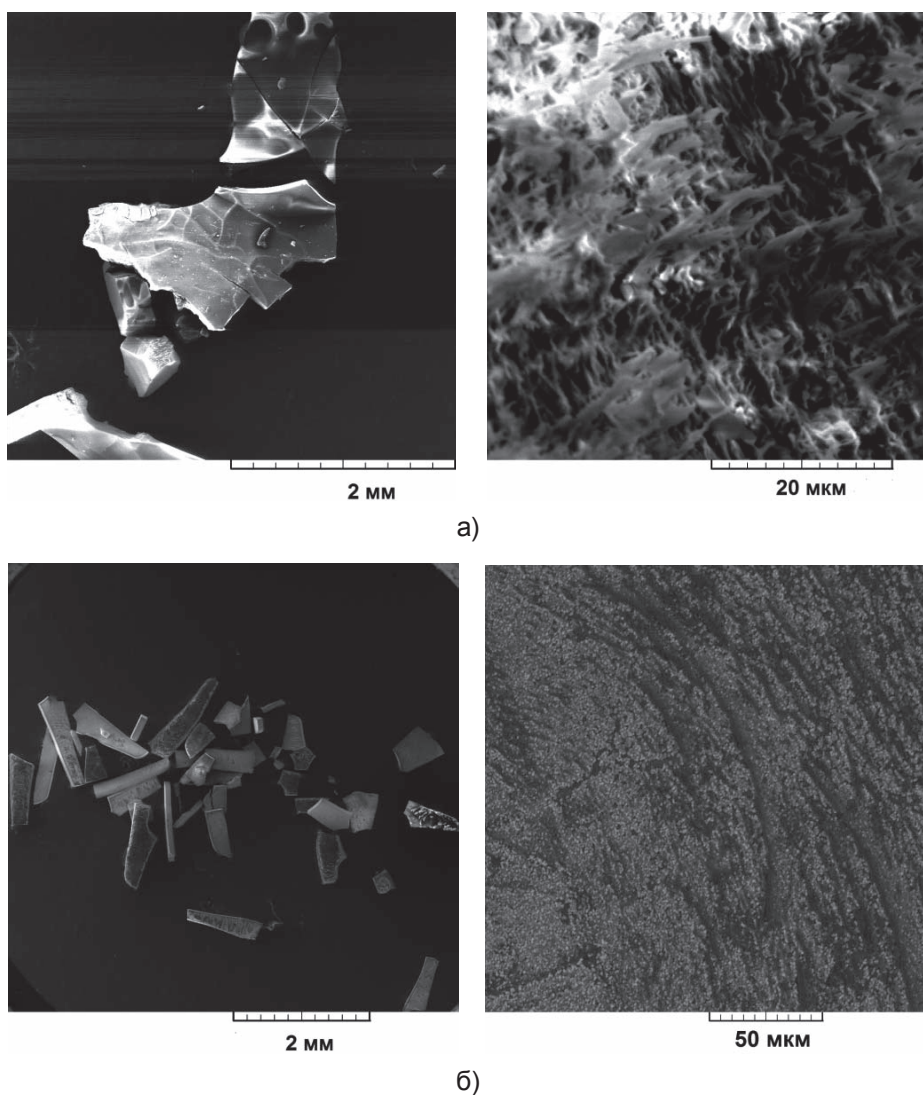


Рис. 1. Высушенные пробы цельной крови (а) и плазмы (б). Растровый электронный микроскоп Tescan Vega II XMU, режим регистрации вторичных электронов

крови (а) и плазмы крови (б), полученные на растровом электронном микроскопе Tescan Vega II XMU в режиме регистрации вторичных электронов при двух увеличениях. При большем увеличении видно, что частицы имеют неровную пористую неоднородную структуру. Специфика приготовленных таким образом проб заключается в следующем. Во-первых, получающиеся в результате высушивания пробы ограничены по массе и объему, что требует использования рентгеноспектральных методов локального анализа. Во-вторых, получающиеся сухие пробы неоднородны как на макро- так и на микроуровне. Поэтому получение результата, адекватно отражающего состав исходной пробы, требует проведения локального анализа в различных участках сухой пробы с последующим усреднением. В-третьих, массовая доля легких элементов (Н, С, N и О) для высушенных препаратов крови весьма значительна, что определяет существенную интенсивность рассеянного рентгеновского излучения и, следовательно, рост интенсивности фона. В-четвертых, для определения состава таких проб весьма трудно подобрать или синтезировать адекватные образцы сравнения (ОС). Существующие стандартные образцы в основном предназначены для анализа жидких проб.

Способ анализа

Отсутствие адекватных ОС, невозможность применения для таких объектов способа добавок, делают необходимым использование расчетных методов построения градуировочной характеристики. Программное обеспечение современных приборов (реализация метода фундаментальных параметров (МФП) для рентгенофлуоресцентного анализа, ZAF-коррекция в случае электронно-зондового рентгеноспектрального микроанализа (ЭЗРСМА)) позволяет достигнуть хороших показателей правильности. Однако для корректного учета матричных эффектов должны быть определены все элементы пробы, включая легкие. Учитывая, что в исходной (жидкой) пробе распределение органической составляющей является практически однородным, мы предлагаем для учета влияния неопределяемых и некоторых легких элементов использовать классический метод определения валового содержания Н, С, N и S в органическом веществе. Затем результаты этого анализа используются при расчете содержаний других элементов в РФМА и ЭЗРСМА.

Эксперимент и результаты анализа

Рентгенофлуоресцентный микроанализ (РФМА) проводили на рентгенофлуоресцентном микроанализаторе с капиллярной оптикой EAGLE III μ -probe и энергодисперсионным детектированием (окно – Ве) при следующих условиях: напряжение на трубке с Rh-анодом $U = 40$ кВ, ток трубки $i = 500$

мкА, окружающая среда – вакуум. Отдельные частицы закрепляли на электропроводящем скотче и помещали в камеру прибора. Время набора одного спектра при анализе 100 с. Диаметр зоны облучения составлял около 100 мкм, измерения проводили в 5-10 зонах в каждой пробе. Предел обнаружения при этих условиях для большинства элементов составляет не более 10 ppm, что дает принципиальную возможность определять в крови и плазме крови Mg, Si, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu и Zn [4]. Содержание элементов рассчитывали с применением алгоритма МФП. Для этой цели была использована программа «No standards» (EDAX) с нормировкой окончательных содержаний на 100 %.

На рис. 2 приведен общий вид спектра цельной крови и плазмы. Использование энергодисперсионного спектрометра (ЭДС) с бериллиевым окном для анализа проб с большой долей органической составляющей обладает существенным преимуществом. Поскольку содержание С, О и N в пробах очень велико, в случае ЭДС с тонким окном или безоконным вариантом детектирования основная доля загрузки детектора приходится на эти элементы. Наличие бериллиевого окна позволяет избежать перегрузки детектора и, таким образом, оптимизировать условия, обеспечивающие более надежное определение элементов тяжелее натрия, относительное содержание которых в пробе мало. Mg, P, S, Cl, K, Ca и Fe определяли по $K\alpha$ - линиям. Кроме этих элементов удается установить наличие Si, Cu и Zn, но из-за близости содержаний этих элементов к соответствующим пределам обнаружения они достоверно определены не были.

Для определения кислорода и натрия применяли ЭЗРСМА, который проводили на растровом электронном микроскопе Tescan Vega II XMU с энергодисперсионным спектрометром INCAx-sight. Частицы пробы закрепляли на электропроводящем скотче и помещали на держатель образцов. Аналитический сигнал получали в режиме низкого вакуума (остаточное давление

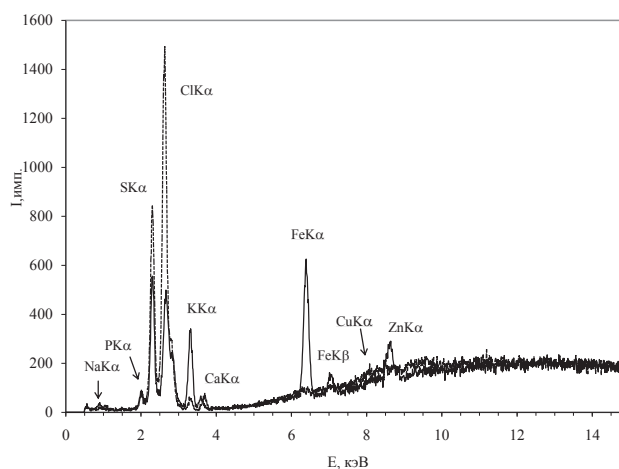


Рис. 2. Спектры высушенных проб цельной крови (сплошная) и плазмы (пунктир), полученные методом РФМА (EAGLE III μ -probe)

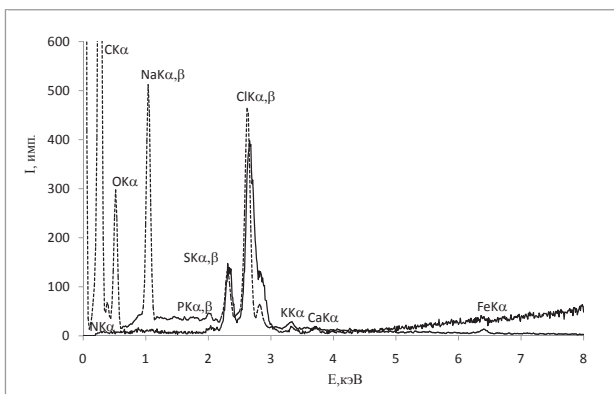


Рис. 3. Спектры высушенных проб плазмы крови, полученные методами РФМА (сплошная) и ЭЗРСМА (пунктир)

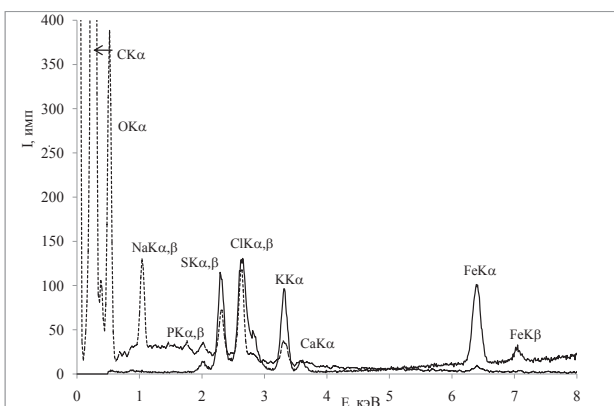


Рис. 4. Спектры высушенных проб цельной крови, полученные методами РФМА (сплошная) и ЭЗРСМА (пунктир)

Таблица 1

Результаты анализа цельной крови и плазмы крови, полученные по разработанному способу

Элемент	Содержание, % мас.	
	Плазма	Цельная кровь
H	6.89 ± 0.13	7.27 ± 0.15
C	46.6 ± 0.9	49.4 ± 1.0
N	12.2 ± 0.5	14.0 ± 0.6
O	25 ± 4	22.0 ± 3.5
Na	5.0 ± 1.6	3 ± 1
Mg	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.02
P	0.09 ± 0.03	0.22 ± 0.09
S	0.53 ± 0.12	0.5 ± 0.1
Cl	3.00 ± 0.24	2.30 ± 0.18
K	0.10 ± 0.03	0.74 ± 0.23
Ca	0.10 ± 0.03	0.05 ± 0.01
Fe	0.010 ± 0.005	3.50 ± 1.90

в камере образцов 25 Па) без напыления проводящего слоя; начальная энергия электронов – 10 кэВ. Площадь сканирования составляла 45×45 мкм, время накопления спектра – 70 с. Детектор спектрометра, оснащенный тонким окном, позволил определять легкие элементы. Разницу матричных эффектов в анализируемых и образцах сравнения учитывали программой ZAF-коррекции. Образцами сравнения служили Na[AlSi₃O₈] (альбит) и MgO. В высушенных пробах плазмы крови методом ЭЗРСМА проведено определение O и Na по Kα- линиям в 5-7 «точках». Затем результаты усредняли.

РФМА и ЭЗРСМА проводили на одних и тех же пробах. На рис. 3 и 4 показаны экспериментальные спектры высушенных проб – плазмы крови (рис. 3) и цельной крови (рис. 4). Спектры, полученные методом ЭЗРСМА, совмещены по шкале энергии со спектрами той же пробы, полученными методом РФМА. Видно, что в данных условиях ЭЗРСМА надежно регистрируются аналитические линии кислорода и натрия.

Для определения C, N, S и H использовали традиционный метод органического элементного анализа – CHNS-анализ (модернизированный прибор фирмы Carlo Erba, Италия, мод. EA1108), основанный на хроматографическом разделении продуктов сгорания микроколичества пробы (при 1000 °C в атмосфере O₂). Абсолютные значения массовых долей элементов получали способом построения градуировочной характеристики по стандартным образцам состава.

В табл. 1. представлены итоговые результаты анализа сухих проб плазмы и цельной крови с использованием методов РФМА, ЭЗРСМА и HCNS-анализа. Определение содержаний O и Na проведено ЭЗРСМА с учетом полученных данных CHNS-анализа. При определении Mg, P, S, Cl, K, Ca и Fe методом РФМА учитывали содержания легких элементов и Na, полученные двумя другими методами.

Содержание конкретных элементов в крови может сильно колебаться от пробы к пробе по различным причинам. Однако отношения содержаний элементов в цельной крови и плазме, полученной из той же крови, являются менее изменяющимися величинами. В табл. 2 приведено сравнение полученных в данной работе отношений содержаний в цельной крови и в плазме с литературными данными. Видно достаточно хорошее их совпадение по порядку величин.

Вывод

Показана возможность рентгеноспектрального анализа крови и плазмы крови без предварительного отделения органической составляющей. Показано, что учет влияния легких и неопределяемых элементов может быть осуществлен с использованием данных валового определения

Таблица 2

Отношение содержаний элементов в цельной крови и плазме

Элемент	Данная работа	По данным [4]
Na	0.6	0.6
Mg	2	1.7
P	2.4	2.4
S	1	1.5
Cl	0.8	0.8
K	7.4	8.5
Ca	0.5	0.6
Fe	350	410

H, C, N и S классическим методом органического элементного анализа. Определение O и Na целесообразно проводить методом ЭЗРСМА, а более тяжелых элементов - методом РФМА.

ЛИТЕРАТУРА

1. Определение микроэлементов в биологических жидкостях / Н.Б. Иваненко и [др.] // Ж. аналит. химии. 2011. Т. 66. № 9. С. 900-915.
2. Определение металлов Ca, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Sr, Ba и Pb в лекарственных растениях методом рентгенофлуоресцентного анализа / Е.В. Чупарина и [др.] // Аналитика и контроль. 2008. Т. 12, № 1-2. С. 2-10.
3. 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.
4. Bowen H.J.M. Environmental Chemistry of the Elements. London: Academic Press, 1979. 333 с.

X-RAY SPECTRAL ANALYSIS OF BLOOD WITHOUT SEPARATION OF ORGANIC COMPONENT.

O.I. Lyamina¹, T.A. Kupriyanova¹, I.P. Stolyarov¹, M.N. Filippov¹, A.A. Viryus²

¹*Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry of Russian Academy of Science
Leninsky prosp., 31, Moscow, 119991, Russia*

²*Institute of Experimental Mineralogy of Russian Academy of Sciences
Academica Osypyana ul., 4, Chernogolovka, Moscow region, 142432, Russia*

The possibility of X-ray spectral analysis of blood and plasma without separation of organic component has been investigated. The organic components influence has been calculated as total H, C, N, S determination by elemental analysis method. O and Na has been determined by electron probe microanalysis, elements more heavy then Mg – by X-ray fluorescence microanalysis.

Keywords: X-ray spectral analysis, matrix effects, non-analysis elements, blood, plasma, biological materials.