

Министерство образования и науки Российской Федерации

**Государственное образовательное учреждение
Высшего профессионального образования
«Оренбургский государственный университет»**

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХИМИЧЕСКИХ ЭЛЕМЕНТОВ

Рекомендовано Ученым советом Государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Оренбургский государственный университет» в качестве учебного пособия для студентов, обучающихся по программам высшего профессионального образования по направлению 020101 – Химия и 020201 - Биохимия

Оренбург
ИПК ГОУ ОГУ
2011

УДК 543+577
ББК 24.4:22.902
Б

Рецензент - академик РАН, д-р.мед.наук, профессор Л. Ф. Панченко

Авторы: М.Г. Скальная, Е.В. Лакарова, А.В. Скальный, Т.И. Бурцева

Скальная, М. Г.

Б Современные методы определения химических элементов: учебное пособие / М.Г. Скальная, Е.В. Лакарова, А.В. Скальный, Т.И. Бурцева; Оренбургский гос. ун-т. – Оренбург : ОГУ, 2011. – 164 с.

В учебном пособии обобщены знания, накопленные современной аналитической химией в области анализа элементного состава биологических объектов. Описаны разнообразные технологии элементного анализа, от несложных методик качественного определения ионов до современных инструментальных физико-химических многоэлементных методов. Предназначается для ученых, преподавателей, студентов, а также всех, кто по роду своей деятельности связан с проблемами аналитического определения химических элементов в биологических образцах и объектах окружающей среды.

Учебное пособие предназначено для студентов направления 020101 - Химия и 020201 – Биология.

Учебное пособие подготовлено при поддержке Конкурс РГНФ – “Урал: история, экономика, культура” № 10-06-81602 а/У, № 11-06-81602 а/У. и администрации Оренбургской области.

УДК
ББК

ISBN

© Скальная М. Г.,
Лакарова Е. В.,
Скальный А. В.,
Бурцева Т.И., 2010
© ГОУ ОГУ, 2010

Содержание

Введение	5
Обозначения и сокращения.....	7
1 Современные подходы к оценке элементного статуса человека.....	9
1.1 Химические элементы и здоровье человека: основные понятия, общие положения, классификация.....	9
1.2 Оценка элементного статуса и обеспеченности химическими биоэлементами-микронутриентами.....	20
1.3 Определение содержания химических элементов в цельной крови и моче.....	24
1.4 Анализ элементного состава волос.....	25
1.5 Современное состояние проблемы нормирования элементного состава биосубстратов.....	28
1.6 Биомаркеры элементного статуса.....	30
2 Показатели обеспеченности организма человека эссенциальными химическими элементами.....	31
2.1 Кальций.....	31
2.2 Магний.....	33
2.3 Железо.....	35
2.4 Медь.....	36
2.5 Цинк.....	39
2.6 Марганец.....	40
2.7 Селен.....	41
2.8 Хром.....	43
3 Физико-химические метода анализа.....	45
4 Спектрометрические методы анализа.....	49
5 Атомная спектрометрия.....	51
5.1 Атомно-эмиссионный анализ.....	53
5.2 Атомно-эмиссионный анализ с индуктивно связанной плазмой ИСП-АЭС (ОЭС).....	55
5.3 Атомно-эмиссионная фотометрия пламени.....	57
5.4 Атомноабсорбционная спектрофотометрия.....	58
5.5 Рентгеновская спектрометрия.....	60
5.6 Радиометрические методы.....	61
6 Молекулярная спектрометрия.....	63
6.1 Спектрофотометрический анализ.....	65
6.2 Флуориметрический анализ.....	70
6.3 Инфракрасная спектрометрия.....	72
6.7 Спектрометрия магнитного резонанса.....	76
6.8 Масс-спектрометрия.....	81
7 Электрохимические методы анализа.....	84
7.1 Кондуктометрия и кондуктометрическое титрование.....	87
7.2 Потенциометрия и потенциометрическое титрование.....	90

7.3	Вольтамперометрия.....	96
7.4	Кулонометрия и кулонометрическое титрование.....	102
8	Хроматографические методы анализа.....	105
8.1	Газо-жидкостная хроматография.....	108
8.2	Высокоэффективная жидкостная хроматография.....	110
8.3	Тонкослойная и распределительная хроматография.....	112
8.4	Ионная хроматография.....	114
9	Автоматизация анализа растворов.....	116
10	Информационная эффективность методов анализа и их общая оценка.....	120
11	Актуальные вопросы методологии определения содержания химических элементов в биообразцах.....	123
11.1	Факторы, предшествующие забору проб, и их влияние на их элементный состав биообразцов.....	125
11.2	Влияние внешних факторов на элементный состав биообразцов.....	127
11.3	Обеспечение качества анализа.....	132
11.4	Выбор метода анализа.....	137
11.5	Анализ химических форм элементов («speciation analysis») в биологии и медицине.....	139
11.6	Изотопный состав.....	144
11.7	Электронное состояние и степень окисления.....	145
11.8	Неорганические соединения и комплексы.....	145
11.9	Органические комплексы.....	146
11.10	Металлоорганические соединения.....	147
11.11	Макромолекулярные соединения и комплексы.....	147
11.12	Фракционирование.....	148
	Заключение.....	152
	Список использованных источников.....	161

Введение

Химические элементы в свободном состоянии и в виде множества химических соединений входят в состав всех клеток и тканей человеческого организма. Они являются важнейшими катализаторами различных биохимических реакций, непреходящими и незаменимыми участниками процессов роста и развития организма, обмена веществ, адаптации к меняющимся условиям окружающей среды. Из 92 химических элементов, встречающихся в природе, 81 обнаружен в организме человека. Из них 12 элементов называют структурными, так как именно они в основном (на 99 %) формируют элементный состав человеческого организма.

На долю всего 4 элементов-органогенов (О, С, Н, N) приходится 96 % массы человеческого тела, тогда как на минеральные вещества 4 %, а на микроэлементы всего 0,05%. В зависимости от концентрации химических элементов в организме, выделяют макро- и микроэлементы. Макроэлементами принято считать те химические элементы, содержание в организме которых более 0,005% массы тела. К макроэлементам относятся водород, углерод, кислород, азот, натрий, магний, фосфор, сера, хлор, калий, кальций.

Микроэлементами называются химические элементы, содержащиеся в организме в очень малых количествах. Их содержание не превышает 0,005 % массы тела, а концентрация в тканях - не более 0,000001 %. Среди всех микроэлементов в особую группу выделяют так называемые незаменимые микроэлементы.

Незаменимые микроэлементы входят в состав ферментов, витаминов, гормонов и других биологически активных веществ. К незаменимым микроэлементам относятся железо, йод, медь, марганец, цинк, кобальт, молибден, селен, хром, фтор [15].

Тяжелая экологическая ситуация, возрастание стрессовых ситуаций, современные методы обработки продуктов питания, «убивающие» биологически активные вещества, являются основными причинами повсеместного роста дефицита жизненно важных элементов и избытка токсичных, наносящих непоправимый вред здоровью. Ежедневное поступление химических элементов с пищей должно

находиться на определенном уровне. Столько же химических элементов должно ежедневно выводиться из организма, поскольку их содержания находятся в относительном постоянстве.

В настоящее время наиболее часто возникает потребность в определении содержания в биобразцах макроэлементов (Ca, Mg, K, Na, P, S, Cl), а также таких микроэлементов как Fe, Zn, Cu, Se, J, Pb, Cd и Hg. Остальные элементы определяются значительно реже. Это обусловлено в значительной степени актуальностью тех или иных химических элементов в медицине и биологии, иногда «модой» на некоторые из них, а также аналитическими возможностями лаборатории, т.е. субъективными факторами. Постоянно ощущается необходимость в простых по выполнению, точных, чувствительных методиках, которые позволяли бы определять компонент в сложной по составу смеси. С нашей точки зрения, современный уровень развития науки требует одновременного определения максимального допустимого (с точки зрения надежности получаемых данных) количества макро – микроэлементов, т.к. биологическая роль межэлементных взаимодействий очень значима. Внедрение в исследовательскую практику современных методов многоэлементного анализа эффективно не только с диагностической, но и с экономической точки зрения: мы получаем не только более полную картину происходящих в организме процессов, в которых вовлечены химические элементы, но и прямую экономическую выгоду в виде снижения стоимости элементопределения [13].

Обозначения и сокращения

- АЭС – атомно-эмиссионная спектрометрия
БДУ – биологически допустимый уровень
БХ – бумажная хроматография
ВЧ – высокочастотный
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ГЖХ – газо-жидкостная хроматография
ГХ – газовая хроматография
ИК – инфракрасный
ИСП – индуктивно связанная плазма
ИСЭ – ионселективный электрод
ИЮПАК – Международный союз теоретической и прикладной химии
МАГАТЭ – Международное агентство по атомной энергии
МС – масс-спектрометрия
МЭ – микроэлемент
НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НФХ – нормально-фазовая хроматография
ОФХ – обращено-фазовая хроматография
ПИА – проточно-инжекционный анализ
РКЭ – ртутный капающий электрод
СЭ – селективный электрод
ТСХ – тонкослойная хроматография
УБДУ – условный биологически допустимый уровень
УФ – ультрафиолетовый
ФХМА – физико-химические методы анализа
ХМА – хроматографические методы анализа
ХЭ – химический элемент
ЩЗМ – щелочноземельные металлы
ЭДС – электродвижущая сила

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

ЭМА – электрохимические методы анализа

ЭПР – электронный парамагнитный реонанс

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

1 Современные подходы к оценке элементного статуса человека

1.1 Химические элементы и здоровье человека: основные понятия, общие положения, классификация

Развитие знаний о химическом составе человеческого тела и значении химических элементов для жизни и здоровья человека тесно связано с именами наших выдающихся соотечественников: В.И.Вернадского, А.П.Виноградова, А.И.Венчикова, В.В.Ковальского, Г.А.Бабенко, А.П.Авцына и рядом других видных ученых - биогеохимиков, биологов и врачей.

Химические элементы в свободном состоянии и в виде множества химических соединений входят в состав всех клеток и тканей человеческого организма. На рисунке 1 представлен элементный состав тела человека. На долю всего 4 элементов-органогенов (О, С, Н, N) приходится 96 % массы человеческого тела, тогда как на минеральные вещества 4 %, а на микроэлементы всего 0,05 %. Химические элементы являются важнейшими катализаторами различных биохимических реакций, непреходящими и незаменимыми участниками процессов роста и развития организма, обмена веществ, адаптации к меняющимся условиям окружающей среды (рисунки 1, 2).

Физиологическое действие различных элементов зависит от их дозы. Поэтому токсичные элементы (мышьяк, ртуть, сурьма, кадмий и др.) при низких концентрациях могут действовать на организм как лекарство (оказывая тем самым саногенетическое воздействие), тогда как натрий, калий, кальций, железо, магний и ряд других элементов в высоких концентрациях могут обладать выраженным токсическим эффектом.

Для осуществления жизненно важных функций для каждого элемента существует оптимальный диапазон концентраций. При дефиците или избыточном накоплении элементов в организме могут происходить серьезные изменения, обуславливающие нарушение активности прямо или косвенно зависящих от них ферментов.

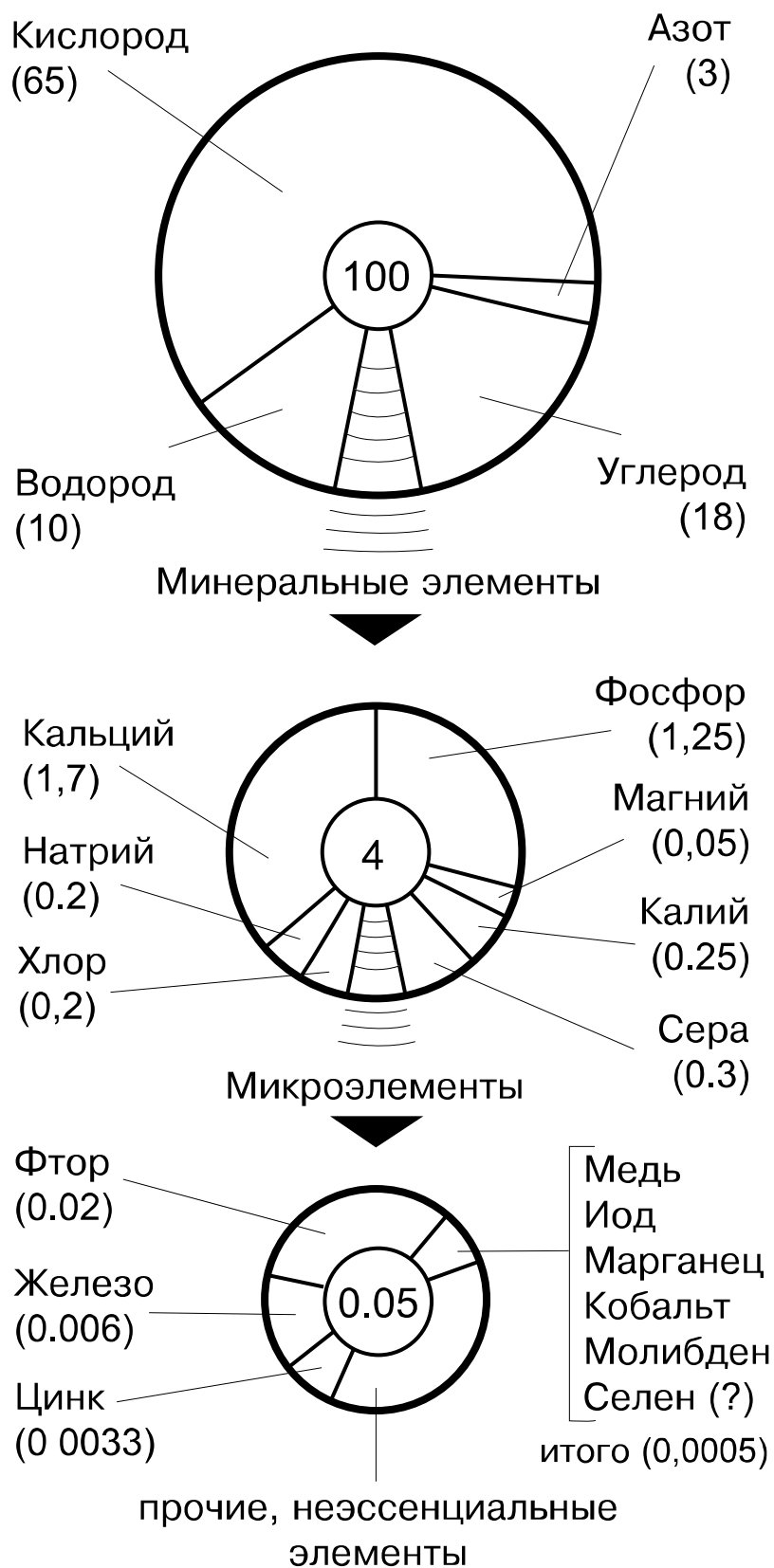


Рисунок 1 - Из чего состоит человеческое тело (в % от массы тела) [8]/

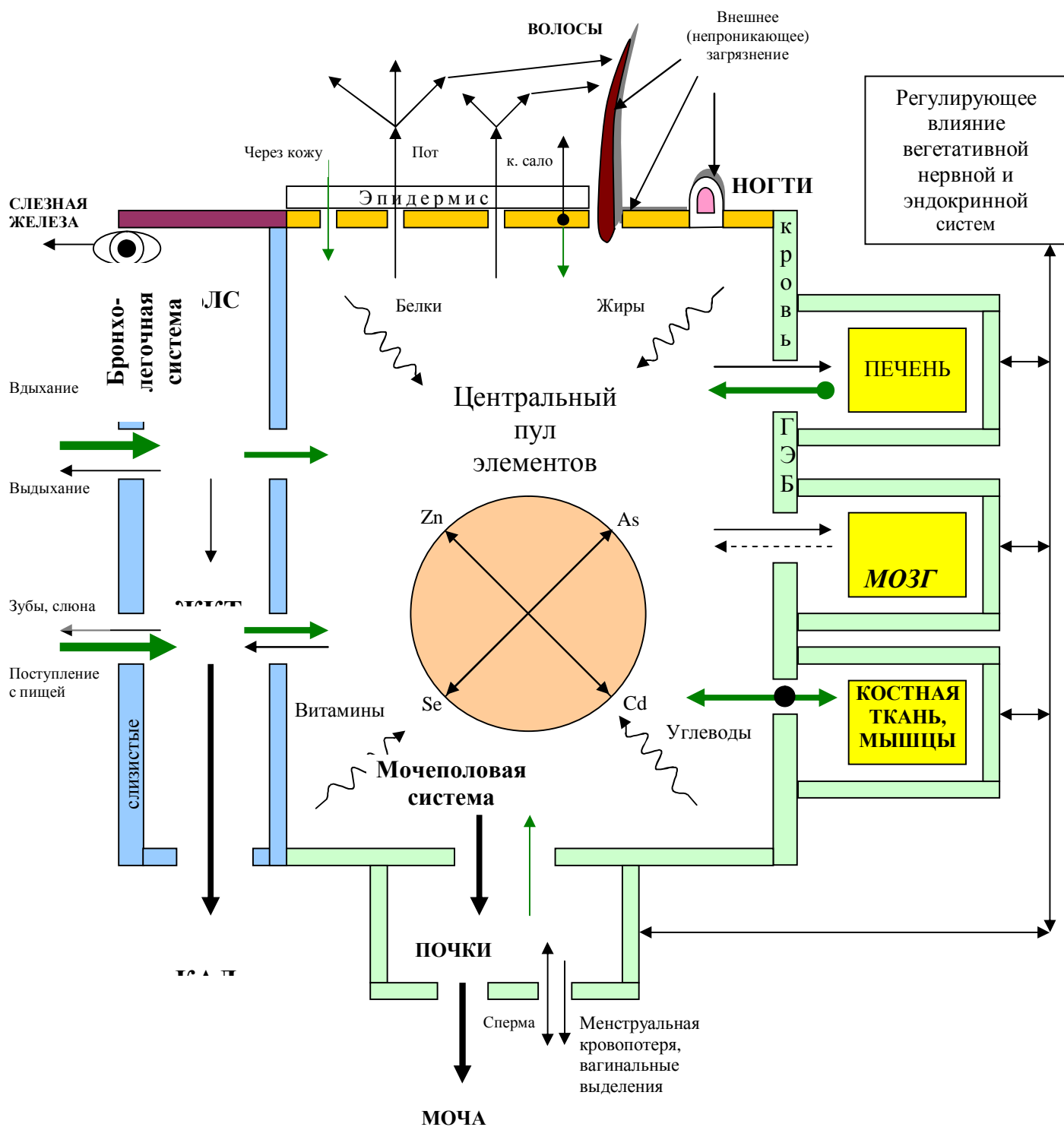


Рисунок 2 - Физиологические механизмы обмена химических элементов [15].

Применение минералов и металлов в лечебных целях известно со времен древнейших цивилизаций Китая, Индии, Месопотамии. Новый импульс применению солей в качестве лекарств отмечен во время Парацельса (XV век). Вплоть до начала XX века металлы и их соединения широко использовались в медицине.

Лечебные свойства элементов и их соединений, как правило, близки или идентичны. К таким соединениям относятся и комплексы с компонентами, свойственными живому организму. По мере развития химии ученые стали все чаще отмечать, что действие, например, металлов, может быть усилено при образовании ими соединений с лекарственными веществами, специфичными по отношению к тому или иному заболеванию. Это обусловлено тем, что в организме химические элементы находятся преимущественно в виде координационных соединений, избыточное образование или распад которых может приводить к нарушению так называемого металло-лигандного гомеостаза, а в дальнейшем и к развитию патологических изменений. Более половины средств современной фармакотерапии представляют собой потенциальные комплексообразующие вещества – лиганды, или металлы и их соединения. Комплексы металл-лекарство могут образовываться в организме в результате приема лекарств – потенциальных лигандов, за счет связывания металлов, входящих в состав металлоферментов (так называемые эндогенные комплексы). В том и другом случае, образовавшиеся координационные соединения элементов, как правило, обладают большой биологической усвояемостью, терапевтической эффективностью и безопасностью [14].

Элементы-металлы и лиганды (например, глутаминовая, аспарагиновая, липоевая, аскорбиновая кислоты и др.), могут выступать в качестве активаторов или ингибиторов различных ферментов, что обуславливает их существенную роль в энзимотерапии различных заболеваний. В конечном итоге успехи координационной химии позволили в последнее десятилетие создать много новых высокоэффективных средств на основе соединений химических элементов и органического вещества (лиганда). В современной медицине металло-лигандные комплексы, наряду с их использованием в качестве самостоятельных терапевтических агентов, являются важными компонентами режимов рационального питания, требующих набора необходимых элементов в легко усваиваемой форме.

Важнейшей особенностью функционирования химических элементов в организме является их взаимодействие друг с другом; часто это взаимодействие проявляется в виде синергических или антагонистических эффектов.

По-видимому, синергистами можно считать такие элементы, которые взаимно способствуют абсорбции в пищеварительном тракте, "помогают" друг другу в осуществлении какой-либо функции на тканевом и клеточном уровне.

В этом случае наблюдаются ситуации, характеризующиеся непосредственным взаимодействием элементов (например, Ca и P, Na и Cl), когда уровень абсорбции определяется их оптимальным соотношением в рационе и химусе. Сочетанное действие элементов в подобных случаях может быть опосредовано через процессы фосфорилирования в стенке кишечника или влияния на активность пищеварительных ферментов. Возможно также и не прямое взаимодействие, напр., путем стимуляции размножения и активности микрофлоры в желудке и кишечнике.

Синергические механизмы функционируют также и на уровне тканевого и клеточного метаболизма. В числе таких механизмов можно выделить взаимодействие элементов в структурных процессах, например. Ca и P - в формировании костей, Fe и Cu - в синтезе гемоглобина, Mn и Zn - в конформации молекул РНК в печени. Элементы синергисты могут вместе участвовать в формировании активного центра какого-либо фермента (например, Fe и Mo в составе ксанти- и альдегидоксидаз, или Cu и Fe - в составе цитохромоксидаз). Они также могут оказывать синергический эффект на активирование ферментных систем и усиление процессов синтеза веществ, активировать функции эндокринных органов и опосредованно влиять через гормоны на обменные процессы.

Антагонистами можно считать элементы, которые тормозят абсорбцию друг друга в пищеварительном тракте или оказывают противоположное влияние на какую-либо биохимическую функцию в организме. В отличие от синергизма, который чаще бывает взаимным, антагонизм может быть обоюдным или односторонним. Так, Mg и P, Zn и Cu взаимно тормозят абсорбцию друг друга в кишечнике, а Ca ингибирует абсорбцию Zn и Mg (но не наоборот).

Эффект ингибирования абсорбции одних элементов другими в пищеварительном канале может быть обусловлен простым химическим взаимодействием элементов, конкуренцией за вещество-переносчик ионов в кишечной стенке, например, Co^{2+} , Fe^{2+} .

На рисунке 3 показаны основные взаимодействия химических элементов между собой. Безусловно, данная схема не отражает все возможные варианты взаимодействия. Кроме того, следует также учитывать и возможную специфику взаимосвязей у представителей разного пола при различных физиологических состояниях; психо-эмоциональной, физиологической нагрузки и времени года.

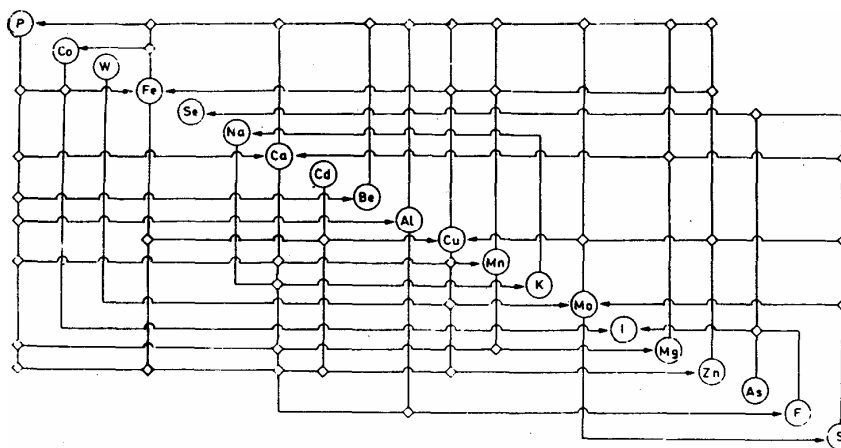


Рисунок 3 - Взаимодействие химических элементов [15].

В процессе тканевого метаболизма, где химические элементы находятся в основном в ионной форме, возможно существование ряда механизмов антагонистического взаимодействия, в числе которых механизм конкуренции ионов за активные центры в ферментных системах (например, Mg^{2+} и Mn^{2+} в металлоферментных комплексах щелочной фосфатазы). В основе другого механизма лежит конкуренция за связь с веществом-переносчиком в крови (например, Fe^{2+} и Zn^{2+} являются конкурентами за связь с трансферрином плазмы). Возможно также антагонистическое влияние ионов разных элементов на один и тот же фермент, активирование ионами ферментных систем выполняющих противоположные функции и т.д.

Все вышеизложенное имеет большое значение не только потому, что уже изученные к настоящему времени двух-, трех- и многосторонние взаимосвязи между

химическими элементами в организме исчисляются сотнями, но и потому, что эти сложнейшие взаимодействия определяют сложный характер внешних проявлений, возникающих вследствие нарушений метаболизма жизненно-важных химических элементов.

В настоящее время проблема диагностики и коррекции нарушений обмена макро- и микроэлементов является чрезвычайно актуальной. Дефицит ряда эссенциальных микроэлементов (селена, цинка, железа, йода, марганца) и интоксикация токсичными микроэлементами (ртуть, свинец, мышьяк) способствуют росту частоты злокачественных новообразований кожи, мозга, желудочно-кишечного тракта, лимфопролиферативных заболеваний, инфекционных патологий, аутоиммунных заболеваний, дегенеративных заболеваний (атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, болезнь Альцгеймера). Поэтому первичный скрининг, направленный на выявление нарушений обмена макро- и микроэлементов, и их медикаментозная коррекция должны стать концептуальным направлением современной медицины.

По классификации, основанной на количественном признаке, все химические элементы делятся на три группы в соответствии с их содержанием в организме: макроэлементы, микроэлементы (МЭ) и ультрамикроэлементы.

Система классификации по количественному признаку проста и удобна, но она не дает ответа на главный вопрос - какова биологическая роль того или иного элемента в организме. Кроме того, количественное содержание некоторых элементов в организме может значительно варьировать в зависимости от среды обитания человека, его рациона питания и характера трудовой деятельности.

Классификация химических элементов по их биологической роли позволяет подразделить все элементы на группы **эссенциальных**, условно эссенциальных и токсических. Группа эссенциальных элементов включает в себя все макроэлементы, часть микро- и ультрамикроэлементов. Это подтверждает мысль о том, что порядок концентрации того или иного микроэлемента в организме еще не определяет его биологического значения. Вторую значительную группу элементов составляют **токсичные** микроэлементы.

Сложность проблемы состоит в том, что сами эссенциальные МЭ при определенных условиях могут вызывать токсичные реакции, а отдельные токсические МЭ при определенной дозировке и экспозиции могут обнаруживать свойства эссенциальных МЭ, т.е. оказываться полезными и даже жизненно важными (таблица 1).

Таблица 1 - Классификация химических элементов по биологической роли для млекопитающих животных

Жизненно необходимые элементы		Вероятно необходимые элементы	Элементы с малоизученной ролью	
Кальций	Сера	Фтор	Литий	Бериллий
Фосфор	Магний	Кремний	Бор	Скандий
Калий	Железо	Титан	Алюминий	Галлий
Хлор	Медь	Ванадий	Германий	Рубидий
Натрий	Кобальт	Хром	Цирконий	Серебро
Цинк		Никель	Олово	Сурьма
Марганец		Мышьяк	Цезий	Барий
Молибден		Бром	Ртуть	Свинец
Йод		Стронций	Висмут	Радий
Селен		Кадмий	Торий	Уран

По мнению ряда исследователей, микро- и ультрамикроэлементы вообще не следует отождествлять с минеральными веществами по той причине, что в организме они содержатся главным образом в виде органических соединений или комплексов, обладающих биологической активностью. Однако это обстоятельство, по-видимому, не может быть основанием для обособления микроэлементов в особую группу биологически активных веществ.

С точки же зрения науки о питании микроэлементы являются столь же необходимыми компонентами питания, как и другие нутриенты, независимо от того, в какой форме и количествах они поступают в организм.

Элемент может быть отнесен к группе эссенциальных, если он удовлетворяет следующим требованиям:

- постоянно присутствует в организме в количествах, сходных у разных индивидуумов;

- ткани по содержанию данного элемента всегда располагаются в определенном порядке;

- синтетический рацион, не содержащий этого элемента, вызывает у животных характерные симптомы недостаточности и определенные биохимические изменения в тканях;

- эти симптомы и изменения могут быть предотвращены или устранены путем добавления данного элемента в пищу.

Вероятно, что необходимые элементы (или условно эссенциальные) также можно обнаружить в различных биосредах в относительно стабильных количествах, однако они не удовлетворяют всем перечисленным выше требованиям. Участие этих элементов в обменных процессах может ограничиваться отдельными тканями и в ряде случаев требует экспериментального подтверждения.

Однако строго ограничивать группу биогенных элементов тоже нельзя, поскольку возможно открытие биологической роли новых элементов. Например, в последние десятилетия установлена биотическая роль селена, появились экспериментальные и клинические данные об участии в метаболических процессах фтора, хрома, кремния, мышьяка.

Классификация элементов по степени их биогенности имеет существенные недостатки: она имеет слишком общий вид, не отражает механизма влияния химических элементов на организм и не позволяет достаточно точно предвидеть возможную биологическую роль или токсикологический эффект того или иного элемента. В настоящее время исследователи вынуждены давать индивидуальную оценку каждому элементу [3].

Обилие предложенных классификаций уже само по себе свидетельствует об их несовершенстве. Действительно, "структурные" элементы одновременно являются "эссенциальными", в свою очередь, «эссенциальные» при определенных условиях становятся "токсическими", а «токсические» элементы в малых концентрациях могут быть полезными и даже необходимыми для организма. Поэтому некоторые из токсических элементов, такие как Cd, Pb, Al, Rb, называют "серьезными кандидатами на эссенциальность". Таким образом, огромная и

разнообразная роль химических элементов в процессах жизнедеятельности и недостаточная изученность этой проблемы делают невозможным при современном уровне знаний создание единой совершенной классификации.

Для обозначения химических элементов, обеспечивающих жизнедеятельность организма, предлагались различные названия, которые подчеркивали связь этих элементов с жизнью: биотический элемент, биогенный элемент, атомовит и др. По нашему мнению, использование для этой цели термина "**биоэлемент**" от греч. *bios* (жизнь), в качестве первой составной части термина (ср. - биотики, биосфера и др.), представляется наиболее правильным. Основными отличительными признаками биоэлементов по сравнению с элементами являются:

- более низкая токсичность;
- более высокая усвояемость;
- соответствие форме нахождения в организме (в форме соединений, аналогичных природным: глицинаты, аспартаты, фосфаты, цитраты, гистидинаты, оротаты и др.).

Например, селен в виде селенита натрия не является биоэлементом в отличие от селеноцистеина или селенометионина, так же как цинк в виде сульфата по сравнению с аспарагинатом, глутаматом, пиколинатом и глицинатом цинка. Возможно, что свободный ион (катион, анион) - это переходная форма между химическим элементом и биоэлементом. Например, биоэлемент - металл в составе метало-лигандного комплекса: металл – аминокислота (цинк – аспартат, гистидинат, глицинат); металл – органическая кислота (калия цитрат, кальция лактат и др.). Биоэлементами являются водород и кислород, входящие в состав молекул воды; азот, входящий в состав аммиака и др.

Разумеется, роль многих химических элементов в организме в настоящее время еще до конца не выяснена. Однако с достаточной уверенностью можно предположить, что список необходимых для жизни «эссенциальных» элементов будет расширяться, пополняясь за счет "токсичных" элементов и тех элементов, чья биологическая роль пока еще недостаточно ясна.

Что же касается рассмотренных выше классификаций, то, по-видимому, наиболее обоснованным в настоящее время является деление биоэлементов на **органогены, макро-, микро- и ультрамикроэлементы**. Хотя это деление является чисто условным, в его основу положен достоверный факт, свидетельствующий о том, что отдельные биоэлементы в организме содержатся в различных количествах. Кроме того, исторически сложилось так, что с макроэлементами в большей мере связываются представления о "структурных" функциях, с микроэлементами - биохимическая и физиологическая активность, несоразмерная с их малым содержанием в человеческом теле, а с ультрамикроэлементами - токсичность и недостаточная изученность их роли в организме.

В нашей стране по предложению академика РАМН А.П. Авцына для обозначения всех патологических процессов, вызванных дефицитом, избытком или дисбалансом макро- и микроэлементов, введено понятие **микроэлементозов**, классификация которых приведена в таблице 2. **Под микроэлементозами человека понимают состояния дефицита, избытка или дисбаланса химических элементов, которые естественным образом отражаются на его здоровье.**

Таблица 2 - Рабочая классификация микроэлементозов (МТОЗ) человека [1]

МТОЗы	Основные формы заболеваний	Краткая характеристика
1	2	3
Природные Эндогенные	1 Врожденные 2 Наследственные	При врожденных микроэлементозах в основе заболевания может лежать микроэлементоз матери. При наследственных микроэлементозах недостаточность, избыток или дисбаланс МЭ вызываются патологией хромосом или генов
Природные Экзогенные	1 Вызванные дефицитом МЭ 2 Вызванные избытком МЭ 3 Вызванные дисбалансом МЭ	Природные, т. е. не связанные с деятельностью человека и приуроченные к определенным географическим локациям эндемические заболевания людей, нередко сопровождающиеся теми или иными патологическими признаками у животных и растений

Продолжение таблицы 2

1	2	3
Техногенные	1 Промышленные (профессиональные) 2 Соседские 3 Трансгрессивные	Связанные с производственной деятельностью человека болезни и синдромы, вызванные избытком определенных МЭ и их соединений непосредственно в зоне самого производства; по соседству с производством; в значительном отдалении от производства за счет воздушного или водного переноса МЭ
Ятрогенные	1 Вызванные дефицитом МЭ 2 Вызванные избытком МЭ 3 Вызванные дисбалансом МЭ	Быстро увеличивающееся число заболеваний и синдромов, связанных с интенсивным лечением разных болезней препаратами, содержащими МЭ а также с поддерживающей терапией (например, с полным парентеральным питанием) и с некоторыми лечебными процедурами - диализом, не обеспечивающим организм необходимым уровнем жизненно важных МЭ

1.2 Оценка элементного статуса и обеспеченности химическими биоэлементами- микронутриентам

Для оценки элементного статуса человека используют определение элементного состава биосубстратов, а также изучение активности или определение содержания ферментов или метаболитов, отражающих косвенно уровень химических элементов в органах и тканях. В таблице 3 приведены различные элемент-специфические лабораторные показатели, наиболее часто используемые в диагностических целях [15].

Таблица 3 - Элементспецифические индикаторные функции [15]

Элемент	Кинетические индикаторы		Динамические индикаторы
	установленные	возможные	
1	2	3	4
Al	Плазма крови	Моча, волосы	P, Ca щелочная фосфатаза
Sb	Моча и волосы	Цельная кровь	Клинический анализ крови
As	Моча и волосы, ногти	кровь	Аминолевулиновая кислота, фетальный эритропротеин δ, аудиограмма
Pb	Цельная кровь и моча	Волосы, зубы	Аминолевулиновая кислота в моче, нервно-мышечная проводимость, цинк-протопорфирин, копропорфирин
Cd	Моча и цельная кровь	Волосы	β2-микроглобулин в моче
Cr	Эритроциты	Волосы	гиалуронидаза плазмы крови, насыщенность трансферрина хромом, тест на толерантность к глюкозе
Fe	Плазма крови	Волосы	Ферритин плазмы, свободный эритропорфирин, насыщенность железом трансферрина
F	Моча	Волосы	Рентгенография костей
Au	Волосы, ногти	Моча и плазма крови	Картина крови
I	Моча, плазма крови	Волосы	йод, связанный с белком
Cu	Плазма крови, волосы	Моча, ногти	Церулоплазмин, лизилоксидаза, дофамин-β-гидроксилаза
Li	Плазма крови	Моча, волосы	
Mn		Волосы и моча	ЭЭГ, ЭМГ, агглютинация эритроцитов, 17-кетостероиды в моче
Pt	Моча и плазма крови	Волосы	-
Ag	Моча	Волосы и плазма крови	-

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4
Mo	Моча и плазма крови	Волосы, ногти	Церулоплазмин, медь в моче, мочева кислота в плазме и моче
Hg	Моча	Кровь и волосы, слюна	Лизосомальные ферменты в плазме крови, белок в моче
Se	Моча и волосы, плазма крови	Ногти	Глутатионпероксидаза в эритроцитах
Zn	Моча, плазма крови и волосы	Слюна, ногти	Ретинолсвязывающий белок, изменение вкуса и обоняния

Поскольку определение концентрации элементов в биосубстратах, полученных у человека, является прямым доказательством их уровня в организме, мы остановимся более подробно на вопросах, связанных с использованием цельной крови, плазмы/сыворотки, мочи и волос человека в качестве диагностических биосубстратов. Согласно современным представлениям, элементный состав этих биосубстратов отражает концентрацию химических элементов во внутренней среде организма и их метаболизм.

Для оценки элементного статуса в клинической лабораторной диагностике наиболее часто используют анализ сыворотки и плазмы крови. Определение в сыворотке или в плазме крови отражает текущее состояние обмена конкретного элемента, так как они являются транспортной средой, в которой элемент находится от момента его резорбции из желудочно-кишечного тракта до поступления к месту осуществления физиологического действия или депонирования, а также экскреции из организма. Помимо этого, в сыворотке и плазме крови элементы находятся в составе продуктов метаболических и катаболических процессов. Принципиальным является положение о том, что информация, полученная с помощью анализа сыворотки и плазмы крови, отражает обменные взаимосвязи между различными органами или метаболически активными компартаментами организма.

То есть, в сыворотке и плазме крови мы определяем только общую концентрацию элемента, характерную для момента непосредственного забора пробы. Недостатком анализа общей концентрации элемента является то, что

дефицит его в сыворотке и плазме крови появляется после наступления заболевания, то есть вследствие обеднения организма, связанного с усиленным его выведением. Поэтому специфические изменения концентрации отдельных металлопротеинов зачастую не могут быть распознаны своевременно и их колебания находятся в пределах колебаний ошибки метода анализа и зависят от их связанности с белком.

Хорошо известно, что элементный состав внутренней среды организма находится под контролем гомеостатических механизмов [10], что влияет на информативность анализов сыворотки крови, а также сужает возможности их применения на донозологических и начальных стадиях развития заболевания [9]. Для того, чтобы повысить аналитическую информативность, необходимо определять, в каком виде,- связанном или свободном,- и в каких пропорциях находится элемент в сыворотке крови. Это поможет понять механизмы резорбции, обмена, транспорта и выделения макро- и микроэлементов.

Одна из важнейших проблем, связанная с применением анализа микроэлементов – их возможная контаминация в процессе забора, хранения, транспорта и преаналитической обработки пробы. Известно, что даже незначительный гемолиз может приводить к повышению концентрации Fe, Cu, Zn, Pb, Rb, Mn и Mg в сыворотке крови от нескольких десятков до сотен процентов, при этом “фактор различия” в концентрации Fe может достигать 500, Pb – более 200, Mn – более 20, Zn – 7, а Mg – 2,5. При контакте с медицинским инструментарием возможно наружное загрязнение Al, Cr, Mn, Ni, Zn, что требует специальных методов забора и хранения. Так, например, по данным немецких ученых, отбор пробы крови с помощью обычного медицинского шприца может повышать концентрацию Al в сыворотке крови почти в 10 раз (от $1,4 \pm 0,9$ до $13,0 \pm 1,9$ мкг/л) (Braetter, 2002). Поэтому, предпочтителен не шприцевой отбор крови, а забор с использованием венных канюль из пластического материала. Имеет значение также применение антикоагулянтов (оксалат, цитрат, ЭДТА, гепарин), которые обычно приводят к загрязнению образцов ионами металлов. С этой точки зрения, анализ сыворотки крови предпочтительнее анализа плазмы при определении элементного статуса.

К сожалению, на каждой стадии взятия, хранения и обработки сыворотки крови и тем более плазмы нельзя исключить возможности их загрязнения ионами металлов. Это предопределяет проблематичность в широком использовании плазмы и сыворотки крови для оценки элементного статуса в нашей стране с учетом относительно низкого уровня лабораторной техники и отсутствия специально подготовленного персонала клиник и многих научных учреждений для работы с этими наиболее распространенными диагностическими биосубстратами.

1.3 Определение содержания химических элементов в цельной крови и моче

Использование в диагностических целях такого биосубстрата, как цельная кровь, связано с теми же проблемами, что и в случае с сывороткой и плазмой крови. Однако, из-за того, что концентрация химических элементов в цельной крови намного выше, чем в сыворотке, для ее анализа можно ограничиться забором капиллярной крови, что уменьшает инвазивность пробоотбора, и особенно ценно при скрининговых исследованиях, например для определения нагрузки организма детей Рв.

Необходимо отметить, что при пробоподготовке цельной крови возрастает риск потерь элементов при применении таких еще доминирующих в отечественных лабораториях методов минерализации, как озоление в муфельной печи и “мокрое” озоление с помощью кислот в открытых сосудах. Естественно, при двух перечисленных способах подготовки повышен риск, как потерь элементов, так и контаминации проб. Поэтому для получения валидных данных при элементном анализе цельной крови, а так же других биосубстратов следует применять современные методы минерализации в закрытых емкостях под давлением с использованием ультрачистых реагентов [9].

Для химических элементов моча является средой выведения. В основном она содержит продукты катаболизма и другие вещества, от которых организм избавляется в процессе обмена веществ. В целом, анализ содержимого мочи

отражает функцию почек, процесс выведения веществ и загрязнения токсическими веществами внутренней среды организма. Необходимо помнить, что моча, даже в большей степени, чем другие биосубстраты, является неомогенной, что, естественно, влияет на результаты исследования. Поэтому при анализе мочи на содержание химических элементов отдадут предпочтение анализу суточной мочи, а не одной ее порции. Единичная порция может быть информативна только при выраженной нагрузке организма, например, токсичными металлами.

Для исследования обменных процессов рекомендуется собирать мочу в течение 48 - 72 часов [40]. Во всех случаях необходимо собирать мочу в предварительно очищенные или одноразовые полиэтиленовые резервуары. При сборе мочи с помощью катетера возможно загрязнение кровью или материалом, из которого изготовлен катетер, что так же может отразиться на результатах анализа.

Все эти факторы, так же как в случае сыворотки и плазмы крови, ограничивают применение мочи в качестве диагностического биосубстрата при латентных стадиях заболеваний и донозоологических состояниях, когда возможные нарушения в ходе сбора, хранения и пробоподготовки могут быть более существенными, чем метаболические эффекты, особенно в случае изучения ультрамикрорезультатов. В любом случае, интерпретация данных о пониженном содержании элементов в моче более проблематична по сравнению с их высокими концентрациями. В первую очередь это касается условно токсичных и токсичных элементов, для которых ренальный путь выведения является существенным.

1.4 Анализ элементного состава волос

В сравнении с анализом крови или мочи элементный анализ волос имеет много преимуществ, среди которых одними из основных является высокая концентрация элементов в волосах, неинвазивность отбора проб, удобство при хранении и транспортировки. Отмечено, что в отличие от внутренних (жидких) биосред организма концентрация элементов в волосах менее подвержена жесткому гомеостатическому контролю, что предопределяет преимущества использования

элементного анализа волос в гигиенической, донозоологической диагностике и раннем выявлении патологических изменений в организме и латентных процессов. Тем не менее, информативность анализа волос, как показателя, отражающего элементный статус организма, продолжает дискутироваться в научной литературе.

Анализ волос нашел широкое применение в гигиене, токсикологии, судебно-медицинских исследованиях, например, при выявлении случаев отравления As, Hg, Cd, F, Ni, Mn, Pb. Были найдены значительные различия в изменении концентрации элементов в волосах при популяционных исследованиях в различных географических регионах. Так, например, при эпидемиологическом исследовании в Китае была выявлена зависимость между низкой концентрацией Se в волосах и эндемическим гипоселенозом [20]. В нашей стране и за рубежом проведены многочисленные исследования, в которых продемонстрирована отчетливая взаимосвязь между уровнем обеспеченности населения Zn, Se, Cu и другими микроэлементами с уровнем их содержания в волосах [15]. Также показана прямая зависимость между уровнем нагрузки популяции и индивидуума Pb, As, Hg, Cd, Ni, Cr и концентрациями этих элементов в волосах.

По мнению большинства авторов анализ волос может использоваться в качестве оценки элементного статуса не только на популяционном уровне, но и на индивидуальном [42]. Однако, некоторые исследователи [35] оспаривают это мнение и считают, что элементный анализ волос пригоден только для популяционных исследований элементного статуса. В целом, накопленные к настоящему времени данные убедительно свидетельствуют о том, что анализ волос отражает не только эндогенное содержание элемента, но и экзогенное воздействие и уровень выведения элементов из организма.

Согласно рекомендациям МАГАТЭ, во избежание мешающих влияний для анализа следует отбирать в 4-5 местах с затылочной части головы, применяя при этом ножницы из нитрида титана или керамики [30]. На концентрацию элемента в волосах могут влиять их окраска, цвет волос, длительное применение отдельных шампуней, мазей и других косметических и лечебных средств наружного применения [30, 31, 32]. Поэтому все перечисленные факторы должны учитываться

при оценке содержания химических элементов в волосах. В обобщенном виде сравнительная информативность элементного анализа волос показана в таблице 4.

Таблица 4 - Информативность определения химических элементов в крови, моче и волосах [11]

Элемент	Кровь	Моча	Волосы
1	2	3	4
As	+	+	+
Al	-	-	+
Ba	-	-	+
Bi	+	-	-
B	-	-	+
Cd	+	+	+
Ca	+	+	+
Cr	+	+	-
Co	+	-	-
Cu	+	+	+
Fe	-	-	+
Pb	+	-	+
Mg	-	-	+
Hg	+	+	-
P	-	-	+
Se	+	-	-
Ag	+	-	-
Sr	-	-	+
Tl	+	-	-
Zn	+	-	+

Зависимость диагностической ценности анализа волос и жидких биосубстратов от стадий патологического процесса и развитие дефицита макро – и микроэлементов представлены на рисунке 4.

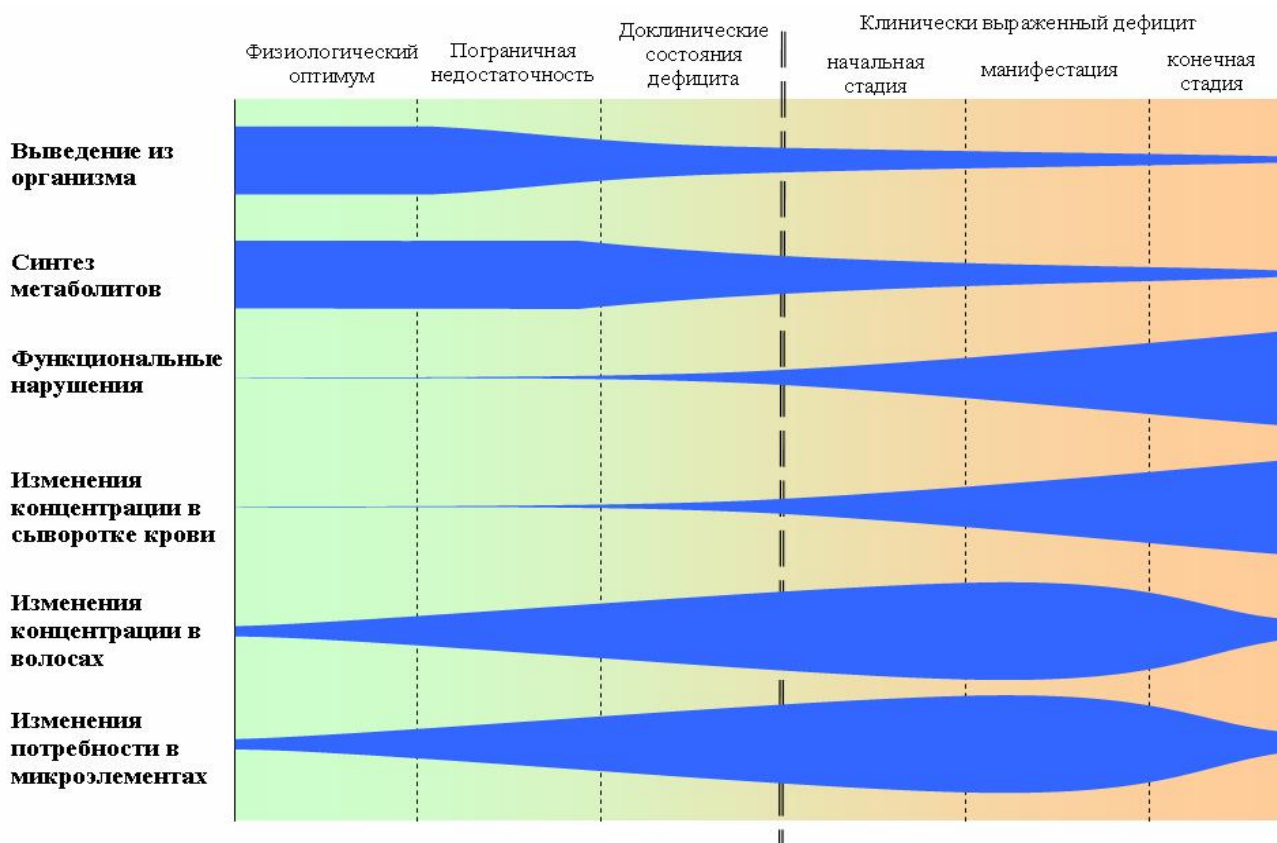


Рисунок 4 - Информативность определения химических элементов в биосубстратах в зависимости от стадии развития патологического процесса [10]

1.5 Современное состояние проблемы нормирования элементного состава биосубстратов

В последние десятилетия отмечаются попытки в установлении нормальных физиологических границ содержания химических элементов. Однако, использование статистических параметров средних величин или центильной шкалы (25-75 или 5-95 центили) могут быть расценены только как статистическая характеристика исследованной группы, но не как отражение состояния здоровья (Bertram, 1992) E.J. Wormer (2000) указывает, что понятие нормального значения содержания того или иного элемента лишь предполагается, однако в настоящее время не существует точного определения нормальности и здоровья населения. Поэтому принимается, что лабораторные анализы 95 % населения соответствует норме и только 5 % остальных находятся вне области нормальных значений. Это

приводит к хорошо известным проблемам в диагностике заболеваний и, особенно, в выявлении состояний предболезни и латентных, скрыто протекающих процессов.

Для формирования групп риска по интоксикации металлов в нашей стране предложено использовать такие показатели как биологически допустимый уровень и критический уровень содержания химических элементов в биосредах [10]. Условным допустимым уровнем считается такое количество вещества в организме или критическом органе, которое при постоянном его содержании не вызывает изменений состояния здоровья человека, обнаруживаемых современными методами исследований. При значительном превышении допустимого уровня по одному из элементов у многих обследованных целесообразно использовать понятие о **критическом уровне**, при котором наблюдаются биохимические изменения, связанные с токсическим воздействием металла или дефицитом жизненно важного элемента.

Нами [15] было введено понятие условного **биологически допустимого уровня** (БДУ), под которым подразумевались эмпирически установленные на основании многолетних клинических наблюдений уровни содержания химических элементов в волосах, при которых автор отмечал специфические изменения в состоянии здоровья, заболеваемости людей. Практически условный биологически допустимый уровень (УБДУ) соответствует верхней или нижней границе физиологического содержания элемента. Впервые в этой работе был поставлен вопрос о необходимости разработать нижние и верхние БДУ (или границы физиологической нормы) содержания химических элементов в диагностических биосубстратах.

Проблемы с определением границ физиологической нормы, биологически допустимого уровня и критического уровня содержания элементов в биосубстратах привели к тому, что при относительно низком уровне лабораторной службы в нашей стране, с одной стороны, и повышенным интересом ученых и врачей-практиков к проблеме роли макро – и микроэлементов в диагностике и лечении заболеваний, - с другой стороны, приводит к накоплению несопоставимых друг с другом аналитических данных, к появлению так называемых “региональных нормативов”

по отдельным элементам, отличающихся от общепринятых литературных данных на порядки.

1.6 Биомаркеры элементного статуса

Биомаркерами пищевого статуса являются биохимические и физиологические параметры, по которым судят не только об обеспеченности питательными веществами, но и об уровне их потребления с пищей.

Доклинические формы недостаточной обеспеченности химическими элементами – микронутриентами могут быть установлены путем анализа содержания их в тканях и органах, истощение запасов в которых наступает достаточно быстро при условии недостаточности поступления извне.

Биомаркеры пищевого статуса могут отражать как текущую обеспеченность микронутриентами, так и в отдаленном прошлом. Цельная кровь и ее составные части наиболее часто используются для оценки пищевого статуса человека и отражают обеспеченность химическими элементами за короткий период времени. Из-за особенностей метаболизма химических элементов и гомеостатической регуляции уровни их содержания в крови могут не изменяться даже при обеднении депо в органах и тканях [28].

Исследование экскреции с мочой пищевых веществ также дает представление об их текущем потреблении. Исследование суточной мочи основано на физиологическом механизме: снижение экскреции с мочой отражает недостаточность поступления и истощение запасов, а усиление экскреции свойственно избыточному поступлению питательных веществ. На процесс выведения влияет функциональная способность самих почек, состояние организма (физическая активность, стресс, инфекции и т.д.) [22].

Биохимическим маркером, который не реагирует на кратковременные изменения в питании и способен отражать картину обеспеченности химическими элементами организма на протяжении нескольких месяцев, является спектральный анализ волос. Оценка результатов содержания элементов в волосах является

ретроспективной, отражающей длительный период и не зависит от гомеостатического контроля. Точность оценки определяется скоростью роста волос, влиянием факторов окружающей среды, пробоподготовкой и качеством анализа.

Таким образом, интегральная оценка обеспеченности организма химическими элементами – микронутриентами и уровня накопления токсикантов может быть получена путем одновременного определения элементного состава как минимум двух биосубстратов, отражающих ретроспективную и текущую картину питания (например, волосы и сыворотка крови), оценки фактического питания в сопоставлении с антропометрией и клиническими методами исследования.

2 Показатели обеспеченности организма человека эссенциальными химическими элементами

2.1 Кальций

Для раннего выявления нарушений гомеостаза кальция используется определение его в сыворотке крови. Во внеклеточной жидкости находится лишь около 1 % кальция, содержащегося в организме. В сыворотке крови 45 % кальция связано с белками, 5 % находится в форме цитратов, фосфатов, бикарбонатов и 50 % существует в ионизированном состоянии [17]. Эта форма составляет физиологически активную часть в обмене кальция и часто является лучшим индикатором в клинических исследованиях. В случае отсутствия отклонений в содержании общего белка или диспротеинемии соотношение общего и ионизированного кальция не нарушено.

Помимо сыворотки крови для оценки статуса кальция в организме человека используют его определение в волосах, а так же устанавливают почечную экскрецию кальция с мочой. Сниженное содержание ионизированного кальция в сыворотке крови указывает на отрицательный баланс кальция, однако при отрицательном балансе возможно и нормальное содержание кальция в сыворотке крови. Нормальные значения содержания ионизированного кальция, как и другие

лабораторные показатели, которые будут приведены ниже, представлены в соответствующей таблице. Общее содержание кальция в сыворотке крови по мнению многих авторов [16] является плохим индикатором статуса кальция, так как уровень сыворотного кальция находится под строгим физиологическим контролем.

Наиболее распространенная причина снижения общего кальция в сыворотке крови является гипоальбуминемия [21]. Важно отметить, что зачастую гипо – и гиперкальциемия могут быть первичными проявлениями патологического процесса.

Выведение кальция с мочой в количествах менее 150 мг в день может указывать на пищевой дефицит этого макроэлемента.

Одним из информативных лабораторных тестов, отражающих обеспеченность организма кальцием, многие авторы [24, 25] считают определение кальция в волосах.

Таблица 5 - Оценка обеспеченности организма взрослого (здесь и далее) человека кальцием (показатели “нормального” содержания)

Источник	Zimmermann, 2003	Ruekgauer, Kruse-Jarres, 2002	Скальный, 2003	Burgerstein et al., 2002
1	2	3	4	5
Общий кальций сыворотки	85-105 мг/л (2,2-2,6ммоль/л)	2,20-2,65 ммоль/л	-	85-105 мг/л
Ионизированный кальций сыворотки	1,17-1,29 ммоль/л	1,12-1,32 ммоль/л	-	1,17-1,29 ммоль/л
Кальций в моче	200-300 мг/сут.- муж. 150-250 мг/сут.- жен.	<6,2 ммоль/сут.- жен. <7,5 ммоль/сут.- муж.	-	<150 мг/сут.- дефицит
Кальций в волосах	400-2000 мкг/г	-	494-1619 мкг/г	400-2000 мкг/г

Многочисленные эпидемиологические исследования указывают на связь концентрации кальция в волосах с его алиментарным поступлением в организм, а также с питьевой водой (положительная корреляция с жесткостью питьевой воды) [18]. Важно подчеркнуть, что повышенное содержание кальция в волосах зачастую

свидетельствует не о его избытке в организме, а отражает усиленный кругооборот этого макроэлемента [12, 13].

2.2 Магний

Такой показатель, как концентрация магния в сыворотке крови, по мнению многих специалистов, имеет ограниченное клиническое значение, так как 95 % этого макроэлемента в организме человека локализовано внутриклеточно [38, 37]. Внеклеточная концентрация магния коррелирует с общим статусом магния только в редких случаях, при наличии дефицита этого микроэлемента. Около 25 % сывороточного магния связано с альбумином, поэтому сниженный уровень альбумина ведет к снижению показателя уровня содержания магния даже в тех случаях, когда истинный дефицит этого элемента отсутствует. Чтобы исключить псевдогипомагниемиию, как указывают Ruekgauer и Kruse-Jarres (2002), необходимо определять уровень магния с учетом концентрации альбумина. При оценки результатов содержания магния в сыворотке всегда нужно помнить о “ложной” гипомагниемии при стрессе, остром респираторном заболевании, гиповолемии.

По мнению многих авторов, эритроциты, лейкоциты и мышечные клетки следует использовать для оценки статуса магния. Однако этот путь ведет к большим материальным затратам. По мнению Braetter (2002), Kruse-Jarres (2002) и других известных специалистов в области лабораторной диагностики лучшим индикатором для определения дефицита магния является тест на ретенцию магния (при условии нормальной функции почек). Для этого исследования используют внутривенное введение магния с последующим сбором суточной мочи. Исследование содержание магния в моче не имеет большого значения, так как до 60 % магния выводится с калом (таблица 6).

Таблица 6 - Оценка обеспеченности организма человека магнием (показатели “нормального” содержания)

Источник	Burgerstein et al., 2002	Zimmermann, 2003	Скальный, 2003	Ruekgauer, Kruse-Jarres, 2002
Магний в сыворотке крови	0,65-0,88 ммоль/л	0,75-1,05 ммоль/л	-	0,73-1,06 ммоль/л – муж. 0,77-1,03 ммоль/л – жен.
Ионизированной магний в сыворотке крови	0,5-0,66 ммоль/л	0,5-0,66 ммоль/л	-	0,46-0,6 ммоль/л
Магний в лейкоцитах		3,0±0,09 фмоль/клетку	-	-
Магний в моче	> 25 мг/сут.	<1 ммоль/сут.- дефицит	-	3-53 ммоль/сут.
Магний в волосах	25-100 мкг/г	-	39-137 мкг/г	-

Согласно многим авторам, определение магния в волосах адекватно отражает его обмен в организме человека и является показателем обеспеченности этим макроэлементом [37, 38, 39].

2.3 Железо

Существует выраженная обратная зависимость между обеспеченностью организма человека железом и его всасыванием в пищеварительном тракте, которое зависит от возраста, питания, состояния желудочно-кишечного тракта, количества и химических форм поступления железа, а так же прочих нутриентов. Концентрация железа зависит от резорбции в желудочно-кишечном тракте, накопления в кишечнике, селезенке и костном мозге, от синтеза и распада гемоглобина и его потерь организмом. В настоящее время общепринято, что диагноз железодефицитных состояний надо ставить до развития полной картины заболевания, то есть до развития гипохромной анемии – поздней стадии болезни.

К современным методом ранней диагностики гипосидероза относятся определение железа в сыворотке, общая железосвязывающая способность сыворотки, трансферрина и ферритина в сыворотке. Гиперсидероз может возникать вследствие экзогенных причин (металлурги, электросварщики, шахтеры), эндогенный гиперсидероз чаще всего имеет гемоглобиновое происхождение и возникает в результате повышенного разрушения этого пигмента [2].

Определение железа в сыворотке крови дает представление об уровне транспортирования железа плазмой крови, связанного с трансферрином. Из-за больших разбросов концентрации железа в сыворотке его повышение при некротических процессах и снижение при воспалительных ограничивает диагностическую значимость этого показателя. Он не указывает на причины нарушенного обмена железа, поэтому необходимо определять содержание ферритина и трансферрина [4]. Концентрация железа в сыворотке очень зависит от циркадианных ритмов и многочисленных индивидуальных факторов [41]. Статус железа снижен, если синтез трансферрина усилен и наоборот. Ферритин, напротив, прямо коррелирует с дефицитом железа.

Одним из методов определения статуса железа является его определение в костном мозге [36].

По нашим данным имеется прямая корреляционная связь между концентрацией железа в волосах, сыворотки крови и, в еще большей степени, концентрацией сывороточного ферритина. Это указывает на возможное использование определения железа в волосах для оценки статуса этого элемента в организме человека.

Таблица 7 - Оценка обеспеченности организма человека железом (показатели “нормального” содержания)

Источник	Iyengar, Woittiez, 1987	Ruekgauer, Kruse-Jarres, 2002	Burgerstei net al., 2002	Скальный, 2003	Bertram, 1992
Железо в цельной крови	425-500 мг/л	-	-	-	-
Железо в сыворотке крови	800-1200 мкг/л	4,1-29,5 мкмоль/л-жен. 6,3-30,1 мкмоль/л-муж.	400-1500 мкг/л	-	0,80-1,40 мг/л
Ферритин сыворотки крови	-	34-310 мкг/л-муж. 22-112 мкг/л – жен.	150-2000 мкг/л – муж. 120-1500 мкг/л-жен.	-	-
Насыщенность железа трансферрином	-	16-45%	<16%	-	-
Железо в моче	100-200 мкг/сут.	-	-	-	10-25 мкг/л
Железо в печени	150-250 мкг/г	-	-	-	50-250 мкг/г
Железо в волосах	30-60 мкг/г	-	-	11-24 мкг/г	5-25 мкг/г

2.4 Цинк

Диагноз Zn-дефицитного состояния выставляют в том случае, если содержание цинка в сыворотке крови менее 13 мкмоль/л. Еще более низкая концентрация этого элемента в сыворотке ($8,2 \pm 0,9$) мкмоль/л является неблагоприятным прогностическим признаком [15].

По мнению Ruekgauer (2002), концентрация цинка в сыворотке гомеостатически регулируется и мало реагирует на величину его поступления в организм. Обмен между богатыми цинком тканями, а так же концентрация цинка в

плазме зависит от пола, возраста, суточных ритмов, алиментарных факторов (обеспеченность белком), гормонального статуса, стресса, а так же регуляторных механизмов резорбции и экскреции.

Реакция острой фазы воспаления, физическое перенапряжение, стресс, инфекция, хронические заболевания, прием пероральных контрацептивов и беременность ведут к накоплению цинка тканями и таким образом приводят к снижению в сыворотке. Сывороточный уровень цинка снижается при гипоальбуминемии и повышается при приеме кортикостероидов, цитокинов и избыточном поступлении с пищей. При неправильном питании и катаболических состояниях сывороточная концентрация этого микроэлемента за счет его поступления из мышечной ткани может оставаться стабильной, тогда как при ускоренном синтезе – снижаться. Из-за того, что мышцы и кости могут высвобождать этот элемент, дефицит цинка длительное время не отражается на его концентрации в сыворотке крови. Все это ограничивает информативность определения цинка в сыворотке крови при оценке статуса этого микроэлемента.

Концентрация цинка в эритроцитах длительное время остается стабильной даже в условиях дефицита. Изменения концентрации цинка в эритроцитах могут быть вызваны метаболическими расстройствами. В нейтрофилах обнаружена максимальная концентрация цинка из всех клеток крови. Выявлена положительная связь между концентрацией цинка в лимфоцитах и его содержанием в печени. У пожилых лиц уменьшается содержания цинка в полиморфноядерных лейкоцитах. Использование лейкоцитов в качестве диагностического биосубстрата для оценки статуса цинка пока проблематично из-за того, что популяция и продолжительность жизни лейкоцитов очень гетерогенны [23].

Таким образом, в диагностике статуса цинка пока не существует оптимального метода, при этом следует признать, что содержание цинка в лейкоцитах является достаточно валидным и может отражать состояние умеренного дефицита цинка [26].

Также существует так называемый цинк-толерантный тест. Его проводят следующим образом: до после дачи per os 50 мг цинка через 120 мин определяют

концентрацию цинка в плазме. Двух-трех кратное увеличение концентрации цинка в плазме указывает на его дефицит (таблица 8).

Таблица 8 - Оценка обеспеченности организма человека цинком (показатели “нормального” содержания)

Показатель	Iyengar, Woittiez, 1987	Скальный, 2003	Burgerstein et al., 2002	Bertram, 1992	Ruekgauer, Kruse-Jarres, 2002
Цинк в цельной крови	6-7 мг/л	-	-	-	(86,7+18,4 мкмоль/л)-жен. 97,5+23,0 мкмоль/л – муж.
Цинк в сыворотке	0,8-1,1 мг/л	-	-	0,7-1,1 мг/л	0,7-1,3 мг/л (11-20 мкмоль/л)
Цинк в плазме		-	0,6-2,4 мг/л	-	-
Цинк в моче	0,4-0,6 мг/сут.	-	-	100-600 мкг/л	2,3-12,3 мкмоль/сут.
Цинк в слюне		-	-	0,1-0,8 мг/л	-
Цинк в печени	40-60 мкг/г	-	-	30-100 мкг/г	-
Цинк в волосах	150-250 мкг/г	155-206 мкг/г	170—245 мкг/г	100-250 мкг/г	-

Считается, что концентрация цинка в моче выше 0,5 мг/л свидетельствует о риске его дефицита из-за усиленной экскреции или интоксикации этим элементом. В оценке статуса цинка в организме все шире применяют определение его концентрации в волосах.

2.5 Медь

Медь в сыворотке крови связана с церулоплазмином (95 %) и альбумином (5 %) [15]. Следует помнить, что концентрация меди в сыворотке крови регулируется гомеостатически и связана с циркадианными ритмами с утренним максимумом. Также в качестве биоиндикатора для определения статуса меди могут

использоваться клетки крови, а между содержанием меди в них и в сыворотке имеется взаимосвязь.

Информативными маркерами статуса меди является активность супероксиддисмутазы в эритроцитах и цитохром-С оксидазы в тромбоцитах.

Токсическое действие меди осуществляется в основном за счет свободных ионов этого микроэлемента в плазме. Вместе с тем, следует отметить, что установление статуса меди является сложной задачей. Поэтому при подозрении на нарушение обмена меди следует определять ее концентрацию в сыворотке крови, моче или в тканях, а так же в волосах.

Алиментарный дефицит меди может приводить к сидеробластической микроцитарной анемии с нейтропенией. По мнению Р. Burgerstein с соавт. (2002), сывороточная концентрация меди и содержание церулоплазмينا могут отражать дефицит меди, однако надо помнить, что церулоплазмин относится к белкам острой фазы воспаления. Поэтому, оба этих показателя могут повышаться при различных состояниях организма и варьировать независимо от наличия меди в депо.

Эти же авторы считают, что концентрация меди в волосах хорошо коррелирует с содержанием ее в тканях, однако вследствие вероятности экзогенного загрязнения волос медью, иногда, даже при тяжелом дефиците меди, ее концентрация в волосах может оставаться в пределах нормальных значений.

Таблица 9 - Оценка обеспеченности организма человека медью (показатели “нормального” содержания)

Источник	Iyengar, Woittiez, 1987	Скальный, 2003	Burgerstein et al., 2002	Bertram, 1992	Ruekgauer, Kruse-Jarres, 2002
1	2	3	4	5	6
Медь в цельной крови	0,8-1,1 мг/л-муж. 1,0-1,4 мг/л-жен.	-	-	-	13,4+2,0 мкмоль/л –жен. (18,8+4,3 мкмоль/л- при приеме контрацептивов)

Продолжение таблицы 9

1	2	3	4	5	6
Медь в сыворотке крови	0,8-1,1 мг/л- муж. 1,1-1,4 мг/л- жен.	-	100-246 мкг/л	0,75-1,3 мг/л	12-21 мкмоль/л
Медь в слюне		-		5-60 мкг/л	
Супероксиддисмутаза в эритроцитах		-	0,47+0,067 мг/г		2580-4840 Ед/г гемоглобина
Медь в печени	5-7 мкг/г	-		2,5-10 мкг/г	-
Церулоплазмин плазмы		-	1800-4000 мг/л	-	150-600 мг/л
Медь в волосах	15-25 мкг/г	9-14 мкг/г	11-22 мкг/г	7,5-80 мкг/г	-
Медь в моче	30-60 мкг/сут.	-	-	2-25 мкг/л	<0,94 мкмоль/сут.

2.6 Марганец

Дефицит марганца в организме приводит к гиперхолестеринемии, снижению синтеза половых гормонов, бесплодию, задержке развития, иммунодефициту, снижению выработки антител, нервно-психическим расстройствам, а так же снижению выработки пигмента кожи. Дефицит этого микроэлемента сопровождается сахарный диабет II типа [19, 15]. Избыток марганца в организме в крайнем своем проявлении выражается в синдроме Паркинсона и встречается, как правило, при длительном профессиональном контакте с этим микроэлементом. По данным П.Н. Любченко с соавт. (1989) уровень марганца выше 30 мкг/г волос указывает на риск профессионального манганоза. Обобщенные данные о лабораторных показателях, используемые для оценки статуса марганца, представлены в таблице 10.

Таблица 10 - Оценка обеспеченности организма человека марганцем (показатели “нормального” содержания)

Источник/ Показатель	Iyengar, Woittiez, 1987	Скальный, 2003	Bertram, 1992	Zimmermann , 2003	Ruekgauer, Kruse-Jarres, 2002
Марганец в цельной крови	8-12 мкг/л	-	-	72-255 нмоль/л	<191 нмоль/л
Марганец в сыворотке	0,5-1,0 мкг/л	-	0,3-1,0 мкг/л	0,02-0,04 мкг/л	<15 нмоль/л
Марганец в моче	0,5-2,0 мкг/сут.	-	0,1-1,5 мкг/л	-	1,8-27 нмоль/л
Марганец в слюне	-	-	0,5-30 мкг/л	-	-
Марганец в печени	1-2 мкг/г	-	0,5-2,0 мкг/г	-	-
Марганец в волосах	0,5-1,5 мкг/г	0,32-1,13 мкг/г	0,1-1,0 мкг/г	0,1-2,0 мкг/г	-

2.7 Селен

У здоровых взрослых концентрация селена в цельной крови, плазме и эритроцитах коррелирует между собой с высокой достоверностью [29, 15]. Лучшим индикатором содержания селена является его концентрация в цельной крови, которая коррелирует с содержанием этого микроэлемента в печени. Концентрация селена в сыворотке и активность глутатионпероксидазы в плазме является чувствительным параметром при низкой алиментарной обеспеченности.

Статус селена в значительной степени отражает региональные различия. Он связан с поступлением селена из пищи [27]. Для оценки селенового статуса в Германии измеряли содержание селена в цельной крови и сыворотке. Концентрация селена у детей повышалась, достигая плато во взрослом возрасте и снижаясь после 60 лет.

Наиболее высокие концентрации селена обнаружены в лейкоцитах ($0,00125 \pm 0,00033$) мкмоль/к* 10^9 кл), тогда как в эритроцитах его концентрация

равнялась $0,00017 \pm 0,00003$, а в тромбоцитах – $(0,000061 \pm 0,000011)$ мкмоль/л* 10^9 кл. С возрастом концентрация селена в эритроцитах падает.

Активность глутатионпероксидазы в плазме и эритроцитах также изменяется от возраста и пола и зависит от регионального содержания селена в почве [34].

По мнению многих авторов [6] концентрация селена в волосах является адекватным показателем его содержания в организме. Однако, необходимо помнить, что использование некоторых селен-содержащих шампуней может влиять на концентрацию этого элемента в волосах. Также [6] считает, что концентрация селена в цельной крови меняется только при экстремальном дефиците или при отравлении этим элементом.

Таблица 11 - Оценка обеспеченности организма человека селеном (показатели “нормального” содержания)

Источник	Iyengar, Woittiez, 1987	Скальный, 2003	Burgerstein et al., 2002	Bertram, 1992	Ruekgaue r, Kruse-Jarres, 2002
1	2	3	4	5	6
Селен в плазме	-	-	80-150 мкг/л	-	-
Селен в цельной крови	90-130 мкг/л	-	80-130 мкг/л- Европа 100-250 мкг/л- Америка	-	0,9-1,7 мкмоль/л
Селен в слюне	-	-	-	2-5 мкг/л	-
Глутатионпероксида за в цельной крови	-	-	<30 Ед/г Нв – дефицит	-	19,8+4,2 Ед/г Нв
Глутатионпероксида за в плазме	-	-	-	-	96-150 Ед/л
Селен в моче	25-50 мкг/сут.	-	-	15-45 мкг/л	-
Селен в печени	0,25-0,4 мкг/г	-	-	0,2-0,5 мкг/г	-

1	2	3	4	5	6
Селен в волосах	0,5-1,0 мкг/г	0,69-2,20 мкг/г	0,6-1,2 мкг/г 0,11-6,0 мкг/г	0,5-1,5 мкг/г	-
Селен в сыворотке	75-120 мкг/л	-	-	60-120 мкг/л	0,7-1,3 мкмоль/л
Примечание - Hb – гемоглобин					

2.8 Хром

Содержание хрома в тканях организма не всегда сочетается с его содержанием в крови, а определение концентрации хрома в сыворотке не может служить надежным биоиндикатором статуса этого микроэлемента в организме [29]. Большую трудность для определения содержания хрома в крови и моче представляет, с одной стороны, возможность контаминации проб медицинским инструментарием во время забора проб, а с другой стороны, низкая чувствительность лабораторных методов исследования в обнаружении микроколичеств этого ультрамикроэлемента. Напротив, повышенный уровень хрома в сыворотке и моче при условии известного источника поступления избыточного количества хрома в организм, его интенсивности воздействия указывает на возможность использования данных биосубстратов в качестве биоиндикаторов в скрининговых эпидемиологических исследованиях (таблица 12).

Таблица 12 - Оценка обеспеченности организма человека хромом (показатели “нормального” содержания)

Источник	Iyengar, Woittiez, 1987	Ruekgauer, Kruse-Jarres, 2002	Bertram, 1992	Zimmermann, 2003	Burgerstein et al., 2002
Хром в цельной крови	<5 мкг/л	72,3+20,7 нмоль/л-жен. 74,2+24,9 нмоль/л-муж.	-	-	-
Хром в сыворотке	0,1-0,2 мкг/л	11,1+3,7 нмоль/л-жен. 11,0+4,4 нмоль/л-муж.	0,1-0,5 мкг/л	<2 нмоль/л – при дефиците	<0,14 мг/л-дефицит
Хром в плазме	-	0,26-0,3 нг/мл	-	-	-
Хром в эритроцитах	-	0,0088+ 0,0047 нмоль/л*10 ⁹ кл	-	-	-
Хром в моче	0,2-2,0 мкг/сут.	-	0,1-1,5 мкг/л	3-4 нмоль/л	0,2 мкг/сут.
Хром в печени	0,005-0,05 мкг/г	-	0,01-0,05 мкг/г	-	-
Хром в волосах	0,3-1,2 мкг/г	-	0,1-2,0 мкг/г	0,05-0,8 мкг/г	0,03-0,3 мкг/г

Определение содержания хрома в эритроцитах отражает статус хрома (VI) в организме, так как лишь эта форма хрома пенетрирует мембрану эритроцита в условиях интоксикации соединениями хрома (VI) [7].

Определение хрома в моче имеет ограниченное значение при оценке статуса хрома. Однако, интоксикация хромом сопровождается обнаружением сильной корреляционной зависимости между уровнем экспозиции организма соединениями хрома и его содержанием в крови, моче, волосах и эритроцитах.

По мнению М. Zimmermann (2003), определение хрома в волосах хорошо отражает статус этого микроэлемента в организме. Однако, воздействие экзогенных источников, а также использование различных химических реагентов в период пробоподготовки образцов волос и зависимость от длины отобранной пробы, приводит к вариабельности концентрации хрома в этом биосубстрате.

Таким образом, из представленных выше современных научных сведений следует, что ни один из широкоиспользуемых в диагностических целях биосубстратов не является идеальным при оценке элементного статуса организма. Для достоверной оценки состояния обмена макро – микроэлементов в организме и обеспеченности ими желательно проведение параллельных исследований нескольких биосубстратов и биохимических индикаторов элементного статуса, таких как активность металлоферментов и другие в соответствие с поставленными диагностическими целями.

Особую трудность представляет выбор адекватного биосубстрата для проведения многоэлементного анализа по определению “элементного портрета” [4] индивидуума, контингента или популяции. Это связано с тем, что до настоящего времени абсолютное большинство исследований элементного статуса в научных и практических целях у нас в стране и за рубежом проводились путем определения одного, реже нескольких химических элементов в одном биосубстрате, как правило, без сопоставления данных, полученных одновременно в нескольких биосредах.

3 Физико-химические методы анализа

Физико-химические методы анализа (ФХМА) используют для обнаружения, количественного определения и изучения свойств химических элементов и веществ. Они основаны на измерении физико-химических характеристик объектов исследования с помощью специальных приборов. В качестве таких характеристических свойств выступают, например, способность атомов элементов к испусканию характеристического излучения, способность атомов или молекул веществ взаимодействовать с электромагнитным излучением, с движущимися заряженными частицами, способность веществ проявлять различного рода электрохимическую активность на поверхности электрода, по-разному распределяться между подвижной и неподвижной фазами и, таким образом, разделяться за определенное время. Перечисленные свойства составляют основу

важнейших современных ФХМА: спектрометрических, электрохимических и хроматографических соответственно.

Результат измерения характеристических свойств в ФХМА – сигнал – несет в себе качественную и количественную информацию об определяемом веществе, об его элементном, изотопном, молекулярном и фазовом составе. Отклик прибора, измеряемый аналитиком, называют сигналом. Аналитический сигнал может измеряться непосредственно при прямом изучении объекта, что однако возможно очень редко, или – стандартная ситуация – после проведения пробоподготовки, связанной например с переводением пробы в гомогенный раствор, и, если нужно, соответствующей аналитической реакции. Достоинства ФХМА состоят в низких пределах обнаружения, высокой чувствительности, в избирательности (селективности), в скорости определения, возможности автоматизации, осуществления дистанционного анализа, неразрушающего анализа и т.д.

Градуировочная зависимость. Для извлечения количественной информации в ФХМА необходимо получить градуировочную зависимость, отражающую функциональную зависимость интенсивности сигнала от концентрации определяемого компонента при поддерживаемых постоянными оптимальными условиями выполнения определения избранным методом. Сначала приготавливают или используют специально приготовленные и аттестованные стандартные образцы состава, содержащие определяемые элементы в разных количествах, отвечающих ожидаемым в пробе. Далее измеряют сигналы всех этих образцов S . Из результатов измерений находят градуировочную зависимость в виде уравнения прямой линии (представлено в соответствии с рекомендациями ИЮПАК):

$$y = F(x) + e_y$$
$$F(x) = B + S = B + Ax$$
$$y = B + Ax + e_y,$$

где y – измеренный сигнал, рассматриваемый в качестве зависимой переменной;

$F(x)$ – градуировочная зависимость, выраженная в математической форме

как уравнение прямой линии;

x – концентрация каждого определяемого компонента, рассматриваемая в качестве независимой переменной;

A, B – параметры уравнения прямой линии, представляющие соответственно коэффициент чувствительности и сигнал нулевой линии;

e_y – погрешность измерения сигнала.

Погрешность e_y оценивается как случайная величина для среднего арифметического, равного нулю, при отсутствии смещения и характеризуется стандартным отклонением s . Параметры уравнения прямой оцениваются с помощью стандартных способов математической статистики (см. также разд. «Представление результатов количественного определения и рекомендации ИЮПАК»).

Коэффициент чувствительности A , строго говоря, первая производная функция от сигнала y по концентрации x : $A = \partial y / \partial x$. Этот тезис оказывается полезным,

если зависимость сигнала от концентрации будет нелинейной.

Предел обнаружения и предел определения. Естественно, на ФХМА в полной мере распространяются рассмотренные ранее общие положения количественного анализа, касающиеся предела обнаружения, измерения аналитического сигнала, качества результатов химического анализа. Можно сделать одно дополнение. Из уравнения, связывающего сигнал с концентрацией видно, проблема возникнет тогда, когда концентрация будет очень маленькой и придется решать с использованием методов математической статистики. Предел обнаружения – величина вероятностная. Возникает разумный вопрос о погрешности, с которой эта величина может быть установлена. Напомним, что пределу обнаружения

$$c(A)_{\text{мин}} = \frac{\bar{y}_0 + 3\sigma_0}{A},$$

где σ_0 – погрешность измерения сигнала фона, отвечает наименьший измеряемый сигнал, равный $\bar{y}_0 + 3\sigma_0$. Допустим для простоты, что средний сигнал

фона статистически незначимо отличается от нуля, т.е., что $\bar{y}_0 \approx 0$. Этой ситуации отвечает соответственный сигнал нулевой линии $B = 0$. Тогда относительная погрешность s_r , с которой этот сигнал, а следовательно и $c(A)_{\text{мин}}$, могут быть установлены, составит:

$$s_r \approx \frac{\sigma_0}{3\sigma_0} \cdot 100\% = 33\% \text{ отн.}$$

Подчеркнем, что это теоретическая погрешность только измерения наименьшего сигнала и эквивалентной ему концентрации, – без погрешности отбора пробы и выполнения процедур пробоподготовки. Так что, реально погрешность будет даже побольше. Конечно, такая погрешность не мала. Когда можно пойти на это? В том случае, когда лучше иметь возможность выполнить определение с погрешностью в десятки процентов, чем не выполнять это определение вовсе. Для того, чтобы отойти от таких больших погрешностей в ФХМА используют понятие о пределе определения, когда погрешности измерения сигнала составляют единицы процента (в зависимости от метода иногда и доли его). Это пожелание можно записать в виде формулы, подобной полученной при определении предела обнаружения, отличающейся тем, что за предел определения можно принять сигнал, превышающий погрешность измерения фона на порядок. Поэтому *предел определения*:

$$c(A)_{\text{Пропред}} \approx \frac{\bar{y}_0 + 10 \cdot \sigma_0}{A}.$$

Таким образом, концентрация, отвечающая пределу определения – это область, с которой начинается стандартный количественный химический анализ, выдающий результаты с погрешностями, отвечающими как паспортным данным прибора, так и соответствующим нормативам качества на методики анализа. Отметим, что в ФХМА нередко предел обнаружения указывают не в единицах концентрации, а в процентах, по умолчанию предполагая, что указываемая цифра относится к навеске образца массой 1 г.

4 Спектрометрические методы анализа

Спектрометрические методы анализа основаны на регистрации испускания или поглощения квантов электромагнитного излучения атомами или молекулами исследуемого вещества. Энергия испускаемого или поглощаемого излучения, о которой можно судить по длине волны или частоте излучения, дает информацию о природе вещества, а интенсивность сигнала – о его количественном содержании. В этих методах используют различные области спектра электромагнитного излучения, очень сильно различающиеся по энергии квантов: от 10^8 до 10^{-6} эВ, отвечающее диапазону частот от 10^{20} до 10^6 Гц. Это: γ -излучение, рентгеновское излучение, вакуумная ультрафиолетовая (УФ), видимая, инфракрасная (ИК) и микроволновая области, вплоть до радиоволновой. Столь широкому диапазону энергий, отвечают неодинаковые механизмы взаимодействия излучения с веществом, – возникновение сигналов имеет разную природу. Так, энергия γ -квантов столь велика, что здесь возможно осуществление ядерных превращений, энергия квантов рентгеновской области отвечает электронным переходам во внутренних электронных оболочках атомов, испускание и поглощение квантов в УФ и видимой областях связано с переходами внешних валентных электронов, в то время как поглощение ИК и микроволновых квантов обязано переходам между колебательными и вращательными уровнями молекул. Энергия квантов радиоволнового диапазона настолько мала, что оказывается связанной только с переходами с изменением ориентации спинов электронов и ядер атомов.

В каждом конкретном методе атомной спектрометрии осуществляются только разрешенные правилами квантовой механики электронные переходы между определенными уровнями, что зависит от строения электронной оболочки атома и от величины энергии возбуждения. Поэтому каждый вид атомов характеризуется своим собственным набором энергетических уровней, а следовательно и разрешенных переходов и уникальным набором спектральных линий, что и

позволяет идентифицировать эти атомы по их спектрам – атомно-эмиссионным, атомно-абсорбционным. Поэтому в каждом из соответствующих приборов, которые обычно называют спектрометрами, устанавливают различные источники и приемники (детекторы) рабочего излучения, устройства для выделения узкой области рабочего излучения, называемые монохроматорами. Отсюда следует разнообразие принципиальных и практических схем приборов и устройств.

Теоретически и методологически обоснованным принципом классификации спектрометрических методов является их деление на методы атомной и молекулярной спектрометрии, когда ответственным за возникновение сигналов является испускание или поглощение квантов энергии соответствующего диапазона атомами или молекулами исследуемого вещества. Примерная классификация, иллюстрированная важнейшими методами, представлена на рисунке 5.

В причисленной к спектрометрическим группе радиометрических (ядерных) методов анализа, связанных с использованием радиоактивности, аналитические сигналы возникают за счет превращения атомов исследуемых элементов в радионуклиды, которые далее определяют по их радиоактивности. Регистрирующий прибор часто называют спектрометром.

С практической точки зрения наиболее удобна работа в УФ, видимой и ближней ИК областях спектра, когда возникновение сигналов связано исключительно с электронными переходами внешних валентных электронов. Этот раздел спектрометрии выделяют в оптические методы. Иногда, желая подчеркнуть работу в видимой области, используют также и термин спектроскопия.



Рисунок 5 - Классификация спектрометрических методов

5 Атомная спектрометрия

Обобщенная схема возникновения аналитических сигналов в методах атомной спектрометрии, обусловленного осуществлением соответствующих строго определенных энергетических переходов, приведен на рисунок 6. Сначала воздействием высоких температур вещество превращают в атомный пар, т.е. превращают в свободные атомы соответствующих химических элементов. Этот процесс называют атомизацией.

Далее, при столкновении с частицами плазмы (атомы, ионы, радикалы, электроны находящиеся во всех энергетических состояниях) атомы переходят в возбужденное состояние и один из электронов, находящийся на основном уровне, переходит в возбужденное состояние – на другой уровень, которому соответствует большая энергия.

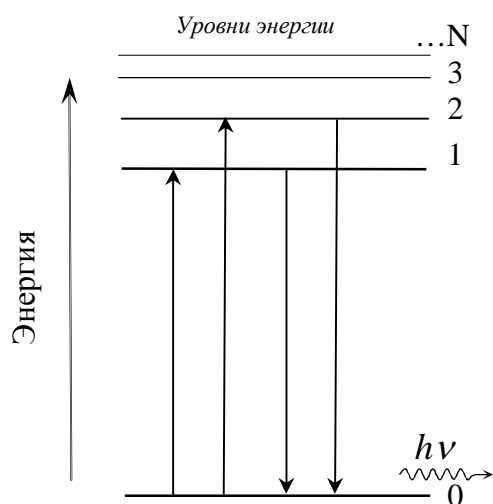


Рисунок 6 - Электронные переходы между основным (0) и возбужденными (1,2) уровнями и происхождение атомных спектров

Это состояние неустойчиво, поэтому через очень малое время ($\sim 10^{-9}$ с) атом возвращается в исходное состояние: электрон вновь переходит на основной уровень и испускается квант энергии, отвечающий разности энергий на двух уровнях. Это можно записать в виде формулы Планка:

$$\Delta E_{1 \rightarrow 0} = E_1 - E_0 = h\nu_{1 \rightarrow 0} = h c / \lambda_{1 \rightarrow 0} \quad \text{1-ая линия}$$

$$\Delta E_{2 \rightarrow 0} = E_2 - E_0 = h\nu_{2 \rightarrow 0} = h c / \lambda_{2 \rightarrow 0} \quad \text{2-ая линия и т.д.,}$$

где h – постоянная Планка,

ν и λ - частота и длина волны спектральной линии, отвечающей данному электронному переходу в соответствующей спектральной области.

Отметим, что линии, для которых переход заканчивается на основном уровне, обычно наиболее интенсивные и чувствительные. Их часто называют *резонансными*. Так возбуждают эмиссионные спектры атомов в атомно-эмиссионном методе и в фотометрии пламени.

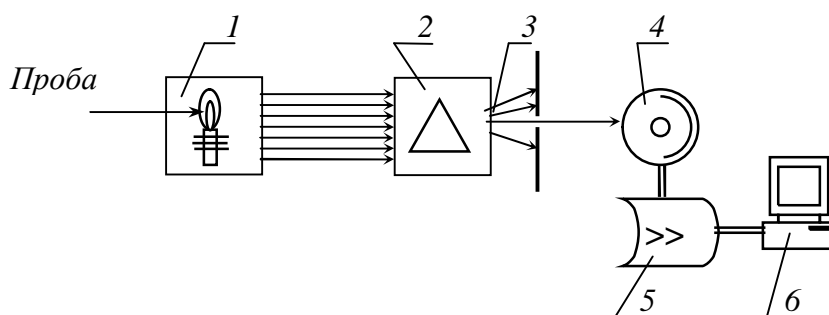
В атомно-абсорбционном анализе вещество также подвергают атомизации, но таким образом, что возбуждения атомов не происходит, такое состояние часто называют "атомным паром". Поэтому эти атомы способны поглощать кванты проходящего через него резонансного излучения, в результате чего интенсивность его уменьшается. Ее и измеряют. Поглощая свой "родной" квант атом переходит в

возбужденное состояние и далее в основное, однако здесь соответствующая энергия деградирует в колебательную форму, - в тепло. Атомно-эмиссионный и атомно-абсорбционный методы характеризуются низкими пределами обнаружения (10^{-3} - 10^{-5} %), особенно при использовании индуктивно-связанной плазмы и электротермической атомизации (10^{-5} - 10^{-7} %) соответственно.

Индивидуальность линейчатых атомных спектров всецело определяется строением внешней электронной оболочки атомов и ее заполнением электронами. В теории принято характеризовать энергию электрона на каждом уровне с помощью аппарата квантовых чисел и соответствующей символики. Это позволяет описывать электронные переходы, приводящие к возникновению спектров, и находить их энергию с помощью *спектральными термов*. В методах атомной спектроскопии могут осуществляться только электронные переходы с изменением орбитального квантового числа. Соответствующий переход иногда сопровождают термином "оптический электрон".

5.1 Атомно-эмиссионный анализ

Атомно-эмиссионный анализ позволяет определять до 70 элементов, в основном металлы. Для этого анализируемую пробу вводят в источник возбуждения (плазма электрического дугового разряда, высоковольтная искра, газовое пламя, индуктивно связанная плазма), где она испаряется и переходит в атомарное состояние. Атомы возбуждаются и, возвращаясь в основное состояние, испускают кванты. Суммарное излучение разлагается в линейчатый спектр. Регистрируют наличие, положение и интенсивность спектральных линий, отвечающих разрешенным правилами квантовой механики переходам внешних валентных электронов того или иного элемента. Функцией природы атомов является длина волны спектральной линии в оптической области от 200 до 800 нм, функцией количества – интенсивность этих линий. Принципиальная схема эксперимента приведена на рисунок 7.



1 - источник возбуждения:

электрическая дуга, искра; индуктивно-связанная плазма инертного газа;

2 - монохроматор: призма (оптическое стекло, кварц (для УФ)), дифракционная решетка;

3 - выходная щель;

4 – приемник излучения: фотоэлектронный умножитель, диодная матрица;

5 – усилитель-преобразователь;

6 – отсчетное устройство.

В атомно-эмиссионной фотометрии пламени:

1 – газовое пламя;

2 – интерференционный светофильтр (другие монохроматоры).

Рисунок 7 - Блок-схема измерений в атомно-эмиссионном методе

Важнейший параметр источника возбуждения – температура. Температура электрической дуги постоянного или переменного тока достигает от 4000 °С до 7000 °С, конденсированной электрической искры – от 7000 °С до 10000 °С, в канале разряда до $3 \cdot 10^4$ °С. Эти источники не отличаются высокой стабильностью. Индуктивно связанная плазма (ИСП) – напротив современный высокостабильный источник возбуждения, устойчиво поддерживающий температуру 6000 - 10000°. Если работают с электрической дугой, используют электроды из спектрально чистого графита, а порошкообразные пробы вводят в каналы электрода. ИСП спектрометрия – "растворный" метод: раствор пробы в распыляют аргоном в горящую плазму. Существенным может быть эффект матрицы – влияние прочих элементов пробы на интенсивность излучения исследуемого элемента. Для возбуждения каждого элемента существует оптимальная температура, при которой атомизация достаточна, но ионизации элемента в плазме не происходит – спектр иона существенно отличается от спектра атома.

Монохроматор необходим для разложения суммарного излучения пробы в спектр и выделения нужных спектральных линий. Эмиссионные спектры атомов особенно богаты большим числом линий. Так, например, в интервале 200 – 800 нм в спектре атома водорода (1 валентный электрон) 54 линии, калия – 99, меди – 530, железа – 3257. Безусловны проблемы с распознаванием спектральных линий искомого элемента из-за их совпадения и наложения. Поэтому требования к монохроматору высокие. В современных приборах – это дифракционная решетка с особым профилем полос, нанесенных на дифракционный элемент. При качественном обнаружении элемента в его спектре нужно отыскать не менее трех характерных линий, обычно это наиболее чувствительные резонансные линии.

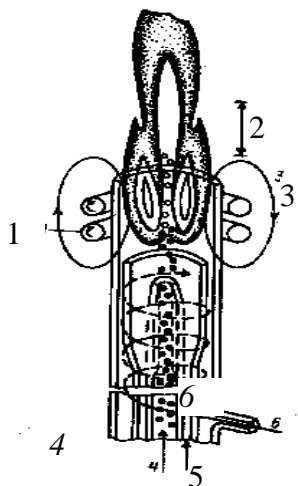
Фотоэлектрическая регистрация спектральных линий ныне общепринята как наиболее удачная, соответствующий электрический сигнал легко обрабатывается и регистрируется. Прежние виды регистрации – визуальная (отсюда и термин спектроскопия) и фотографическая (работа на спектрографах) ныне утратили свое значение.

Основная область атомно-эмиссионного анализа – определение металлов в различных объектах. При определении неметаллов наилучшие линии – резонансные – находятся в трудно доступной области вакуумного УФ. Влияние матрицы учитывают тщательным выбором спектральных линий и соответствующей химической обработкой пробы. Поэтому в конкретных условиях не всегда целесообразно и можно выбрать наиболее чувствительным резонансные линии определяемого элемента. Кроме того, резонансные линии металлоидов лежат в трудно доступной вакуумной ультрафиолетовой области. Приходится работать по другим, существенно менее чувствительным линиям.

5.2 Атомно-эмиссионный анализ с индуктивно связанной плазмой ИСП-АЭС (ОЭС)

Метод применяют для определения элементов в растворах. Основное преимущество – возможность определять из одной пробы большое количество

элементов, параллельно или последовательно, - в зависимости от конструкции прибора. Для возбуждения спектров здесь используют индуктивно-связанную аргоновую плазму (ИСП), получаемую в особом устройстве, называемом "горелкой". Принцип действия ее поясняет рисунок 8.



- 1 – индукционная катушка, охлаждаемая протекающей водой;
- 2 – зона излучения;
- 3 – высокочастотное электромагнитное поле;
- 4 – внутренний поток аргона, подающий пробы в горелку через распылитель;
- 5 – промежуточный поток аргона, в котором "поджигается" плазма;
- 6 – внешний поток аргона, сжимающий плазму по периферии.

Рисунок 8 - Схема устройства горелки с индуктивно-связанной плазмой

Индукционная катушка горелки 1 подключается к мощному – до 2 кВт - высокочастотному генератору Тесла, обеспечивающему накачку энергии в поток аргона, который вследствие этого ионизируется. Это вызывает появление индукционного тока, циркулирующего в плазме, происходит сильный индукционный разогрев потока аргона. Температура достигает 8000 – 10000 К и поддерживается с высокой точностью, вследствие чего условия возбуждения атомных спектров очень хорошо воспроизводятся, что существенно улучшает точность определений. Кроме того столь высокая температура плазмы устраняет многие химические помехи, связанные, например, с неполной минерализацией

матрицы при исследовании биологических проб, - при таких температурах атомизация всегда протекает практически полностью.

Для выполнения практических определений особенно удобен последовательный сканирующий спектрометр с дифракционной решеткой, работающий под управлением компьютера по заданной оператором программе. Программа управляет автоматической подачей проб в горелку, автоматическим сканированием спектра пробы в заданном диапазоне длин волн, что осуществляется программируемым вращением дифракционной решетки, и соответствующий регистрацией спектральных линий искомых элементов. диспергирующая сила монохроматора позволяет гибко выбирать оптимальные длины волн, обеспечивающие отсутствие спектральных совпадений при анализе таких сложных объектов, как биологические. Интенсивность спектральных линий измеряется современным фотоэлектрическим способом с применением так называемых диодных матриц. Ввиду очень большого диапазона линейности градуировочной зависимости, охватывающего до 5 – 6 порядков, метод одинаково хорошо пригоден для определения и малых и больших концентраций элементов из одной пробы. Достижимые пределы обнаружения – низки и обычно составляют десятые и даже сотые доли мкг/мл. Отметим, что это один из лучших современных методов, применяемых для анализа биологических проб, что подтверждает также и наличие официальных методик и нормативных документов.

5.3 Атомно-эмиссионная фотометрия пламени

Атомно-эмиссионную фотометрию пламени (источник возбуждения – газовое пламя) в основном используют для определения щелочных и щелочно-земельных металлов (ЩЗМ), поскольку для атомизации этих элементов и возбуждения спектров атомов достаточно температуры пламени газовой горелки. Температура газового пламени, а следовательно, и список возбуждаемых элементов, зависят от горючего газа и применяемого окислителя, сравнительные данные приведены в таблице 13.

Таблица 13 - Газовые пламенна, используемые в атомно-эмиссионной фотометрии пламени

Горючий газ - окислитель	Температура, °С	Возбуждаемые элементы
Светильный газ - воздух	1800	Щелочные металлы
C_2H_2 - воздух	2200	Щелочные металлы+ЩЗМ
$H_2 - O_2$	2800	Щелочные металлы+ЩЗМ
$C_2H_2 - N_2O$	3200	Тяжелые металлы) Ag, Cu, Mn)

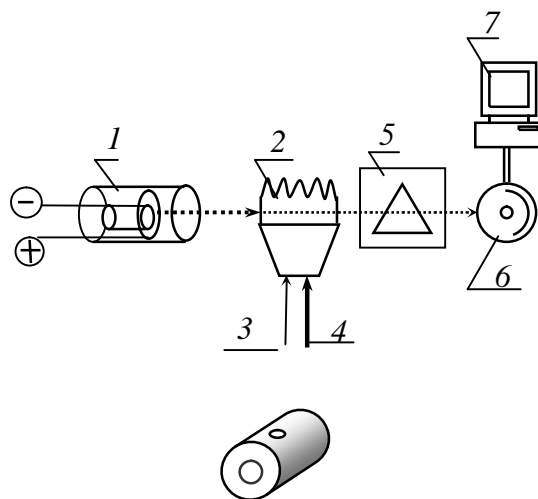
В пламенах свободные атомы детектируются в случае легко возбуждаемых элементов, обычно это щелочные металлы и, частично, ЩЗМ. В случае ЩЗМ, Mg, Cu существенную роль приобретает детектирование молекул, которые определяют по наиболее интенсивным краям (канты) полос испускания частиц MeO, MeOH. Так как температура плазмы газового пламени ниже, чем в дуге или в ИСП, спектры атомов характеризуются меньшим числом линий. Это упрощает требования к монохроматору, его можно заменить и интерференционным светофильтром, что значительно упрощает прибор. В фотометрии пламени работают с растворами проб, которые потоком окислителя распыляют в пламя.

Метод особенно хорош для определения щелочных металлов в любых растворах, в том числе и в биологических жидкостях. Достигаемые для них пределы обнаружения низки. Так, для Na 0,0001, для K – 0,001, для Li – 0,00003 (!), для Ca – 0,005 мкг/мл. Из недостатков метода можно отметить анионный эффект, так эмиссию кальция подавляют сульфаты, фосфаты, алюминий за счет образования в пламенах трудно диссоциирующих малолетучих соединений. Устранить этот недостаток можно предварительной химической обработкой пробы.

5.4 Атомноабсорбционная спектрофотометрия

В методе атомно-абсорбционной спектрофотометрии пробу, содержащую определяемые металлы, переводят в атомарное состояние в газовом пламени или в графитовой кювете, нагреваемой электрическим током (пламенная или

электротермическая атомизация соответственно), но возбуждения атомов не происходит. Через слой этого атомного пара пропускают монохроматическое излучение (источник – лампа с полым катодом), непременно содержащее линии определяемого элемента и измеряют резонансное поглощение элемента в атомарном паре в области 200 – 800 нм фотоэлектрическим способом. Схема атомно-абсорбционных измерений приведена на рисунок 9.



- 1 – лампа с полым катодом;
- 2 – атомизатор;
- 3 – горючий газ;
- 4 – воздух, подающий раствор пробы в распылитель;
- 5 – монохроматор;
- 6 – фотоприемник;
- 7 – регистрирующее устройство.

Внизу: графитовая кювета с отверстием сверху для ввода пробы

Рисунок 9 - Принципиальная схема измерений в атомно-абсорбционном методе.

Лампа с полым катодом 1 имеет катод, изготовленный в виде трубки из того металла, который определяют. В нем – вакуум и немного паров ртути. При подаче высокого напряжения возникает тлеющий разряд, в результате которого возбуждается резонансное излучение того металла, который определяют. Через кварцевое окошко это излучение попадает в атомизатор. Это может быть газовое пламя (чаще всего ацетилен – воздух, дающее температуру ~ 2250 К), горящее в щелевой горелке. В это пламя распыляется аэрозоль исследуемого раствора. В пламени происходит разрушение исследуемого вещества до атомарного уровня. Освобождающиеся невозбужденные атомы поглощают "родное" для них

резонансное излучение, в результате чего мощность прошедшего через пламя лучистого потока уменьшается. Отсчетная схема прибора регистрирует это как поглощение, величина которого и измеряется. Поглощение A связано с концентрацией элемента c прямо пропорциональной зависимостью $A = k c l$ (k – коэффициент чувствительности), исходя из которой, определяют концентрацию искомого элемента. Таким образом, желаемый перечень определяемых элементов связан с количеством имеющихся в распоряжении аналитика ламп с полым катодом.

5.5 Рентгеновская спектрометрия

В методах рентгеновской спектрометрии регистрируют сигналы, отвечающие электронным переходам между внутренними энергетическими уровнями атомов. Энергия квантов здесь существенно больше, а длина волны меньше и составляет 0,001 – 10 нм. В рентгеновской области часто традиционно используют и внесистемные единицы измерения длин волн – ангстремы. Соответственно, получим: 0,01 – 100 Å. В отличие от оптической спектрометрии в рентгеновской осуществляются электронные переходы с изменением главного квантового числа, которым соответствует существенно большая энергия квантов рентгеновского излучения - 4 – 11 эВ.

Рентгеновский эмиссионный и флуоресцентный анализ позволяет идентифицировать и количественно определять элементы с порядковым номером большее 13, возможен локальный анализ с разрешением до 10 мкм, что удобно при анализе тонких пленок, полупроводниковых, некоторых твердых биологических проб. Как правило, объект определения – основные элементы. Исследование дифракции рентгеновских лучей применяют для определения кристаллической структуры вещества – идентификации кристаллов. Флуоресцентный метод используют для количественного анализа. Сопоставительные схемы осуществления рентгеновского эмиссионного и флуоресцентного анализа приведены на рисунке 10.

В рентгеновском флуоресцентном методе флуоресцентное рентгеновское излучение инициируют, вызывая первичное. При этом осуществляются электронные

переходы во внутренних электронных оболочках с изменением главного квантового числа. Положение счетчика квантов 4 можно изменять и таким образом регистрировать отдельные спектральные линии, отвечающие идентифицируемым элементам. Количество зарегистрированных импульсов пропорционально количеству атомов определяемого элемента, что и является основой количественного анализа.

5.6 Радиометрические методы

Методы основаны на использовании в аналитических целях явления радиоактивности. Возникнув во время интенсивного развития ядерной физики, радиохимии и ядерной техники и технологии, они приобрели и общее значение. Методы включают определение элементов по естественной радиоактивности, например ^{40}K , ^{87}Rb и др., наиболее распространенные радиоактивационный анализ, методы изотопного разбавления и др.

Радиоактивационный анализ. В методах ядерной спектрометрии химические элементы определяют по интенсивности радиоактивного излучения (γ -спектр), возникающего вследствие взаимодействия атомных ядер с корпускулярным излучением и вызывающего превращение атомов определяемых элементов в радионуклиды. Этот способ называют активационным анализом и применяют для определения элементного состава твердых образцов. Особенно низкие пределы обнаружения и, следовательно, высокую чувствительность определений (до 10^{-12} %) обеспечивает нейтронно-активационный анализ, для применения которого требуется источник нейтронов – ядерный реактор, циклотрон, генератор нейтронов, изотопные нейтронные источники, нелинейные ускорители. Особенность метода - независимость чувствительности от формы нахождения элемента, но - длительность выполнения, необходимость работы в специальной радиохимической лаборатории.

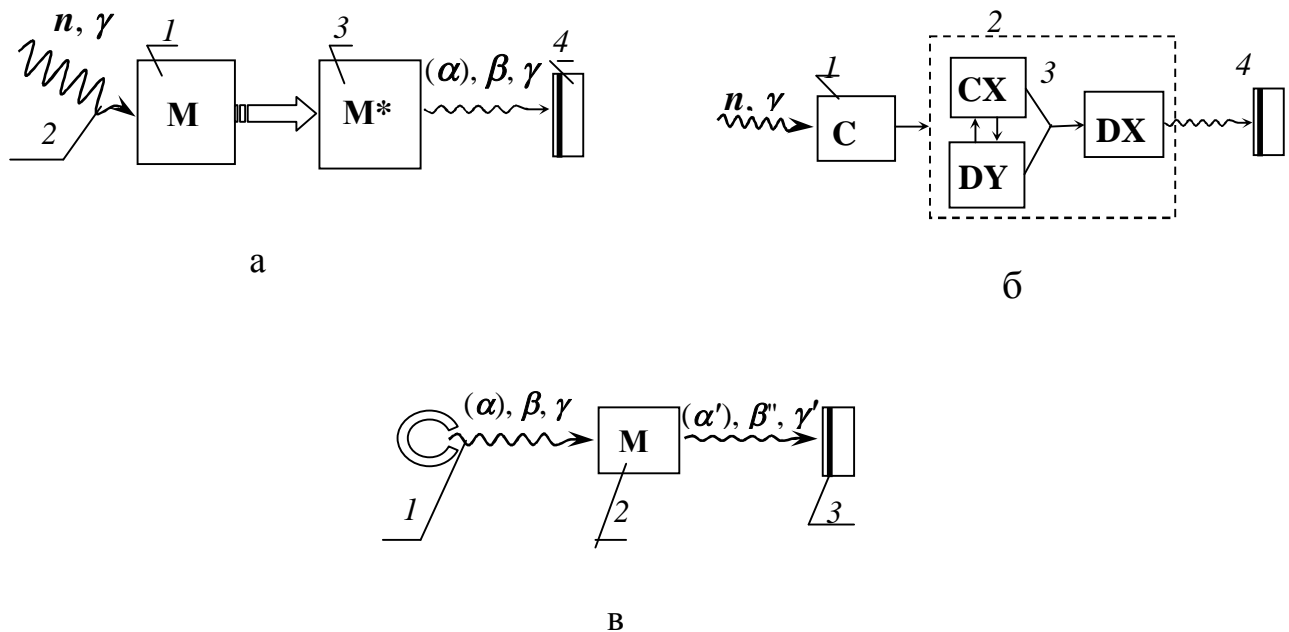
При проведении нейтронно-активационного анализа образец помещают в ядерный реактор и облучают его потоком нейтронов, в результате чего все

способные к возбуждению элементы пробы становятся радиоактивными, что иллюстрирует схема на рисунок 10 а.

Зависимость наведенной радиации от времени называется кривой распада. Она отражает активность всех образовавшихся радиоактивных изотопов. Индивидуальные элементы можно идентифицировать и определить, исследуя эту интегральную кривую и разлагая ее на составляющие. Такую математическую задачу решают с помощью компьютеров, поскольку законы, описывающие явление радиоактивного распада известны в четкой математической формулировке. Так, например, при анализе пробы волос непосредственно после облучения измеряли интенсивность γ -квантов ^{37}Cl , ^{128}I , через час после облучения – ^{24}Na , ^{64}Cu , ^{56}Mn . Через неделю - измеряли интенсивность ^{82}Br , ^{76}As , ^{90}Mo , ^{175}Cd , через месяц – ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{60}Co , ^{75}Se и др. Желаемые результаты можно получить, снимая не всю кривую распада, а регистрируя γ -спектр пробы в определенные моменты после облучения. Обычно используют Li-Ge детектор и многоканальный анализатор, работающий под управлением компьютера.

Радиохимический анализ. В радиометрическом методе анализа измеряют ослабление интенсивности радиоактивного излучения при взаимодействии с атомами элементов, входящих в компоненты образца. В радиохимическом анализе к пробе примешивают небольшое количество радиоактивного индикатора (меченые атомы) и подвергают ее химической обработке аналитическими реактивами, приводящей к изотопному обмену. Определение активности продукта реакции дает информацию о количестве определяемого вещества (*метод изотопного разбавления*). Блок-схема метода приведен на рисунок 10 б.

Радиометрический метод. Принцип метода состоит в измерении ослабления интенсивности радиоактивного излучения вследствие его взаимодействия с определяемыми элементами в образце, что передает схема на рисунок 10, в. Измеряют поглощение излучения, связанное с концентрацией искомого элемента в пробе известной зависимостью, используя счетчики радиоактивного излучения.



a – активационный анализ:

1 – образец; 2 – радиоактивное излучение; 3 – радиоактивный образец; 4 – детектор (спектрометр). М – определяемый элемент; * - наличие радиоактивности.

б – радиохимический анализ (изотопное разбавление):

1 – образец; 2 – добавление радиоактивного индикатора *;
3 – химическая реакция (DY – реагент); 4 – детектор. Пунктиром отмечен блок химических превращений, приводящий к изотопному обмену.
CX – определяемое соединение, С - катион, X – анион; * - наличие радиоактивности.

в – радиометрия:

1 – источник радиоактивного излучения; 2 – образец; 3 – детектор. М - определяемый элемент, поглощающий радиоактивное излучение.

Рисунок 10 - Схемы радиометрических методов

6 Молекулярная спектрометрия

В методах молекулярной спектрометрии (спектроскопии) с электромагнитным излучением взаимодействуют молекулы определяемых вещества. Молекулярная спектрометрия в УФ и, особенно, в видимой областях спектра, основанная на

поглощении излучения оптического диапазона (200-800 нм), связана с осуществлением электронных переходов валентных электронов. Это – основа спектрофотометрического анализа. Его применяют для определения как элементов, так и органических соединений. Для идентификации последних может быть использовано их собственное поглощение в УФ области, обусловленное наличием специфических групп атомов, часто называемых хромофорами.

Многие органические соединения или их комплексы с ионами металлов способны к фотолюминесценции, вызванной испусканием квантов в видимой области при возбуждении молекул УФ излучением и видимым светом. Такой вариант люминесцентного анализа называют флуориметрическим. Флуориметрия дает более низкий предел обнаружения ($\sim 10^{-6}$ %) по сравнению со спектрофотометрией ($\sim 10^{-5}$ %). Сочетание рассматриваемых способов с экстракционным концентрированием приводит к гибридным методам анализа – экстракционно-спектрофотометрическому и экстракционно-флуориметрическому с еще более низкими пределами обнаружения. Их часто применяют при определении микроэлементов в веществах особой чистоты или металлов-токсикантов в объектах окружающей среды.

В методе фотоакустической спектроскопии пробу облучают светом, модулированным звуковой частотой, и регистрируют колебательную энергию безызлучательного перехода в основное состояние в виде соответствующей звуковой волны. Этот способ относительно нов и весьма удобен при исследованиях больших молекул в биохимических исследованиях.

Основное назначение ИК-спектроскопии – идентификация химических соединений по их колебательным и реже вращательным спектрам, возникающих вследствие поглощения ими излучения в области частот $13000 - 10 \text{ см}^{-1}$. По ИК спектрам находят характеристические частоты, отвечающие колебаниям отдельных групп атомов и фрагментов в молекулах. Однако не все колебания молекул активны в ИК спектрах. Метод комбинационного рассеяния света (зарубежом Раман-эффект) позволяет наблюдать и эти колебания и, таким образом, дополняет результаты ИК спектрометрического исследования.

В методах спектроскопии магнитного резонанса регистрируют сигналы, возникающие вследствие переходов магнитных диполей между энергетическими уровнями, расщепляющимися в результате взаимодействия магнитных моментов ядер или неспаренных электронов с внешним магнитным полем. Это методы ядерного магнитного и электронного парамагнитного резонанса (ЯМР и ЭПР соответственно). Измеряя химические сдвиги сигналов ядер ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{19}F , ^{14}N и других по отношению к стандарту, можно исследовать структуру индивидуальных соединений и их состояние в растворах (ЯМР). ЭПР применяют при определении радикалов и частиц, имеющих неспаренный электрон.

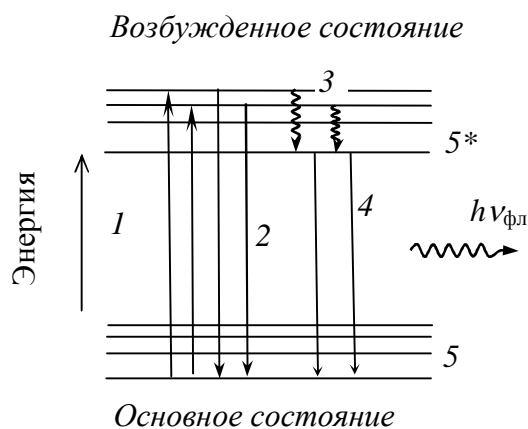
Формально отнесенная к спектроскопическим методам анализа масс-спектрометрия основана на воздействии на образец высокоэнергетического пучка электронов как квантов электронного излучения и на последующем разделении образующихся молекулярных и осколочных ионов в электростатическом и магнитном полях. Масс-спектрометрия – мощное средство идентификации органических соединений, химических элементов и их чувствительного определения.

Далее рассмотрены важнейшие рабочие принципы и особенности доступных и используемых на практике методов анализа, имеющих наибольшее практическое применение и распространение.

6.1 Спектрофотометрический анализ

Спектрофотометрический анализ основан на превращении определяемого вещества в окрашенное соединение, определении поглощения этого соединения и на нахождении концентрации его в пробе. Явление поглощения электромагнитного излучения обусловлено осуществлением электронных переходов внешних валентных электронов. Напомним, что область длин волн от 200 до 360 нм отвечает невидимой ультрафиолетовой области, а от 360 до 760 нм – видимой. Энергия поглощаемого кванта соответствует разнице в энергиях между основным и возбужденным уровнями. Поглощая квант, электроны переходят в возбужденное

состояние, которое неустойчиво. Поэтому далее следует обратный переход, а энергия возбуждения переходит в тепловую, что поясняет рисунок 11.



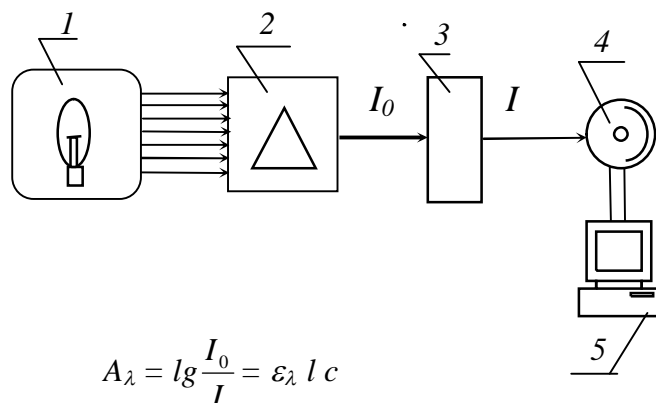
- 1 – переход внешних электронов из основного в возбужденное состояние
- 2 – возвращение возбужденных электронов в основное состояние; энергия возбуждения деградирует в тепло – явление поглощения
- 3 – безызлучательные переходы между колебательными подуровнями возбужденного состояния
- 4 – электронный переход, приводящий к испусканию кванта $h\nu_{\text{фл}}$ – явление флуоресценции
- 5, 5* – колебательные подуровни основного и возбужденного состояний.

Рисунок 11 - Схема электронных переходов, поясняющая явления поглощения электромагнитного излучения в спектрофотометрии и испускания квантов $h\nu_{\text{фл}}$ в флуориметрии.

Из рисунок 11, видно, что энергия электронного перехода больше, чем колебательного. Поэтому, каждый такой переход является в сущности электронно-колебательным. Это приводит к появлению полос поглощения. В конденсированной среде молекулы вещества взаимодействуют с сольватным окружением, что приводит к слиянию отдельных полос электронно-колебательных переходов в широкие области поглощения, имеющие, однако, максимумы. Зависимость поглощения от длины волны называют спектром поглощения.

Каждое поглощающее вещество в зависимости от молекулярного строения характеризуется собственным спектром поглощения. Поэтому спектрофотометрические измерения, схема осуществления которых показана на рисунке 12, выполняют при оптимальной длине волны, отвечающей наибольшей

разности в поглощениях продукта реакции и всех исходных веществ. Определяющее значение имеет проведение аналитической реакции, приводящей к образованию интенсивно окрашенных продуктов.



- 1 – источник непрерывного излучения: водородная, дейтериевая лампа – УФ область; лампа накаливания – видимая область;
 2 – монохроматор (призма, дифракционная решетка);
 3 – проба;
 4 – ФЭУ;
 5 – отсчетное устройство

Рисунок 12 - Схема спектрофотометрических измерений

Для ионов металлов это обычно реакции комплексообразования с различными, прежде всего, органическими реагентами. Это могут быть и процессы окисления-восстановления, синтетические реакции, особенно характерные при определении органических соединений и др., примеры многих таких реакций приведены в разд. «качественный анализ». Необходимо однако, чтобы реакция протекала быстро, количественно, а образующееся соединение обладало интенсивной и устойчивой окраской. Отдельные примеры приведены в таблице 14.

Таблица 14 Примеры реакций, используемых в спектрофотометрическом определении элементов

Определяемый элемент	Реагент	Примечание
1	2	3
Co(II,III)	1-Нитрозо-2-нафтол	Комплексообразование
Fe(II), Co(II), Cu(I)	1,10'-Фенантролин	—

Продолжение таблицы 14

1	2	3
Hg(II), Bi(III), Cd(II), Co(II), Pb(II), Ag(I), Zn(II)	Дитизон	–
Ni(II)	Диметилглиоксим	–
Cu(II), Mo(VI)	Бензоиноксим	–
La(III), Zr(IV), Th(IV)	Арсеназо III	–
Mn(II) NO ₂ ⁻	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	–
Mn(II) NO ₂ ⁻	Сульфаниловая кислота + 1-нафтиламин 1,8-Нафтилендиамин Родамин и другие окрашенные катионы	Окисление Mn(II) → MnO ₄ ⁻ Синтез азокрасителя
Se(IV) Анионные комплексы Sb(V), Au(III) и др.		Синтез окрашенного пиазоселенола Экстракция окрашенных ассоциатов комплексов элементов с катионами красителей и измерение поглощения или флуоресценции экстракта.

Основой количественного спектрофотометрического анализа является объединенный закон поглощения, по которому: поглощение при данной длине волны A_λ , определяемое как логарифм отношения интенсивностей падающего и прошедшего лучистого потоков $\frac{I_0}{I}$ - см. рисунок 12), является прямо пропорциональной функцией концентрации c :

$$A_\lambda = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon_\lambda l c,$$

где ε_λ - молярный коэффициент поглощения окрашенного соединения при оптимальной длине волны,

l – толщина поглощающего слоя,

c – концентрация, моль/л.

Подчеркнем, что искомое поглощение A_λ измеряют относительно раствора сравнения, содержащего все предусмотренные методикой компоненты, за исключением определяемого вещества.

В спектрофотометрическом анализе поглощение измеряют при определенной оптимальной длине волны, в этом случае высоки требования к монохроматору (см. рисунок 12): в современных приборах используют дифракционную решетку, кварцевую (УФ область) или стеклянную (работа только в видимой области спектра) призмы. Наименьшее поглощение, которое эти приборы позволяют измерить, составляет 0,002 – 0,005. Коэффициент молярного поглощения наиболее интенсивно окрашенных веществ составляет $\sim 5 \cdot 10^4$, но не более теоретического предела 10^5 . Следовательно при $l=1$ см, минимальная концентрация, доступная количественному определению составит $c_{\text{мин}} = 0,005/5 \cdot 10^4 = 10^{-7}$ моль/л, что в среднем согласуется с достигаемыми в этом методе пределами обнаружения. Это означает, что при навеске пробы 1 г можно определить до $\approx 10^{-5}$ % элемента, если предварительно позаботиться об его избирательности. Комбинируя цветную реакцию с экстракционным извлечением окрашенного продукта в небольшой объем несмешивающегося с водой органического растворителя, можно понизить и эту величину. Классический пример такого рода – реагент дитизон (см. таблицу 13), нерастворимый в воде, но растворимый в четыреххлористом углероде (зеленая окраска), в то время как его комплексы с металлами имеют окраску от оранжевой до красной.

Фотометрическое титрование. В методе используют измерение изменения поглощения раствора при выбранной оптимальной длине волны в процессе титрования. Далее строят кривые титрования, отражающие зависимость поглощения от количества добавленного титранта. Конечную точку на них находят экстраполяцией прямолинейных участков кривой титрования до их пересечения. Поглощение измеряют с помощью фотометра или спектрофотометра (спектрофотометрическое титрование). В зависимости от применяемого прибора производится и название метода. Регистрация конечных точек возможна, если

титруемое вещество, титрант или продукт реакции отличается характерным поглощением при выбранной оптимальной длине волны.

Фототурбидиметрическое титрование. В этом методе к раствору определяемого вещества добавляют титрант, образующий с ним малорастворимое соединение (например, системы $\text{SO}_4^{2-} - \text{Ba}^{2+}$, $\text{Cl}^- - \text{Ag}^+$ и т.п.). Условия проведения реакций выбирают таким образом, чтобы образовывался золь малорастворимого продукта реакции, а не осадок на дне сосуда. Внешне это проявляется как помутнением раствора. Это помутнение можно измерить, используя стандартную схему спектрофотометрии (рисунок 20) и регистрируя оптическую плотность $D = \lg \frac{I_0}{I}$. Подчеркнем, что ослабление интенсивности светового потока, прошедшего через "мутную" пробу (без поглощения), формально описывается уравнением, совпадающим с используемым в фотометрии. В конечной точке оптическая плотность, отвечающая наибольшему помутнению, достигает максимума и далее в процессе титрования не изменяется. Это позволяет начертить кривую титрования и по излому на ней найти конечную точку.

6.2 Флуориметрический анализ

При определенном строении молекулы структура ее энергетических уровней такова, что после их возбуждения УФ излучением, электронные переходы с возбужденного уровня на основной сопровождаются испусканием квантов в видимой области спектра, как это показано на рис. 11. Небольшой избыток энергии возбуждения при этом теряется на переходы между колебательными подуровнями, поэтому энергия испускаемого кванта (видимая область) меньше энергии поглощаемого кванта (УФ область). Важнейшей характеристикой фотолуминесценции является ее квантовый выход:

$$\varphi = I_{\text{фл}}/I_{\text{погл}},$$

где $I_{\text{фл}}$, $I_{\text{погл}}$ – интенсивности флуоресценции и поглощенного излучения соответственно (см. рисунок 13).

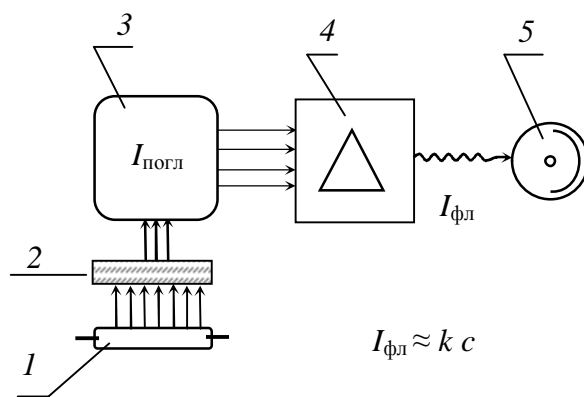
Чем ближе эта величина к 1, тем выше к.п.д. этого процесса. В аналитических целях используют системы с высоким квантовым выходом. Комбинируя это выражение с основным законом поглощения, записанным для пропускания, можно связать $I_{\text{фл}}$ с концентрацией определяемого флуоресцирующего вещества, если она мала, что обычно и бывает на практике, то:

$$I_{\text{фл}} = I_{\text{погл}} \varphi = (I - I_0) \varphi = (I_0 - I_0 \exp(-\varepsilon l c)) \varphi \approx 2,3 I_0 \varepsilon l c \varphi \approx k c,$$

где k - коэффициент пропорциональности для данной системы. Последнее выражение – основа количественного флуориметрического анализа.

Принципиальная схема измерения интенсивности фотолюминесценции – флуоресценции – приведена на рисунке 13. Так как излучение флуоресценции изотропно, то монохроматор удобно расположить как показано на рисунке 13. Это важно: излучение источника не попадает на детектор. Флуориметрия более чувствительна, чем фотометрия, так как при измерении поглощения необходимо сравнить две интенсивности лучистого потока, а в флуориметрии измеряется сам аналитический сигнал. Более того, при низких концентрациях флуоресцирующего вещества исчезает помеха за счет тушения люминесценции этим веществом.

В аналитической практике распространены способы, основанные на образовании флуоресцирующих комплексов с ионами металлов. Собственная флуоресценция имеет значение для определения редкоземельных элементов, органических соединений, витаминов, полициклических ароматических углеводов с конденсированными ядрами и др. Избирательность определений обеспечивается тщательным подбором условия проведения аналитических реакций. Среди многообразия флуоресцентных реагентов можно упомянуть 8-оксихинолин, полиоксифлавоны, кверцетин, оксиазо- и оксиазометиновые соединения и др. Дополнительные примеры некоторых реагентов упомянуты в таблице 14.



- 1 – источник УФ излучения (ртутная лампа);
- 2 – первичный светофильтр (прозрачен только для УФ излучения);
- 3 – проба;
- 4 – монохроматор (вторичный светофильтр);
- 5 – ФЭУ.

Рисунок 13 - Принципиальная схема флуориметрических измерений

Флуориметрическое титрование. Метод основан на измерении изменения интенсивности фотолюминесценции в процессе титрования. По результатам измерений вычерчивают кривую титрования – зависимость изменения интенсивности свечения от количества добавленного титранта. Излом на этой кривой позволяет установить конечную точку титрования. Возможно титрование веществ, обладающих собственной люминесценцией или приобретающих ее в процессе титрования, или с применением соответствующих люминесцентных индикаторов. Метод пригоден для работы в мутных и окрашенных растворах.

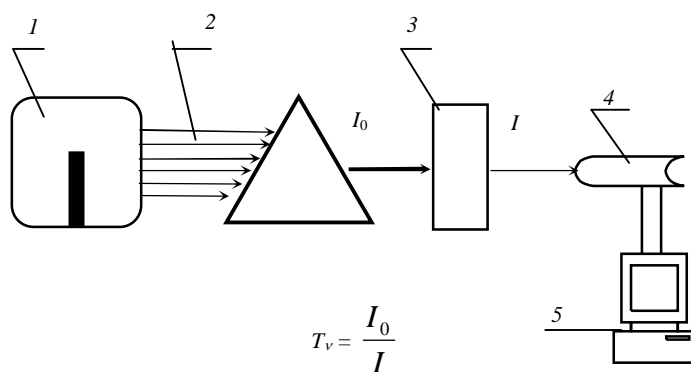
6.3 Инфракрасная спектроскопия

В инфракрасной (ИК) области спектра энергия поглощаемого излучения достаточна лишь для изменения колебаний и вращения молекул. ИК спектры существенно сложнее электронных, потому что именно в этой области спектра находятся характеристические колебательные частоты, отвечающие внутренним колебаниям отдельных групп атомов и фрагментов многоатомных молекул.

Эксперименту доступны: ближняя ИК область с частотами от 13000 до 4000 см⁻¹, фундаментальная – от 4000 до 200 см⁻¹ и дальняя – от 200 до 10 см⁻¹.

Принцип измерений иллюстрирует рисунок 14. Подчеркнем, что в ИК области активны лишь те молекулы, в которых при колебаниях атомов изменяется их дипольный момент.

Образец, помещенный в поток ИК излучения, поглощает те его частоты, которые отвечают упомянутым колебаниям, но пропускает все другие. В процессе съемки спектра осуществляется сканирование поглощения с изменением частоты ИК излучения.



1 – источник непрерывного излучения для ИК области (силитовый стержень – глобар, штифт Нернста);

2 – монохроматор (призма из прозрачных в ИК области KBr, NaCl, LiF);

3 – проба;

4 – детектор ИК излучения (болометр, термистор, пироэлектрический);

5 – регистратор.

Рисунок 14 - Принцип измерений в инфракрасной (ИК) спектроскопии

Это позволяет зарегистрировать зависимость пропускания T_v от частоты – ИК спектр. Анализируя полученный спектр, можно определить какие группы атомов присутствуют или отсутствуют в исследуемом образце. Естественно, что степень поглощения зависит от концентраций соответствующих частиц, что является основанием для количественного анализа. С разбавленными растворами особенно удобно работать в ближней ИК области, когда нет проблем с прозрачностью используемых растворителей. Пример идентификации органических соединений по характеристическим частотам определенных молекулярных групп приведен на рисунок 15, из которого на примере замещенных бензола видно, что различие в

строении молекул отчетливо отражается в их колебательных спектрах. Этот факт – основа идентификации соединений.

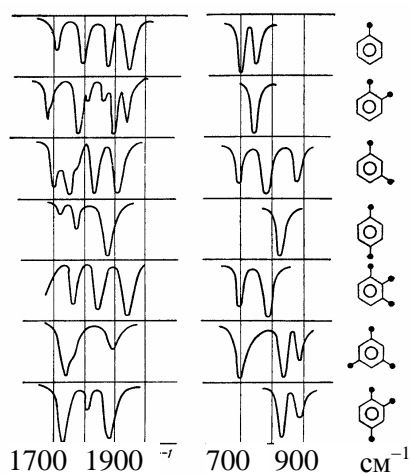


Рисунок 15 - ИК спектры некоторых замещенных бензола с метильными группами в областях 700–900 и 1650–2000 см^{-1}

ИК спектрометрию широко применяют для идентификации веществ и материалов, определения состава сложных смесей, контроля протекания химических реакций и для установления строения химических соединений. Помимо стандартного использования метода для идентификации и количественного анализа, ИК спектрометрия позволяет решать такие задачи, как определение средней молекулярной массы некоторых полимеров по количеству концевых групп, определение кристалличности полимеров, степени стереорегулярности, наличие конформаций, деградации материалов, исследование водородной связи и взаимодействия растворенное вещество – растворитель, природу гидратации и многие другие. Для решения таких сложных задач используют более мощную аппаратуру, отличающуюся от традиционной, когда ИК спектр регистрируют, например, записывают на бланке диаграммы, в координатах пропускание T – волновое число $\tilde{\nu}$, которое осуществляют в режиме пропускание – время сканирования. Это, так называемый, дисперсионный метод. Существенным недостатком таких систем становится их инерционность, обусловленная последовательной записью спектра по мере сканирования всего заданного участка ИК области и инерционностью таких детекторов, как болометры и термопары.

Решение этих проблем предоставляет сочетание математического алгоритма Фурье преобразования с ИК спектрометрией.

Фурье-спектрометрия позволяет чрезвычайно быстро – за секунды – записать весь ИК спектр (добавим и в других областях спектра вплоть до радиочастотной). Основой его является математический аппарат Фурье-преобразования, позволяющего выделять исходные периодические компоненты из сложной также периодической функции, например записи ИК спектра, разумеется, путем соответствующей компьютерной обработки. Результатом Фурье- преобразования является частотный спектр. В этом методе вместо традиционного монохроматора с выходной щелью используют классический интерферометр Майкельсона и пироэлектрические детекторы, что позволяет резко увеличить скорость съемки всего спектра – до практически одномоментной. Интерферометр работает как своеобразный высокоскоростной прерыватель излучения, дающий соответствующую разность хода лучей. Благодаря этому, два монохроматических потока с различающимися частотами, прошедшими через пробу, попадают в интерферометр одновременно и дают в зависимости от различия в пропускании соответствующую интерференционную картину, записываемую после выполнения Фурье-преобразования на компьютере как искомый ИК спектр. Таким образом, Фурье-ИК-спектрометрия обладает существенно большим спектральным разрешением и отличается более низкими пределами обнаружения, так как вся энергия от ИК излучателя проходит через образец (отсутствие оптических щелей в приборе) и попадает на детектор

Если при колебаниях молекул не происходит изменения их дипольных моментов, зарегистрировать их ИК спектр нельзя. В этом случае необходимую «колебательную» информацию о молекуле можно получить с помощью метода комбинационного рассеяния света (КРС, Рамановская спектрометрия). С помощью специальной техники удастся зарегистрировать результат модуляции видимого света колебаниями молекул. В этом случае в результирующем спектре комбинационного рассеяния света наряду с линией индуцирующего света появятся дополнительные слабые частоты $\nu_{\text{Д}} \pm \nu_{\text{м}}$ в более длинноволновой области – стоксовы

линии – и в более коротковолновой – антистоксовы линии. Таким образом, спектр КРС строят в координатах – интенсивность рассеяния света – рамановское смещение $\Delta\tilde{\nu} = \pm(\tilde{\nu}_i - \nu_{\text{Дайала}})$, где $\tilde{\nu}_i$ - волновое число падающего света. Спектры КРС дают молекулы, изменяющие свою поляризуемость при столкновении с фотонами. Поэтому спектрометрия КРС дополняет возможности колебательной ИК спектрометрии. Для того, чтобы увеличить интенсивность линии рассеяния света, в качестве источника исходного монохроматического излучения используют лазеры. Метод применяют для исследования молекулярной структуры органически и неорганических соединений, изучения водных растворов неорганических соединений, что недоступно в ИК спектрометрии ввиду собственного поглощения воды, для определения конфигурационных изомеров и в других случаях.

6.7 Спектрометрия магнитного резонанса

Методы основаны на измерении резонансного поглощения электромагнитного излучения радиочастотного диапазона, прошедшего через пробу. Явление магнитного резонанса можно истолковать с квантово-механической и с классической точек зрения. В первом случае при совпадении частоты излучения с частотой перехода между энергетическими уровнями ядер (ядерный магнитный резонанс) или электронов (электронный парамагнитный резонанс) с различной ориентацией спина наблюдается сильное резонансное поглощение излучения, пропорциональное количеству резонирующих частиц, которое регистрируют как спектр. Ядерный магнитный резонанс (ЯМР) наблюдается только на ядрах имеющих магнитный момент – ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P и др., в то время как электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) на электронах, обладающих нескомпенсированным спином. Для наблюдения резонансного поглощения исследуемое вещество помещают в сильное постоянное магнитное поле и одновременно налагают на него переменное радиочастотное поле. В этом случае частицы, обладающие магнитными свойствами, имеют возможность находиться на одном из появляющихся под воздействием магнитного поля энергетическом уровне, т.е. реализуются их

энергетические переходы. Этот факт и регистрируется как спектр магнитного резонанса, удобно обсуждать с точки зрения классической электродинамики.

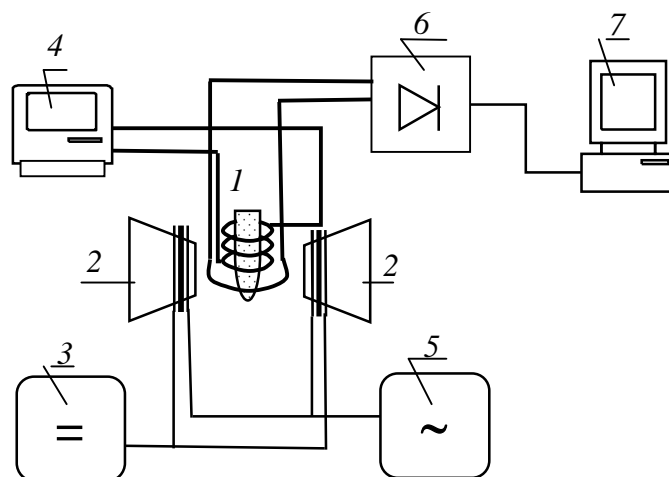
Ядерный магнитный резонанс. Схему соответствующего эксперимента, приведенную на рисунке 16. Проба 1, содержащая соединение с ненулевым магнитным моментом помещается в магнитное поле с напряженностью H_0 , создаваемое полюсами магнита 2. При этом начинается прецессия вращательного движения ядра с частотой

$$\nu = \gamma H_{\text{эфф}}/2\pi,$$

где γ есть гиромагнитное отношение, характеризующее ядро с ненулевым спином,

$H_{\text{эфф}}$ - эффективное магнитное поле, воздействующее на ядро.

Если на пробу воздействует еще и радиочастотное излучение генератора 4 с частотой, близкой к ν и перпендикулярно H_0 изменяется угол между вектором магнитного момента ядра и H_0 . Поскольку все вращающиеся ядра прецессируют в фазе, то согласно электромагнитной теории они начинают действовать как когерентные излучатели. Это излучение наводит сигнал в соседней катушке индуктивности, подключенной к детектору 6, а возникающий сигнал регистрируется регистратором 7. Для экспериментального наблюдения резонансного поглощения можно использовать две возможности – изменять частоту ν при постоянном магнитном поле H_0 , или же изменять H_0 при поддерживаемой постоянной ν . Чаще реализуется второй способ. Пример спектра ЯМР приведен на рис. 25. Рабочими частотами в ЯМР чаще всего являются 60, 100 и 220 МГц, напряженность магнитного поля составляет 10^3 - 10^4 Э.

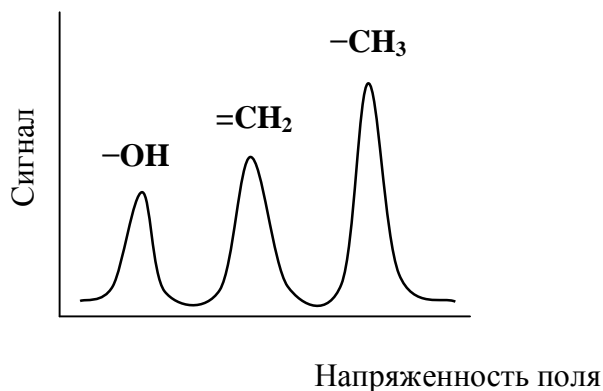


- 1 – проба;
- 2 – полюса электромагнита;
- 3 – источник стабилизированного тока;
- 4 – генератор радиочастоты с кварцевой стабилизацией;
- 5 – генератор изменения магнитной индукции;
- 6 – детектор;
- 7 – регистратор;

Рисунок 16 - Схема эксперимента в спектрометрии магнитного резонанса

Из приведенного на рисунке 13 ^1H -ЯМР (чаще используют аббревиатуру ПМР – протонный магнитный резонанс) спектра этанола видно, что протоны гидроксильной, метиленовой и метильной групп дают различающиеся сигналы. Это типичное для ЯМР явление связано с тем, что $H_{\text{эфф}}$ чувствительно к окружению ядер, входящих в состав молекул: ядра, имеющие различное окружение, резонируют при разных частотах. Этот сдвиг частот, называемый химическим сдвигом, измеряют относительно стандарта и используют как важнейшую характеристику ядер, входящих в состав различных молекул, единицей измерения является миллионная доля – м.д. Химический сдвиг – качественная характеристика, используемая при идентификации соединений. Взаимодействие между соседними магнитно неэквивалентными ядрами, приводящее к расщеплению сигналов для каждого из ядер, называют спин-спиновым взаимодействием. Количественной характеристикой является, напомним, интенсивность резонансного сигнала. Из приведенного на рисунке 17 ПМР спектра этанола видно, что протоны, связанные с

различными атомами углерода и с гидроксильной группой неэквивалентны, что и проявляется в спектре. По интенсивностям соответствующих пиков можно сделать и количественные выводы.



Стандарт тетраметилсилан $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, протоны которого эквиваленты

Рисунке 17- ^1H -ЯМР (ПМР) спектр этанола (схема)

ЯМР является мощным современным способом исследования и установления структуры молекул. Его используют при изучении органических, неорганических, биологических и элементоорганических соединений, включая макромолекулы полимеров и протеинов. Ценную информацию дают химические сдвиги, данные о спин-спиновом взаимодействии, исследование тонкой структуры пиков. В современных высококлассных особо чувствительных приборах с высоким разрешением используют ЯМР спектрометры с Фурье-преобразованием и с электромагнитами со сверхпроводниками. Возможности ЯМР спектроскопии ограничены ядрами, обладающими магнитными моментами. Большинство элементов, как правило, имеют один стабильный изотоп с магнитным моментом. Если его распространенность в природе мала, используют прием изотопного обогащения.

Электронный парамагнитный резонанс. Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) можно наблюдать для веществ, в которых атомы и молекулы имеют неспаренные электроны. Это могут быть соединения парамагнитных ионов металлов ($\text{Ti}(\text{III})$, $\text{V}(\text{IV})$, $\text{Mo}(\text{V})$, $\text{Cr}(\text{III})$, $\text{Mn}(\text{II})$, $\text{Fe}(\text{III})$, $\text{Co}(\text{II})$, $\text{Ni}(\text{III})$, $\text{Cu}(\text{II})$, $\text{Ag}(\text{II})$,

Eu(II) и др.), органические и неорганические радикалы, атомы и молекулы с нечетным числом электронов (NO, H, N...), полупроводники, возбужденные триплетные состояния молекул. Метод позволяет исследовать структуру соединений и химическую связь в них. Идея ЭПР состоит в том, что неспаренный электрон, обладающий спиновым вращательным моментом, под воздействием электромагнитного поля микроволнового диапазона приобретает магнитный момент, который может взаимодействовать с налагаемым внешним магнитным полем H . Это приводит к возможности нахождения электрона на уровнях с различной ориентацией спина. Между этими двумя уровнями и наблюдается резонансный переход, регистрируемый как сигнал ЭПР. Энергия этого перехода ΔE равна:

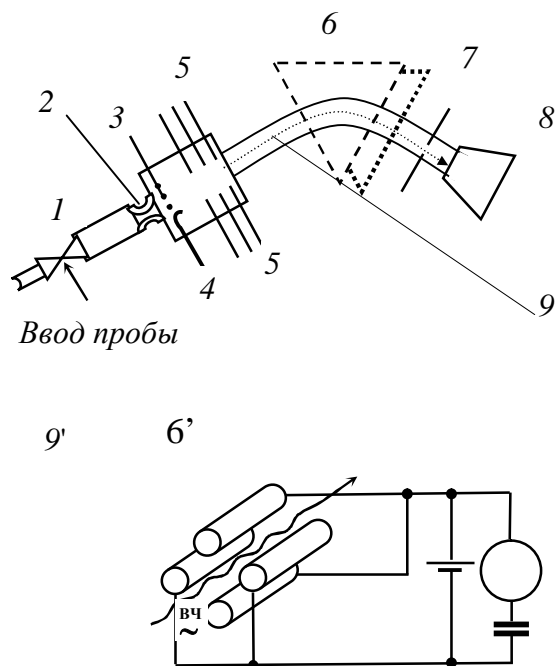
$$\Delta E = g B H,$$

где g – безразмерная постоянная, называемая g -фактором и определяющая положение линии в магнитном поле, и являющаяся мерой эффективного магнитного момента электрона; B – магнетон Бора. Величина g -фактора является константой вещества, позволяющей выполнять его идентификацию и обнаружение.

Взаимодействие спинов электрона и ядра в молекуле приводит к появлению сверхтонкой структуры спектра ЭПР, которое является мерой спиновой плотности электрона на ядрах. Анализ интенсивностей и энергий расщепления позволяет установить природу парамагнитного состояния. Расширение возможностей метода на диамагнитные ионы дает использование их комплексообразования с органическими реагентами, представляющими собой устойчивые свободные радикалы. Такие реагенты называют спин-мечеными. Спектрометрия ЭПР – чувствительный метод, позволяющий определить до 10^{-12} моля парамагнитных частиц в пробе, которая может быть жидкой, твердой или газообразной. Стандартная рабочая частота ЭПР спектрометра 9400 МГц.

6.8 Масс-спектрометрия

Масс-спектрометрический метод широко используют для установления элементного и изотопного состава неорганических веществ и материалов, для идентификации и установления строения структуры органических соединений. Обобщенная схема эксперимента в масс-спектрометрии приведен на рисунке 18. Пробу исследуемого вещества вводят в прибор через систему напуска 1 в натекатель 2 и подвергают воздействию высокоэнергетического пучка электронов 3–4 в вакууме. При этом осуществляется ионизация атомов и молекул исследуемого вещества. Образовавшиеся молекулярные и осколочные ионы ускоряются ионов электростатическим полем 5 и далее, проходя через магнитное и электростатическое поля масс-анализатора 6, разделяются в зависимости от отношения масса/заряд (m/z), фокусируются и достигают детектор. В каждый момент времени через выходную щель 7 на детектор 8 направляется поток ионов только с определенным отношением m/z . Именно этим отношением и определяется траектория движения иона в приборе. Возникающий ионный ток детектора регистрируется в виде отдельного пика. Таким образом, масс-спектр представляет собой совокупность пиков, которые выдаются в координатах интенсивность – отношение m/z . Масс-спектрометрическому исследованию доступны вещества с молекулярными массами от 2 до 3000 а.е.м.



- 1 – система напуска;
 2 – натекатель (точечная диафрагма);
 3 – ионный источник – катод;
 4 – ионный источник – анод;
 5 – ускоряющие электроды;
 6 – масс-анализатор, магнитный и электростатический;
 6' - квадрупольный масс-анализатор (пояснения в тексте);
 7 – выходная щель;
 8 – детектор;
 9, 9' – траектории движения иона, определяемые отношением m/z ;
 Примечание - В приборе поддерживается вакуум $\sim 10^{-5}$ мм рт. ст.

Рисунок 18 - Схема эксперимента в масс-спектрометрии

Для выполнения определения достаточно уже 1 мг пробы, важно, чтобы она была представительной. Пробы летучих или газообразных органических веществ ионизуют электронным ударом (как в примере на рисунке 18) или химической ионизацией. В этом приеме пробу еще до электронного удара разбавляют большим избытком газа-реактанта, например, CH_4 , NH_3 , He , Ar , что приводит к преобладающему образованию из них первичных ионов. Далее, эти первичные ионы, сталкиваясь с молекулами исследуемого вещества, образуют вторичные ионы,

несущие необходимую аналитическую информацию, хотя результирующий масс-спектр и получается более сложным, чем при электронном ударе.

Образцы нелетучих веществ, например, при элементном анализе неорганических веществ, вводят в прибор в виде растворов и ионизируют бомбардировкой пучком ионов, используют термическую, лазерную ионизацию (твердые пробы) или индуктивно связанную аргоновую плазму. В зависимости от способа ионизации может быть записан масс-спектр положительно или отрицательно заряженных ионов. Кроме того, в зависимости от способа ионизации и структуры исследуемой молекулы после образования молекулярного иона могут протекать процессы его фрагментации, при которых образуются характерные для каждого вещества осколочные ионы с меньшей массой, естественно, также регистрируемые спектрометром.

Размеры и массу масс-спектрометра можно уменьшить, используя в анализаторе не тяжелый магнит, а компактное устройство – квадрупольный масс-анализатор, схема устройства которого приведена на рисунке 18,6'. Квадруполь представляет собой 4 соосно расположенных металлических стержня, подсоединенные как показано на рисунке 18,6' к источнику постоянного напряжения и к генератору радиочастоты. Суммарный эффект воздействия постоянного и переменного высокочастотного электрических полей на движущийся ион приводит к его волновому движению. Изменяя частоту высокочастотного поля, можно добиться, чтобы детектора достигал только резонирующий ион с определенным отношением m/z , в то время как прочие нерезонирующие ионы будут передавать свой заряд металлическим квадрупольям и, таким образом, не попадать в детектор. Сканируя частоту высокочастотного поля определенным образом можно зарегистрировать весь масс-спектр. Разумеется, существуют и другая техника выполнения масс-спектрометрического исследования, что выходит за рамки данного пособия. В целях методического единства можно упомянуть, например, масс-спектрометрию с Фурье-преобразованием подобно тому, как это делается в частности в ИК и ЯМР спектрометрии.

7 Электрохимические методы анализа

ЭМА – совокупность методов исследования и анализа растворов, основанных на изучении электрохимических свойств веществ, помещенных в электрохимическую ячейку. Возможная классификация ЭМА представлена в виде схемы на рисунке 19.

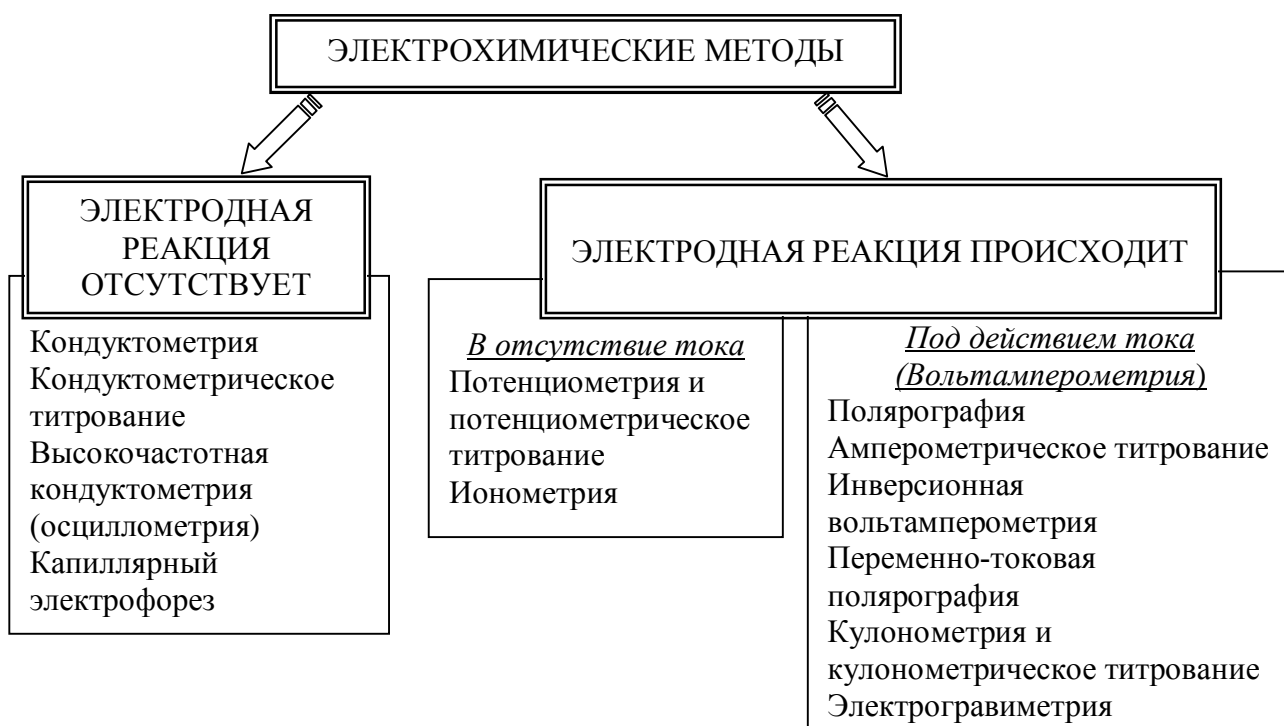


Рисунок 19 - Классификация электрохимических методов анализа

Из рисунка 19 видно, что к ЭМА относится и небольшое число методов, в которых электродная реакция отсутствует. Измерение омического активного сопротивления раствора электролита переменному току (чаще говорят об обратной величине – электропроводности), обусловленного определенной подвижностью ионов в растворе, составляет сущность кондуктометрии. Изменение электропроводности в процессе аналитической реакции, например кислотно-основного взаимодействия, осаждения и других, используют в кондуктометрическом титровании для индикации достижения конечной точки титрования. Если измерять полное сопротивление току высокой частоты, то можно

обойтись и без погружаемых в раствор электродов. Так поступают в методе высокочастотной кондуктометрии (и титровании). Это особенно удобно при работе с токсичными веществами. В настоящее время подвижность ионов в электрическом поле используют для разделения смесей ионов, например образуемых аминокислотами, методом капиллярного электрофореза. Роль рассмотренных методов не особенно велика по сравнению с методами, основанными на электродных реакциях, когда эти процессы поддаются экспериментальному наблюдению, отображением чего является вольтамперная кривая.

В потенциометрических методах измеряют величину электродного потенциала индикаторного электрода в отсутствие тока, которая зависит от активности (концентрации) потенциалопределяющих ионов. Эта зависимость передается уравнением Нернста. Метод широко применяют для определения рН растворов и биологических жидкостей, концентрации некоторых катионов и анионов (ионометрия) и величины окислительно-восстановительных потенциалов, а также для определения конечной точки титрования, отвечающей моменту окончания реакции – моменту эквивалентности (потенциометрическое титрование).

Методы вольтамперометрии основаны на использовании явления поляризации рабочих электродов, когда концентрация ионов в растворе и у поверхности электрода вследствие электрохимической реакции различаются, и измеряемый потенциал электрода отклоняется от равновесного значения, предписываемого уравнением Нернста. Возникающий при этом ток – аналитический сигнал – называют диффузионным.

В полярографии анализируемое вещество, содержащее или ионы металлов, или некоторые органические соединения, обладающие полярографической активностью, подвергают электролизу на ртутном каплюющем электроде. Типичный вид регистрируемой при этом поляризационной кривой, называемой полярограммой (см. далее по тексту). Потенциал полуволны является характеристикой вещества, а высота волны – функцией концентрации. Связь величины диффузионного тока с концентрацией передает уравнение Ильковича. Измерение предельного

диффузионного тока используют также для нахождения конечной точки титрования в амперометрическом титровании.

Чувствительность классической полярографии (10^{-5} – 10^{-7} %) можно повысить, используя способ инверсионной вольтамперометрии. Для этого "следы" определяемого металла сначала концентрируют в покоящейся капле ртути, а далее, при анодном растворении этого металла, регистрируют пик тока и определяют концентрацию ионов металла. Более низких пределов обнаружения можно достичь, видоизменив способы развертки потенциала, прилагаемого к электрохимической ячейке, или регистрации возникающего электрического сигнала. Эти способы используют в методах переменного-токовой полярографии.

Кулонометрия основана на определении количества электричества, потребовавшегося для полного превращения электрохимически активного вещества. Этот метод относится к наиболее точным, поскольку измерения количества электричества и необходимые расчеты по уравнению Фарадея могут быть выполнены корректно и с высокой точностью.

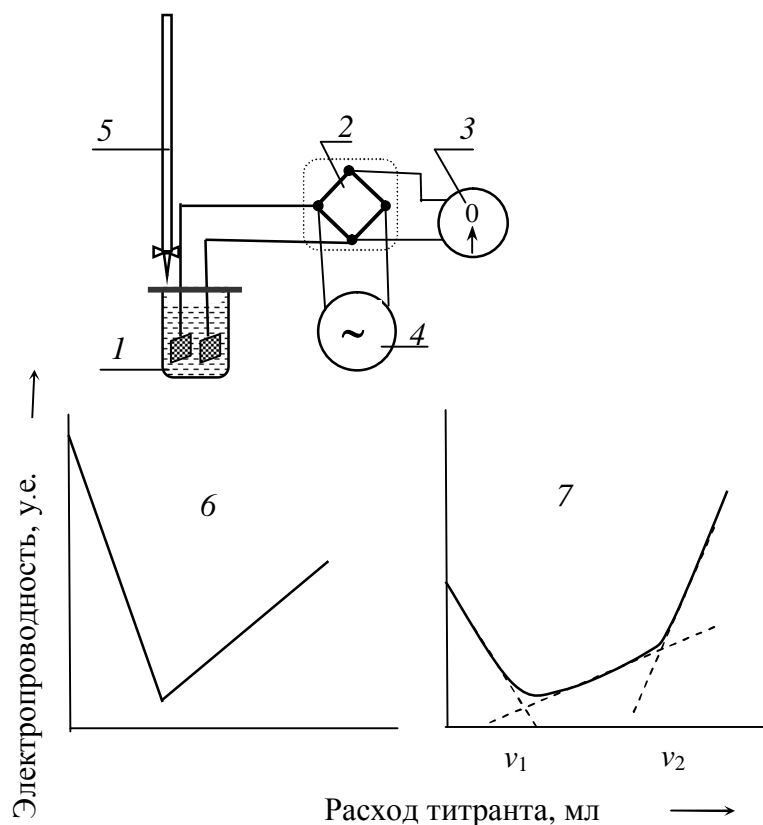
Для автоматического поддержания необходимого режима электролиза используют специальные электронные устройства – потенциостаты. Электролиз в кулонометрии можно проводить в двух режимах, – при поддерживаемом постоянном токе, или при постоянном потенциале рабочего электрода, что удобнее. Еще более широко применяют кулонометрическое титрование, в котором электролиз применяют для электрогенерации титрантов, в том числе и неустойчивых при обычных условиях. Это делает кулонометрическое титрование пригодным для определения широкого круга неорганических и органических соединений. В особых случаях, например при определении меди, удается осуществить полное электросаждение металла в виде осадка на электроде и определить его массу взвешиванием (электрогравиметрия).

Из приведенного краткого обзора видно все многообразие ЭМА, что отражает современную ситуацию. Конечно, не все указанные на рисунке 19, методы имеют равное значение, поэтому далее приводится несколько более подробная информация о наиболее важных с практической точки зрения методах.

7.1 Кондуктометрия и кондуктометрическое титрование

Низкочастотная кондуктометрия. Схема измерения электропроводности растворов приведена на рисунок 20. Напомним, что раствор электролита – проводник 2-го рода, когда, частицами, переносящими ток, являются ионы. Принципиально важно, чтобы электроды, помещенные в раствор электролита, осуществляли только электрический контакт. Для этого платиновые электроды платинируют – покрывают тончайшим слоем дисперсной платины, что увеличивает поверхность электрода и обеспечивает отсутствие поляризационных явлений на нем – никаких электрохимических превращений. Последнее обеспечивает также и работа на переменной токе частотой 1000 Гц. Сопротивление ячейки измеряют с помощью мостовой схемы, подключая ячейку 1 к плечу моста 2 и уравновешивая мост сопротивлением соседнего плеча. Благодаря этому, в момент равновесия моста через его измерительную диагональ ток не протекает и измеряется истинное омическое сопротивление.

Электропроводность – величина аддитивная и определяется подвижностью всех ионов, присутствующих в растворе, поэтому невозможно отличить один ион от другого, т.е. аналитическая избирательность отсутствует. Однако кондуктометрию можно эффективно использовать, наблюдая за ходом изменения электропроводности в процессе титрования, т.е. приливая его из бюретки 5. Изменение электропроводности раствора в процессе титрования отображает кривая титрования (6), излом на которой отвечает конечной точке титрования – $v_{TЭ}$. Расчет результата выполняют далее по стандартным формулам титриметрии. Титрование можно проводить в мутных и окрашенных растворах, можно использовать и другие реакции, например осаждения ($\text{Na}_2\text{SO}_4 + (\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ba} \rightarrow \text{BaSO}_4\downarrow + 2\text{CH}_3\text{COONa}$). Ценная особенность – возможность анализа смесей некоторых электролитов, например сильной и слабой кислот (7). В этом примере v_1 отвечает оттитровыванию HCl , а разность $v_2 - v_1 - \text{CH}_3\text{COOH}$.



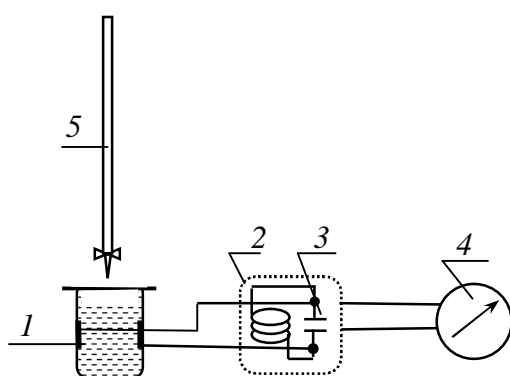
- 1 – ячейка с платинированными электродами;
 - 2 – мост переменного тока;
 - 3 – нуль-индикатор;
 - 4 – источник переменного тока;
 - 5 – бюретка (при осуществлении кондуктометрического титрования);
- Внизу: Кривая титрования HCl (6) и смеси HCl + CH₃COOH (7) раствором NaOH (схема).

Рисунок 20 - Схема эксперимента в кондуктометрии и примеры кривых кондуктометрического титрования

Высокочастотная кондуктометрия. Метод основан на измерении полной проводимости на частотах порядка десятков мегагерц. При таких частотах становится отчетливой роль молекулярной, или деформационной, и ориентационной поляризации. В первом случае под действием высокочастотного (ВЧ) поля происходит некоторое разобшение электронного облака и ядер молекулы, появляется наведенный диполь. Полярные молекулы в таком поле стремятся ориентировать свои дипольные моменты вдоль поля. Поляризация молекул в ВЧ поле приводит к существенному изменению диэлектрической и магнитной проницаемости всего раствора. Изменение этих параметров можно зафиксировать,

если включить ячейку в колебательный контур и регистрировать изменение тока в нем, как это показано на рисунке 21. Можно поместить ячейку с раствором между обкладками конденсатора (ячейка *C*-типа) или между витками катушки индуктивности (ячейка *L*-типа). В любом случае это будет вариант бесконтактной ВЧ кондуктометрии, что является достоинством метода. Можно осуществлять и высокочастотное титрование, получая линейные кривые титрования, подобные рассмотренным выше. Следует отметить, что в ВЧ кондуктометрии измеряется полная проводимость раствора, складывающаяся из активной омической компоненты и из реактивной составляющей, зависящей от емкости и индуктивности. Понятие реактивная составляющая отражает изменение фазы переменного тока, при его прохождении через реактивный элемент – емкость или индуктивность. Итак, изменение свойств раствора приводит к изменению омического сопротивления и его реактивной компоненты, регистрируемая прибором их векторная сумма называется импедансом.

В методе ВЧ титрования можно использовать очень многие аналитические реакции – кислотно-основное взаимодействие, осаждение, комплексообразование, подчеркнем без непосредственного контакта с раствором. Окраска, мутность, агрессивность, токсичность раствора исследуемого соединения не имеют негативного практического значения.

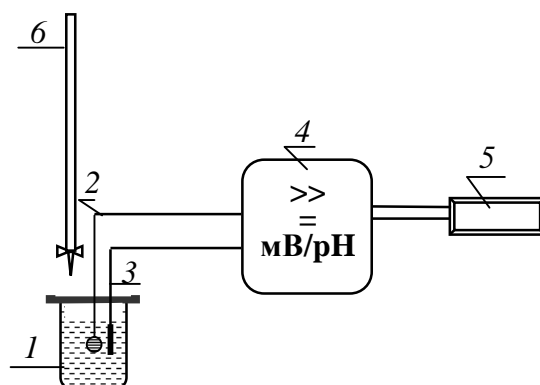


- 1- бесконтактная ячейка (C-типа);
- 2 – высокочастотный (ВЧ) генератор;
- 3 – измерительная схема;
- 4 – микроамперметр;
- 5 – бюретка (для ВЧ титрования);

Рисунок 21 - Схема измерения высокочастотной проводимости растворов

7.2 Потенциометрия и потенциометрическое титрование

Метод основан на измерении электродвижущей силы (ЭДС) гальванического элемента, составленного из помещенных в раствор индикаторного и вспомогательного (сравнения) электродов. Эту ЭДС принято называть электродным потенциалом. Он возникает как следствие электронно-ионного или ионообменного равновесия на поверхности раздела фаз электрод – раствор. Электродная реакция происходит в отсутствие тока, не поддается непосредственному наблюдению, но проявляет себя в электродном потенциале. Схема потенциометрического эксперимента приведена на рисунке 22.



- 1 – ячейка;
- 2 – индикаторный электрод;
- 3 – электрод сравнения;
- 4 – милливольтметр (рН-метр);
- 5 – цифровой милливольтметр;
- 6 – бюретка (для титрования).

Рисунок 22 - Схема потенциометрических измерений и потенциометрического титрования

В потенциометрии применяют металлические и ионселективные индикаторные электроды. Металлические электроды (иначе называемые электродами 1-го рода) могут быть активные и инертные. Потенциал активного металлического электрода является функцией активности его собственных ионов в

растворе. Например, серебряный электрод работает на основе электронно-ионного равновесия $\text{Ag}^+ + \bar{e} \rightleftharpoons \text{Ag}$. Для него справедливо уравнение Нернста:

$$E = E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}}^0 + 0,059 \lg a_{\text{Ag}^+},$$

где $E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}}^0$ - стандартный потенциал системы при активностях, равных 1.

В растворе, содержащем Cl^- - ионы, потенциал начинает зависеть от их концентрации. Это уже электрод 2-го рода, для которого:

$$E = E_{\text{AgCl}/\text{Ag}, \text{Cl}^-}^0 - 0,059 \lg a_{\text{Cl}^-},$$

где $E_{\text{AgCl}/\text{Ag}, \text{Cl}^-}^0 = E_{\text{Ag}^+/\text{Ag}}^0 + 0,059 \lg K_{S, \text{AgCl}}$, а K_S - произведение растворимости AgCl . Если концентрацию Cl^- -ионов поддерживать постоянной, величина потенциала также будет оставаться постоянной. Соблюдая это условие, хлоридсеребряный электрод используют в качестве электрода сравнения.

Инертные металлические электроды являются лишь переносчиками электронов от восстановителя к окислителю и изготавливаются из благородных металлов (Pt, Au). Их потенциал поэтому зависит от соотношения активностей окисленной и восстановленной форм. Область их применения – потенциометрическое окислительно-восстановительное титрование.

Ионометрия. Большое прикладное значение приобрела прямая потенциометрия с ионселективными мембранными электродами (ионометрия с ИСЭ) для определения концентрации ионов в растворе. Метод состоит в измерении потенциала ИСЭ и в нахождении концентрации по градуировочной зависимости. При концентрациях $\sim 10^{-6}$ М электрод утрачивает свою электродную функцию. В ИСЭ непременно имеется мембрана – полупроницаемая перегородка, пленка, вполне подобная внутриклеточным и биологическим мембранам. Она отделяет внутреннюю часть ИСЭ от анализируемого раствора. С помощью электродов сравнения, помещенных во внешний анализируемый и во внутренний раствор, можно измерить разность этих потенциалов, которую и называют рассмотренным мембранным потенциалом. Потенциал мембраны возникает вследствие существования равновесия ионного обмена на ее поверхности, проникновения

ионов в фазу мембраны и перемещение в ней. Сумму этих процессов, приводящих к возникновению потенциала мембраны E_M , например при определении концентрации A^+ в присутствии мешающего иона B^+ , описывает уравнение Никольского:

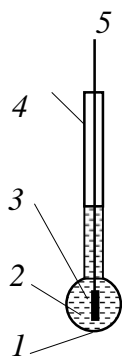
$$E_M = \text{const} + \frac{0,059}{z_A} \lg(a_A + k_{A,B}^{\text{пот}} a_B^{z_A/z_B}),$$

где z_A, z_B – заряды ионов, $k_{A,B}^{\text{пот}}$ – коэффициент потенциометрической селективности (видно, что чем меньше этот коэффициент, тем выше селективность ИСЭ к определяемому иону).

Мембраны могут быть:

- некристаллическими с жесткой матрицей (стеклянный электрод, используемый для определения рН);
- кристаллическими (лантанфторидный электрод на F^- с мембраной из LaF_3 , сульфидсеребряный электрод на S^{2-} с мембраной из Ag_2S , йодидселективный электрод с мембраной из Ag_2S+AgI);
- жидкими (раствор ионообменника или «нейтрального переносчика ионов» в несмешивающемся с водой органическом растворителе, удерживаемом в пленке пористого полимера, например кальцийселективный электрод с мембраной из поливинилхлорида, пропитанного раствором додецилфосфата кальция $[(RO_2)_2POO]_2Ca$ в диоктилфенилфосфате или калийселективный валиномициновый электрод с мембраной на основе «нейтрального переносчика» валиномицина); упомянутые в примере жидкостные мембранные электроды приобрели особое значение в биологических исследованиях.

На рисунке 23 в качестве примера приведена схема устройства стеклянного электрода (СЭ) для измерения рН. СЭ селективен по отношению к ионам водорода. Потенциал возникает вследствие ионного обмена ионов водорода с ионами щелочных металлов, обычно натрия, закрепленными в силикатной матрице. Конструктивно стеклянный электрод представляет собой тонкостенную сферу 1, изготовленную из специального стекла, обладающего очень низкой ионной проводимостью.



- 1 – рН чувствительная мембрана из электродного стекла;
- 2 – внутренний раствор: 0,1 М НСl, насыщенный AgCl;
- 3 – внутренний электрод сравнения;
- 4 – стеклянная трубка;
- 5 – токоотвод.

Рисунок 23 - Схема устройства стеклянного электрода

Если СЭ погрузить в испытуемый раствор, то между внешней и внутренней поверхностями стеклянной мембраны возникнет разность потенциалов, измерение которой и позволяет рассчитать рН. Конструктивное исполнение СЭ может быть разнообразным. Часто его объединяют в одно целое с электродом сравнения и используют специальную конструкцию для уменьшения и стабилизации диффузионного потенциала. Обычно для этого используют солевой мостик, – узкую трубку, заполненную раствором КСl, поскольку ионы K^+ и Cl^- имеют приблизительно равные ионные подвижности. Это обеспечивает минимизацию и постоянство диффузионного потенциала. СЭ позволяет измерять рН в интервале 1–10. В сильно кислой области появляются погрешности из-за уменьшения активности воды, в сильнощелочной – вследствие проявления СЭ катионной функции по отношению к присутствующим в растворе ионам щелочного металла. Известны конструкции СЭ для измерений рН в одной капле жидкости, в ее тонких. Конечно, в практической работе более удобными будут изготавливаемые из специального электропроводного стекла твердотельные стеклянные электроды, отличающиеся отсутствием внутреннего стандартного раствора. Ионселективные электроды с иными мембранами имеют в принципе сходное устройство.

В современные приборы встраивают микропроцессор (соответствующую функцию называют smart). Это позволяет проводить настройку рН-метра по нескольким стандартным буферным растворам (таблице 15), значения рН которых запоминаются.

Таблица 15 - Стандартные буферные растворы, применяемые для настройки рН-метра (*m* – моляльность)

<i>t</i> , °С	Битартрат калия (насыщенный) при 25 °С	Бифталат калия (0.05 <i>m</i>)	КН ₂ РО ₄ (0.025 <i>m</i>) + Na ₂ НРО ₄ (0.025 <i>m</i>)	КН ₂ РО ₄ (0.008695 <i>m</i>) + Na ₂ НРО ₄ (0.03043 <i>m</i>)	Na ₂ B ₄ O ₇ (0.01 <i>m</i>)
25	3,557	4,008	6,865	7,413	9,180
30	3,552	4,015	6,863	7,400	9,139
35	3,549	4,024	6,844	7,389	9,102

Далее по этим значениям методом наименьших квадратов рассчитывается уравнение градуировочной функции в координатах "потенциал *E* – рН". Естественно, для обеспечения точности измерений необходимо контролировать температуру исследуемого раствора. Так целесообразно поступать, например, при определении рН физиологических сред, изменяющихся в достаточно широком интервале (таблица 16).

Таблица 16 - Величина рН некоторых физиологических жидкостей.

Физиологическая жидкость	рН
Желудочный сок	0,9 – 2,0
Артериальная кровь	7,35 – 7,45
Кровь (плазма)	7,25 – 7,44
Моча	5,0 – 6,5
Пот	4,2 – 7,8
Слезная жидкость	7,6 – 7,8
Слюна	5,6 – 7,9
Сок поджелудочной железы	8,6 – 9,0
Сок тонкого кишечника	5,07 – 7,07

Потенциометрическое титрование. Метод основан на осуществлении титрования с потенциометрическим контролем за ходом реакции. Выбор

конкретного индикаторного электрода зависит от используемой для титриметрического определения реакции:

- Кислотно-основное взаимодействие – стеклянный электрод ($\text{H}^+ + \text{OH}^- = \text{H}_2\text{O}$);
- реакции окисления-восстановления: Pt электрод ($\text{Fe}^{2+} + \text{Cr}_2\text{O}_7^{2-} + 14\text{H}^+ = \text{Fe}^{3+} + 2\text{Cr}^{3+} + 7\text{H}_2\text{O}$);
- реакции осаждения – электроды 1-го рода, ИСЭ ($\text{Cl}^- + \text{Ag}^+ = \text{AgCl}\downarrow$);
- реакции комплексообразования – ИСЭ ($\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{Y}^{2-}(\text{ЭДТА}) = \text{CuY}^- + 2\text{H}^+$).

Измерение потенциала индикаторного электроды выполняют после добавления каждой небольшой порции титранта. По результатам титрования строят кривую титрования, которая имеет билогарифмическую форму (см примеры на рисунок 24). Конечную точку титрования на ней находят по скачку титрования. Если скачок выражен слабо, то построение ее в координатах первая (вторая) производная – ν помогает решить проблему (рисунок 24).

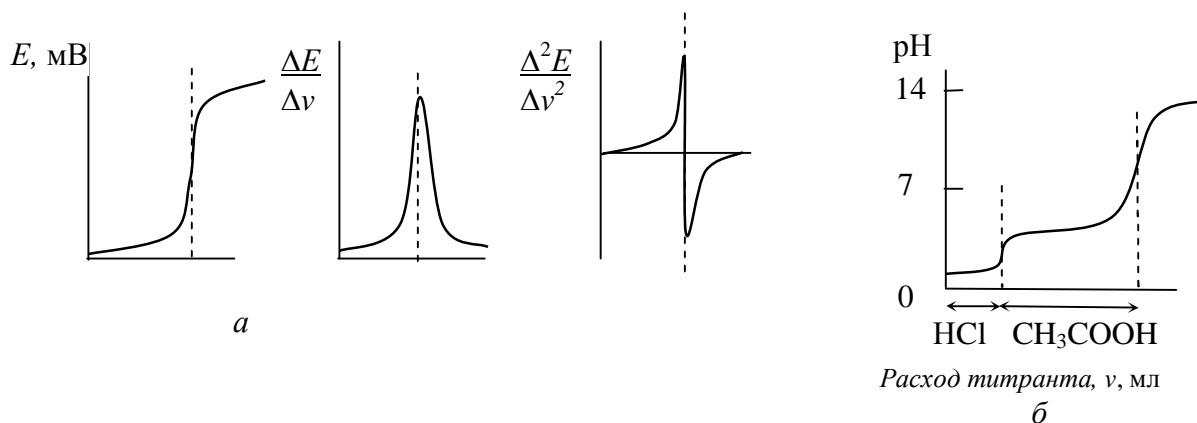


Рисунок 24 - Примеры способов нахождения конечной точки (а) и кривая титрования смеси HCl + CH₃COOH раствором NaOH (б) (Конечной точке титрования отвечает пересечение пунктирной линии с осью «расход титранта»)

Метод имеет ряд преимуществ перед прямой потенциометрией и титриметрией с визуальными индикаторами. В отличие от прямой потенциометрии и ионометрии здесь отсутствуют погрешности за счет диффузионного потенциала и, кроме того, меньше случайные погрешности. Преимущества по сравнению с

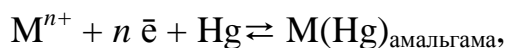
визуальной титриметрией состоят в исключении субъективных погрешностей при установлении конечной точки, в возможности анализа некоторых смесей веществ, когда на кривой титрования имеется несколько скачков, чаще всего двух, что иллюстрирует рис. 24 б.

7.3 Вольтамперометрия

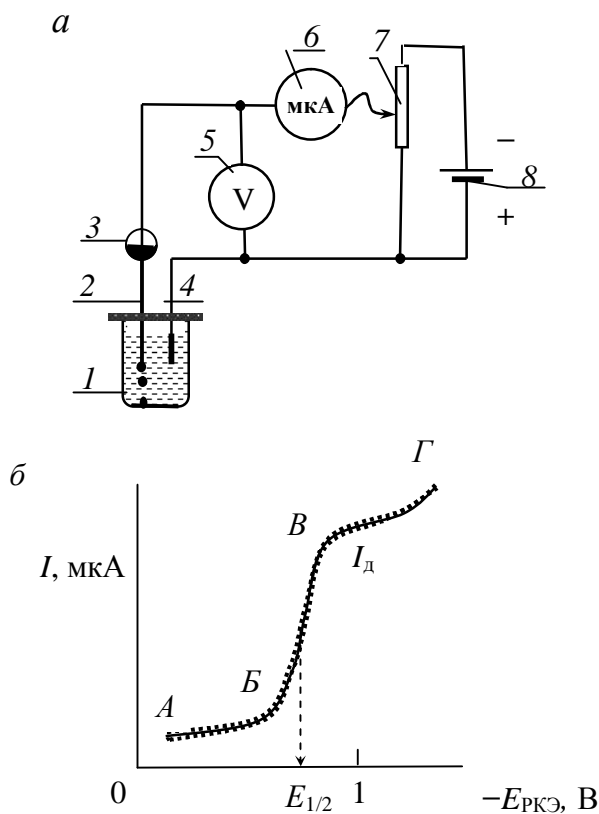
Метода анализа, основанные на расшифровке поляризационных кривых - вольтамперограмм, которые снимают в электролитической ячейке с поляризующимся индикаторным электродом и неполяризующимся электродом сравнения. Это позволяет одновременно извлекать из них качественную и количественную информацию о природе и концентрации веществ, восстанавливающихся или окисляющихся на электроде-деполяризаторе.

Полярография на ртутном капающем электроде. Схема полярографического эксперимента и характер получающейся при этом типичной вольтамперограммы (полярографической кривой, вольт-амперной кривой, полярограммы) приведены на рисунок 25. Подчеркнем, что применение именно ртутного капающего электрода (РКЭ) обеспечивает хорошую воспроизводимость поверхности капли и ее постоянное обновление, что, в свою очередь, гарантирует воспроизводимость полярограмм. Кроме того, именно высокое перенапряжение водорода ртути позволяет работать в широкой области потенциалов от +0,25 В до минус 1,8 В в кислых и до минус 2,3 В в щелочных растворах. Это открывает широкие практические возможности для классической полярографии при определении электрохимически активных ионов металлов, способных к электровосстановлению в этих условиях. Получающуюся вольтамперную кривую можно прокомментировать следующим образом. На пологом участке *A-B* через ячейку протекает так называемый остаточный ток, так как здесь на поверхности капли образуется двойной электрический слой – электрод поляризуется. Компонентой остаточного тока является емкостной ток, расходующийся на поляризацию электрода. При потенциалах, больших отвечающих точке *Б*, начинается процесс

электровосстановления ионов металла, образовавшиеся атомы растворяются в ртути с образованием амальгам:



и ток начинает резко увеличиваться (участок $B - B$).



1 – электрохимическая ячейка, содержащая ионы восстанавливаемого металла M^{n+} и фоновый электролит;

2 – капилляр ртутного капающего электрода (РКЭ) 3;

3 – ртутный капающий электрод;

4 – электрод сравнения;

5 – вольтметр;

6 – микроамперметр;

7 – потенциометр;

8 – источник постоянного тока;

Фоновый электролит, обычно KCl. Растворенный кислород удален продувкой азотом.

Рисунок 25 - Схема полярографических измерений на ртутном капающем катоде (а) и вид полярограммы (б)

Величина тока контролируется диффузией M^{n+} из раствора к поверхности ртутной капли, поэтому его называют диффузионным. Точке B отвечает предельный диффузионный ток. Новый намечающийся рост тока в области после точки Γ обусловлен новой электрохимической реакцией, начинающейся при более отрицательных потенциалах электрода. Описанная картина наблюдается на каждой новой капле ртути, поэтому полярограмма, называемая также полярографической волной, всегда имеет вид осциллирующей кривой. Отметим, что ток, расходуемый на целевую электрохимическую реакцию называют фарадеевским.

Полученная кривая несет информацию о природе и концентрации M^{n+} . Первой при оговоренных условиях эксперимента отвечает потенциал полуволны $E_{1/2}$. Если в растворе имеется несколько ионов металла и их $E_{1/2}$ различаются более, чем на 150 мВ, на полярограмме регистрируется соответствующее число полярографических волн, что определяет аналитическую избирательность метода. Функцией концентрации является величина предельного диффузионного тока I_d , определяемая уравнением Ильковича:

$$I_d = k c,$$

где k – константа Ильковича, равная произведению постоянных в эксперименте параметров:

$$k = 607 n D^{1/2} m^{2/3} t^{1/6},$$

где D – коэффициент диффузии;

m – скорость вытекания ртути;

t – время жизни капли ртути.

Таким образом, работая по уравнению Ильковича, можно по градуировочной зависимости найти концентрацию искомого металла. Стандартными объектами определения являются ионы металлов, восстанавливающиеся на ртутном катоде: Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} и т.п. Возможности классической полярографии ограничены концентрациями $\sim 10^{-5}$ М, препятствием для их понижения является остаточный ток. Поэтому существуют различные варианты ее усовершенствования и их много. Далее рассмотрены некоторые наиболее важные, обеспечивающие увеличение соотношения фарадеевский ток – емкостной ток.

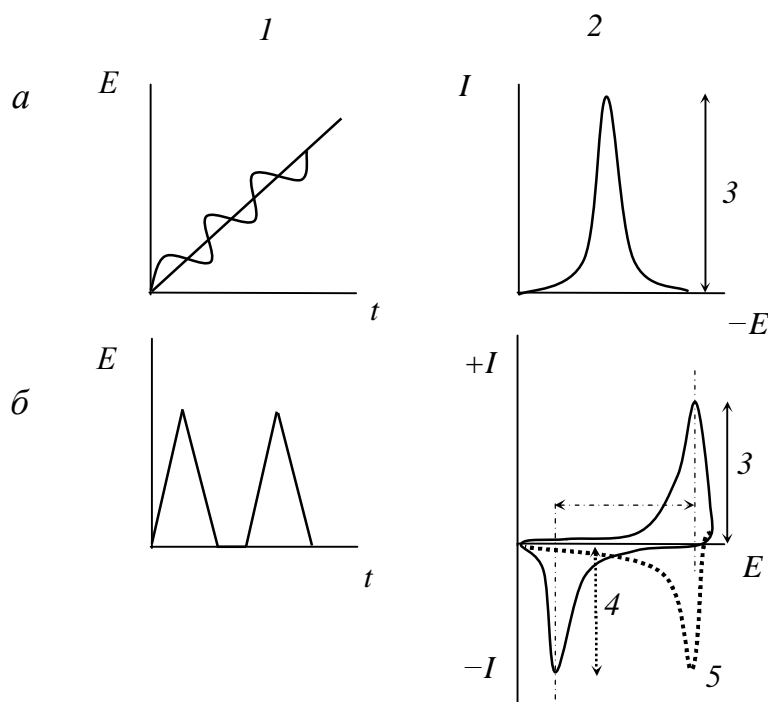
Переменнотоковая полярография. Схему эксперимента в переменнотоковой полярографии иллюстрирует рисунок 26. В методе синусоидальной переменнотоковой полярографии на поляризующее напряжение, прилагаемое к ячейке (развертка потенциала), является суммой постоянного (прямая линия на рисунок 26, а, 1) и синусоидального (волнистая линия там же). При этом через ячейку протекает и постоянный и переменный ток. С помощью устройства, называемого фазовым детектором, измеряется только переменный ток. Его возникновение объясняется периодическими изменениями концентрации восстановленной и окисленной форм иона-деполяризатора как раз за счет наложенного переменного напряжения. Поэтому зависимость тока от прилагаемого напряжения приобретает вид кривой с максимумом при потенциале, отвечающем потенциалу полуволны в классической полярографии (рисунке 26 а, 2). Высота пика пропорциональна концентрации. Ясно, что наилучшие результаты получаются для обратимых систем. В этом случае можно определить до $5 \cdot 10^{-7}$ М металла, обладающего полярографической активностью.

Осциллографическая полярография. В методе используют высокоскоростную линейную развертку потенциала (0,1 – 1 В/с), изменяющегося по линейному закону, что иллюстрирует рисунок 26 б, 1. Это позволяет зарегистрировать всю полярограмму за время жизни одной капли ртути в виде кривой с максимумом катодного тока 3 (рис. 26 б, 2).

Причина появления максимума – в быстроте развертки потенциала, когда диффузия за ним не успевает. Высота пика при этом будет больше, чем предельный ток в классической полярографии, а чувствительность лучше: $\sim 10^{-6}$ М. Зависимость тока пика от скорости развертки потенциала передает уравнение Рэндлса-Шевчика.

При треугольной развертке потенциала во время его спада и возвращения к исходной величине можно зарегистрировать циклическую полярограмму, т.е. еще и анодный пик 4. Развертку потенциала осуществляют настолько быстро, что за изменением ее и высоты пика следят с помощью электронного осциллографа, отсюда и название метода – осциллополярография. Метод позволяет судить об обратимости электрохимического процесса на электроде. Так, если пика катодного и

анодного токов существенно сдвинуты один относительно другого 4 – процесс необратим. Если же расстояние между ординатами пиков мало, например ситуация 5, – имеет место обратимая электрохимическая реакция. Таким образом, осциллополярграфия – мощный инструмент исследования электрохимических реакций.



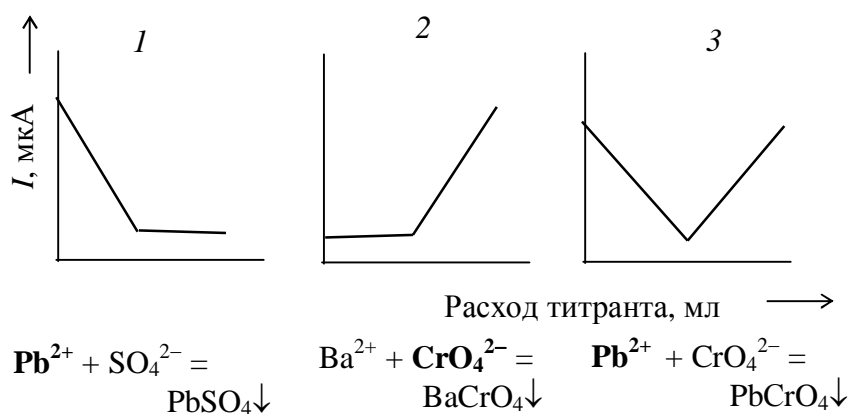
- 1 – схема развертки потенциала;
- 2 – регистрируемая полярограмма;
- 3 – катодный диффузионный ток;
- 4 – анодный диффузионный ток;
- 5 – анодный пик в случае обратимого процесса.

Рисунок 26 - Принцип синусоидальной переменноточковой полярографии (а) и осциллополярграфии с треугольной разверткой потенциала (б)

Инверсионная полярография (вольтамперометрия). В методе используют предварительной концентрирование определяемого вещества на поверхности индикаторного электрода, например капли ртути. Электролиз проводят при потенциале предельного тока при перемешивании раствора в течение определенного непродолжительного времени. Далее перемешивание прекращают, включают анодную развертку потенциала и регистрируют пик анодного растворения

сконцентрированного в амальгаме металла. Особенность метода – возможность определения до 10^{-9} - 10^{-10} М Pb, Cu, Cd, Zn и др.

Амперометрическое титрование. Метод основан на измерении величины предельного диффузионного тока в процессе титрования. Так как этот ток по уравнению Ильковича связан с концентрацией электрохимически активного компонента, можно зарегистрировать линейные кривые различного типа, а конечную точку на них находить интерполяцией линейных участков кривых до пересечения. Метод отличается экспериментальной простотой (не нужно регистрировать всю вольтамперограмму) и определенными аналитическими возможностями при определении различных веществ, в том числе и не обладающих электрохимической активностью. Отсюда следует разнообразие возможных кривых титрования, примеры которых приведены на рисунке 27. Перед титрованием индикаторный электрод поляризуют напряжением, отвечающем предельному диффузионному току.



Электроактивностью обладает:

- 1 – определяемое вещество;
- 2 – титрант;
- 3 – определяемое вещество и титрант.

Рисунок 27 - Примеры возможных кривых амперометрического титрования в различных системах

7.4 Кулонометрия и кулонометрическое титрование

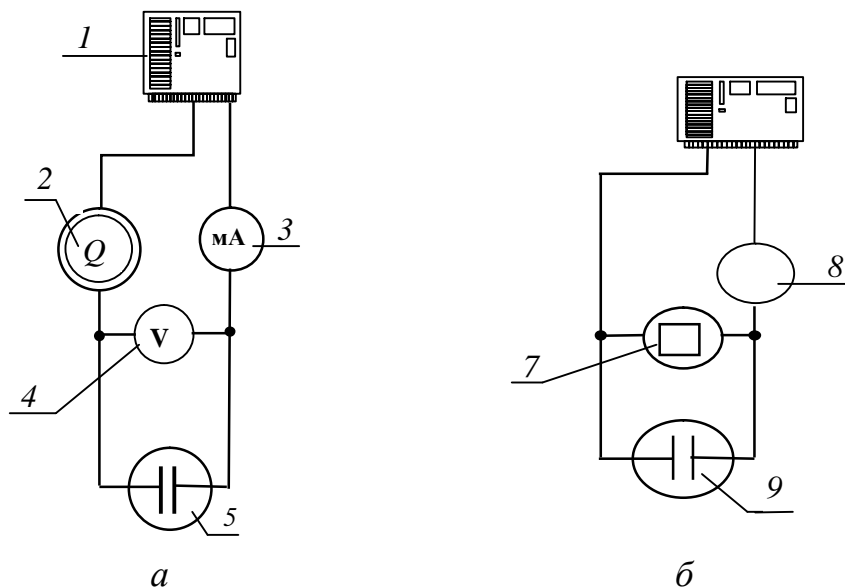
Кулонометрические методы анализа основаны на измерении количества электричества, потребовавшегося для полного 100 %-ного превращения электрохимически активного вещества. Здесь электрохимическая реакция приводит к полному исчерпанию вещества за счет его электролиза. Таким образом, в основе кулонометрических методов лежат законы Фарадея. Согласно ним, количество электропревращенного вещества прямо пропорционально количеству израсходованного электричества, и для выделения 1 моля любого вещества необходимо затратить одно и то же количество электричества, называемое числом Фарадея:

$$F = \frac{Q \cdot M}{m \cdot n},$$

где Q – количество электричества, необходимое для выделения на электроде m граммов вещества с молярной массой эквивалента, равной M/n (M – молярная масса определяемого вещества, n – число электронов, участвующих в электродной реакции). Количество электричества равно произведению тока I на время t : $Q = I \cdot t$.

Количественный электролиз можно проводить при поддерживаемом постоянным напряжении или токе. Соответственно различают потенциостатическую и гальваностатическую кулонометрию, схемы этих экспериментов приведены на рисунок 28.

Потенциостатическая кулонометрия. Принципиальное значение имеет правильный выбор рабочего потенциала электрода, поскольку необходимо исключить протекание конкурирующих реакций и обеспечить 100 %-ный выход по току. Это делают, используя поляризационные кривые всех необходимых систем. В процессе электролиза при постоянном потенциале ток уменьшается. Электролиз проводят до достижения величины остаточного тока. Если ориентируются на погрешность ~ 1 %, то электролиз проводят до стократного уменьшения начального тока.



- 1 – потенциостат;
- 2 – кулонометр;
- 3, 8 – миллиамперметр;
- 4, 7 – вольтметр;
- 5, 9 – кулонометрическая ячейка.

Рисунок 28 - Схема эксперимента в потенциостатической (а) и гальваностатической (б) кулонометрии

Для погрешности в 0,1 % – за остаточный ток принимают ток, в 1000 раз меньший начального. Количество затраченного электричества определяют как

площадь под кривой изменения тока от времени: $Q = \int_{t_0}^{t_{\text{г}}} I \partial t$ с помощью соответствующих приемов.

Гальваностатическая кулонометрия. Метод применяют редко. Для его использования определяемый металл должен быть предварительно выделен на катоде, поэтому его применяют для определения толщины металлических покрытий, например из серебра. Как только все серебро будет удалено с электрода, произойдет скачок потенциала из-за смены электродной реакции, указывающий на окончание процесса растворения металла: $M \rightarrow M^+$.

Кулонометрическое титрование. Метод основан на генерации титранта, вступающего в аналитическую реакцию с определяемым веществом, с помощью электролиза. Генерацию его электролизом ведут при условиях, гарантирующих

100%-ный выход по току, когда весь затраченный ток расходуется только на эту одну реакцию. Это – гальваностатический режим электролиза и большой избыток вспомогательного вещества, из которого генерируют титрант. Способ установления конечной точки может быть любым – от индикаторного до подходящего физико-химического, например, потенциометрического, спектрофотометрического, амперометрического и т.п. Примеры электрогенерации титрантов и область их применения систематизированы в таблице 17. Видно, что метод позволяет определять вещества, обладающие и не обладающие электроактивными свойствами. В методе нет проблем с приготовлением и стандартизацией титранта, здесь первичные стандарты просто не нужны. Результат титрования находят, умножая величину тока при электролизе на его время до достижения конечной точки. Современная техника позволяет измерять ток и время с высокой точностью, поэтому кулонометрическое титрование является одним из наиболее точных методов анализа: погрешности до 0,1 % отн. могут быть гарантированы.

Таблица 17 - Примеры кулонометрического титрования

Титрант	Вспомогательный реагент	Реакция на генераторном электроде	Определяемые вещества
Кислотно-основное титрование			
OH^-	H_2O	$2\text{H}_2\text{O} + 2 \bar{e} \rightleftharpoons 2\text{OH}^- + \text{H}_2$	Кислоты
H^+	H_2O	$\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons 2\text{H}^+ + \frac{1}{2}\text{O}_2 + 2 \bar{e}$	Основания
Титрованием методом осаждения			
Ag^+	Ag-анод	$\text{Ag} \rightleftharpoons \text{Ag}^+ + \bar{e}$	Cl^- , Br^- , I^-
Окислительно-восстановительное титрование			
Mn^{3+}	MnSO_4	$\text{Mn}^{2+} \rightleftharpoons \text{Mn}^{3+} + \bar{e}$	Fe(II) , $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$
Br_2	Br^-	$\text{Br}_2 + 2 \bar{e} \rightleftharpoons 2\text{Br}^-$	As(III) , I^- , фенолы
I_2	I^-	$2\text{I}^- \rightleftharpoons \text{I}_2 + 2\bar{e}$	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, As(III)

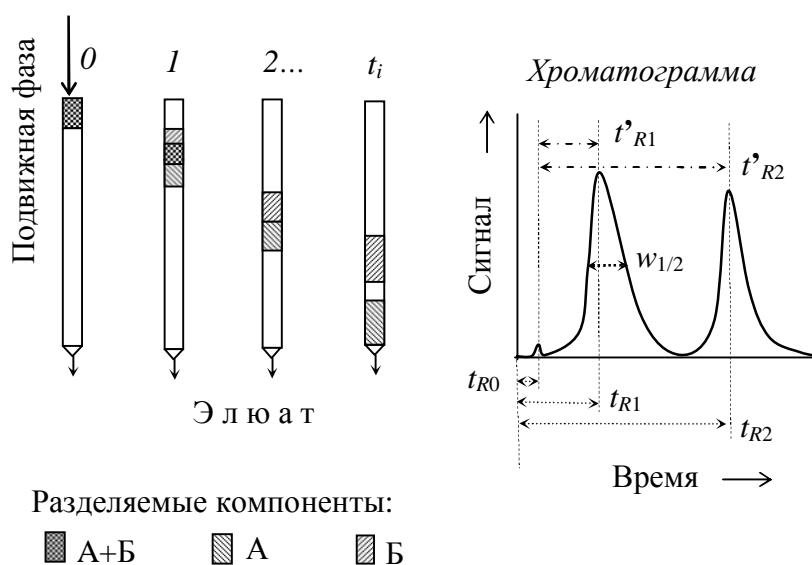
8 Хроматографические методы анализа

Хроматографические методы анализа (ХМА) предназначены для анализа смесей веществ путем их разделения. ХМА – совокупность динамических сорбционных методов анализа, основанных на различии в скоростях передвижения компонентов разделяемых смесей, перемещающихся вместе с подвижной фазой (элюент) вдоль слоя неподвижной фазы (сорбент). Различие в распределении компонентов между двумя указанными фазами – необходимое условие их хроматографического разделения. Исходя из геометрии слоя неподвижной фазы, различают колоночную и тонкослойную хроматографию. Подвижной фазой в хроматографии может быть газ, жидкость или – новейший вариант – сверхкритический флюид. Неподвижная фаза – это твердое, часто мелкопористое вещество, представляющее собой сорбент с большой поверхностью или тонкую пленку жидкости, нанесенную на твердый носитель. В тонкослойной хроматографии неподвижная фаза (тонкий слой сорбента) нанесена на прямоугольную пластину. Во все еще широко используемой бумажной хроматографии специально обработанную хроматографическую бумагу используют как подложку и пропитывают растворителем. Подвижной фазой здесь является растворитель или их смесь, а разделение осуществляется за счет неодинакового распределения компонентов смеси между растворителем в порах бумаги и вне ее, т.е. это вариант жидкость – жидкостной хроматографии. Наибольшее практическое значение приобрели газо-жидкостная хроматография (ГЖХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), другие виды жидкостной хроматографии – тонкослойная, бумажная и ионная хроматография.

Схема хроматографического разделения в наиболее часто используемом, колоночном. варианте показана на рисунке 28. С другой стороны хроматографическую пластину можно рассматривать как своеобразный «разрез» колонки, когда тот же процесс разделения осуществляется в плоскостной хроматографической системе. В любой хроматографической системе всегда есть неподвижная и подвижная фаза, т.е. ХМА – сорбционно-динамический метод

разделения смесей. Сам факт разделения объясняется тем, что различные вещества по-разному взаимодействуют с подвижной и неподвижной фазами, что и является причиной хроматографического разделения. Важнейшим параметром здесь является коэффициент распределения D , равный отношению концентрации веществ в неподвижной c_s (индекс от английского *stationary*) и в подвижной фазах c_m (индекс от английского *mobile*):

$$D = c_s / c_m.$$



t_{R0} – время удерживания несорбируемого компонента;
 t_{R1} , t_{R2} – времена удерживания 1-го и 2-го компонентов;
 t'_{R1} , t'_{R2} – исправленные времена удерживания 1-го и 2-го компонентов;
 $w_{1/2}$ – полуширина пика, измеренная на половине его высоты;
 А, Б – разделяемые компоненты, имеющие разные времена удерживания и поэтому в различное время достигающие детектора.

Рисунок 28 - Схема хроматографического разделения и параметры хроматограммы

В процессе хроматографического разделения подвижная фаза движется вдоль неподвижной, как это показано на рисунке 28. Поскольку коэффициенты распределения D_i разделяемых компонентов различны, то каждый из них движется вдоль колонки с различной скоростью, т.е. по-разному удерживаются в хроматографической системе. Это характеризуют с помощью важнейшего параметра в хроматографии – времени удерживания, которое обозначают t_{Ri} , где i – номер определяемого компонента. Результатом ХМА является хроматограмма (рис.

28), представляющая собой запись сигнала детектора, т.е. какой-либо величины, пропорционально связанной с концентрацией компонента, в зависимости от времени хроматографирования или объема подвижной фазы, прошедшей через детектор. Из рисунка 28 видно, что каждый компонент может быть охарактеризован своим временем удерживания t_{Ri} , которое можно найти по хроматограмме. Величина t_{Ri} зависит от природы определяемого компонента как вещества при постоянстве других параметров системы (сорбент, размеры колонки, скорость подвижной фазы). Для идентификации веществ при этих условиях используют исправленные времена удерживания $t'_{Ri} = t_{Ri} - t_{R0}$ (рисунке 28).

Эффективность хроматографического разделения характеризуют критерием разделения R_S (разрешением):

$$R_S = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_{1/2(2)} + w_{1/2(1)}},$$

где $w_{1/2(2)}$ и $w_{1/2(1)}$ - полуширина 2-го и 1-го пиков.

В качестве детекторов используют или физические (например, катарометр – детектор по теплопроводности в ГЖХ), или спектроскопические (например, измерение поглощения при заданной длине волны в ВЭЖХ), или электрохимические устройства (в жидкостной хроматографии). Известны и другие детекторы, часто называемые селективными. Количественное содержание каждого компонента анализируемой смеси в ХМА рассчитывают, исходя из площади его пика или, что чаще и проще, из высоты пика – величин пропорциональных концентрации.

Разделенные в результате хроматографирования компоненты смеси далее уже последовательно поступают в детектор, дающий соответствующий отклик на концентрацию компонента в подвижной фазе в момент прохождения ею детектора. Соответствующая стадия хроматографического процесса называется элюированием.

Таким образом, в хроматографической системе, в сущности, совмещены процесс разделения и определения компонентов, такие методы предложено называть гибридными.

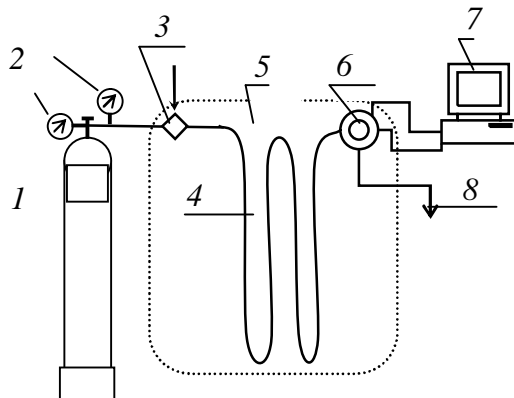
Для разделения смесей катионов или анионов за счет их различного сродства к ионообменникам эффективна ионная хроматография, осуществляемая с помощью катионо- и анионообменников с малой обменной емкостью. Для разделения смесей веществ с различными размерами молекул (например, мономер и полимер) применяют гель-проникающую хроматографию. В ней разделение происходит за счет неодинакового распределения молекул веществ между растворителем, находящимся внутри пор полимерного геля – сефадекса, и вне его.

В теории хроматографического разделения уделяют внимание достижению наилучшего разрешения пиков, используя для этого разные подходы – термодинамический, теорию теоретических тарелок, кинетическую теорию, что выходит за рамки данного учебного пособия. Цель этих теорий – объяснение размывания (несимметричного уширения) хроматографических пиков, ухудшающего эффективность их разрешения. Теория теоретических тарелок позволяет сравнивать эффективность различных хроматографических систем и дает удобный критерий. Теория предполагает всю колонку состоящей из неких воображаемых теоретических тарелок. При хроматографировании каждая тарелка отвечает однократному распределению вещества между подвижной и неподвижной фазами. Следовательно, чем больше теоретических тарелок в системе (N), тем лучше хроматографическое разделение. Если длину колонки L разделить на число теоретических тарелок, то можно получить другой важнейший параметр – высоту, эквивалентную одной теоретической колонке (ВЭТТ): $ВЭТТ = L / N$. Отсюда следует важный вывод: хроматографическая система тем эффективнее, чем больше N и чем меньше ВЭТТ. Эти параметры позволяют объективно сравнивать эффективность хроматографического разделения в различных видах хроматографии и на различных колонках, что особенно удобно на практике.

8.1 Газо-жидкостная хроматография

Метод применяют для качественного и количественного анализа сложных смесей газов, жидких веществ и некоторых твердых легколетучих веществ. Схема

эксперимента приведена на рисунке 29. Пробу вводят в испаритель. Далее пары пробы подхватываются подвижной фазой – газом-носителем – и поступают в хроматографическую колонку необходимой длины.



- 1 – баллон с газом-носителем (He);
- 2 – манометры;
- 3 – устройство ввода пробы;
- 4 – колонка;
- 5 – термостат;
- 6 – детектор;
- 7 – регистратор;
- 8 – сброс;

Рисунок 29 - Схема газо-жидкостного хроматографа

В ГЖХ подвижная фаза – газ, неподвижная – мало летучая жидкость, нанесенная на твердый носитель. Если неподвижная фаза нанесена на внутреннюю поверхность достаточно длинного капилляра, то говорят о капиллярной ГЖХ. В качестве детекторов чаще всего используют детектор по теплопроводности, пламенно-ионизационный, реже детектор электронного захвата и некоторые другие. В ГЖХ по временам удерживания рассчитывают более универсальные параметры, не зависящие от особенностей конкретного эксперимента – индексы удерживания. Иногда удается нелетучие соединения путем предварительной химической обработки превратить в летучие и далее отправить на анализ в хроматограф ГЖХ. Такой процесс называют дериватизацией. Например, так можно осуществить разделение смеси аминокислот, если предварительно перевести их в летучие N-ацетильные эфиры.

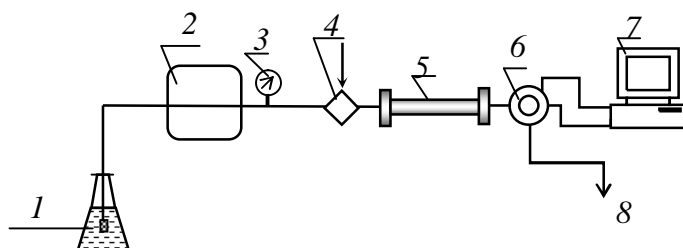
ГЖХ – современный мощный аналитический инструмент. Его широко используют при анализе смесей углеводородов, органических кислот, спиртов, кетонов и т.д.), в нефтехимии (анализ и идентификация бензинов), в анализе пестицидов, лекарственных препаратов и других физиологически активных веществ. Особенной аналитической силой отличается сочетание ГЖХ с ИК-спектрометрией и масс-спектрометрией. Хромато-масс-спектрометрия – мощный инструмент хроматографического анализа. Этот способ незаменим при анализе сложных смесей и определении очень малых количеств органических соединений, например экотоксикантов, в различных объектах. Известны гибридные методы, в которых сочетают термический анализ, изучающий разрушение вещества при нагревании, с ГЖХ и масс-спектрометрией. Они оказываются очень удобными при анализе смесей продуктов пиролиза и расшифровки структуры различных материалов, например биологических, полимерных и композиционных. Смеси термически неустойчивых соединений можно анализировать, используя разновидность газовой хроматографии – сверхкритическую флюидную хроматографию. В ней в качестве подвижной фазы используют вещества, способные при высоких давлениях и повышенной температуре находиться в сверхкритическом состоянии. Это диоксид углерода, диэтиловый эфир и некоторые другие соединения.

8.2 Высокоэффективная жидкостная хроматография

Метод позволяет выполнять качественный количественный анализ сложных смесей разнообразных жидких и твердых веществ. Более того отдельные компоненты могут быть выделены в чистом виде для дальнейшего исследования и использования, это – препаративная хроматография. В жидкостной хроматографии подвижная фаза – жидкость, неподвижная – твердое вещество. Если подвижная фаза неполярная (например, гексан), а неподвижная полярная (например, силикагель), говорят о нормально фазовом режиме (НФХ), что позволяет разделять смеси неполярных веществ. Напротив, при неполярной неподвижной фазе (например, модифицированный силикагель с привитыми углеводородными группами) и

полярной подвижной (вода, ее смесь с ацетонитрилом) говорят об обратном фазовом варианте жидкостной хроматографии (ОФХ). Этот способ позволяет разделять смеси любых – в смысле полярности - веществ. Разделение достигается ввиду различного удерживания каждого компонента анализируемой смеси неподвижной фазой, вследствие чего они элюируются подвижной фазой в различное время. Важное значение имеет правильный выбор неподвижной и, особенно, подвижной фазы. Схема эксперимента приведена на рисунке 30.

В жидкостной хроматографии, если неподвижная твердая фаза или носитель имеют частицы с размером до 2 – 5 мкм, эффективность разделения на небольших колонках длиной 10–18 см возрастает настолько сильно, что говорят о высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В колонках ВЭЖХ число теоретических тарелок достигает 10000, в то время как в ГЖХ речь идет только о сотнях на колонках, длиной 1,5–2 м.



- 1 – сосуд с подвижной фазой;
- 2 – насос;
- 3 – манометр;
- 4 - устройство ввода пробы;
- 5 – колонка;
- 6 – детектор;
- 7 – регистратор;
- 8 – слив.

Рисунок 30 - Схема хроматографа для ВЭЖХ

Гидравлическое сопротивление таких колонок велико, поэтому подвижную фазу подают в колонку с помощью насоса высокого давления. В отличие от ГЖХ в ВЭЖХ можно анализировать смеси любых органических веществ, растворимых в

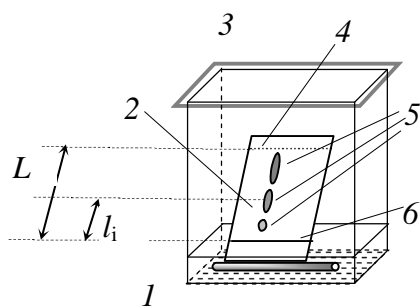
подвижной фазе, прежде всего нелетучих веществ, например водорастворимых и жирорастворимых витаминов, нуклеозидов, гормонов, полиядерных углеводов и многих др., поскольку можно гибко варьировать состав подвижной жидкой фазы, подбирать неподвижные фазы, модифицировать их и достигать желаемой эффективности разделения. В ВЭЖЗ применяют различные чувствительные к разделяемым веществам детекторы. Стандартный детектор – спектрофотометрический в УФ области. При отсутствии хорошего поглощения в этой области спектра используют рефрактометрический, пламенно-ионизационный, флуориметрический и др. детекторы.

8.3 Тонкослойная и распределительная хроматография

Эти способы жидкостной хроматографии сходны по технике выполнения работ, схему которой иллюстрирует рисунок 31. В тонкослойной хроматографии (ТСХ) слой сорбента тонким равномерным слоем нанесен на поддерживающую подложку. В простейшем случае – это тонкая стеклянная пластинка, что, очевидно, не очень удобно. На хроматографических платинах типа «силуфол» слой твердого адсорбента, например оксида алюминия, силикагеля, закреплен на тонкой алюминиевой пластине. В ТСХ может быть реализована адсорбционная и распределительная хроматография. В последнем случае слой сорбента используют в качестве носителя неподвижной жидкой фазы.

В методе бумажной распределительной хроматографии (БХ) в качестве носителя неподвижной фазы, например воды, используют специальную хроматографическую бумагу. В ТСХ и БХ в качестве подвижной жидкой фазы используют различные растворители, их смеси, органические и неорганические кислоты.

Разделяемые компоненты образуют на пластине или полоске хроматографической бумаги отдельные слегка вытянутые по ходу растворителя зоны, называемые пятнами. Причина этого – явление размывания хроматографических зон, связанное с нелинейностью изотермы распределения.



- 1 – сосуд с подвижной фазой;
 2 – пластина с сорбентом;
 3 – крышка;
 4 – линия фронта растворителя;
 5 – хроматографические зоны;
 6 – линия старта;
 L – путь, пройденный растворителем;
 l_i – путь, пройденный пятном компонента i .

$$R_f = L/l_i$$

Рисунок 31 - Схема эксперимента в тонкослойной хроматографии

В практической работе их форму принимают близкой к эллиптической. Положение пятен на хроматограмме, естественно зависящее от их удерживания, характеризуется величиной R_f (см рисунке 31). Величина R_f зависит от природы носителя, состава и природы растворителя, техники эксперимента и, конечно, от природы разделяемых компонентов. Если на хроматограмме образуются окрашенные пятна, выполняют визуальные наблюдения. Бесцветные пятна проявляют, обрабатывая их реактивами, дающими цветные реакции. Например, после разделения смеси бесцветных аминокислот хроматограмму обрабатывают раствором нингидрина в ацетоне, образующего с каждой из аминокислот окрашенные сине-фиолетовые соединения. Для количественного определения можно вымыть пятно из слоя сорбента и определить количество компонента спектрофотометрическим в этом примере, или, в общем случае, также флуориметрическим, атомно-абсорбционным и др. методом. Можно найти количество компонента непосредственно по площади пятна, или по интенсивности

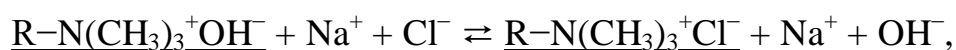
поглощения или отражения с помощью фотоденситометров. ТСХ и БХ применяют для анализа смесей неорганических и органических веществ. Привлекательной является простота выполнения определений, отличающаяся, однако, длительностью и трудоемкостью.

8.4 Ионная хроматография

Метод позволяет анализировать смеси различных катионов и анионов. В основе метода лежит явление обмена ионов, находящихся в растворе, с противоионами, связанными с полимерной матрицей неподвижной фазы. Для осуществления этого химического процесса используют ионообменники (иониты). Ионообменники, способные к обмену катионами, называют катионообменниками. Классический пример катионообменника – катионит КУ-2, представляющий собой сульфированный полистирол (условно $\underline{R}-\text{SO}_3^-\text{H}^+$, где \underline{R} означает полимерную матрицу). Пример анионообменника – полистирольная матрица, с которой связаны группы четвертичного аммониевого основания: $\underline{R}-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{X}^-$, где X^- – противоанион. Существуют и другие иониты, с иными ионообменными группами и матрицами. Естественно, все эти полимеры в воде нерастворимы. Но их активные группы гидрофильны и имеют различное сродство к ионам, находящимся в растворе. Вследствие этого оказываются возможными обратимые гетерогенные химические реакции ионного обмена – катионный обмен на катионообменниках, например H^+ на Na^+ :



и анионный обмен на анионообменниках, например OH^- на Cl^- в NaCl :

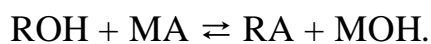


или в кратком виде: $\underline{R}-\text{OH} + \text{NaCl} \rightleftharpoons \underline{R}-\text{Cl} + \text{NaOH}$.

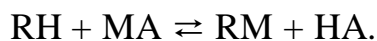
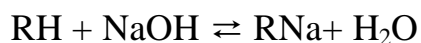
Различные ионы имеют разную способность к этим реакциям и образуют по эффективности взаимодействия некую последовательность, называемую рядами селективности. В ионной хроматографии используют поверхностно-пористые

иониты, отличающиеся небольшой обменной емкостью и малым временем установления равновесия. Это важно, поскольку ионообменное разделение в ионном хроматографе – «ионообменно-динамический» процесс. Схема эксперимента в ионной хроматографии приведена на рисунок 32. В основе двухколоночного метода – элюентное ионообменное разделение катионов или анионов в разделяющей колонке 4, заполненной ионообменником малой емкости; подавление фонового сигнала в подавляющей колонке, заполненной ионообменником с высокой емкостью; кондуктометрическое детектирование ионов после разделения.

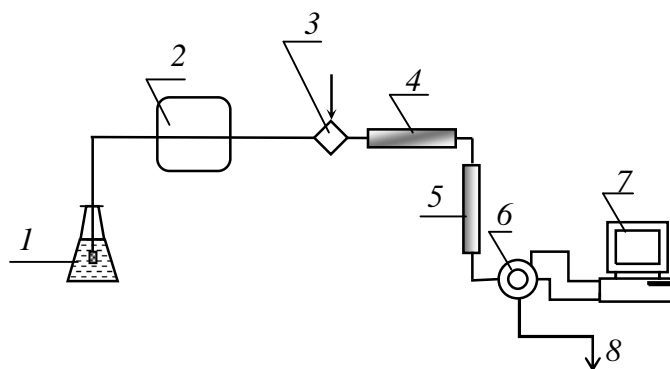
Пробу, содержащую смесь ионов, например, анионов A^- , вводят в поток деионизованной воды. В разделяющей колонке 4 (заполненной анионообменником в OH^- -форме) эти ионы сорбируются в различных частях колонки за счет их неодинакового сродства к анионообменнику – разделяются – и удерживаются в ней:



Элюирование их далее осуществляется разбавленным раствором $NaOH$ (или $NaHCO_3$). В подавляющей колонке, заполненной катионообменником большой емкости в H^+ -форме, катионы образца и элюента обмениваются на противоионы катионообменника, в результате чего элюент преобразуется в воду, а разделенные анионы детектируются в виде соответствующих сильных кислот:



Последовательное поступление зон соответствующих сильных кислот в кондуктометрический детектор позволяет зарегистрировать соответствующую хроматограмму. Анализ смесей катионов выполняется подобно рассмотренному с использованием катионообменника низкой емкости для разделения и анионообменника высокой емкости в подавляющей колонке, а в качестве элюента разбавленного раствора HNO_3 . Достижимые в методе пределы обнаружения – доли $\mu\text{кг}$ в мл .



- 1 – сосуд с элюентом;
- 2 – насос;
- 3 – устройство ввода пробы;
- 4 – разделяющая колонка;
- 5 – подавляющая колонка;
- 6 – детектор (кондуктометрический);
- 7 – регистратор;
- 8 – слив.

Рисунок 32 - Схема ионного хроматографа

9 Автоматизация анализа растворов

Автоматизация методов анализа – одно из важнейших направлений современной аналитической химии. Потребность в ней вызвана необходимостью выполнения большого числа анализов при контроле в производстве, при мониторинге окружающей среды, в медицине и биологии, в пищевой промышленности, агрохимии, в медико-биологических и иных исследованиях. Автоматизированные системы анализа должны включать пробоотбор, пробоподготовку, измерение сигнала, его обработку и сопоставление с имеющейся базой данных. Поскольку данных приходится обрабатывать много, очень удобно использовать соответствующую микропроцессорную технику: в современных приборах компьютер составляет часть прибора.

Автоматические методы химического анализа используют современную идеологию и средства аналитической и микропроцессорной техники. Развитие автоматических методов анализа стимулируется повышением надежности и экономичности анализа при уменьшении его стоимости, оперативностью получения большого объема точной аналитической информации.

Такие приборы должны быть пригодны, подчеркнем еще раз, для автоматического выполнения важнейших стадий аналитического определения – отбор пробы, перевод ее в форму, удобную для проведения анализа – в раствор, проведение аналитической реакции, измерение количества продукта этой реакции. Существуют два подхода к автоматизации аналитических определений в растворах. Реализуя первый, стремятся создать автоматический анализатор, который бы полностью или частично выполнял бы обычные аналитические работы. Это сложно и дорого. Можно поступить проще и сконструировать прибор, автоматически выполняющий только одну важнейшую аналитическую операцию – собственно измерительную, например титрование. Соответствующие приборы называют титраторами. Разработано большое число систем, автоматизирующих процесс титрования. Такой прибор (титратор) производит процесс титрования, отображает кривую титрования на дисплее, рассчитывает результаты определения, сохраняет их в памяти компьютера и т.д. Конечно, эти приборы хороши, но оказываемые ими услуги не всегда отвечают оптимизму рекламирующих их фирм.

Более удачным оказался второй, принципиально иной подход, основанный на идее непрерывного анализа. Здесь анализируемый раствор непрерывно перемещается с помощью перистальтического насоса по жидкостным коммуникациям прибора – чаще всего это просто система узких пластиковых трубок. При этом к нему добавляются необходимые реактивы и сама аналитическая реакция протекает в потоке. Определение концентрации продукта аналитической реакции – это аналитический сигнал – осуществляется непрерывно с помощью детектора, когда участок потока с продуктом реакции проходит его. Этого сигнала регистрируется прибором в виде пика. В этом случае наиболее просто достигаются условия, обеспечивающие воспроизводимость проведения аналитических реакций и

измерений. Этот способ оказался очень удобным, простым и эффективным. Разумеется, способ сочетается с автоматическим пробоотборником – устройством, позволяющим автоматически отбирать жидкие пробы, осуществлять их смену и направление в анализатор.

Еще более удачным оказался метод непрерывного анализа, предложенный в 1974 г. Ружичкой и Хансеном и названный ими проточно-инжекционным (flow injection analysis), схема осуществления которого приведена на рисунке 33. Проба, инжектированная в поток реагента, вступает с ним в реакцию и образует например окрашенный продукт реакции, регистрируемый далее детектором в виде аналитического сигнала – пика. В ПИА чаще всего используют спектрофотометрические детекторы, производительность до 200 – 300 проб в час. Перечисленные ниже ценные особенности ПИА отличают его от других аналитических методов:

- быстрота выполнения, химики-аналитики говорят "экспрессность" и, следовательно, экономия рабочего времени, так как отпадает необходимость в выполнении вручную длительных рутинных аналитических операций, связанных с разбавлением растворов, добавлением реагентов, с работой на аналитических приборах;

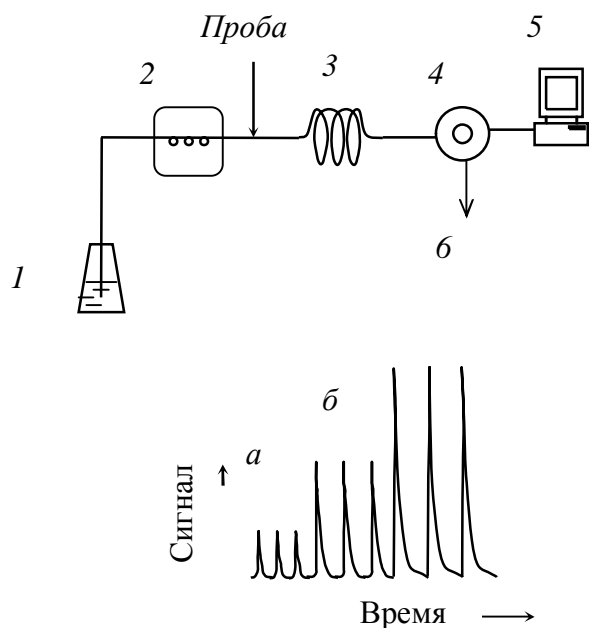
- высокая воспроизводимость измерений и, следовательно, надежность результатов анализа;

- осуществление химико-аналитических реакций в закрытой в техническом смысле слова проточной системе в отсутствие контакта с токсичными веществами и с атмосферой;

- возможность использования неустойчивых реагентов, генерирования их непосредственно в потоке;

- экономия дорогостоящих аналитических реагентов, на анализ каждой пробы расходуется от 100 до 300 мкл раствора реагента;

- большая гибкость в создании новых схем автоматического анализа;
 возможность использования различных параметров пика – высоты, площади,
 ширины - для определения концентрации.



- 1 – раствор реагента
 - 2 – перистальтический насос
 - 3 – смесительная спираль
 - 4 – проточная кювета спектрофотометрического детектора
 - 5 – регистратор
 - б – слив
- Внизу – вид регистрируемых пиков.
 а – ввод стандартов
 б – пробы

Рисунок 33 - Схема проточно-инжекционного анализа и пример регистрируемых пиков

Способ широко применяют при выполнении биохимических исследований, в экологической химии, гидрохимии и гидрогеологии и др. областях, где требуется высокая произвольность.

10 Информационная эффективность методов анализа и их общая оценка

С общей точки зрения конечная цель выполнения любого аналитического определения или анализа – это получение интересующей потребителя информации об этом объекте. Эта категория может трактоваться очень широко, поскольку именно такая информация служит основой для принятия ответственных решений самого различного масштаба. С другой стороны для получения такой информации каждый метод анализа должен предоставлять исполнителю или вообще потребителю информации результаты анализа строго определенного качества. Согласно современной идеологии в этой области качество результата определения должно быть оценено с точки зрения его погрешностей и, подчеркнем, должно быть охарактеризована и надежность, качество этой самой погрешности. Поэтому, согласно разработкам в этой области, принципиальнейшие из которых ныне присутствуют в соответствующих нормативных документах, необходимо учитывать следующие параметры качества в химическом анализе, важнейшие из которых рассматривались ранее:

- качество пробы – подобие пробы и объекта;
- качество пробоотбора;
- предел обнаружения (+ предел определения);
- чувствительность;
- селективность и специфичность;
- линейная область градуировочной зависимости;
- точность;
- прецизионность в условиях воспроизводимости и сходимости;
- смещение. Правильность. Мера правильности;
- робастность – устойчивость результатов к небольшим колебаниям внешних условий;
- затраты. Стоимость;
- информация.

Уместно упомянуть здесь и о юридической стороне вопроса. Так, контроль за содержанием токсичных элементов в пищевых продуктах основан на контроле их соответствия нормативов СанПиН, исследовательская медицина опирается на большой массив экспериментальных данных, полученных с помощью аттестованных или хорошо проработанных методик в аккредитованных лабораториях, оснащенных современным оборудованием. Соблюдение нормативов химического анализа, заложенных в ГОСТ Р ИСО 5725-(1-6)-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений» является обязательным.

В зависимости от конкретной ситуации оценки и значение этих параметров могут приобрести характер своеобразных лингвистических переменных, которые в принципе также могут быть охарактеризованы математически. Поэтому возникает заманчивая идея свести все многообразие к какому-то одному интегрирующему показателю, по-видимому, желательно в численной мере. В зависимости от поставленной аналитической задачи эффективность метода анализа может быть описана различными параметрами. Общий интерес представляют такие параметры, как время, необходимое для выполнения анализа, точность получаемых результатов и разрешающая способность метода. Современная хемометрика – пограничная область науки, вовлекающая в себя статистику, аналитическую химию, методы современной, в том числе и вычислительной математики. Аппарат хемометрики позволяет подойти к решению проблемы с точки зрения теории информации, исходя из уравнения Шеннона. Так, в качественном анализе возможны только *два* вывода – компонент присутствует – отсутствует. Для этого случая максимальное получаемое количество информации $H_{\text{макс}} = \log_2 2 = 1$ составит 1 бит (от binary digit – двоичная единица измерения количества информации по Шеннону). В количественном анализе учитывают конкретные особенности метода анализа, например, время выполнения определения, разрешающую способность метода, рабочий диапазон измеряемых концентраций и др. Поэтому объем информации I в битах –, предоставляемой методом анализа, может быть оценен по следующей более сложной формуле:

$$I = \frac{t}{t_A} \frac{z_{\max} - z_{\min}}{\Delta z_{1/2}} \log_2 \frac{(x_{\max} - x_{\min}) \sqrt{n_A}}{s_x \sqrt{2\pi e}} \text{ бит},$$

где t – имеющееся в распоряжении аналитика время;

t_A – время, необходимое для выполнения анализа данным методом (при n_A параллельных);

z_{\max}, z_{\min} – диапазон измеряемых свойств;

$z_{1/2}$ – полуширина сигнала;

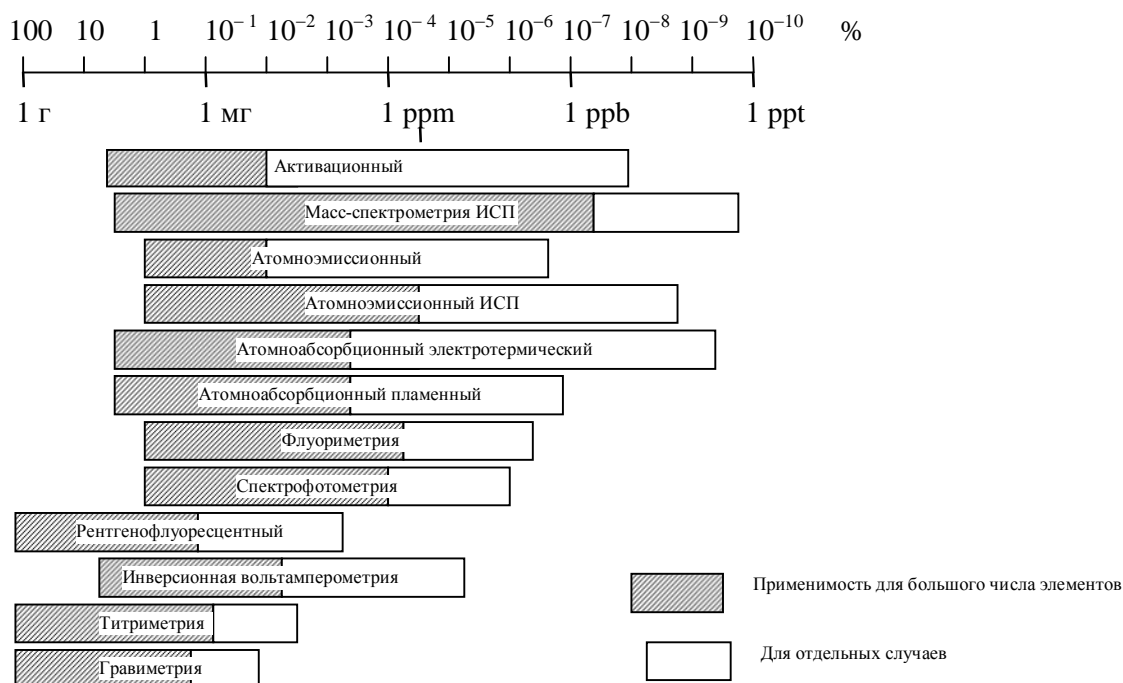
x_{\max}, x_{\min} – интервал измеряемых концентраций; s_x – случайная погрешность;

\log_2 – двоичный логарифм.

Таким образом, если качественный анализ способен предоставить только 1 бит информации, то химические методы – один – два десятка бит информации, атомный эмиссионный анализ и рентгеновская спектрометрия – уже сотни бит, а масс-спектрометрия – тысячи бит. Это объясняется тем, что в современных приборах очень велики диапазон измеряемых сигналов и диапазон измеряемых содержаний – до 5 – 6, а точность очень хороша. При всесторонней оценке метода анализа немалую роль играет и стоимость, которая складывается из всех действительных затрат (амортизация аппаратуры, стоимость материалов, энергии, заработная плата и т.д.). Поэтому отношение количества полученной информации к затратам может характеризовать рентабельность метода анализа.

Области применения важнейших методов анализа и определения схематично сопоставлены на рисунке 34. Видно, что с точки зрения рассмотренного информационного подхода большему диапазону определяемых содержаний при прочих равных условиях и отвечает большая информационная эффективность метода. Видно также, что физико-химические методы анализа имеют принципиально более низкие пределы обнаружения и несравненно более эффективны, чем классические химические методы анализа – гравиметрия и титриметрия. Избыточная с точки зрения химика-аналитика информационная мощь таких методов как атомно-эмиссионный анализ с ИСП и масс-спектрометрия с ИСП, по-видимому, в медицинской элементологии имеет очевидные преимущества при

единовременном выполнении сравнительных исследований по большому числу элементов.



Рисунке 34 - Области применения важнейших методов анализа

11 Актуальные вопросы методологии определения содержания химических элементов в биообразцах

За последние 50 лет мировой наукой накоплены многочисленные данные об элементном составе различных биологических тканей и жидкостей. К сожалению, к большинству из полученных в различных лабораториях за такое продолжительное время результатов следует относиться с большой осторожностью (Ewers U., Brockhaus A., 1987). Это обусловлено, помимо несоблюдения рядом исследователей рутинных требований к проведению исследований и собственно к технологии анализа, большими погрешностями при сборе биоматериала, его хранении, проподготовке, а также анализе (например, так называемые матричные эффекты). В итоге, разброс приводимых в литературе данных о содержании многих химических элементов огромен. Например: для сывороточного марганца фактор разброса равен

64 (от 0,54 до 34,3 нг/мл), молибдена – 443 (от 0,58 до 257 нг/мл), а для хрома – почти 6000 (от 0,14 до 782 нг/мл) [5]. При этом следует отметить, что с развитием аналитических методов определяемые количества многих химических элементов (Ag, Al, As, Cr, Cs, Co, Hg, Mn, Mo, Ni, Sb, Sn, V) существенно снижаются, в некоторых случаях на порядки [29]. Более или менее сопоставимые данные получены в различных лабораториях при определении макроэлементов, а также Fe, Zn, Cu, Se [28]. Поэтому валидность (истинность) получаемых результатов должна подтверждаться одновременным анализом другим независимым методом, анализом сертифицированных стандартных референтных материалов (образцов) и/или межлабораторным контролем. Согласно современным требованиям, все исследования должны проводиться в аккредитованных лабораториях, в которых условия выполнения анализов, особенно в случае определения микро- и ультрамикроэлементов, соответствуют критериям “Good Laboratory Practice” (GLP).

Помимо внешних факторов, на результаты анализов влияют внутренние (физиологические, метаболические) факторы – время забора образцов, особенно жидких биосубстратов, возраст, пол, состояние здоровья, курение, алкоголизм, профессиональные вредности, климато-географические условия проживания и состояние окружающей среды, уровень жизни и связанное с ним качество питания, уровень медицинского обслуживания. Исходя из вышеизложенного, для получения сопоставимых результатов необходимо, кроме обеспечения аналитической точности, учитывать многие параметры, отражающие текущее состояние организма и условия окружающей и производственной сферы.

Очевидно, что современные методы анализа требуют от персонала специального базового химико-биологического образования, и не могут быть качественно выполнены в типичных отечественных клинических лабораториях врачами-лаборантами.

На современном этапе развития науки изучение биологической роли макро- и микроэлементов является междисциплинарным направлением, и для его успешного продвижения требуются новые организационные подходы.

Например: корректное определение содержания микроэлементов в нейтрофилах, тромбоцитах, клетках буккального эпителия, являющихся одними из лучших показателей элементного статуса [26], возможно только при наличии в исследовательском коллективе врача-«интерпретатора» (т.е., специалиста по клиническому применению результатов этих анализов), химика-аналитика, физика (при использовании физических методов анализа), биолога (биохимика), владеющих современными методами математической обработки полученных данных.

К сожалению, абсолютное большинство полученных до настоящего времени в СССР, РФ и странах СНГ данных об элементном составе различных биообъектов из-за несоблюдения вышеуказанных методических требований несопоставимо при их анализе и обобщении. Это не позволяет получить реальное представление о биологической роли макро- и микроэлементов, распространенности заболеваний, связанных с нарушением их поступления или обмена, получить достоверные научные данные, принять адекватные решения и провести экологические, профилактические и оздоровительные мероприятия как на федеральном, так и на региональных уровнях.

11.1 Факторы, предшествующие забору проб, и их влияние на их элементный состав биообразцов

Существует целый ряд биологически обусловленных факторов, которые могут влиять на уровень химических элементов в биообразцах.

Во-первых, к ним следует отнести генетические факторы [15], биологические ритмы, профессии, влияние среды обитания, сезона и климата [10], а также ряд физиологических факторов (пол, возраст, наличие беременности, лактация, менопауза – у женщин) [15]. Например, сезонные колебания в содержании химических элементов в волосах у жителей Европейской части России могут достигать 50 %.

Во-вторых, имеют большое значение эмоциональное и физическое состояние на момент проведения исследования (например: в спортивной медицине, у лиц

опасных профессий и др., в экспериментах на животных), посмертные изменения при заборе аутопсийного материала (имбибиция, отечность, аутолиз), внутренние факторы и артефакты (гемолиз, обусловленный стрессом, перераспределением жидкости в организме и др.).

В-третьих, на результат анализа могут существенно влиять эндогенное «загрязнение» вследствие приема медикаментов, нутрицевтиков, парентерального питания, соблюдения специальных диет и потребления специфических пищевых продуктов в больших количествах, наличие имплантатов, пломб (амальгама) и т. д.

Прижизненное получение образцов тканей и внутренних органов для элементного анализа возможно в ходе выполнения оперативного вмешательства или при взятии биопсии. В первом случае можно достичь минимального загрязнения образца и точно отобрать необходимый образец под визуальным контролем, что выгодно отличает этот прием от биопсии [37]. Однако, операционный стресс, анестезия, кровопотери, неизбежные в процессе операции, существенно изменяют элементный состав тканей и органов. После наступления смерти в организме отсутствуют естественные механизмы гомеостатической регуляции, что приводит к значительному перераспределению элементов между органами и тканями, не говоря о (как правило) предшествовавших смерти кровопотери, шоке, травмах [16].

Поэтому для корректной интерпретации в дальнейшем полученных аналитических данных необходимо скрупулезно фиксировать дату забора образца, состояние и условия, в которых находился человек или животное, до и во время отбора образца, а также собрать все доступные сведения об объеме исследования, которые могут быть полезны при обсуждении его результатов.

11.2 Влияние внешних факторов на элементный состав биообразцов

Загрязнение (контаминация). Загрязнение образцов, особенно при определении ультрамикроэлементов, является большой проблемой, которая часто приводит к фальсификации результатов очень многих исследований, причем до такой степени, что делает их проведение бессмысленным [23]. Загрязнение образца

может произойти на любом этапе исследования: вследствие контакта образца с приспособлениями и инструментами забора, сосудами и другими емкостями, тарой для сбора и хранения образца, воздухом в помещении или атмосферным (пыль, влажность), химическими реактивами, лабораторными инструментами и комбинации других различных рисков [18]. Существует обратная связь между «ценой» ошибки определения химических элементов, обусловленная внешним загрязнением и его содержанием в анализе. Поэтому, в первую очередь ошибки при анализе биообъектов встречаются в случаях с такими микроэлементами как Cr, Al, Ti, Mn, Ag, V, Co, Si, Sn. Например: с ЭДТА как антикоагулянтом в кровь попадают 1,2 нг/мл Zn, и 0,2 нг/мл Cr, что несущественно для первого и не приемлемо для определения второго микроэлемента.

Потери. В связи с тем, что в биомедицинских исследованиях в основном применяются так называемые «разрушающие» биообразец методы анализа, перед определением элементного состава производятся разложение (минерализация), растворение, «сплавление», образцов с помощью различных физических методов и химических реактивов. В ходе этих манипуляций возникают риски потерь определенных количеств химических элементов, вследствие улетучивания (испарения), адсорбции, абсорбции на поверхностях инструментов и контейнеров, распыления, разбрызгивания, адсорбции на поверхностях, образования нерастворимых твердых частиц и т.д.

Наиболее опасными в плане потерь ХЭ способами пробоподготовки биообъектов являются так называемое «сухое» озоление (dry ashing – англ.), то есть высушивание и выпаривание до сухого состояния под воздействием высоких температур. Летучесть элементов зависит от формы их нахождения в образцах и может быть очень значительной (особенно в случаях с I, As, Se, Hg). В настоящее время в России и многих других странах исследователи продолжают широко применять «сухое» озоление (по существу сжигание образцов, помещенных в фарфоровые или платиновые тигли, в муфельных печах, при температурах от 450 °С до 800 °С в течение 6-24 часов) [1]. Однако, согласно рекомендациям ВОЗ (1996) и ряда авторитетных ученых, от этого способа минерализации следует отказаться, так

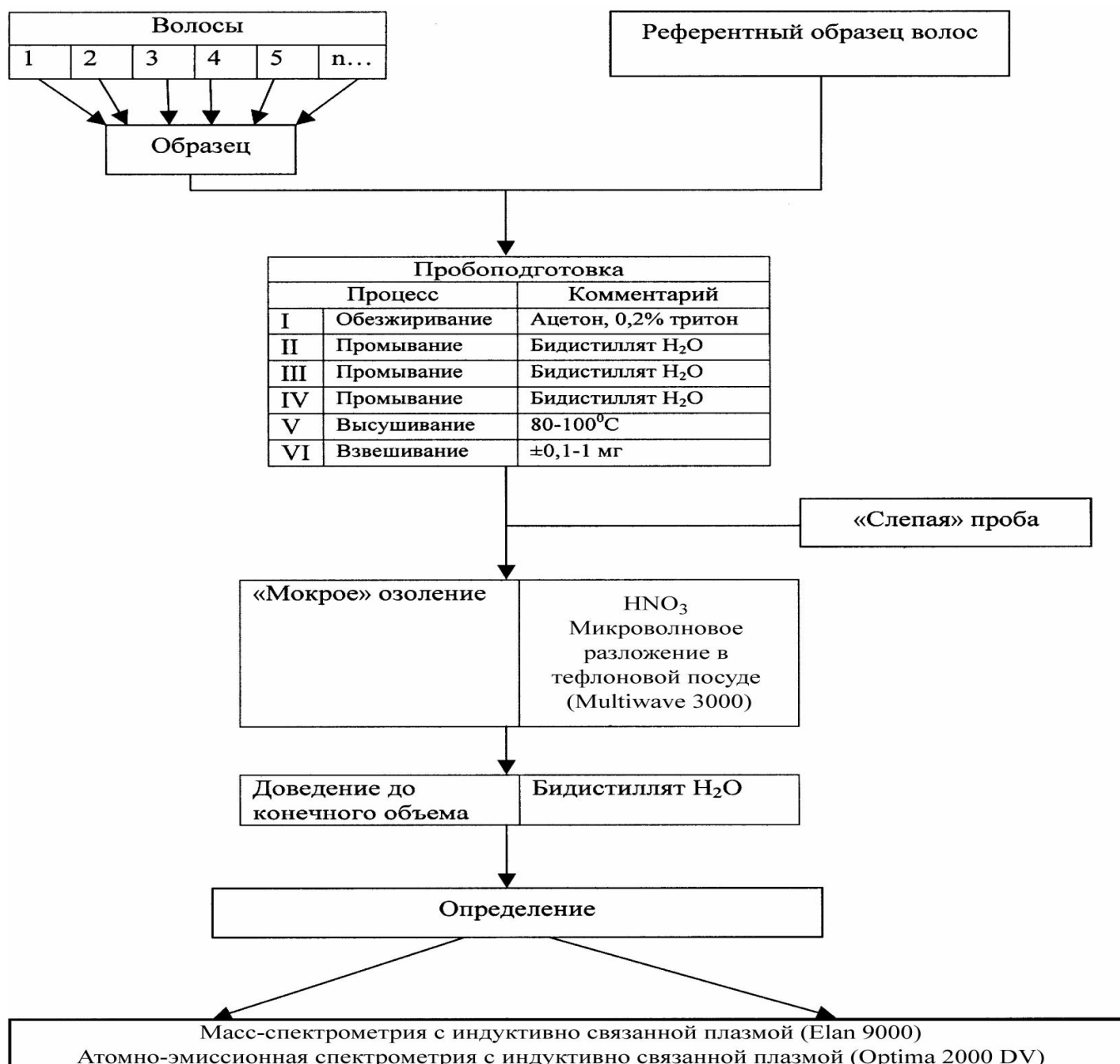
как невозможно избежать больших потерь ХЭ, а также загрязнения в ходе проведения этой процедуры, – когда используются металлические инструменты, возможен контакт с внутренней поверхностью муфельной печи и т.д. Так, при сухом озолении цельной крови теряются от 9 до 16 % стронция, от 4 до 51 % хрома, от 35 до 86 % мышьяка; печени – 26 % алюминия, 14 % кобальта, 6 % хрома [2].

Даже высушивание образцов при 80-120° С в течение 24-72 часов может привести к существенной потере из мочи таких «летучих» элементов как Se (12 - 30 % при $t = 80$ °С, 30-50 % при $t = 110$ °С, 60 - 65 % при $t = 120$ °С), Hg (3 % при $t = 80$ °С и 15 % при $t = 110$ °С), I (4 % при 110 °С и 7 % при 120 °С) (Elemental analysis, 1980).

В условиях высушивания замораживанием (24-48 часов, давление 1,3 - 6,7 Па) также возможны потери микроэлементов (5 % Se, 2 % Hg и I в моче; 3 % Hg в мышцах; 39 % Hg в воде; 20 Hg в рыбе; при этом потерь Mn не наблюдалось).

Т.н. «мокрое» озоление (wet ashing – англ.) биообразцов, которое проводится с помощью кислот (обычно HNO₃ с добавлением H₂O₂) при подогреве и/или под воздействием повышенного давления в «открытых» или «закрытых» системах разложения более безопасно в плане потерь ХЭ [15].

На рисунке 35 представлена схема одного из современных способов анализа биообразцов с предварительной «мокрой» минерализацией с применением системы микроволнового разложения [10]. Естественно, необходимо стремиться использовать «закрытые» системы разложения, чтобы уменьшить риск возможных потерь ХЭ в ходе минерализации, так как особенно хлориды As³⁺; Sb³⁺; Sn⁴⁺; Ge⁴⁺ и Hg²⁺ летучие, что может приводить к потерям указанных элементов при образовании хлоридов, возможном при использовании содержащих хлор кислот. Во время «мокрого» озоления в открытых системах возможны также потери бора.



Рисунке 35 - Схема системы мультиэлементного анализа

На рисунке 36 представлено устройство для микроволнового разложения образцов.



Рисунок 36 - Система микроволнового разложения образцов

Одной из главных проблем, влияющих на содержание ХЭ в биообразцах при «мокрой» минерализации, является вероятность неполного разложения, в результате чего «нелетучие» элементы могут не извлекаться полностью из биообъекта (например Cr, Fe, Sr или Mn), оставаться связанными с нерастворившейся частью органической матрицы [23]. Причем эти «потери» ХЭ могут быть значительными (от нескольких до десятков процентов, в зависимости от элемента и вида образца). При кислотном разложении биообразцов (волосы, печень, мышцы) в открытой системе мы [15] также отмечали в анализах остаточные нерастворимые образования в которых была повышена концентрация ряда ХЭ. Поскольку они не могли

поступить в пробу и подвергнуться анализу, то это влияло на конечный результат определения элементного состава.

Отмечено, что богатые серой матрицы (волосы, печень, кожа, ногти) могут ухудшать переход в раствор таких элементов как Hg и Cu, что естественно отражается на точности их количественного определения. На элементный состав образцов могут также оказать влияние условия хранения и «консервации». Естественно, контейнеры для хранения биообразцов должны быть чистыми (желательно, одноразового использования, полученные в неповрежденной упаковке), не подвергаться контаминации при длительном использовании и желательно без добавления каких-либо консервантов, антикоагулянтов, пигментов и т.п.), которые могут привести к контаминации химическими элементами.

В настоящее время получены данные о том, что популярная в медицине фиксация образцов формалином существенно влияет на элементный состав. Так, концентрации As, Cd, Mg, Rb и Sb, определенные методом ИСП-МС в формалине, в котором в течение нескольких лет хранили образцы тканей мозга, были более чем в 100 раз выше по сравнению со свежим формалином, тогда как концентрации Zn, Fe и Cu отличались в 20 раз, а Cr и Ni были сопоставимы в формалине до и после хранения образцов. Установлена прямая зависимость между концентрацией микроэлементов в формалине и сроком хранения проб. В связи с этим, исследователи рекомендуют использовать для анализа свежие или замороженные ткани.

Важно отметить значение полимерных материалов, из которых произведены контейнеры. Так, полиэтиленовые пробирки могут использоваться в течение многих лет без риска загрязнения образцов входящими в их состав ХЭ, если температура хранения не очень низкая (это имеет большое значение при хранении, например, порошков референтных образцов). В случае низкотемпературного хранения образцов рекомендуется использовать изделия из политетрафторэтилена (например, в случае замораживания образцов крови, мочи, которые могут храниться до 10 лет при температуре – от 18 °С до 20 °С).

11.3 Обеспечение качества анализа

Обеспечение качества анализа заключается в проведении контроля качества и поддержании стандартов качества.

Контроль качества подразумевает проведение процедур по установлению контрольных ошибок (погрешностей), тогда как оценка качества является процессом верификации того, что аналитическая система работает в приемлемых границах (допусках). Обеспечение внутреннего и внешнего контроля качества имеет ключевое значение для определения удовлетворительности уровня проводимых в любой лаборатории исследований.

Стандарты качества зависят от конечных целей исследования и, естественно, должны удовлетворять его целям и требованиям. Например, при сертификации референтных материалов требуется очень высокий стандарт качества (допускается около 1% погрешность), тогда как при проведении скрининговых исследований в гигиене, например, достаточна умеренная точность (от $\pm 10\%$ до 25%). В целом, для большинства биообразцов вполне удовлетворительной является погрешность в пределах от 5% до 10% .

В качестве примера может быть приведено одно из наших недавних исследований по определению элементного состава цельной крови (Skalny A.V. et al., 2004). Установлено что применение комплекса методов ИСП-АЭС и ИСП-МС позволяет получить очень надежные данные по концентрации таких элементов, как Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, P, Rb, Sr и Zn (погрешность до 10%), удовлетворительно по Ga, Ge, I, Li, Mn, Pb и Se (погрешность до 20%) при одновременном анализе.

В любом случае, прежде чем проводить масштабное лабораторное исследование, следует на ограниченном количестве образцов убедиться в достижимости поставленных целей с помощью тех методологических приемов, приборов и инструментов, которые предполагается использовать.

Важнейшим условием для получения качественных аналитических данных является использование стандартных референтных материалов (образцов) (CRM-certified или SRM или standard reference materials). К сожалению, публикуемые в

нашей стране научные статьи редко содержат ссылки на проведение этой стандартной процедуры. Из этого следует, что только единичные лаборатории соответствуют современным требованиям и представляют более или менее сопоставимые результаты. Поэтому на 1-й и 2-й международных конференциях «Биоэлементы» было принято решение шире внедрять в лабораторную практику использование CRM и SRM.

В настоящее время в мире существует несколько основных производителей SRM, из которых стоит выделить МАГАТЭ, Бюро референтных материалов ЕЭС (Бельгия), Национальный институт стандартов и технологий США (NIST), Национальный институт экологических исследований (Япония), фирму «СЕРОНОРМ» (Германия), институт ядерной физики Академии наук КНР. Основное достоинство использования SRM заключается в нивелировании влияния матриц биообразцов на результаты исследований, в исключении влияния погрешностей процедуры анализа на конечный результат.

Конечно же, желательно использовать при анализе каждого из объектов соответствующий эталон (например, при анализе сыворотки референтный образец «сыворотки крови человека», при анализе печени – SRM «печень быка» и т.д.). Как указывают специалисты МАГАТЭ и ВОЗ (TE in HNH, 1998), в идеальном случае необходимо использовать как минимум 2 референтных стандарта с различными паспортизированными уровнями содержания ХЭ.

Кроме т.н. SRM высшего качества (primary standards), можно использовать т.н. вторичные (secondary) референтные материалы которые изготавливаются самостоятельно в лаборатории, где планируют проведение исследования, особенно в тех случаях, когда соответствующего SRM не существует или он недоступен. Однако в этом случае необходима высокая степень надежности полученного SRM и ответственности исследователей.

Ниже (таблицы 18 - 20) приведено несколько примеров использования SRM в практике испытательного центра АНО «ЦБМ» [10].

Таблица 18 - Сравнение данных, полученных в лаборатории АНО “ЦБМ”, с международными стандартными образцами, используемые для проверки правильности и воспроизводимости при анализе волос (GBW09101, человеческие волосы, Национальное бюро стандартных образцов, Пекин, Китай)

Элемент	Метод анализа	Среднее, мг/кг	SD	RSD, %	Среднее, мг/ кг	SD
		Данные измерения			Паспортное значение	
Al	ИСП-АЭС	13,63	0,96	7,04	13,3	2,3
As	ИСП-МС	0,71	0,03	4,2	0,59	0,07
Be	ИСП-МС	0,0034	0,0013	38,2	-	-
Ca	ИСП-АЭС	899,17	55,23	6,14	1090	72
Cd	ИСП-МС	0,076	0,004	5,26	0,095	0,012
Co	ИСП-МС	0,12	0,01	8,33	0,135	0,008
Cr	ИСП-МС	3,05	0,64	20,98	4,77	0,38
Cu	ИСП-МС	23,30	3,31	14,2	23	1,4
Fe	ИСП-АЭС	68,37	3,87	5,66	71,2	6,6
Hg	ИСП-МС	1,38	0,18	13,04	2,16	0,21
K	ИСП-АЭС	5,83	2,16	37	11,8	-
Li	ИСП-МС	0,009	0,003	33,3	-	-
Mg	ИСП-АЭС	109,38	35,19	32,17	105	6
Mn	ИСП-МС	2,62	0,29	11,07	2,94	0,2
Na	ИСП-АЭС	253,52	65,23	25,72	266	12
Ni	ИСП-МС	2,59	0,36	13,9	3,17	0,4
P	ИСП-АЭС	152,40	12,60	8,28	184	-
Pb	ИСП-МС	7,42	0,36	4,85	7,2	0,7
Se	ИСП-МС	0,68	0,07	10,3	0,58	0,05
Si	ИСП-АЭС	3,77	2,23	59,15	-	-
Sn	ИСП-МС	0,32	0,02	6,25	-	-
Ti	ИСП-МС	1,16	0,36	31,03	-	-
V	ИСП-МС	0,07	0,01	14,28	-	-
Zn	ИСП-АЭС	187,55	9,01	4,8	189	8

Таблица 19 - Сравнение данных, полученных в лаборатории АНО “ЦБМ”, с международными стандартными образцами, используемые для проверки правильности и воспроизводимости при анализе мочи (стандарт на мочу серии ClinChek, Recipe chemicals + instruments, Munchen, Germany)

Стандарт	Элемент	Среднее, мкг/мл	SD	RSD, %	Среднее, мкг/мл	Диапазон, мкг/мл	
						от	до
	Данные измерения				Паспортное значение		
Level I ClinChek	Al	0,087	0,05	54,80	0,088	0,066	0,11
	As	0,037	0,006	15,76	0,034	0,026	0,042
	Be	0,0018	0,0013	70,72	3E-05	1E-05	4E-05
	Cd	0,0072	0,0007	10,10	0,0088	0,007	0,0106
	Co	0,0045	0,0004	9,94	0,0055	0,0041	0,0069
	Cr	0,011	0,0017	15,45	0,01	0,0082	0,0118
	Cu	0,051	0,0112	21,96	0,056	0,046	0,066
	Fe	0,031	0,004	12,90	0,039	0,029	0,049
	Hg	0,0042	0,0003	7,14	0,0039	0,0026	0,0052
	Mn	0,0054	0,0008	14,26	0,0056	0,0042	0,007
	Ni	0,0082	0,003	35,50	0,01	0,0074	0,0126
	Pb	0,024	0,0025	10,68	0,027	0,021	0,033
	Se	0,026	0,005	20,36	0,023	0,016	0,03
	Tl	0,0028	0,0004	15,74	0,0035	0,0026	0,0044
	V	0,018	0,0062	34,44	0,019	0,014	0,024
	Zn	0,17	0,038	22,52	0,21	0,16	0,26
Level II ClinChek	Al	0,158	0,047	29,75	0,148	0,116	0,18
	As	0,066	0,0067	10,23	0,073	0,057	0,089
	Be	0,00176	0,001	65,73	0,0001	8E-05	0,0002
	Cd	0,013	0,001	7,90	0,015	0,012	0,018
	Co	0,03825	0,002	5,23	0,035	0,029	0,041
	Cr	0,03517	0,0045	12,80	0,034	0,029	0,039
	Cu	0,98867	0,0183	1,85	0,113	0,095	0,131
	Fe	0,288	0,028	9,89	0,3	0,225	0,375
	Hg	0,04907	0,011	22,42	0,055	0,044	0,066
	Mn	0,015	0,0013	8,44	0,016	0,012	0,02
	Ni	0,04525	0,004	8,84	0,047	0,038	0,056
	Pb	0,051	0,0052	10,31	0,06	0,048	0,072
	Se	0,064	0,007	10,36	0,071	0,053	0,089
	Tl	0,0181	0,001	5,52	0,019	0,015	0,023
	V	0,052	0,015	28,09	0,048	0,037	0,059
	Zn	0,53	0,05	9,54	0,59	0,51	0,67

Таблица 20 - Сравнение данных, полученных в лаборатории АНО “ЦБМ”, с международными стандартными образцами, используемые для проверки правильности и воспроизводимости при анализе цельной крови (стандарт цельной крови серии ClinChek, Recipe chemicals + instruments, Munchen, Germany; стандарт А-13, цельная кровь, МАГАТЭ, Вена, Австрия)

Стандарт	Элемент	Среднее, мкг/мл	SD	RSD, %	Среднее, мкг/мл	Диапазон, мкг/мл	
						от	до
		Данные измерения			Паспортное значение		
Level I ClinChek	Cd	0,0006	0,00018	28,28	0,0007	0,0005	0,001
	Co	0,0022	0,00026	12,06	0,0021	0,0015	0,0027
	Cr	0,0017	0,00038	22,75	0,0018	0,0014	0,0023
	Hg	0,0038	0,00139	36,86	0,0034	0,0024	0,0044
	Mn	0,0242	0,0038	15,7	0,025	0,02	0,03
	Ni	0,0036	0,00044	12,30	0,0039	0,0027	0,005
	Pb	0,0714	0,007	10,14	0,089	0,07	0,108
	Se	0,1423	0,038	27,04	0,148	0,118	0,178
	Zn	2,4217	0,3	12,53	2,268	1,814	2,722
Level II ClinChek	Cd	0,0041	0,00055	13,32	0,0043	0,0035	0,0051
	Co	0,0044	0,0005	11,79	0,0047	0,0037	0,0057
	Cr	0,0065	0,0009	14,83	0,0071	0,006	0,0082
	Hg	0,017	0,003	16,96	0,015	0,012	0,018
	Mn	0,0306	0,008	27,61	0,027	0,022	0,032
	Ni	0,0077	0,0015	20,36	0,0083	0,0064	0,0102
	Pb	0,273	0,022	8,17	0,304	0,258	0,35
	Se	0,2025	0,054	26,87	0,171	0,137	0,205
Zn	2,5766	0,36	13,83	2,449	1,959	2,939	
Level III ClinChek	Cd	0,0073	0,0017	23,06	0,0077	0,0065	0,0089
	Cr	0,016	0,005	31,35	0,017	0,014	0,02
	Hg	0,0311	0,011	35,34	0,035	0,028	0,042
	Mn	0,031	0,003	10,87	0,032	0,027	0,037
	Ni	0,0229	0,008	35,56	0,026	0,022	0,03
	Pb	0,5059	0,07	13,69	0,503	0,443	0,563
	Se	0,2253	0,072	32,13	0,197	0,158	0,236
	Zn	2,7921	0,46	16,37	2,803	2,242	3,364
А-13	Ca	302	24,4	8,08	290	226	332
	Cu	3,54	0,17	4,7	4,22	3,7	4,8
	Fe	2187	107,43	4,91	2260	2200	2500
	K	2796	362,05	12,95	2550	2100	2800
	Na	13353	269,24	2,02	13400	11600	13500
	Mg	87,54	90	4,05	99	79	119
	P	837	65,8	7,86	940	740	1140

11.4 Выбор метода анализа

Выбор аналитического метода определяется в первую очередь целью и задачами исследования и не должен лимитироваться аналитическими возможностями конкретного коллектива исследователей. Практически невозможно (да и нецелесообразно, в первую очередь из экономических соображений) иметь в собственном распоряжении весь спектр приборов, которые применяются для определения химических элементов и их соединений. Еще сложнее даже теоритически представить себе в современной России учреждение биомедицинского профиля, имеющего в своем распоряжении группу высококвалифицированных специалистов по каждому из видов анализа, готовых оперативно выполнить любое исследование на высоком уровне. К сожалению, в России и многих других странах ближнего зарубежья директорат научно-исследовательских учреждений зачастую увлечен бессистемными закупками аналитического оборудования без учета реальных потребностей в нем и наличия соответствующих решению сложных задач специалистов. Это приводит к дублированию усилий и нерациональному расходованию бюджетных средств. Альтернативой этому неэффективному подходу является создание сети сотрудничающих между собой аккредитованных лабораторий, групп исследователей различной ведомственной принадлежности, всех форм собственности (включая независимых), способных оперативно решать задачи по анализу и интерпретации полученных данных в кратчайшие сроки в рамках специализации каждого коллектива и, естественно, на взаимовыгодных условиях. В рамках университетов и научных центров отделений РАН и РАМН перспективным могло бы быть создание лабораторий коллективного пользования. Другими словами, важнейшей предпосылкой быстрого и эффективного развития исследований в области медицинской и биологической элементологии в нашей стране и достижения самых больших высот в этом перспективном направлении естествознания и медицины является разумная междисциплинарная кооперация.

На пути выбора правильного или, точнее, адекватного метода (методов) анализа, кроме затронутых выше объективных причин, существуют также

мешающие субъективные факторы. К ним следует отнести проблему низкого уровня базовой подготовки и недостаточной информированности о современных возможностях аналитической химии, врачей, ветеринаров, биологов, которые, как правило, и ставят задачи перед коллективом исследователей. Имея недостаточное представление о реальных возможностях тех или иных методов анализа, исследователи – клиницисты-медики и ветеринары – зачастую ошибаются с выбором метода и, в результате получают малоценные с точки зрения современного уровня развития науки данные. В странах с высоким уровнем биомедицинских исследований (США, Германия, Великобритания, Франция, Швейцария, Италия, Япония, Австралия, Канада, а в настоящее время и КНР) очень развита кооперация ученых из разных университетов, лабораторий, клиник, исследовательских центров. Это позволяет оперативно проводить исследования на самом высоком уровне и в краткие сроки внедрять полученные данные в фармацевтическую, пищевую и медицинскую промышленность, практическое здравоохранение. Одними из последних примеров такого сотрудничества в области медицинской элементологии явился проект ZENITH, выполненный в течении 2-х лет учеными 3-х европейских стран – врачами, биохимиками, психологами, иммунологами, генетиками, химиками-аналитиками. В результате на репрезентативной выборке пожилых людей, проживающих во Франции, Сев. Ирландии и Италии, обоснована необходимость повышение уровня обеспеченности этой категории населения эссенциальным микроэлементом цинком.

Итак, перед началом исследования, включающего определение содержания химических элементов, их соединений и других индикаторов элементного статуса (определение активности ферментов, уровня отдельных белков, метаболитов др.) (Bertram, 1992) необходимо четко определить перечень подлежащих исследованию показателей, биообразцы которые будут подвергнуты анализу, время забора (час дня) для крови, слюны и др. (ВТЕР, 1991), сезон – для волос [15], определиться с полом, возрастом, профессией и состоянием здоровья, физическим состоянием, уровнем физической нагрузки, местом проживания, особенностями питания. В планировании исследования должны участвовать: врач, специалист по лабораторной

диагностике, желательно привлечение эксперта, имеющего опыт проведения исследований в области медицинской или биологической элементологии. После этого, исходя из задач исследования, следует определиться с методом (-ами) анализа. В обсуждении этого важного вопроса обязательно участие аналитика, биохимика и/или химика-аналитика или специалиста по инструментальным методам анализа.

11.5 Анализ химических форм элементов («speciation analysis») в биологии

В последнее время интенсивно развивается направление элементного анализа, изучающего содержание элементов (в частности, металлов и металлосодержащих соединений) в биологических структурах, объектах окружающей среды и объектах техногенного происхождения. В биологических системах металлы находятся в основном в виде соединений с различными лигандами: малыми органическими (например, цитратом, тартратом, оксалатом, фитатом, аминокислотами, олигопептидами) или макромолекулярными (например, белками, полисахаридами, нуклеиновыми кислотами). Они выполняют различные функции в организме, среди которых транспортная (белки, связанные с Al, Cu, Zn, Fe), каталитическая (металлоферменты, содержащие Fe, Zn, Mg, Ca, Co), транскрипционная (нуклеиновые кислоты – Cr, Ni, Pt, Ru).

Определенные переходные металлы (например, Cu, Fe, Se, Zn и др.), выполняя роль, например, кофакторов ферментов, также могут катализировать цитотоксические реакции. Ряд элементов упоминается в контексте карцино- (As, Cr, Pt), иммуно- (Au, Co, Cr, Ni, Pt), эмбрио-/терато- (Hg), спермо- (Cd, Pb, Tl), нефро- (Cd, U) или нейро- (Al, Hg, Mn) токсичности [20]. Молекулярная основа многих металлозависимых биохимических процессов до сих пор остается неясной [42].

Биологические функции металлов (как микро-, так и макроэлементов) зависят от заряда, подвижности и прочности связывания с биологическими лигандами. Некоторые металлы (Na, K) образуют слабые связи с отрицательно заряженными лигандами, могут легко проникать через клеточные мембраны и участвуют,

например, в передаче нервного импульса. Другие (Mg, Ca) формируют относительно устойчивые комплексы с ферментами, нуклеиновыми кислотами и участвуют в регуляции биологических функций, например, кальций регулирует сокращение и расслабление мышц. Третьи (Fe, Zn, Cu) очень прочно связаны с ферментами или другими белками и служат их неотъемлемыми структурными компонентами (База знаний по биологии человека, ИМГ РАН)(таблица 21).

Таблица 21 - Некоторые металлоферменты и металлопротеиды, их биологическая функция

Химический элемент	Некоторые биологические функции	Примеры металлоферментов и металлопротеидов
Железо	Транспорт кислорода	Цитохром с-оксидаза, трансферрин, ферритин, нитрогеназа
Цинк	Синтез и распад нуклеиновых кислот и белка, метаболизм этанола	ДНК- и РНК-полимеразы, алкогольдегидрогеназа, рецепторы глюкокортикоидов, карбоангидраза, карбоксипептидаза, щелочная фосфатаза
Медь	Синтез гемоглобина, обменные процессы в соединительной ткани, рост и развитие костей	Cu-Zn-супероксиддисмутаза, церулоплазмин (ферроксидаза), аминоксидаза, пластоцианин
Кобальт	Метаболизм метионина	Метионинсинтаза
Марганец	Окислительное фосфорилирование; метаболизм жирных кислот, гликозаминогликанов и холестерина	Плацентарная аминоксидаза, пируваткарбоксилаза, Mn-супероксиддисмутаза
Молибден	Метаболизм ксантинов	Ксантинооксидаза, нитрогеназа
Селен	Антиоксидант	Глутатионпероксидаза
Никель	Стабилизация структуры РНК и ДНК	Уреаза

Сдвиг элементного статуса ведет к нарушению работы металлосодержащих соединений, что может проявляться развитием болезни. Отклонения от нормы концентраций определенных металлов и/или содержащих их белков может служить индикатором при диагностике и важным показателем при исследовании различных заболеваний. Например, болезнь Паркинсона характеризуется повышенными концентрациями Fe, Mn и Cu в диагностических биосубстратах и тканях мозга.

Ацерулоплазминемия характеризуется дефектами в Cu-связывающем гликопротеиде церулоплазмине, которые ведут к нарушению метаболизма Fe - его накоплению в тканях мозга и органов, и, как следствие, дегенеративным синдромам. При ишемической болезни происходит значительное снижение способности альбумина к связыванию Co, Ni, Cu.

На данном этапе развития направления, занимающегося изучением элементов, еще не до конца сформирован базис ключевых терминов и определений. В настоящее время наблюдается путаница в делении элементов по их отношению к живым организмам - на биогенные и абиогенные, на макро- и микро-, а теперь уже и ультрамикроэлементы, на ятрогенные, эссенциальные (жизненно важные) и условно эссенциальные, на токсичные и условно токсичные. Эту путаницу усугубляет антропоцентризм, поскольку полезность, нейтральность или «вредность» того или иного элемента для человека отнюдь не означает таковых свойств для других представителей животного мира или для представителей растительного мира. Все перечисленные выше классификации по сути своей искусственны [15], однако термины активно используются в научной среде.

Наиболее часто под термином «микроэлементы» подразумевается группа химических элементов, которые содержатся в организме человека в очень малых количествах, в пределах от 10^{-3} до 10^{-12} % (при этом микроэлементы с содержанием ниже 10^{-5} % иногда называют ультрамикроэлементами).

Биоэлементом можно назвать форму, в которой химический элемент находится в живых системах и участвует в процессах жизнедеятельности. Химия клетки характеризуется не только геномом или протеомом, но также и распределением металлов и металлоидов среди различных форм и клеточных структур, т.е. металломом [34].

Металломика представляет собой интегративное направление в науке, изучающее биометаллы в симбиозе с геномикой и протеомикой, поскольку синтез и метаболические функции генов (ДНК и РНК) и протеинов не могут осуществляться без участия различных ионов металлов и металлоферментов.Metalloмика представляет собой науку о металлах, формах нахождения металлов и их

взаимодействиях, превращениях и функциях в биологических системах; она может быть определена как биохимия металлозависимых функций [22].

Утверждение о том, что показателем, определяющим поведение отдельных элементов, является совокупность различных химических форм элемента и их соотношений, принято в таких различных областях науки как токсикология, клиническая химия, геохимия, химия окружающей среды. Химическая форма соединения (chemical species) представляет собой определенную форму элемента, характеризуемую изотопным составом, электронным состоянием или степенью окисления и/или структурой молекулы или комплекса [36]. Таким образом, химические соединения, имеющие различные характеристики, рассматриваются, как отдельные химические формы. То есть, речь идет о различных структурах элемента, имеющих значение для токсикологии, биохимии, геохимии, химии окружающей среды.

Анализ химических форм (speciation analysis) представляет собой определение и/или количественное измерение одной или более химической формы в образце [36].

В последнее время получил широкое распространение и считается весьма эффективным метод масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС) для определения валового содержания элементов без учета формы нахождения элементов в образце. Метод стал рутинной процедурой, необходимой в различных областях исследований. Он основан на использовании индуктивно-связанной плазмы в качестве источника ионов и масс-спектрометра для их разделения и детектирования. Ионы из плазмы через серию конусов попадают в масс-спектрометр, обычно квадрупольный, где они разделяются на основании отношения массы к заряду, и детектор получает сигнал, пропорциональный концентрации частиц с таким соотношением. Концентрация может быть определена путем калибровки с использованием элементных стандартов. ИСП-МС также позволяет количественно определять изотопный состав. Другие масс-анализаторы, подключенные к ИСП, включают магнитно-электростатический сектор с двойной фокусировкой, а также времяпролетные системы. Также ИСП используется в

спектрометрах другого типа – ИСП-АЭС (атомно-эмиссионная спектроскопия). ИСП-МС позволяет определять одновременно большое количество элементов с атомной массой от 7 до 250, то есть от Li до U в отличие от атомно-абсорбционной спектроскопии, определяющей единовременно только один элемент [35].

Однако, некоторые важные элементы, такие как S и P, имеют высокие энергии ионизации, поэтому плохо ионизируются в условиях данной методики по сравнению с металлами; так же эта проблема касается галогенов, особенно фтора, т.к. он принимает участие в метаболизме лекарственных веществ [34].

Определенное валовое содержание химического элемента в образце является «суммарным параметром», включающим в себя различные формы нахождения элементов, которые отличаются токсичностью, могут быть канцерогенными или эссенциальными, токсичными или нетоксичными, присутствовать в образце в виде частиц, в т.ч. коллоидных, быть растворенными в жидкости или присутствовать в газообразном состоянии, отличаться по, находиться в связанном или свободном состоянии (в виде свободных ионов), сорбированными или в виде комплексов. Еще недавно определение общего содержания химических элементов в образцах считалось достаточным для целей биологических, токсикологических, клинических и экологических исследований. Однако интенсивное развитие как новых аналитических подходов и методов, так и технологий по производству биологически активных веществ, в последние десятилетия привело к осознанию необходимости определения форм нахождения элементов в объектах окружающей среды и биообразцах.

Определение формы нахождения химических элементов имеет очень большое прикладное значение. Во-первых, большинство химических элементов в органах, тканях и биологических жидкостях связано с различными белками (т.н. металлопротеиды), значительная часть из которых относится к металлоферментам. Во-вторых, токсичность и биодоступность биоэлементов также зависят от их химических форм, например, ионы Cr(VI) являются значительно более токсичными по сравнению с Cr(III) [26] в противоположность соединениям Hg: и метилртуть, и

неорганические соединения Hg являются токсичными, хотя их токсичность опосредуется разными механизмами.

Согласно опубликованным в научной литературе за 2000-2005гг. данным, наиболее часто объектами анализа химических форм элементов во всех областях становятся химические формы нахождения As (ок.15 %), Se, Hg, Cr (ок. 8 %), Sn и Cu (7 %), Zn и Pb (6 %), Fe и Cd (5 %), Ni (4 %), Mn и Sb (3 %), Co, Al, V (2 %), Pt и P (менее 1 %), на остальные элементы приходится 3 % исследований. Т.е. всего на 5 элементов (As, Se, Hg, Cr, Sn) приходится 50 % всех публикаций, а на следующие 5 элементов (Cu, Zn, Pb, Cd, Fe) – еще 30 % (EVISA).

В зависимости от задач анализа учитываются различные структурные аспекты определяемых веществ: изотопный состав, электронное состояние, нахождение элемента в форме неорганического соединения или в связи с органическими соединениями и в комплексах [36].

11.6 Изотопный состав

Относительное содержание изотопов элемента может изменяться, например, при радиоактивном распаде или в процессе воздействия физических факторов (в условиях окружающей среды или антропогенного влияния). Например, Pb имеет четыре стабильных изотопа 204, 206, 207 и 208, однако три из них имеют радиоактивное происхождение: образуются при распаде U (Pb 206 и 207) и Th (Pb 208) [27]. Другими изотопами радиоактивной природы, важными для геохимии, являются Os, Sr и Nd.

Существуют изотопы элементов, не имеющие радиоактивных предшественников, например, O 16 и 18. Изотопы Li имеют различное биологическое поведение, частично это связано с различием в прохождении через мембраны клеток [30]. Это необходимо учитывать, т.к. соли Li применяются в лечении маниакально-депрессивного психоза. Возможно, в будущем при производстве литийсодержащих соединений будет проводиться изотопный анализ химических форм.

11.7 Электронное состояние и степень окисления

Степень окисления элемента сильно влияет на его токсичность, например, Cr (III) играет важную роль в метаболизме глюкозы, однако соединения Cr (VI) являются генотоксичными и канцерогенными (Katz S.A. and Salem H.T., 1994). В противоположность Cr, более низкие степени окисления As являются более токсичными: арсин AsH_3 > арсенит $As(III)$ > арсенат (V) [24]. Трех- и пентавалентные неорганические соединения As имеют сопоставимую биодоступность [40], обладая при этом разной биохимическими свойствами, частично из-за предпочтения трехвалентных форм в реакциях связывания тиолов [24].

Кроме того, степень окисления может влиять на абсорбцию и выведение элемента, например, ионы Fe (II) растворимы в физиологических условиях и свободно проникают через мембраны, тогда как Fe (III) не так легко проникает в клетки и легче подвергается гидролизу в водных и биологических системах [31].

Ионы Hg (II) способны проникать внутрь клетки. Некоторые бактерии имеют редуктазную систему, которая восстанавливает Hg (II) до Hg^0 , которая затем путем диффузии уходит из клетки [41]. Подобная активность возможна в печени человека [18].

11.8 Неорганические соединения и комплексы

Транспорт и биодоступность соединений определяется такими свойствами, как заряд, растворимость и коэффициент диффузии. Практическая важность анализа химических форм неорганических соединений может быть проиллюстрирована на примере профессионального воздействия Ni и его соединений. Такие соли Ni, как хлорид и сульфат, растворимы в воде и обладают низкой токсичностью при пероральном поступлении в организм человека. Оксиды и сульфиды Ni нерастворимы в воде, их биодоступность является следствием взаимодействия с

биологическими лигандами. Сульфид Ni (Ni_3S_2) является сильным канцерогеном животных [23].

Комплексы с неорганическими лигандами обладают различной стабильностью, поэтому, зачастую, их сложно разделять. Гидролиз является важным аспектом ионной химии металлов. Для большинства металлов образование гидроксидов в водной среде (в присутствии кислорода) при нейтральном pH является определяющими фактором их растворимости и биодоступности [35].

11.9 Органические комплексы

В результате реакций комплексообразования с органическими лигандами образуются координационные комплексы с разной степенью термодинамической стабильности.

Распределение металлолигандных комплексов зависит от таких факторов, как концентрация, стехиометрия, pH и ионная сила. В биологических жидкостях слишком большое количество N-, O-, и S-лигандов, поэтому невозможно показать «полное» распределение химических форм *in vivo*, и предсказание токсичности или биоаккумуляции возможно только тогда, когда картина упрощена, т.е. рассматриваются концентрации основных комплексов (например, связывание Cd с основным белком плазмы альбумином) или их устойчивость (например, связывание Fe (III) или Al с трансферрином) [35].

11.10 Металлоорганические соединения

Металлоорганические соединения представляют собой соединения, в которых атом углерода и металла соединены ковалентной связью. Токсичность данных соединений часто является следствием биоаккумуляции в жировых тканях и прохождением через мембраны. Так, ионы Hg (II) токсичны для почек млекопитающих и вызывают повреждение слизистой оболочки в местах абсорбции;

CH_3Hg^+ проходит плацентарный и гематоэнцефалический барьеры, являясь тератогеном и токсином центральной нервной системы [16].

В основном металлы подвергаются только биологическому метилированию; донорами метильных групп обычно являются S-аденозилметионин и метилкобаламин [39]. Некоторые элементы, особенно As и Se, могут образовывать другие виды металлоорганических соединений, например, арсеноилрибозиды (арсеносахара) и селеноаминокислоты. Метилирование металлов приводит к возрастанию токсичности их соединений, тогда как метилирование As [24] и Se [26] способствует их детоксикации.

Основной интерес для анализа представляют соединения As, Sn, Hg и Pb. Ртутьорганические соединения применяются для обработки семян злаковых растений, $(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{Sn}$ является фунгицидом, $\text{CH}_3\text{As}(\text{ONa})_2$ – гербицидом. При сгорании бензина выделяются $(\text{CH}_3)_4\text{Pb}$ и $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{Pb}$; диоктилолово выделяется из поливинилхлоридного пластика. $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{Pb}$, $(\text{CH}_3)_3\text{Sn}^+$, CH_3Hg^+ , $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ являются токсичными для центральной нервной системы. Алкилпроизводные Pb, Sn и Hg являются основными токсичными металлоорганическими соединениями [37].

11.11 Макромолекулярные соединения и комплексы

Наивысшим структурном уровнем, на котором рассматривается анализ химических форм, является макромолекулярный. Становится возможным описать распределение элемента среди различных белков или даже среди изоформ одного белка, а также распределение различных химических форм самого элемента, например, распределение Fe среди трансферрина, ферритина и гемовых белков [31] или распределение в гемоглобине взрослых и фетальном гемоглобине.

В природных условиях связывание с полианионами (гуминовыми кислотами и фульвокислотами) и коллоидными частицами определяет транспорт и доступность таких элементов, как Cd, Cu и Pb [21]. В организме такие полианионы, как нуклеиновые кислоты [36] и гликозаминогликаны [32], неспецифически связывают большинство ионов металлов.

Небольшие органические лиганды способствуют высвобождению Cd из альбумина и захвату Cd клетками; напротив, биодоступность Ni снижается некоторыми лигандами, такими как цистеин и гистидин, и в меньшей степени белками [39].

11.12 Фракционирование

В настоящее время практически невозможно определить содержание каждой из форм химического элемента в биообразце. Это связано с тем, что многие формы являются очень нестабильными образованиями, что затрудняет их определение. Даже в процессе измерения может происходить перераспределение химического элемента между различными химическими формами вследствие изменения pH или каких-либо особенностей метода определения и нарушаться соотношение между ними. Очень часто имеет место преобразование аналита в комплекс, который анализируется отдельно от матрицы образца. Одним из способов получения более достоверной информации о составе образца в случае с лабильными химическими формами элементов в их «природном» состоянии является применение неинвазивных и не изменяющих состав образца методов, как прямая спектроскопия или потенциометрическое измерение [40]. Проведение фракционирования основывается на различных свойствах химических форм, таких как растворимость, аффинность, размер, величина заряда, гидрофобность, т.е. фракционирование – это процесс выделения (определения) аналита или группы аналитов из образца в соответствии с их физическими или химическими свойствами. Например, фракционирование используется для определения концентраций органически связанной и неорганической меди в природных водах.

Инструменты для анализа химических форм разнообразны. Существует не так много методов, которые позволяют напрямую проводить анализ, к ним относятся мессбауэровская спектроскопия, рентгеноэлектронная спектроскопия, ядерный магнитный резонанс, электронный спиновый резонанс и тандемная масс-спектрометрия. Применяемые на практике методы для анализа химических форм

элементов являются комбинациями совмещенных техник сепарации (разделения) и высокочувствительной детекции.

В связи с тем, что анализ химических форм чаще всего используется для исследований т.н. форм микро- и ультрамикроэлементов, применяются наиболее чувствительные методы: атомно-флуоресцентная, абсорбционная и эмиссионная спектрометрия или масс-спектрометрия. Совместно с этими методами используются различные способы возбуждения, такие как нагрев (кварцевый или графитовый нагреватели), пламя и плазма (плазма СВЧ-разряда, индуктивно связанная плазма), плазма постоянного тока или источники тлеющего разряда.

В настоящее время наиболее востребованными аналитиками технологиями сепарации являются высокоэффективная жидкостная (ВЭЖХ) и газовая хроматографии (ГХ), в меньшей степени распространены капиллярный электрофорез, диализ, ультрафильтрация, суперкритическая жидкая экстракция. Учитывая широкий спектр техник жидкостной хроматографии (ионообменная, обращено-фазная, аффинная, эксклюзионная, ион-парная и др.), ее наиболее часто используют в качестве разделения.

Основными детекторами химических элементов являются методики, использующие в качестве источников возбуждения плазму (EVISA).

Анализ химических форм элементов является современным подходом к обеспечению безопасности жизнедеятельности и повышению качества жизни человека. Анализ химических форм обеспечивает информацию, необходимую для описания эффектов активных форм элементов, которая недоступна при определении валового содержания элемента. Концепция исследований включает в себя определение химической формы элемента, токсичности, эссенциальности, роли для здоровья человека, нутритивных особенностей, воздействия на окружающую среду определенной химической формы элемента (а не самого элемента). Области применения анализа химических форм элементов приведены в таблице 22.

Таблица 22 - Области применения анализа химических форм элементов (EVISA)

Область применения 1	Необходимость применения «speciation analysis» 2
Токсикология, фармация, медицина, клиническая химия и биология	Изучение биологической активности, токсичности, метаболических путей макро- и микроэлементов у человека и животных, которые в значительной степени зависят от химической формы элемента.
Гигиена и медицина труда	Идентификация опасных для здоровья животных и человека агентов, оценка различных путей поступления и происхождения токсикантов и потенциально опасных веществ, биомониторинг химических форм микроэлементов путем определения биомаркеров и изучения кинетики форм микроэлементов в организме при профессиональном контакте человека с ними.
Нутрициология, диетология	Лучшее понимание преобладающих химических форм микроэлементов в пище и их поведения в желудочно-кишечном тракте. Определение потребности в микронутриентах – макро- и микроэлементах – с учетом химической формы элемента.
Пищевая промышленность	Повышение качества и безопасности производимых пищевых продуктов.
Производство питьевой воды	Токсичность присутствующих в исходной воде микроэлементов (например, As, Al, Cr) во многом определяется их химической формой.
Анализ риска загрязнения окружающей среды	Идентификация загрязняющих веществ, оценка дозозависимых эффектов, оценка уровня загрязнения на основании детализированных результатов анализа, характеризующих экотоксичность, мобильность и биодоступность химических форм соединений.

Продолжение таблицы 22

1	2
Химическая промышленность	Оптимизация технологических процессов и качества продукции, т.к. химическая активность реагентов, катализаторов, продуктов и побочных продуктов и загрязнителей зависят от химических форм соединений.
Нефтехимическая промышленность	Металлопорфирины и другие соединения металлов присутствуют в топливе, что влияет на процессы очистки; органометаллические соединения (например, тетраэтилсвинец или трикарбонилмарганец) используются в качестве добавок при изготовлении топлива.
Организация сбора и удаления отходов	Оценка отходов в регионе, поиск путей снижения затрат по их очистке.
Полупроводниковая промышленность	Некоторые используемые органометаллические или металлоидные соединения высокотоксичны, они требуют строгого контроля технологического процесса и охраны труда.

Заключение

Информация об элементном составе организмов всегда вызывала большой интерес. Данные о содержании ключевых элементов живого вещества – биогенных элементов - углерода, азота, водорода, фосфора и некоторых других хорошо известны. В последнее время существенно возросло внимание к контролю содержания токсичных элементов, прежде всего тяжелых металлов, мышьяка, селена, йода и других, осуществляемое в рамках исследований по санитарно-эпидемиологическому и экологическому благополучию населения. Обновленной причиной этого являются актуальные для современной медицины исследования биологической роли химических элементов, присутствующих в организмах в микро- и субмикро- количествах, определению которых в живых организмах и посвящена данная монография.

Известно, что многие из этих элементов являются эссенциальными, яркие примеры – хорошо изученные железо, йод, данные о метаболизме которых известны. Биологическая роль других элементов – в стадии интенсивного исследования, поэтому современная научная медицина предпочитает определять общее количество эссенциальных и условно эссенциальных элементов в различных биологических объектах. В связи с этим существенно возросли требования к результатам химического анализа биологических объектов, к их качеству, что требует приложения здесь всей мощи современной аналитической химии. Мощным и эффективным приемом современной пробоподготовки является ее микроволновый вариант. Возможность применения минимальных количеств реактивов и, следовательно, наименьшего внесения загрязнений – существенные достоинства этого метода полной минерализации органической матрицы пробы. В то же время, в зависимости от собственно метода измерения аналитического сигнала эффективной является пробоподготовка с частичной деструкцией этой матрицы, достигаемой, например, при обработке концентрированной азотной кислотой. Так, например, поступают в рассматриваемых далее атомно-эмиссионной спектроскопии с

индуктивно-связанной аргоновой плазмой (АЭС-ИСП), в масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ИСП-МС), которые по праву можно отнести к наиболее современным, мощным и эффективным в массовом анализе методам. Отдельно следует подчеркнуть требование неинвазивности анализа, нарушение покровов организма здесь недопустимо, что вносит серьезные ограничения в выбор исследуемых биологических материалов.

Основные современные методы определения следов элементов в биологических объектах представлены следующими:

- 1) атомно-абсорбционная спектрофотометрия с электротермической атомизацией (ААС-ЭТА);
- 2) плазменная атомно-эмиссионная спектрометрия (АЭС-ИСП)
- 3) плазменная масс-спектрометрия (МС-ИСП);
- 4) рентгенофлуоресцентная спектрометрия;
- 5) инверсионная вольтамперометрия, ионометрия;
- 6) нейтронно-активационный анализ;
- 7) жидкостная хроматография, эффективные детекторы, система ВЭЖХ-МС.

Традиционным стандартным методом определения микроэлементов в биологических объектах является атомно-абсорбционная спектрофотометрия. Достижимые пределы обнаружения, особенно в методах с электротермической атомизацией, оказываются удовлетворительными, особенно при определении тяжелых металлов (например, графитовая кювета). Узким местом метода является ограниченная производительность, определяемый наличием источников резонансного излучения перечень определяемых элементов, невозможность быстрого определения большого числа металлов, невозможность определения неметаллов, необходимость полной деструкции матрицы. Необходимость чувствительного определения легко летучих элементов, например, ртути, реализуется с помощью соответствующих гидридных приставок (известный метод холодного пара). Однако достоинства метода и доступность соответствующей техники позволяют отнести этот метод к стандартным.

Высокоэффективным методом определения микроэлементов в биологических объектах является АЭС-ИСП. Высокая, до 6000-10000 К, температура аргоновой плазмы, поддерживаемая за счет ее индуктивного разогрева, позволяет решить проблемы высокочувствительного многоэлементного анализа. Пределы обнаружения большинства металлов оказываются здесь достаточно низкими, однако проявление спектральных наложений не всегда заставляет исследователя выбирать для работы самые чувствительные линии, иногда приходится работать и по ионным линиям. Но как раз высокая температура плазмы позволяет избежать длительной процедуры полной минерализации матрицы.

Конструктивно АЭС-ИСП спектрометры могут быть оформлены в параллельном и последовательном вариантах. В первом случае суммарное излучение разлагается в спектр, после чего соответствующие спектральные линии определяемых элементов одновременно регистрируются многоэлементным детектором, например диодной матрицей. Таким образом, перечень определяемых элементов жестко предопределен конструктивно.

В последовательном, сканирующем, спектрометре определяется интенсивность спектральных линий всех интересующих исследователя элементов, информация о чем заранее вводится в рабочую программу прибора. Производительность современных сканирующих приборов с высоким оптическим разрешением хорошо сочетается с их аналитической многоэлементностью. Несмотря на дороговизну ИСП спектрометров, наиболее надежные данные о содержании химических элементов (металлов) в живых организмах в последнее время были получены, по-видимому, именно с помощью этого метода. Поскольку резонансные линии неметаллов часто лежат в экспериментально трудно доступной вакуумной ультрафиолетовой области, пределы обнаружения таких элементов, как например, мышьяк, селен и др. в этом методе оказываются неудовлетворительными для медицины. В параллельных спектрометрах установлена жесткая, конструктивно выполненная, система регистрации только определенных элементов. Такой прибор несколько дешевле, но не обладает необходимой для исследователя гибкостью.

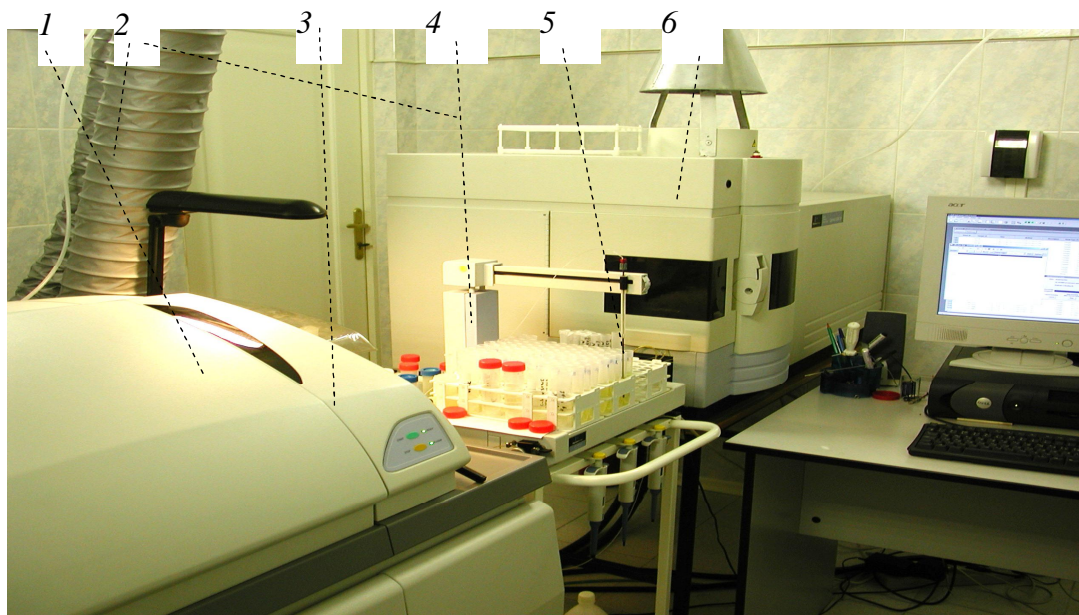
Серьезным прорывом в ррт область при анализе биологических объектов стала ИСП-МС. Использование «горелки» ИСП для ионизации пробы биологических субстратов в масс-спектрометрии позволило преодолеть существенные именно ввиду специфики объектов анализа недостатки способов ионизации пробы электронным ударом, химической ионизации, ионизации искрой. Однако в этом случае начинают проявляться существенные изобарные наложения, что негативно сказывается на селективности способа, например, определению мышьяка по иону $^{75}\text{As}^+$ мешает изобарный ион $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$, определению кальция по $^{44}\text{Ca}^+$ мешает углерод органической матрицы – ион $^{12}\text{C}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$. Решение задачи было найдено в приборах с квадрупольным масс-анализатором и дискретно-диодным детектором (например фирмы Перкин-Элмер). Здесь индуктивно-связанная плазма, поддерживаемая в специальной горелке, способна эффективно генерировать однозарядные ионы из атомов пробы. Далее ионы фокусируются ионно-оптической системой, отделяются от полиатомных и изобарных ионов и направляются в квадрупольный анализатор масс-спектрометра, где разделяются по отношению массы к заряду (m/z) и поступают в детектор. Через масс-спектрометр в каждый момент времени пропускаются ионы со строго определенным (m/z). Масс-анализатор в сочетании с динамической реакционной ячейкой позволяет избирательно разрушать молекулярные мешающие ионы, пропуская к детектору лишь ионы определяемых элементов, и, таким образом осуществлять химическое разрешение ионных пиков. Влияние полиатомных ионов устраняется путем их избирательного разрушения в результате взаимодействий с молекулами, напускаемого в ячейку. Достижимые в квадрупольной ИСП-МС пределы обнаружения находятся на уровне при этом десятых (Be, Na, V, Cr, Fe, Ni, As...) и сотых (Li, Mg, Mn, Co, Rh, In, Sb, Pb, U...) долей нг\л. Учитывая малые расходы растворов пробы, можно отметить, что достигаемая в квадрупольном масс-анализаторе абсолютная чувствительность позволяет решить многие современные проблемы элементного (и, добавим, изотопного – например, содержание ^{238}U и ^{235}U в ювенальных жидкостях) анализа биологических объектов. ИСП-МС позволяет количественно определить до 40-50 элементов в течение 2-3 мин в подготовленных пробах биологических объектов.

Разумеется, при работе в области столь низких концентраций приходится самое серьезное внимание уделять чистоте используемых реактивов и условиям работы в лаборатории, так используемая деионизованная вода должна иметь электрическое сопротивление на уровне 17,5-18 (!) МоМ, лаборатория должна отвечать всем необходимым требованиям (помещения класса 1000), и должным образом аккредитована.

Одной из последних разработок в области масс-спектрометрии является ее сочетание с методом лазерной абляции, что позволяет осуществлять испарение и ионизацию пробы воздействием лазерного облучения и использовать твердые пробы биологических объектов, спрессованные в таблетки. Таким образом, современные мощные методы исследования большого массива проб биологических объектов, тканей, биоптатов человека и, возможно других, например методами АЭС-ИСП и МС-ИСП позволяют достоверно устанавливать дефицит или избыток элемента в организме человека, что представляет большой практический интерес для медико-биологических исследований XXI века. На рисунке 36 приведен фотографический снимок такого типа лаборатории по определению микроэлементов в биологических объектах методами атомно-эмиссионной спектрометрии и масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой. Приборы подсоединены к общей шине, к которой также подключены и аналитические весы. Анализ выполняется в автоматическом режиме по предварительно выбранному алгоритму. Это гарантирует высокую производительность, отсутствие искажений информации при ее передаче от устройства к устройству, невозможность оказания какого-либо давления на качество получаемых результатов.

В современных, хорошо оборудованных лабораториях приборы, в том числе и электронные аналитические весы, через соответствующие платы интерфейсов подсоединяют к общей шине, объединяя тем самым одну или несколько лабораторий в единую систему – компьютерную сеть. Это позволяет контролировать доступ ограниченных лиц, например администрации, к результатам анализа, и делает невозможным оказание какого-либо влияния на них, что очень важно при принятии ответственных решений, например при контроле качества

результатов анализа в медицине, экологии и т.д. За рубежом такие системы называют LIMS (laboratory information and management systems).



- 1 – ИСП масс-спектрометр;
- 2 – локальная вытяжная вентиляция;
- 3 – автоматический проботорник с подготовленными пробами в одноразовых пластиковых пробирках;
- 4 – ИСП атомно-эмиссионный спектрометр;
- 5 – управляющий компьютер;
- 6 – сетевой выключатель .

Рисунок 36 - Современный комплекс для определения микроэлементов в биологических и других объектах. (АНО «Центр биотической медицины» г. Москва)

Подводя итог обсуждению актуальных аспектов диагностики элементозов следует подчеркнуть, что важнейшими, по нашему мнению, лимитирующими развитие элементологии факторами являются наличие:

- 1) эрудированных специалистов с высшим медицинским или биологическим образованием, способных правильно определить задачи исследований в области элементологии и оценить их результаты, исходя из потребностей современной медицины и технических возможностей имеющихся в их распоряжении методов анализа;

2) подготовленного специально обученного персонала (врачи, лаборанты, мед. сестры, исследователи), способных грамотно провести клиническую часть исследования, правильно собрать и сохранить материал для анализа;

3) химиков-аналитиков и физиков, специализирующихся в области методов анализа элементного состава биообразцов и специации, способных оценить преимущества и недостатки имеющихся в наличии и необходимых методик анализа и аналитического оборудования, и провести аналитические исследования на качественном уровне.

Как указывают эксперты ВОЗ (1996), аналитик является наиболее важной составляющей любой аналитической системы и его компетентность и навыки являются залогом успешного применения выбранной технологии анализа. Наличие в собственном распоряжении оборудования (оснащенность лаборатории), естественно, является очень важным, но не важнейшим для решения постоянных задач фактором, т.к. при разумном распределении (распоряжении) финансовыми средствами зачастую более целесообразно выполнять часть исследований на временно арендованном оборудовании или в рамках научной кооперации с другими исследовательскими группами, в централизованных лабораториях, лабораториях коллективного пользования и специальных испытательных центрах.

Итак, наличие в медицинском научно-исследовательском или практическом учреждении грамотного специалиста в области медицинской элементологии является важнейшим и необходимым условием успешного проведения исследования. Финансирование исследования может быть обеспечено любой из заинтересованных сторон (или быть совместным), а знание предмета позволит сделать правильный выбор исполнителей – аналитиков.

В настоящее время наиболее часто возникает потребность в определении содержания в биобразцах макроэлементов (Ca, Mg, K, Na, P, S, Cl), а также таких микроэлементов как Fe, Zn, Cu, Se, J, Pb, Cd и Hg. Остальные элементы определяются значительно реже. Это обусловлено в значительной степени актуальностью тех или иных ХЭ в медицине и биологии, иногда «модой» на некоторые из них, а также аналитическими возможностями лаборатории, т.е.

субъективными факторами. С нашей точки зрения, современный уровень развития науки требует одновременного определения максимального допустимого (с точки зрения надежности получаемых данных) количества макро – микроэлементов, т.к. биологическая роль межэлементных взаимодействий очень значима. С внедрением в исследовательскую практику современных методов многоэлементного анализа (ИСП-АЭС, ИСП-МС) это эффективно не только с диагностической, но и с экономической точки зрения: мы получаем не только более полную картину происходящих в организме процессов, в которых вовлечены химические элементы, но и прямую экономическую выгоду в виде снижения стоимости элементопределения. В связи с бурным развитием ИСП-МС предложенные экспертами ВОЗ 10 лет т.н. рекомендации по выбору подходящих аналитических методов для развивающихся стран несколько устарели, однако, естественно, могут служить хорошим ориентиром для исследователей. Наш 20-летний опыт применения в медицине ИСП-АЭС и ИСП-МС свидетельствует об их существенных преимуществах по отношению к более традиционным сегодня в нашей стране методам анализа (высокая степень автоматизации процесса, скорость определения, уменьшение зависимости от “человеческого фактора”, быстрая окупаемость при большой нагрузке – определение от одного до десятков элементов в десятках и сотнях образцов ежедневно).

Пригодность лаборатории для проведения определений элементного состава биообразцов существенно ограничивается степенью чистоты воздуха (класс-100), рабочих поверхностей и оборудования, возможностью использовать в необходимых количествах воду и реактивы необходимой степени чистоты, хранения и обработки проб, стабильностью энергоснабжения и др. факторами (см. более подробно ВОЗ, 1996). Оценить пригодность аналитических методов для решения поставленных задач можно путем анализа SRM (сертифицированных референтных материалов), сравнивая полученные собственные данные с “паспортными”. В целом, поддержание качества элементного анализа в лаборатории должно занимать до 20 % рабочего времени (ВОЗ, 1996).

Т.о., для успешного решения задач по использованию макро– и микроэлементов в диагностических, профилактических и лечебных целях, необходимыми условиями являются мультидисциплинарный подход, наличие подготовленных к взаимодействию кадров из числа исследователей – врачей и биологов, а также химиков – аналитиков, оснащение лаборатории современными технологиями анализа, в том числе ИСП – МС и ИСП – АЭС или возможность оперативного пользования услугами такой лаборатории. Экономически целесообразно создание базовых лабораторий, обслуживающих большое число групп исследователей медико-биологического профиля, способных на современном уровне решать самые сложные аналитические задачи.

Список использованных источников

- 1 Бабенко, Г.А., Применение микроэлементов в медицине / Г.А.Бабенко, Л.П. Решеткина. – Киев: Здоровье, 1971. – 180 с.
- 2 База знаний по биологии человека / ИМГ РАН – Режим доступа: <http://humbio.ru>.
- 3 Бгатов, А.В. Биогенная классификация химических элементов / А.В. Бгатов // Философия науки - 1999.- 2(6).- Режим доступа: [http://www. water. Ru /digest/biogen _classification. Shtml](http://www.water.Ru/digest/biogen_classification.Shtml).
- 4 Биофизическая химия. Химия биогенных элементов / Ю.А.Ершов, В.А. Попков, А.С.Берлянд, А.З.Книжник, Н.И.Михайличенко.–М.: Высш. Шк., 1992. – 234 с.
- 5 ГОСТ Р ИСО 5725-(1-6)-2002. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. – Введ. 2002 – 11 – 01.- М.: Госстандарт России, 2002.- 405 с.
- 6 Зеленин, К. Н. Химия / К. Н. Зеленин. –С.-Пб.: Спец. литература, 1997. – 123 с.
- 7 Кузнецов, В.В. Номенклатурные правила ИЮПАК в курсе аналитической химии. Химические методы. / В.В.Кузнецов, Ю.В.Ермоленко, И.Н.Семенова. - М.: РХТУ им. Д.И.Менделеева. 2004. – 72 с.
- 8 Микроэлементозы человека / А.П.Авцын, А.А.Жаворонков, М.А.Реми, Л.С. Строчкова. - М.: Медицина, 1991. – 496 с.
- 9 Некрасов, В.И., Элементный статус лиц вредных и опасных профессий / В.И.Некрасов, А.В. Скальный.- Оренбург: РИК ОГУ, 2006. – 230 с.О химическом анализе и о том, что вокруг него / Ю.А. Золотов. –М.: Наука. 2004. – 477 с.
- 10 Определение химических элементов в биологических средах и препаратах методами атомно-эмиссионной спектроскопии и масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой: сборник методических указаний: МУ 4.1.1482.-03, МУ 4.1.1483.-03. утв. гл. государств: санитарн. врачом РФ 30.06.2003./ С.И. Иванов, Л. Г.

Подунова, В. Б. Скачков, В. А. Тутельян, А. В. Скальный, В. А. Демидов, М.Г.Скальная, Е.П.Серебрянский, А.Р.Грабеклис, В.В. Кузнецов. - М.: ФЦГСЭН МЗ РФ, 2003. – 54 с.

11 Основы аналитической химии. В 2 кн. Кн.1. Общие вопросы. Методы разделения: учеб. для вузов / Ю.А.Золотов, [и др.]; под ред. Ю.А.Золотова.–М.: Высш. шк., 1996. – 383 с.

12 Основы аналитической химии. В 2 кн. Кн.2. Методы химического анализа: учеб. для вузов / Ю.А.Золотов, [и др.]; под ред. Ю.А.Золотова.–М.: Высш. шк., 1996. – 461 с.

13 Отто, М. Современные методы аналитической химии. В 2 кн./ М. Отто. –М.: Техносфера, 2003. – 2кн. – 521 с.

14 Практическое руководство по аналитической химии: учеб. пособие для вузов / В.И. Фадеева [и др.]. –М.: Высш. шк., 2001. – 463 с.

15 Скальный, А.В., Биоэлементы в медицине / А.В.Скальный, И.А.Рудаков – М.: Издательский дом «Оникс 21 век»: Мир, 2004. – 272 с.

16 Campbell, D., Mercury Hazardous Materials Toxicology: Clinical Principles of Environmental Health. Baltimore: Williams and Wilkins, 1992. 833 p.

17 Cao, Y., Competitive complexation of trace metals with dissolved humic acid // Environ Health Persp. - 1995.- 103 (1). P.29-32.

18 Dunn, J.D., Ethanol reveals novel mercury detoxification step in tissues / J.D. Dunn // Science -1981.- № 213(4512). – P.1123-1125.

19 European Virtual Institute for Speciation Analysis (EVISA) – Node of acces: [http:// speciation. net](http://speciation.net).

20 Finney, L.A. Transition Metal Speciation in the Cell: Insights from the Chemistry of Metal Ion Receptors/ L.A., Finney // Science. - 2003.- 300(5621).- P.931-936.

21 Florence, T.M. Trace element speciation by anodic stripping voltammetry/ T.M. Florence // Analyst. - 1992.- № 117(3). - P.551-553.

22 Haraguchi, H. Metallomics as integrated biometal science/ H. Haraguchi // Journal of Analytical Atomic Spectrometry. - 2004.- № 19. - P.5–14.

23 Hertel, R.F., IPCS Environmental Health Criteria 108: Nickel. Geneva World Health Organization, 1991. – 234 p.

24 Hindmarsh, J.T. Clinical and environmental aspects of arsenic toxicity/ J.T. Hindmarsh // *Crit Rev Clin Lab Sci.* - 1986.- № 23(4). - P.315-347.

25 Hughes, M.S. Isotopic differences in the lithium transport rate in human erythrocytes during simultaneous incubations with the stable isotopes $[6]Li$ and $[7]Li$ / M.S. Hughes // *C R Seances Acad Sci III.* - 1992.- № 314(4). - P.153-158.

26 Karlson, U. Biological Properties of Metal Alkyl Derivatives. Metal Ions in Biological Systems. / U Karlson. -: New York, Marcel Dekker. 1993. № 29. P. 185–227.

27 Kersten, M., Pollution Sources Reconnaissance using Stable Isotope Ratios ($^{206}Pb/^{207}Pb$). Impact of Heavy Metals on the Environment. J.-P. Vernet. / M. Kersten.- Amsterdam, Elsevier. 1992.- №32. - P. 311-325.

28 Misra, T.K. Bacterial resistances to inorganic mercury salts and organomercurials. / T.K Misra. // *Plasmid.* - 1992.- № 27(1). -P. 4-16.

29 Olivieri N.F., Templeton D.M. Speciation of tissue and cellular iron with on-line detection by inductively coupled plasma-mass spectrometry / N.F. Olivieri, D.M. Templeton // *Anal Biochem.* - 1992.- № 205(2). P. 278-284.

30 Renshaw, P. A diffusional contribution to lithium isotope effects/ P.Renshaw. // *Biological Psychiatry.* - 1987.- № 22(1). - P. 73-78.

31 Schneider, W. Iron hydrolysis and the biochemistry of iron: The interplay of hydroxide and biogenic ligands/ W. Schneider. // *Chimia.* - 1988.- № 42.- P.9-20.

32 Siobbak, T.P. Concentrations of Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Pb, V and Zn in formalin-fixed brain tissue in amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex of Guam determined by ICP-MS./ T.P. Siobbak // *Biol Tr Elem Res.* 2003, № 96. – P. 39-60.

33 Schneider, W. The Hydrolysis of Iron in Synthetic, Biological, and Aquatic Media. Aquatic Surface Chemistry: Chemical Processes at the Particle-Water Interface. John Wiley 1987. 196 p.

34 Szpunar, J. Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics / J. Szpunar. // *The Analyst.* - 2005.- № 130.- P. 442-465.

35 Tanner, S.D. Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review / S.D.Tanner, V.I. Baranov, D.R.Bandura. // Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy. - 2002.-№ 57(9). - P.1361-1452.

36 Templeton, D., Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches/ D. Templeton. // Pure Appl Chem. - 2000.- № 72.- P.1453–1470.

37 Templeton, D.M. Biomedical aspects of trace element speciation// Fresenius J. Anal. Chem. - 1999.- № 363.- P.505–511.

38 Templeton, D.M. Trace element speciation in toxicology and clinical sciences/ D.M. Templeton. // Inorg Chim Acta. - 1988.- 153. - P.165.

39 Thayer, J.S. Biological Properties of Metal Alkyl Derivatives. Metal Ions in Biological Systems. H. Sigel and A. Sigel. New York, Marcel Dekker. 1993. № 29. - P. 1–36.

40 Vahter, M. Metabolism of ⁷⁴As-labeled trivalent and pentavalent inorganic arsenic in mice / M.Vahter. // Environ Res. - 1980.- № 21(2). - P.446-457.

41 Walsh, C.T. Molecular basis of bacterial resistance to organomercurial and inorganic mercuric salts / C.T.Walsh, M.D. Distefano, M.J. Moore, L.M.Shewchuk. // FASEB J. - 1988.- № 2(2). - P.124-130.

42 Williams, R.J. Chemical selection of elements by cells / R.J.Williams. // Coordination Chemistry Reviews. - 2001.- № 217. - P.583–595.