

УДК 543.422.8

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЛЬЦИЯ И НАТРИЯ В ОТОЛИТАХ БАЙКАЛЬСКОГО ОМУЛЯ МЕТОДОМ РЕНТГЕНСПЕКТРАЛЬНОГО ЭЛЕКТРОННО-ЗОНДОВОГО МИКРОАНАЛИЗА

Л.А.Павлова, С.М.Павлов, П.Н.Аношко, М.Л.Тягун**

Институт геохимии СО РАН
664033, Иркутск, ул.Фаворского, 1а
pavpla@igc.irk.ru

*Лимнологический институт СО РАН
664033, Иркутск, Улан-Баторская, 3

Поступила в редакцию 4 мая 2003 г.

Разработана методика рентгеноспектрального электронно-зондового микроанализа (РСМА) натрия и кальция в отолитах байкальского омуля. Изучена устойчивость отолитов под действием электронного зонда. Оптимальные условия возбуждения и регистрации рентгеновского излучения Са и Na 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 2,8 мкВт/мкм². Оценены метрологические характеристики методики: относительное стандартное отклонение для натрия 0,013%, для кальция 0,74 %, доверительные интервалы соответственно 0,01 и 0,53%, а пределы обнаружения – 0,09 и 0,07 %. На рентгеноспектральном электронно-зондовом микроанализаторе Jeol Superprobe-733 по разработанной методике изучено распределение и определено содержание натрия и кальция в отолитах байкальского омуля. Полученные результаты соответствуют II категории анализа.

Павлова Людмила Анатольевна - кандидат химических наук, старший научный сотрудник Института геохимии им. А.П.Виноградова СО РАН.

Область научных интересов: рентгено-спектральный электронно-зондовый микроанализ природных объектов, взаимодействие электронов и рентгеновского излучения с веществом, экология.

Автор более 100 опубликованных работ, в том числе 2 монографий.

Павлов Сергей Михайлович – лаборант-исследователь Института геохимии им. А.П.Виноградова СО РАН.

Область интересов: вычислительная техника, программирование, электронно-зондовый микроанализ.

Автор 6 опубликованных работ.

Аношко Павел Николаевич – научный сотрудник Лимнологического института СО РАН.

Область научных интересов: экология, рыбы, популяционная структура, динамика сообществ, статистический анализ.

Автор 11 опубликованных работ.

Тягун Марина Львовна – аспирант Лимнологического института СО РАН.

Область научных интересов: рыбы, динамика популяций, экология, возраст и рост, регистрирующие костные элементы.

Автор 3 опубликованных работ.

Отолиты (ушные камни) позвоночных являются составной частью органов равновесия внутреннего уха. Они представляют собой карбонатные структуры, преимущественно в форме арагонита, с небольшим содержанием белкового матрикса [1]. В ихтиологии эти структуры благодаря чередованию оптически различимых сезонных приростов (сходных с годовыми кольцами деревьев) широко используются для определения возраста рыб. В последнее десятилетие разрабатываются методы элементного анализа отолитов, в том числе и способы изучения распределения в них химических элементов. Широкое изучение отолитов определяется возможностью реконструкции по ним тех событий в окружающей среде, вследствие которых происходят изменения химического состава соответствующего прироста. Определение состава центра отолита, характеризующего раннюю стадию жизни рыбы, и его края, соответствующего поздней стадии развития, может дать доступ к хронологической информации, хранящейся в отолитах рыб [2].

В связи с вышесказанным исключительно важно знать химический состав отдельных частей отолита, который можно определить методом рентгеноспектрального электронно-зондового микроанализа (РСМА). Широкому применению РСМА при изучении биологических объектов пре-

пятствуют изменению состояния образца под действием электронного зонда и высокие пределы обнаружения некоторых элементов, интересующих исследователей.

Цель настоящей работы – разработка методики определения концентраций натрия и кальция и изучения однородности распределения этих элементов в отолитах байкальского омуля методом РСМА.

Подготовка образцов к анализу вследствие хрупкости отолитов требует особой тщательности и осторожности. Изучаемой поверхностью образцы наклеивали на липкую ленту. Для закрепления в нужном положении наклеенные отолиты осторожно заливали небольшим количеством эпоксидной смолы, а после ее затвердевания добавляли эпоксидную смолу до придания образцу формы, удобной для дальнейшей обработки. Закрепленные в эпоксидной смоле отолиты обрабатывали на алмазных пастах до получения зеркально-полированной поверхности. Для обеспечения стока электронов, падающих на образец, на поверхность напыляли в вакууме пленку из уг-

лерода, толщина которой 20-30 мкм определялась способом, основанным на наблюдении цветов интерференции полированной медной поверхности.

Оптимальные условия возбуждения и регистрации интенсивности рентгеновского излучения подбирали, чтобы исключить искажение аналитического сигнала из-за разрушения образца во время бомбардировки его электронами. С этой целью изучали устойчивость отолитов к воздействию электронного пучка. В произвольно выбранных точках отолита при разных условиях возбуждения в течение одной минуты проводили измерения скорости счета наиболее интенсивного K_{α} -излучения кальция. Время измерения менялось от 2 до 10 с и, соответственно, число измерений от 6 до 30. Зависимости относительных интенсивностей от времени действия электронного пучка на образец, полученные при разных поверхностных плотностях потока электронов, приведены на рис. 1. Визуально заметно, что интенсивность не изменяется в течение 30 с лишь при поверхностных плотностях потока электронов не превышающих $2,5 \text{ мкВт/мм}^2$.

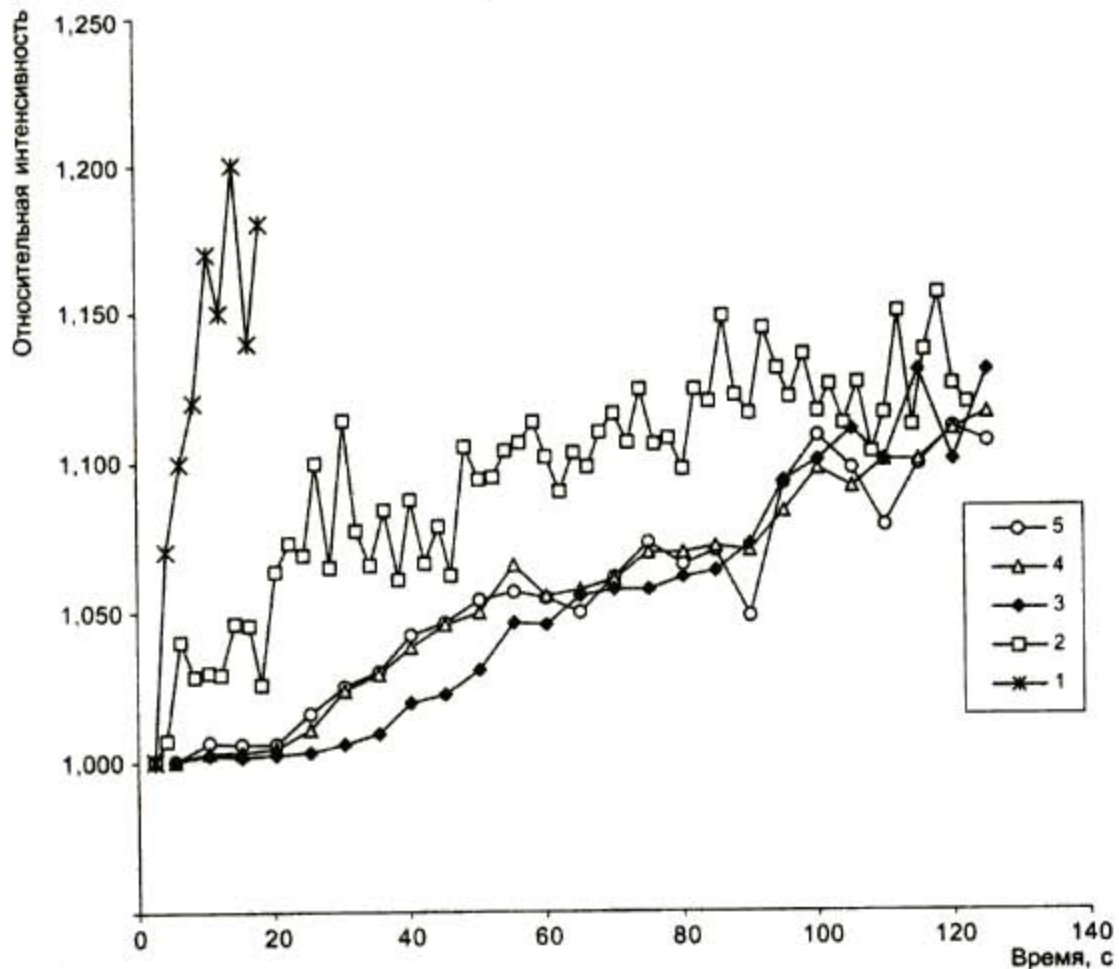


Рис.1. Изменение относительной интенсивности K_{α} -линии кальция в зависимости от времени измерения и плотности потока возбуждающих электронов, мкВт/мм^2 : 1 – 191,00; 2 – 3,82; 3 – 2,54; 4 – 2,86; 5 – 3,06

Количественно устойчивость образцов оценивали по критерию, приведенному в работах [3, 4]. Образец устойчив, если относительное стандартное отклонение $S_c = \sqrt{(\sum(N_i - N_{cp})^2) / (n - 1)}$ для n измеренных значений скорости счета (N_i) i -го элемента с концентрацией не менее нескольких массовых процентов меньше стандартного отклонения

за счет статистики счета ($\sigma_c = \sqrt{N_{cp}}$) при среднем значении скорости счета $N_{cp} = (\sum N_i) / n$. В табл. 1 приведены результаты оценки устойчивости отолитов для точек с максимальным изменением интенсивности рентгеновского излучения K_{Ca} -линии кальция.

Таблица 1

Характеристика устойчивости отолитов

Условия измерения сигнала				Общее время измерения, с										
				20		30		40		50		60		
				S_c	α_c	S_c	α_c	S_c	α_c	S_c	α_c	S_c	α_c	
d_z , мкм	E_0 , кВ	i , нА	P , мкВт/мкм ²											
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	9	1,72	15,3	61,3	24,6	62,0	38,9	61,7	58,9	62,4	62,0	61,9	
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	15	13	2,48	18,8	62,7	28,3	62,8	42,5	62,3	61,3	62,4	64,9	63,9	
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	14,5	2,77	20,4	63,7	35,8	63,1	62,1	63,8	67,2	63,1	70,3	63,9	
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	16	3,06	62,7	62,6	63,6	62,1	67,8	63,3	75,8	63,5	84,3	63,7	
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_z - диаметр зонда; E_0 - ускоряющее напряжение; i - ток зонда; P - поверхностная плотность потока электронов

Видно, что при бомбардировке отолита пучком электронов в течение одной минуты условие устойчивости образца не нарушается, если поверхностная плотность потока электронов меньше 1,7 мкВт/мкм², что соответствует, в частности, 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/мкм², которая соответствует десятимикронному зонду при напряжении 15 кВ и токе зонда 15 нА. Таким образом, количественные определения натрия и кальция в отолитах следует проводить зондом, диаметр которого не менее 10 мкм. Однако изучение отолитов требует локальности на уровне микрона. Достичь этого можно за счет уменьшения диаметра зонда. На рис. 2 графики распределения натрия показывают, что изменение содержания Na по приведенному профилю практически не заметно при возбуждении излучения зондом, диаметр которого 10 мкм (крив. 2), тогда как в случае одномикронного зонда четко видны границы областей с разной концентрацией натрия (крив. 1). В случае десятимикронного зонда границы областей с разным содержанием Na размываются, а из-за

их малых размеров различие в концентрациях оказывается практически незаметным. Таким образом, при изучении однородности распределения элементов в отолитах локальность, достигаемая при возбуждении излучения десятимикронным зондом, оказывается недостаточной. Уменьшение диаметра зонда до 1 мкм позволяет различить области с разной концентрацией, но при этом приводит за 10 с к увеличению содержания натрия на 2 отн. % (рис. 2). Учитывая разрушение отолита под действием пучка электронов, сравниваемые профили выбирались на расстоянии 7 мкм друг от друга. На рис. 3 приведены графики распределения по профилю K_{Ca} -излучения натрия, возбужденного одномикронным зондом в течение разного времени. Можно видеть, что вид распределения элемента практически не зависит от времени измерения (графики а, б, в и г, д, е). Увеличение времени измерения уменьшает статистический разброс (графики в и е) и усиливает искажение состава. Изменение состояния отолита, в случае возбуждения излучения в нем одномикронным зондом в течение 5 с, приводит к искажению истинного содержания кальция на 6, а натрия на 2 отн. %. Получение истинного распределения элементов по

профилю требует не только правильного подбора диаметра зонда и времени регистрации излуче-

ния, но и учета искажения аналитического сигнала за счет разрушения отолита.

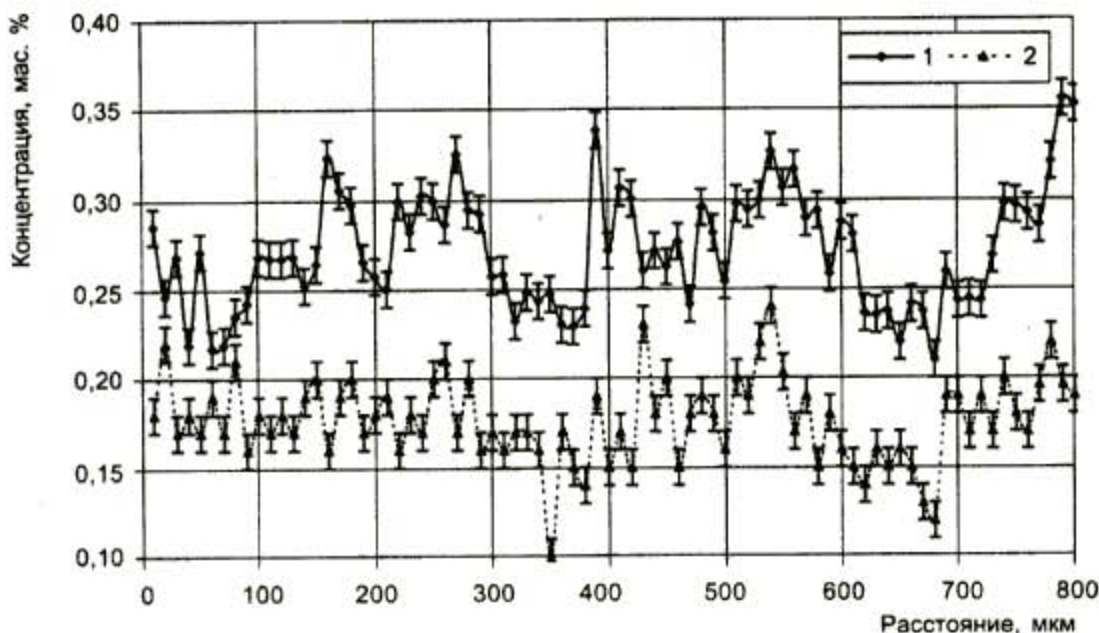


Рис. 2. Изменение содержания натрия в отолите вдоль линии сканирования при возбуждении излучения электронным зондом разного диаметра, мкм: 1 – 1; 2 – 10. Отмечены доверительные интервалы

При построении графиков распределения элементов и определении истинных концентраций кальция и натрия в каждой выявленной

области, вводили поправку на искажение интенсивности за счет изменения состояния образца под действием электронов зонда.

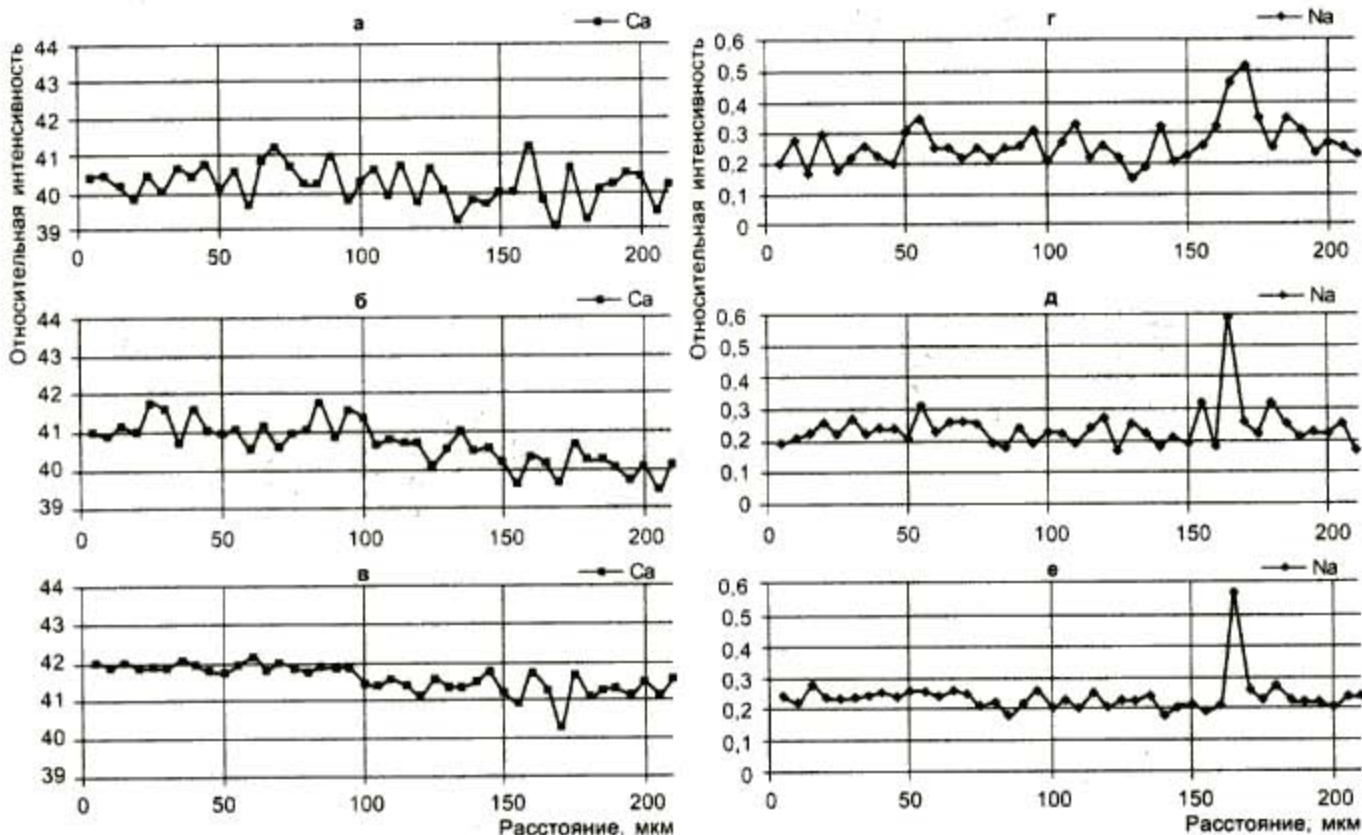


Рис. 3. Изменение относительной интенсивности CaK_α - и NaK_α -излучения, возбужденных одномикронным зондом, при сканировании образца, в зависимости от времени регистрации, с: а, г – 2; б, д – 3; с, е – 5

Разрушение образца особенно важно учитывать при определении состава в случае, когда количество анализируемых элементов превышает число аналитических каналов прибора, когда общее время бомбардировки образца электронным зондом более 30 с. В нашем случае управляющая программа [5], которая учитывает конструктивные возможности микроанализатора, составлена так, что электронный пучок при изменении углов регистрации излучения перекрывается и электроны падают на отолит только непосредственно во время измерения интенсивности. Это значительно сокращает общее время воздействия электронного зонда на образец.

Метрологические характеристики методики определения концентраций натрия и кальция оценены на рентгеноспектральном электронно-зондовом микроанализаторе Jeol Superprobe-733. Воспроизводимость оценивалась по 10 измерениям в области отолита с неиз-

менной концентрацией. Относительное стандартное отклонение для натрия составило 0,013 %, а для кальция 0,74 %, что ниже допустимых значений [6]. Доверительные интервалы для среднего значения при 95 % статистической достоверности оказались равными 0,01 % для натрия и 0,53 % для кальция. Пределы обнаружения элементов, рассчитанные по формуле, приведенной в работе [7], составили для натрия и кальция соответственно 0,09 и 0,07 мас. %. Получаемые по предлагаемой методике результаты соответствуют II категории анализа [6, 8].

Определение содержания натрия и кальция в отолитах байкальского омуля проводилось по разработанной методике. На рис. 4 приведено распределение натрия и кальция, полученное по поперечному сечению отолита при измерении одномикронным зондом через каждые 5 мкм в течение 5 с в каждой точке. Наблюдаются значительные различия концентраций натрия и кальция в разных частях отолита.

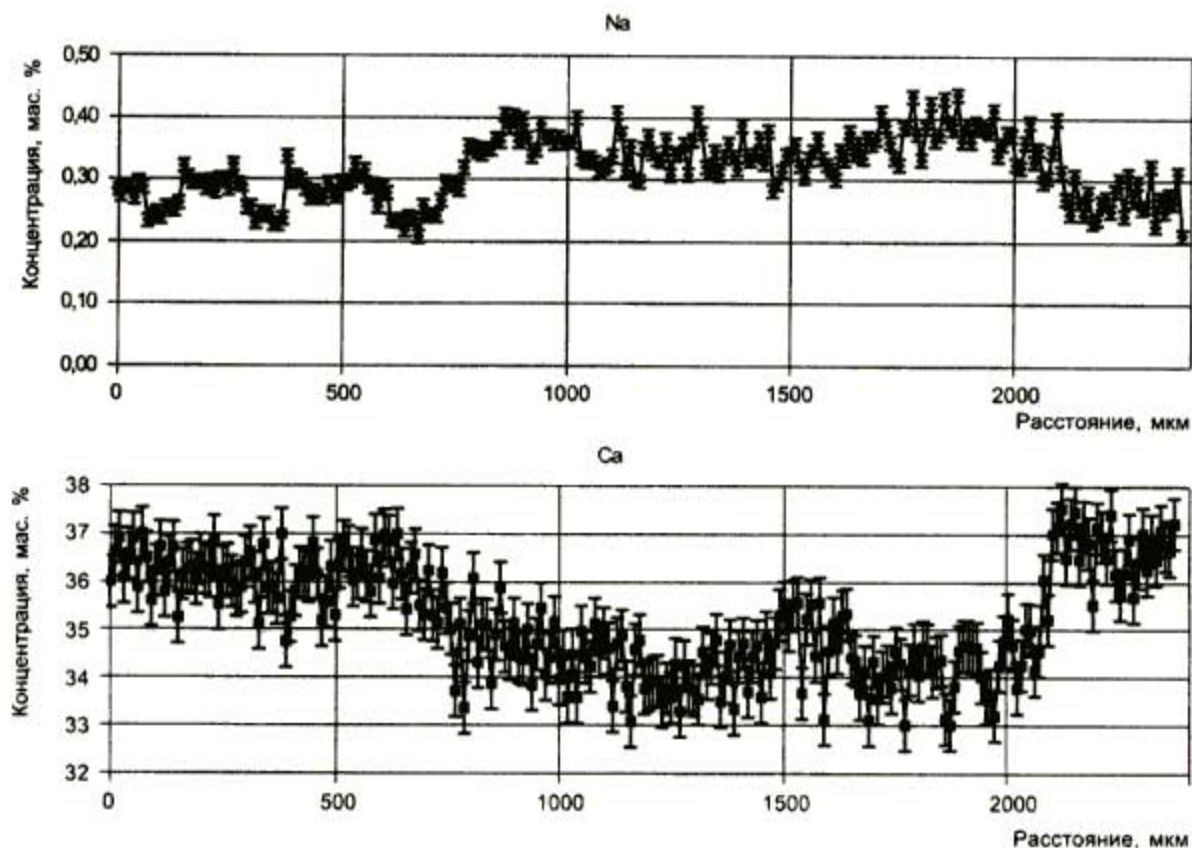


Рис. 4. Распределение натрия и кальция по поперечному сечению отолита. Отмечены доверительные интервалы

В табл. 2 приведено содержание элементов в отолитах. Минимальные и максимальные значения концентраций для каждой зоны, приведенные в табл. 2, и доверительные интервалы на рис. 2 и рис. 4 подчеркивают значимость разли-

чий состава в обнаруженных зонах. Очевидно, что в центре отолита кальция меньше, чем в краевой зоне. Что касается натрия, то его содержание в центре выше, чем в краевой зоне, и, кроме того, изменяется в краевой зоне от слоя к слою.

Таблица 2

Содержание натрия и кальция в отолитах байкальского омуля

Область исследования отолига			Содержание элементов (мас.%)			
			Na		Ca	
272	I	1	0,272; 0,265; 0,280; 0,278; 0,279	0,275	34,70; 35,45; 35,73; 34,71; 35,47;	35,21
		2	0,344; 0,358; 0,353; 0,348; 0,338;	0,348	37,11; 36,43; 36,91; 37,22; 36,64;	36,86
	II	1	0,212; 0,203; 0,221; 0,214; 0,209	0,212	32,79; 32,98; 33,19; 32,89; 33,25;	33,01
		2	0,263; 0,259; 0,266; 0,271; 0,258;	0,263	35,22; 35,17; 35,30; 34,78; 34,96;	35,08
195	I	1	0,330; 0,316; 0,336; 0,329; 0,320;	0,326	34,83; 35,55; 35,14; 35,12; 34,75;	35,33
		2	0,400; 0,384; 0,390; 0,381; 0,393;	0,390	37,14; 37,53; 37,15; 37,21; 37,45;	37,30
	II	1	0,232; 0,229; 0,241; 0,245; 0,240;	0,237	33,79; 33,86; 33,93; 33,95; 33,51;	33,81
		2	0,313; 0,294; 0,303; 0,295; 0,312;	0,304	35,31; 35,47; 35,09; 35,50; 35,56;	35,39
246	I	1	0,306; 0,316; 0,312; 0,299; 0,307;	0,308	33,01; 32,80; 32,66; 33,12; 32,87;	32,89
		2	0,375; 0,374; 0,364; 0,355; 0,358;	0,365	33,33; 33,25; 34,10; 34,02; 33,14;	33,57
	II	1	0,253; 0,249; 0,241; 0,254; 0,250;	0,249	34,89; 34,18; 34,29; 33,99; 34,56;	34,38
		2	0,312; 0,294; 0,305; 0,296; 0,310;	0,303	35,01; 34,74; 35,09; 34,55; 34,95;	34,87

Примечание: I – центральная часть отолига; II – краевая часть отолига; 1 – области с минимальным содержанием элемента; 2 – области с максимальным содержанием элемента.

Это, возможно, связано с тем, что более подвижный натрий, сопровождает множество метаболических процессов в организме рыбы, а кальций, являясь основным структурным элементом, менее подвержен влиянию факторов среды и из-

менениям физиологического состояния особи.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проекты № 01-05-97233-р2001байкал и № 01-05-97224-р2001байкал).

ЛИТЕРАТУРА

1. Degens E.T. Molecular structure and composition of fish otoliths / E.T.Degens, W.G.Deuser, R.L.Haedrich // Mar. Biol. 1969. V.2. P.105-113.
2. Dove S.G. An investigation of chronological differences in the deposition of trace metals in the otoliths of 2 Temperate Reef fishes / S.G.Dove, B.M.Gillanders, M.J.Kingsford // Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 1996. V.205, № 1-2. P.15-33.
3. Buseck P.R. Compositions and Cooling Rates of Pallasitic Meteorites. / P.R.Buseck, J.I.Goldstein // Geol. Soc. Am. Bull. 1969. V.80, № 11. P.2141.
4. МИ 1709-87. Методические указания. Однородность стандартных образцов состава монокристаллических материалов для спектрального анализа. Методика выполнения измерений. М.: Изд-во стандартов, 1988. 7 с.
5. Канакин С.В. Программное обеспечение электрон-
- но-зондовых микроанализаторов MAP-3 и MAP-4 для IBM PC / С.В.Канакин, Н.С.Карманов // Тез. докл. III Всероссийской и VI Сибирской конференций по рентгеноспектральному анализу. Иркутск, 1998. С.67.
6. Thompson M. GeoPT1. International proficiency test for analytical geochemistry laboratories – report on round 1 (July 1996) / M.Thompson, P.J.Potts, P.C.Webb // Geostandards Newsletter: The Journal of Geostandards and Geoanalysis. 1997. V.21. P.51-58.
7. Бернер А.И. Метрологические аспекты рентгеноспектрального микроанализа / А.И.Бернер, Ф.А.Гимельфарб, Т.А.Ухорская // Журн. аналит. химии. 1982. Т.37, № 2. С.338-348.
8. Методические основы исследования химического состава горных пород, руд и минералов / Под ред. Г.В. Остроумова. М.: Недра, 1979. 400 с.

ELECTRON PROBE X-RAY MICROANALYSIS OF THE CALCIUM AND SODIUM IN THE OTOLITHS OF BAIKAL'S OMUL

L.A.Pavlova, S.M.Pavlov, P.N.Anoshko, M.L.Tyagun

The x-ray electron probe microanalysis (EPMA) technique is elaborated for the finding calcium and sodium in the otoliths of Baikal's omul. The stability of otoliths during the electron probe action was studied. The change of element's intensity in accordance with the beam power densities was chosen as the criterion to select optimum conditions for analysis of the elements. It is concluded that the beam power densities $>2,8 \mu\text{W}/\mu\text{m}^2$ resulted in unacceptable levels of otolith damage. The metrological testing the elaborated technique was carried out. The relative standard deviation obtained for sodium is 0,013 % and for calcium – 0,74 %, confidence intervals for sodium and calcium are respectively equal 0,01 and 0,53 %, and thresholds of delectability are respectively equal 0,09 and 0,07 %. The Lake Baikal omul's otoliths have been studied using the electron probe X-ray microanalyser "Superprobe-733". The quality of all available results complies with the "applied geochemistry" category of performance (category 2).