

## Особенности РСМА отолитов рыб как перспективного метода мониторинга окружающей среды

Л. А. Павлова, С. М. Павлов

Институт геохимии им. А.П. Виноградова СО РАН, 664033, Иркутск, ул. Фаворского, 1А

*Разработана методика рентгеноспектрального электронно-зондового микроанализа (РСМА) натрия, кальция, кремния, железа, фосфора и марганца в отолитах рыб. Изучена устойчивость отолитов под действием электронного зонда. Оптимальные условия возбуждения и регистрации рентгеновского излучения в отолитах выбраны с учетом полученных закономерностей изменения интенсивности от плотности потока электронов. Установлено, что количественное определение состава отолитов методом РСМА возможно при поверхностной плотности потока электронов не превышающей 2,5–2,8 мкВт/мм<sup>2</sup>. Метрологические характеристики методики оценены на контрольных стандартных образцах состава. Результаты, получаемые по разработанной методике соответствуют II категории анализа.*

Источники и характер загрязнения озера Байкал исследуются более трех десятилетий [1]. Уникальность Байкала, с удивительно чистой, содержащей много кислорода и мало кремния водой, вызывает интерес исследователей, выдвигает глобальную задачу учета изменений, происходящих в озере в связи с жизнедеятельностью человека. Водные позвоночные наиболее подвержены воздействию загрязняющих веществ и являются индикаторами уровня загрязнения озера. Отолиты (ушные камни) позвоночных представляют собой карбонатные структуры, преимущественно в форме арагонита, с небольшим содержанием белкового матрикса [2] и являются одним из самых стабильных органов по структуре и химическому составу, а потому могут быть перспективным материалом для исследования. Отолиты содержат информацию не только о возрасте организмов, но и летопись изменений среды обитания животного. По ним можно реконструировать события окружающей среды, определяющие изменения химического состава соответствующего прироста отолита [3]. Определение элементного состава центра отолита, характеризующего раннюю стадию жизни рыбы, и его края, соответствующего поздней стадии развития, может дать доступ к хронологической информации, хранящейся в отолитах [4].

Решение перечисленных задач напрямую связано с определением химического состава отдельных частей отолита, которое может быть выполнено неразрушающим методом рентгеноспектрального электронно-зондового микроанализа (РСМА), позволяющим определять состав из 10–13 г вещества. Изучение отолитов методом РСМА осложняется неустойчивостью их под действием

электронного зонда и требует методики анализа, учитывающей это.

Цель настоящей работы – разработка методики РСМА для определения концентраций натрия, кальция, кремния, железа, фосфора и марганца в отолитах рыб.

### Материалы и методы исследования

Материалом для исследования служили отолиты рыб, выловленных в озере Байкал. Изучали отолиты большой голомянки и омуля. Изучение химического состава отолитов проводили на рентгеноспектральном микроанализаторе Superprobe-733 (JEOL Ltd, Япония) с помощью волновых спектрометров. Управление съемкой и пересчет регистрируемых относительных интенсивностей в концентрации проводили по расчетно-управляющей программе MARSHELL, описанной в работе [5] и адаптированной в математическое обеспечение прибора. В программе MARSHELL предусмотрена возможность выбора способов расчета матричных эффектов и коэффициентов поглощения рентгеновского излучения. При изучении отолитов коэффициенты поглощения рассчитывали способом Маренкова [6], а матричные эффекты учитывали PAP-методом [7], реализованном в программе MARSHELL. Фоновые интенсивности определяли расчетным методом [8] и усреднением фоновых интенсивностей, измеренных с двух сторон от аналитической линии. Измерение интенсивностей рентгеновского излучения выполняли с помощью кристаллов-анализаторов TAP для  $\text{SiK}_\alpha$ -,  $\text{NaK}_\alpha$ - линий, PET для  $\text{CaK}_\alpha$ - и  $\text{PK}_\alpha$ -линий и LiF для  $\text{FeK}_\alpha$ - и  $\text{MnK}_\alpha$ -линий. В качестве образцов сравнения и для настройки спектрометров на пик

Таблица 1. Состав используемых образцов сравнения и контрольных образцов, мас. %

Название	Источник аттестации	SiO <sub>2</sub>	TiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Cr <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	FeO	MnO	MgO	CaO	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	NiO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Cl
Стекло К-412	Национальное бюро стандартов, США [9]	45,35	-	9,27	-	8,04	2,77	-	19,33	15,25	-	-	-	-	-
Гранат IGEM		36,80	-	20,50	-	-	29,40	9,94	1,02	2,24	-	-	-	-	-
Диопсид		55,49	-	-	-	-	0,05	18,59	25,84	0,03	-	-	-	-	-
Ильменит GF-55	Институт геологии, геофизики и минералогии СО РАН, Новосибирск, Россия	0,09	50,04	0,50	0,72	-	37,98	0,26	9,86	-	-	-	-	-	-
Гранат О-145		42,30	-	23,40	0,08	-	10,10	0,17	20,00	4,03	0,02	-	-	-	-
Хромит UV-126		0,30	4,61	8,79	44,80	-	26,30	0,17	14,10	-	-	-	0,27	-	-
С-апатит		-	-	-	-	-	-	-	-	53,84	-	-	-	41,0	6,81
Альбит		68,74	-	19,44	-	-	-	-	-	11,82	-	-	-	-	-
Ортоклаз		63,60	0,05	18,20	-	-	0,20	-	-	-	0,11	16,40	-	-	-
Стекло:															
BHVO-2G	Геологическая служба Денверского федерального центра, США [10]	49,94	2,71	13,80	-	2,82	8,58	0,168	7,23	11,40	2,26	0,52	-	0,273	-
BСR-2G		54,11	2,24	13,64	-	3,59	8,88	0,18	3,48	6,95	3,27	1,69	-	0,36	-
BIR-1G		47,77	0,96	15,35	-	2,08	8,38	0,171	9,68	13,24	1,75	0,027	-	0,046	-

Примечание. ' - ' - элемент отсутствует.

аналитической линии для NaK<sub>α</sub>-излучения применяли альбит, для SiK<sub>α</sub>- и CaK<sub>α</sub>-излучений – стекло К-412, для FeK<sub>α</sub>-излучения – гранат О-145, для РК<sub>α</sub>-излучения – хлорсодержащий апатит и для MnK<sub>α</sub>-излучения – марганцевый гранат IGEM. Химический состав образцов сравнения приведен в табл. 1. Для отладки методики и определения ее метрологических характеристик применяли контрольные образцы, в качестве которых использовали стандартные образцы состава: хромит UV-126 (для SiO<sub>2</sub> и MnO), ортоклаз 359/1 (для Na<sub>2</sub>O), хромит 79/62 (для SiO<sub>2</sub> и MnO), стандартные стекла BСR-2G (для P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), BIR-1G (для Na<sub>2</sub>O), BHVO (для P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), ТВ-1G (для P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) и ильменит GF-55 (для SiO<sub>2</sub> и MnO). Составы используемых контрольных образцов также приведены в табл. 1. Стекло К-412 изготовлено Национальным бюро стандартов США, аттестованно в 1986 году комиссией IUPAC (программа CSG-7) [9]. Три базальтовых стекла BHVO-2G, BСR-2G и BIR-1G, изготовлены геологической службой США в Денверском федеральном центре [10]. Обработка результатов их аттестации показала, что все имеющиеся данные по составу этих стекол подтверждают их однородность на микро уровне и соответствие состава исходному материалу. Хромиты UV-126 и 79/62, ильменит GF-55, ортоклаз 359/1, альбит, гранат О-145, хлорсодержащий апатит и марганцевый гранат IGEM охарактеризованы как образцы сравнения в Институте геологии, геофизики и минералогии СО РАН в Новосибирске.

**Подготовка образцов к анализу** вследствие хрупкости отолитов требует особой тщательности. Образцы для анализа изготавливали в виде аншлифов двумя способами. В первом случае отолиты с помощью эпоксидной смолы просто наклеивали на стекло. Во втором выбранные для изучения отолиты распиливали и исследуемой поверхностью наклеива-

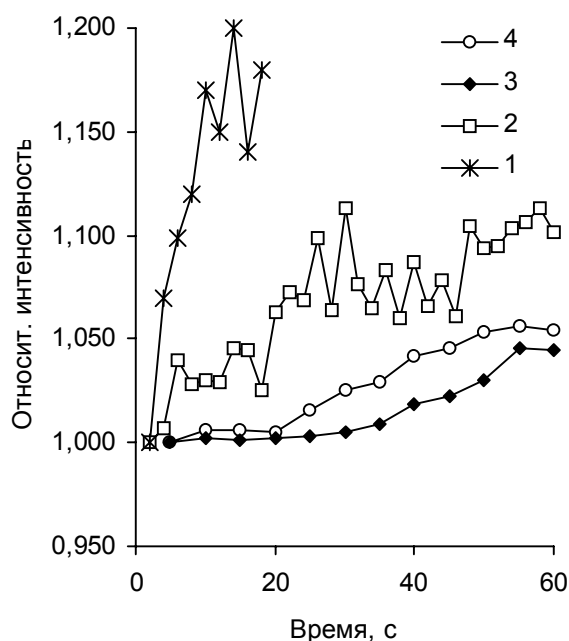


Рис. 1. Зависимость интенсивности  $K_{\alpha}$ -линии кальция от времени воздействия электронов на образец при разных значениях поверхностной плотности потока возбуждающих электронов: 1 – 191,00 мкВт/мкм<sup>2</sup>; 2 – 3,82 мкВт/мкм<sup>2</sup>; 3 – 2,54 мкВт/мкм<sup>2</sup>; 4 – 3,06 мкВт/мкм<sup>2</sup>.

ли на липкую ленту. Для закрепления в нужном положении наклеенные отолиты заливали небольшим количеством эпоксидной смолы, а после ее затвердевания добавляли смолу до придания образцу формы, удобной для полировки на алмазных пастах. В дальнейшем и наклеенные на стекло и закрепленные в эпоксидной смоле отолиты обрабатывали на алмазных пастах до получения зеркально-полированной поверхности. На полированную поверхность напыляли в вакууме пленку из углерода (для обеспечения стока электронов, падающих на образец во время измерения). Толщину пленки (20–30 мкм) определяли способом, основанным на наблюдении цветов интерференции полированной медной поверхности [11].

**Оптимальные условия возбуждения и регистрации** аналитического сигнала подбирали, изучая устойчивость отолитов к воздействию электронного пучка. Скорости счета наиболее интенсивного  $SaK_{\alpha}$ -излучения измеряли в произвольно выбранных точках отолита при разных условиях возбуждения в течение 50–60 с. При одних и тех же условиях разные точки отолита под действием пучка электронов ведут себя не одинаково. Возможно, это связано с плотностью отолита, но разрушение одних частей отолита под действием электронов происходит заметно быстрее

других. Для изучения стабильности отолита под действием пучка использовали те области, в которых изменение состояния отолита было особенно интенсивным. Время измерения менялось от 2 до 10 с и, соответственно, число измерений от 25 до 6. На рис. 1 показаны зависимости относительных интенсивностей от времени действия электронного пучка на образец, полученные при разных поверхностных плотностях потока электронов. Заложенная в рентгеноспектральном микроанализаторе Superprobe-733 конструктивная возможность перекрывания электронного пучка, использована в программе MARSHELL для отключения пучка на время, когда измерение интенсивности излучения не происходит. Таким образом, изменение положения спектрометров при переходе на линии следующих элементов, выбранных для измерения, и изменение координат при переходе в новую область исследования происходят при перекрытом пучке электронов. Это позволяет при выполнении аналитических работ ограничивать время воздействия пучка на образец непосредственно временем измерения, тем самым, сохраняя область исследования от разрушения. Комплектация прибора тремя волновыми спектрометрами с кристаллами анализаторами TAP, PET и LiF дает возможность при экспозиции 10 с проводить измерение изучаемых элементов (натрия, кальция, кремния, железа, фосфора и марганца) в течение 20 с. Поэтому условия измерения и регистрации излучения должны быть подобраны так, чтобы образец не изменял своих свойств в течение как минимум 20 с. Зависимость интенсивности излучения от времени действия пучка, показанная на рис. 1, позволяет визуально заметить что интенсивность не изменяется в течение 20 с лишь при поверхностных плотностях потока электронов не превышающих 2,5–2,8 мкВт/мкм<sup>2</sup>.

Количественная оценка устойчивости отолитов под действием электронов проведена согласно критерию, приведенному в работах [12, 13]. Образец устойчив, если  $S_c < \sigma_c$ , где  $S_c$  – относительное стандартное отклонение и  $\sigma_c$  – стандартное отклонение за счет статистики счета. Результаты оценки устойчивости отолитов под действием электронов для области с максимальным изменением интенсивности рентгеновского излучения  $SaK_{\alpha}$ -линии приведены в табл. 2. Видно, что при бомбардировке отолита пучком электронов условие устойчивости образца не нарушается в течение одной минуты, если поверхностная плотность потока электронов меньше 0,7 мкВт/мкм<sup>2</sup>, что соответствует, в частности,

Таблица 2. Характеристика устойчивости отолитов

Условия измерения сигнала				Общее время облучения электронами, с									
				20		30		40		50		60	
$d_3$ , мкм	$E_0$ , кВ	$i$ , нА	$P$ , мкВт/мкм <sup>2</sup>	$S_c$	$\sigma_c$	$S_c$	$\sigma_c$	$S_c$	$\sigma_c$	$S_c$	$\sigma_c$	$S_c$	$\sigma_c$
20	15	15	0,72	14,3	60,7	25,8	59,9	40,3	60,2	59,1	62,8	61,7	62,9
10	15	10	1,91	18,5	63,2	27,4	62,7	43,1	62,9	61,6	63,0	64,4	63,1
10	20	10	2,54	19,3	62,9	29,6	63,0	45,2	62,8	62,6	62,9	65,0	63,6
10	15	14	2,68	19,8	61,8	30,6	62,9	51,3	63,1	63,8	63,3	68,0	63,6
10	15	15	2,87	19,0	63,4	53,4	63,6	66,3	64,1	66,0	63,9	77,9	64,1
10	15	20	3,82	63,0	62,4	79,3	62,7	80,7	62,9	88,0	63,1	84,8	63,2
1	15	10	191,1	198,7	68,0	215,6	67,1	204,0	68,3	226,1	68,9	218,6	67,9

Примечание.  $d_3$  - диаметр зонда;  $E_0$  - ускоряющее напряжение;  $i$  - ток зонда;  $P$  - поверхностная плотность потока электронов;  $S_c$  - относительное стандартное отклонение;  $\sigma_c$  - стандартное отклонение за счет статистики счета.

ускоряющему напряжению 15 кВ, току зонда 15 нА и диаметру зонда 20 мкм. Тридцать секунд отолит устойчив к разрушению при поверхностной плотности потока электронов до 2,8–2,9 мкВт/мкм<sup>2</sup>, которая соответствует зонду диаметра 10 мкм при напряжении 15 кВ и токе 15 нА. Таким образом, одновременно количественно определять Na, Si, Fe, Mn, P и Ca в отолитах на микроанализаторе JCSA-733 можно только если поверхностная плотность потока электронов не превышает 2,8–3,0 мкВт/мкм<sup>2</sup>. Достичь такой плотности потока возможно только при большом (около 10 мкм) диаметре зонда. Однако для исследования однородности отолитов на микронном уровне требуется локальность на уровне одного микрона. Такая возможность изучения распределения элементов в отолитах описана в работе [17].

Метрологические характеристики методики определения концентраций натрия, кремния, железа, кальция, фосфора и марганца установлены согласно следующим формулам: относительное стандартное отклонение –  $s_r = 100 \cdot 0,02 \cdot C^{0,8495} / C$  [14], доверительный интервал для среднего генеральной совокупности при 95% статистической достоверности  $\Delta C = 1,96 \cdot s / \sqrt{n}$  [14] и предел обнаружения –  $C_{\min} = F \cdot C \cdot t \cdot \sqrt{2} / \sqrt{n} \cdot d_l \cdot \sqrt{I_{\phi} / I_l}$  [15]. В этих формулах  $s$  – стандартное отклонение;  $F$  – фактор учета матричных эффектов;  $C$  – концентрация элемента в образце сравнения;  $t$  – коэффициент Стьюдента,  $n$  – число измерений,  $I$  – интенсивность излучения в образце сравнения, индексы  $l$  и  $\phi$  соответствуют

линии и фону,  $\tau$  – экспозиция. Интенсивность фона определяли измерением с двух сторон от линии и усреднением полученных значений. Метрологические характеристики методики, приведенные в табл. 3, оценены для рентгеноспектрального электронно-зондового микроанализатора Superprobe-733 с помощью контрольных образцов. Воспроизводимость определений, полученных на контрольных образцах, сравнивали с воспроизводимостью, оцениваемой на отолитах. Последнюю определяли для натрия и кальция по 8–10 измерениям, выбирая для этого области отолита с неизменным составом. На отолитах относительные стандартные отклонения составили: для натрия 0,103 и для кальция 0,034, что соответствует значениям, полученным на контрольных образцах и ниже допустимых значений [14]. Можно предположить, что метрологические характеристики для определяемых элементов, полученные на контрольных образцах, соответствуют таковым на отолитах. Получаемые по предлагаемой методике результаты соответствуют II категории анализа [14, 16].

По разработанной методике проведено определение состава отолитов большой голомянки и байкальского омуля. Предварительные данные по их составу приведены в табл. 4. Наблюдаются четкие различия концентраций натрия и кальция в разных частях отолита. В центре отолита кальция меньше, чем в краевой зоне. Что касается натрия, то его содержание в центре выше, чем в краевой зоне. В таблице приведены средние значения концентраций, определенные по 3–5 измерениям в каждой области.

Таблица 3. Метрологические характеристики методики

Оксид	n	C <sub>ат</sub> , мас. %	C <sub>сп</sub> , мас. %	s <sub>r</sub>	σ <sub>r</sub>	ΔC, мас. %	C <sub>min</sub> , мас. %
Na <sub>2</sub> O	8	0,110	0,128	0,105	0,112	0,010	0,030
	6	1,750	1,797	0,052	0,057	0,082	
CaO	7	15,25	15,34	0,009	0,010	0,109	0,084
	7	2,240	2,086	0,027	0,029	0,044	
MnO	6	0,168	0,152	0,118	0,130	0,016	0,076
	6	0,170	0,164	0,117	0,128	0,017	
	6	0,171	0,165	0,189	0,208	0,027	
	7	0,180	0,163	0,141	0,153	0,018	
	5	0,190	0,157	0,085	0,096	0,013	
	7	0,260	0,236	0,109	0,117	0,021	
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	6	0,273	0,194	0,109	0,119	0,019	0,185
	7	0,360	0,234	0,106	0,114	0,020	
	5	0,660	0,406	0,099	0,110	0,039	
FeO	8	0,200	0,246	0,096	0,103	0,018	0,082
SiO <sub>2</sub>	8	0,300	0,271	0,118	0,126	0,024	0,044

Примечания. n – число измерений; C<sub>ат</sub> – аттестованное значение концентраций; C<sub>сп</sub> – среднее значение полученных концентраций; s<sub>r</sub> – относительное стандартное отклонение; s<sub>r</sub> – допустимое относительное стандартное отклонение; C<sub>min</sub> – предел обнаружения; ΔC – доверительный интервал для среднего генеральной совокупности при 95-процентном уровне надежности  $\Delta C = 1,96 \cdot s/\sqrt{n}$

Таблица 4. Химический состав отолитов.

Область отолита		Ca	Na	Si	P	Fe	Mn	
Омуль	1	Центр	34,05	0,31	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
		Край	36,54	0,24	0,16	н.о.	н.о.	н.о.
	2	Центр	34,16	0,36	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
		Край	36,32	0,27	0,18	н.о.	н.о.	н.о.
	3	Центр	33,23	0,34	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
		Край	34,96	0,28	н.о.	н.о.	0,1	н.о.
Голомянка	1	Центр	35,06	0,36	0,4	н.о.	н.о.	н.о.
		Край	36,45	0,24	2,86	0,19	0,15	н.о.
	2	Центр	39,04	0,48	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
		Край	40,96	0,29	н.о.	0,18	0,09	н.о.
	3	Центр	33,27	0,47	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
		Край	39,70	0,27	0,22	0,27	н.о.	н.о.
	4	Центр	39,51	0,36	н.о.	0,17	н.о.	н.о.
		Край	41,83	0,34	0,33	0,17	н.о.	н.о.
	5	Центр	34,39	0,94	н.о.	0,26	н.о.	н.о.
		Край	38,41	0,40	0,17	0,21	0,09	н.о.

Примечание: н.о. – не обнаружено.

Изменение содержания определяемых элементов, особенно кальция и натрия, связанное с множеством метаболических процессов, происходящих в организме рыб во время их роста, определяет

сезонные и годовые изменения в среде обитания. Другие выводы по полученным результатам делать, пожалуй, преждевременно. Лишь накопление данных по составу отолитов разных рыб, выловленных в

разных местах и в разное время, позволит установить связь состава их отолитов с состоянием воды в водоеме, в котором живут рыбы.

Таким образом, в предлагаемой статье разработана методика РСМА для определения содержания натрия, кальция, кремния, железа, фосфора и марганца в отолитах рыб. Метрологические характеристики методики, оцененные с помощью контрольных образцов, позволяют установить, что результаты, получаемые по предлагаемой методике соответствуют II категории анализа.

### Литература

1. Мониторинг состояния озера Байкал. – Л.: Гидрометиздат, 1991.
2. *Degens E.T., Deuser W.G., Haedrich R.L.* // *Mar. Biol.* – 1969. – **2**, № 1. – P. 105–113.
3. *Brazner J. C.* // *Transactions of the Amer. Fisheries Societ.* – 2004. – **133**. – P. 692–704.
4. *Dove S.G., Gillanders B.M., Kingsford M.J.* // *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* – 1996. – **205**, № 1–2. – P. 15–33.
5. *Канакин С.В., Карманов Н.С.* // III Всерос. и VI Сибирская конф. по рентгеноспектр. анал.: Тез. докл. Иркутск. – 1998. – С. 67.
6. *Маренков О.С.* Таблицы и формулы рентгеноспектрального анализа. Методические рекомендации. Л.: Машиностроение, 1982.
7. *Pouchou J.L., Pichoir F.* // *Recherche Aerospatiale.* – 1984. – **3**. – P. 13–38.
8. *Карманов Н.С., Канакин С.В.* // IV Всерос. конф. по рентгеноспектр. анализу. Тез. докл. Иркутск. – 2002. – С. 34.
9. NIST Standard Reference Materials Catalog 1990–1991, Ed: R.S. McKenzie, NIST Special Publication 260, U.S. Department of Commerce, National Institute of Standards and Technology, – 1990. – p. 71.
10. *Wilson S.A. and Taggart J.E.* Development of USGS micro-beam reference materials for geochemical analysis. // 4th International Conference on the Analysis of Geological and Environmental Materials. 29th Aug.-1st Sep., Pont a Mousson, Lorraine, France. – 2000. – p. 24.
11. *Reed S. J. B.* Electron Microprobe Analysis. – Cambridge London. New York. Melbourne.: Cambridge University Press, 1975.
12. *Buseck P.R., Goldstein J.I.* // *Geol. Soc. Av. Bull.* – 1969. – **80**, № 11. – P. 2141.
13. МИ 1709-87. Методические указания. Однородность стандартных образцов состава монокристаллических материалов для спектрального анализа. Методика выполнения измерений. М.: Изд-во стандартов, 1988.
14. *Thompson M., Potts P.J., Webb P.C.* *GeoPT1.* // *Geostandards Newsletter: The Journal of Geostandards and Geoanalysis.* – 1997. – **21**. – P. 51–58.
15. *Бернер А.И., Гимельфарб Ф.А., Ухорская Т.А.* // *Журн. аналит. химии.* – 1982. – **37**, № 2. – С. 338–348.
16. Методические основы исследования химического состава горных пород, руд и минералов / Под ред. Г.В. Остроумова. М.: Недра, 1979.
17. *Павлова Л. А., Павлов С. М., Аношко П. Н., Тягун М. Л.* // *Аналитика и контроль.* – 2003. – **7**, № 3. – С. 242–247.