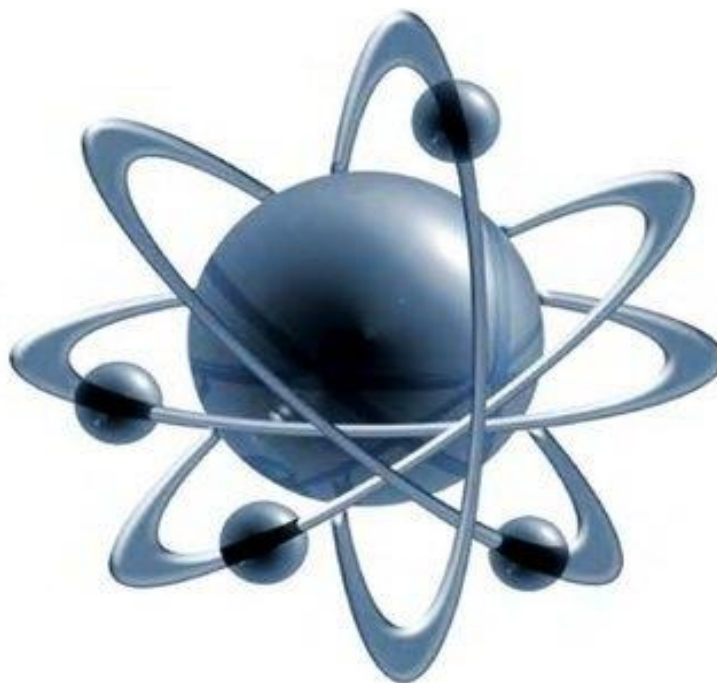


**КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

**Химический институт им.А.М.Бутлерова
Кафедра аналитической химии**

**АНАЛИЗ
СЛЕДОВЫХ КОЛИЧЕСТВ ВЕЩЕСТВ**

Е.Е.Стойкова, А.В.Порфирьева, Г.А.Евтюгин



Казань - 2010

Печатается по решению Научно-методического совета Химического института им.А.М.Бутлерова Казанского (Приволжского) федерального университета

Рецензент: доктор химических наук, профессор Будников Г.К.

АНАЛИЗ СЛЕДОВЫХ КОЛИЧЕСТВ ВЕЩЕСТВ / Е.Е.Стойкова, А.В.Порфирьева, Г.А.Евтюгин. - Казань, Казанский (Приволжский) федеральный университет им.В.И. Ульянова-Ленина, 2010.- 72 с.

Учебно-методическое пособие к курсу "Аналитическая химия следовых количеств веществ" для студентов 4 курса дневной формы обучения Химического института им.А.М.Бутлерова, специальность "Химия", и биолого-почвенного факультета, специальности "Молекулярная фармакология" и "Биология". В пособии рассмотрены основные факторы, определяющие аналитические характеристики определения следовых количеств элементов и соединений в объектах различного состава, способы пробоподготовки, разделения и концентрирования следов элементов. Большое внимание уделено современным физическим методам анализа биологических объектов, позволяющим регистрировать единичные биомолекулы, а также биохимическим методам контроля таких соединений. Пособие подготовлено при поддержке Программы Президента Российской Федерации для поддержки молодых российских ученых (грант МКР-249.2009.3).

СОДЕРЖАНИЕ

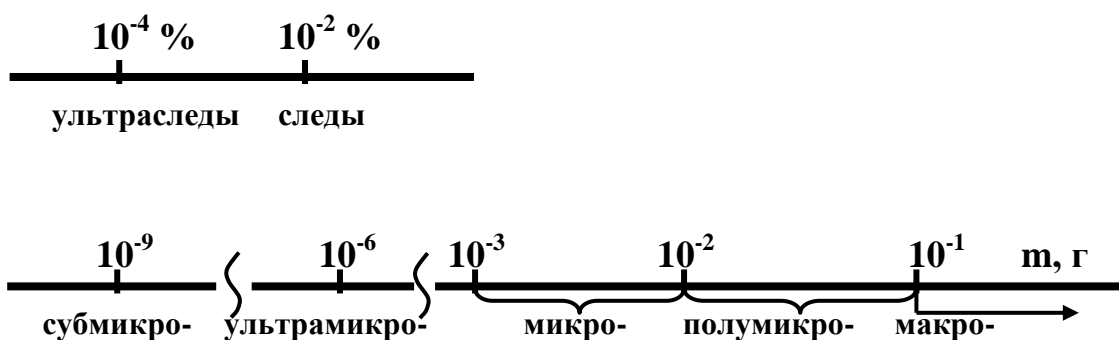
Общие аспекты определения следов элементов	4
Выбор методов определения СЭ	5
Роль следовых количеств элементов в физических и химических явлениях	12
Микроэлементы в биологических системах	15
Источники потерь и загрязнений при определении низких концентраций веществ	19
Роль матрицы при определении следовых количеств веществ	22
Разделение и предварительное концентрирование в определении следовых количеств элементов и веществ	23
Основные физико-химические методы определения СЭ	36
Методы определения единичных молекул	39
ДНК-сенсоры	56
Иммунохимические методы определения	62
Заключение	67
Рекомендуемая литература	69
Приложение. Вопросы для подготовки к зачету	70

ОБЩИЕ АСПЕКТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЛЕДОВ ЭЛЕМЕНТОВ

Все возрастающая роль очень небольших количеств элементов в химических, физических и биологических системах в значительной степени стимулировала расширение области применения различных аналитических методов для определения этих элементов. Это привело к развитию специализированной аппаратуры, методологии и к выделению отдельной области – **аналитической химии следовых количеств**.

Под термином «**следы**» понимают очень малые количества элемента, содержащиеся в пробе, причем верхний предел содержания следов составляет 10^{-2} %. Для концентраций ниже 10^{-4} % используют термин «**ультраследы**».

Для абсолютных содержаний вещества в пробе (в граммах) используются понятия субмикроколичества (10^{-9} г), ультрамикро- (10^{-6} г), микро- (10^{-3} - 10^{-2} г), полумикро- (10^{-2} - 10^{-1} г) и макроколичества ($>10^{-1}$ г).



Определение следов элементов (СЭ) может потребоваться в различных условиях проведения анализа. Наиболее часто встречаются следующие:

- прямое определение следов элементов в относительно большом объеме пробы; это наиболее сложный вид анализа, предъявляющий наибольшие требования к чувствительности и селективности определения следовых количеств вещества или элемента;

- предварительное концентрирование микропримесей в виде концентрата с удалением основных количеств макроэлементов матрицы для улучшения предела обнаружения или устранения влияния основы. Данный вариант традиционно используется при анализе объектов, не предъявляющих специальных требований к объему пробы. Пример – анализ поверхностных вод или почв на содержание тяжелых металлов;

- определение малых локальных концентраций примесей в большом объеме пробы. По сравнению с другими приведенными вариантами в этом случае приходится учитывать неравномерность распределения примесей по объему анализируемого образца;

- определение больших и малых количеств веществ / элементов в малых по объему пробах. Пример – анализ биологических систем, для которых отбор больших проб невозможен или неприемлем по этическим соображениям или медицинским показаниям

В каждом из этих случаев необходимо применение высокочувствительных методов анализа, специфика их применения определяется не только видом анализа, но и природой определяемых компонентов.

ВЫБОР МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЭ

Наиболее важными критериями при выборе подходящего метода определения СЭ является чувствительность, точность, воспроизводимость и избирательность анализа. Большое практическое значение имеют также такие характеристики методов, как подготовка проб и стандартов, стоимость оборудования и продолжительность анализа.

Чувствительность. Это понятие отражает способность аналитического метода обнаруживать разницу между различными количествами определяемого вещества. Величина этой разницы зависит от характера связи между измеряемым сигналом и количеством присутствующего элемента. Чаще всего для количественного определения веществ используется линейная градуировочная зависимость (рис.1). В этом случае способность метода различать сигналы пропорциональна тангенсу угла наклона линейного участка зависимости величины этого сигнала от количества определяемого компонента. С математической точки зрения чувствительность (обозначается S – sensitivity) равна величине первой производной соответствующей зависимости:

$$S = \operatorname{tg} \alpha = \frac{\Delta y}{\Delta x}$$

Градуировочный график

$$S = \frac{dy}{dx}$$

Градуировочная зависимость

Следует отметить, что часто, говоря о чувствительности метода, имеют в виду концентрации, соответствующие интервалу линейности градуировочного графика либо пределу обнаружения (см. ниже). Сопоставление таких значений чувствительности будет справедливо только для методов, характеризующихся близкими параметрами определения, в частности, близкой шириной интервала линейности градуировочного графика. Также следует отметить, что все указанные характеристики чувствительности можно сравнивать только в том случае, когда линейные зависимости получают в одинаковой системе координат.



Рис.1. Определение чувствительности метода по линейному градуировочному графику

Минимальные количества вещества (элемента) или их концентрации, которые могут быть обнаружены указанным методом, характеризуют предел обнаружения (c_{lim} , $c_{\text{мин}}$, раньше использовалось сокращение ПрО). Величина предела обнаружения зависит от точности измерения полезного аналитического сигнала и его величины в холостом опыте (в отсутствие определяемого вещества).

Предел обнаружения - наименьшее содержание определяемого вещества (аналита), при котором он может быть обнаружен по данной методике анализа с заданной точностью. Пределом обнаружения обычно считают содержание аналита, при котором регистрируемый сигнал достоверно отличается от сигнала холостого измерения. Существует достаточно много подходов к определению предела обнаружения, из которых наиболее распространено правило $s/n = 3$ (часто используется выражение «критерий 3σ »), то есть достижение троекратного превышения погрешности холостого сигнала. При условии нормального распределения результатов измерения и одинаковом значении относительной погрешности измерения сигнала в холостом опыте и в присутствии аналита в концентрации, равной $c_{\text{мин}}$, данное условие отвечает 99.8% вероятности достоверного отличия полезного сигнала от измерения в холостом опыте.

Более точно, для расчета предела обнаружения необходимо установить градуировочную зависимость $y = a + bx$ и установить стандартные отклонения регрессионных параметров s_A и s_B для a и b , соответственно, а также коэффициент регрессии R . После этого рассчитывается минимально значимый полезный аналитический сигнал y_0 :

$$y_0 = t(\bar{P}, f) \sqrt{s_A^2 + s_B^2}$$

Здесь $t(\bar{P}, f)$ – табличное значение коэффициента Стьюдента для доверительной вероятности \bar{P} и числа степеней свободы f ($f = n-1$, где n – число измерений). Предел обнаружения рассчитывают по формуле:

$$c_{\text{lim}} = 2 \frac{y_0}{b} \frac{(1+R) \frac{s_A}{\sqrt{s_A^2 + s_B^2}} t(\bar{P}, f) \left(\frac{s_B}{b}\right)}{1 - t(\bar{P}, f) \left(\frac{s_B}{b}\right)^2}$$

Оба метода расчета дают сходные результаты.

Предел обнаружения может выражаться как абсолютным значением концентрации (количества) вещества, так и его процентным содержанием в анализируемом образце. В соответствии с этим его называют абсолютным и относительным пределом обнаружения.

При рассмотрении элементного состава образца (анализ почв, вод на содержание тяжелых металлов, анализ сплавов и т.д.) $c_{\text{мин}}$ обычно выражают в мкг/мл или мкг/г. Распространение получили и английские аббревиатуры выражения относительных величин – ppm (part per million, = мг/кг) ppb (part per billion, = мкг/кг).

Значения пределов обнаружения определяются не только методом анализа, но и способами подготовки пробы и предварительного концентрирования, которые могут существенно – на несколько порядков величины – повышать чувствительность и снижать предел обнаружения определяемого вещества. Тем не менее, можно говорить об определенных характерных (типичных) значениях данных характеристик, относящихся к наиболее употребительным способам подготовки пробы, связанным с особенностями проведения измерения и ограничениями, накладываемыми соответствующим аналитическим оборудованием. Рассмотрим некоторые характеристики распространенных методов.

Рентгеноспектральный эмиссионный анализ. Предел обнаружения сильно зависит от природы матрицы и толщины пробы; обычные значения составляют $n \times (10^{-4} - 10^{-3})$ %, при использовании предварительного концентрирования абсолютное значение $c_{\text{мин}}$ может составлять несколько нанограмм.

Методы изотопного разбавления. $c_{\text{мин}}$ достигает $10^{-9} - 10^{-17}$ г.

Вольтамперометрические методы анализа. Для различных вариантов модуляции сигнала абсолютные значения $c_{\text{мин}}$ составляют $10^{-6} - 10^{-10}$ г, причем требуемый объем пробы может достигать всего 0.1 мкл, существуют пленочные микроячейки с полезным объемом до 1 мкл. Наименьшим значением отличается инверсионная вольтамперометрия, предполагающая концентрирование

определяемого элемента непосредственно на рабочем электроде. В частности, определение ртути, кадмия, свинца, меди и цинка в инверсионной вольтамперометрии характеризуется значениями $c_{\text{мин}}$ на уровне 0.1-1 нг. Полярография с классическим капельным электродом дает величины $c_{\text{мин}}$ до $n \times 10^{-7}$ г в постоянноточковом режиме и до 1×10^{-8} г – в осциллополярографическом. Такие же предельные концентрации достижимы в вариантах с анодным растворением и накоплением в висящей ртутной капле. При этом минимальный объем ячейки составляет около 0.5 мл.

Другие электрохимические методы анализа характеризуются существенно меньшими чувствительностями. Так, кулонометрия позволяет определять до 10^{-4} % воды в органических растворителях (модифицированный метод Фишера) и до 1 мкг серебра, в том числе, в покрытиях металлических изделий. Эти же методы позволяют проводить определение до 0.1 мкг окисляющихся органических соединений.

Атомно-абсорбционная спектроскопия. При использовании пламенной атомизации достижимы значения $c_{\text{мин}}$ на уровне 0.1-10 мкг/л для большинства элементов I и II групп. Для свинца, теллура, алюминия, сурьмы, молибдена, платины, висмута, титана, кремния и селена пределы обнаружения составляют 10-100 мкг/л. При электротермической атомизации из объема образца 20 мл определяются 0.005-0.05 мкг/л цинка, кадмия, магния и серебра, 0.05-0.5 мкг/л алюминия, хрома, марганца, кобальта, меди, железа, молибдена, бария, кальция, свинца и 0.5-5 мкг/л большинства других элементов.

Атомно-эмиссионный анализ с индуктивно связанной плазмой дает пределы обнаружения менее 1 мкг/л для лития, бериллия, щелочноземельных металлов, скандия, иттрия, титана, циркония, ванадия, хрома, марганца, железа, кобальта, никеля, меди, цинка, бора, серебра, кадмия, рения, лантана, 1-10 мкг/л для натрия, калия, алюминия, кремния, фосфора, серы, галлия, германия, мышьяка, селена, индия, олова, сурьмы, платиновых металлов, вольфрама, золота, ртути, таллия, свинца, висмута, церия, урана. Современные системы атомно-эмиссионного анализа позволяют осуществлять локальный анализ, в том числе, для определения следов металлов в биологических тканях с пределами обнаружения до 1 нг и массой среза биологических тканей до 10 нг.

Для определения органических соединений, в том числе, биомолекул живых организмов, чаще всего используются *хроматографические методы анализа*. Их характеристики в значительной степени определяются конструкцией детектора и другими особенностями аппаратного оформления. Некоторые характеристики наиболее распространенных детекторов газо-жидкостной и высокоэффективной жидкостной хроматографии приведены в табл.1. Следует помнить, что в отличие от большинства других методов анализа, хроматография одна не обеспечивает надежной идентификации определяемого соединения (за

исключением масс-спектрометрических детекторов, пока слишком сложных и дорогостоящих для повсеместного использования). По этой причине реальные концентрации определяемых органических соединений, особенно олигомерных, остаются заведомо выше теоретических пределов их обнаружения.

Кроме того, ряд детекторов обладает высокой специфичностью в отношении определяемых соединений. Так, электрозахватный детектор в ГЖХ с наибольшей чувствительностью позволяет определять соединения, содержащие в своем составе атомы галогенов. Флуоресцентный детектор обладает максимальной чувствительностью определения соединений, способных к вынужденному излучению – флуоресценции. Это в основном полиароматические и ненасыщенные гетероциклические соединения. Поскольку такие фрагменты часто присутствуют в биомолекулах, флуоресцентный анализ, в том числе, с хроматографическим разделением и концентрированием, активно применяется в органическом анализе *in vivo* и *in vitro*.

Таблица 1

Пределы обнаружения соединений
в хроматографии с различными типами детекторов

Детектор	$C_{\text{мин}}$
Пламенно-ионизационный	10^{-12} г
Катарометр	10^{-12} г/мл
Электронного захвата	10^{-14} г/мл
Термоионный	10^{-15} г
ИК-спектрометр	>1 мкг
Масс-спектрометр	10^{-12} - 10^{-14} г
Пламенно-фотометрический	10^{-11} - 10^{-12} г
Фотоионизационный	10^{-13} г
Флуоресцентный	10^{-13} – 10^{-15} г

Хемилюминесцентные методы анализа обеспечивают значения $C_{\text{мин}}$ на уровне 10^{-5} - 10^{-7} М (методы прямого окисления), при использовании специальных приемов повышения чувствительности с включением дополнительных реагентов – до 10^{-10} М. Высокая специфичность хемилюминесцентных методов, сигнал которых «привязан» к строго

определенной реакции, делает их привлекательными в различных вариантах иммунохимических и других биохимических методов анализа.

Масс-спектрометрические методы анализа характеризуются абсолютными значениями $c_{\text{мин}}$ до $10^{-6} - 10^{-15}$ г. Так при атомизации с помощью электронного спрея определяются до 5×10^8 атомов аргона, 2×10^{-11} см³ ксенона.

Метрологические характеристики. При выборе между методами с адекватной чувствительностью определения следовых количеств веществ необходимо выбрать метод с более высокой точностью анализа. В настоящее время произошли существенные изменения в требованиях к характеристике точности метода анализа в связи с введением ИСО 5725. Поэтому дадим некоторые наиболее употребительные определения:

Правильность – степень близости результата измерений к истинному или условно истинному (действительному) значению измеряемой величины или в случае отсутствия эталона измеряемой величины – степень близости среднего значения, полученного на основании большой серии результатов измерений к принятому опорному значению. Показателем правильности является значение систематической погрешности.

Прецизионность – степень близости друг к другу независимых результатов измерений, полученных в конкретных установленных условиях.

Экстремальными выражениями прецизионности являются понятия сходимости (повторяемости) и воспроизводимости. Последнее понятие учитывает влияние на результаты измерений конкретных факторов, определяющих изменчивость результатов (оператор, выполняющий собственно измерения, используемое оборудование, параметры окружающей среды, интервал времени между измерениями и т.д.)

Все отклонения результатов измерения от истинного значения измеряемой величины определяются случайными и систематическими ошибками. Случайные ошибки не смещают среднее значение результатов измерений от истинного значения, тогда как систематические ошибки такое смещение вызывают. Как правило, систематические ошибки возникают при неправильном планировании эксперимента или подготовке оборудования (неправильная калибровка, смещение нулевого значения шкалы). К источнику систематической ошибки определения вещества, имеющей особое значение при определении следовых количеств веществ, относится присутствие определяемого вещества (элемента) во вспомогательных реагентах (растворителях, используемых в хроматографии, экстрагентах, сорбентах и пр.). Присутствие систематической ошибки измерения нельзя установить чисто статистическими методами. Для этого требуется привлечение независимых данных о составе образца, например, использование других надежных методов измерения с другими принципами измерения сигнала. Другим способом установления систематической ошибки

является использование стандартных образцов с известным содержанием определяемого компонента.

Если систематические ошибки отсутствуют, точность измерения характеризуется величиной относительного стандартного отклонения. Это отношение (в %) абсолютного стандартного отклонения к среднему значению содержания, полученному в серии измерений. Относительное стандартное отклонение минимально в середине интервала определяемых концентраций, закономерно увеличиваясь к предельным значениям концентраций. Отклонение максимально при концентрациях, близких к $c_{\text{мин}}$. Оценка случайной составляющей результатов измерений в химическом анализе производится с помощью различных статистических методов анализа. Для обычного размера выборки для этого используется закон нормального распределения, в котором вероятность отклонения результата измерения от математического ожидания (истинного значения) описывается функцией Гаусса:

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} \exp \left[-\frac{(x - \bar{x})^2}{2\sigma^2} \right]$$

Здесь $f(x)$ – функция распределения вероятности совпадения результата измерения x с его математическим ожиданием \bar{x} , а σ^2 называется дисперсией. Функция нормального распределения справедлива для бесконечно большой выборки измерений. Однако предполагается выполнимость данного уравнения и для конечных выборок. При этом вместо математического ожидания используется среднеарифметическое всех результатов измерения, а приближением величины σ (квадратный корень из дисперсии) является величина среднеквадратического отклонения. Допущение о нормальном характере распределения позволяет оценить доверительный интервал Δx среднего значения \bar{x} с заданной степенью надежности (доверительной вероятности P) с использованием табличных значений коэффициента Стьюдента $t(P, f)$:

$$\Delta x = t(P, f) s_x$$

Избирательность. При определении следовых количеств веществ и элементов исключительно большое значение имеет мешающее влияние компонентов пробы. Ее макро- и микрокомпоненты способны не только изменить абсолютное значение сигнала, но и уменьшить чувствительность определения.

Избирательность анализа (селективность) - возможность определять или обнаруживать искомый компонент в присутствии других сопутствующих компонентов. Избирательность анализа характеризуют числом сопутствующих компонентов, которые не мешают определению искомого компонента, и максимальными отношениями содержаний каждого из сопутствующих и

искомого компонентов, при которых еще возможно надежное определение или обнаружение последнего (факторами селективности). Наиболее высокой избирательностью характеризуются такие методы многокомпонентного анализа как масс-спектрометрия, нейтронно-активационный анализ, газожидкостная хроматография и др. Избирательность может быть повышена путем оптимизации различных параметров инструментальных методов, а также совершенствованием пробоподготовки, направленной на отделение или снижение содержания мешающих компонентов пробы.

Итак, чувствительность, точность, воспроизводимость и избирательность – основные факторы, которыми руководствуются при выборе метода определения СЭ.

РОЛЬ СЛЕДОВЫХ КОЛИЧЕСТВ ЭЛЕМЕНТОВ В ФИЗИЧЕСКИХ И ХИМИЧЕСКИХ ЯВЛЕНИЯХ

Влияние следов элементов на широкий круг разнообразных физических и химических процессов очень велико. Многие физические и химические явления зависят от присутствия следовых количеств примесей. Рассмотрение этих явлений позволит лучше понять важность исследований по определению следов элементов для науки и технологии.

Электронные явления в твердых телах. Важная область, где проявляется влияние примесей, связана с электрическими, магнитными и оптическими свойствами, обусловленными поведением электронов в материалах.

Наиболее известные электронные эффекты, обусловленные примесными элементами, - *p*- и *n*-проводимость полупроводниковых материалов. Основные электрические свойства полупроводников определяются концентрациями примесных атомов на уровне 10^{-4} – 10^{-7} %. При этом имеет значение не только количество примесных атомов, но и их распределение в основном материале (сверхчистом кремнии). Их направленное внедрение в отдельные области полупроводника позволяет получать миниатюрные диоды и транзисторы с контактирующими областями *p*- и *n*-проводимости, полученными путем внедрения соответственно атомов бора и фосфора или мышьяка. И наоборот, присутствие нежелательных примесей аналогичного действия способно резко ухудшить параметры полупроводниковых приборов. Это – лишь часть проблемы получения сверхчистых материалов, востребованных не только в полупроводниковой промышленности, но и при производстве катализаторов, электромеханических устройств, новых композитных материалов и т.д.

Металлы высокой степени чистоты при низких температурах обладают свойствами сверхпроводимости, при этом температура перехода к сверхпроводимости зависит от количества примесей в металле. Наибольшее

значение имеют парамагнитные примеси. Так, 0.01 % железа понижает температуру перехода молибдена к сверхпроводимости до примерно 0.3 К по сравнению с 0.92 К для чистого металла. Иридий и родий становятся полностью сверхпроводящими при наличии в них примесей редкоземельных элементов.

Следы примесей оказывают значительное влияние и на *магнитные свойства* материалов. Так, магнитные свойства железа с высокой магнитной проницаемостью зависят от содержания углерода, серы, азота, кислорода.

Чувствительны к примесям свойства кристаллов, применяемых в лазерах. Материалы для лазеров (CaF_2 , CaWO_4 , Al_2O_3) в своей кристаллической решетке содержат небольшие концентрации ионов редкоземельных или переходных металлов. Другие примеси и дефекты кристалла приводят к уширению флуоресцентных линий. Излучение лазера в микроволновом диапазоне спектра более чувствительно к примесям, чем излучение лазера. Примеси Fe^{3+} в рубине ($\text{Cr(III)-Al}_2\text{O}_3$) отрицательно сказываются на данных свойствах кристалла.

Следы элементов имеют большое значение для люминесцентных материалов. Активаторы люминесценции увеличивают ее интенсивность, ингибиторы – снижают. Помимо влияния на характеристики люминофоров, эти реакции находят применение для высокочувствительного определения самих активаторов и ингибиторов. Такие методы позволяют определять до 10^{-4} % примесей.

Атомные явления в твердых телах. Еще одна область, где присутствие примесей влияет на свойства твердых тел – это свойства, обусловленные движением атомов. Присутствие примесей оказывает существенное влияние на механические свойства металлов. Так, ряд труднообрабатываемых металлов при достижении некоторого уровня чистоты легко поддается обработке. Например, вольфрам, содержащий примеси в количестве 2×10^{-2} %, хрупок и трудно обрабатывается, а при содержании примесей меньше 10^{-3} % обрабатывается легко. Присутствие 5×10^{-3} % серебра в свинце приводит к увеличению жесткости решетки и повышению прочности на разрыв.

Контроль содержания примесей очень важен для процесса выращивания кристаллов, который является основой многих технологических процессов. Одна из важнейших проблем – чистота контейнеров, используемых для выращивания кристаллов. Например, монокристаллы кремния выращивают из расплава при высокой температуре, когда возможны реакции со стенками контейнера и загрязнение расплава материалом контейнера и содержащимися в нем примесями. Наличие примесей может влиять на рост и качество кристалла. Адсорбция примесей уменьшает скорость роста кристалла и, как следствие, приводит к образованию в нем различных дефектов кристаллической решетки.

Особой проблемой является чистота конструкционных материалов для ядерных реакторов. Основная причина – большое сечение захвата нейтронов у

многих элементов-примесей, содержащихся в реакторных материалах, что приводит к уменьшению плотности потока нейтронов в реакторе. Примером является примесь гафния в цирконии. Сечение захвата нейтронов у гафния равно ~ 120 бн (барн – 10^{-24} м²), у циркония – 0.18 бн. При этом химические свойства циркония и гафния так близки, что их разделение чрезвычайно затруднительно. Другая причина использования чистых материалов в реакторостроении состоит в том, что некоторые из них поддаются обработке только в очень чистом виде. Так, очень малые количества кислорода, азота и водорода в цирконии превращают этот ковкий и прочный металл в твердый и хрупкий материал, неудобный для обработки.

Присутствие примесей влияет на протекание многих *химических реакций*. Так, следы некоторых веществ и материалов тормозят цепные реакции, эффективность такого ингибирования зависит от способности примеси взаимодействовать с промежуточными продуктами реакции, выступая в качестве ловушек радикальных частиц и тем самым останавливая реакционные цепи. Так, на протекание реакции водорода с кислородом существенно влияет присутствие примесных количеств пропана. Высокую чувствительность к химическому составу реагентов предъявляют также многие каталитические реакции. Это особенно характерно для поливалентных металлов и аморфных соединений. Например, присутствие ртути ускоряет фотохимические реакции, а следовые количества соединений хрома (III) меняют соотношение цис-транс изомеров непредельных продуктов реакции дегидрирования длинноцепочечных алканов. Хорошо известно влияние следовых количеств пероксида водорода на реакцию присоединения бромоводорода по непредельным двойным связям: присутствие пероксидов инициирует антимаковниковское присоединение HBr в результате перехода от электрофильного к радикальному механизму присоединения.

Так как количество катализатора, как правило, значительно меньше количеств реагирующих веществ, даже незначительные следы примесей в реагирующих веществах оказывают сильное влияние на катализатор, занимая активные центры на его поверхности или меняя региоселективности катализируемого процесса. Среди промышленно значимых процессов следует упомянуть влияние загрязнения сырой нефти металлами на процессы ее крекинга.

Еще одна область, в которой велико влияние примесей – это коллоидная химия. Присутствие следовых количеств компонентов способно вызывать спонтанную пептизацию коллоидов. Так, следы NaOH облегчают пептизацию кремниевой кислоты, а следы Na₂CO₃ – глины. Многие примеси стабилизируют коллоидные системы, другие – повышают эффективность коагулирующих реагентов. При этом концентрации примесей-коагулянтов могут быть очень небольшими: 10 мкМ AlCl₃ достаточно для коагуляции золя As₂S₃, всего 0.7 мкМ

лимонной кислоты требуется для коагуляции золя $\text{Fe}(\text{OH})_3$. С другой стороны, коллоидные частицы могут выступать в качестве адсорбентов, накапливая вещества, присутствующие в дисперсионной среде в ничтожных количествах. Это может приводить как к изменению физико-химических характеристик самих коллоидов (изменение цвета, вязкости, ζ -потенциала), так и усугублять воздействие накопленных примесей на другие компоненты систем. Например, накопление металлов на гидроколлоидных системах иловых осадков природных водоемов способствует проявлению их токсических свойств для гидробионтов. Взаимодействие примесей с коллоидными системами объясняет многие биохимические реакции, протекающие в живых организмах, начиная с доставки лекарственных препаратов и кончая выведением жирорастворимых чужеродных соединений с молоком коров.

Итак, влияние следовых количеств примесей проявляется как в промышленно важных процессах, так и в биогеохимических системах в окружающей среде. Все эти явления имеют общий фактор: необходимость осуществления тщательного контроля содержания примесей и полной химико-аналитической характеристики веществ.

МИКРОЭЛЕМЕНТЫ В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Процессы жизнедеятельности, протекающие в живой клетке, обусловлены содержанием в ней широкого круга микроэлементов. Их влияние может ограничиваться как молекулярным уровнем (изменение активности ферментных систем, использующих металлы в активном центре, изменение проницаемости липидных мембран клетки), так и проявляться для организма в целом. Например, хроническое отравление или наоборот, недостаток микроэлементов может приводить к подавлению иммунитета, патологиям и задержкам развития. Применительно к экосистемам в целом изменение микроэлементного состава приводит к изменениям конкурентных взаимодействий среди биологических видов, изменению плотности и ареала местообитания отдельных сообществ. Раньше это использовали, например, для поиска месторождений биологически активных металлов. Их близость приводила к характерным изменениям в составе растительности, которые опытные геологи определяли визуально. Сейчас это направление, называемое биоиндикацией, активно используется для установления загрязнения природных систем сверхнизкими (называемыми еще хроническими) концентрациями токсичных металлов. Например, крапива является индикатором чистых (не загрязненных тяжелыми металлами) почв, а коловратки — насыщения поверхностных вод кислородом. Существуют индикаторные списки биологических видов, расставленных в соответствии с их чувствительностью к присутствию того или иного элемента, что позволяет

устанавливать примерное содержание загрязнителей по наличию или отсутствию определенных видов из списка. Различают три вида реакции биологических видов на микроэлементные – положительная (активация, например, увеличение скорости роста наземной части растения или численности водорослей и микроорганизмов), отрицательная (токсикация, подавление жизненных функций и развития организма в целом) и индифферентная (отсутствие непосредственной реакции на поступление микроэлементов или их недостаток). Последнее не значит, что опасности от избытка или недостатка микроэлемента не существует. Просто она может проявляться в периоды времени, превышающие продолжительность наблюдения, или влиять на последующие поколения. Такую реакцию называют также отдаленной, или отложенной, токсикацией.

Естественно, что изучение роли следовых количеств элементов в биологических системах очень важно.

Существует несколько *классификаций* деления элементов на макро- и микроэлементы. Приведем наиболее распространенную

Для растений:

- макроэлементы: K, Mg, Ca, N, P, S, C, H, O;
- микроэлементы: Fe, Cu, Mn, Zn, B, Na, Cl;
- ультрамикроэлементы: Co, Mo, V.

Для животных:

- макроэлементы: K, Mg, Ca, N, P, S, C, H, O;
- жизненноважные микроэлементы: Fe, I, Cu, Zn, Mn, Co, Mo, Se;
- вероятно жизненноважные микроэлементы: F, Br, Ba, Sr.

Кроме того, функции многих элементов еще не выяснены.

Развитие современных методов анализа следовых количеств веществ позволяет получать важную информацию о функциях и жизненной важности элементов.

Существует несколько проблем, возникающих при определении микроэлементов в биологических системах в зависимости от *объекта анализа*.

Почвы. При изучении содержания микроэлементов в почвах встает проблема отбора пробы. Состав почв подвержен горизонтальным и вертикальным изменениям и характеризуется значительной неоднородностью распределения, как отдельных элементов, так и их форм (соединений). Такая неоднородность в значительной степени влияет на способность микроэлементов, содержащихся в почве, включаться в биогеохимические циклы.

Следующая проблема – определение общего количества летучих микроэлементов (прежде всего, селен, мышьяк, йод, в определенной степени ртуть), которые могут теряться в процессе отбора и последующего разложения пробы. В этом случае эффективны методы анализа, не предъявляющие особых

требований к обработке (вскрытию) пробы, например, рентгено-флуоресцентный метод, метод нейтронной активации и т.д. Следует учитывать, что указанные методы не свободны от недостатков, связанных с высокой погрешностью измерения и матричными эффектами (влиянием макрокомпонентов пробы).

Растения. При изучении микроэлементов в растениях исследования проводят в двух основных направлениях. В первом из них исследуемый микроэлемент возможно более полно удаляют из необходимой для роста среды (обычно питательного раствора) и наблюдают за развитием растения (скорость роста, прирост биомассы для корневой и наземной части, общий рост, морфологические изменения, анализ ферментативной и фотосинтетической активности). Кроме того, изучают влияние добавок определенных количеств микроэлемента к питательному раствору. Основная проблема в этом случае – контроль состава питательного раствора, который должен содержать нужные количества всех необходимых для растения элементов, кроме исследуемого. Другое направление исследований – выяснение места и механизма действия микроэлемента. Для этого, например, устанавливается распределение микроэлемента в отдельных частях растения на различных стадиях его развития, а также изучается движение микроэлемента при его поступлении из почвы и /или питательного раствора. В отличие от первого подхода, изучению подвергаются растения в естественных условиях их развития. Одной из основных проблем интерпретации полученных данных является учет взаимного влияния микроэлементов, при котором один микроэлемент может компенсировать или усиливать потребность растения в другом элементе.

Животные. Функции микроэлементов в организме животных весьма различны. При этом почти все жизненно важные микроэлементы являются токсичными для животных, если они содержатся в пище в избыточных количествах. Хорошо известно токсичное действие умеренных и высоких концентраций селена и молибдена. Сообщалось о токсичном действии высоких концентраций кобальта, меди, цинка и марганца. Для изучения недостатка микроэлементов в организме животных используется метод, основанный на искусственном ограничении поступления микроэлемента с пищей и водой. Определенные результаты могут быть получены в результате статистических исследований популяций в связи с уровнем естественного содержания того или иного элемента, особенно в так называемых биохимических провинциях, отличающихся аномальным (высоким или низким) содержанием элемента в земной коре. Например, часть Татарстана входит в такую провинцию, характеризующуюся высоким уровнем содержания никеля в почвах.

Исследование функций микроэлементов в организме животного требует научно обоснованного выбора органов или тканей для последующего анализа на

содержание микроэлемента. Предпочтение следует отдавать органам, ответственным за усвоение пищевых ресурсов и выделение продуктов жизнедеятельности, поскольку они наиболее быстро откликаются на изменение микроэлементного состава корма. Печень и мышечная ткань более консервативны, накопление в них продуктов метаболизма с участием микроэлементов свидетельствует о длительном поступлении микроэлемента в организм животного. Чаще всего анализу подвергают мышечную ткань, печень и покровные ткани. Так, соотношение ртути в печени и мышцах рыб позволяет косвенно судить о продолжительности поступления токсиканта в водоем. В случае множественности форм нахождения элемента в организме иногда встает задача определения не полного (валового) содержания микроэлемента, а какого-то конкретного продукта. Например, важнее определить содержание витамина В₁₂, в состав которого входит кобальт, чем общее содержание кобальта в организме. В случае железа часто необходимо выделить его часть, находящуюся в гемоглобине. Такой анализ возможен путем правильного выбора пробоподготовки, не разрушающей соответствующие формы присутствия элемента. Пробоподготовка также позволяет успешно решать некоторые трудности, связанные с особенностями метаболизма. Так, ртуть в организме находится частично в виде метилртути, накапливающейся в жировой ткани и достаточно летучей, что исключает вскрытие пробы перед атомно-абсорбционным определением путем ее озоления.

Современная аналитическая химия следовых количеств элементов ориентирована на решение следующих задач:

- совершенствование методов определения следовых количеств элементов с учетом особенностей их биохимических реакций, поступления и выведения из организма;
- использование анализа для уточнения известных и открытия новых функций жизненно важных и токсичных элементов в организме человека (например, токсичность селена была установлена раньше, чем его важность для жизнедеятельности организма);
- выявление устойчивых ассоциаций микроэлементов, обусловленных их ролью в организме, создание методов многоэлементного анализа для корректной интерпретации данных об элементах, входящих в такие ассоциации (так, для определения содержания селена необходимо знать концентрацию мышьяка, а для молибдена – концентрацию вольфрама);
- развитие методов определения не только общего содержания микроэлементов, но и их активных или функциональных форм.

ИСТОЧНИКИ ПОТЕРЬ И ЗАГРЯЗНЕНИЙ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ ВЕЩЕСТВ

Потери и загрязнения являются очень серьезной проблемой при определении следовых количеств элементов и соединений. Если в микро- и полумикроанализе многие из таких источников считаются несущественными, они же в определении субмикроколичеств веществ становятся определяющими. Ярким примером этого является оценка загрязнения Мирового Океана тяжелыми металлами. Первые данные о содержании элементов, в первую очередь, ртути, меди, свинца и цинка (несколько позднее – кадмия) появились в 20-30 годах 20 века. При этом фоновые концентрации указанных элементов были установлены на уровне 0.1-1 мг/л. После этого на протяжении последующих 60-70 лет результаты оценки неоднократно пересматривались в сторону снижения. В настоящее время валовое содержание большинства указанных элементов оценивается в 0.001-0.01 мг/л! По этой причине при рассмотрении тенденций в загрязнении объектов окружающей среды не рассматриваются результаты химического анализа, полученные до 1970-х годов. Это связано с тем, что только с этого периода были установлены и исключены основные источники загрязнения проб при анализе – минеральные кислоты, содержащие достаточно большие количества определяемых металлов, а также материалы, из которых были изготовлены необходимые инструменты для отбора и обработки проб.

Рассмотрим различные источники потерь и загрязнений, а также меры предотвращения и способы их уменьшения.

Загрязнения, обусловленные реактивами. Это серьезный источник загрязнений, т.к. реактивы используют в больших количествах по сравнению с образцом. Даже очень чистые реактивы содержат примеси, которые могут концентрироваться в пробе в процессе ее обработки. Как уже отмечалось выше, при определении металлов источником загрязнения выступали сильные минеральные кислоты – серная, соляная, азотная, плавиковая, которые до использования хранили в металлических емкостях. В результате вскрытия проб (стадия, необходимая для растворения образцом минералов, почв и высвобождения присутствующих в них металлов) содержание определяемых элементов могла возрасти в несколько раз. Аналогичное влияние оказывают органические растворители, когда речь идет об определении следовых количеств органических соединений. Органические растворители применяют для извлечения определяемых соединений путем их экстракции, а также в хроматографическом анализе проб в качестве подвижной фазы и носителя пробы. Даже если они сами не содержат определяемых веществ, возможны реакции с их образованием или, наоборот, связыванием, протекающие в процессе дистилляции, хранения или хроматографирования. Так, большое

внимание уделялось роли растворителей в надежности определения полихлордибензодиоксинов, в ходе которого было установлено, что все хлорсодержащие растворители, контактировавшие с пробой, приводили к завышению результатов определения.

В воде, растворителях и растворах кислот содержатся различные примеси, некоторые из которых - на уровне всего 10^{-7} %. В процессе подготовки к анализу все вспомогательные реагенты должны подвергаться анализу и при необходимости – доочистке. Так как различных примесей достаточно много, удаляют только нежелательные. Например, в случае определения металлов с помощью атомно-эмиссионной и атомно-абсорбционной спектроскопии концентрированные минеральные кислоты очищают от следов металлов путем дистилляции. В случае органических растворителей дистилляция может сочетаться с химическими методами удаления загрязнителей.

Загрязнение посуды и аппаратуры. Источником загрязнения реактивов может быть посуда, в которой они хранятся, причем не обязательно, чтобы примеси содержались в самом материале – они могут быть адсорбированы на внутренней поверхности сосуда, в частности, перейти на нее при анализе предыдущей пробы. Такое явление получило название «эффекта памяти», при нем результат определения пробы в ряду понижающихся концентраций определяемого компонента оказывается завышен, а в ряду повышающихся – занижен.

Так как потери и загрязнения от аппаратуры трудно предсказать и оценить, необходимо обращать особое внимание на очистку, хранение и предысторию аппаратуры.

Наиболее предпочтительные материалы: полиэтилен, тефлон, платина, кварц, фарфор, нержавеющая сталь, боросиликатное стекло. Для определения следов металлов лучше применять пластиковую посуду, так как в ней самой содержание металлов меньше, чем в стеклянной, и у нее выше химическая стойкость. Дополнительное требование предъявляется к материалам, используемым при изготовлении ступок и пестиков: эти материалы должны быть твердыми и химически инертными (гранит, специальная керамика, агат). Надписи на посуде также могут служить источником загрязнений. Например, некоторые эмали, используемые для нанесения градуировочных меток на пипетки, могут служить источником загрязнения свинцом.

Очистка посуды и аппаратуры не должна сопровождаться загрязнением ее компонентами моющих средств. Для очистки многоразовой стеклянной или кварцевой посуды применяют раствор бихромата калия в концентрированной серной кислоте. Однако при этом на поверхности посуды остаются значительные количества хрома. Поэтому предпочтительнее применять смесь концентрированных серной и азотной кислот (1:1). При анализе биологических

молекул часто используется раствор пероксида водорода в азотной кислоте, активно удаляющий органические загрязнения на стенках посуды. Перед определением следов тяжелых металлов рекомендуется мыть посуду раствором дитизона в трихлорметане. Платиновую посуду очищают плавлением в ней пиросульфата натрия с последующей обработкой соляной кислотой. Также применяется промывание посуды различными очищающими растворами под действием ультразвука.

Возможны потери за счет улетучивания определяемых веществ или их взаимодействия с газообразными компонентами воздуха или парами химических реагентов, присутствующими в лаборатории. Например, возможны потери следовых количеств ртути (II) в растворе в результате поглощения сероводорода из воздуха за счет образования нерастворимого сульфида ртути.

Для уменьшения загрязнения пробы используют разные способы. Помимо упоминавшихся, можно указать на использование одноразовой посуды из химически инертных материалов (анализ воды в емкостях из полипропилена и полиэтилена); выбор наиболее чистых коммерческих реактивов и их дополнительную очистку непосредственно перед использованием; соблюдение установленных сроков хранения реактивов и подготовленных проб перед анализом; использование пробоподготовки и методик анализа, предполагающих использованием минимальных количеств дополнительных реактивов.

Большое внимание уделяется сокращению количества органических реактивов путем перехода с жидкофазной на твердофазную экстракцию, использования сверхкритических жидкостей, более широкого внедрения капиллярного электрофореза вместо ВЭЖХ, отказа от растворителей на стадии вскрытия и дериватизации пробы. Эта тенденция хорошо согласуется с принципами «зеленой химии», поскольку производство многих растворителей, особенно хлорсодержащих, является экологически грязным.

Загрязнения из воздуха. Атмосфера лаборатории содержит различные газы, пары и пыль, на частичках которой могут сорбироваться нелетучие вещества. Наиболее часто из воздуха в растворы попадают Na, Ca, Mg, Cu, Fe, Al, Si, Zn, а также NH_3 и Hg, переносимые с микрокаплями воды, образующимися в помещении при мытье посуды. Для уменьшения загрязнения, поступающего из воздуха, необходимо соблюдение следующих требований:

- анализ следовых количеств веществ должен проводиться в отдельном помещении со специальной облицовкой и усиленной вентиляцией;
- необходимо современное оборудование, сокращающее продолжительность контакта пробы с воздухом на подготовительных стадиях и при проведении собственно измерения;

- необходимо максимально возможное исключение потенциальных источников загрязнения воздуха, в частности, все дополнительные реагенты должны храниться в отдельном помещении;

- посуда и оборудование, контактирующее с пробой, должны храниться в закрытом виде, при возможности - в закрытых емкостях;

- необходимо применение специальной аппаратуры для выпаривания и высушивания образцов, минимизирующее перенос частиц в воздух помещения .

Кроме того, потовые выделения, попадающие на посуду с рук исследователя, служат источником загрязнения хлоридом натрия и различными органическими веществами, в том числе, биологически активными. В частности, такие выделения содержат фермент ДНКазу, которая катализирует расщепление внеклеточной ДНК. По этой причине все эксперименты с лабораторными биохимическими образцами следует проводить в одноразовых перчатках, даже если отсутствует угроза контакта с токсичным или биологически активным материалом. Биологическое загрязнение также способно существенно повлиять на состав органических буферных систем (трис, ацетатный и цитратный буферы), а также изменить подвижность металлов, содержащихся в биологических матрицах. Плесневые грибы являются также источником ряда летучих соединений и низкомолекулярных органических кислот, обладающих коррозионной активностью и ускоряющих загрязнение проб при контакте с металлическими поверхностями.

РОЛЬ МАТРИЦЫ ПРИ ОПРЕДЕЛЕНИИ СЛЕДОВЫХ КОЛИЧЕСТВ ВЕЩЕСТВ

Определение следовых количеств веществ ведут в присутствии основы – главных компонентов образца. Обычно концентрации следов бывают на уровне $10^{-4} - 10^{-7} \%$, а их абсолютные количества – $10^{-6} - 10^{-9}$ г. В роли матрицы (основы) могут выступать неорганические материалы (металлы, сплавы, минералы, вода), органические и биологические системы. Влияние основы (так называемые «матричные эффекты») зависит от выбранного метода анализа и проявляется также в традиционных вариантах измерения. Оно хорошо описано и учитывается в рекомендованных и аттестованных методиках анализа. Но применительно к следовым количествам веществ существуют дополнительные сложности, связанные с влиянием матрицы на результаты определения. Не затрагивая их подробно, отметим следующие:

- проблемы гомогенизации пробы и полноты отделения следовых количеств элементов и веществ;

- влияние матричных эффектов на выделение следовых количеств элементов с помощью экстракции;

- увеличение объема пробы и сложности ее усреднения, особенно при анализе почв и других твердых образцов.
- сложности калибровки (построения градуировочных графиков) по стандартным образцам, в том числе, в связи с их отсутствием и недостаточным числом.

РАЗДЕЛЕНИЕ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ В ОПРЕДЕЛЕНИИ СЛЕДОВЫХ КОЛИЧЕСТВ ЭЛЕМЕНТОВ И ВЕЩЕСТВ

Разделение при определении следов элементов зависит от поставленной задачи. В различных случаях может потребоваться:

- полное отделение компонентов матрицы;
- удаление ее большей части, иногда в соответствии с особенностями структуры пробы (гранулометрический состав, вязкость, однородность);
- замена основы другой, более благоприятной с точки зрения выбранного метода анализа;
- отделение следов элементов друг от друга.

Отделение большей части основы называют предварительным концентрированием, или обогащением следов элементов.

Эффективность разделения характеризуется двумя факторами: *выходом* определяемого элемента и *фактором разделения* мешающего и определяемого элементов.

Выход R_A определяемого элемента A представляет собой отношение количества элемента A после разделения к количеству элемента A в исходном образце до разделения, выраженное в процентах:

$$R_A = \left(\frac{Q_A}{Q_A^0} \right) \times 100\%$$

где Q_A - количество элемента A после разделения, Q_A^0 - количество элемента A в исходном образце до разделения.

Фактор разделения $S_{B/A}$ мешающего (B) и определяемого (A) элементов рассчитывают по формуле:

$$S_{B/A} = \frac{(Q_B \times Q_A^0)}{(Q_A \times Q_B^0)},$$

где Q_A - количество элемента A после разделения, Q_A^0 - количество элемента A в исходном образце до разделения, Q_B - количество элемента B после разделения, Q_B^0 - количество элемента B в исходном образце до разделения.

Величину, обратную фактору разделения ($1/S_{B/A}$), называют *фактором концентрирования*, или *коэффициентом обогащения* элемента A , если B – макрокомпонент пробы (основа).

Эти факторы зависят от природы образца и метода разделения. При идеальном разделении $R_A = 100\%$, $S_{B/A} = 0$. Удовлетворительным считается разделение, если $R_A = 99\%$, $S_{B/A} = 1 \times 10^{-4}$.

Теоретически можно определить бесконечно малые концентрации следов элементов, если отделить основу из бесконечно большого количества образца и сконцентрировать содержащиеся в нем следы элементов. Но существуют некоторые ограничения:

- *Потери следов элементов при разделении.* Чем ниже концентрация следов элементов, тем больше опасность потерь. Для оценки возможных потерь используют пробы, меченные изотопами определяемого элемента. Такие исследования, очевидно, необходимы на этапе разработки методики концентрирования, но не могут применяться постоянно при обработке каждого образца. Это увеличивает погрешность определения и создает определенные сложности по ее оценке

- *Загрязнение концентрата.* В ходе разделения в пробу могут быть внесены нежелательные примеси, источником которых могут быть реактивы, посуда и атмосфера лаборатории. Чем больше стадий концентрирования, чем больше количества добавляемых растворителей и других вспомогательных реагентов, тем больше возможное влияние такого загрязнения. Для того чтобы оценить влияние этого фактора, проводят аналогичные процедуры концентрирования с холостой пробой, не содержащей определяемого элемента (вещества), а при ее отсутствии – со стандартным образцом с известным (аттестованным) содержанием определяемого компонента.

- *Сложность метода разделения.* Если концентрации следов элементов очень низкие, число мешающих компонентов в образце возрастает, а операции их отделения очень сложны и трудоемки.

- *Величина образца.* Максимальное количество образца для анализа ограничено трудностями отбора и обработки пробы, а также его стоимостью и доступностью образца. При анализе биологических объектов максимальный размер образца также ограничен соображениями биоэтики и невозможностью отбора больших объемов биологических жидкостей или тканей без нанесения вреда живому организму. Если же отбор пробы осуществляется от нескольких организмов-доноров, появляется неопределенность, связанная с индивидуальной изменчивостью химического состава биологических тканей.

Выбор и оценка методов разделения должны проводиться с учетом большого разнообразия факторов. Также необходимо отметить, что многие методы разделения следовых количеств элементов генетически связаны с

существующими методиками, предложенными ранее для определения макроколичеств тех же элементов в пробе той же природы. Их можно рассматривать как вариации существующих методик, адаптированных, не всегда оптимально, под меньшие концентрации определяемого компонента. Поэтому открыты достаточно большие возможности по созданию новых способов разделения, более полно учитывающих следующие основные факторы:

- метод последующего количественного определения элементов;
- число определяемых элементов в образце;
- нижний предел концентраций следов элементов в образце;
- выход следов элементов после разделения или концентрирования;
- фактор разделения;
- загрязнения в процессе разделения;
- величина образца;
- количество образцов;
- сложность метода разделения;
- время, затрачиваемое на разделение;
- трудоемкость и стоимость разделения.

При прочих равных условиях предпочтение следует отдать наиболее универсальным способам разделения, которые могут применяться к пробам разной природы и для разделения разных соединений, что позволяет сэкономить ресурсы и средства.

Рассмотрим некоторые наиболее распространенные способы разделения и концентрирования, используемые при определении следовых количеств веществ.

Дистилляция и возгонка. Это старейшие приемы разделения в аналитической химии. При повышенной температуре из жидкого или твердого образца отгоняется либо основа, либо элементы примеси. Дистилляция основана на том, что при испарении смеси жидкостей пар обогащается более легко кипящим компонентом смеси. Поэтому при разделении смеси удаляются легко кипящие компоненты (примеси или основа), а трудно кипящие компоненты остаются в перегонном аппарате. При образовании азеотропных смесей, сохраняющих постоянство состава при перегонке, разделение таким образом невозможно. Дистилляцию или возгонку используют при значительном различии в летучести разделяемых компонентов. Чем ниже температура, тем меньше опасность потерь и загрязнений, обусловленных аппаратурой.

Дистилляцией можно выделить следы B, N, Si, S, Ge, As, Se, Tc, Ru, Sn, Sb, Re, Os и галогенов. При содержании серы S в металлах на уровне 10^{-4} % ее отгоняют в виде сероводорода H_2S из смеси кислот. При выделении до 10^{-5} % бора в металлах и сплавах отгоняется метилборат. При определении кремния на уровне 10^{-4} % в уране и плутонии его предварительно отгоняют в виде фторида

кремния SiF_4 из смеси кислот. Следы неметаллов H, C, N, O, S из металлов отгоняют в виде газов с последующим определением методами газового анализа с чувствительностью до $10^{-4} \%$.

В случае отгонки основы часто наблюдаются большие потери следов элементов, обусловленные следующими факторами: частичной летучестью определяемых компонентов и механическим увлечением выделяющимися парами мелких жидких или твердых частиц, содержащих определяемые элементы. Кроме того, следует учитывать возможную адсорбцию следов элементов на стенках посуды.

Простейший пример отгонки основы – выпаривание воды из водных растворов. Так определяют примеси Mg, Mn, Cr, Bi, Al, Ni, Mo, Be, In, Zn, Ti, Zr, Co, Fe, Pb, Ga при их содержании на уровне $10^{-7} \%$ в кислотах высокой чистоты с последующим количественным определением из концентрата методами спектрального анализа.

В случае определения следов металлов в органических и биологических системах применяют предварительное разложение матрицы путем ее окисления до полного улетучивания основы (озоление пробы). Существует два основных способа – сухое и мокрое озоление. Метод сухого озоления подразумевает окисление образца на воздухе при высокой температуре ($\sim 5000^\circ\text{C}$). Метод прост и находит широкое применение, особенно при анализе растительных остатков. Но при этом возникают потери, связанные с отделением и потерей легколетучих соединений металлов. Так, в элементарном состоянии, в виде хлоридов или металлоорганических соединений улетучиваются As, B, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Hg, Ni, P, V, Zn. Озоление не позволяет количественно выделять Ga, In, Tl, C, Si, N, As, O, F, Cl, Br. При *сухом озолении* влажных образцов на начальных этапах нагрева происходит вспенивание образца и потери элементов в результате разбрызгивания. По этой причине увлажненные образцы первоначально подсушивают при температуре около 100°C . Это же относится к связанной воде, например, при анализе почв и биологических образцов. Понижение температуры снижает потери в результате улетучивания, но приводит к неполному вскрытию пробы, что в результате также дает заниженные результаты спектроскопического определения элементов. В золе, образующейся при неполном окислении органических систем, остается некоторое количество углерода в виде сажи, адсорбирующей определяемые элементы.

Для повышения эффективности сухого озоления в исходные образцы добавляют некоторые компоненты, призванные понизить летучесть определяемых соединений или понизить температуру разложения образца. Такие добавки могут вноситься как в сухом виде, так и при смачивании образца соответствующим водным раствором. Для более глубокого разложения матрицы сухое озоление может проводиться в присутствии кислорода или при

повышенном давлении (в так называемой бомбе). Источником кислорода могут выступать соли кислородсодержащих кислот, таких как перхлораты или нитраты, добавляемые к образцу.

В методе *мокрого озоления* образцы окисляют жидкими реагентами. Обычно это сильные минеральные кислоты HNO_3 , HClO_4 , H_2SO_4 или их смеси. Потери при этом меньше, чем в методе сухого озоления, так как температура озоления существенно снижается. Потери возможны только при определении наиболее летучих компонентов (Sb, As, B, Cr, Ge, Hg, Se, Sn, P, Os, Re, Ru, Au), а основным источником загрязнений получаемого концентрата служат реактивы. Во избежание потерь за счет разбрызгивания необходимо тщательно следить за температурой процесса. Важное значение имеет также относительный избыток реагента и его правильный подбор, исходя из предполагаемого состава и свойств матрицы.

Ионный обмен. Методы ионного обмена используют для определения следов элементов, образующих ионные соединения (соли). В частности, их применяют для разделения редкоземельных элементов, концентрирования ионов уранила и других радиоактивных элементов. Ионный обмен основан на распределении элемента между раствором и твердым ионообменником. В качестве ионообменника в настоящее время применяют полимерные материалы, содержащие заряженные функциональные группы. Для сохранения электронейтральности в таком материале всегда присутствуют подвижные ионы противоположного знака, которые могут обратимо замещаться другими ионами. В зависимости от знака обмениваемого иона различают катионо- или анионообменные материалы. В рабочей форме они содержат в качестве противоионов соответственно H^+ (реже ионы натрия) и OH^- - группы (хлорид-ионы). При пропускании электролита через ионообменную смолу происходит обмен ионов металла или кислотного остатка, соответственно, на H^+ или OH^- .

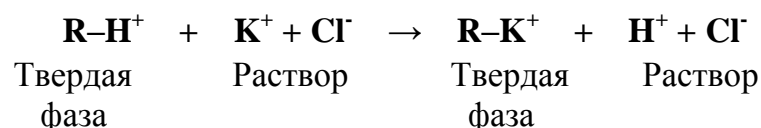
При определении следовых количеств элементов в качестве катионообменников часто используют сульфированные сополимеры стирола и дивинилбензола, а также полимеры с аммонийными группами в заместителях боковой цепи. Используются также ионообменные мембраны, смолы с комплексообразующими группами, например, производные целлюлозы, неорганические фосфаты и оксиды циркония (IV), титана (IV) и олова (IV). Неорганические ионообменники полезны при разделении высокорadioактивных материалов (благодаря их устойчивости к облучению), а также при разделении катионов щелочных и щелочноземельных металлов (благодаря исключительной избирательности), но избирательность концентрирования определяемых элементов на таких материалах относительно невысока.

Наряду с обычными ионообменными смолами можно применять окисленные углеродсодержащие материалы, получаемые при обработке угля,

образующегося при пиролизе органических материалов, азотной кислотой или другими окислителями. В отличие от традиционного активированного угля, являющегося анионитом, окисленный уголь имеет свойства катионита. Он проявляет определенную избирательную способность: так, из раствора, содержащего Ca^{2+} и NH_4^+ , сорбирует почти исключительно (на 98 %) Ca^{2+} . Это позволяет с успехом использовать его для выделения примесей из солей. Из раствора NaCl можно полностью удалить Mg^{2+} ; из растворов солей Mg^{2+} , Ca^{2+} и Zn^{2+} хорошо выделяются Cu^{2+} , Al^{3+} , Fe^{3+} и т. д. С помощью 10 г окисленного угля можно очистить от микропримесей до 20 л 10-30 %-ного раствора соли.

Для использования в разделении следовых количеств элементов ионообменники должны характеризоваться не только высокой избирательностью, но и высокой величиной обменной емкости (число способных к обмену групп, выраженное в мл-эквивалентах данного элемента на 1 г ионообменника). Для ускорения разделения необходимы высокая скорость и обратимость ионного обмена, низкая набухаемость. Кроме того, ионообменные материалы должны обладать высокой химической и физической (механической) стойкостью, что, наряду с обратимостью ионного обмена, обеспечивает длительный срок эксплуатации, а значит, и низкую стоимость ионообменного разделения.

Ионообменное равновесие. Пусть твердый ионообменник с подвижными катионами водорода H^+ (катионит в H^+ -форме) погружен в водный раствор хлорида калия. Ионообменное равновесие можно выразить уравнением:



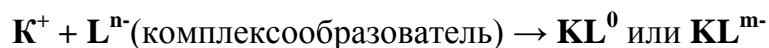
Если общее количество иона калия очень мало по сравнению с обменной емкостью катионита, коэффициент распределения D или объемный коэффициент распределения D_V не зависят от концентрации ионов калия:

$$D = \frac{\text{Количество K}^+ \text{ на 1 г сухого катионита}}{\text{Количество K}^+ \text{ на 1 мл раствора}}$$

$$D_V = \frac{\text{Количество K}^+ \text{ на 1 мл набухшего катионита}}{\text{Количество K}^+ \text{ на 1 мл раствора}}$$

Ионообменное поведение элемента зависит от состава раствора и природы ионообменника. Использование комплексообразующих реагентов, концентрированных растворов и водноорганических растворителей часто позволяет повысить избирательность ионообменных разделений.

Разделение металлов. Большинство металлов в обычных водных растворах существует в виде катионов, разница в их сорбируемости катионитами невелика. Селективность ионообменников по отношению к катионам меньше селективности по отношению к анионам или незаряженным комплексам, поэтому разделение металлов проводят с использованием нейтральных или отрицательно заряженных комплексов:



Разделение металлов в виде хлоридных, фторидных и т.д. комплексов проводят из водных растворов кислот HCl, HF, HNO₃, H₂SO₄, H₃PO₄, H₂C₂O₄, ЭДТУ и т.д. Для разделения щелочных и щелочноземельных металлов используется смесь диоксан-кислота.

Потери и загрязнения в ионообменных методах могут быть обусловлены следующими причинами. Во-первых, некоторые элементы сорбируются на ионообменнике очень прочно. Это приводит не только к потере определяемых элементов, но и к загрязнению последующих образцов («эффект памяти»). Во-вторых, ионообменники могут в процессе эксплуатации частично разлагаться и загрязнять образцы. По этой причине новые иониты необходимо предварительно обрабатывать для удаления растворимых примесей. В-третьих, возможно неполное вымывание следовых количеств определяемых элементов из больших колонок, что приводит к их потере.

Наиболее благоприятен случай, когда на ионообменнике удерживаются только следы определяемых элементов, а макрокомпоненты матрицы не сорбируются. При этом для образца большого объема можно использовать небольшую колонку с низкой обменной емкостью. В случае если требуется отделение следов определяемых элементов друг от друга, необходимо большее количество ионообменника с большей емкостью. Помимо разделения, ионный обмен позволяет проводить концентрирование примесей из природных, сточных и морских вод, а также примесей в высокочистых металлах. Его же используют для умягчения и очистки лабораторной воды (рис.2).

Если ионный обмен используется для концентрирования макроионов, тем самым отделяемых от определяемых элементов, необходимо использование значительных количеств ионообменного материала. Данный способ используется, в частности, для отделения примесей от урана и плутония. При насыщении ионообменного материала может произойти так называемый «проскок» - поступление неочищенной воды в концентрат.

Наиболее неблагоприятен случай, когда на ионообменнике сорбируются и определяемые элементы, и элементы основы. В этом случае разделение требует тщательного контроля его условий. Повысить эффективность разделения и концентрирования может правильный выбор элюента.

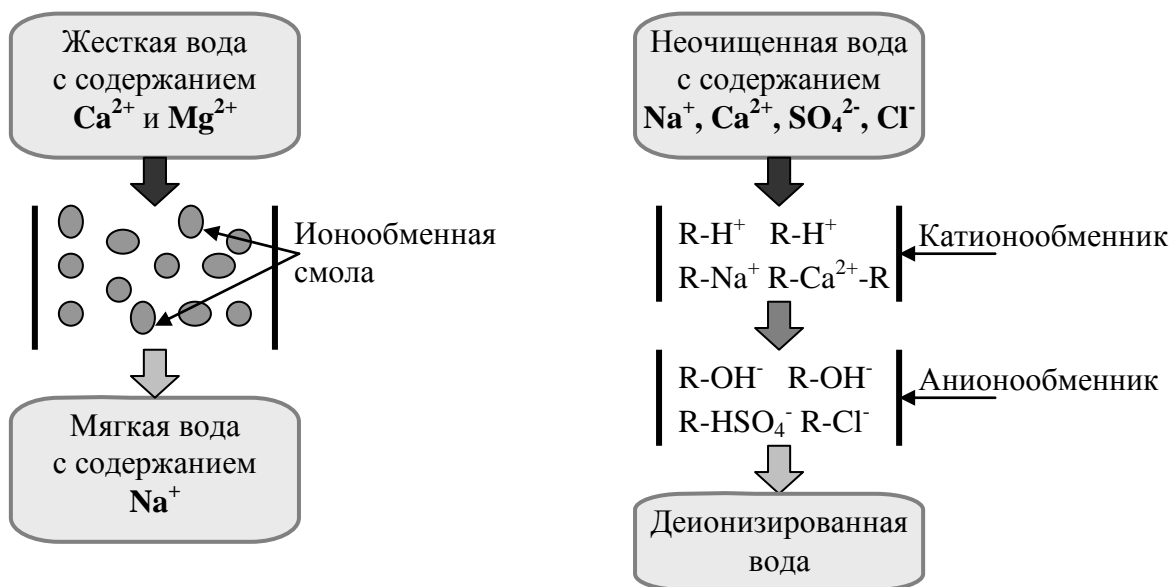


Рис. 2. Схематическое изображение использования ионообменной колонки для умягчения воды и выделения ионных компонентов из раствора

Экстракция. Метод основан на извлечении одного из компонентов раствора с помощью не смешивающегося с водным раствором органического растворителя. Жидкофазная экстракция является одним из основных методов разделения при определении следов элементов, так как это простой и быстрый метод, при котором загрязнения концентрата определяемого элемента невелики. Кроме того, экстракция достаточно эффективна для выделения элементов из предельно разбавленных растворов.

В равновесных условиях экстрагируемый компонент распределяется между раствором и слоем органического растворителя в отношении, зависящем от коэффициента распределения:

где $c_{орг}$ и $c_{водн}$ - концентрация вещества в органической и водной фазе, соответственно.

Экстракция позволяет исключить соосаждение, типичное для осадительных методов концентрирования. Кроме того, метод достаточно универсален и использует одни и те же растворители-экстрагенты для извлечения достаточно широкого круга определяемых соединений. Применительно к определению следов металлов в органический растворитель обычно добавляют комплексообразователь, который образует с ионом металла комплекс, преимущественно находящийся в органической фазе. Избирательность комплексообразования характеризует селективность концентрирования и возможность выделения следовых количеств элемента в присутствии макрокомпонентов пробы или других, химически сходных

соединений. В некоторых случаях возможно выделение в органическую фазу ионных пар металлов, а также их неорганических комплексов с хлоридами, цианидами, роданидами в качестве лигандов.

Экстракцию применяют для определения следов на уровне $10^{-4} - 10^{-7} \%$. Например, для определения металлов-примесей в нефтях или в образцах высокочистых металлов, таких как Al, Ti, Zr, Se, Si, Ge. Иногда применяют и экстракцию макрокомпонентов матрицы (Fe, Ga, Ge, In, Au, Ag, Bi, Cd, Hg), но в этом случае возможна соэкстракция примесей. Высокая степень извлечения характерна для Hg, Ag, Au, Bi, Cd, причем степень извлечения ртути достигает 99.9999 %. Метод позволяет проводить обработку таких веществ, которые не удастся разделить иными методами, например, при очистке солей уранила от примесей железа, бора, молибдена и др.

В случае органических соединений экстракция проводится растворителями, подбираемыми в соответствии с полярностью (гидрофобностью) экстрагируемого вещества.

Следы элементов могут теряться из-за адсорбции на стенках посуды или из-за образования эмульсии. С целью сокращения объема экстрагента перспективно использование плавких экстрагентов, таких как нафталин. Экстракцию с их помощью проводят при повышенных температурах, после охлаждения застывший экстрагент отбирается путем фильтрования. Такие системы отличаются повышенным коэффициентом распределения и пониженными потерями экстракта в силу его эмульгирования и пенообразования.

Осаждение. Одним из простейших методов разделения веществ является перевод одного из компонентов (примеси или основного вещества) в осадок. Это может быть достигнуто, если при действии подходящего реагента удаляемый компонент смеси образует малорастворимое соединение, например, выделение примеси Fe^{3+} в NH_4Cl при действии аммиака: $\text{Fe}^{3+} + 3\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O} = \text{FeO}(\text{OH})\downarrow + 3\text{NH}_4^+ + \text{H}_2\text{O}$. В качестве осадителей часто применяются аммиак или аммонийные соли, избыток которых затем легко удаляется при прокаливании осадка. Однако часто приходится иметь дело с такими комбинациями ионов, каждый из которых может реагировать с реактивом - осадителем, давая малорастворимые вещества. В этом случае необходимо использовать различие в константах растворимости, создавая условия, в которых электролиты, имеющие наибольшую растворимость, остаются в растворе. Так, для отделения примеси Ba^{2+} в солях Sr^{2+} достаточно добавить к раствору очищаемой соли небольшое количество H_2SO_4 . Если учесть, что $K_s(\text{BaSO}_4) = 8.7 \times 10^{-11}$, а $K_s(\text{SrSO}_4) = 2.8 \times 10^{-7}$, то ясно, что менее растворимый BaSO_4 будет выпадать в первую очередь, и только после почти полного его выделения оставшаяся серная кислота осадит некоторое количество Sr^{2+} в виде SrSO_4 .

Осаждение имеет два недостатка: отделяемый осадок всегда имеет остаточную растворимость, что приводит к сохранению в растворе некоторых количеств удаляемых компонентов. Второй, более серьезный недостаток – явление соосаждения, когда на осадке происходит отделение веществ, для которых произведение растворимости не достигнуто. Серьезными источниками потерь и загрязнений являются также адсорбция на стенках посуды, на частицах осадка и на материале фильтра, и загрязнения от фильтров.

Явление соосаждения активно используется для концентрирования следовых количеств веществ. Метод был первоначально разработан для отделения радиоактивных примесей, впоследствии получил большое распространение и для других элементов. В этом случае используют дополнительные реагенты для осаждения из раствора так называемого коллектора. Обычно это элемент-носитель, который образует осадок, структурно подобный аналогичному соединению отделяемого примесного элемента. В результате при соосаждении происходит частично замещение ионов носителя в кристаллической решетке осадка примесными ионами. При выборе коллектора необходимо учитывать не только степень концентрирования и полноту отделения определяемых микрокомпонентов, но и легкость отделения осадка коллектора от маточного раствора; а также удобство его дальнейшей обработки.

Так, для микроколичеств рения сероводородом осаждение проводят совместно с сульфидами Hg, Ag, Cu, Pb, Mo, Zn, Os и As. Для отделения от раствора сульфата цинка следов мышьяка и ряда других элементов добавляют сульфат железа (III), а затем вносят пасту карбоната цинка. Выпадающий осадок $\text{FeO}(\text{OH})$ сорбирует из раствора примеси мышьяка, фосфора и сурьмы. Часто применяется соосаждение следов элементов с гидрооксидом алюминия или железа (III) из растворов солей щелочных металлов с контролем pH осаждения. В качестве коллектора может служить осадок, включающий макрокомпонент пробы. Например, соосаждение примеси цинка с гидроксидом никеля (коллектор) проводят путем осаждения части ионов никеля из растворов его нитрата едким натром или аммиаком; соосаждение примеси меди с гидроксидом или сульфидом кобальта достигается путем добавления соответственно аммиака или сульфида аммония.

Осаждение макрокомпонентов пробы с точки зрения потерь и загрязнения концентрата определяемого элемента хуже, чем осаждение самих следовых количеств. Можно привести только единичные примеры, когда осаждение основы целесообразно для отделения ее от микропримесей. Так, трудная проблема очистки солей кобальта от примеси никеля была решена путем осаждения гидроксида кобальта большим избытком аммиака. При этом выход по кобальту составил около 90 %. Одновременно в пять раз снижалось остаточное содержание ионов меди, в 10 раз – кадмия, в 100 раз – кальция. Можно также

отметить очистку сурьмы и ниобия от примесей кобальта, никеля, марганца и других путем гидролитического осаждения основной массы гидроокиси сурьмы или ниобия в сильноокислой среде. При осаждении подавляющей части основного вещества решающее значение имеет подбор условий, обеспечивающих получение плотных, легко фильтруемых и хорошо промываемых осадков.

Избирательное растворение. Избирательное растворение может быть очень эффективным способом разделения. Для этого необходим полный контакт следов определяемых элементов с растворителем. При этом твердый образец тщательно измельчают, чтобы наиболее полно выделить следы определяемого элемента. Потери возможны как из-за неполного выделения, так и из-за адсорбции следов элементов на поверхности твердого образца. Этот метод успешно применяют для выделения 10^{-7} % бора из кремния избирательным растворением в 95 % спирте или в растворе гидроксида натрия.

Перекристаллизация. Отделение основы в случае солей и других твердых электролитов и органических соединений возможно путем перекристаллизации. Процесс отличается простотой и эффективностью. Воспользовавшись повышением растворимости солей при нагревании, можно приготовить насыщенный при температуре кипения раствор, отфильтровать его от механических примесей и охладить; при этом зачастую удастся получить кристаллы достаточно чистой соли, а в растворе останутся следы элементов. Это связано с тем, что при охлаждении раствор оказывается пересыщенным только по отношению к основному веществу, в то время как следы элементов, присутствующие в количестве долей процента, остаются в маточном растворе. Недостатком перекристаллизации является то, что возможны потери следов элементов из-за механического захвата образующимися кристаллами основного вещества (окклюзия, инклюзия). Возможна также адсорбция элементов-примесей на поверхности кристаллов, хотя при образовании крупных кристаллов, имеющих небольшую удельную поверхность, роль адсорбции невелика. Образование твердых растворов может иметь место в том случае, когда ионы основы и ионы примеси отличаются по размерам не более чем на 10-15% и оба вещества кристаллизуются в одинаковой системе. Тогда часть ионов основы в процессе роста кристаллов может быть замещена ионами примеси. Разделение кристаллизацией изоморфных веществ невозможно. В этих случаях прибегают к особым приемам. Так, при отделении примеси Fe^{3+} от алюмоаммонийных квасцов, предназначенных для изготовления лазерных рубинов, не удастся перекристаллизацией избавиться от примеси Fe^{3+} , поскольку алюмоаммонийные и железоаммонийные квасцы изоморфны. При $\text{pH}=2$ выход элемента-примеси (R_A) не превышает 90 %. Но если Fe^{3+} восстановить до Fe^{2+} , то изоморфизм устраняется, и выход элемента-примеси доходит до 100 %.

Эффективность отделения основы перекристаллизацией зависит также от ее растворимости. При растворимости основы, лежащей в пределах 5-30 %, выделение происходит значительно полнее, чем при растворимости 75-85 %. Отсюда следует, что перекристаллизация нецелесообразна при отделении легкорастворимой основы.

Вариантом многоступенчатой перекристаллизации является *зонная плавка*. Этот метод разделения основан на различии растворимости примеси в твердом веществе и в расплаве. Образец твердого вещества (например, стержень из металла, подлежащего очистке) медленно передвигают через узкую зону нагрева, при этом происходит постепенное расплавление отдельных участков образца, находящихся в данный момент в зоне нагрева (рис.3).

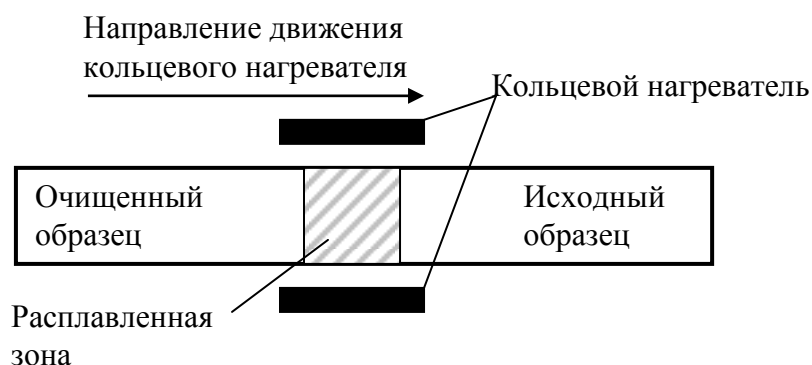


Рис. 3. Схема проведения зонной плавки

Примеси следов элементов, содержащиеся в образце, накапливаются в жидкой фазе, вместе с ней передвигаются вдоль образца и по окончании плавки оказываются в его конце, впоследствии удаляемом. Как правило, зонную плавку повторяют многократно или образец движется через несколько обогреваемых зон для сокращения времени разделения. Достоинствами зонной плавки являются простота аппаратного оформления, сравнительно невысокие температуры проведения процесса (по сравнению с ректификацией) и высокая эффективность разделения. Таким путем, например, выделяют из германия примеси, содержащиеся в нем на уровне 10^{-8} %. Помимо металлов можно также выделять примеси и из неорганических и органических продуктов. Однако зонная плавка неприменима, если два металла образуют твердые растворы. Например, зонной плавкой нельзя отделить золото от серебра. Существует также низкотемпературная зонная плавка, применяемая для глубокой очистки жидких веществ при температуре, близкой к их точке замерзания.

Электроосаждение. Электролитическое осаждение ионов тяжелых металлов из различных растворов на металлических электродах часто является очень полезным методом разделения при определении следов элементов. Поведение следов элементов при электроосаждении зависит от состава

электролита, материала и формы электрода, типа электролитической ячейки и т.д. Наиболее широкое применение нашел электролиз с ртутным катодом. Материалом анода в этом случае являются Pt, Pt-Ir, Ag, Pb. Материал анода не должен содержать примеси и не должен растворяться. Чем больше площадь поверхности ртутного катода, тем больше скорость осаждения. В качестве фонового электролита чаще всего используют разбавленные растворы H_2SO_4 и HClO_4 , а также другие кислоты. Таким методом можно количественно осадить такие элементы, как Cr, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, Mo, Tc, Rh, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Re, Ir, Pt, Au, Hg, Tl, Bi, Po. Такие элементы, как As, Se, Te, Os и Pb количественно отделяются от электролита, но не количественно осаждаются на ртути. Mn, Ru, Sb, La и Nb отделяются неполностью, а в электролите остаются щелочные и щелочноземельные металлы, а также Ti, Zr, Hf, V, Nb, Ta, W, B, Al, P и U.

При электроосаждении следов элементов они переходят в амальгаму, а элементы основы остаются в электролите. Существует два способа последующего отделения следов элементов от амальгамы: отгонка ртути при температуре ее кипения ($\sim 358^\circ\text{C}$) в токе азота и метод анодного растворения, при котором электролитическое растворение следов элементов проводят при контролируемом потенциале, используя амальгаму в качестве анода.

Электроосаждение следов элементов применяется для выделения примесей Cd, Co, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn и Bi в уране при их остаточном содержании на уровне $10^{-4}\%$. После отгонки ртути примеси определяют спектрофотометрически или полярографически.

Благородные металлы (Ag, Au, Pt) самопроизвольно осаждаются на ртути без наложения потенциала. Возможно выделение этих металлов при их содержании в образце на уровне $10^{-7} - 10^{-8}$ г. Этим методом выделяют серебро из меди и железа, а также золото из меди из аммиачных растворов. Электроосаждение следов можно применять для выделения примесей при их содержании в образце до $10^{-7}\%$.

Менее эффективно электроосаждение основного компонента сплава. Его применяют для отделения следов таких элементов, как B, Al, Ti, W, V, Ca, Mg, от железа, никеля, их сплавов (стали). Метод применяют для спектрального определения редкоземельных элементов в стали на уровне $10^{-4}\%$. При определении примеси бора в никеле компактный образец служит анодом. Что касается загрязнений в процессе электроосаждения, то они связаны с частичным растворением противоиэлектрода (например, примесей из платинового анода) с последующим их переносом на катод. Потери возможны за счет улетучивания следов элементов вместе с парами ртути при ее отгонке или из-за неполного растворения при анодном растворении образца.

ОСНОВНЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЭ

Метод	$c_{\text{мин}}$, ГОС	Объем пробы	Определяемые вещества	Достоинства метода
<i>Электрохимические методы анализа</i> в т.ч.	10^{-10} М или 10^{-9} г	1 – 100 мкл		Без введения дополнительных реагентов, т.е влияние мешающих элементов минимально
Полярография	10^{-7} г, 10^{-7} %	0.5 - 2 мл	СЭ в ультрачистых металлах, пищевых продуктах, промышленных отходах, с/х продукции (пестициды), минералах, биологических материалах (микроэлементы и фармпрепараты), следы органических веществ в неводных средах	
Дифференциальная полярография и с анодным растворением	10^{-8} г	10-50 мкл	Практически все электроактивные элементы, для неэлектроактивных можно подобрать электроактивный реагент	Высокая селективность
Амперометрия	10^{-3} – 100 %		O ₂	
Кондуктометрия	10^{-3} – 10^{-6} %		SO ₂ , CO ₂ в воздухе	
Потенциометрия		< 0.2 мл	Cl ⁻ , CO ₂ , O ₂ в крови и выдыхаемом воздухе	
Кулонометрия	10^{-4} % 10^{-7} г 10^{-8} г/л 10^{-4} %		Водяной пар в воздухе хлор в сжигаемых образцах пестициды меркаптаны в болотных газах	

Хронопотенциометрия	10^{-10} Г-экв $< 10^{-6}$ Г < 1 мономолекулярного слоя	50 мкл	Г Ag толщина коррозионных слоев и защитных покрытий на металлах	
Масс-спектрометрические методы в т.ч.	$10^{-4} - 10^{-7} \%$, $10^{-6} - 10^{-15}$ Г	До n мкг	Отрицательно и положительно заряженные частицы, в основном определяют катионы	Селективность, универсальность, можно изучать распределение элементов по объему и поверхности очень малых проб
Методы с электронной бомбардировкой	$5 \cdot 10^8$ атомов $2 \cdot 10^{-11}$ см ³ $10^{-8} \%$ $< 10^{-7} \%$		Следы неорганических газов: аргона ксенона; примеси в воздухе примеси газов в металлах	
Изотопное разбавление	$10^{-6} - 10^{-12}$ Г		СЭ, обладающих двумя и более стабильными изотопами	
Методы с ионной бомбардировкой	$10^{-4} \%$.		Анализ полупроводников и изоляторов	Анализ без разрушения пробы
Метод с искровым источником	$10^{-7} \%$		Анализ полупроводников, сплавов, газов в металлах, примесей в тяжелой воде, СЭ в плазме крови, продуктах сгорания ракетных топлив	Эффективная ионизация для всех элементов, отсутствует эффект влияния основы, надежная идентификация

Эмиссионный РСА в т.ч.	$10^{-4}\%$		Примеси в металлах, рудах и минералах, нефти и нефтепродуктах	
Локальный анализ с помощью электронного зонда	10^{-14} г	До n мкг	Анализ микроскопических осадков, частиц пыли воздуха, микроскопических минеральных зон, слоев коррозии	Анализ без разрушения пробы
Спектроскопия без диспергирующих систем	10^{-9} г	10^{-8} г (срезы тканей)	Следы металлов в биологических объектах	
Спектрофотометр ия (СФМ) и флуорометрия (Фл)	$10^{-4}\%$ СФМ и $10^{-6}\%$ Фл			Легкое приготовление проб и стандартов (анализ в растворе)
Эмиссионный спектральный анализ в т.ч.	10^{-8} г		До 70 элементов. Применяют в полупроводниковой и ядерной промышленности, производстве стали	
Пламенная фотометрия	$10^{-4}\%$		До 60 элементов. Применяют в анализе биологических, агрохимических и промышленных материалов	Минимальная пробоподготовка, минимальное загрязнение пробы

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЕДИНИЧНЫХ МОЛЕКУЛ

В последнее время большое значение уделяется развитию физических методов анализа, ориентированных на регистрацию сверхнизких концентраций веществ. Такие методы ориентированы на контроль состава биологических объектов, в первую очередь, определение сигнальных веществ, участвующих в передаче нервного импульса, манипуляции ионными каналами клеточных мембран и т.д. Упор в таких методах делается не только и не столько на концентрирование и разделение компонентов объекта анализа, сколько на возможности оценки динамики изменения регистрируемой молекулы – структурного, координационного или химического. Это связано с тем, что состав микроокружения сигнальных молекул в биологических системах строго постоянен, что позволяет относительно легко учитывать его влияние на параметры регистрируемых характеристик биологических молекул.

Методы *определения единичных молекул* (ОЕМ) имеют ряд особенностей по сравнению с классическими методами, применяемыми для анализа относительно однородных сред – растворов, мембран, кристаллов. Прежде всего, измерение характеристик единичных молекул дает информацию, свободную от усреднения. Вместо статистических характеристик некоего ансамбля частиц, обменивающихся энергией в результате теплового движения, взаимодействия с электромагнитным излучением и т.д. ОЕМ дает информацию о единичном акте взаимодействия молекулы с окружением. Вторая особенность – отсутствие дополнительных требований к методу анализа, связанных с особенностями обмена энергией между источником электромагнитного излучения и единичной молекулой. В частности, большинство традиционных спектральных методов анализа *a priori* предполагает определенное распределение молекул по базовому и возбужденным энергетическим состояниям, которое определяет характер спектра излучения или поглощения и его зависимость от числа молекул или атомов. Процессы обмена энергией внутри системы, как правило, ведут к уширению линий спектра. Еще более сложным является процесс согласования переноса энергии в люминесцентных методах анализа.

В ОЕМ задача количественного определения числа молекул, как правило, не стоит, вместо нее основной задачей анализа выступает оценка динамики изменения, связанного с взаимодействиями молекулы в рамках определенной модели поведения – катализа, комплексообразования, конформационных изменений, связанных с изменением pH или ионного состава среды и т.д. Это позволяет, в частности, отследить формирование интермедиатов или динамику их образования и расходования по координате реакции. ОЕМ обладает большим потенциалом, правда, пока до конца не реализованным, при получении информации о пространственном и временном распределении сложных

супрамолекулярных систем и молекулярных ансамблей, о динамическом перемещении единичных молекул, для биологических систем – в том числе, во внутриклеточном пространстве *in vivo*.

Современные физические методы OEM включают в себя различные варианты флуоресцентной спектроскопии и рамановской спектроскопии комбинационного рассеяния (КРС). Для достижения чувствительности указанных методов на уровне единичных молекул необходимо решить две проблемы: добиться максимального соотношения сигнал/шум (или сигнал/фон) и убедиться, что наблюдаемый сигнал дает единичная молекула.

В OEM необходимо получить соотношение сигнал/шум, которое позволило бы выделить сигнал единичной молекулы на фоне его флуктуаций. Иными словами, в отличие от обычных макроскопических методов анализа, понятие "шум" относится также к характеристикам единичной молекулы, а именно к естественным флуктуациям полезного сигнала, обусловленным динамикой молекулярного движения или конформационных изменений единичной молекулы. Понятие сигнал/фон трактуется аналогично, но в качестве сигнала фона рассматривается сигнал микроокружения единичной молекулы, в частности, процессы рассеивания или поглощения электромагнитного излучения единичными молекулами и их ансамблями, отличающимися по химической природе от регистрируемой единичной молекулы. Оба указанных параметра определяются как эффективность систем детектирования единичных актов поглощения / излучения электромагнитной энергии отдельными молекулами, так и параметрами последующей обработки сигнала, в частности, условиями его интегрирования, временного разрешения детектора и т.д.

Достижение требуемых значений соотношений сигнал/шум и сигнал/фон достигается путем максимального увеличения регистрируемого сигнала наряду с уменьшением шума/фонового сигнала от нежелательных источников.

Достижение максимального уровня сигнала. Так как в большинстве случаев естественный уровень флуоресценции биомолекул относительно низок, в них часто вносят флуоресцентные метки. Так называют небольшие органические молекулы или органические комплексы f-элементов, которые обладают выраженной флуоресценцией и сохраняют ее после включения в состав биополимера.

Процесс включения флуоресцентной метки достигается путем ее ковалентного связывания с помощью бифункциональных сшивающих реагентов. К числу таких связывающих агентов относятся, например, карбодиимиды или глутаровый альдегид. Такая процедура позволяет четко контролировать место пришивки флуоресцентной метки. Это дает возможность четко координировать метку относительно центра, по которому идет взаимодействие, регистрируемое

по изменению флуоресценции. Такое требование селективного включения метки называется достижением требуемой сайт-специфичности.

Чтобы увеличить сигнал, используя методы флуоресценции, нужны метки- флуорофоры с большим квантовым выходом и подходящими фотофизическими свойствами, такими как большое сечение поглощения и высокая флотабильность. Часто в качестве меток используют органические соединения, относящиеся к классам родаминов, цианинов и оксазинов. В качестве альтернативы этим традиционным флуорофорам в OEM находит использование так называемый зеленый флуоресцентный белок. Первоначально он был выделен из некоторых морских организмов и получил свое название по способности к флуоресценции в зеленой части спектра. Исходный белок - полипептид из 238 аминокислотных остатков, выделенный из медузы *Aequorea Victoria*, поглощал излучение в УФ и синей области спектра и излучал в зеленой. Сейчас существуют варианты рекомбинантного белка, отличающиеся по области поглощения / флуоресценции от исходного природного полипептида. За открытие и исследование строения и функционирования зеленого флуоресцентного белка была присуждена Нобелевская премия по химии (2008 г., О.Симамура, Р.Тсенью и М. Чалфи). Известны также белки, излучающие в красной и синей части спектра.

Белки-метки могут быть введены в состав протеинов с помощью генной инженерии. Для этого в состав ДНК, кодирующей белок, вводится плазмидная ДНК с кодом зеленого флуоресцентного белка. После этого синтезируемый в живой клетке белок будет содержать часть, обеспечивающую высокий уровень флуоресценции.

Другим эффективным способом повышения сигнала является использование в качестве флуорофоров квантовых точек. Так называют нанообъекты, представляющие собой своего рода нанокристаллы, содержащие несколько тысяч атомов халькогенидов кадмия и некоторых других подобных соединений. Они обладают свойствами полупроводников, но под действием внешнего иницирующего излучения сравнительно легко иницируют образование пары "электрон – дырка (положительно заряженная вакансия структуры кристалла)". Этот процесс сопровождается излучением одного фотона. Сильно флуоресцирующие полупроводниковые квантовые точки имеют ряд преимуществ по сравнению с традиционными флуорофорами – это узкая спектральная линия эмиссии и высокая устойчивость к выгоранию (фотообесцвечиванию). В настоящее время разрабатываются способы сочетания квантовых точек с биомолекулами, обеспечивающие как сайт-специфичность, так и биологическую совместимость компонентов.

Повышение чувствительности регистрации комбинационного рассеяния света (КРС) в рамановской спектроскопии упирается в необходимость

разработки эффективных подложек для увеличения сечения рамановского рассеяния. Одним из перспективных подходов является сочетание спектроскопии КРС с измерением поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Явление наблюдается на границе раздела двух сред, отличающихся по оптическим характеристикам, в которых область контакта покрыта сверхтонким слоем металлического проводника. Обычно это золото или серебро. При взаимодействии с электромагнитным излучением в таких металлических сверхтонких пленках формируются устойчивые ансамбли частиц – плазмоны, отличающиеся по энергии и способные к дискретному обмену такой энергией. Выбор условий излучения, в частности, угла падения электромагнитного излучения, позволяет достичь условий резонанса, когда происходит скачкообразное увеличение энергии, потребляемой на формирование таких плазмонов. В результате можно зарегистрировать так называемую исчезающую (затухающую) волну, распространяющуюся в тонком слое на границе двух фаз, параметры которой определяются свойствами подложки. Если поместить на поверхность металла мономолекулярный слой органических молекул, явление ППР позволяет многократно повысить эффективность регистрации их спектров КРС. Такой вариант рамановской спектроскопии получил название SERS – surface enhanced Raman spectroscopy (рамановская спектроскопия с поверхностным усилением сигнала). Основной проблемой SERS является получение подложки с высокой воспроизводимостью характеристик – слой металла должен быть строго постоянной толщины в доли микрона. Для его получения используют различные фотолитографические процессы. Имобилизация исследуемых молекул проводится путем их самосборки поверх золота за счет образования связей Au-S (формирование тиолированных монослоев).

Существуют теоретические ограничения соотношения сигнал/шум (s/n) для различных методов анализа. В частности, для флуоресценции предложено следующее выражение:

$$s/n = \frac{D\Phi_F \left(\frac{\sigma_p}{A} \right) \left(\frac{P_0}{h\nu} \right) T}{\sqrt{\left(\frac{D\Phi_F \sigma_p P_0 T}{Ah\nu} \right) + C_b P_0 T + N_d T}}$$

Здесь Φ_F – квантовый выход флуоресценции, σ_p – сечение поглощения, T – постоянная интегрирования по времени детектора, A – область облучения, $P_0/h\nu$ – число поглощаемых фотонов в секунду, C_b – фоновая величина скорости счета в расчете на 1 Вт мощности возбуждения, N_d – темновая скорость счета, D – зависящий от инструмента фактор накопления.

Согласно этому уравнению, для повышения соотношения s/n следует использовать флуорофор с большим квантовым выходом (Φ_F) и сечением поглощения σ_p . Лазерный пучок должен быть настолько узким, насколько возможно. Мощность излучения P_0 нельзя повышать бесконтрольно, поскольку насыщение снижает сечение поглощения. Кроме того, высокая мощность излучения способна разрушить структуру биологических объектов.

ОЕМ, как правило, лимитировано фоновым излучением объекта исследования. Большая его часть связана с рэлеевским рассеянием света и присутствием флуоресцирующих примесей. В случае живых клеток также наблюдается слабая автофлуоресценция клеточных компонентов. Один из наиболее эффективных путей снижения влияния фона – уменьшение объема пробы. Сигнал единичной молекулы не зависит от объема пробы, тогда как сигнал фона пропорционален объему пробы. Интенсивность рэлеевского и рамановского рассеяния значительно снижается в присутствии меньшего количества рассеивающих молекул в меньшем объеме, а флуоресценция фона, вызванная растворителем и другими средами, снижается за счет уменьшения числа излучающих молекул.

Также подавление фонового сигнала достигается путем использования ультрачистых реагентов при приготовлении образца, путем фотообесцвечивания посторонних включений в растворителе и использования слабофлуоресцирующей оптики.

Максимально доступное увеличение оптической схемы достигается путем использования конфокальной схемы лазерного возбуждения, двухфотонного и затухающего возбуждения, а также ближнепольной оптики.

Схематическое изображение типичного *лазерного конфокального микроскопа* приведено на рис.4. В нем лазерный луч фокусируется вплоть до теоретического предела, определяемого дифракцией. В конфокальной микроскопии используется диафрагма с точечным отверстием (конфокальная диафрагма), помещаемая в базисную фокальную плоскость объектива (фокальный – син. «фокусный»). В результате происходит отклонение всего потока света, кроме области, непосредственно ограничиваемой фокусом диафрагмы. Соответственно, на оптические характеристики лазерного луча влияет только тот объем пробы, который располагается в этой фокальной точке (обычно около фемтолитра).

В *двухфотонном возбуждении* молекула определяемого вещества одновременно поглощает два фотона с общей энергией, соответствующей энергии возбуждения молекулы. Снижение фонового излучения при этом объясняется двумя факторами. Во-первых, эффективность двухфотонного возбуждения зависит от квадратного корня из мощности лазера. В результате достаточную для возбуждения энергию получает крайне малая часть пробы,

располагающаяся непосредственно у фокального пятна (рис.5). Во-вторых, при такой схеме, предполагающей значительное разделение длин волн возбуждения и детектирования, рэлеевское и рамановское рассеяние лазерного пучка под действием образца легко компенсируется соответствующими высокоэффективными оптическими фильтрами.

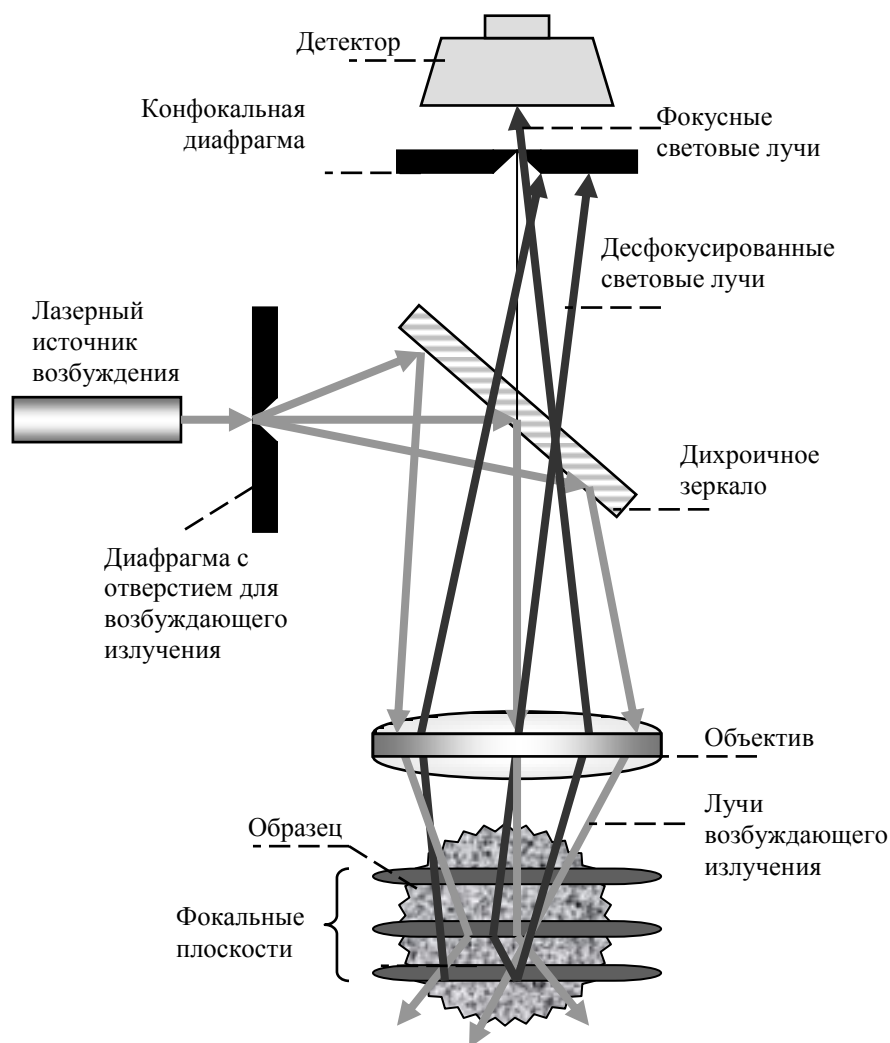


Рис. 4. Схема лазерного конфокального микроскопа.

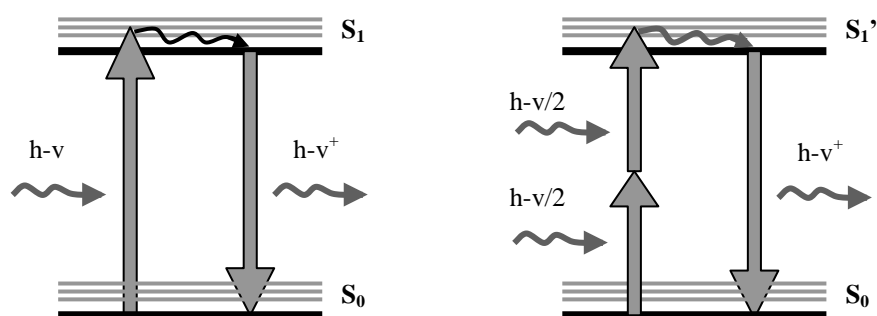


Рис. 5. Энергетические диаграммы одно- (слева) и двухфотонного (справа) возбуждения

Затухающая волна - явление, родственное ППР. При прохождении возбуждающего лазерного луча из среды с высоким показателем преломления в среду с более низким показателем преломления можно достичь явления полного внутреннего отражения луча, подбирая угол его падения. При этом часть энергии затрачивается на генерирование электромагнитного поля (так называемой затухающей волны), распространяющейся в среде с более низким показателем преломления. Энергия затухающей волны экспоненциально уменьшается с увеличением расстояния от границы раздела сред. Поэтому ее можно зафиксировать в слое не более 300 нм от границы раздела. Только в пределах этого слоя состав пробы влияет на характеристики излучения, что сильно снижает эффективный объем пробы.

Вышеприведенные способы оптического снижения объема пробы приводят к улучшению соотношения сигнал / шум. Однако их эффективность часто остается недостаточной. Альтернативой выступают механические устройства, например, микрокапиллярные трубки или микроканалы в сочетании с гидродинамической фокусировкой. Эффективные объемы, создаваемые этими каналами, в 100 раз меньше, чем объемы в традиционной конфокальной оптике, что дает возможность дальнейшего усиления аналитического сигнала. Дополнительными преимуществами таких устройств являются повышенная скорость определения и меньшие затраты на обработку данных. К числу недостатков можно отнести зависимость результатов от геометрии таких наноустройств (размер, форма капилляров, их однородность, постоянство характеристик трения вдоль внутренних стенок и т.д.).

Другой экспериментальной проблемой OEM является необходимость убедиться в том, что наблюдаемый сигнал создается единичной молекулой. Флуктуации интенсивности, наблюдаемые в экспериментах, могут быть связаны с изменениями динамики единичной молекулы или ее молекулярного окружения, но они также могут создаваться излучением окружающих молекул. Данная проблема называется «неопределенностью источника шума».

Первый способ решения проблемы включает сочетание фокусировки лазера на малом объеме возбуждения и использования ультранизких концентраций интересующих молекул. Второй способ – использование резонансных методов, когда возбуждение и последующая регистрация сигнала проводятся при строго определенных характеристиках лазерного луча, обеспечивающего селективность переноса энергии на строго определенные молекулы образца. Даже если лазерный луч освещает заведомо большую площадь, никакие молекулы в объеме возбуждения, кроме молекул-мишеней, не будут участвовать в поглощении электромагнитного излучения.

Дадим краткую характеристику основных оптических методов OEM.

Люминесценция с лазерным возбуждением - ценный метод изучения молекулярных процессов, относящийся к неразрушающим методам контроля. Помимо собственно интенсивности вынужденного излучения различных флуоресцентных меток для получения информации могут использоваться изменения в поляризации электромагнитного излучения и характеристическом времени флуоресценции. Эти параметры позволяют изучать конформационные превращения, кинетику реакций и другие тонкие изменения в химическом микроокружении изучаемых молекул.

Флуоресцентная корреляционная микроскопия – метод изучения броуновского движения флуоресцентных молекул по флуктуации интенсивности флуоресценции молекул, проходящих в фокусе лазерного луча. Оценка малых спонтанных флуктуаций сигнала от совокупности флуоресцентных молекул позволяет получить динамическую информацию о термодинамически равновесных системах. В частности, флуоресцентная корреляционная микроскопия позволяет с высокой точностью определять локальные концентрации флуорофоров, коэффициенты их подвижности, рассчитывать константы скорости реакций биомолекул, меченных флуоресцентными метками. Измерения также возможны во времени, в том числе, при исследовании процессов с участием нуклеиновых кислот и белков. Разработаны способы контроля конформационных изменений природных молекул по флуктуациям флуоресценции единичных молекул флуоресцентных красителей, используемых в качестве меток. Метод флуоресцентной корреляционной микроскопии характеризуется высоким отношением сигнал/шум за счет крайне малых объемов проб, достигаемым путем использования конфокального и двухфотонного методов возбуждения. Так, конфокальная микроскопия позволяет оценивать молекулярные процессы в клеточных мембранах, изучать молекулярную подвижность белков и ДНК, в том числе, внутри клеток.

Флуоресцентный резонансный перенос энергии (FRET – fluorescence resonance energy transfer) - это безызлучательный перенос энергии между двумя молекулами различных флуорофоров, располагающихся в непосредственной близости друг от друга (на расстоянии от 20 до 100 Å) (рис.6). Такой перенос требует определенной взаимной ориентации молекул, нарушение которой снижает выход флуоресценции. Применительно к биологическим объектам для достижения FRET в биологическую макромолекулу вводят два флуорофора – донорный и акцепторный, которые ковалентно связывают с определенными функциональными группами биополимера. Выбор меток проводят, исходя из условия, что спектры свободных (несвязанных) флуорофоров должны частично перекрываться. Тогда при инициировании флуоресценции за счет явления FRET возбуждение одного (донорного) флуорофора будет инициировать излучение второго (акцепторного).

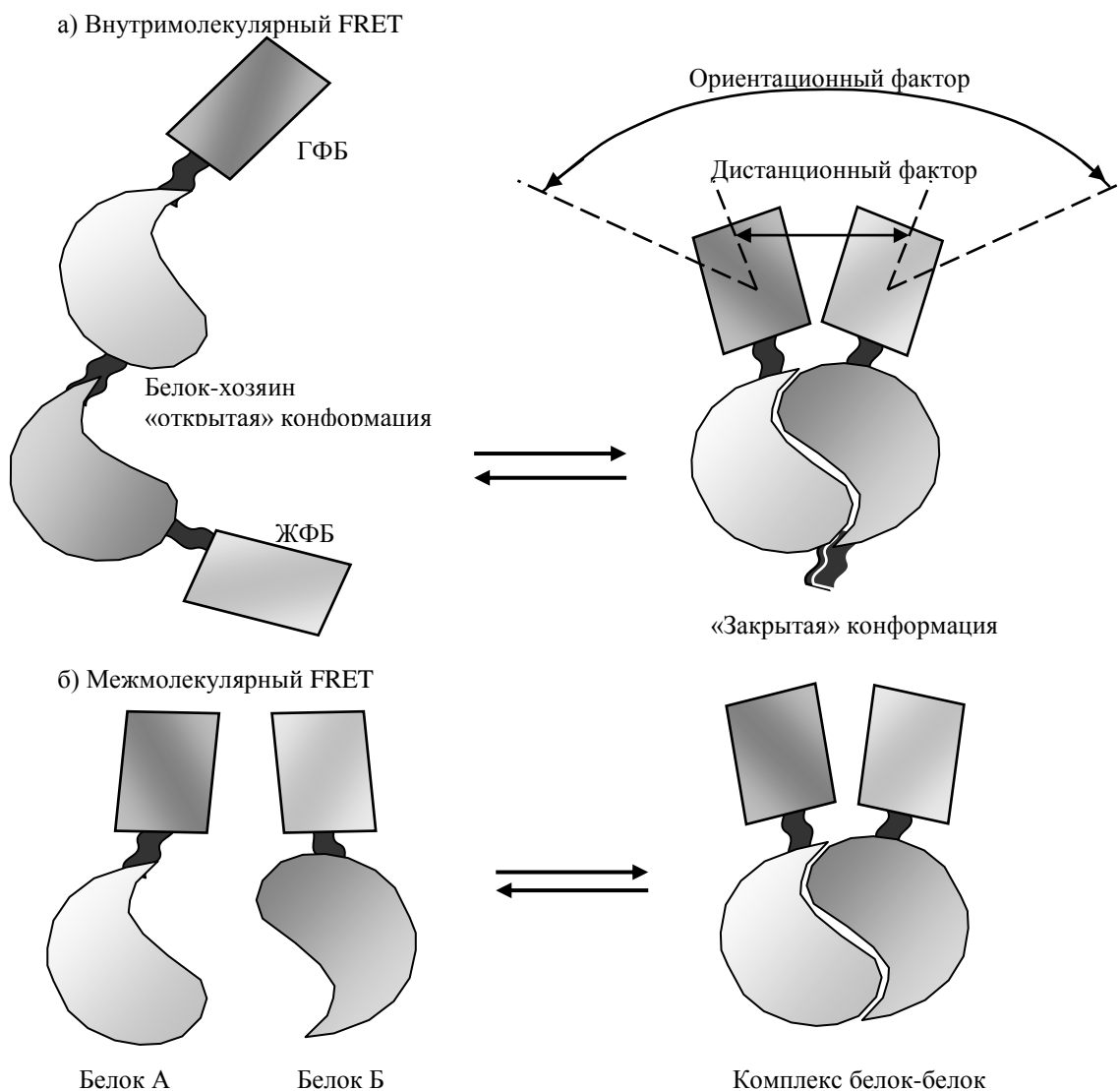


Рис. 6. Внутри- и межмолекулярный FRET. а) Внутримолекулярный FRET происходит, когда и донорный, и акцепторный флуорофоры (голубой флуоресцентный белок ДФБ и желтый флуоресцентный белок ЖФБ, соответственно) закреплены на одной и той же молекуле-хозяине, которая способна к переходу между «открытой» и «закрытой» конформациями. Количество переносимой энергии сильно зависит от относительной ориентации и расстояния между донорным и акцепторным флуорофорами. б) Межмолекулярный FRET происходит между одной молекулой (белок А), соединенной с донором (ДФБ), и другой молекулой (белок Б), соединенной с акцептором (ЖФБ). Когда два белка связываются друг с другом, происходит FRET. Когда они диссоциируют, FRET уменьшается.

Поскольку интенсивность флуоресценции определяется расстоянием и взаимным расположением флуорофоров, явление FRET предоставляет тонкий механизм изучения молекулярной динамики биополимеров – белков и

олигонуклеотидов. Например, внутримолекулярный FRET (рис. 6а) будет реагировать на изменение конформации белка, включая его денатурацию. Межмолекулярный FRET (рис. 6б) с участием двух молекул белка, меченных соответственно донорным и акцепторным флуорофором, позволяет отслеживать взаимодействия белок-белок. Существуют методы реализации FRET, в которых в качестве одного из флуорофоров используется зеленый флуоресцирующий белок.

Флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения (TIR-FM, total internal reflection fluorescence microscopy) – общий термин для спектроскопического или микроскопического метода, основанного на использовании затухающей волны, возникающей при полном внутреннем отражении электромагнитного излучения на границе сред с разными показателями преломления.

Это важный инструмент изучения любых явлений, протекающих в указанной области пространства. В TIR-FM затухающая волна обуславливает возбуждение флуорофоров, характеристики излучения которых (интенсивность затухания и спектры флуоресценции) определяются процессами, протекающими на границе сред. Метод позволяет проводить измерения не только в гомогенных условиях, но и в живых клетках и других микро- и наногетерогенных структурах. К достоинствам метода относятся четкое пространственное разделение объектов контроля (как отмечалось выше, за счет пространственного ограничения затухания сканируются объекты на расстоянии не более сотен нанометров от границы раздела) и чрезвычайно низкий уровень фонового излучения как результат огромного снижения удельного объема облучаемого образца.

Применяют две конфигурации оборудования: TIR-FM на призме и с использованием объектива (рис.7). В первом варианте (рис. 7а) призма, используемая для генерации переменного поля затухающей волны, располагается со стороны образца напротив объектива. В конфигурации с объективом (рис.7б), возбуждающий лазерный луч освещает образец, проходя через специальные линзы с высокими значениями цифровой апертуры, и генерирует затухающую волну на границе между стеклянным покровным стеклом и образцом.

Близкопольная сканирующая оптическая микроскопия. Развитие данного метода явилось попыткой обойти фундаментальное ограничение оптики, а именно, дифракционное ограничение разрешения, равное половине используемой длины волны электромагнитного излучения. В данном случае (рис. 8) оптические измерения возможны с разрешением меньше указанного параметра. Для этого используют своеобразный зонд, представляющий собой точечный источник излучения, располагающийся на очень близком расстоянии

от поверхности сканируемого объекта. Диаметр отверстия (апертура) источника излучения должен быть меньше длины волны и обычно составляет порядка 50-100 нм. В качестве зонда используется стекловолокно в металлической оболочке (оптоволоконный кабель).

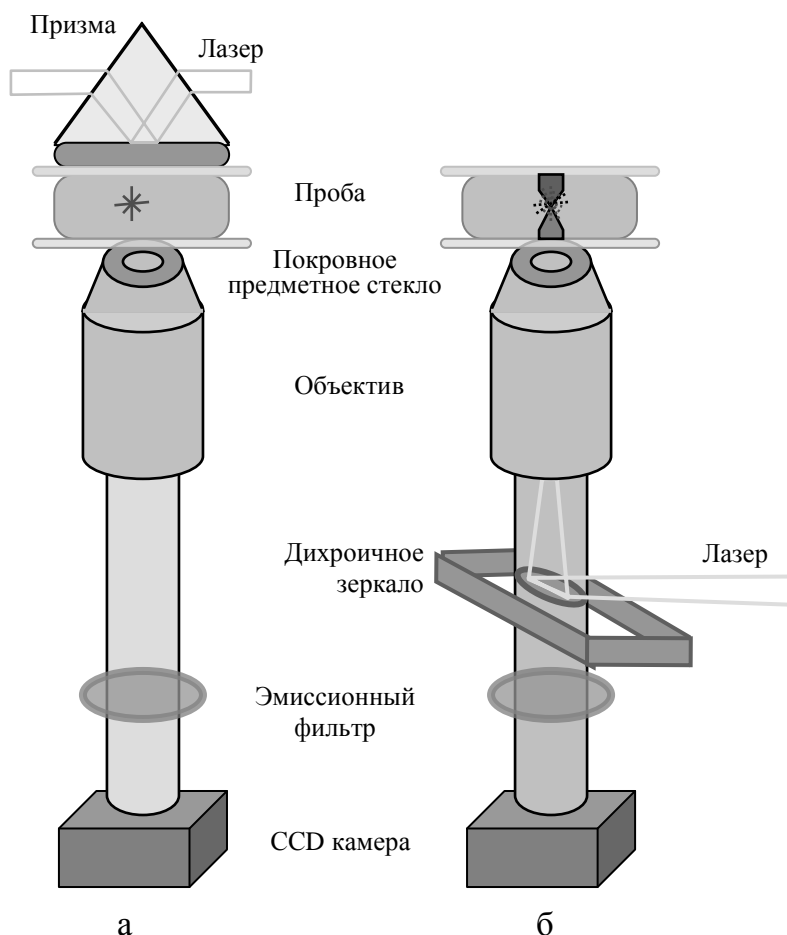


Рис. 7. Флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения: а) на призме. Лазерный луч, проходящий через призму на сторону пробы, расположенной напротив объектива микроскопа, генерирует затухающее поле. Излучаемая флуоресценция поступает на тот же объектив и детектируется посредством CCD (цифровой) камеры; б) через объектив. Направленный лазерный луч поступает через дихроичное зеркало в объектив микроскопа. Испускаемая флуоресценция возвращается на тот же объектив и детектируется CCD камерой.

Снижение пределов разрешения происходит за счет двух явлений. Во-первых, длина пробега фотонов становится недостаточной для проявления дифракции. Во-вторых, формируется затухающая волна на границе зонд – поверхность образца, что приводит к эффективному контролю переноса энергии в пределах слоя толщиной до 200 нм от кончика зонда. Перемещение зонда по поверхности позволяет проводить своеобразную «топографическую съемку»,

получая профили распределения характеристик затухающей волны, производные от состава поверхностного слоя.

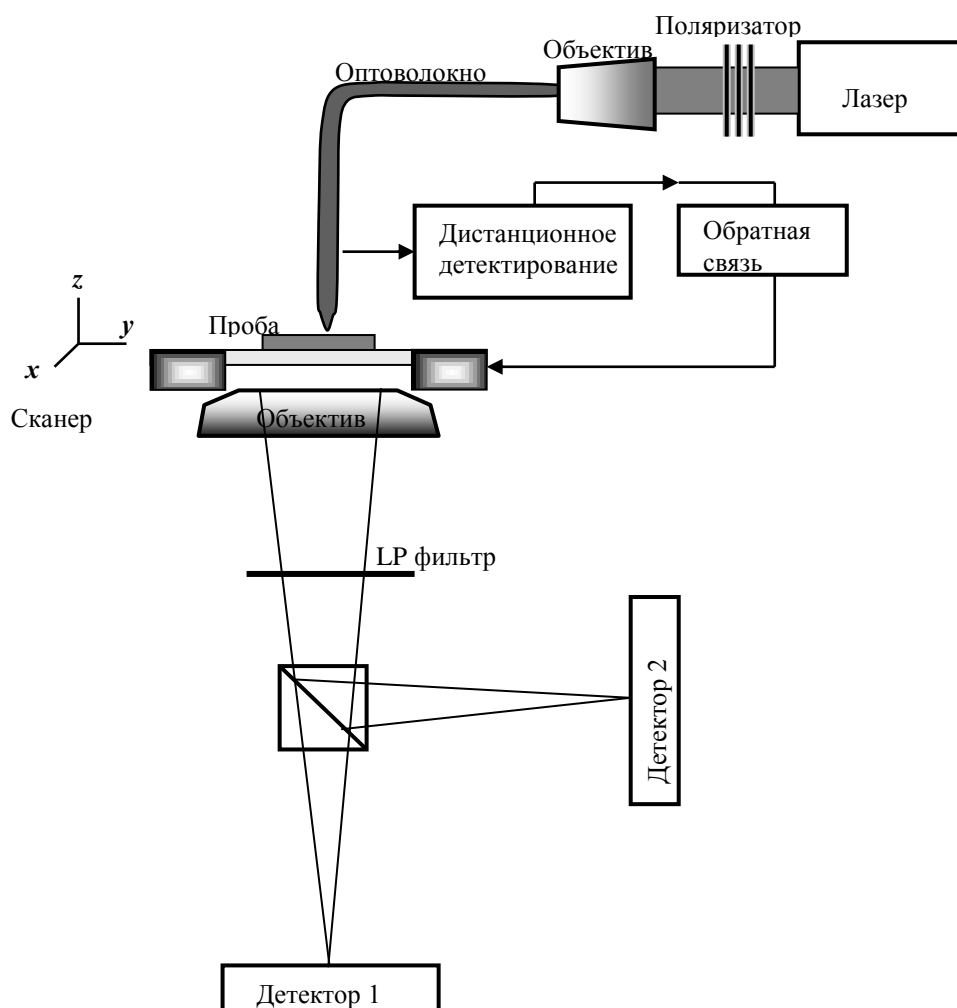


Рис. 8. Схема ближнепольного сканирующего оптического микроскопа (БСОМ). Зонд в БСОМ представляет собой оптоволоконно с коническим кончиком. Лазерный луч поступает по волокну и возбуждает флуорофоры, сканируя поверхность пробы. Расстояние зонд – проба поддерживается постоянным (<10 нм) посредством контроля сил притяжения в сочетании с электронной системой обратной связи, контролирующей с помощью пьезоэлектрического мотора перемещение предметного столика. Флуоресценцию регистрируют с помощью традиционного инвертированного микроскопа. Двухканальное оптическое детектирование позволяет проводить разделение сигналов по длине волны и поляризации излучения. LP (long-pass) фильтр отсекает коротковолновое излучение.

Сверхмалый объем «прощупываемого» пространства, достигаемый за счет выбора апертуры и свойств затухающей волны, практически устраняет мешающее действие фонового излучения. Метод позволяет «видеть» как

отдельные молекулы (белки, нуклеиновые кислоты) и клетки, так и процессы с их участием, например, взаимодействие раковых клеток с лекарственными препаратами или ферментативное превращение субстрата, сопровождаемое конформационным изменением белка.

SERS - поверхностно усиленная рамановская спектроскопия. Это способ усиления сигналов спектра КРС, связанный с использованием наноразмерных частиц золота и серебра. На рис.9 схематически показаны способы получения таких наноструктур. Значительное увеличение сечения поглощения в SERS обусловлено, главным образом, более высокой интенсивностью электромагнитного поля, окружающего наночастицы металлов, благодаря явлению ППР. Модификация поверхности наночастиц монослоями органических молекул варьирует сигнал в зависимости от природы и концентрации модифицирующих молекул. Фактор усиления SERS порядка 10^{14} соответствует эффективному сечению поглощения $\sim 10^{-16}$ см²/молекулу. Это значение достаточно для определения единичных излучающих молекул.

«Оптический пинцет» (оптическая ловушка) - метод, основанный на явлении светового давления, оказываемого электромагнитным излучением. Для его реализации используется специальная схема фокусировки лазерного луча (рис.10а). Развиваемые при этом силы, действующие на освещаемую частицу, имеют величину порядка нескольких пиконьютонов, но они вполне достаточны для перемещения нанообъектов. Рис. 10б иллюстрирует работу оптической ловушки. Взаимодействие сфокусированного лазерного луча с условным объектом (шариком) как сумму сил можно разложить на две составляющие. Это $F_{\text{scattering}}$ - сила рассеивания, которая перемещает шарик по направлению падающего света, и F_{gradient} - сила отклонения, возникающая из-за градиента интенсивности света и направленная перпендикулярно по направлению изменения интенсивности сфокусированного луча. Когда сила отклонения F_{gradient} превышает силу рассеивания $F_{\text{scattering}}$, «оптический пинцет» может захватывать нанообъекты и перемещать их в требуемом направлении.

В качестве «шариков» могут выступать вирусы, бактерии, живые клетки, органеллы, молекулы ДНК и другие частицы с размерами от десятков нанометров до десятков микрон. Ими можно манипулировать, подбирая характеристики лазерного излучения (рис. 10в). Так можно определять пространственное положение клеток и бактерий, перемещать их в определенном направлении, исследовать динамику превращения в химических реакциях, в процессах автоагрегации и др. «Оптический пинцет» используют в изучении так называемых молекулярных двигателей и измерении физических свойств ДНК (упругости, эластичности, параметров фазового перехода и пр.).

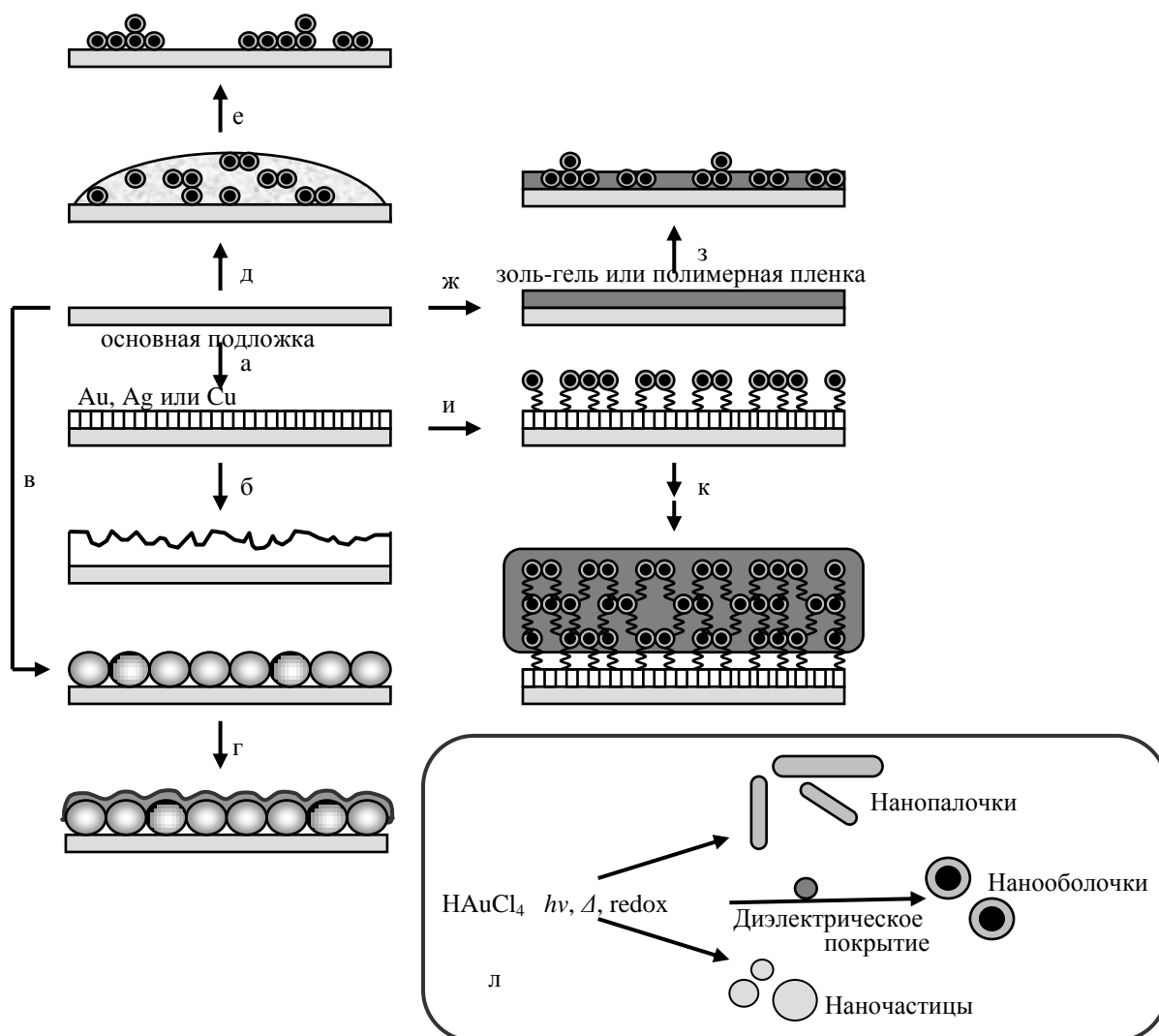


Рис. 9. Схема получения твердотельных и наноструктурированных SERS-активных архитектур: вакуумное осаждение или осаждение из паровой фазы сплошных или разрывных пленок благородных металлов и металлических «островков» (а); коррозионное травление или электрохимическое повышение шероховатости (б); осаждение и упорядочение микросфер и наночастиц (в); вакуумное напыление на регулярную или нерегулярную поверхность (полимерный латекс, коллоидные кристаллы и т.п.) (г); осаждение из водного золя (д) с последующей агрегацией, гравитационным осаждением или сборкой (е); полимерное или золь-гель осаждение (ж); захват наночастиц благородных металлов в матрице или формирование наночастиц *in situ* (з); самосборка монослоя коллоидных частиц металла (и); формирование коллоидных мультислоев и их последующее покрытие силиконом, получаемым по золь-гель технологии (к). Общие строительные блоки, используемые для приготовления SERS-активных материалов, начинаются с прекурсоров благородных металлов, таких как HAuCl_4 , AgNO_3 или Ag_2SO_4 (л).

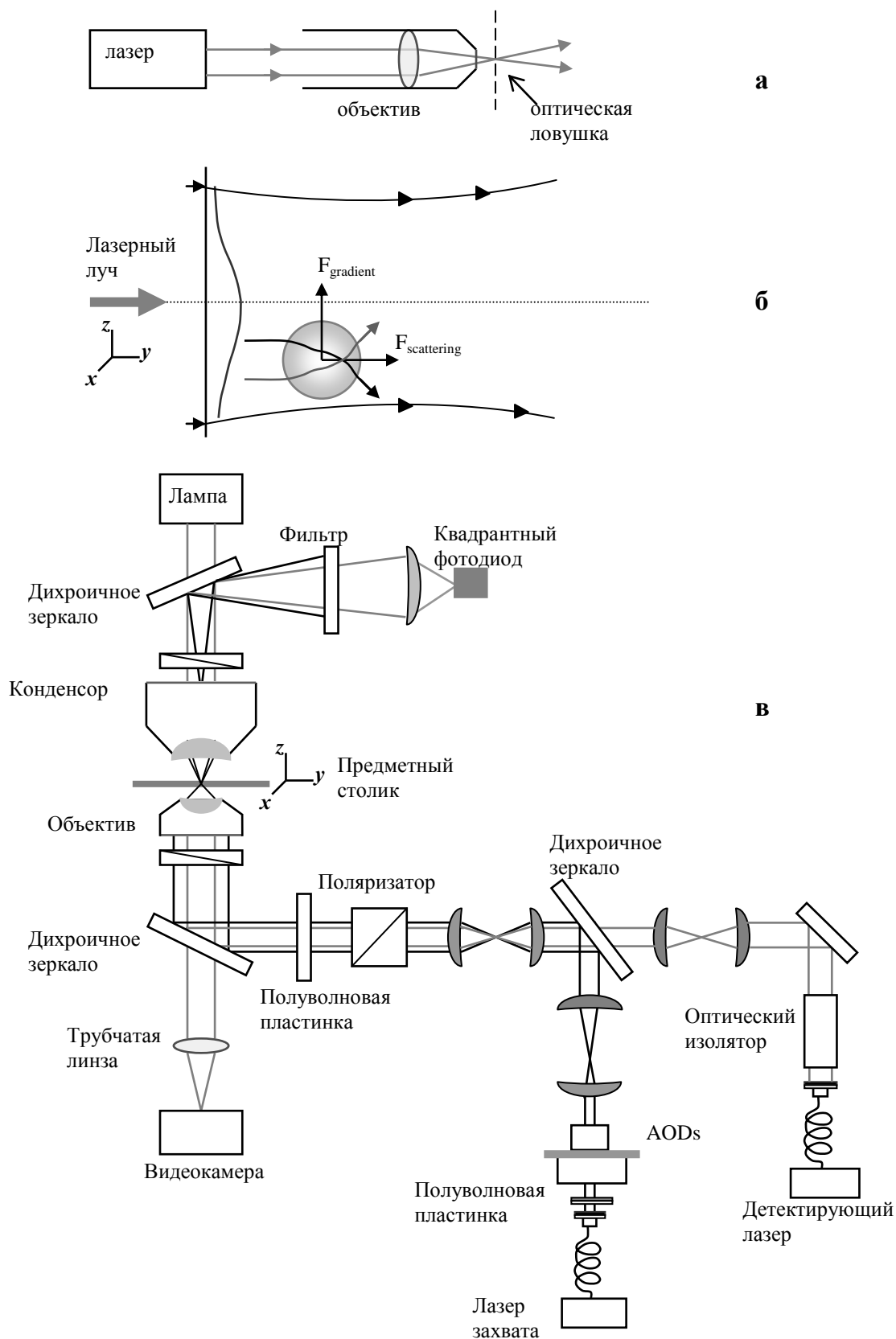


Рис. 10. а) Принцип формирования оптической ловушки; б) основной принцип перемещения частиц под действием светового давления; в) схема «лазерного пинцета»

Рассмотрим некоторые биологические и супрамолекулярные процессы, в изучении которых активно применяют методы ОЕМ.

«Молекулярные двигатели» - биологические и супрамолекулярные системы, в которых реализуется направленное механическое перемещение отдельных частей молекулы или отдельных молекул. Примером могут служить двигательные белки, участвующие в мускульном сокращении под действием определенных химических стимулов. Методы ОЕМ позволили изучить детали функционирования таких белков, а именно миозина и кинезина.

Механизм их движения был установлен по результатам исследования конформационных изменений и наблюдения за скоростью и направлением перемещения отдельных доменов и молекул в целом. Для этого использовали варианты FRET, а также «оптический пинцет». Метод TIR-FM позволил связать механические и химические процессы с участием единичной молекулы миозина, в частности, выявил роль АТФ в сокращении мускульных белков. Способность управлять нитями миозина с помощью оптической ловушки сделала возможным прямые измерения нанометровых перемещений молекулы и сил порядка нескольких пиконьютонов, необходимых для приведения в движение молекулы миозина.

Сигнальные системы клетки. Высокое временное и пространственное разрешение, доступное в спектроскопии единичных молекул, делает ее идеальной для изучения конформационной динамики и определения местоположения белков в процессе передачи химических и электрофизических сигналов клетки. Сигнальные белки, такие как мембранные рецепторы, малые G-белки, меченные флуорофорами или зеленым флуоресцентным белком, четко проявились в клетках с помощью TIR-FM. Для оценки динамического и пространственного распределения калмодулина, сигнального кальций-зависимого белка – посредника метаболических процессов, отвечающих за мускульные сокращения и метаболизм энергии, – использовали FRET. При этом удалось достичь временного разрешения сигнала в пределах микро- и миллисекундной шкалы.

Конформационную динамику белков изучали с помощью метода FRET, позволяющего отслеживать единичные молекулы белков в растворах и непосредственно в живых клетках. Метод имеет множество вариантов применения, включая оценку флуктуаций структуры белков, их стабильности, способности к обратимому сворачиванию, изучение ферментативного катализа. Повышение чувствительности определения дает использование FRET в сочетании с зеленым флуоресцентным белком, синтез которого можно «запрограммировать» путем экспрессии соответствующего гена в молекулу РНК. Флуоресцентная микроскопия используется для контроля конформаций белков в природном окружении *in vivo*. Информация об ориентации доменов

белка может быть получена из анализа поляризационного спектра флуоресценции при облучении хромофоров поляризованным светом. Примером может послужить наблюдение вращательных движений нитей единичных молекул актина и миозина. Одновременное измерение FRET или уровня поляризации излучения наряду с оценкой механических сил, возникающих при перемещении молекулы миозина, может дать полезную информацию о связи конформационных изменений молекул с особенностями молекулярного движения.

Ионные каналы - это белки, которые строго регулируют ионный поток через клеточные мембраны и генерируют градиент концентрации ионов, необходимый для осуществления функций клетки, таких, например, как синтез АТФ, передача нервного импульса, мышечная активность и др. С помощью TIR-FM были визуализированы единичные белковые молекулы калиевого канала, включая движение молекул белков, не вовлеченных прямо в открытие или закрытие ионного канала, но соседствующих с ним. Конфокальная флуоресцентная микроскопия была использована для исследования кинетики функционирования ионных каналов на основе единичных белковых молекул. С помощью данного метода было установлено перемещение отдельных ионов по каналу, при этом использовали тушение флуоресценции тетрацицина, включенного в липидную мембрану. Подобный подход чрезвычайно актуален в исследовании действия фармакологических препаратов, а также при моделировании различных патологий. Помимо калиевых каналов, аналогичные исследования проводили на кальциевых каналах сердечной мышцы человека.

Мониторинг химических реакций в клетках. OEM эффективно применяют для определения количества реагентов, участвующих во внутриклеточных реакциях, и их пространственного анализа. Для этого используют оптические наносенсоры, состоящие из биологического рецептора, соединенного с оптоволоконном нанометрового размера. В качестве биологических распознающих элементов применяют ДНК и белки. Такие устройства в перспективе способны обеспечить прорыв в исследованиях живой клетки, включая исследование апоптоза клетки, генетической изменчивости и канцерогенеза. Прототипом таких наносенсоров могут служить исследования SERS с наночастицами золота и серебра, например, для построения профилей распределения молекул противораковых препаратов, меченных флуорофорами, а также для изучения их влияния на ДНК раковых клеток.

ДНК-СЕНСОРЫ

Дезоксирибонуклеиновые кислоты (ДНК) активно используются в составе биосенсорных устройств для определения высоко- и низкомолекулярных соединений, способных к специфическому взаимодействию. Помимо собственно аналитических целей (обнаружение и количественное определение противораковых препаратов, денатурирующих реагентов, ионов тяжелых металлов, антиоксидантов), интерес к ДНК как компонентам биосенсоров обусловлен их ролью в функционировании клетки, прежде всего, в процессах хранения и передачи генетической информации.

ДНК-сенсоры в определенной степени моделируют указанные процессы, что позволяет успешно решать медико-биологические задачи, связанные с такими проблемами, как ранняя диагностика онкологических и аутоиммунных заболеваний, установление отцовства, выявление патогенных микроорганизмов и вирусов, обнаружение высокого загрязнения объектов окружающей среды и мутагенной активности химических соединений и отходов производства.

ДНК за счет особенностей строения реализует многоточечное взаимодействие с биологическими молекулами, что позволяет достичь в ряде случаев высокоспецифичного отклика и надежного определения целевых соединений на уровне $10^{-16} - 10^{-18}$ М.

В первую очередь, достижение высокой чувствительности определения реализуется для гибридизационных взаимодействий. Как известно, нативная ДНК существует в виде двойной спирали, образованной последовательностью нуклеиновых оснований (аденин, тимин, гуанин и цитозин), связанных между собой мостиками из фосфатных и рибозных остатков. Взаимодействие нуклеотидов происходит по принципу «каждый с каждым» и строго специфично: аденин взаимодействует с тимином, а гуанин – с цитозином. Взаимодействие обеспечивает высокая геометрическая комплементарность указанных нуклеотидов, а также образование водородных связей между атомами кислорода и азота гетероциклов.

В ДНК-сенсорах для регистрации комплементарных взаимодействий используется участок одной цепи ДНК, так называемый **ДНК-зонд**, нуклеотидный состав которой специфичен для ДНК «хозяина». Как правило, это участок гена определенного белка или концевой фрагмент молекулы ДНК, содержащий нуклеотиды, участвующие в регуляции процессов транскрипции. В отличие от самой молекулы ДНК, содержащей миллионы пар оснований, такие зонды невелики и включают не более нескольких десятков нуклеотидов. Это существенно облегчает их модификацию и включение в состав биосенсоров.

Исходным материалом для создания ДНК-сенсоров являются продукты, применяемые в генетической диагностике с помощью традиционных

несенсорных технологий. Это, в первую очередь, анализ на основе **полимеразной цепной реакции (ПЦР)** – технологичный, хотя и не вполне дешевый способ определения нуклеотидной последовательности, комплементарной зонду, с флуоресцентной регистрацией сигнала. ДНК-зонды для анализа с помощью ПЦР и ДНК-зондов получают с помощью ДНК-амплификаторов – устройств, обеспечивающих последовательное присоединение отдельных нуклеотидов по специальной программе. Амплификаторы полностью автоматизированы и обеспечивают достаточно низкую себестоимость изготовления олигонуклеотидов требуемого состава.

Перед определением ДНК-зонды наносят на твердый носитель, в качестве которого могут выступать пластиковые пластины или преобразователи сигнала биосенсоров. Этот процесс, называемый **иммобилизацией**, требует модификации ДНК-зондов. К их концевым (называемым также терминальными) функциональным группам присоединяют вспомогательные реагенты, которые обеспечивают связывание ДНК-зонда с подложкой и регистрацию последующего сигнала о связывании с комплементарным участком олигонуклеотидов – так называемой биологической мишенью. К числу наиболее распространенных способов модификации можно отнести присоединение тиольных фрагментов $-SH$ (иммобилизация ДНК на золоте за счет самопроизвольного образования связей $Au-S-$), ферроцена (регистрация взаимодействий по амперометрическому сигналу метки), обработка ДНК карбодиимидами с последующим присоединением к карбоксильным или аминок группам носителя. Особое значение имеет присоединение к концевым группам ДНК биотина – природного амина, обладающего высоким сродством к белкам авидину и стрептавидину. Биотин присоединяется к этим белкам с образованием высокопрочных комплексов, что позволяет конструировать различные биологические материалы с последовательным присоединением биомолекул, содержащих соответствующие фрагменты данной пары. Биотинированные ДНК-зонды, необходимые для наиболее массовых видов клинического анализа, выпускаются промышленностью.

Различают три основных пути иммобилизации ДНК: физическая, аффинная и ковалентная иммобилизация. В *физической* адсорбции ДНК-зонды адсорбируют на соответствующем носителе или включают в пленку природного или синтетического полимера. Данный способ иммобилизации сохраняет естественную конформацию ДНК, однако может стерически ограничивать доступ к ней больших биомолекул. В *аффинной иммобилизации* используют природные рецепторы, такие как биотин и авидин, для прочного связывания ДНК-зонда с субстратом. В качестве последнего могут выступать также частицы коллоидных металлов (прежде всего, золота), и феррита, обладающие парамагнитными свойствами. Это позволяет отделять ДНК и продукты

взаимодействия с комплементарными молекулами с помощью постоянного магнита. В качестве наиболее распространенных рецепторов для аффинной иммобилизации применяют также конканавалин А и протеин А, выделяемые соответственно из растительного материала и клеточных стенок бактерий. *Ковалентная иммобилизация* осуществляется посредством образования связей между функциональными группами ДНК-зонда и материалом носителя. Такие связи устойчивы к гидролизу и обеспечивают долговечность ДНК-сенсора при хранении и использовании. Кроме того, ковалентная иммобилизация позволяет достаточно точно регулировать селективность реакции присоединения, что позволяет добиться регулярного строения поверхностного слоя и сохранения стерической доступности ДНК-зонда для связывания высокомолекулярных соединений. К числу наиболее распространенных вариантов ковалентной иммобилизации относятся присоединение тиолированных ДНК-зондов к золоту, связывание с помощью карбодиимидов и глутарового альдегида.

Регистрация сигнала ДНК-зонда осуществляется в основном с помощью косвенных методов, основанных на использовании специальных соединений – меток, вводимых в состав самого зонда или вспомогательных соединений, добавляемых в пробу. Многие из таких методов аналогичны вариантам конкурентного и сэндвичевого иммуноанализа, рассмотренного ниже. В качестве примера, на рис. 11 представлен вариант ДНК-анализа с помощью олигонуклеотидов, меченных ферментом.

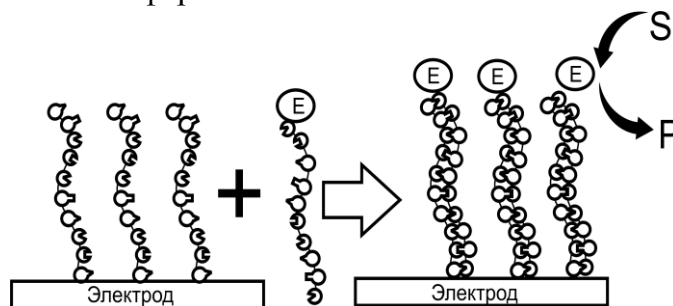


Рис.11. Регистрация гибридационных взаимодействий с помощью олигонуклеотида, меченного ферментом Е. Мерой активности фермента является скорость превращения субстрата (S), определяемой по концентрации продукта реакции (P)

При присоединении к ДНК-зонду, закрепленному на электроде, комплементарной последовательности с концевым ферментом, достаточно определить активность фермента в продукте взаимодействия, чтобы установить концентрацию участников гибридационного взаимодействия. Если ферментом является щелочная фосфатаза, чувствительность электрохимической регистрации достаточна для определения фемтомолярных количеств биологической мишени (субстрат – нафтил фосфат). Поскольку введение

фермента-метки в состав определяемого олигонуклеотида – достаточно сложная задача, можно реализовать конкурентную схему, добавляя меченый олигонуклеотид к пробе и устанавливая уровень активности фермента как меры конкуренции меченого и немеченого олигонуклеотида в пробе.

Сэндвичевые методы имеют преимущество перед конкурентными ДНК-сенсорами при определении молекул ДНК с большой массой, для которых установление конкурентного равновесия требует довольно продолжительного времени. Предел обнаружения олигонуклеотидов в сэндвичевых методах может составлять до 10^6 молекул при общей продолжительности измерения около 2 часов.

Аналог сэндвичевого иммуноферментного анализа – ДНК-сенсор, промышленно выпускаемый фирмой Motorola под торговой маркой eSensor™. В нем используются два ДНК-зонда, комплементарные различным участкам биологической мишени. Один зонд предназначен для иммобилизации олигонуклеотида на твердом носителе, а второй, содержащий метку (ферроцен), – для регистрации гибридизационных взаимодействий. В результате тройных взаимодействий образуется структура, в которой биологическая мишень выступает в качестве «мостика», связывающего два ДНК-зонда с поверхностью электрода. В результате ферроценовые фрагменты оказываются вблизи поверхности электрода, что позволяет зафиксировать амперометрический сигнал их обратимого окисления (рис.12).



Рис. 12. Схема функционирования сенсора Motorola eSensor™

В составе eSensor™ присутствуют сразу 16 или 32 электрода, каждый из которых несет свой ДНК-зонд. Это позволяет обнаруживать сразу несколько возбудителей заболеваний и решать задачи по локализации точечных мутаций ДНК. Объем реагентов, необходимых для определения, составляет ~ 100 мкл.

Помимо способов измерения сигнала, общих с иммуноанализом, для ДНК-сенсоров разработан ряд собственных специфических схем измерения, использующих свойства самих ДНК-зондов. Наиболее интересны так

называемые конформационные биосенсоры, в которых регистрация сигнала обусловлена изменением жесткости гибридизованного участка ДНК, образующегося при распознавании биологической мишени. В таких биосенсорах используют специальные зонды, представляющие собой частично комплементарные олигонуклеотидные последовательности, одним концом закрепленные на носителе. В обычном состоянии такой зонд сворачивается за счет взаимодействия комплементарной части последовательности, образуя конфигурацию, называемую «шпилькой» (рис.13). В присутствии биологической мишени, комплементарной связывающему участку ДНК-зонда, происходит разворачивание «шпильки» с образованием димера. Существуют несколько вариантов регистрации перехода «шпилька» - димер. На рис.3 показан электрохимический сенсор, в котором сигналом служит ток окисления ферроцена, ковалентно присоединенного к противоположному кольцу «шпильки». В отсутствие мишени ферроцен располагается близко к поверхности электрода, что позволяет ему участвовать в реакции переноса электрона. После присоединения мишени формируется достаточно жесткий двунитевой участок, отодвигающий ферроцен от поверхности электрода.

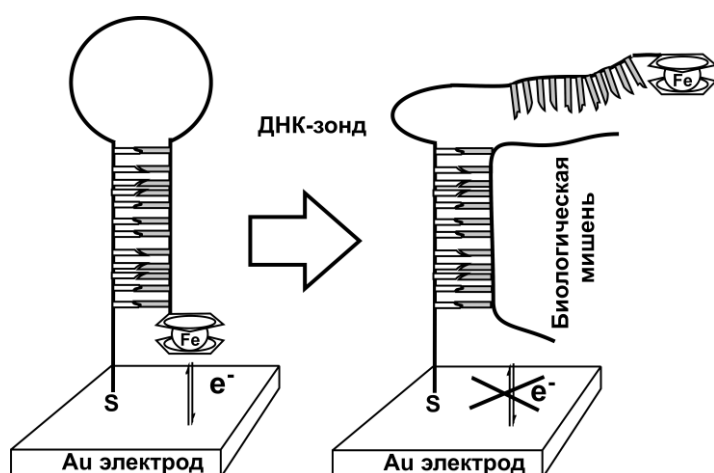


Рис. 13. ДНК-сенсор на основе «шпильки» ДНК, меченной ферроценом

Аналогичные конформационные изменения используются в вариантах ДНК-анализа с флуориметрической регистрацией сигнала. Например, к противоположным концам «шпильки» могут быть присоединены флуорофор и супрессор флуоресценции. Их пространственное разделение приводит к восстановлению уровня флуоресценции, характерного для свободного флуорофора. Более сложный вариант – согласованное взаимодействие двух флуорофоров, один из которых выступает в качестве акцептора энергии излучения, а второй – донора избыточной энергии. Такой механизм

вынужденного излучения, называемый FRET, реализуется также только при близком контакте компонентов реакции.

Высокая специфичность и чувствительность определения комплементарных олигонуклеотидов реализована в биочипах – высокоинтегрированных ДНК-сенсорах, первоначально разработанных для расшифровки генома человека. В биочипах реализована сэндвичевая схема измерения сигнала с использованием вторичных ДНК-зондов, содержащих флуоресцентные метки. Использование технологий фотолитографии позволяет достичь очень высокой плотности расположения отдельных элементов биочипа. Например, ДНК-чип формы Affimetrix размером 1.28×1.28 см содержит 500 тысяч таких центров связывания, каждый из которых может реагировать со своим ДНК-зондом. Выпускаются варианты и с 50 000 элементами распознавания. Для обнаружения меток чип облучают с помощью лазера, перемещающего луч по всем центрам связывания по специальной программе. Флуоресценцию регистрируют с помощью фотоумножителей, позволяющих зафиксировать присутствие до 50 000 молекул флуорофоров. В результате получается картина с двумерным распределением светящихся точек, каждая из которых соответствует определенной олигонуклеотидной последовательности биологической мишени (рис. 14).

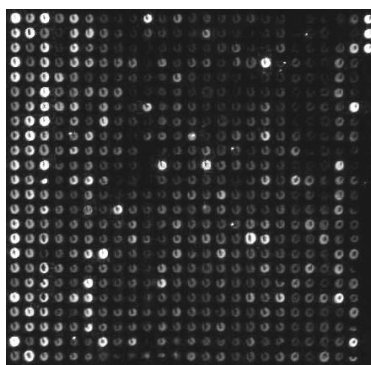


Рис. 14. ДНК-чип после регистрации флуоресценции меток

В первых ДНК-чипах вместо присоединения готовых зондов использовали химический синтез требуемой последовательности нуклеотидов, многократно повторяя процедуру добавления соответствующего мономера (производного тимина, гуанина, цитозина и аденина) и фотохимической активации реакции их присоединения к "затравке", связанной с поверхностью. Сегодня применяют уже готовые короткие последовательности из 25-90 нуклеиновых оснований, ковалентно пришиваемые к поверхности центра связывания.

Для решения задач генетики и молекулярной биологии структуру ДНК-зондов обычно закономерно изменяют в рядах и строках таким образом, чтобы

иметь возможность определять степень сходства или различия анализируемого участка генома. Таким образом, например, определяют, есть ли мутации гена и насколько серьезно мутация повредила исходную ДНК. Для задач медицинской диагностики, когда число различаемых участков ДНК невелико, достаточно иметь несколько десятков светящихся точек, чтобы идентифицировать вирус или диагностировать раннюю стадию онкологического заболевания. ДНК-чипы позволяют также решать задачи выявления белков, специфически связывающихся с ДНК, и количественной характеристики такого связывания в зависимости от строения ДНК-зонда. Они позволяют устанавливать влияние загрязнения окружающей среды на генетическое здоровье человека, позволяют выявлять предрасположенность к онкологическим заболеваниям и аллергиям, идентифицировать мясо различных животных в консервах и на обеденном столе, определять источники микробиологического загрязнения природных вод.

ИММУНОХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В иммунохимическом анализе (ИХА) используется высокочувствительная реакция взаимодействия специфических белков, называемых иммуноглобулинами, или **антителами** (Ат), с чужеродными организму биологическими или химическими факторами. Выработка антител является частью иммунного ответа организма на поступление чужеродных соединений, генетического материала, патогенных микроорганизмов. Такие соединения, инициирующие синтез антител, называют **антигенами** (Аг). Взаимодействие антигенов и антител является формально обратимой реакцией (1), равновесие которой смещено в сторону соответствующего продукта – иммунного комплекса Ат-Аг.



Вводя в кровь лабораторного животного антиген или его производное с высокомолекулярным носителем, можно получить специфические антитела, в дальнейшем используемые для высокочувствительного определения антигенов. На самом деле в такой процедуре иммунизации получается семейство антител близкого строения (поликлональные антитела), реагирующие с одним и тем же антигеном. Использование носителя для выработки антител связано с тем, что низкомолекулярные вещества не обладают антигенными свойствами, но при связывании с белками или липидами способны инициировать иммунную реакцию. Для получения антител в лабораторных условиях используют производные низкомолекулярных соединений, называемых также гаптенами. В качестве носителей гаптенных чаще всего используют белки – овальбумин, желатин или соевый ингибитор трипсина. К числу гаптенных, имеющих

аналитическое значение, относятся гормоны, лекарственные препараты, пестициды, промышленные и бытовые аллергены и пр.

Возможность определения следовых количеств гаптенов определяется чувствительностью стадии регистрации иммунной реакции (1). Для этого используют несколько подходов:

1. *Прямое определение* продукта – комплекса антиген-антитело. Первоначально такое определение достигалось путем контроля скорости осаждения комплекса, растворимость которого, как правило, ниже растворимости исходных соединений. Однако чувствительность такого определения оказалась невысока. Ее повышение достигается путем введения в состав одного из компонентов (обычно антитела) метки, которая легко детектируется каким-либо методом. Например, в качестве такой метки может выступать радиоактивный изотоп какого-либо элемента. Соответствующий вариант называется радиоиммунноанализом. Он позволяет проводить определение до $n \times 10^{-18}$ М гаптена.



В порядке уменьшения чувствительности определения другие метки, применяемые в ИХА, располагаются в ряд:

радионуклиды < флуорогены < хемилюминесцентные метки < ферменты < наночастицы металлов и пигментов.

2. *Косвенное определение*. В нем производится измерение относительного изменения сигнала метки в результате иммунной реакции. Главным достоинством косвенных методов перед прямыми является отсутствие необходимости в отделении комплекса антиген-антитело от исходных реагентов, сокращение числа стадий добавления реагентов и отмывки. Основным недостатком является повышение (на порядок и более) предела обнаружения определяемого компонента. К основным вариантам косвенного ИХА относят конкурентные и заместительные варианты, которые будут рассмотрены ниже.

Главной характеристикой ИХА является специфичность антител. Все антитела представляют собой белковый комплекс симметричного строения, включающий четыре полипептидные цепи (рис.15).

Выделяют пять классов антител, отличающиеся особенностями третичной (пространственной) структуры олигопептидов, так называемой доменной структуры. Они обозначаются IgG, IgM, IgA, IgD и IgE. Аминокислотный состав концевых фрагментов длинных олигопептидов варьирует в зависимости от источника антител и способа проведения иммунизации. Этот участок называют переменной частью антител, и именно он ответственен за специфичность связывания антигена. Аминокислотные остатки переменной части, непосредственно участвующие в связывании антигена, называют антигенными

детерминантами. Обычно в молекуле антител две детерминанты, располагающиеся симметрично по концам длинных цепей.

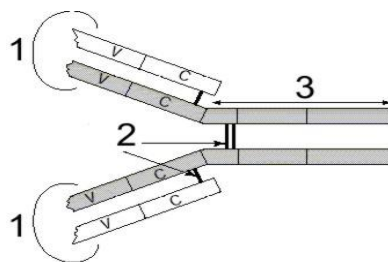


Рис. 15. Схематическое изображение антитела. 1 – область связывания антигена, 2 – дисульфидные мостики, связывающие пептидные цепи, 3 – общая часть олигопептидов, не участвующая в иммунной реакции, v – переменная и c – постоянная часть олигопептидов

Количественно прочность связывания в комплексе Аг-Ат характеризуется константой равновесия образования иммунокомплекса (K_a), называемой иногда константой аффинности.

$$K_a = \frac{[Аг-Ат]}{[Аг] \times [Ат]}$$

Обычно значения K_a составляют $10^6 - 10^{11} \text{ M}^{-1}$, если константа равновесия больше, чем 10^8 , такие антитела считаются высокоаффинными. Значения константы аффинности также используют для сравнения различных антител на один и тот же антиген.

Многие антитела обладают способностью избирательно связывать только определенный антиген (авидность), что определяет их применение как аналитических реагентов.

Поскольку выделение белков повышает стоимость определения, вместо антител можно использовать сыворотку крови иммунизированного животного (антисыворотку), содержащую антитела. Количество антител в сыворотке определяют ее титром – величиной разведения, необходимого для достижения заданной степени связывания антигена (обычно 50%). Титр может составлять 1/10000-1/100000. Чем больше титр, тем меньше антисыворотки необходимо для анализа.

Рассмотрим некоторые варианты осуществления ИХА, отличающиеся порядком и природой добавляемых иммунореагентов, а также способом осуществления реакции.

Прежде всего, следует сказать, что в большинстве современных вариантов ИХА иммунная реакция протекает на подложке – носителе одного из реагентов. Такой вариант называется гетерогенным ИХА, самым известным его вариантом является ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, иммуносорбентный

анализ с ферментом в качестве метки). Иммунные реакции в растворе находят ограниченное применение в проточных вариантах ИХА.

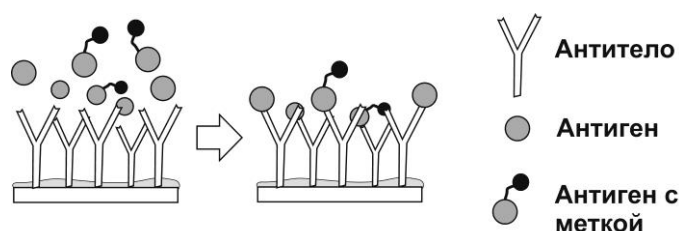


Рис. 16. Схема проведения конкурентного ИХА. Изображения иммунореагентов даны не в одинаковом масштабе

Конкурентный ИХА использует смесь двух иммунореагентов, один из которых несет метку — функциональную группу, фермент, радиоактивный изотоп, флуорофор, окрашенную частицу полимера, присутствие которых легко установить визуально или физико-химическим методом анализа. На рисунке 16 представлен вариант, в котором метку включили в состав антигена. Антитела находятся на твердом носителе, в анализируемый раствор добавляют известное количество меченого антигена. В результате конкурентного связывания с антителом соотношение связанного с меткой и свободного антигена на поверхности носителя будет отвечать соотношению их объемных концентраций в растворе. Зная, сколько добавлено меченого антигена, можно рассчитать концентрацию свободного (не связанного с меткой) антигена в анализируемой пробе.

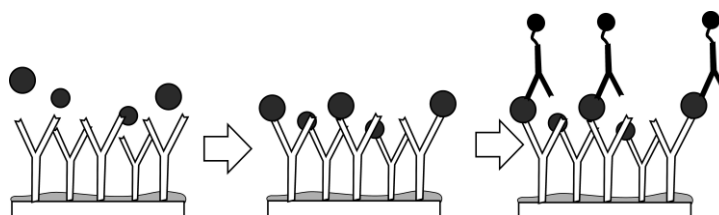


Рис. 17. Схема проведения сэндвичевого ИХА (обозначения иммунореагентов те же, что и на рис. 16)

Сэндвичевый ИХА (рис.17). В данном варианте используется способность некоторых иммунореагентов связывать несколько антител. В анализе сначала производится концентрирование определяемых молекул антигена на носителе, содержащем антитела, специфичные к данному антигену. После этого несвязавшиеся реагенты отмывают, к комплексу Аг-Ат добавляют вторые, малоспецифичные антитела, которые связываются с антигеном, но не способны к взаимодействию с первичными антителами на поверхности носителя. Такие вторичные антитела несут метку, концентрация которой на поверхности будет

определяться концентрацией определяемых молекул антигена. Сэндвичевый ИХА относится к числу наиболее чувствительных и трудоемких. Каждая стадия добавления реагентов и промежуточной отмывки проводится в строго контролируемых условиях (постоянство температуры, определенный состав растворов), а общая продолжительность измерения достигает 6-8 часов.

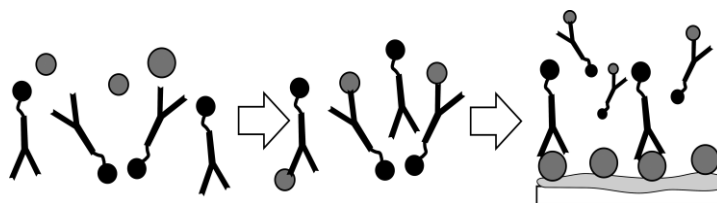


Рис. 18. Схема проведения непрямого конкурентного ИХА

Непрямой конкурентный ИХА (рис.18) используется для определения гаптенов. В этом случае часть реакций проводится в растворе и часть – на поверхности носителя. Сначала к анализируемой пробе добавляют избыток меченых антител. В результате реакции в растворе остается избыток свободных антител, не связанных в иммунокомплекс. После этого смесь добавляют к носителю, на поверхности которого закреплены производные (конъюгаты) гаптена. Они реагируют со свободными антителами, но не с комплексами Ат-Аг, присутствующими в растворе. В результате концентрация метки на поверхности носителя оказывается тем больше, чем меньше была концентрация гаптена в анализируемой пробе.

Чувствительность ИХА определяется не только специфичностью антител, но и методом регистрации концентрации метки.

В радиоиммуноанализе с использованием изотопов ^{125}I , ^{131}I , ^{57}Co и ^{111}In она составляет несколько пикограмм на миллилитр. При этом следует учитывать сложности работы с радиоизотопами и нестабильность меченных ими антител. Среди других способов регистрации наибольшей чувствительностью обладают методы флуоресцентной спектроскопии с использованием в качестве меток ионов тербия европия и самария, дающих наиболее узкие эмиссионные пики флуоресценции. Чувствительность определения флуоресцентных меток составляет до 10^{-15} М. Электрохимические способы регистрации сигнала метки показывают наибольшую чувствительность в различных вариантах иммуноферментного анализа. Так, при использовании в качестве метки щелочной фосфатазы чувствительность определения ее активности по продукту ферментативного гидролиза нафтилфосфата составляет до 10^{-18} М, холинэстераза позволяет регистрировать концентрацию до 10^{-12} М, пероксидаза – до 10^{-8} М.

Методы оптического детектирования сигнала в ИХА также в основном связаны с использованием ферментов в качестве меток. Так, при использовании пероксидаз можно определять окрашенные продукты окисления 4-аминоантипирина или замещенных бензидинов, а также регистрировать люминесценцию в реакции пероксидазного окисления люминола. Чувствительность определения при этом несколько уступает флуоресцентным методам и обычно составляет до 10^{-7} – 10^{-9} М. Использование визуальной детекции изменения окраски достигается при включении в состав иммунореагентов наночастиц золота или окрашенных латексов. Чувствительность определения гаптенных визуальными методами значительно уступает аппаратным вариантам иммуноанализа, но зато такие способы незаменимы при создании тестовых методов анализа - таких как тест-стрипы (индикаторные полоски с заранее нанесенными реагентами).

Современные варианты ИХА позволяют проводить определение в ряде случаев до 10^{-18} М иммунореагентов, хотя более распространены пределы обнаружения на уровне 10^{-11} – 10^{-12} М. Интервалы определяемых концентраций обычно составляют до 4-6 порядков величины. При этом следует помнить, что в целом калибровочная зависимость определения в ИХА имеет сигмоидный вид с достаточно узкой центральной линейной частью графика. Поэтому ИХА в большинстве случаев дает полуколичественную оценку содержания определяемых веществ в области их сверхмалых и малых концентраций.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вопросы анализа следовых количеств веществ и элементов приобретают в настоящее время все возрастающее значение в силу развития новых методов и технологий, оперирующих в названии приставкой "нано": наномедицины, нанотехнологий, нанохимии. Потребности в измерениях такого рода очевидны и связаны с осознанием того факта, что многие биологические свойства наноразмерных объектов не сопоставимы с их номинальной концентрацией и способны оказывать определяющее влияние на характеристики макрообъектов. Если раньше анализ следовых количеств элементов развивался в связи с проблемами получения сверхчистых материалов, а также определения суперэкоотоксикантов в объектах окружающей среды, настоящий период развития аналитической химии характеризуется развитием методов определения биомакромолекул и их агрегатов. Следует признать, что такой анализ достаточно необычен для традиционной аналитической химии, поскольку оперирует не концентрациями, а буквально числом отдельных молекул или

наноразмерных частиц. На первый план выходят средства визуализации нанообъектов, исследование единичных актов взаимодействия и внутримолекулярных изменений (реакций, конформационных переходов), не испытывающих влияния усреднения подобно "макрохимии".

Настоящее учебное пособие построено таким образом, чтобы учесть современные тенденции развития анализа следовых количеств веществ и дать общее представление о планировании и осуществлении традиционного эксперимента при классическом определении малых и сверхмалых количеств веществ и элементов. В нем нашли отражение вопросы пробоподготовки, выбора наиболее подходящего метода анализа, а также рассмотрены потенциальные источники загрязнения проб и другие факторы, влияющие на достоверность и точность результата измерения. Предполагается, что при изучении данного курса студенты опираются на базовые знания в области аналитической химии, полученные на 2 курсе, а также на некоторые спецкурсы специализации "Аналитическая химия", рассматривающие особенности использования органических аналитических реагентов, вопросы метрологии и пробоподготовки.

Учитывая особое внимание, уделяемое биологическим объектам, в пособие вошли главы, посвященные отдельным биохимическим методам анализа, отличающимся наиболее высокой чувствительностью определения биологически активных соединений. По-видимому, в перспективе роль данных методов в аналитической химии биологических объектов будет только возрастать, учитывая их потенциал не только в исследовании элементного состава живых организмов, но и в изучении механизмов биохимических процессов, в том числе, имеющих фундаментальное значение для жизнеобеспечения.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Физические методы анализа следов элементов / Под ред. И.П. Алимарина. М.: Мир, 1967. 355 с.
2. Золотов Ю.А. Основы аналитической химии (в двух томах). М.: Высш. шк., 2000.
3. Золотов Ю.А. Аналитическая химия: Проблемы и достижения. М.: Наука, 1992. 285 с.
4. Байерман К. Определение следовых количеств органических веществ. М.: Мир, 1987. 462 с.
5. Майстренко В.Н., Хамитов Р.З., Будников Г.К. Эколого-аналитический мониторинг суперэкоотоксикантов. М.: Химия, 1986. 319 с.
6. Отто М. Современные методы аналитической химии (в двух томах). М.: Техносфера, 2003.
7. Кельнер Р. Аналитическая химия. Проблемы и подходы (в двух томах). М.: Мир, 2004.
8. Aras N.K., Ataman O.Y. Trace Element Analysis of Food and Diet. The Royal Society of Chemistry, 2006. - 362 p.
9. Nanotechnology in biology and medicine / Edited by Tuan Vo-Dinh. Methods, Devices, and Applications, 2006. - 770 p.
10. Herber R.F.M., Stoeppler M. Trace element analysis in biological specimens. CRC Press, 1994. – 591 p.
11. Степин Б.Д. и др. Методы получения особо чистых неорганических веществ. Л.: Химия, 1969. – 480 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ВОПРОСЫ ДЛЯ ПОДГОТОВКИ К ЗАЧЕТУ

1. Общие аспекты определения следов элементов. Понятия «следы» и «ультраследы».
2. Шкала малых концентраций и аналитические характеристики методов. Основные термины и понятия.
3. Выбор методов определения следов элементов. Чувствительность и селективность.
4. Выбор методов определения следов элементов. Предел обнаружения.
5. Выбор методов определения следов элементов. Правильность, точность и прецизионность анализа.
6. Аналитическая химия малых концентраций и объекты анализа: эколого-аналитический контроль, фармакология, биохимия и медицина.
7. Роль физических методов анализа в определении низких концентраций биологически активных веществ.
8. Основные физико-химические методы определения малых концентраций, их характеристики.
9. Роль следовых количеств элементов в физических исследованиях.
10. Роль следовых количеств элементов в химических исследованиях.
11. Роль микроэлементов в биологических системах.
12. Проблемы, возникающие при определении микроэлементов в биологических системах в зависимости от объекта анализа.
13. Потери и загрязнения при определении низких концентраций веществ. Загрязнения от реактивов. Очистка реактивов.
14. Потери и загрязнения при определении низких концентраций веществ. Загрязнения от посуды и приборов. Очистка посуды.
15. Потери и загрязнения при определении низких концентраций веществ. Загрязнения из атмосферы лаборатории.
16. Влияние основы («матричные эффекты») при определении малых концентраций.
17. Факторы, характеризующие эффективность разделения при определении следовых концентраций. Выход и фактор разделения.
18. Критерии выбора методов разделения.
19. Основные способы концентрирования при анализе малых концентраций. Дистилляция и возгонка.
20. Основные способы концентрирования при анализе малых концентраций. Ионный обмен.

21. Основные способы концентрирования при анализе малых концентраций. Экстракция.
22. Основные способы концентрирования при анализе малых концентраций. Осаждение.
23. Основные способы концентрирования при анализе малых концентраций. Избирательное растворение.
24. Основные способы концентрирования при анализе малых концентраций. Зонная плавка.
25. Основные способы концентрирования при анализе малых концентраций. Перекристаллизация.
26. Основные способы концентрирования при анализе малых концентраций. Электроосаждение.
27. Общая характеристика физических методов определения единичных молекул, их основные задачи.
28. Способы достижения оптимального соотношения сигнал/шум и сигнал/фон в физических методах определения единичных молекул.
29. Пути достижения максимального уровня сигнала в физических методах определения единичных молекул.
30. Особенности методов определения единичных молекул по сравнению с классическими методами.
31. Оптические методы определения единичных молекул. Люминесценция с лазерным возбуждением.
32. Оптические методы определения единичных молекул. Флуоресцентная корреляционная микроскопия.
33. Оптические методы определения единичных молекул. Флуоресцентный резонансный перенос энергии.
34. Оптические методы определения единичных молекул. Флуоресцентная микроскопия полного внутреннего отражения.
35. Оптические методы определения единичных молекул. Близкопольная сканирующая оптическая микроскопия.
36. Оптические методы определения единичных молекул. SERS - поверхностно усиленная рамановская спектроскопия.
37. Оптические методы определения единичных молекул. «Оптический пинцет» (оптическая ловушка).
38. Применение методов определения единичных молекул в изучении биологических и супрамолекулярных процессов. «Молекулярные двигатели».
39. Применение методов определения единичных молекул в изучении биологических и супрамолекулярных процессов. Сигнальные системы клетки.

40. Применение методов определения единичных молекул в изучении биологических и супрамолекулярных процессов. Конформационная динамика белков.
41. Применение методов определения единичных молекул в изучении биологических и супрамолекулярных процессов. Ионные каналы.
42. Применение методов определения единичных молекул в изучении биологических и супрамолекулярных процессов. Мониторинг химических реакций в клетках.
43. ДНК-сенсоры в определении следовых количеств биологически важных веществ.
44. ДНК-сенсоры. Способы иммобилизации ДНК.
45. ДНК-сенсоры. Способы регистрации сигнала.
46. ДНК-сенсоры. Способы регистрации гибридизационных взаимодействий.
47. ДНК-сенсоры. Биочипы.
48. Иммунохимические методы определения низких концентраций веществ.
49. ИХА. Подходы к определению следовых количеств гаптенов Прямое и косвенное определение.
50. Основные характеристики ИХА.
51. ИХА. Классы антител.
52. Варианты осуществления ИХА: конкурентный, сэндвичевый, непрямой конкурентный ИХА.
53. Методы регистрации концентрации метки в ИХА.