

СПЕКТРАЛЬНО-ИЗОТОПНЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОРГАНОГЕННЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИЗОТОПНЫХ МЕТОК

Г. К. ДУДИЧ, П. Н. ЗАНАДВОРОВ, В. В. КИДИН, Г. С. ЛАЗЕЕВА, Ю. М. ЛОГИНОВ,
А. А. ПЕТРОВ, Ю. В. ФРОЛОВ, Р. В. ХОМЯКОВ, В. Я. ШЕВЧЕНКО

(Кафедра агрономической и биологической химии ТСХА, ЦИНАО, НИИФИ ЛГУ)

Если спектрально-изотопный метод находил до последнего времени наиболее широкое применение при определении газообразующих элементов в неорганических материалах (главным образом в металлах) и в газовых смесях [11], то его использование для анализа органических объектов началось значительно позже и обзорные публикации по этому вопросу отсутствуют. Данная работа, показывая возможность применения метода при анализе органических веществ в биологических, агрохимических и экологических исследованиях, восполняет этот пробел. Не вдаваясь в детали, мы предполагаем здесь описать созданную нами аппаратуру, очертить сферы использования метода и вытекающее из этого разнообразие методических приемов, а также показать те его применения (их число сейчас достаточно велико), которые уже реализованы.

С помощью спектрально-изотопного метода определяют как валовое содержание органогенных элементов — С, N, O, H, так и их изотопный состав. Последнее обусловлено широким применением в биологических исследованиях метода «меченых атомов» [12, 18, 19]. При этом желательно иметь дело со стабильными изотопами, поскольку они, как правило, не стимулируют и не угнетают исследуемый биохимический процесс в живом организме¹.

Принято считать, что для анализа стабильных изотопов наиболее рационально использование массо-спектрометрии. Однако это верно лишь в случаях, когда необходима высокая прецизионность анализа — на уровне относительной стандартной ошибки — около десятых долей процента. В биологических же экспериментах с «меткой» такая точность чаще всего не нужна, прежде всего потому, что относительные флуктуации изотопных концентраций в самом биологическом опыте составляют, как правило, несколько, а иногда десять и более процен-

¹ Исключение составляет дейтерий в виде D₂O. См., например, [15].

тов. Флуктуации валового содержания органогенных элементов того же порядка. Поэтому для аналитического обеспечения здесь рационально использовать спектральный метод, ошибки которого ($\sim 1\%$) не снижают точности всего биологического эксперимента в целом. Что же касается простоты аппаратуры, ее дешевизны, производительности и доступности для широкого круга исследователей, то тут преимущество оказывается на стороне спектрального метода [14, 17]. Результаты систематического сопоставления масс-спектрометрического и спектрального методов в массовых агрохимических опытах с ^{15}N изложены в [20].

Исходя из сказанного мы поставили перед собой задачу создания комплекса универсальных методов и аппаратуры для спектрально-изотопного определения основных органогенных элементов в органических объектах. Такие методы и приборы должны обеспечивать:

1) определение как общего содержания данного элемента, так и его изотопного состава;

2) возможность анализа разнообразных натуральных биологических объектов в целом — растений, почв, органических и минеральных удобрений, а также продуктов их препарирования — фракций белка, аминокислот при хроматографическом разделении и т. п.;

3) возможность анализа и больших (десятков мг), и малых (долей мкг) количеств определяемого элемента;

4) возможность анализа в очень широком диапазоне концентраций изотопов — от различающихся на 2—3 порядка до равных, причем точность анализа не должна снижать точности биологического эксперимента в целом;

5) высокую производительность определений, необходимую для массовых биологических и особенно агрохимических экспериментов;

6) возможность определения как каждого из органогенных элементов в отдельности, так и совместно нескольких элементов.

Существенны все перечисленные требования, но особо следует подчеркнуть последнее, поскольку оно позволяет проводить биологический эксперимент сразу с двойной (^{13}C — ^{15}N) или даже с тройной (^{13}C — ^{15}N — ^2H) меткой, что резко повышается информативность не только благодаря увеличению количества результатов эксперимента, но и, что более важно, непосредственному установлению корреляции между разными изучаемыми процессами в одном и том же опыте [3, 21].

Очевидно, совокупности перечисленных требований может удовлетворять анализ только чистых газов, выделенных из органических проб в результате их препарирования и тщательной последующей очистки от примесей. Поэтому методики и установки для такого анализа включают в себя 4 основные части: препарирование исходного образца с целью выделения исследуемых газов; их разделение и очистка; возбуждение их спектров; регистрация яркостей изотопных компонентов этих спектров. В случае определения валового содержания элементов процедура выделения газов сочетается с их изотопическим уравниванием.

Принципиальная схема аналитической установки показана на рис. 1.

1. Препарирование пробы осуществляется путем ее пиролиза в вакууме в присутствии окислителя

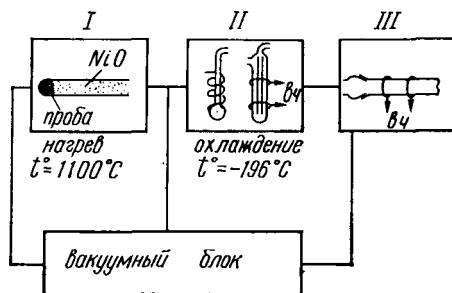


Рис. 1. Блок-схема препаративной установки.

I — пиролиз; II — фракционирование; III — возбуждение спектров.

Аналитические спектры, используемые для определения концентраций изотопов

Изотоп (анализируемый газ)	Область C^1 % ат	Аналитический спектр λ , нм	Область высокочастотного разряда
^{15}N (N_2)	$\left\{ \begin{array}{l} 0,37-70 \\ 0,05-0,37 \end{array} \right.$	$C^3\Pi_u - B^3\Pi_q$	(+), (-)
^{13}C (CO_2)		297,6	(+)
^{18}O (CO)	1—50	CO^+ , $B^2\Sigma - X^2\Sigma$	(-)
^2H (H_2O)	0,5—95	H_β бальмеровской серии, 486,4	(-), (+)

(NiO), если выделяют азот, углерод и водород, или восстановителя (активированный уголь), если выделяют кислород. Время, необходимое для пиролиза, около 5 мин, температура около 1000 °C [1, 4, 5].

2. Разделение газов и их очистка осуществляются в системе криогенных и криогенно-разрядных ловушек. Время разделения от 2—3 до 10—15 мин. Применение разрядно-криогенной ловушки [6] особенно целесообразно при определении азота, поскольку обеспечивает наилучшую его очистку от остаточных количеств CO и NO, практически не отделимых при простом криогенном фракционировании. Наложение же спектра этих примесей на аналитические полосы N_2 искажает результаты определения ^{15}N .

3. Возбуждение аналитических спектров для определения ^{15}N , ^{13}C , ^{18}O , ^2H осуществлялся в высокочастотном разряде в чистых N_2 , CO_2 , CO и парах H_2O . При этом спектры нейтральных молекул N_2 ($C^3\Pi_u - B^3\Pi_q$) и атомов (H_β бальмеровской серии) возбуждаются в межэлектродном («положительном»), а молекулярных ионов CO^+ ($B^2\Sigma - X^2\Sigma$) — в подэлектродном («отрицательном») свечении, где их яркость примерно на 2 порядка больше, чем при возбуждении в «положительном столбе» [1, 4, 5, 7]. Обычно используемые аналитические полосы и линии указаны в табл. 1.

4. Измерение относительных яркостей изотопных компонент аналитических спектров осуществляется на спектрофотометрах, разработанных в НИИФ ЛГУ [11]. Перевод значений относительных яркостей в значения концентрации изотопов производится безэталонными методами, требующими во всех случаях учета взаимного переложения изотопных компонент, но в большей мере при анализе по молекулярным полосам, в меньшей — при анализе по атомным линиям H_β . Созданные варианты спектрофотометрических установок различаются по степени автоматизации измерения относительных яркостей компонент аналитического спектра, а также по возможности учета их переложений для расчета концентраций изотопов.

Разработанные модели спектрофотометров предназначены для лабораторий с разным объемом и характером исследовательской работы. Ниже описываются основные модели этих спектрофотометров².

Первый вариант установки представляет собой фотометр с автоматическим переключением чувствительности с выходом на регистрирующий потенциометр. Блок-схема установки представлена на рис. 2. В монохроматоре осуществляется сканирование изотопных компонент аналитического спектра; диапазон сканирования исследуемых элементов 5—30 Å. Сигнал с фотоэлектронного умножителя (ФЭУ) поступает на входной аттенюатор, выход которого подключен к входу усилителя постоянного тока (УПТ), коэффициент деления входного аттенюатора (1:1; 1:10 или 1:30) устанавливается оператором предварительно с учетом соотношения сравниваемых сигналов. Если в процессе измерения

² Аппаратура аналогичного назначения (N-15 анализаторы) выпускается в ГДР и Японии [16, 23, 24].

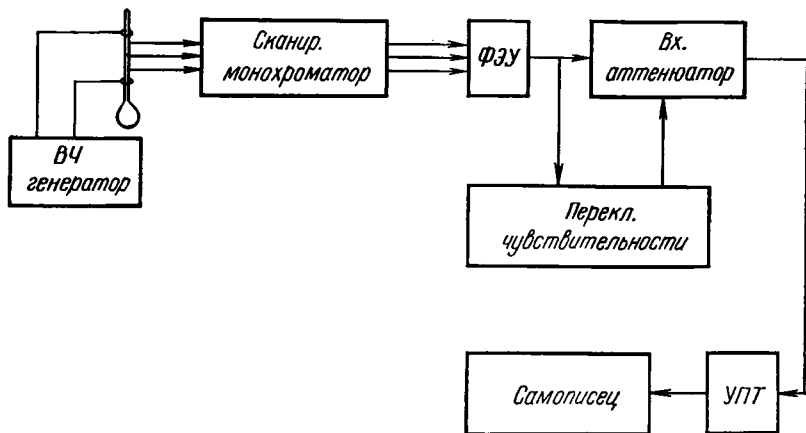


Рис. 2. Блок-схема спектрофотометра переменной чувствительности с ручной обработкой результатов.

большой сигнал превышает некоторое пороговое значение, автоматически срабатывает реле переключателя чувствительности, вход которого подключен к выходу ФЭУ, и устанавливается выбранный коэффициент деления аттенюатора. Усилитель постоянного тока и переключатель чувствительности собраны по параллельно-балансной схеме, преимуществами которой являются компенсация температурного дрейфа и нечувствительность к дрейфу напряжения питания.

Этот вариант установки наиболее дешев и прост, но и наименее производителен, так как период сканирования составляет 1—2 мин, а расчет относительной яркости проводится вручную по регистрограмме с ленты самописца. Его применение наиболее рационально в малых лабораториях со сравнительно небольшой потребностью в анализах (не более 20 анализов в день).

Второй вариант представляет собой модернизацию первого с выводом информации на стандартный машинный носитель (перфоленгу) и с последующим расчетом концентрации на ЭВМ. Имеется также контрольный самописец. Блок-схема установки представлена на рис. 3.

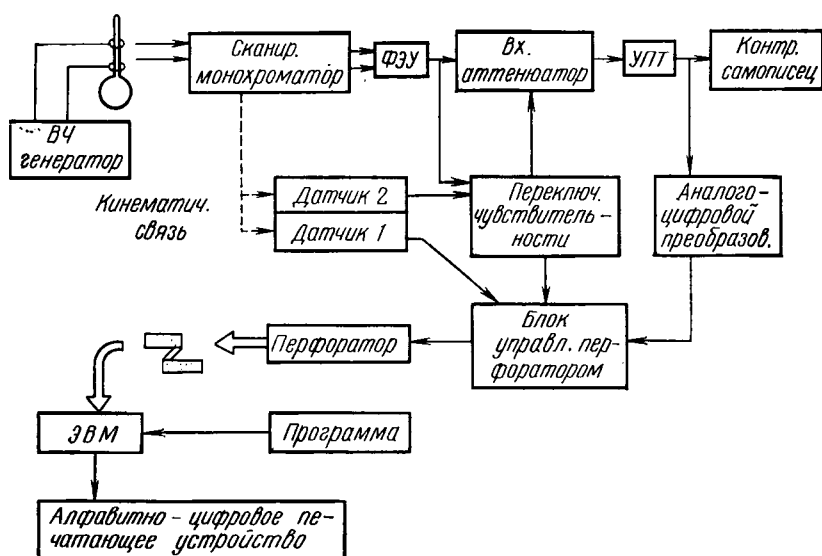


Рис. 3. Блок-схема спектрофотометра с выводом информации на ЭВМ.

В отличие от предыдущего варианта здесь со сканирующим узлом монохроматора кинематически связаны диск с набором щелей и блок фотодиодных датчиков, выдающих команды для двух замеров фона — при номинальной и уменьшенной (в результате переключения аттенюатора) чувствительности УПТ, а также для измерения амплитуд контуров аналитических пиков. Переключение чувствительности при измерении большого пика осуществляется автоматически, а при замере фона — по команде датчика 2. Взаимное расположение щелей и их ширина, определяющие моменты и длительность импульсов команд, регулируются. Предварительная настройка блока датчиков осуществляется по регистрограмме контрольного самописца.

Цифровая информация на блок управления перфоратором поступает с выхода аналого-цифрового преобразователя, вход которого подключен к выходу УПТ. Блок управления перфоратором преобразует параллельный двоичный код АЦП в последовательный код для ввода в перфоратор. Полученная информация обрабатывается затем на ЭВМ по заданной программе, в которой предусмотрено вычитание значений фона из измеряемых амплитуд пиков изотопных компонент (при соответствующей — номинальной или уменьшенной — чувствительности) и вычисление их истинного отношения.

Данный вариант, предназначенный для организаций, имеющих ЭВМ либо канал связи с ЭВМ, существенно облегчает работу оператора, освобождая его от проведения расчетов.

В третьем варианте существенно увеличена производительность спектрофотометра (рис. 4). С этой целью в установке осуществлено скоростное сканирование спектра с помощью вращающейся плоскопараллельной пластинки, помещаемой в тубус выходной щели монохроматора. Частота сканирования около 80 Гц.

Радиотехническая часть установки представляет собой аналого-цифровой преобразователь, предназначенный для измерения отношения амплитуд аналитических пиков с цифровой индикацией результатов измерения. Информация с выхода системы передается на специализирован-

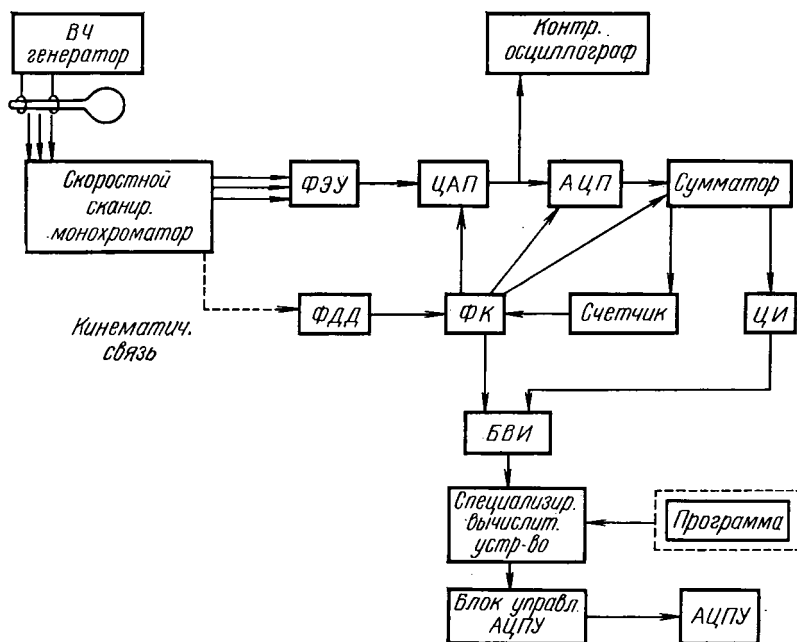


Рис. 4. Блок-схема скоростного логометра.

ное вычислительное устройство, позволяющее выводить на цифрочекать результаты измерения в концентрациях.

Сигнал с ФЭУ поступает на импульсно-аналоговый преобразователь (ИАП), который содержит стробируемый усилитель, позволяющий автоматически переключать коэффициент усиления и пиковый детектор, предназначенный для преобразования импульсного сигнала с ФЭУ в постоянное напряжение для ввода в аналого-цифровой преобразователь. Сигналы управления для ИАП и АЦП поступают с формирователя команд (ФК), который запускается опорными импульсами фотодиодного датчика (ФДД), кинематически связанного со сканирующим узлом монохроматора. Положение импульсов выборки из сигнала с ФЭУ устанавливается оператором вручную по экрану контрольного осциллографа, что дает возможность измерять отношение двух любых пиков в спектре. Параллельный двоичный код АЦП поступает в двухканальный детектор. Канал пика I (меньшего) заканчивается цифровым индикатором, канал пика II (большого) — счетчиком с ограниченной емкостью счета. При накоплении определенного, заранее заданного числа счетчиком канала II он выдает в ФК стоп-импульс, останавливающий накопление в обоих каналах. При этом на цифровом индикаторе (ЦИ) высветится число, соответствующее отношению пиков. Для повышения точности измерения малых сигналов (при низких концентрациях изотопа) в системе предусмотрена возможность усиления пика I в 10 или 100 раз. Осциллограмму с усиленным пиком I можно наблюдать на экране контрольного осциллографа, подключенного к выходу ИАП.

Значение отношения пиков в цифровом коде через блок вывода информации (БВИ) вводится в специализированную малую вычислительную машину типа 15-ВСМ-5, в которой производится расчет концентраций по заранее заданной программе. Результат через блок управления АЦПУ поступает на цифрочекательное устройство типа «Консул-260». В системе может быть использовано специализированное вычислительное устройство «Искра-125» с собственным АЦПУ.

Время измерения отношения яркостей I_1/I_2 — 20—40 с в зависимости от яркости источника. Использование вычислительного устройства для расчета концентраций в целом не увеличивает времени проведения анализа.

Во всех рассмотренных вариантах спектрофотометров точность измерения относительной яркости составляет 1—2% в диапазоне величин I_1/I_2 от 100 до 1. Что касается перехода от отношения яркостей к концентрациям изотопов, то он осуществляется путем учета взаимного переложения компонент изотопной структуры с помощью заранее определяемых для данной установки коэффициентов переложения, которые затем вводятся в расчетные формулы для перехода от I_1/I_2 к C_1/C_2 . При машинной обра-

Т а б л и ц а 2

Основные характеристики методик при массовых и прецизионных измерениях концентраций изотопа

C^i % ат.	\bar{S}_T	Δ % отн.
Азот		
0,05*	3	13
0,1*	2	5
0,2*	1	1
0,37*	0,5	0,3
0,37	2	1,5
1	1,5	1
10	1	0,5
50	0,5	0,2
80	0,5	0,2
Углерод		
1	3	3,5
2	2	2
10	1,5	1,5
30	1,5	1
60	1	0,5

Примечания: 1. C^i , % ат.—концентрация изотопа; \bar{S}_T % отн.—относительная стандартная ошибка определения для серии из 10 измерений; Δ % отн.—среднее расхождение между параллельными определениями.

2. Звездочкой обозначены определения по прецизионной методике.

ботке результатов измерений программа этого перехода введена в ЭВМ и результат измерений выдается в единицах концентрации изотопов. При обработке вручную для облегчения работы оператора составлены соответствующие таблицы (имеются также программы для расчета таких таблиц).

Рассмотренная аппаратура может быть использована, как указано выше, для анализа изотопного состава всех основных органогенных элементов. В методическом же плане нами пока наиболее полно отработано определение азота и углерода как наиболее важных элементов в исследованиях с «мечеными» атомами [3, 6, 7]. Основные характеристики методик определения этих элементов, иллюстрирующие возможность аппаратуры, приведены в табл. 2.

Такие характеристики обеспечивают успешные применения спектроскопического анализа без снижения точности всего биологического эксперимента в целом.

Особый интерес в методике анализа азота представляет область концентраций ниже естественных содержаний ^{15}N . Он вызван показанной в [13, 22] возможностью использовать в полевых агрохимических (экологических) опытах материала, меченного не ^{15}N , а ^{14}N , что обеспечивает значительное снижение затрат труда и средств. Описанная нами ранее [8] методика спектроскопического определения ^{15}N в области ниже 0,37 % в настоящее время несколько улучшена, что и нашло свое отражение в табл. 2.

Представленные здесь установки позволяют определять не только изотопный состав, но и общее содержание всех указанных элементов в биологических объектах [1, 4, 5].

Наряду с анализом каждого из элементов в отдельности возможен и осуществляется одновременный анализ двух элементов (азота и углерода) из одного образца в одном аналитическом цикле [7]. При этом точность совместного определения не ниже, чем раздельного. Сделаны попытки определения одновременно трех элементов (^{15}N — ^{13}C — ^2H) [2].

Описанная аппаратура успешно используется в Центральном институте агрохимического обслуживания сельского хозяйства (ЦИНАО) [9, 10].

ЛИТЕРАТУРА

1. Бичаев В. Б., Лазеева Г. С., Петров А. А., Хомяков Р. В. Спектрально-изотопное определение изотопного состава и общего содержания кислорода в биологических объектах. — Вест. ЛГУ, сер. физ. и хим., 1977, № 16, с. 68—74. — 2. Квитко К. В., Лазеева Г. С., Петров А. А., Хомяков Р. В., Чемерилова В. Н., Чупаев А. С. Использование спектрально-изотопного метода для определения изотопного состава и общего количества азота, углерода, кислорода и водорода в водорослях и других биологических объектах. — В сб.: Развитие и значение водорослей в почвах Нечерноземной зоны. — Пермь, 1977, с. 153—155. — 3. Квитко К. В., Лазеева Г. С., Хомяков Р. В., Чупаев А. С., Якубов К. Ф. Применение спектрально-изотопного метода для изучения изменчивости показателей фотосинтеза и обмена органогенных элементов у зеленых водорослей. Характеристики роста и фотосинтеза мутантов по включению ^{13}C и ^{15}N в биомассу. — Вест. ЛГУ, сер. биол., 1977, № 21, с. 132 — 4. Лазеева Г. С., Петров А. А. Эмиссионный спектральный анализ изотопного состава азота. — В сб.: Методы применения изотопа азота ^{15}N в агрохимии. М., «Колос», 1977, с. 89—118. — 5. Лазеева Г. С., Петров А. А., Хомяков Р. В. Спектрально-изотопный метод определения углерода в биологических объектах. — ЖПС, 1976, т. 25, вып. 4, с. 571. — 6. Лазеева Г. С., Петров А. А., Хомяков Р. В. Универсальный метод препарирования пробы для спектрально-изотопного определения азота в натуральных биологических образцах. — Вест. ЛГУ, сер. физ. и хим., 1976, № 22, с. 153—155. — 7. Лазеева Г. С., Петров А. А., Хомяков Р. В. Совместное определение изотопного состава и общего количества азота и углерода в биологических объектах спектрально-изотопным методом. — Журн. прикл. спектроскопии, 1977, т. 26, с. 1112—1115. — 8. Лазеева Г. С., Петров А. А., Чеснокова Е. Ф., Ярмухамедова Ф. М. Спектроскопическое определение изотопного состава азота при концентрациях ниже естественных содержаний. — Журн. прикл. спектроскопии, 1977, т. 26, вып. 5, с. 923—

- 926.—9. Логинов Ю. М., Фролов Ю. В., Кузнецова О. Б., Дудич Г. К. Применение спектрально-изотопной аппаратуры для анализа ^{15}N в агрохимических исследованиях. — Докл. совет. участников VIII Междунар. конгр. по минеральным удобрениям. Ч. II. «Наука», 1976, с. 194—202. — 10. Логинов Ю. М., Флоринский М. А., Фролов Ю. В., Кузнецова О. Б., Павлихина А. В., Буянов В. А. К вопросу о применении изотопного метода при изучении эффективности азотных удобрений. — Химия в сельск. хоз-ве, 1977, № 1, с. 63—66. — 11. Петров А. А. Спектрально-изотопный метод исследования материалов. — Изд-во ЛГУ, 1974. — 12. Применение стабильного изотопа ^{15}N в исследованиях по земледелию. М., «Колос», 1973. — 13. Edwards A. P., Hauck R. D. — Soil. Sci. Soc. Amer. Proc., 1974, vol. 38, p. 765. — 14. Fiedler R., Proksch G. — Anal. Chim. Acta, 1975, vol. 78, p. 1. — 15. Hübn-ner G. — Isotopenpraxis, 1966, Bd 2, N 3, S. 116. — 16. Meier G., Müller G. — Isotopenpraxis, 1965, J. 1, H. 2, S. 53. — 17. Middelboe V. — Soil organic matter studies, vol. II, IAEA, Vienna, 1977, p. 205—211. — 18. Isotopes and radiation in soil-plant relationships including forestry. (Proc. of Sympos. Vienna, 1971), IAEA, Vienna, 1973. — 19. Soil organic matter studies (Proc. of Sympos. Braungschweig, 1976), IAEA, Vienna, 1977. — 20. Proksch G. — Isotopes and radiation in soil-plant relationships including forestry, IAEA, Vienna, 1973, p. 217. — 21. Schüttele H. R., Gross D., Liebisch H. W., Stephan U. — Isotopenpraxis, 1969, Bd 5, S. 319. — 22. Starr J. L., Broadbent F. E., Stout P. R. — Soil. Sci. Soc. Amer. Proc., 1974, vol. 38, p. 226. — 23. Tsuji O., Masugi M., Kosai J. — Anal. Biochem., 1975, vol. 65, N 1, p. 19—25. — 24. Zur Tracertechnik mit dem stabilen stickstoffisotop ^{15}N , Gesamtherstellung: TASTOMAT Eggersdorf GH 245/19/74 — 1681, DDR.

Статья поступила 20 апреля 1979 г.

SUMMARY

The appraisal of spectrophotometric equipment developed for determining the isotopic composition of nitrogen, carbon and hydrogen in agrochemical and biochemical investigations is presented in the paper. Three suggested versions of spectral installations differing in the degree of automation in obtaining and treating the results of the analysis are described.