

СООБЩЕНИЯ
ОБЪЕДИНЕННОГО
ИНСТИТУТА
ЯДЕРНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ

Дубна

P19-96-309

В.Подгурски*, А.П.Кобзев, Т.Студзински*,
А.Лятушински**, Т.Маевски*, Д.Мончка

ЭЛЕМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ
БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ
С ПОМОЩЬЮ ЯДЕРНО-ФИЗИЧЕСКИХ МЕТОДИК
RBS И PIXE

*Сельскохозяйственная академия, 20-031 Люблин, Польша

**Институт физики Университета имени Марии Кюри-Склодовской,
20-031 Люблин, Польша

1996

Элементный анализ биологических образцов
с помощью ядерно-физических методик RBS и PIXE

С помощью ядерно-физических методик выполнен элементный анализ образцов молока и мозга животных. Исследован состав как минералов (P, Cl, K, Ca), так и микропримесей (Mn, Fe, Co, Cu, Zn). Наблюдались элементы As, Se, Br, Rb, которые сложно определить методами классического элементного анализа, а также элементы Ti, V, Ni, Pb, обусловленные загрязнениями окружающей среды. Отмечалось присутствие тяжелых элементов в пробах молока, взятых в районах с высокой степенью урбанизации. Тяжелые металлы (в том числе свинец) обнаружены также в мозге животных, находившихся в городских условиях.

Работа выполнена в Лаборатории нейтронной физики им.И.М.Франка ОИЯИ.

Сообщение Объединенного института ядерных исследований. Дубна, 1996

Podgorski W. et al.

P19-96-309

Element Analysis of Biological Materials
by the RBS and PIXE Methods

The element analysis of the samples of cow milk and animal brain was performed by nuclear-physics methods. The contents of some minerals (P, Cl, K, Ca) and microelements (Mn, Fe, Co, Cu, Zn) in the brain of rats, dogs and cattle and in the milk of cows has been investigated. Such elements as As, Se, Br, Rb difficult to be detected by classic analytical methods, as well as environmental pollutants (Ti, V, Ni, Pb) were identified. Heavy metals were found in the samples of milk from industrial districts. Heavy metals (including Pb) were also found in the brain of animals living in the urban conditions.

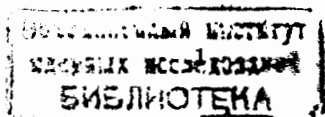
The investigation has been performed at the Frank Laboratory of Neutron Physics, JINR.

Введение

Проблема определения элементного состава в материалах биологического происхождения приобретает с годами все большую значимость во многих отраслях науки и техники, в частности в медицине и ветеринарии [1], в биологии, сельском хозяйстве и пищевой промышленности [2,3]. В этих целях используются как химические, так и физические методы. Среди физических методов довольно широкое распространение в различных лабораториях получили методики PIXE и RBS, которые продолжают совершенствоваться в направлении повышения чувствительности, экспрессности и расширения диапазона обнаруживаемых элементов [4]. Чувствительность этих методов при обнаружении тяжелых элементов в биологических объектах уже сейчас достигает ppm, а при специальной подготовке образцов может достигать даже уровня ppb. Тогда для анализа достаточно иметь малый объем исследуемого вещества или незначительную часть органа животного.

Наиболее успешно эти методики используются для определения загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами, а также для исследования биогенных свойств некоторых минеральных элементов и их влияния на метаболические процессы, происходящие в живых организмах. При исследовании биотических функций химических элементов в живых организмах использование этих методов позволяет локализовать их в отдельных органах, выяснить механизмы, исполнительные функции, а также определить их влияние на динамику метаболических перемен.

Важным преимуществом методов PIXE и RBS является также возможность применения образцов без их первичной обработки. Это существенно снижает уровень ошибок, которых, как правило, невозможно избежать, используя обычные аналитические процедуры. Настоящая работа представляет результаты исследований методами PIXE и RBS элементного состава молока, являющегося важной составной частью питания человека. Наибольший интерес представляло определение концентрации микропримесей тяжелых элементов, обусловленных загрязнением окружающей среды. В работе также исследовался элементный состав мозгового вещества домашних животных (собаки, коровы) и крыс. Был выявлен целый ряд элементов, среди которых находились и элементы, обладающие биогенными свойствами, такие как Br, Rb, Sr. Как известно [4], эти элементы довольно сложно обнаружить традиционными химическими методами, а названные методики обеспечили необходимую чувствительность и селективность.



Экспериментальная техника

В данной серии экспериментов предметом исследования являлись биологические объекты - мозговое вещество 17 крыс, 6 коров и 6 собак. Крысы породы Wistar разводились в лабораториях при сельскохозяйственной академии в г.Люблине. Не имевшие породы собаки были доставлены из разных районов г.Люблина. Коровы, мозговое вещество которых было использовано в опытах, предназначались для забоя на мясокомбинате. Из мозговой массы коров и собак использовались в экспериментах определенные части мозга, а именно striatum, hippocamp и nigra, а мозговая масса крыс использовалась целиком.

Для исследований использовалось также молоко, привезенное с молочных комбинатов г.Люблина (8 образцов) и с комбинатов, находящихся в районах с малой степенью урбанизации (10 образцов). Процедура подготовки образцов включала процесс лиофилизации (испарение при низкой температуре), перемешивание со спектрально чистым графитом в отношении 1:2 и прессование в таблетки.

Элементный анализ с помощью методик PIXE и RBS проводился на ускорителе типа Ван-де-Граафа ЛНФ ОИЯИ. Использовался пучок протонов с энергией 2,5 МэВ и интенсивностью около 10 нА. Графитовый коллиматор ограничивал диаметр пучка до 2 мм. Исследуемые образцы помещались в вакуумной камере на специальном держателе. Угол наклона образцов по отношению к оси пучка составлял 45° . При регистрации спектров PIXE и RBS количество протонов, участвующих в реакциях, определялось измерением заряда, перенесенного пучком протонов на образец за время экспозиции. Держатель с образцами находился в графитовом цилиндре, на который подавался потенциал -400 В для ограничения тока вторичных электронов. Индуцированное в образце вследствие бомбардировки протонами рентгеновское излучение выходило из камеры через металлизированное майларовое окно толщиной 10 мкм и попадало в детектор через бериллиевое окно толщиной 26,3 мкм. Измерение характеристического рентгеновского излучения проводилось с помощью Si(Li)-детектора, помещенного под углом 90° по отношению к оси пучка протонов. Его разрешающая способность составляла около 200 эВ для энергии 6,4 кэВ. Спектр упруго рассеянных протонов регистрировался с помощью поверхностно-барьерного детектора с разрешением около 20 кэВ, расположенного под углом 135° по отношению к пучку.

В качестве примера на рис.1 показан спектр характеристического рентгеновского излучения, возбуждаемого протонами с энергией 2,5 МэВ в образце молока. Подобные спектры получены для остальных образцов молока и мозговых масс. Они дали возможность определить элементный состав исследованных образцов с высокой точностью. Однако методом PIXE могли быть обнаружены и точно идентифицированы элементы более тяжелые, чем кремний. На указанном рисунке видны линии К-серии для 9 элементов от фосфора до стронция. Площади пиков были получены при обработке спектров рентгеновского излучения с помощью компьютерной программы, которая аппроксимировала экспериментальные пики гауссовским распределением, вычитала фон и обеспечивала точное определение энергии соответствующей спектральной линии, чем достигалась однозначная идентификация соответствующего элемента.

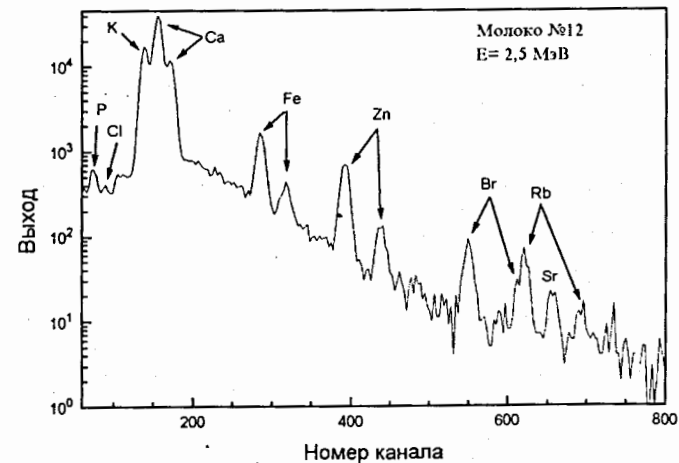


Рис.1 Спектр характеристического рентгеновского излучения, возбужденного протонами в образце молока.

Одновременно с измерением спектров характеристического излучения измерялись спектры протонов, рассеянных под углом 135° (рис. 2).

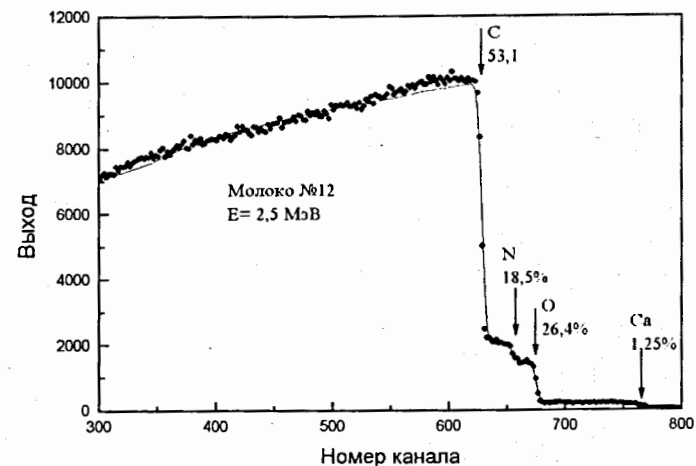


Рис. 2. Типичные экспериментальный и расчетный спектры RBS для образца молока. Атомные концентрации основных элементов указаны за вычетом добавляемого графита

Эти измерения преследовали две цели: во-первых, позволяли определить с достаточно высокой точностью основной состав элементов (преимущественно легких). Во-вторых, те из средних (по массе) и тяжелых элементов, концентрация которых оказывалась достаточно высокой, чтобы их удавалось обнаружить методом RBS, использовались в качестве внутренних стандартов при вычислении предельно малых концентраций элементов, определяемых только методом PIXE. Для образца молока №12 таким внутренним стандартом является кальций. Как видно на рисунке, экспериментальные спектры с высокой точностью описываются расчетом в рамках модели, предполагающей равномерное распределение элементов по глубине.

Для исследования обратного рассеяния протонов использовался поверхностно-барьерный детектор, помещенный под углом 135° по отношению к оси пучка протонов. На рис. 2 показаны экспериментальный и расчетный спектры обратно рассеянных протонов. Расчет выполнен для модели, состоящей из легких элементов: С, N, O, Са. Концентрация кальция хотя и составляет чуть больше 1 атомного процента, но определяется с относительной точностью не более 10%, что позволяет использовать ее в качестве внутреннего стандарта для спектров PIXE при вычислении концентрации микроэлементов.

Результаты элементного анализа

Всего в результате анализа 18 образцов молока и мозга было обнаружено и идентифицировано 20 элементов. В табл. 1 представлены атомные концентрации той группы элементов, которые обнаружены в большинстве образцов. Причем отсутствие водорода в этой группе объясняется тем, что этот элемент не может быть обнаружен ни одним из указанных методов. Это обстоятельство, а также предварительная обработка органических образцов - лиофилизация - существенно повысили концентрацию средних и тяжелых элементов.

Таблица 1. Концентрация элементов в образцах молока (в атомных процентах)

№	C	N	O	P	Cl	K	Ca	Fe	Cu	Zn	Br	Rb	Sr
1	41,9	22,9	32,5	0,33	0,16	0,66	1,48	0,033	0,008	0,037	0,012		0,005
2	55,6	15,2	27,5	0,14	0,14	0,48	0,90	0,024	0,015	0,23	0,006		0,004
3	34,6	25,4	37,1	0,49	0,49	0,65	1,30	0,042	0,003	0,13	0,006		0,012
4	47,5	15,9	34,5	0,12	0,25	0,56	1,19	0,012	0,005	0,028	0,005	0,003	0,004
5	47,0	18,6	27,5	0,24	0,34	0,36	0,72	0,009	0,011	0,013	0,005		0,002
6	46,2	21,0	30,8	0,34	0,12	0,40	1,08	0,011		0,015	0,005	0,007	0,001
7	55,0	11,9	31,1		0,12	0,55	1,32	0,002	0,014	0,024	0,002	0,008	0,003
8	61,8	12,9	23,3	0,12	0,12	0,48	1,33	0,003	0,006	0,018	0,006	0,008	
9	58,3	17,4	22,3	0,12	0,12	0,47	1,28	0,022	0,017	0,024	0,003	0,005	0,002
10	50,2	22,5	25,3	0,13	0,13	0,44	1,2	0,014	0,042	0,017	0,003	0,004	0,003
11	52,9	21,3	24,0	0,12	0,12	0,42	1,14	0,003	0,004	0,015	0,003	0,004	0,003
12	53,1	18,5	26,4	0,13	0,13	0,46	1,25	0,016		0,018	0,006	0,006	0,003
13	58,3	17,2	24,5	0,12	0,12	0,43	1,16	0,005	0,002	0,017	0,006	0,006	0,001
14	51,2	21,4	25,2	0,38	0,12	0,44	1,19	0,003	0,003	0,015	0,005	0,009	0,004
15	47,5	23,2	27,4	0,14		0,54	1,23	0,005	0,003	0,015	0,004	0,008	0,003
16	62,5	18,4	25,5	0,38	0,12	0,50	1,13	0,003	0,009	0,017	0,006	0,008	0,003
17	56,1	18,7	23,6	0,12		0,41	1,11	0,003		0,014	0,003	0,002	0,002
18	56,0	18,6	23,4	0,12	0,12	0,46	1,16	0,019		0,014	0,004	0,008	0,004

Таким образом, полученные результаты могут быть отнесены к исходным объектам исследования, молоку и мозгу, с некоторой поправкой на абсолютное значение концентраций. Относительные же значения концентраций, как будет показано ниже, определены с достаточно высокой точностью. Для той же группы элементов в таблице 2 приведен абсолютный и относительный разброс концентрации в 18 однотипных образцах (молоко).

Таблица 2. Усредненные концентрации элементов в молоке и их разброс

Элемент	Средняя концентр.	Разброс абсолютный	Разброс относит.%
C	52,3	6,9	13,4
N	18,6	4,0	22,5
O	27,3	4,1	15,4
P	0,26	0,12	61,3
Cl	0,19	0,06	41,0
K	0,48	0,08	16,7
Ca	1,18	0,16	14,1
Fe	0,0245	0,0526	220,7
Cu	0,0089	0,0092	105,5
Zn	0,0187	0,006	33,2
Br	0,005	0,0024	75,8
Rb	0,0062	0,002	34,6
Sr	0,0031	0,018	67,5

Разброс в 15-20% для большинства элементов, по-видимому, в основном характеризует относительную точность используемых методик. Реальный разброс содержания элементов, конечно, несколько завышает оценку точности. Для тех же элементов, для которых разброс составляет десятки и сотни процентов, объяснение следует искать во влиянии внешних условий. Промежуточное положение занимают элементы Sr, Rb и Br, т.е. такие элементы, которые сложно определить методом классического анализа, химического или инструментального, из-за их микроскопического количества. С помощью методики PIXE они обнаружены почти в каждом образце молока, и вариация их содержания в зависимости от внешних условий должна стать объектом дальнейших исследований.

Ещё одна группа элементов таких, как Pb, As, Ni, Co, Mn, V и Ti, обнаружена только в некоторых образцах. Так, Pb обнаружен в 6 образцах, Ni - в 5, Mn - в 4, V и Ti - в 3, As - в 2, и Co - в 1 образце молока (см. табл. 3). При этом существенно, что указанные элементы, большинство из которых входят в группу тяжелых металлов, найдены во всех образцах молока, доставленного из местности, находящейся на расстоянии около 2-х километров от расположенного там металлургического комбината, и только в одном образце (из 10 исследованных) молока, доставленного из районов с малой степенью урбанизации. Этот результат является прямым подтверждением влияния объектов технического прогресса на элементный состав продуктов питания.

Таблица 3. Концентрации редко встречающихся в молоке элементов, атомные %

Образец	Pb	As	Ni	Co	Mn	V	Ti
1	0,0044				0,0082		
2	0,0046		0,0122		0,0101		
3	0,0019				0,0034		
4		0,0005	0,004				
5		0,0004					
6	0,0002		0,0024			0,0044	0,0048
7	0,0002		0,0024			0,0044	0,0048
8	0,0002		0,0024			0,0044	0,0048
9				0,0008	0,0111		

Аналогичные результаты получены из анализа элементного состава мозговых клеток домашних животных. Таблица 4 дает среднюю измеренную концентрацию нескольких элементов, их абсолютное и относительное среднеквадратичное отклонение для 17 образцов мозгового вещества крыс, 6 образцов мозгового вещества коров и 6 образцов мозгового вещества собак.

Таблица 4. Средняя концентрация некоторых элементов, постоянно присутствующих в составе образцов мозга животных

	крысы			собаки			коровы		
	конц.	разбр.	%	конц.	разбр.	%	конц.	разбр.	%
K	1,31	0,30	23,8	1,30	0,09	7,8	1,33	0,05	3,8
Ca	0,52	0,24	47,1	0,47	0,26	60,0	0,18	0,22	130,6
Fe	0,047	0,016	36,1	0,028	0,005	17,5	0,045	0,005	11,1
Cu	0,0078	0,0032	45,4	0,0093	0,0072	85,3	0,0075	0,0056	81,2
Zn	0,0208	0,0029	14,4	0,0183	0,0062	36,9	0,0179	0,0058	35,6
Br	0,0059	0,0011	20,7	0,0018	0,0003	20,6	0,0020	0,0007	42,2
Rb	0,0044	0,0009	22,3	0,0052	0,0022	47,4	0,0043	0,0011	26,7
Sr	0,0033	0,0027	84,7	0,0003	0,0001	42,2	0,0002	0,00005	21,9

В таблицу не включены результаты определения С, О, и N, из которых, в основном, состоит мозговая масса (98%), так как их содержание легко определить традиционными методами. Во всех образцах мозга находились Rb, Sr, и Br. Известно, что эта группа элементов оказывает важное биологическое воздействие на определенные системы живых организмов.

Так, Br оказывает воздействие на нервную систему, Rb имеет влияние на электролитические системы, а Sr принимает участие в механизме затвердевания костей. Эти элементы, обнаруженные в исследованных образцах, подтверждают тот факт, что они присутствуют в любых живых организмах. Но с другой стороны, и это более важно, таблица 4 дает представление об относительных и абсолютных (с учетом указанных выше замечаний) концентрациях этих элементов.

В образцах мозговой массы крыс и собак обнаружен Se (таб. 5), который даже в микроскопическом количестве увеличивает сопротивляемость организма заразным заболеваниям и может защищать его от злокачественных заболеваний и поражения ионизирующим излучением. Уже было установлено ранее, что Se присутствует повсюду в

биологическом материале, однако в малых количествах, порядка нг/г. Возможно, что он имеется и в мозговом веществе коров, но в таких количествах, которые нами не могли быть обнаружены.

С биологической точки зрения интересен факт наличия As почти во всех образцах мозга крыс и отсутствия его в мозговой массе собак и коров. Пока трудно дать этому явлению однозначное объяснение - оно требует дополнительных исследований. Возможно, что присутствие As в мозге крыс является результатом специфических биологических свойств клеточной структуры мозга этих животных. Вместе с тем можно предположить и влияние определенных условий питания.

Таблица 5. Концентрация элементов, редко встречающихся в образцах мозга животных. А-число образцов данного типа, а-число образцов, в которых обнаружен указанный элемент, Y- средняя концентрация каждого элемента в атомных %

Элементы	Mn		Ni		As		Se		Pb		
	A	a	Y	a	Y	a	Y	a	Y	a	Y
Крысы	17			5	0,00098	15	0,00044	3	0,00043		
Собаки	6							2	0,00038	4	0,00040
Коровы	6	1	0,00062	2	0,00115						

Типичным примером влияния цивилизационных загрязнений на организмы животных являются результаты исследований содержания свинца, который, как известно, проникая в больших дозах, может существенно повредить клеточную структуру мозга. Этот элемент найден в 4 случаях из 6 исследованных образцов мозга собак. Эти животные жили в городских условиях, вдыхая воздух, загрязненный выхлопными газами автомобилей, содержащими свинец. Исследования образцов крыс и коров не показали присутствие свинца в их мозговой массе, так как эти животные находились в более экологически чистых условиях. Таким образом, проведенные исследования показали возможность исследования как основного состава, так и микроэлементов в биологических объектах с помощью методик PIXE и RBS. Причем методика PIXE оказалась достаточно чувствительной для обнаружения влияния объектов технической цивилизации на продукты питания и мозг животных.

Работа частично поддержана Комитетом по научным исследованиям Республики Польша, контракт № 3P40703205.

Литература

1. G.P.Buso, E.Valanti, G.Moschini and B.M.Stievano., X-ray and fluorescence (XRF and PIXE) in Medicine. Editor R.Cesareo, Italy, Roma, 1982.
2. O.Y.Asubiojo, F.Y.Iskander. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 155 (2), 256-270.1988.
3. G.V.Lyengar. Proceedings of the New Zealand. Dunedin. New Zealand. University of Otago. Department of Nutrition. 284-290. 1981.
4. А.П. Кобзев, Д.М.Широков. Препринт ОИЯИ Р14-91-516. Дубна, 1991.
5. J.Kajfosz, S.Szymczyk. Selenium in nutrition. Trace Elemental Analytical Chemistry in Medicine and Biology. 3. 151-158.1984.

Рукопись поступила в издательский отдел
23 августа 1996 года.