

СУЧАСНІ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ МІКРО- ТА МАКРОЕЛЕМЕНТІВ

Головним завданням при дослідженні взаємозв'язку вмісту мікроелементів в організмі із здоров'ям людини є вибір найбільш відповідних для цілей дослідження біосубстратів і методів аналізу. Відомо, що хімічні елементи акумулюються у всіх органах і тканинах, в клітинах крові (еритроцити, лейкоцити, лімфоцити, тромбоцити і інших) і в придатках шкіри (волосся і нігтьях). Волосся і нігті придатні для неінвазивної діагностики.

Слід зауважити, що серед діагностичних біосубстратів (кров, сеча, нігті, зубний дентин і слина) волосся володіє найвищою інформативністю для оцінки дії як токсичних речовин, так і оцінки рівня ряду есенціальних макро- і мікроелементів в організмі. Елементний склад крові знаходиться під жорстким впливом систем, регулюючих гомеостаз організму: дефіцит Mg, Ca в крові виявляється пізніше, ніж в кістках, зубному дентині, волосся і нігтьях. Рівень цих найважливіших для гомеостазу елементів при їх дефіциті тривалий час підтримується з депо, в першу чергу, з кісткових тканин, а в крові зберігається нормальним або субнормальним. Дефіцит цих металів реєструється в крові із значним запізненням в часі, при виснаженні депо, при глибоких дефіцитах, що важко піддаються корекції. Інформативність крові при діагностові хронічних дій нейротоксичних Cd, Hg і Pb рівнозначна інформативності волосся, сечі, нігтів. При цьому накопичення Pb, As, Cd, Hg, Tl краще виявляється при аналізі елементів в цільній крові, а вміст Al, Mn, Se, Li - в сироватці крові. Динамічність елементного складу крові пояснюється впливом на її склад різноманітних ендогенних і екзогенних стресових і дієтичних чинників. Так, кров є якнайкращим субстратом для діагностики при гострому отруєнні металами. При хронічних діях надмалих доз, при дисбалансі есенціального елементного складу концентрація Pb, Cd, Se в крові може бути настільки мала, що кількісне визначення цих металів вимагає додаткових лабораторних прийомів, таких як: концентрація крові, висушування або осадження білків.

Звичайно, мікроелементний склад крові першим реагує на дію підвищених концентрацій важких металів в довкіллі, проте він не відображає дійсного вмісту в організмі важких металів. Важливо досліджувати такий біосубстрат, який є швидше клітинним, ніж рідинним, причому метаболічно активним. Волосся краще, ніж така індикаторна середа, як кров і сеча, відповідають більшості цих вимог, оскільки вони є другими по порядку метаболічно активною тканиною

після кісткового мозку. В той же час волосся характеризується фіксованою динамікою росту (0,2-0,5 мм в день) і містить “запис” не лише того, що відбувалося з обміном речовин в найближчому минулому, але і інформацію про його стан у віддаленішому періоді. В цьому відношенні унікальною властивістю волосся є те, що вони можуть зберігати дані про процеси метаболізму, зокрема мінерального обміну. Мінерали, що одного дня включилися у волосся, не можуть бути включені назад в метаболізм організму. Найявні дані ясно показують, що вміст мікроелементів у волоссі можуть використовуватися як скринінговий метод і відображати мікроелементний статус організму в цілому.

Таким чином, акумуляція в організмі таких токсичних елементів, як Cd, Hg, Pb, Tl, в першу чергу відбивається на їх акумуляції у волоссі, сечі, нігтях. Окрім функції депонування макро- і мікроелементів, волосся і нігті відображають процес їх елімінації з організму.

Отже, кров – одна з найбільш динамічної середі, що знаходиться під впливом різноманітних ендогенних і екзогенних (стресових, дієтичних і професійних) чинників. Найбільш показними за змістом мікроелементів зразками біоматеріалів є щільні тканини: кістки, хрящі, шкіра, волосся і нігті. Оскільки прижиттєвий збір кістково-хрящових зразків практично неможливий або надзвичайно обмежений (випавші молочні зуби у дітей, біопсія, забір посічених тканин при оперативних втручаннях), то волосся і нігті є ідеальними об'єктами для скринінгових медико-екологічних досліджень. Порівняння інформативності біосубстратів для визначення макро- і мікроелементів проведене E. Sabbioni та співавторами і представлено в таблиці 5.

Таблиця 5. Інформативність визначення МЕ в різних біосубстратах (E. Sabbioni)

МЕ	СМР	КРОВ	СЕЧА	ВОЛОССЯ	КІСТЬ І ХРЯЩ	СЛИНА
As	N	+	+	+	N	N
Al	N	-	-	+	+	N
Ba	N	-	-	+	+	N
Bi	N	+	-	-	N	N
B	N	-	-	+	+	N
Cd	N	+	+	+	+	N
Ca	N	+	+	+	+	N
Cr	N	+	+	-	N	N
Co	N	+	-	-	N	N
Cu	+	+	+	+	N	N
F	N	-	-	-	+	+
Fe	+	-	-	+	N	N
Pb	N	+	-	+	+	N
Mg	N	-	-	+	+	N
Mn	+	-	-	-	+	N
Mo	N	-	-	-	+	N
Hg	N	+	+	-	N	N
P	N	-	-	+	+	N

Se	+	+	-	-	N	N
Si	N	-	-	-	+	N
Li	N	-	-	-	N	+
I	N	-	-	-	N	+
Ag	N	+	-	-	+	N
Sr	N	-	-	+	+	N
Tl	N	+	-	-	N	N
V	N	-	-	-	+	N
Zn	+	+	-	+	N	+

Примітка: «+» - репрезентативність; «- » - не представляє значущості; N - дані відсутні.

Крім того, у зв'язку із загрозою поширення вірусних інфекцій при масових обстеженнях останнім часом віддається перевага неінвазивним методам досліджень, що унеможливають зараження. До додаткових переваг вивчення МЕ у волоссі відноситься простота забору матеріалу, можливість його тривалого зберігання а також те, що біоматриця волосся простіша, ніж в крові і сечі. Крім того, волосся поєднують депонуючі і акумулюючі властивості з функцією елімінації МаЕ і МЕ з організму. Все це дає можливість по елементному аналізу волосся проводити ретроспективний аналіз і прогноз елементного статусу.

Таким чином, в даний час оптимальним біосубстратом для оцінки елементного статусу прийнято цільну кров, волосся і нігті. Крім того важливими об'єктами дослідження можуть стати сеча та спинномозкова рідина, вміст металів в яких відображає обмін елементів в реальному режимі часу.

Сучасні методи аналізу дозволяють визначати вміст в зразку більшості елементів періодичної таблиці Д. І. Менделєєва з малою

навіскою об'єкта. Для визначення вмісту мікроелементів в біопробах застосовуються методи, що забезпечують достовірну реєстрацію досліджуваного елементу на рівні не менше 0,1 мкг/кг при навісці близько 0,1 грам.

Для аналізу біопроб широко використовуються наступні методи:

- метод атомної абсорбційної спектроскопії з атомізацією в полум'ї (ААС в полум'ї);
- метод атомної абсорбційної спектроскопії з атомізацією в графітовій кюветі (ААС з графітовою кюветою);
- метод атомно-емісійної спектроскопії зі збудженням в індукційно-зв'язаній плазмі (ІЗП-АЕС);
- мас-спектрометричний метод з іонізацією в індукційно-зв'язаній плазмі (ІЗП-МС).

Вказані вище методи передбачають проведення озолення на стадії пробопідготовки і переводу проби в рідкий стан. Для цього застосовуються муфельні печі або спеціалізовані автоклави, в яких поєднуються всі етапи пробопідготовки.

Найбільш сучасним методом пробопідготовки є пробопідготовка в пластикових автоклавах з нагрівом в СВЧ-пічках. Нижче (таблиця 6) приведені можливі діапазони виявлення при використанні цих методів для аналізу біопроб.

Найбільш доступними методами аналізу мікроелементів є ААС в полум'ї і ААС з графітовою кюветою. З використанням їх добре відпрацьовані методики кількісного аналізу багатьох об'єктів. Недоліком методів ААС є необхідність збільшення об'єму проби і тривалості аналізу при збільшенні числа аналізованих елементів.

**Таблиця 6. Діапазони виміру концентрацій мікроелементів
при використанні різних методів**

Використовуваний метод	Діапазон виміру концентрацій мікроелементів
ААС в полум'ї	$10^{-2} \div 10^2$ мг/л
ААС з графітовою кюветою	$10^{-4} \div 10$ мг/л
ІЗП-АЕС	$10^{-3} \div 1$ мг/л
ІЗП-МС	$10^{-6} \div 10^2$ мг/л

Недоліком методу ІЗП-АЕС є його низька чутливість. Це обмежує можливість його використання або передбачає введення в цикл пробопідготовки додаткової операції – концентрації проби, що, у свою чергу, збільшує помилку виміру.

Найбільш інформативним методом аналізу мікроелементного складу біопроб є метод ІЗП-МС, що дозволяє аналізувати кількісно «практично всю таблицю Менделєєва» на рівні слідів елементів з мінімальним навішуванням. Істотним недоліком методу є його дорожнеча, що обмежує його використання в умовах клініки.

МЕТОДИКА ПРОВЕДЕННЯ АТОМНО АБСОРБЦІЙНОГО АНАЛІЗУ

Атомна абсорбція спектрометрія (ААС) - сучасний загально визнаний метод аналізу елементного складу будь-якого технічного або природного об'єкту по атомних спектрах поглинання і використовується в даний час для визначення близько сімдесяти елементів, що мають резонансні лінії в області спектру від 190 до 900 нм. Перевагами методу ААС є його висока чутливість та виняткова селективність. Основні труднощі при використанні даного методу для досліджень в біології та медицині виникають у зв'язку з наявністю в об'єкті матриці, вплив якої на абсорбцію визначуваного елементу може бути значною. Для нейтралізації матричних впливів існують методики, які будуть описані в наступних розділах.

ФІЗИЧНІ ОСНОВИ АТОМНОЇ АБСОРБЦІЙОЇ СПЕКТРОМЕТРІЇ

Явище атомної абсорбції, полягає в поглинанні монохромного світла вільними атомами хімічних елементів. Поглинаючи світло, вільні атоми переходять з основного енергетичного стану з енергією E_0 в збуджений стан з енергією E_1 , де $E_1 > E_0$. Частота поглиненого кванта світла ν атомом елементу пов'язана з енергіями станів E_0 і E_1 рівнянням Бору:

$$E_1 - E_0 = h\nu$$

де, h - постійна Планка.

Кожному хімічному елементу відповідає "своя" частота поглинання, тобто, довжина хвилі, при якій спостерігатися атомне поглинання. Найбільше поглинання спостерігається під час переходу електрона з основного на більш близький до йому рівень, так звана "резонансна" лінія.

Інтенсивність світла, що пройшло крізь шар абсорбції залежить від його товщини, згідно рівняння Бугера-Ламберта:

$$I = I_0 e^{-k l C} \quad (1.1)$$

де I - інтенсивність світла, що проходить, I_0 - інтенсивність падаючого світла, l - товщина оптичного шару, k - абсорбційний

коефіцієнт, тобто здатність шару абсорбувати світло, C - концентрація вільних атомів в шарі.

Спільний закон абсорбції світла (закон Бера) має вигляд:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = k \cdot l \cdot C, \quad (1.2)$$

З формули (1.2) виходить, що залежність між абсорбцією A і концентрацією C лінійна, а температура атомізатора на поглинання не впливає.

МЕТРОЛОГІЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДА.

Характеристична маса (концентрація)

Для визначення чутливості АА виміру введено поняття характеристичної маси - m_0 (1.3), тобто маси аналізованого елемента в пробі, що викликає поглинання 0.0044 одиниць поглинання (1 % абсорбції) при розпиленні чистих розчинів

$$m_0 = \frac{m}{A} \lg \left(\frac{100}{99} \right), \quad (1.3)$$

де m - введена в піч маса елемента.

Для підвищення чутливості методу, тобто для зниження характеристичної маси, необхідно оптимальне розділення аналітичної резонансної лінії від інших близьких ліній (зменшення ширини монохроматора); оптимізація умов атомізації (оптимальне співвідношення ацетелену-кисню, висоти полум'я, введення буферних добавок); збільшення кількості та дисперсії аерозолу, що надходить в полум'я.

Межа визначення

Межа визначення – це найменша концентрація чи найменша абсолютна кількість елемента, що знаходиться в розчині та визначається із заданою довірчою вірогідністю.

Відтворюваність

Відтворюваність результатів – це характеристика випадкових похибок. Відтворюваність аналітичного методу визначається випадковими похибками, які виникають на всіх стадіях аналітичного

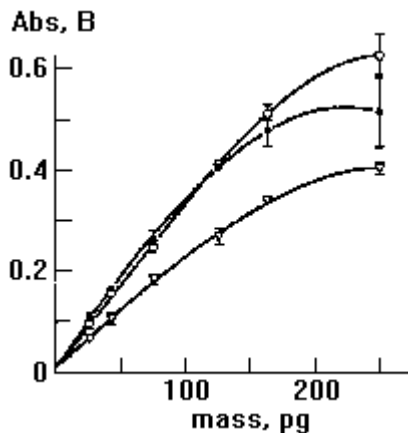
процесу, включаючи забір проби, пробопідготовку и безпосередньо вимірювання аналітичного сигналу

Правильність

Правильність характеризується відхиленням середнього результату багаторазових визначень від істиного (достовірно встановленого) вмісту елемента в пробі. Основною причиною систематичних помилок в атомно-абсорбційному аналізі є впливи, викликані відмінністю складу проби та калібровочних розчинів. Крім того, на правильність результату можуть впливати як часовий доєйф нульової лінії так і часовий дрейф чутливості

ГРАДУЮВАННЯ (КАЛІБРОВКА) ПРИЛАДУ

Будь-яке визначення концентрації в ЕТААС включає як необхідну операцію градуювання приладу, яке полягає в тому, що в атомізатор послідовно вводять розчини з відомою концентрацією визначуваного елемента (розчини порівняння), і будують графік залежності оптичної щільності A від концентрації або введеної маси аналізованого елемента мал. 1.1.



Малюнок 1.1. Градувальні графіки в ЕТААС.

Оскільки така залежність сильно залежить від конкретного типу приладу, атомізатора, складу матриці проби і умов атомізації, кожен градувальний графік унікальний. Тобто перед кожним

окремим циклом вимірювання необхідно проводити градування приладу. Використовувати градувальний графік минулого вимірювання неприпустимо.

Для приготування серії градувальних розчинів використовуються стандартні зразки водних розчинів солей металів - ГСОРМ, що поставляються в запаяних скляних ампулах ємністю по 6 мл. 5 мл розчину ГСОРМ поміщається в мірну колбу на 100 мл і розбавляється "нульовим" розчином до об'єму 100 мл. Отриманий розчин називається "еталонним" і призначений для приготування серії градувальних розчинів і подальшого тривалого зберігання при температурі 4⁰С. Перед використанням "еталонний" розчин необхідно підігріти до температури 20-25⁰С. Для отримання градувальних розчинів необхідно використовувати хімічно чистий посуд. Готові розчини для полуменевого атомізатора, концентрацією понад 1 мг/л можна зберігати до 1 місяця, розчини з меншою концентрацією є нестабільними, тому їх необхідно готувати безпосередньо перед проведенням калібровки приладу.

ДЖЕРЕЛА МОНОХРОМАТИЧНОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ.

Як джерело монохроматичного випромінювання в атомній абсорбційній спектроскопії найчастіше використовуються лампа з порожнистим катодом (ЛПК). Промисловими типами ЛПК є скляні або кварцеві балони, заповнені інертним газом (Ar, Ne, Хе) під тиском 10-2Па.

Катоди ламп виготовляють з одного елемента або сплаву декількох елементів у вигляді циліндра з крізною порожниною або відкритого з одного кінця. Найбільш поширеною в аналітичній практиці формою полого катода є циліндрова порожнина, відкрита з одного кінця (діаметром 4 - 4.5 мм). Анодом є штир або коаксіальний з катодом порожнистий циліндр.

Електроживлення ЛПК зазвичай здійснюється постійним струмом від стандартних джерел з напругою ~600В. Спектральні і електричні характеристики ЛПК в імпульсному режимі електроживлення значно збільшують інтенсивність резонансних ліній, проте одночасно відбувається їх розширення.

Останнім часом в нових приладах використовується одне джерело випромінювання (190 – 900 нм) - ксенонова лампа високого тиску з короткою дугою. Інтенсивність такої лампи щонайменше в 100 разів перевищує інтенсивність випромінювання звичайної лампи ЛПК у

всьому спектральному діапазоні. Хоча інтенсивність випромінювання не впливає на чутливість самого методу ААС, вона значно впливає на відношення "сигнал-шум". Також на відміну від ЛПК така лампа не втрачає при зберіганні своїх експлуатаційних властивостей.

СПЕКТРАЛЬНІ ПЕРЕШКОДИ ПРИ ААС І ЇХ КОРЕКЦІЯ

Накладення ліній. Через малу спектральну ширину і невеликої кількості ліній поглинання вірогідність збігу ліній нікчемно мала, і ці впливи в атомній абсорбції спектроскопії незначні в порівнянні з емісійними. Все ж деякі збіги резонансних аналітичних ліній із слабкими лініями елементів, що заважають, можливі, наприклад: Au 242.79нм - Fe 242.82нм; Hg 253.65нм - Co 253.65нм; Cu 324.75нм - Eu 324.75нм. Ці перешкоди дають себе знати лише при значному надлишку (1:500) компонента, що заважає. Спектральних перешкод можна уникнути переходом на іншу лінію поглинання або хімічним відділенням компонента, що заважає.

Фонове поглинання світла. Фонове поглинання - основна спектральна перешкода в атомному абсорбційному аналізі. Це поглинання пов'язане з розсіюванням світла або молекулярною абсорбцією. Молекулярна абсорбція світла пов'язана з електронними переходами в молекулах і радикал-іонах, що є продуктами піролізу матриці, таких як SO*, SO₂, SO₃, PO*, NO*, CAO, CaOH*, MgOH*, NaCl, KBr, KI, і ін. Молекулярні смуги ALO в області спектру 437-542нм, SIO 241-292нм, CAO 547-556нм часто дають перешкоди при спектральному аналізі. Якщо елемент утворює стабільну молекулу, концентрація вільних атомів зменшується і спектральна лінія ослабляється.

Поглинання, що викликається молекулярною абсорбцією, сильно залежить від довжини хвилі спектру поглинання. Особливе сильне молекулярне поглинання NaCl, COO і CaOH* - основних компонентів геологічних і біологічних об'єктів.

Корекція фонового поглинання. Для здобуття достовірних результатів аналізу в атомній абсорбції спектрометрії необхідна корекція фонового поглинання резонансного випромінювання. Зараз широко використовують три методи корекції:

1. Метод Зеємана (*Zeeman*), заснований на розщеплюванні ліній поглинання в змінному магнітному полі (*Z-метод*).
2. Корекція розширенням лінії випромінювання, за рахунок її самообернення при імпульсі великого струму лампи з порожнистим катодом (*SH-метод*).

3. Корекція другим джерелом суцільного спектру (*D-метод*), коли фонове поглинання вимірюється при просвічуванні аналітичного вічка джерелом випромінювання з суцільним спектром (зазвичай дейтерієвою дуговою лампою).

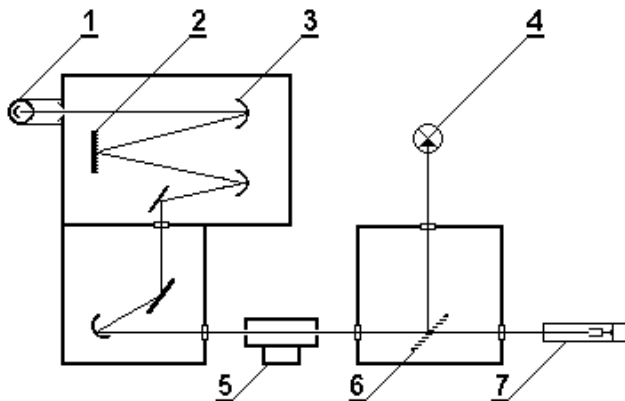
ПРИЛАДИ І УСТАТКУВАННЯ

Дана методика передбачає використання серійного атомного абсорбційного комплексу *KAC-120.1* виробництва АТ “Selmi” (м. Суми, Україна). Комплекс призначений для визначення концентрації хімічних елементів в рідких пробах різного походження і складу в умовах хіміко-біологічних лабораторій дослідницьких установ і промислових підприємств.

До складу комплексу *KAC-120.1* входять:

- спектрофотометр *C-115-м1*;
- комплект “Графіт - 2”;
- пристрій подачі проб;
- персональний комп'ютер.

Комплекс *KAC-120.1* оснащений як полумєневим атомізатором, так і електротермічним атомізатором *A-5*, який являє собою піч Массмана. Для атомізації використовується графітова порожниста трубка (довжина *28мм*, внутрішній діаметр *6мм*) аналог печі *HGA-500* фірми *Perkin Elmer*. Температурний діапазон роботи печі *290-3340K*, швидкість розігрівання в режимі “1” до *2000K/с*, в режимі “2” більше *2000K/с*, погрішність установки температури $\pm 20K$, об'єм проби *5-50 мкл*, що дозується. Комплекс має двопроменевий спектрофотометр *C-115-м1*, оптична схема, якого представлена на мал. 2.1.



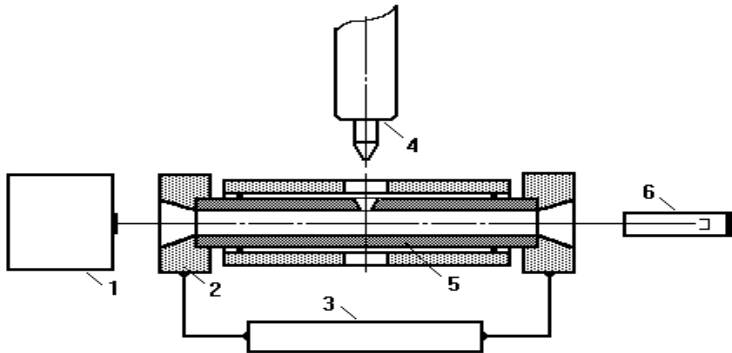
Малюнок 2.1. Оптична схема спектрофотометра *C-115-м1*

Випромінювання від лампи з порожнистим катодом *ЛТ-2 - 7* і дейтерієвої лампи *ДДС-30 - 4* у вигляді зміщених за часом світлових імпульсів надходять на напівпрозоре дзеркало - 6. Випромінювання проходить крізь поглинаючий шар атомної пари в атомізаторі - 5 і спрямовується системою дзеркал - 3 на монохроматор (дифракційні решітки) - 2 і надходять на фотоприймач (*ФЕУ*). Підсилювач-перетворювач забезпечує посилення імпульсів і перетворить їх в тривалість по лінійному і логарифмічному закону залежно від вибраної шкали: світлопропускання або оптична щільність.

Спектрофотометр *C-115-м1* має наступні технічні характеристики:

- | | |
|--|--------------------|
| • Спектральний діапазон вимірів, <i>нм</i> | <i>190-900</i> |
| • Спектральний дозвіл, <i>нм</i> не більш | <i>0.1</i> |
| • Діапазон виміру оптичної щільності, <i>mB</i> | <i>0-2000</i> |
| • Діапазон виміру масової концентрації | <i>10-100 Схар</i> |
| • Характеристична концентрація, <i>mg/l</i> | |
| по міді | <i>0.05</i> |
| по алюмінію | <i>0.6</i> |
| • Межа виявлення, <i>mg/l</i> | |
| по міді | <i>0.005</i> |
| по алюмінію | <i>0.15</i> |
| • Абсолютна погрішність виміру поглинання атестованих світлофільтрів, не більш | <i>0.01</i> |
| • Абсолютна погрішність виміру масової концентрації в робочому діапазоні | <i>5 Схар</i> |

На мал. 2.2 представлена блок схема комплексу з електротермічним атомізатором А-5.



Малюнок 2.2. Схема атомного абсорбційного комплексу; 1 - приймальний пристрій; 2 - графітові електроди; 3 - програматор; 4 - дозатор; 5 - графітова піч; 6 - джерело світла.

Аналізована проба (у вигляді розчину) заздалегідь поміщається за допомогою дозатора всередину печі. Графітова піч - 5 розігрівається електричним струмом, що проходить через неї, до температури атомізації проби по заданій в програматорі - 3 програмі. Всередину печі подається інертний газ аргон для продування і видалення продуктів піролізу проби. При температурі атомізації проба утворює атомну пару, крізь яку проходить промінь монохромного світла і поступає на приймальний пристрій, - 1, де визначається залежність інтенсивності пройденого світла від часу.

Отримані в приймальному пристрої сигнали зберігаються і обробляються за допомогою комп'ютера *IBM*. Використовувана апаратура дозволяє отримувати залежність атомного поглинання від часу з дозволом 0.016 с.

НОРМИ ПОГРІШНОСТІ ВИМІРІВ

Відтворюваність аналітичного методу визначається випадковими погрішностями аналізу, що виникають на всіх стадіях аналітичного процесу, як при попередній підготовці проби, так і при атомно-абсорбційних вимірах. Відносна погрішність виміру концентрацій елементів даної методики складається з погрішностей на наступних стадіях:

- приготування розчинів ГСОПМ 1.0 %;
- приготування калібрувального розчину 2.0 %;
- приготування градуювальних розчинів 3.7 %;
- розведення аналізованої проби 2.0 %;
- дозування проби в атомізатор 2.7 %;
- визначення оптичної щільності 10.0 %.

Сумарна відтворюваність виміру згідно закону складання помилок може бути представлена наступною формулою:

$$S = S_1 + S_2 + \dots + S_N$$

де, $S_1, S_2 \dots S_N$ стандартні відхилення точності приготування розчинів, флюктуаций джерела, атомізатора, реєструючого пристрої, і так далі

Згідно вищезгаданому закону дана методика забезпечує виміри концентрацій визначуваних елементів з сумарною відносною погрішністю не більше 11.4% при довірчій вірогідності 95% (0.95). Погрішність виміру може бути значно понижена при дозуванні проб в атомізатор автоматичним саплером, приготуванні всіх розчинів гравіметричним способом і при вищому струмі лампи ЛТ-2.

ЗАСОБИ ВИМІРІВ І ДОПОМІЖНІ ПРИСТРОЇ

При виконанні аналізу біологічних проб застосовують наступні вимірювальні засоби і пристрої:

- комплекс КАС 120.1, ТУ 25-7416.0131-88;
- посуд лабораторний скляний, ГОСТ 25336-82;
- посуд мірний, ГОСТ 1770-74, ГОСТ 20292-74;
- стандартні зразки складу водних розчинів солей металів, ГСОПМ-4, ГСОПМ-23 - 27;
- кислота азотна реактивна розбавлена «ХЧ», ГОСТ 4461-77;
- ваги аналітичні АДВ - 200М, ГОСТ 19491-74;
- гирі аналітичні ГА - 200А, ГОСТ 7328-82.

5. ВИМОГИ БЕЗПЕКИ

УВАГА! У зв'язку з використанням агресивних речовин (концентрованих кислот, лугів), балонів із стислими газами, а також приладів з напругою до 1000В всі роботи в атомній

абсорбційній лабораторії відносяться до категорії підвищеної небезпеки.

До самостійних робіт в лабораторії допускаються особи, що мають спеціальну хімічну освіту - хіміки, інженери-хіміки, лаборанти хімічного аналізу і так далі, пройшли інструктаж по техніці безпеки в хімічних лабораторіях і що мають необхідний досвід роботи.

При роботі в хімічній лабораторії повинні знаходитися не менше двох чоловік, що уміють надавати першу медичну допомогу. Особи у хворобливому стані, при поганому самопочутті, а також з ранами і пошкодженнями рук до роботи не допускаються.

Перед початком роботи з комплексом *КАС 120.1* необхідно перевірити наявність і справність заземлення всіх його складених блоків і пристроїв, переконатися у відсутності оголених дротів, розібраних блоків.

При поводженні з концентрованою азотною кислотою слід бути особливо уважним, оскільки кислота і її пари легко взаємодіють з багатьма речовинами, викликаючи сильні опіки і отруєння.

В разі порушення правил техніки безпеки в хімічних лабораторіях особи відстороняються безпосереднім керівником від праць до перездачі правил техніки безпеки.

ВИМОГИ ДО КВАЛІФІКАЦІЇ ПЕРСОНАЛУ

Всі особи, що виконують самостійні роботи в хімічній лабораторії повинні мати спеціальну хімічну освіту. Пробоподготовка повинна виконуватися лише кваліфікованим хіміком-аналітиком.

Особи, що безпосередньо виконують виміри на атомному абсорбційному комплексі *КАС 120.1* повинні пройти спеціальний курс вчення фізико-хімічним основам атомного абсорбційного методу аналізу, вивчити пристрій комплексу і документацію до нього з подальшою перевіркою знань керівником робіт і мати допуск до роботи з балонами під тиском.

Безпосереднє керівництво в хімічній лабораторії покладається на кваліфікованого інженера - хіміка, що забезпечує методичний і технічний контроль виконуваних робіт.

УМОВИ ВИМІРІВ

При виконанні вимірів дотримують умови, викладені в технічному описі і інструкції з експлуатації комплексу *КАС 120.1 - 2.851.034-04 TE* і інших допоміжних засобів і пристроїв виміру:

- температура довкілля, 0°C 10 - 35;
- максимальна відносна вологість при температурі 250°C % 80;
- атмосферний тиск, *kPa* 84 – 106.7.

В наслідок високої чутливості методу, в приміщенні, в якому виконуються виміри, недопустимі роботи, що приводять до запилення і забруднення повітря. Співробітники повинні переодягатися і міняти взуття в спеціальному буферному приміщенні, підтримувати чистоту на робочих місцях і не допускати захаращення.

У хімічній лабораторії неприпустимо вживання їжі, куріння, протяги, різкі перепади температури. Провітрювання приміщення повинне проводитися до або після вимірів на *КАС 120.1*.

ПІДГОТОВКА ДО ВИКОНАННЯ ВИМІРІВ

Пробопідготовка, тобто підготовка проби до аналізу на атомному абсорбційному комплексі вносить найбільшу долю погрішності до результатів вимірів концентрацій аналізованих металів і, в основному, визначає достовірність вимірів. Унаслідок низької концентрації аналізованих металів в деяких біологічних об'єктах (10^{-8} - $10^{-4}\%$) пред'являються підвищені вимоги до чистоти реактивів, посуду і матеріалів, і особливо, до кваліфікації персоналу, оскільки відтворюваність методу визначається випадковими погрішностями аналізу, що виникають на всіх стадіях аналітичного процесу.

Перед початком пробопідготовки необхідно ретельно вимити хімічний посуд, який застосовуватиметься в роботі. Скляний посуд зазвичай очищають розчином гарячої хромової кислоти (дихромат калія в сірчаній кислоті) при цьому слід врахувати сорбцію хрому на поверхні скла, що приводить до спотворення результатів вимірів концентрації хрому, унаслідок подальшої десорбції іонів хрому в аналізований розчин. Лужні розчини перманганату калія значно більше руйнують скло і приводять до сорбції марганцю. Вказаних недоліків позбавлений миючий засіб для скляного посуду, що складається з рівних об'ємів 6N розчину HCL і 6% розчину перекису водню.

Для обполіскування хімічного посуду і приготування розчинів окрім звичайної води – дистилату, необхідно приготувати бідистильовану воду - бідистилат. Для цієї мети збирається лабораторна перегінна установка, в якій дистильована вода повторно переганяється. Неприпустимо додавання в дистилат перманганату калія з метою спалювання органічних сполук (масел), оскільки іони, що утворюються при цьому, разом з парами води надходять в приймач бідистилату. З цією метою допустиме вживання перекису водню, що містить незначну кількість домішок. Останнім етапом підготування посуду є її «закислення». Для цього ретельно вимитий посуд замочують в 50% розчині азотної кислоти (ХЧ або ЧДА) протягом доби. Після висушування посуд може зберігатися в щільно зачиненій шафі не більше 1 тижня. Після цього терміну необхідне повторне проведення процедури миття посуду.

Атомний абсорбційний аналіз є відносним методом, що вимагає градування спектрофотометра по серії градувальних розчинів із заздалегідь відомими концентраціями аналізованих елементів. Концентрації визначуваних металів градувальних розчинів повинні перебивати концентрації аналізованих розчинів. У випадках визначення "слідів" металів в пробі ці концентрації можуть бути значно понижені.

Всі аналізовані розчини мають бути приготовані на основі "нульового" розчину, що є фоном вимірів. Для цього готується 0.1N розчин азотної кислоти ($pH=1.05$). У правильно приготованому "нульовому" розчині концентрація аналізованих металів має бути нижче за межу їх виявлення.

Для приготування серії градувальних розчинів використовуються стандартні зразки водних розчинів солей металів - ГСОПМ, що поставляються в запаяних скляних ампулах ємністю по 6 мл. 5 мл розчину ГСОПМ поміщається в мірну колбу на 100 мл і розбавляються "нульовим" розчином до об'єму 100 мл. Отриманий розчин називається "еталонним" і призначений для приготування серії градувальних розчинів і подальшого тривалого зберігання.

Пробопідготовка зводиться до розкладання проби концентрованою азотною кислотою в тефлоновому автоклаві (так звана мінералізація проби). Для цього навіска проби поміщається в автоклав і додається 0.5-1.0 мл азотної кислоти. Автоклав герметично закривається і протягом години розігрівається на електронічній печі до температури 120-150С. Після охолодження автоклава мінералізат переноситься в мірну пробірку і розбавляється "нульовим" розчином

до об'єму 10 мл. Дана методика дозволяє зберегти максимально точну концентрацію елементів в розчині.

За відсутності тefлонового автоклава, можна скористатися керамічними тefлями (попередньо ретельно вимитими та «підкисленими»), в яких проводиться спалювання органічної проби, при температурі 450°C в муфельній печі. Щоб уникнути зменшення кількості елементів в пробі на даному етапі, не рекомендується підвищувати дану температуру. Спалювання проводиться впродовж 2-14 днів залежно від виду проби. Після озолення проводиться мінералізація проби в розчинах соляної і азотної кислот (упарити 2 мл соляною і довести до кипіння в 1 мл азотної кислоти). Після охолодження мінералізація переноситься в мірну пробірку і розбавляється "нульовим" розчином до об'єму 10 мл.

Всі розчини мають бути ретельно перемішані. Перемішування склянню паличкою вносить додаткові забруднення і тому небажано. Переважне перемішування розчинів струшуванням нахилених пробірок, для чого їх слід заповнювати лише на половину.

Перед виконанням вимірів градувальні розчини об'ємом по 5 мл розміщуються в штативі в п'яти пробірках ємністю по 10мл. Поруч поміщається пробірка з "нульовим" розчином і пробірки з аналізованими розчинами. Слід зазначити, що градувальні розчини на відміну від еталонних не підлягають зберіганню і повинні використовуватися для градування приладу в день приготування. Оскільки при зберіганні дуже розбавлених розчинів концентрація їх поступово зменшується унаслідок сорбції металів на поверхні скла посуду. Цей ефект виявляється при концентраціях 1 - 10 мг/л і нижче.

ВИКОНАННЯ ВИМІРІВ

При виконанні вимірів концентрацій визначуваних елементів комплекс *KAC-120.1* готується до роботи згідно з його технічним описом і інструкцією з експлуатації 2.851. 034 - ТЕ. Спекрофотометр має бути переведений в режим "вимір" (допускається режим "нуль" або "безперервний вимір"). Для охолодження атомизатора в його холодильник подається вода з тиском 1-2 ат. Тиск стислого аргону на виході з редуктора має бути на рівні 5 ат.

Відповідно до таблиці 1 ЗАСТОСУВАННЯ вибираються спектрохімічні умови аналізу, а відповідно до таблиці 2 ЗАСТОСУВАННЯ режим атомізації.

Для корекції неатомних поглинань включається дейтерієва лампа. Проводити виміри на *KAC-120.1* без корекції неприпустимо із-

за великих перешкод з боку неатомних поглинань. Для охолодження дейтерієвої лампи включається компресор і відкривається клапан обдування лампи стислим повітрям.

Запускається робоча програма "AAS_SPEKTR". Регулюванням струму ламп і напруги ФЕУ добиваються інтенсивності випромінювання 90 - 110 % і входять в режим визначення стабільності роботи ламп. У цьому режимі прилад прогрівається 20-30 хв до повного припинення дрейфу нуля, на графіці цей достаток представляється двома паралельними лініями. Якщо протягом 30 хвилин дрейф нуля не припиняється необхідно понизити напругу ФЕУ або замінити спектральну лампу ЛТ-2 після чого регулювання повторюється.

Перед початком вимірів обпалюється графітова кювета до повного видалення слідів визначуваного елемента. Температура випалення має бути на 100 - 200С вище за температуру атомізації, витрата аргону для обдування печі має бути максимальною. Неприпустимо використовувати для аналізу відпрацьовані печі, форма яких змінилася. Така "економія" приводить до втрати частини проби і значного спотворення результатів.

Для визначення оптичної щільності програма "AAS_SPEKTR" переводиться в режим "калібрування" або "безпосереднього виміру". Початок сканування сигналу задається за допомогою програматора у вигляді спеціального кроку програми представленого в прикладі оформлення результатів.

При використанні як сигналу площі піку замість його висоти усуваються перешкоди, пов'язані з різною швидкістю випару визначуваного елемента і матриці. При цьому покращується лінійність калібрувального графіка і правильність виміру, але при цьому важно вибрати оптимальний час інтеграції, оскільки "хвости" піків є джерелами шумів.

Визначається оптична щільність, спочатку – градувальних розчинів, потім - аналізованого розчину. Для досягнення прийнятої в методиці надійності 95% (0.95) слід виконати не менше 7 – 8 паралельних вимірів оптичної щільності кожного розчину.

Під час атомізації величина сигналу оптичної щільності повинна пройти через максимум з подальшим падінням до нуля. Тривалість атомізації повинна цьому відповідати, якщо рівень сигналу не досягає нуля, слід підвищити температуру атомізації.

В разі "запізнювання" піку, тобто коли максимальний пік з'являється в самому кінці атомізації, слід збільшити тривалість

згорання проби оскільки в цьому випадку матриця проби не руйнувалася і утримує визначуваний елемент.

Під час вимірів на КАС-120.1 робоча програма "AAS_SPEKTR" автоматично записує в створюваний нею файл результати вимірів, як максимумів оптичної щільності, так і інтегральні площі піків які використовуються програмою "AAS_SPEKTR" для математичної обробки даних.

ОБРОБКА РЕЗУЛЬТАТІВ ВИМІРІВ

Статистична математична обробка результатів вимірів виконується комп'ютером за допомогою програми "AAS_SPEKTR" згідно наступному алгоритму:

- По значеннях оптичної щільності, отриманих при аналізі градувальних розчинів, будується крива залежності оптичної щільності від концентрації елементу в розчині і по ній визначається концентрація елементу в аналізованому розчині. Критерієм оцінки правильного вибору ступеню апроксимуючого полінома є відсутність екстремумів на градувальній кривій при мінімальному значенні середнього квадратних відхилень кривої від калібрувальних точок.

- Розраховується середнє арифметичне, X :

$$X_m = \frac{\sum X_i}{n}$$

де, X_i - одиничний результат вимірів; n - кількість вимірів.

- Визначається стандартне відхилення, S :

$$S = \frac{\sum (X_i - X_m)^2}{n - 1}$$

- Знаходиться середня квадратична помилка:

$$A = \frac{S}{n^{0.5}}$$

- Обчислюється погрішність виміру %:

$$P = 100 \cdot \frac{A}{X_m}$$

- Обчислюється коефіцієнт Стьюдента - t для $f = n - 1$ при довірчій вірогідності 95% (0.95) відповідний таблиці:

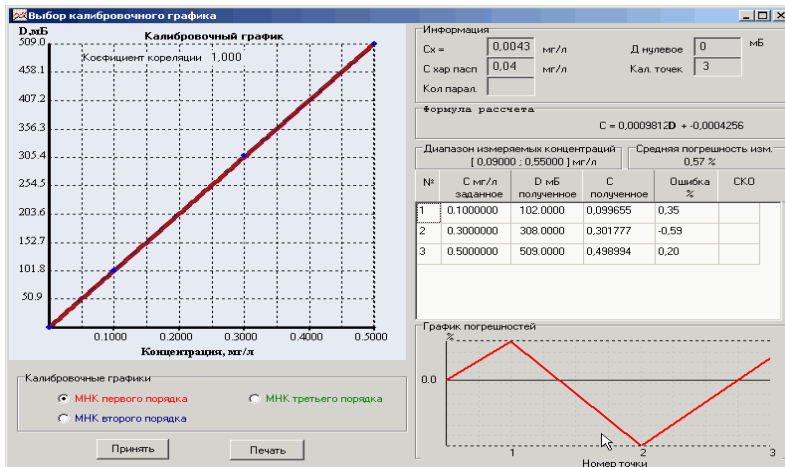
f	3	4	5	6	7	8	9
t	3.20	2.78	2.57	2.45	2.37	2.31	2.26

- Визначається довірчий інтервал вимірів:

$$L = t \cdot A$$

- З вірогідністю 0.95 встановлюють інтервальне значення концентрації визначуваного елементу в аналізованому розчині:

$$X = X_m \pm t \cdot A$$



На додаток до програми "AAS_SPEKTR" перевіряються одиничні результати вимірів на грубий промах, для чого визначаємо приналежність кожного виміру інтервалу $3S$: $X - 3S < X_i < X + 3S$. В разі випадання X_i з інтервалу $3S$ значення X_i відкидають. Після перевірки результатів вимірів на грубий промах повторно

розраховують середнє арифметичне \bar{X}_m і стандартне відхилення S , де n - кількість дійсних вимірів, що залишилися, після перевірки X_i на приналежність інтервалу $3S$.

ОФОРМЛЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ВИМІРІВ

Результати вимірів концентрацій аналізованих металів мають бути представлені у вигляді текстового файлу створеного програмою AAS_SPEKTR, що зберігається на ПЕВМ або на гнучкому магнітному диску - ГМД з інформацією про пробу, режим аналізу і отримані результати. Детальніша інформація про вміст інформаційного файлу і оформлення результатів вимірів міститься в описі програми "AAS_SPEKTR" при її запуску на комп'ютері.