

УДК 519.9

Коротков П.А., д. ф.-м. н, проф, Кириленко Є.К.,
к. ф.-м. н, Гальченко* С.М., аспірант.

Методика підвищення чутливості кількісного рентгенофлуоресцентного аналізу біологічних проб, що базується на методі максимальної правдоподібності

Представлено результати практичного використання методики підвищення чутливості у кількісному рентгенофлуоресцентному аналізі. Методика базується на методі максимальної правдоподібності і може використовуватись у випадках сильного перекриття характеристичних ліній та слабких спектральних ліній у шумовому фоні. Спектри з'єднання ртуті та цинку було проаналізовано спочатку на тестових зразках фільтрувального паперу, а потім на тестових біопробах сухого залишку плазми крові. Абсолютну похибку визначення вмісту ртуті у біопробах зменшено у 2,4 рази, а поріг знаходження досягає 13 ppb, що суттєво нижче ніж отримані дані для стандартних методів обробки спектрів.

Ключові слова: слідова концентрація, метод максимальної правдоподібності, поріг знаходження, біопроба.

*E-mail: Svetadingo@gmail.com, viria@ips.com.ua

Статтю представив д. ф.- м. н. Скришевський В. А.

Вступ

Визначення вмісту мікроелементів у різних тканинах живого організму представляє великий науковий інтерес. Виявлення закономірностей та характеру змін їх хімічного складу під дією зовнішнього середовища та при різноманітних патологічних станах, встановлення їх ролі в етіології, патогенезі, при діагностиці, лікуванні та профілактиці захворювань вимагають вдосконалення старих та застосування нових методів аналізу з високими аналітичними характеристиками [7,8,9]. Одним із перспективних аналітичних методів є рентгенофлуоресцентний аналіз.

Добре відомі переваги рентгенофлуоресцентного аналізу, такі як висока експресність визначення (декілька хвилин), широкі діапазони елементів, що визначаються (від бору до урану) та їх кількості (від 100 до 10^{-4}

P. A. Korotkov, D. Sc., prof., E. K. Kirilenko, Ph.D,
S. N. Galchenko*, postgraduate student.

Sensitivity increase technique of quantitative X-ray fluorescence analysis of bioassays based on the maximum likelihood method

The practical use results of sensitivity increase technique in quantitative X-ray fluorescence analysis are presented. The technique is based on the method of maximum likelihood and can be used in the cases of the characteristic lines strong overlap and weak spectral lines in noise background. The spectra of mercury and zinc amalgam were analyzed, at first on the test samples of filter paper and than on the test bioassays of blood plasma solid. Absolute error of mercury content detection in bioassays was 2.4 times decreased. Detection limit achieved by the method is 13 ppb, significantly lower than obtained by standard spectral processing procedures.

Key Words: trace concentration, maximum likelihood method, detection limit, bioassay.

мас.%), а у окремих випадках і нижче), можливість одночасного визначення елементів у зразку та деякі інші, роблять цей метод дуже перспективним при аналізі біологічних та медичних об'єктів [5]. Проте, маючи справу з біопробами, де мікроелементи представлені у слідових концентраціях, а також приймаючи до уваги той факт, що існує сильне перекриття характеристичних K та L ліній окремих елементів, визначення сліду мікроелементу досить складна задача. Все це призводить до пошуку різних методів підвищення чутливості аналізу.

Сьогодні існує велика кількість стандартних методів обробки спектрів. Наприклад, одним із найбільш використовуваних на практиці є метод фундаментальних параметрів [3]. При використанні цього методу, кожна аналітична

лінія рентгенівської флуоресценції апроксимується за допомогою функції Гауса з урахуванням енергетичної роздільної здатності приладу та відносної інтенсивності лінії в своїй серії. Такий підхід виправданий при високих інтенсивностях аналітичних ліній. Для низьких концентрацій, коли інтенсивність аналітичних ліній наближається до фонового рівня, цей метод дає велику похибку. У даній роботі представлено методику підвищення чутливості кількісного рентгенофлуоресцентного аналізу біопроб, що базується на методі максимальної правдоподібності [4]. Методику застосовано для визначення ртуті при наявності цинку. Такий вибір зумовлений тим, що концентрації ртуті у біопробах зазвичай мають слідовий характер, крім того, K_{β} -лінія цинку та L_{α} -лінія ртуті взаємно перекриваються, оскільки мають близькі енергії (9,570081 та 9,987144 KeV відповідно).

Базові поняття рентгенофлуоресцентної спектрометрії

Дуже важливо звернути увагу на те, що зростання будь-якого рентгенофлуоресцентного спектру є прямо пропорційним до часу збору даних, відповідно інтенсивність аналітичних ліній залежить лише від співвідношення елементів у зразку та від ефективності реєстрації рентгенівських квантів [1,2].

Базове рівняння для рентгенофлуоресцентної спектрометрії має наступний вигляд:

$$I_i = K_i I_o N_o \sigma_i \omega_i m_i / A_i \quad (1),$$

де I_i -інтенсивність сигналу від елемента i .

Воно описується в умовах наступних параметрів:

K_i – константа, що залежить від геометричних факторів та ефективності знаходження енергії лінії, яка розглядається;

I_o – інтенсивність джерела збудження;

N_o – число Авогадро;

M_i – поверхнева густина елемента i з атомним числом Z_i та атомною масою A_i ;

σ_i – переріз збудження;

ω_i – флуоресцентний вихід.

У випадку, коли характеристики сигналів, що відповідають кожному елементу відомі, спектр S може бути виражений, використовуючи рівняння (1), як добуток двох векторів:

$$S = I_o N_o \left(F_{z=1}, F_{z=2}, \dots, F_{z=n} \right) \begin{pmatrix} (Km\sigma\omega/A)_{z=1} \\ (Km\sigma\omega/A)_{z=2} \\ \vdots \\ (Km\sigma\omega/A)_{z=n} \end{pmatrix} \quad (2),$$

де ми нехтуємо впливом шумового фону та статистичними флуктуаціями.

Перший вектор містить інформацію про функцію кожного елемента. Характеристичні сигнали кожного елемента i є функцією F_i .

У нашому випадку функції отримані емпіричним способом за допомогою спектрометра і використання чистих зразків елементів. Вони визначені фіксованими енергетичними положеннями в спектрі і нам необхідно нормувати їх так, щоб інтеграл від функції в ділянці спектра, де вона визначається, дорівнював одиниці.

Ця функція незмінна, якщо ніякі експериментальні параметри спектрометра не змінюються, тобто ідентична геометрія збудження, ідентичний детектор для всіх зразків, однаковий коефіцієнт підсилення для підсилювача та електроніки збирання даних, тощо.

Другий вектор несе інформацію про склад зразка, фізичні властивості кожного елемента, ефективність знаходження для даної енергії та геометрію установки.

Параметри I_o , N_o , K , m , σ , ω та A кожного елемента i попередньо були визначені у рівнянні (1).

Відповідно до рівняння (2), у специфічному випадку для вивчення системи з'єднання (спектр з'єднання ртуті (Hg) та цинку (Zn)), будь-який отриманий спектр, A_m , може бути виражений як:

$$A_m = \left[Hg_N (K\sigma\omega m/A)_{Hg} + Zn_N (K\sigma\omega m/A)_{Zn} \right] I_o N_o \quad (3).$$

Результуюча інтенсивність двох ліній в спектрі об'єднання A_m , отримана як лінійна комбінація функцій $F_{Hg} = Hg_N$ та $F_{Zn} = Zn_N$, які є характеристичними функціями для цинку та ртуті, індекси N вказують на їх нормованість.

В рівнянні (3) ми зробили спрощення, припускаючи, що параметри K , ω , σ тотожні двом елементам, тому ми можемо його переписати як:

$$A_m = \left(Hg_N \frac{m_{Hg}}{m_{Hg} + m_{Zn}} + Zn_N \frac{m_{Zn}}{m_{Hg} + m_{Zn}} \right) \quad (4),$$

де A_m – спектр з'єднання, а індекс N вказує, що він також нормований.

Якщо ми визначимо α як відношення мас цинку та ртуті у з'єднанні:

$$\alpha = \frac{m_{\text{Hg}}}{m_{\text{Zn}}} \quad (5),$$

то рівняння (4) може бути записане як:

$$(1 + \alpha)Am_N - Zn_N = \alpha Hg_N \quad (6).$$

Ми повинні звернути увагу на те, що параметр α дає інформацію лише про відносний надлишок ртуті у кожному зразку з'єднання [6].

Визначення інтенсивності сигналу та порогу знаходження

В області спектру, де присутній сигнал, шумовий рівень встановлюється з обох боків від піку. Потім обраховується інтеграл ділянки i з цього значення вираховується площа, що відповідає шумовому фону.

В стандартних методах лінійна інтерполяція між двома сторонами піку подається як шумовий рівень. Також дуже часто використовують більш складні методи, які базуються на лінійній підгінній операції: сигнал та шум моделюються відповідними аналітичними кривими і піддаються операції підгонки, що базується на методі найменших квадратів. Використовуючи методику представлену у даній роботі, можна отримати більш точні оцінки інтенсивності сигналу, оскільки для апроксимації використовуються емпіричні характеристичні функції.

Поріг знаходження визначається як мінімальне значення, яке повинен мати зареєстрований сигнал, щоб бути виділеним з шумового фону [1,2].

Щоб розрахувати значення порогу знаходження визначається рівень фону та обраховується дисперсія шуму (σ_b).

Потім визначається критичний рівень сигналу, таким чином є небажаним його помилкове змішування із статистичними флуктуаціями шуму. Загально прийнятим критерієм порогу чутливості для спектрів з Гаусівським розподіленням шуму є величина інтенсивності, що дорівнює або більша ніж потрібна стандартна девіація (σ_b) рівня шуму.

В цьому випадку ймовірність того, що інтенсивність лінії, яку виміряно, є шумовою флуктуацією, є меншою ніж 1%. Цей критерій є простим у застосуванні та впливає в наступну умову для величини інтенсивності лінії N в області спектра, яка нас цікавить:

$$1 \geq \frac{3\sigma_b}{N} \quad (7).$$

Якщо значення інтенсивності лінії N є пропорційним концентрації C_i елементу i , то поріг знаходження може бути виражений не як функція кількості, а швидше як функція концентрації:

$$\text{LOD} \geq \frac{C_i}{N_i} 3\sigma_b \quad (8).$$

В особливому випадку рентгенофлуоресцентної спектроскопії та інших спектроскопічних технік для визначення порогу знаходження використовують:

$$\text{LOD} \geq \frac{C_i}{N_i} 3\sqrt{Bkgd} \quad (9),$$

де $Bkgd$ - це інтеграл від ділянки нижче сигналу, квадратний корінь береться тому, що шум підкоряється статистиці Пуассона [6].

Метод максимальної правдоподібності

На сучасному етапі розвитку науки, метод максимальної правдоподібності став ключовим методом аналізу. Загальне розповсюдження цього методу викликано низкою причин. По-перше, за його допомогою можна отримувати найкращі оцінки. По-друге, ще у 1976 році було показано, що багато методів оцінювання, такі як двох - та трьохетапний метод найменших квадратів та ін., можуть бути інтерпретовані як наближення до оцінок, отриманих за методом максимальної правдоподібності. Іншими словами, цей метод дозволяє отримувати спроможні та асимптотично ефективні оцінки. По-третє, цей метод є дуже загальним, що дозволяє використовувати його для широкого класу задач. По-четверте, незважаючи на відносну складність методу та необхідність чітко знати форму функції розподілу, з розвитком комп'ютерної техніки, можна позбутися проблем з підрахунком необхідних оцінок. Таким чином, можна сказати, що метод максимальної правдоподібності є універсальним методом отримання оцінок [4].

Ми опишемо методику визначення інтенсивності відомого сигналу, на який діє Гаусівський шум. Використання методики вимагає знання нами позиції в спектрі, де пік повинен з'являтися та функцію, що визначає

його. Якщо шум присутній, то його також необхідно адекватно змоделювати.

Ми візьмемо, як приклад, вимірювання інтенсивності I_{Hg} в пробі, де є тільки чиста ртуть. Спектр має відносну інтенсивність α і вона визначається як: $I_{Hg} = \alpha Hg(E)_N = F_N$, де $Hg(E)_N = F_{Hg}$ – це відома нормована функція (як визначено вище з рівнянь (2) та (3)).

Нижче ми визначимо довірчий інтервал для відносної інтенсивності α .

Новий поріг знаходження має похибку, $\Delta\alpha$, що отримана від значення α . Ця похибка дається з розрахунку флуктуацій, що припадають на шум та дійсну форму функції $Hg(E)_N$.

Оскільки у багатоканальному аналізаторі енергія змінюється дискретно по каналам зі значеннями енергії X_j , де ($J = 1, \dots, n$) – номер каналу, то відома функція $Hg(E)_N$ буде визначена відповідно як дискретне значення $Hg(X_j)_N$.

Ми знаходимо випадкові значення M_j , з якими пов'язані функції розподілу (*pdf*)-нормовані Гаусівські функції з середньою точкою в значенні $\alpha Hg(X_j)_N$, і флуктуації яких дані як σ^2_{bj} (недостовірність чи стандартне відхилення розрахунків j -го каналу) (рис. 1).

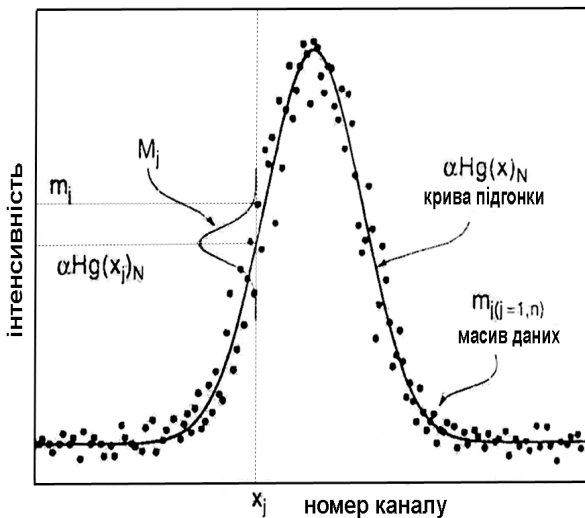


Рис. 1. Експериментальний спектр (x_j, m_j), крива підгонки ($\alpha Hg(X_j)_N$) та функція правдоподібності (M_j)

Кожна змінна M_j знаходиться з функції Гауса,

$$M(\alpha Hg(x_j)_N, \sigma^2_{bj}, m_j) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_{bj}}} * e^{-\frac{[m_j - \alpha Hg(x_j)_N]^2}{2\sigma^2_{bj}}} \quad (10).$$

Зробивши одне вимірювання, ми матимемо ансамбль точок $\{(x_j, m_j)\}$, ($j=1 \dots n$).

Виникає наступне питання: якщо ми знаємо α , то що є загальною ймовірністю отримання результату $\{m_j\}$, передбачаючи, що ми знаємо *pdf* випадкових змінних M_j ? Оскільки випадкові змінні M_j незалежні, то ця загальна ймовірність є добутком ймовірностей того, що кожна змінна M_j включає значення m_j . Ми позначимо загальну ймовірність L :

$$L(m_1, m_2, \dots, m_n, \alpha) = M[\alpha Hg(x_1)_N, \sigma^2_{b1}, m_1] * M[\alpha Hg(x_2)_N, \sigma^2_{b2}, m_2] \dots [\alpha Hg(x_n)_N, \sigma^2_{bn}, m_n] \quad (11).$$

Оскільки функція $\ln(x)$ монотонно зростає в x , максимізування L еквівалентне максимізуванню $\ln(L)$:

$$\ln L = -\sum_{j=1}^n \frac{[m_j - \alpha Hg(x_j)_N]^2}{\sigma^2_{bj}} + \sum_{j=1}^n \ln \left(\frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_{bj}}} \right) \quad (12).$$

Шукаючи похідну, що відноситься до α в цьому виразі та прирівнюючи до нуля, ми знаходимо найбільш ймовірне значення α для ансамблю $\{m_j\}$ даних:

$$\alpha^* \equiv \frac{\sum_{j=1}^n \frac{m_j Hg(x_j)_N}{\sigma^2_{bj}}}{\sum_{j=1}^n \frac{Hg^2(x_j)_N}{\sigma^2_{bj}}} \quad (13).$$

Це являється оцінкою максимальної ймовірності α , воно має важливу властивість (в наближенні нескінченної кількості вимірів) – незміщеність.

Отже, якщо ми розглядаємо розподіл для успішних подій цієї оцінки, їх очікувані значення наближаються до значень параметру α . Тобто, для великої кількості вимірювань:

$$E(\alpha^*) \approx \alpha \quad (14).$$

Pdf оцінки α^* отримано заміною, в р-ні 13, вимірюваних величин m_j на їх відповідні *Pdf*: M_j .

Після взяття варіації в обох членах рівняння, ми отримуємо:

$$V(\alpha^*) = V \left(\frac{\sum_{j=1}^n M_j Hg(x_j)_N / \sigma^2_{bj}}{\sum_{j=1}^n Hg^2(x_j)_N / \sigma^2_{bj}} \right) = \frac{1}{\sum_{j=1}^n \frac{Hg^2(x_j)_N}{\sigma^2_{bj}}} \quad (15)$$

$$\Delta\alpha^2 = V(\alpha^*) = \frac{1}{\sum_{j=1}^n \frac{Hg^2(x_j)_N}{\sigma_{bj}^2}} \quad (16).$$

В результаті ми отримали наступний довірчий інтервал для параметра α :

$$\alpha = \frac{\sum_{j=1}^n m_j Hg(x_j)_N / \sigma_{bj}^2}{\sum_{j=1}^n Hg^2(x_j)_N / \sigma_{bj}^2} \pm \frac{1}{\sqrt{\sum_{j=1}^n \frac{[Hg(x_j)_N]^2}{\sigma_{bj}^2}}} \quad (17)$$

Процедура обробки даних

Обробка спектру будь-якого з'єднання повинна проводитись шляхом повторення (ітерації). Початкове значення α_1 вибране для різниці вказаної в р-ні (6), потім враховується для кожного каналу вибраної ділянки, яка нас цікавить.

В результаті цього отримуємо ансамбль даних $\{m_j\}$ точок. Цей новий ансамбль $\{m_j\}$ може бути проаналізовано за допомогою рівняння (13), яке дає результат – нове значення α_2 . Цей результат використовується знову в рівнянні (6) і процес повторюється до отримання збіжності. Для оцінки рівнянь (13) та (16), необхідні точні знання про стандартні відхилення шумового фону σ_{bj} кожного каналу j .

Щоб обрахувати стандартне відхилення фону, два спектри чистого зразка вираховуються (тобто порівнюють спектри двох чистих зразків цинку, без ртуті).

Параметр α повинен бути нульовим.

Проте різниця в першій частині рівняння (6) не є строго нульовою, швидше, вона дає ненульове значення, як результат статистичних флуктуацій вимірювань чи флуктуацій фону. Позначимо B як функцію отриману з різниці двох функцій Zn_{N1} та Zn_{N2} :

$$B_j = Zn_{N1} - Zn_{N2} = \frac{Zn_{1j}}{\sum_{j=1}^n Zn_{1j}} - \frac{Zn_{2j}}{\sum_{j=1}^n Zn_{2j}} \quad (18).$$

Де Zn_j – це кількість підрахунків в j -му каналі та $\sum Zn_j$ є сумою Zn_j в інтервалі, який розглядається. Статистична дисперсія σ_{bj} , яка відповідає кожному каналу j функції B , може бути обрахована як:

$$\sigma_{bj} = \sqrt{\left(\frac{\partial B_j}{\partial X_k}\right)^2} \Delta X_k^2 \quad (19).$$

Де x_k це кожна з чотирьох змінних рівняння (18), які є взаємозалежними. Застосовуючи р-ня (19) до р-ня (18), ми отримуємо:

$$\sigma_{bj} = \sqrt{\frac{\left(\frac{\sqrt{Zn_{1j}}}{\sum Zn_{1j}}\right)^2 + \frac{Zn_{1j}^2 \left(\frac{\sqrt{\sum Zn_{1j}}}{\sum Zn_{1j}}\right)^2}{\left(\sum Zn_{1j}\right)^4}}{\left(\frac{\sqrt{Zn_{1j}}}{\sum Zn_{1j}}\right)^2 + \frac{Zn_{1j}^2 \left(\frac{\sqrt{\sum Zn_{1j}}}{\sum Zn_{1j}}\right)^2}{\left(\sum Zn_{1j}\right)^4}}} \quad (20),$$

або

$$\sigma_{bj} = \sqrt{\frac{\left(\frac{\sqrt{Zn_{2j}}}{\sum Zn_{2j}}\right)^2 + \frac{Zn_{2j}^2 \left(\frac{\sqrt{\sum Zn_{2j}}}{\sum Zn_{2j}}\right)^2}{\left(\sum Zn_{2j}\right)^4}}{\left(\frac{\sqrt{Zn_{2j}}}{\sum Zn_{2j}}\right)^2 + \frac{Zn_{2j}^2 \left(\frac{\sqrt{\sum Zn_{2j}}}{\sum Zn_{2j}}\right)^2}{\left(\sum Zn_{2j}\right)^4}}} \quad (21),$$

яке є кінцевим виразом для визначення стандартної девіації шуму [6].

Підготовка тестових зразків та виконання вимірювань

Для тестування запропонованої методики було виконано серію вимірювань за допомогою спектрометра енергій рентгенівського випромінювання СЕР-01 виробництва ТОВ “ЕЛВАТЕХ”.

В якості матеріалу для тестових стандартних зразків використовували папір фільтрувальний лабораторний ГОСТ 12026-76.

Процес формування зразка включає у себе наступні етапи:

1. Зважування фільтрувального паперу – 100 мг;
2. Приготування тестових розчинів солей іонів цинку та ртуті з набору ГСОПМ;
3. Закапування розчину з необхідною масою елемента у зразок;
4. Висушування зразків;
5. Пресування у таблетки.

Для зважування використовували ваги лабораторні ВЛР-20 з межею зважування 20 г та границею сумарної похибки 0.1 мг ГОСТ 24104-88.

Для процедури викапування скористались державними стандартними зразками складу розчинів солей іонів ртуті та цинку (1.0 мг/см³) ДСЗУ. Викапування проводилось піпеткою ГОСТ Р 50 444.

Висушування зразка здійснювалось за допомогою шафи сушильної з регулятором температури в діапазоні 60°-135° С.

Після цього кожену наважку пресують у таблетку діаметром 10 мм за допомогою пресу з комплексу спектрометра [10].

Для врахування фонові компоненти спочатку вимірювали спектр чистого зразка фільтрувального паперу. Для знаходження форм характеристичних функцій цинку та ртуті виміряли два спектри зразків фільтрувального паперу, що містили 100 мкг цинку та 100 мкг ртуті відповідно. А для розрахунку стандартної девіації шуму було зроблено ще два вимірювання зразка з цинком.

Наступним кроком було отримання спектрів 5 зразків з'єднання, що містили 100 мкг цинку та 28 мкг ртуті. Таке співвідношення мас використане для того, щоб досягти приблизно однакової інтенсивності піків, що перекриваються.

Для виготовлення біопроб використовували сухий залишок плазми крові (Seronorm™ Trace Elements Serum L-1 LOT JL4409). Відповідно до вищезгаданої методики формування зразків, відважували 100мг плазми, добавляли розчин ртуті з ГСОМ так щоб загальна кількість ртуті у зразках становила 0.09 мкг, висушували та пресували у таблетки (5 зразків). Також було виготовлено одну таблетку плазми без закапування ртуті.

Для тестових біопроб плазми крові з ртутью також було отримано спектри рентгенівської флуоресценції, а для розрахунку стандартної девіації шуму у даному випадку було зроблено два виміри спектрів зразка сухого залишку плазми крові без ртуті.

Розробка та тестування програми на спектрах тестових зразків

Для автоматизації обробки отриманих даних було розроблено відповідне програмне забезпечення.

Програму написано на мові програмування Pascal в середовищі Delphi7.

Першим кроком програми є зчитування текстових файлів, що містять інформацію про виміряні спектри, в масиви даних. Для зручності програма дозволяє відкривати необхідні файли зі спектрами безпосередньо перед розрахунками.

Потім для наглядності програма будує графіки реальних спектрів (рис.2.).

Після цього знаходяться форми характеристичних функцій спектрів ртуті, цинку та з'єднання шляхом нормування реальних спектрів. Нормування відбувається діленням кожного значення елемента масиву на площу під кривою відповідного спектру (енергетичний діапазон 9-10,5 KeV). Програма видає графіки характеристичних функцій (рис.3).

Далі програма виконує процедуру визначення стандартного відхилення кожного каналу σ_{bj} , для коректного обчислення рівнянь (13) та (16).

А далі шляхом ітерації рахує відносну інтенсивність ртуті у спектрі з'єднання – m_{Hg} . Потім рахує похибку Δm_{Hg} . Значення виводяться в одиницях – мкг. Для даних спектрів, в результаті обчислення, отримано середнє значення вмісту ртуті у 5-ти зразках:

$$m_{Hg} = 27,804 \text{ мкг,}$$

$$\Delta m_{Hg} = 0,007 \text{ мкг.}$$

Як бачимо, розроблена програма видає абсолютне значення ртуті у пробі, яке відповідає дійсності з похибкою менше 1% від заявленої величини (28 мкг).

Другим етапом роботи було випробовування програми на тестових зразках плазми крові – середнє значення вмісту ртуті у 5-ти зразках:

$$m_{Hg} = 0,086 \text{ мкг,}$$

$$\Delta m_{Hg} = 0,005 \text{ мкг.}$$

Для оцінки отриманих результатів вміст ртуті було визначено також за допомогою методу фундаментальних параметрів:

$$m_{Hg} = 0,057 \text{ мкг,}$$

$$\Delta m_{Hg} = 0,012 \text{ мкг,}$$

а також пороховано абсолютну та відносну похибку вимірювання та поріг знаходження для обох методів (табл. 1).

За означенням поріг знаходження (LOD) дорівнює потроєному значенню Δm_{Hg} , де Δm_{Hg} – похибка метода обробки спектра.

Для метода фундаментальних параметрів:

$$LOD = 3\Delta m_{Hg} / m_3 =$$

$$= (3*0,02100 \text{ мкг})/0,1 \text{ г} = 630 \text{ ppb,}$$

де m_3 – маса зразка.

Для метода максимальної правдоподібності:

$$\text{LOD} = 3\Delta m_{\text{Hg}}/m_3 =$$

$$= (3 \cdot 0,00043 \text{ мкг})/0,1 \text{ г} = 13 \text{ ppb.}$$

З представлених даних бачимо (табл.1), що при використанні метода максимальної правдоподібності абсолютна похибка зменшилась у 2,4 рази, а поріг знаходження становить 13 ppb, що наближається до

теоретичного порогу чутливості рентгенофлуоресцентного метода кількісного аналізу. Усе це робить його більш придатним, у порівнянні із методом фундаментальних параметрів, для визначення слідових концентрацій елементів у біопробах.

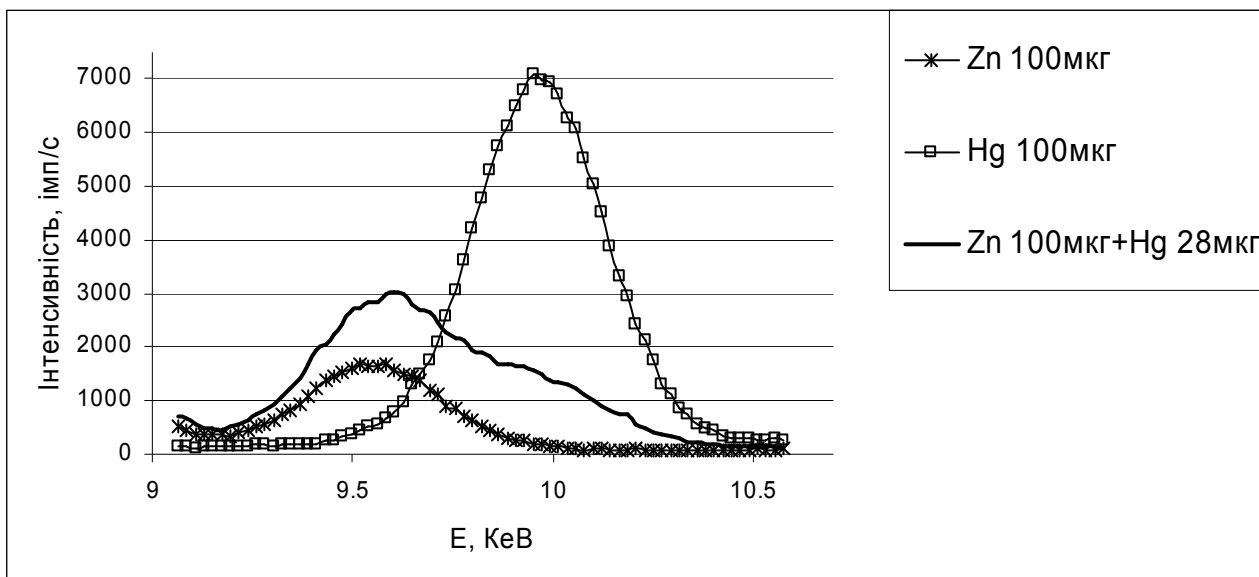


Рис. 2. Реальні спектри для цинку, ртуті та з'єднання

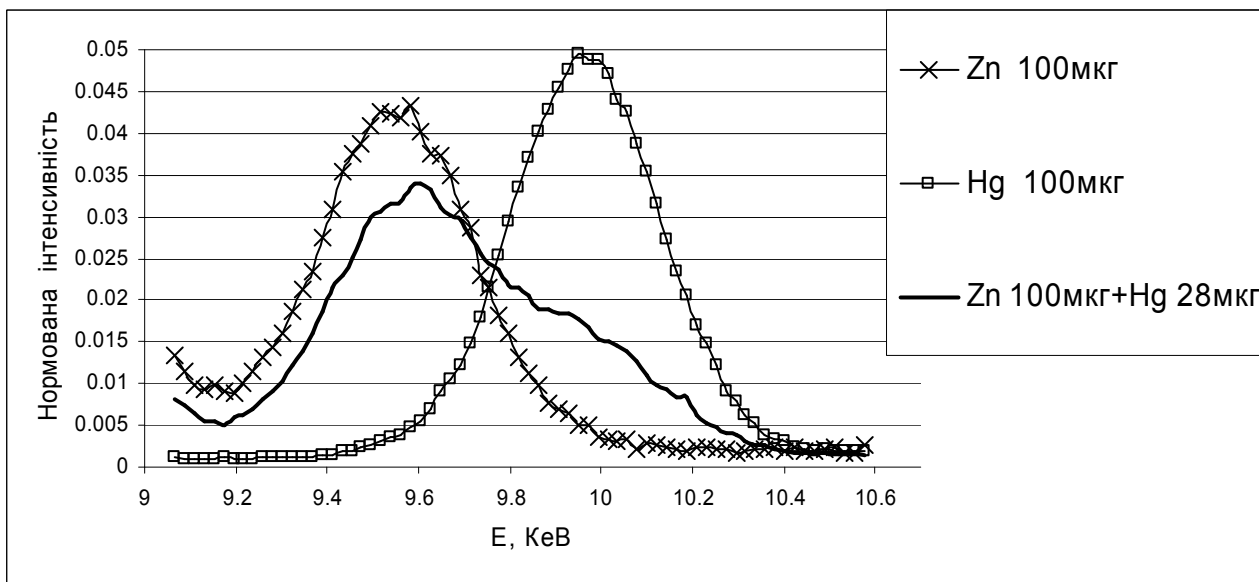


Рис. 3. Форми характеристичних функцій для спектрів цинку, ртуті та з'єднання

Таблиця 1

Значення вмісту ртуті у тестових біопробах сухого залишку плазми крові, похибки вимірювань та поріг знаходження для методів: фундаментальних параметрів та максимальної правдоподібності

№ Зразка	Метод фундаментальних параметрів		Метод максимальної правдоподібності	
	Вміст ртуті $m_{\text{Hg}}, *10^{-6}$ г	Похибка метода, $\Delta m_{\text{Hg}} *10^{-6}$ г	Вміст ртуті $m_{\text{Hg}}, *10^{-6}$ г	Похибка метода, $\Delta m_{\text{Hg}} *10^{-6}$ г
1	0,065	0,033	0,082	0,00032
2	0,043	0,015	0,085	0,00054
3	0,049	0,016	0,089	0,00054
4	0,073	0,019	0,080	0,00035
5	0,095	0,022	0,092	0,00042
Середнє значення, $*10^{-6}$ г	0,057	0,021	0,086	0,00043
Абсолютна похибка, $*10^{-6}$ г	0,012		0,005	
Відносна похибка, %	21,36		5,76	
LOD, ppb	630		13	

Висновки

- У роботі представлено результати практичного використання методики підвищення чутливості рентгенофлуоресцентного визначення мікроелементів у біологічних пробах, що базується на методі максимальної правдоподібності і може використовуватись у випадках сильного взаємного перекриття характеристичних ліній різних елементів;

- Для автоматизації обробки даних розроблено відповідне програмне забезпечення;

- Поріг знаходження ртуті у плазмі крові становить: LOD = 13 ppb (метод максимальної правдоподібності) та LOD = 630 ppb (метод фундаментальних параметрів);

- абсолютну похибку визначення вмісту ртуті зменшено у 2.4 рази:

$\Delta m_{\text{Hg}} = 0,005$ мкг (метод максимальної правдоподібності) та $\Delta m_{\text{Hg}} = 0,012$ мкг (метод фундаментальних параметрів).

Список використаних джерел

1. Лакович Дж., Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986. – 496 с.
2. Вольдсет Р., Прикладная спектрометрия рентгеновского излучения. Изд. доп. (США, 1977). Пер. с англ. М., Атомиздат, 1977. – 192 с.
3. Борходоев В. Я., Рентгенофлуоресцентный анализ горных пород способом фундаментальных параметров. Магадан: СВКНИ ДВО РАН, 1999. – 279 с.
4. Крянгов А. В. Лукин Г. В., Математические методы обработки неопределенных данных. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2003, – 216 с.
5. Куприянова Т. А. Лямина О. И., Семенов В. Ф., Методические особенности определения основных и микроэлементов в сыворотке и клетках периферической крови рентгенофлуоресцентным методом. // Клиническая лабораторная диагностика, 1999. - №8. – С. 11-15.
6. L.Bennun, E.D. Greaves and J.J. Blostein. New procedure for intensity and detection limit determination in spectral trace analysis: application for trace mercury by TXRF. // X-Ray Spectrom., 2002. – 31. – P. 289-295.
7. Magdalena Szczerbowska-Boruchowska. X-Ray fluorescence spectroscopy as analytical tool in neurochemical research. // X-Ray Spectrometry, 2008. – 37. – P. 21-31.
8. Elke E. M. Brouwers, Matthijs Tibbem, H. Rosing, Jan H. M. Schellens, and Jos H. Beijnen. The application of inductively coupled plasma mass spectrometry in clinical pharmacological oncology research. // Mass Spectrometry Reviews, 2008. – 27. – P. 67-100.
9. M. L. Carvalho, J. Brito and M. A. Barreiros. Study of trace element concentration in human tissues by EDXRF Spectrometry. // X-Ray Spectrometry, 1998. – 27. – P. 198-204.
10. Методика. Виконання вимірювань масової частки хімічних елементів у волоссі рентгенофлуоресцентним методом. МВВ 081/12-4502-00 – Київ, 2000. – 17 с.