

На правах рукописи

РОМАНОВА Тамара Евгеньевна

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ВЭЖХ-ИСП-АЭС
ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ФОРМ СВЯЗЫВАНИЯ
КАДМИЯ И РТУТИ В РАСТЕНИЯХ**

02.00.02 – аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Новосибирск – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте неорганической химии им. А.В. Николаева Сибирского отделения Российской академии наук

Научный руководитель

доктор химических наук, старший научный сотрудник
Шуваева Ольга Васильевна

Официальные оппоненты:

доктор химических наук,
профессор кафедры физической и аналитической химии
Короткова Елена Ивановна

ФГАОУ ВПО «Национальный исследовательский
Томский политехнический университет», г. Томск;

доктор химических наук, старший научный сотрудник
Лосев Владимир Николаевич

ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», г. Красноярск

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ордена Ленина и Ордена Октябрьской Революции Институт геохимии и аналитической химии им. В.И. Вернадского РАН, г. Москва

Защита состоится «26» октября 2016г. в 10.00
на заседании диссертационного совета Д 003.051.01
на базе ИНХ СО РАН
по адресу: просп. Ак. Лаврентьева, 3, Новосибирск, 630090

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНХ СО РАН
и на сайте организации по адресу:
<http://www.niic.nsc.ru/institute/dissertatsionnyj-sovet/>

Автореферат разослан «2» сентября 2016г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор физико-математических наук

В.А. Надолинный

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Идентификация химических форм элементов в природных объектах, а также выявление форм их связывания позволяет изучать трансформацию и транспорт веществ в живой природе и потому является актуальной проблемой современной аналитической химии, важной для наук об окружающей среде, а также геологии, клинической и медицинской химии. Разработка подходов к определению форм связывания элементов актуальна для оценки рисков проникновения загрязняющих веществ в окружающую среду, исследования их накопления и транспорта в живых организмах.

Следует отметить, что особое место в исследованиях подобного типа занимают растения, способные аккумулировать загрязняющие вещества, которые широко применяются в мировой практике для очистки водоемов и почв. Для понимания сущности явления гипераккумуляции с целью повышения эффективности применения этого процесса на практике необходима информация о составе соединений, в том числе ассоциатов микроэлементов, образующихся в живом организме и снижающих их токсический эффект.

Для решения задач, связанных с идентификацией химических форм и форм связывания элементов, применяют комбинированные методы анализа, которые объединяют ряд последовательных процедур, включающих извлечение компонентов из образца, концентрирование, получение производных, разделение, и, в конечном итоге, детектирование и количественное определение.

Особую проблему представляют подвижные формы микроэлементов, при определении которых предпочтение следует отдавать гибридным методам анализа, объединяющим разделение и детектирование в рамках одной процедуры. Для разделения аналитов применяют методы газовой хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, капиллярного электрофореза с последующим элемент-селективным (методами атомно-абсорбционной, атомно-эмиссионной и масс-спектрометрии), а также молекулярно-специфичным детектированием.

Для анализа объектов, которые не обладают достаточной летучестью и термической устойчивостью, наиболее предпочтительным методом разделения является высокоэффективная жидкостная хроматография (**ВЭЖХ**). Разработка подходов к идентификации форм связывания элементов в растениях с применением метода ВЭЖХ для разделения компонентов пробы с последующим элемент-селективным детектированием представляется наиболее актуальной задачей современной аналитической химии, решение которой связано с развитием и совершенствованием гибридных методов анализа.

Степень разработанности темы исследования. Для изучения процессов трансформации и транспорта микроэлементов в биологических объектах чаще всего используют данные об общем содержании элемента в исследуемых объектах. Однако, подвижность, токсичность, а также физико-

химические свойства элемента и, как следствие, роль в природной системе, определяется его химической формой. Подобные исследования наиболее активно ведутся в рамках изучения процесса биоаккумуляции элементов растениями, что особенно важно для их последующего применения в фиторемедиации загрязненных природных сред. В подобных системах, как правило, речь идет не о конкретных химических формах элементов, а о классах соединений, определение состава которых затруднительно из-за сложности образующихся ассоциатов.

Число работ, посвященных изучению форм связывания элементов в растениях, весьма ограничено, а данные различных исследований зачастую носят противоречивый характер. Одним из наиболее информативных методов детектирования при идентификации форм связывания элементов в растительных и биологических образцах является масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением, однако отнесение масс-спектров представляется достаточно проблематичным из-за отсутствия необходимой информации для сравнения. По этой причине авторы нередко ограничивают рамки исследований выявлением форм, которые доступны в индивидуальной форме.

Развитие комплексного подхода для выявления и идентификации форм элементов в биологических объектах, в том числе в растениях, является актуальной задачей, для решения которой представляются перспективными гибридные и комбинированные методы анализа, позволяющие выявлять и исследовать состав соединений, образующихся в растениях. При этом наибольший интерес представляют элементы, соединения которых характеризуются наибольшей токсичностью, например, такие как кадмий и ртуть.

Целью данной работы является развитие подходов к идентификации форм связывания кадмия и ртути в растениях с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (**ВЭЖХ-ИСП-АЭС**).

В соответствии с поставленной целью решались следующие **задачи**:

- разработка способов извлечения соединений кадмия и ртути из растений с применением ступенчатой экстракции;
- идентификация форм связывания кадмия и ртути в растениях методом ВЭЖХ-ИСП-АЭС;
- изучение распределения кадмия и ртути в органах и тканях растений;
- разработка интерфейса для состыковки хроматографа и спектрометра с применением пневматического распылителя для идентификации форм связывания кадмия и генератора холодного пара для идентификации форм связывания ртути;
- оптимизация параметров разделения и детектирования форм связывания кадмия и ртути методом ВЭЖХ-ИСП-АЭС в режимах *online* и *offline*;

▪ определение вещественного состава выделенных соединений кадмия и ртути (содержания сульфгидрильных групп и аминокислотного состава).

Научная новизна работы. Предложена методология идентификации форм связывания элементов на примере кадмия и ртути в растениях с применением метода ВЭЖХ-ИСП-АЭС. Показана возможность применения ступенчатой экстракции для разделения форм, связанных с различными классами соединений в тканях растений. Разработаны два типа интерфейса для реализации гибридного метода анализа, сочетающего ВЭЖХ разделение с элемент-селективным детектированием: с вводом элюата в ИСП-АЭС через пневматический распылитель и с применением реактора для генерации холодного пара ртути. Оптимизированы параметры работы гибридной системы в двух режимах: *online*, позволяющем оценить распределение элемента между разными формами связывания, и *offline*, для последующего изучения вещественного состава соответствующих фракций, содержащих изучаемый элемент.

Практическая значимость работы. Применение многоэлементного элемент-селективного детектора в сочетании с хроматографическим разделением в перспективе позволяет проводить идентификацию форм связывания широкого спектра элементов в объектах различной природы. Реализовано два различных интерфейса, а именно: с вводом элюата в плазму горелки спектрометра через пневматический распылитель и через генератор, в котором происходит восстановление соединений гидридообразующих элементов с последующим вводом в индуктивно связанную плазму в виде газовой фазы.

Информация о формах связывания кадмия и ртути в растениях, полученная в данной работе, может быть применена для изучения феномена биоаккумуляции элементов и планирования экспериментов по фиторемедиации водоемов.

Полученная с применением метода ВЭЖХ-ИСП-АЭС информация о формах связывания ртути в водном гиацинте в реальных условиях техногенеза может быть использована для реализации технологии фиторемедиации загрязненных природных сред.

Методология и методы диссертационного исследования. Методология исследования включает в себя процедуру извлечения соединений кадмия и ртути с применением ступенчатой экстракции; идентификацию форм связывания элементов с применением метода ВЭЖХ-ИСП-АЭС в режимах *online* и *offline*; выделение фракций, содержащих аналиты, с последующим определением содержания сульфгидрильных групп методом инверсионной вольтамперометрии и аминокислотного состава методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием (**ВЭЖХ-УФ**).

Для определения общего содержания кадмия и ртути использовали метод атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (**ИСП-АЭС**) после микроволновой минерализации проб. Изучение распреде-

ления исследуемых элементов в тканях растений проводили гистохимическим методом и методом сканирующей электронной микроскопии высокого разрешения с энергодисперсионным анализом химического состава (СЭМ-ЭДС).

Контроль правильности результатов анализа проводили способом «введено-найдено» и сравнением результатов, полученных в режимах *online* и *offline*.

Положения, выносимые на защиту:

– результаты по выявлению зон локализации кадмия и ртути в растениях с применением гистохимического метода и СЭМ-ЭДС;

– развитие подхода к идентификации форм связывания кадмия и ртути в растениях, в основе которого лежит экстракционное извлечение аналитов с последующим применением метода ВЭЖХ-ИСП-АЭС в режимах *online* и *offline*;

– разработка интерфейса для состыковки ВЭЖХ и ИСП-АЭС и оптимизация условий реализации гибридных методов ВЭЖХ-ИСП-АЭС и ВЭЖХ-ИСП-АЭС с детектированием после восстановления соединений ртути методом холодного пара (ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС);

– результаты идентификации форм связывания кадмия и ртути в растениях с применением комплекса методов: ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ИСП-АЭС, ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС, СЭМ-ЭДС и инверсионной вольтамперометрии;

– данные по изучению форм связывания ртути в растениях, подвергавшихся экстремальному воздействию элемента.

Личный вклад автора. В диссертационную работу вошли результаты экспериментальных исследований, выполненных лично автором. Анализ литературных данных по теме диссертации, проведение экспериментов и обработка результатов выполнены лично автором. Обсуждение полученных результатов и подготовка материалов для публикаций проводились совместно с научным руководителем и соавторами.

Апробация работы. Материалы работы докладывались и обсуждались на V Международной конференции «Ecological chemistry» (Кишинев, Молдавия, 2012), VI, VII, VIII Всероссийской конференции молодых ученых, студентов и аспирантов с международным участием «Менделеев» (Санкт-Петербург, 2012, 2013, 2014), XIX, XX Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2012, диплом I степени за устный доклад; 2013, диплом II степени за устный доклад), IX Научной конференции «Аналитика Сибири и Дальнего Востока» (Красноярск, 2012), XVII, XVIII Международной экологической студенческой конференции «Экология России и сопредельных территорий» (Новосибирск, 2012, 2013), Конкурсе-конференции молодых ученых, посвященной 110-летию со дня рождения академика А.В.Николаева (Новосибирск, 2012, диплом III степени), Конкурсе-конференции молодых ученых, посвященной

100-летию со дня рождения академика Л.М. Гиндина (Новосибирск, 2013, диплом III степени), Международной школе-семинаре для молодых исследователей «Биогеохимия элементов и соединений в природных средах» (Тюмень, 2014, диплом I степени за устный доклад), 38th International symposium on environmental analytical chemistry (Lausanne, Switzerland, 2014), Научно-практическом семинаре для стипендиатов Фонда имени В.И. Вернадского «Управление природопользованием и экологическая безопасность регионов» (Москва, 2015), Молодежной научной школе-конференции «Актуальные проблемы органической химии» (Шерегеш, 2015), Всероссийской конференции с международным участием «Теория и практика хроматографии» (Самара, 2015), 18th European conference on analytical chemistry «Euroanalysis» (Bordeaux, France, 2015, award for the best oral presentation), 9th International conference «Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Applications» (Kalamata, Greece, 2015), II Международном симпозиуме «Ртуть в биосфере: эколого-геохимические аспекты» (Новосибирск, 2015), Конференции молодых ученых, посвященной памяти чл.-к. АН СССР, профессора Г.Б. Бокия (Новосибирск, 2015, диплом II степени).

Публикации. Основные результаты работы опубликованы в 5 зарубежных рецензируемых журналах, входящих в перечень индексируемых в международной информационно-аналитической системе научного цитирования Web of Science. В материалах российских и зарубежных конференций опубликованы тезисы 20 докладов.

Степень достоверности результатов исследований. Достоверность представленных результатов основывается на высоком методическом уровне проведения работы, согласованности экспериментальных данных с данными других исследований. О признании информативности и значимости основных результатов работы мировым научным сообществом также говорит их опубликование в рецензируемых журналах различного уровня и высокая оценка на российских и международных конференциях.

Соответствие специальности 02.00.02 – аналитическая химия. Диссертационная работа соответствует п. 2. «Методы химического анализа (химические, физико-химические, атомная и молекулярная спектроскопия, хроматография, рентгеновская спектроскопия, масс-спектрометрия, ядерно-физические методы и др.)» и п. 12. «Анализ объектов окружающей среды» паспорта специальности 02.00.02 – аналитическая химия.

Структура и объем работы. Работа изложена на 127 страницах, иллюстрирована 38 рисунками и содержит 24 таблицы, список литературы содержит 224 работы отечественных и зарубежных авторов. Диссертация состоит из введения, 4-х глав, выводов, заключения, списка цитируемой литературы. Глава 1 посвящена литературному обзору по идентификации форм связывания элементов в растениях. Экспериментальная часть диссертации включает: главу 2, посвященную использованным в работе методикам анализа; главу 3

о разработке подхода к идентификации форм связывания кадмия и главу 4 о разработке подхода к идентификации форм связывания ртути в растениях.

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт неорганической химии им. А.В. Николаева Сибирского отделения Российской академии наук (ИНХ СО РАН) в соответствии с Программой фундаментальных научных исследований ИНХ СО РАН по приоритетному направлению 45.1.4 «Разработка комплекса информативных методов химического анализа высокочистых веществ, функциональных материалов и природных объектов для аналитического контроля технологических и экологических процессов», номер гос. регистрации: 0300-2014-0015. Диссертационная работа была поддержана проектом РФФИ 14-03-31971 «Разработка методологии определения форм связывания элементов в биологических объектах с применением гибридных методов анализа», премией им. академика А.В. Николаева за успехи в научной работе в 2014г. (ИНХ СО РАН), стипендиями Неправительственного экологического фонда им. В.И. Вернадского в 2013 и 2015 гг.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Во *введении* раскрыта актуальность темы, определены цели и задачи исследований, сформулирована научная новизна, практическая значимость работы и положения, выносимые на защиту.

Первая глава посвящена обзору публикаций по методам и подходам к идентификации форм связывания микроэлементов в растениях, а также в других объектах окружающей среды. Критически рассмотрены и обобщены литературные данные по методам отбора проб, извлечению форм кадмия и ртути из растений и подготовки образцов к анализу.

В литературном обзоре сопоставлены возможности и ограничения методов ВЭЖХ, капиллярного электрофореза, газовой хроматографии при применении в качестве методов разделения в совокупности с элемент- и молекулярно-специфичными детекторами в гибридных методах анализа для изучения форм связывания элементов в растениях. Отмечено, что различные варианты ВЭЖХ позволяют разделять аналиты с учетом их специфических свойств: например, эксклюзионная хроматография является размерноselectивной и чаще всего применяется для определения молекулярной массы высокомолекулярных соединений. При этом наиболее информативным методом идентификации форм элементов в растительных образцах является масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением, однако отнесение масс-спектров представляется достаточно проблематичным из-за отсутствия соответствующих стандартных образцов, поэтому авторы нередко ограничивают рамки исследований соединениями, которые доступны в индивидуальной форме. На данный момент число работ, посвященных изучению форм связывания элементов в растениях, весьма ограничено, а данные различных

исследований зачастую носят противоречивый характер. По этой причине существует необходимость в развитии методологии идентификации форм связывания элементов в растениях с применением оптимального сочетания различных методов исследования, в том числе гибридных и комбинированных.

На основе анализа литературных данных делается вывод об актуальности данной тематики и формулируются основные направления исследования: наиболее перспективным для решения данной задачи представляется комплексный подход, в основе которого применение гибридных и комбинированных методов анализа, при этом гибридные методы позволяют выявлять зоны локализации элементов, а комбинированные – исследовать вещественный состав соединений, образующихся в объектах живой природы.

Во *второй главе* приведен перечень применяемого в работе оборудования и реактивов. Для выполнения работы использовалось следующее основное оборудование: хроматограф «Милихром А-02», колонка Ø 2×75 мм с сорбентом ProntoSIL 120-5-C18AQ («Эконова», Россия), атомно-эмиссионный спектрометр «iCap 6500 Duo» («Thermo Scientific», США), микроволновая система пробоподготовки «Mars 5» («СЕМ», США), оптический микроскоп «Axio Scope 40», оборудованный камерой «Axio Cam MRc5», («Carl Zeiss», Германия), сканирующий электронный микроскоп «S-3400N SEM» («Hitachi», Япония), инверсионно-вольтамперометрический анализатор «ИВА-5», (НПО «ИВА», Россия), CHNS анализатор «Vario Micro Cube» («Elementar Analysensysteme», Германия), иономер «Анион-4100» («Инфраспек-Аналит», Россия).

В данной главе также охарактеризован объект исследования – водяной гиацинт – плавающее растение, обладающее высокой способностью к аккумуляции элементов, которое широко применяется на практике для очистки водоемов. Детально описана последовательность проведения лабораторных экспериментов с растениями и процедура подготовки проб к дальнейшим исследованиям. Представлены методики определения содержаний ртути и кадмия в водной фазе и в растениях методом ИСП-АЭС после микроволновой минерализации проб, методика определения аминокислотного состава экстрактов растений методом ВЭЖХ после гидролиза и предколоночной дериватизации [1] и методика определения сульфгидрильных групп [2].

Третья глава посвящена разработке подхода к идентификации форм связывания кадмия в растениях с применением метода ВЭЖХ-ИСП-АЭС и обсуждению результатов исследований. Последовательность стадий проведения эксперимента представлена на рис. 1.

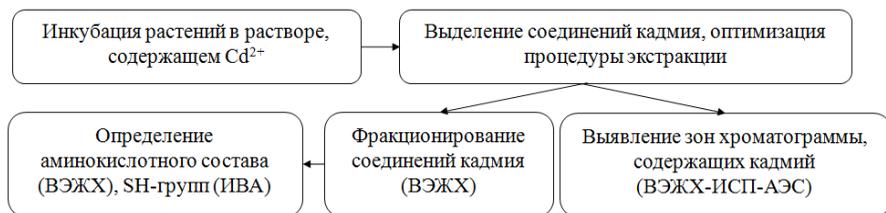


Рис. 1. Общая схема эксперимента по идентификации форм связывания кадмия в растениях (ИВА – инверсионная вольтамперометрия)

Распределение кадмия в органах растений. Для решения задачи идентификации форм связывания микроэлементов после завершения лабораторного эксперимента в растениях, подвергавшихся воздействию кадмия, определяли общее содержание элемента и оценивали его распределение между частями растения (корнями, стеблями и листьями). Оказалось, что в течение 7 суток одно растение аккумулирует 7,4-7,8 мг кадмия, причем в корне растения накапливается около 83%, в стеблях и листьях – 13% и 4% соответственно. Так как большая часть элемента концентрируется в корне растения, то при идентификации форм его связывания объектом исследования являлся именно корень. Для выявления зон преимущественного концентрирования кадмия в самом корне, структура которого включает ризодерму, первичную кору и центральный цилиндр (стелу), применяли методику гистохимического анализа, в основе которой образование оранжево-красного комплекса кадмия с дитизоном [3]. Присутствие элемента в тканях растений устанавливали, сравнивая окраску изучаемого образца с контрольным под микроскопом. Установлено, что в корне водного гиацинта кадмий локализуется преимущественно в ризодерме и первичной коре.

Экстракция соединений кадмия из растений. Для извлечения форм, содержащих кадмий, из растения применяли ступенчатую экстракцию, в процессе которой сначала отделяли водорастворимые соединения, а затем из остатка – кадмий, связанный с компонентами клеточной стенки (пектинами).

В качестве экстрагентов для извлечения водорастворимых форм использовали буферные растворы [4] и деионизованную воду, причем максимальная эффективность извлечения (9-10%) была достигнута при использовании деионизованной воды. Полученный экстракт в дальнейшем подвергали хроматографическому анализу с элемент-селективным детектированием с целью идентификации форм связывания кадмия.

Известно, что клеточная стенка растений содержит большое количество отрицательно заряженных групп, что обеспечивает эффективное связывание ионов металлов. В зависимости от типа ткани и вида растения состав клеточной стенки может различаться: в среднем она содержит 25-30% целлюлозы, 15-25% гемицеллюлозы, 35% пектина и 5-10% гликопротеинов [5].

Для извлечения кадмия, связанного с пектинами, после отделения водорастворимых форм, использовали раствор 0,05 М ЭДТА в 0,05 М ацетате аммония [6], при этом максимальная степень извлечения была достигнута при экстракции в течение 4х часов. Оказалось, что в корне растения с пектинами связано $55\pm 7\%$ от общего количества кадмия.

Оптимизация условий идентификации компонентов экстракта методом ВЭЖХ-ИСП-АЭС. Для идентификации водорастворимых форм кадмия, компоненты водного экстракта разделяли на хроматографической колонке с последующим элемент-селективным детектированием. Проведение анализа в режиме *online* позволяет получить информацию об основных зонах локализации элемента на хроматограмме. Для реализации данного подхода были оптимизированы параметры работы системы, сочетающей ВЭЖХ и ИСП-АЭС (рис. 2), обеспечивающие ее стабильное функционирование.

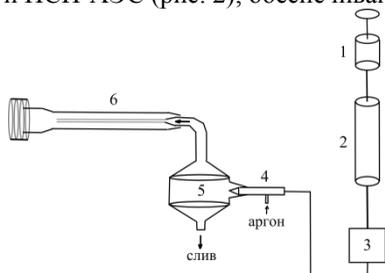


Рис. 2. Принципиальная схема системы хроматографа и ИСП-АЭС спектрометра для идентификации форм связывания кадмия:

- 1 – шприцевой насос хроматографа,
- 2 – разделительная колонка, 3 – спектрофотометрический детектор хроматографа,
- 4 – распылитель, 5 – распылительная камера циклонного типа,
- 6 – горелка спектрометра

При выборе условий разделения водорастворимых форм кадмия на первом этапе исследования ориентировались на литературные данные [4], при этом в качестве элюента использовали раствор ацетата аммония, содержащий тетрабутиламмония гидроксид (ТБАГ) – ион-парный реагент, присутствие которого необходимо для разделения отрицательно заряженных комплексов кадмия с пептидами.

Однако, несмотря на то, что применение ион-парной обращено-фазовой хроматографии в градиентном режиме элюирования позволило добиться разделения компонентов экстракта, присутствие органических веществ (ацетонитрила и ТБАГ на уровне $\approx 10\%$ и $0,04\%$ соответственно) в подвижной фазе приводило к дестабилизации плазмы вплоть до ее гашения. По этой причине условия разделения были оптимизированы, в результате чего из состава подвижной фазы был исключен ион-парный реагент, а содержание ацетонитрила – значительно снижено (табл. 1).

Для обеспечения стабильной работы гибридной системы, сочетающей хроматографическое разделение с ИСП-АЭС детектированием, были также оптимизированы условия подачи и транспортировки пробы в плазму, которые определяют эффективность ввода и характеристики аэрозоля пробы в зависимости от режима функционирования перистальтического насоса и скорости распылительного потока аргона.

**Оптимальные условия разделения компонентов водного экстракта
из корней гиацинта**

Колонка	Ø 2×75 мм ProntoSIL 120-5-C18AQ
Скорость потока элюента	200 мкл/мин
Длина волны детектирования	230 нм, 254 нм
Состав элюента А	Деионизованная вода
Состав элюента В	Ацетонитрил
Градиент элюента В	0-1 мин 0-20%B, 10 мин 20%B

Закономерности формирования аналитического сигнала определяемого элемента были изучены на модельных растворах молибдата натрия. Такой выбор модельного объекта обусловлен возможностью проведения хроматографического анализа с применением двойного детектирования молибдато-иона, а именно: УФ и ИСП-АЭС, что позволило оптимизировать условия разделения для гибридной системы применительно к кадмию.

Выявление форм кадмия в водных экстрактах методом ВЭЖХ-ИСП-АЭС. Проведение анализа в режиме *online* позволяет одновременно получать информацию от двух детекторов – УФ-детектора хроматографа и элемент-селективного детектора ИСП-АЭС. На рис. 3а представлены результаты ВЭЖХ-ИСП-АЭС анализа водного экстракта из корня гиацинта. Видно, что на хроматограмме в координатах «*время удерживания – УФ-положение*» регистрируются два пика, характерные как для растений, подвергавшихся воздействию кадмия, так и для контрольных образцов. На той же хроматограмме в координатах «*время удерживания – интенсивность ИСП-АЭС-сигнала кадмия ($\lambda = 228$ нм)*» видно, что первый пик (1,0 мин) соответствует неудерживаемым компонентам, которые не содержат кадмий, в отличие от второго пика (3,8 мин), характеризующегося присутствием изучаемого элемента.

После выявления зон локализации элемента на хроматограмме проводили отбор фракций, содержащих кадмий, в режиме *offline*, в которых определяли содержания кадмия, сульфгидрильных групп и аминокислот. На рис. 3б представлена хроматограмма экстракта корня гиацинта, подвергавшегося воздействию поллютанта, и результаты количественной оценки содержания кадмия в отобранных фракциях. Установлено, что для экстрактов корня растения соблюдается баланс кадмия по суммарному содержанию во фракциях и общему количеству, введенному в хроматографическую в колонку, что указывает на преимущественное концентрирование аналита в зоне пика со временем удерживания 3,8 мин.

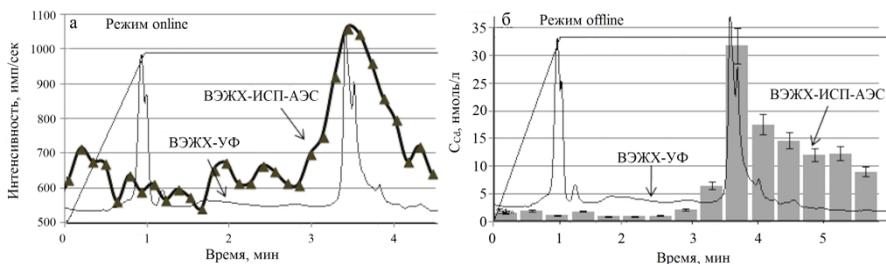


Рис. 3. Результаты ВЭЖХ-ИСП-АЭС идентификации кадмия в экстракте корня гиацинта в режиме *online* (а) и *offline* (б)

Для идентификации тиольных (-SH) групп в экстрактах гиацинта и в выделенных фракциях, содержащих кадмий, применяли метод инверсионной вольтамперометрии, а суммарное содержание серы в тех же фракциях определяли методом ИСП-АЭС ($\lambda = 182$ нм). Сопоставление данных по содержанию тиолов и суммарному содержанию серы в экстрактах показало, что доля серы, присутствующей в экстракте в тиольной форме, близка к 100% как в корнях, так и в стеблях растения.

Помимо данных об общем содержании тиольных групп в экстрактах, интерес представляла также информация о содержании тиольных групп непосредственно во фракциях, содержащих кадмий. Показано, что распределение SH-групп по фракциям совпадает с таковым для кадмия, что указывает на его вероятное связывание тиольными группами (рис. 4), причем количество серы, введенное в колонку, удовлетворительно согласуется с суммой ее содержаний в выделенных фракциях.

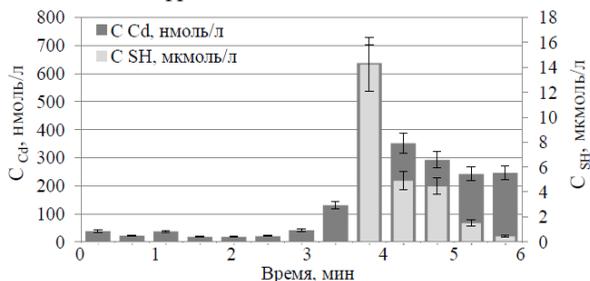


Рис. 4. Содержание кадмия и тиольных групп во фракциях, выделенных из водного экстракта

Кроме тиольных групп во всех отобранных фракциях также определяли аминокислотный состав. Оказалось, что во фракциях, содержащих кадмий, присутствует цистеин, причем молярное отношение SH:Cd в этих фракциях составляет 40:1. Важно отметить, что именно цистеин, согласно литературным данным [4], представляет наибольший интерес с точки зрения связывания этого элемента. При этом во фракциях, не содержащих кадмия, аминокислоты обнаружены не были, что указывает на связь образования пептидных соединений с его присутствием. На основании полученных данных можно предположить, что ионы кадмия

связываются с крупными молекулами, содержащими большое количество сульфгидрильных групп, т.е. белками металлотioneинами [7].

Четвертая глава посвящена разработке подхода к идентификации форм связывания ртути в растениях с применением метода ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС. С целью снижения пределов обнаружения и уменьшения влияния органических компонентов подвижной фазы на стабильность плазменного разряда в системе ВЭЖХ-ИСП-АЭС вместо стандартного пневматического распылителя использовали реактор для генерации паров ртути. Таким образом, применение ВЭЖХ с ИСП-АЭС детектированием холодного пара ртути (ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС) в режиме *online* позволило получить предварительную информацию о зонах локализации и формах связывания ртути на хроматограмме. При проведении анализа в режиме *offline*, при котором разделение и детектирование форм ртути разнесены во времени, отбор фракций, содержащих ртуть, в процессе хроматографического разделения компонентов экстракта позволил изучить их вещественный состав.

Распределение ртути в органах растений. Для количественной оценки перераспределения ртути между органами растений использовали транслокационный фактор (TF – translocation factor). $TF = C_s/C_r$, где C_s – концентрация элемента в побегах растения (мг/кг), C_r – концентрация элемента в корне растения (мг/кг). Чем больше TF, тем интенсивнее элемент мигрирует из корней растения к стеблям и листьям. Накопление ртути во многом зависит от ее перераспределения между корнями, стеблями и листьями ввиду ограниченной сорбционной емкости корней, находящихся в непосредственном контакте с раствором, содержащим ртуть. В результате проведения лабораторного эксперимента было оценено значение $TF(Hg) = 0,018 \pm 0,003$, что указывает на более медленный транспорт ртути в стебли и листья растения и высокую степень ее концентрирования в корне растения по сравнению с кадмием ($TF(Cd) = 0,15 \pm 0,02$).

Для визуализации пространственного распределения ртути в тканях растения применяли сканирующую электронную микроскопию в сочетании с энергодисперсионным определением химического состава. Результаты исследования срезов корня водяного гиацинта методом СЭМ-ЭДС показали, что основная часть ртути концентрируется в ризодерме, а также непосредственно на поверхности корня (рис. 5). При этом наблюдалось как присутствие отдельных микрочастиц ртути (рис. 5а), так и образование пленки, покрывающей поверхность корня (рис. 5б).

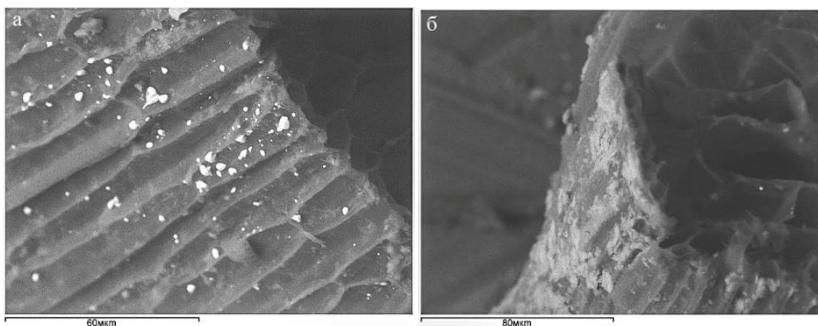


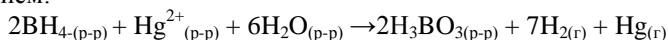
Рис. 5. Локализация ртути на поверхности корня водного гиацинта
(светлые зоны содержат ртуть)

Экстракция соединений ртути из растений. В процессе извлечения форм ртути из растения не исключена возможность превращения одних форм в другие, поэтому для предотвращения подобного эффекта, как правило, используют мягкие экстрагенты (вода, буферные растворы с нейтральным или слабокислым рН) [8]. С помощью таких экстрагентов можно извлечь не более 35% процентов ртути, а в случае высоких концентраций – не более 5% от суммарного содержания в растении. Кроме того, экстракция водой и буферными растворами не позволяет извлечь ртуть, связанную с компонентами клеточной стенки [9].

Нами для изучения форм связывания ртути в растениях была предложена процедура ступенчатой экстракции. При этом извлечение водорастворимых соединений ртути проводили деионизованной водой. Для оптимизации процедуры экстракции изучали влияние объема экстрагента на степень извлечения ртути для растений с различным суммарным содержанием элемента (от 200 мкг/кг до 1000 мг/кг сырой массы). Оказалось, что водный экстракт из корней гиацинта содержит 8,6-13,9% от общего количества ртути. На второй стадии ступенчатой экстракции для извлечения ртути, связанной с карбоксильными группами, использовали раствор $1,0 \cdot 10^{-3}$ М соляной кислоты. При увеличении концентрации кислоты до 2 М на третьей стадии экстракции происходило отделение ртути, прочно связанной с компонентами клеточной стенки. Показано, что при соотношении $m_{\text{экстрагента}}/m_{\text{пробы}} = 9$ (на каждой из стадий) происходит суммарное 100% извлечение элемента.

Оптимизация условий идентификации компонентов экстракта методом ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС. При идентификации форм связывания ртути в экстракте корней гиацинта пневматический распылитель спектрометра был заменен на приставку для генерации паров ртути.

Образование атомарной ртути в реакторе происходит в соответствии с уравнением:



Следует отметить, что подобный прием позволяет снизить предел обнаружения ртути за счет повышения эффективности ввода аналита в плазму в газообразном состоянии по сравнению вводом в виде водного аэрозоля. Кроме того, в процессе генерации холодного пара ртути происходит ее отделение от матричных компонентов самой пробы и элюата на выходе из хроматографической колонки, что снимает проблему дестабилизации плазмы, обусловленную присутствием органических веществ.

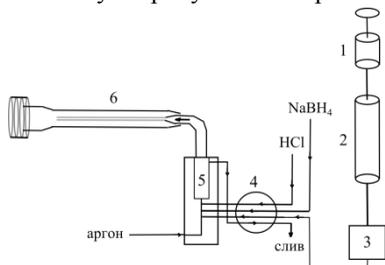


Рис. 6. Принципиальная схема стыковки хроматографа и спектрометра для идентификации форм связывания ртути:

- 1 – шприцевой насос хроматографа,
- 2 – разделительная колонка, 3 – спектрофотометрический детектор хроматографа,
- 4 – перистальтический насос,
- 5 – генератор паров ртути,
- 6 – горелка спектрометра

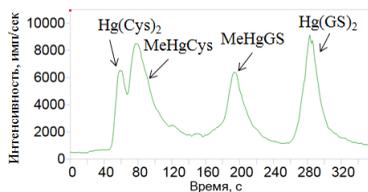


Рис. 7. Разделение форм ртути в режиме ион-парной обращено-фазовой хроматографии ($C_{\text{ТБАГ}} = 0,04\%$)

Для обеспечения оптимальных параметров ВЭЖХ разделения цистеинатов и глутатионатов ртути и метилртути, были апробированы подвижные фазы различного состава. Так, на первом этапе в качестве подвижной фазы использовали смесь воды и ацетонитрила, однако, ввиду малого различия в гидрофобностях исследуемых соединений добиться удовлетворительного разделения не удалось. Принимая во внимание наличие в структуре цистеината и глутатионата ртути карбоксильных и аминогрупп, представлялось целесообразным проводить разделение в режиме ион-парной обращено-фазовой хроматографии с использованием ТБАГ в качестве анион-парного реагента. В результате было достигнуто вполне удовлетворительное разделение глутатионатов ртути и метилртути, однако, для цистеинатов разделения до базовой линии получить не удалось. Хроматограмма модельной смеси представлена на рис.7, а условия разделения приведены в табл. 2. Более сильное удерживание глутатионата ртути и метилртути по сравнению с цистеинатом ртути и метилртути в режиме ион-парной обращено-фазовой хроматографии, вероятно, обусловлено наличием в структуре комплекса двух свободных карбоксильных групп, благодаря чему и происходит образование ионной пары с катионом тетрабутиламмония.

Принимая во внимание литературные данные о вероятном образовании в растительных соединениях ртути с аминокислотой цистеином и трипептидом глутатионом, участвующем также в окислительно-восстановительных процессах, были синтезированы комплексы ртути и метилртути с цистеином ($\text{Hg}(\text{Cys})_2$, MeHgCys) и глутатионом (γ -глутамилцистеинилглицин) ($\text{Hg}(\text{GS})_2$, MeHgGS) с целью идентификации этих соединений в корнях гиацинта [8].

Для обеспечения оптимальных параметров ВЭЖХ разделения цистеинатов и глутатионатов ртути и метилртути, были апробированы подвижные фазы различного состава. Так, на первом этапе в качестве подвижной фазы использовали смесь воды и ацетонитрила, однако, ввиду малого различия в гидрофобностях исследуемых соединений добиться удовлетворительного разделения не удалось. Принимая во внимание наличие в структуре цистеината и глутатионата ртути карбоксильных и аминогрупп, представлялось целесообразным проводить

**Условия разделения цистеината и глутатионата ртути и метилртути
в режиме ион-парной обращенно-фазовой хроматографии**

Колонка	Ø 2×75 мм ProntoSIL 120-5-C18AQ
Скорость потока элюента	400 мкл/мин
Длина волны детектирования	250 нм
Состав элюента А	0,04% ТБАГ
Состав элюента В	0,04% ТБАГ, 50% ацетонитрил
Градиент элюента В	0-0,5 мин 0-20%B, 10 мин 20%B

Примечание: ТБАГ – тетрабутиламмония гидроксид.

Можно предположить, что эффективность восстановления ртути в процессе генерации холодного пара зависит от ее химической формы, поэтому влияние химического окружения ртути на полноту ее восстановления оценивали для всех изучаемых форм: Hg^{2+} , MeHg^+ , $\text{Hg}(\text{Cys})_2$, MeHgCys , $\text{Hg}(\text{GS})_2$, MeHgGS . Для этого каждую из форм с концентрацией 25 мг/л (в пересчете на ртуть) подвергали ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС-анализу, причем в качестве подвижной фазы использовали деионизованную воду и рассчитывали площадь пика, содержащего ртуть (табл. 3). Значимых различий в площадях пиков для разных соединений при одинаковой концентрации ртути, вводимой в колонку, не наблюдалось, что говорит об отсутствии зависимости степени восстановления от формы ртути и возможности использования данного подхода для количественной оценки содержания ртути в исследуемых образцах.

Т а б л и ц а 3

**Площади пиков различных форм ртути, регистрируемых методом
атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой
($\lambda = 189,4$ нм), $C_{\text{Hg}} = 25$ мг/л**

Форма ртути	Время выхода, сек	Площадь пика, импульсы ($\cdot 10^{-6}$), $n=5$
$\text{Hg}(\text{Cys})_2$	48±2	1,09±0,14
MeHgCys	71±3	0,98±0,13
MeHg^+	120±2	1,05±0,11
MeHgGS	212±3	1,07±0,12
$\text{Hg}(\text{GS})_2$	275±2	1,02±0,11
Hg^{2+}	350±4	1,10±0,16

Идентификация форм связывания ртути в водных экстрактах методом ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС. При изучении форм связывания ртути в водном экстракте растения, как и для кадмия, на первом этапе выявляли зоны локализации элемента методом ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС в режиме *online*. На хроматограмме экстракта из корня растения, подвергавшегося воздействию ртути, зарегистрированы два пика, содержащих ртуть (рис. 8), причем время выхода второго пика соответствует таковому для катиона Hg^{2+} , что было подтверждено методом добавок.

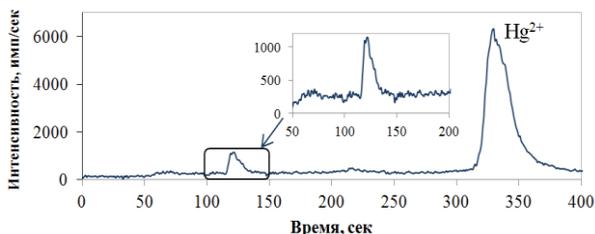


Рис. 8. ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС-хроматограмма водной фракции из корня растения, подвергнувшегося воздействию ртути

элемента в экстракте и в каждой из фракций, можно рассчитать долю ртути, относящуюся к определенному пику хроматограммы от общего количества, введенного в колонку. Полученные данные согласуются в пределах доверительного интервала.

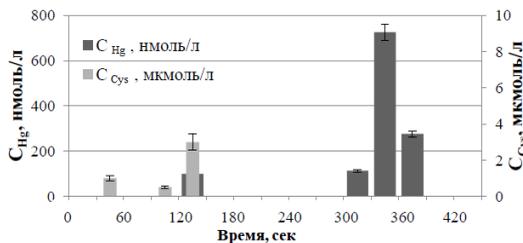


Рис. 9. Содержание ртути и цистеина во фракциях, выделенных из водного экстракта из корня

и металлотионеины. Фитохелатины являются производными глутатиона и имеют в своей структуре фрагмент (γ -Glu-Cys), который повторяется от 2 до 11 раз. Таким образом, при связывании ртути фитохелатинами соотношение Cys:Hg = 30:1 не может быть достигнуто, так как одна молекула фитохелатина содержит не более 11 остатков цистенина. Помимо фитохелатинов, в растениях также могут присутствовать белки – металлотионеины – продукты классического рибосомального биосинтеза, в состав которых могут входить помимо цистеина также и другие 19 аминокислот. Металлотионеины имеют молекулярную массу 500-4000 г/моль и могут содержать в своем составе до 30% цистеина от общего количества входящих в состав одной молекулы аминокислот [10]. Таким образом, на основании полученных данных можно предположить, что выделенные соединения относятся к металлотионеинам.

В **заключении** обобщены полученные результаты и указаны возможные области их применения.

Последовательное выделение фракций, содержащих ртуть, с последующим выявлением и количественным определением содержащихся в них компонентов, проводили в режиме *offline*. Зная концентрацию

Для пика, время выхода которого составляет 125 сек, было установлено соотношение Cys:Hg = 30:1, что является аргументом в пользу пептидного соединения ртути (рис. 9). Среди пептидных соединений, которые могут связывать ионы металлов в растениях, выделяют фитохелатины

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Предложен комплексный подход к идентификации форм связывания кадмия в растениях, включающий ступенчатую экстракцию с последующим выявлением зон локализации элемента в водном экстракте методом ВЭЖХ-ИСП-АЭС и определением содержания сульфгидрильных групп и аминокислотного состава в выявленных фракциях. Достигнута высокая эффективность разделения и чувствительность детектирования форм связывания кадмия методом ВЭЖХ-ИСП-АЭС с вводом элюата в индуктивно связанную плазму через пневматический распылитель путем оптимизации параметров разделения (состава подвижной фазы, скорости и режима элюирования) и детектирования (способа ввода пробы в индуктивно связанную плазму, скоростей потоков аргона, мощности источника).

2. Установлено, что кадмий локализуется в ризодерме и первичной коре корня по результатам гистохимического анализа. Оценена доля кадмия, связанная с компонентами клеточной стенки и доля водорастворимых форм по результатам ступенчатой экстракции. Показано, что в корне растения $55\pm 7\%$ кадмия связано с пектинами, $35\pm 5\%$ – с компонентами клеточной стенки, а $10\pm 1\%$ элемента представлено водорастворимыми формами. Установлено, что в водной фракции, содержащей подвижные формы элемента, кадмий связан преимущественно с полипептидами с высоким содержанием цистеина.

3. Разработана схема идентификации форм связывания ртути в растении, включающая их ступенчатую экстракцию, последующее исследование водной фракции методом ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС, а также определение содержания цистеина в выделенных фракциях. С применением гибридной системы, сочетающей хроматографическое разделение с фотометрическим и элемент-селективным детектированием с генерацией паров ртути установлено, что в водной фракции, характеризующей подвижные формы элемента, ртуть присутствует в основном в виде иона Hg^{2+} , а также в виде пептидных соединений, характеризующихся соотношением $\text{Cys}:\text{Hg} = 30$. Оптимизированы условия разделения форм, содержащих ртуть (состав подвижной фазы, скорость и режим элюирования), и детектирования (способ ввода пробы в индуктивно связанную плазму, скорости потоков аргона, мощность источника) методами ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС.

4. Оценена доля ртути, связанной с компонентами клеточной стенки и доля водорастворимых форм элемента с применением разработанной схемы ступенчатой экстракции. Установлено, что ртуть локализуется в ризодерме и первичной коре корня по результатам СЭМ-ЭДС анализа. Показано, что для корней водяного гиацинта, подвергавшихся воздействию $1,0 \text{ мг/л}$ ртути, водная фракция содержит $8,6\text{-}13,9\%$ ртути от общего содержания. Увеличение времени воздействия приводит к уменьшению относительного содержания ртути в этой фракции. Доля ртути, связанная

с компонентами клеточной стенки, составляет 77-93% и возрастает с увеличением времени воздействия элемента.

5. Показано, что для корней растений, подвергавшихся воздействию ртути в техногенной системе в ореоле рассеяния отходов высокосульфидного месторождения водный экстракт и фракция, извлекаемая $1,0 \cdot 10^{-3}$ М HCl, содержат 22-29 и 9-10% ртути, соответственно, что в процентном соотношении превышает величины, полученные в лабораторном эксперименте. Доля ртути, прочно связанной с компонентами клеточной стенки, составляет 63-67%. Установлено, что в водной фракции, характеризующей подвижные формы элемента, ртуть присутствует в форме Hg^{2+} и пептидного соединения, на долю пептидного соединения приходится около 30% ртути от общего количества в водном экстракте.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

1. Shuvaeva O.V., Belchenko L.A., Romanova T.E. Studies on cadmium accumulation by some selected floating macrophytes // *International Journal of Phytoremediation*. – 2013. – V. 15. – P. 979-990.
2. Romanova T.E., Shuvaeva O.V., Belchenko L.A. The mesocosm study of cadmium and copper bioaccumulation by water hyacinth in one-time and sequentially contaminated system // *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. – 2015. – V. 95. – P. 1186-1194.
3. Romanova T.E., Shuvaeva O.V. Identification of the binding forms of cadmium during accumulation by water hyacinth // *Chemical Speciation and Bioavailability*. – 2015. – V. 27. – P. 139-145.
4. Romanova T.E., Shuvaeva O.V., Belchenko L.A. Phytoextraction of trace elements by water hyacinth in contaminated area of gold mine tailing // *International Journal of Phytoremediation*. – 2016. – V. 18. – P. 190-194.
5. Romanova T.E., Shuvaeva O.V. Fractionation of mercury in water hyacinth and pondweed from contaminated area of gold mine tailing // *Water, Air & Soil Pollution*. – 2016. – V. 227. – P. 171-180.
6. Романова Т.Е. Методология исследования процесса биоаккумуляции металлов растениями // VI Всероссийская конференция студентов и аспирантов с международным участием «Менделеев»: Тез. докл. – Санкт-Петербург. – 2012. – С. 65.
7. Романова Т.Е. Изучение биоаккумуляции элементов водными растениями в условиях модельных экспериментов и реального хвостохранилища // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов»: Тез. докл. – Москва. – 2012.
8. Романова Т.Е., Курбагова М.В., Шуваева О.В., Бельченко Л.А. Применение атомно-эмиссионной спектрометрии для изучения распределения кадмия в процессе биоаккумуляции водными // IX Научная конференция «Аналитика Сибири и Дальнего Востока»: Тез. докл. – Красноярск. – 2012. – С. 282.
9. Романова Т.Е. Применение растений-биоаккумулянтов для извлечения микроэлементов из отвалов на примере Урского хвостохранилища // XVII Международная экологическая студенческая конференция «Экология России и сопредельных территорий»: Тез. докл. – Новосибирск. – 2012. – С. 36-37.

10. Романова Т.Е., Шуваева О.В., Бельченко Л.А. Изучение механизма биоаккумуляции кадмия водными растениями // Конкурс-конференция молодых ученых, посвященная 110-летию со дня рождения академика А.В. Николаева: Тез. докл. – Новосибирск. – 2012. – С. 68.
11. Романова Т.Е. Идентификация форм существования кадмия в плавающих растениях-гипераккумулянтах // VII Всероссийская конференция молодых ученых, студентов и аспирантов с международным участием «Менделеев»: Тез. докл. – Санкт-Петербург. – 2013. – С. 73.
12. Романова Т.Е. Определение форм связывания кадмия в водяном гиацинте // XX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов»: Тез. докл. – Москва. – 2013.
13. Романова Т.Е. ВЭЖХ-ИСП-АЭС методология определения форм связывания кадмия в плавающих растениях // XVIII Международная экологическая студенческая конференция «Экология России и сопредельных территорий»: Тез. докл. – Новосибирск. – 2013. – С. 15.
14. Романова Т.Е. Водорастворимые формы связывания кадмия в водяном гиацинте в процессе биоаккумуляции // Конкурс-конференция молодых ученых, посвященная 100-летию со дня рождения академика Л.М. Гиндина: Тез. докл. – Новосибирск. – 2013. – С. 25.
15. Романова Т.Е. Гибридный метод для выявления водорастворимых форм связывания кадмия в плавающих растениях // VIII Всероссийская конференция молодых ученых, студентов и аспирантов с международным участием «Менделеев»: Тез. докл. – Санкт-Петербург. – 2014. – С. 323-324.
16. Романова Т.Е., Шуваева О.В. ВЭЖХ-ИСП-АЭС гибридный метод для выявления водорастворимых форм связывания кадмия в плавающих растениях // Международная школа-семинар для молодых исследователей «Биогеохимия элементов и соединений в природных средах»: Тез. докл. – Тюмень. – 2014. – С. 146-148.
17. Романова Т.Е., Шуваева О.В. Изучение способности водяного гиацинта, рогоза и рдеста к аккумуляции элементов в условиях модельных экспериментов и реального хвостохранилища // Научно-практический семинар для стипендиатов Фонда имени В.И. Вернадского «Управление природопользованием и экологическая безопасность регионов»: Тез. докл. – Москва. – 2015. – С. 112-119.
18. Романова Т.Е., Шуваева О.В. Гибридный ВЭЖХ-ИСП-АЭС метод для идентификации форм связывания кадмия и ртути в растениях // Молодежная научная школа-конференция «Актуальные проблемы органической химии»: Тез. докл. – Шереш. – 2015. – С. 167.
19. Романова Т.Е., Шуваева О.В. Разработка подхода для выявления водорастворимых форм связывания кадмия и ртути в растениях методом ВЭЖХ-ИСП-АЭС // Всероссийская конференция «Теория и практика хроматографии» с международным участием, посвященная памяти профессора М.С. Вигдергауза: Тез. докл. – Самара. – 2015. – С. 84.
20. Романова Т.Е., Шуваева О.В. Выявление форм связывания ртути в растениях в процессе биоаккумуляции методом ВЭЖХ-ИСП-АЭС // Второй международный симпозиум «Ртуть в биосфере: эколого-геохимические аспекты»: Тез. докл. – Новосибирск. – 2015. – С. 296-298.

21. Романова Т.Е. Идентификация форм связывания ртути в растениях методом ВЭЖХ-ИСП-АЭС // Конкурс-конференция молодых ученых, посвященная памяти чл.-к. АН СССР, профессора Г.Б. Бокия: Тез. докл. – Новосибирск. – 2015. – С. 26.
22. Romanova T.E., Belchenko L.A., Shuvaeva O.V. The study of cadmium transport during accumulation by the floating macrophytes // Proc. of V International conference «Ecological chemistry 2012». – Chisinau, Moldova. – 2012.
23. Romanova T.E., Shuvaeva O.V. HPLC-ICP-AES based methodology for cadmium speciation in floating macrophytes // Proc. of 38th International symposium on environmental analytical chemistry. – Lausanne, Switzerland. – 2014. – P. 37.
24. Romanova T.E., Shuvaeva O.V. HPLC-ICP-AES based approach for cadmium and mercury speciation in floating macrophytes // Proc. of 18th European conference on analytical chemistry «Euroanalysis 2015». – Bordeaux, France. – 2015.
25. Romanova T.E., Shuvaeva O.V. Cadmium and mercury speciation in water hyacinth using HPLC-ICP-AES based approach // Proc. of 9th International conference «Instrumental methods of analysis: Modern trends and applications». – Kalamata, Greece. – 2015. – P. 241.

Список цитируемой литературы:

- [1] Руденко А.О., Карцова Л.А. Определение важнейших аминокислот в сложных объектах биологического происхождения методом обращённо-фазовой ВЭЖХ с получением фенилтиогидантоинов аминокислот // Сорбц. хромат. процессы. – 2010. – Т. 10. – С. 223-230.
- [2] Zakharchuk N.F., Borisova N.S., Guselnikova E., Brainina Kh.Z. Determination of thiols and disulfides in whole blood and its fractions by anodic stripping voltammetry and anodic stripping voltammetric titration // Electroanalysis. – 2006. – V.18. – P. 2343-2353.
- [3] Серегин И.В., Иванов В.Б. Гистохимические методы изучения распределения кадмия и свинца в растениях // Физиология растений. – 1997. – Т. 44. – С. 915-921.
- [4] Sadi B.M., Vonderheide A.P., Gong J.-M., Schroeder J.I., Shann J.R., Caruso J.A. An HPLC-ICP-MS technique for determination of cadmium-phytochelatins in genetically modified *Arabidopsis thaliana* // J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci. – 2008. – V. 861. – P. 123-129.
- [5] Wang J., Evangelou V.P. Metal tolerance aspects of plant cell wall and vacuole. / M. Pessarakli. Marcel Dekker Inc.: New York. – 1995. – 717p.
- [6] Brett C.T., Waldron K.W. Physiology and biochemistry of plant cell walls / C.T. Brett. Springer: Netherlands. – 1996. – 256 p.
- [7] Rauser W.E. Structure and function of metal chelators produced by plants - the case for organic acids, amino acids, phytin, and metallothioneins // Cell. Biochem. Biophys. – 1999. – V. 31. – P. 19-48.
- [8] Krupp E.M., Milne B.F., Mestrot A., Meharg A.A., Feldmann, J. Investigation into mercury bound to biothiols: structural identification using ESI-ion-trap MS and introduction of a method for their HPLC separation with simultaneous detection by ICP-MS and ESI-MS // Anal. Bioanal. Chem. – 2008. – V. 390. – P. 1753-764.
- [9] Caffall K.H., Mohnen D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides // Carbohydr. Res. – 2009. – V. 344. – P. 1879-1900.
- [10] Dallinger R., Berger B., Hunziker P., Kagi J.H. Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism // Nature. – 1997. – V. 388. – P. 237-238.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю д.х.н. Шуваевой Ольге Васильевне за постановку задачи, помощь при выполнении работы и обсуждении полученных результатов, к.х.н. Зубаревой Анне Петровне за проведение CHNS-анализа, Макаренко Татьяне Николаевне за помощь в организации экспериментов, Борисовой Наталье Сергеевне за помощь в проведении инверсионно-вольтамперометрического анализа, к.х.н. Максимовскому Евгению Анатольевичу за помощь в проведении СЭМ-ЭДС анализа, к.г.-м.н. Лазаревой Елене Владимировне, к.г.-м.н. Мягкой Ирине Николаевне, к.г.-м.н. Густайтис Марии Алексеевне за помощь в организации натуральных экспериментов и всему коллективу Аналитической лаборатории ИНХ СО РАН за помощь, поддержку и обсуждение работы.

РОМАНОВА Тамара Евгеньевна

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ВЭЖХ-ИСП-АЭС
ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ФОРМ СВЯЗЫВАНИЯ
КАДМИЯ И РТУТИ В РАСТЕНИЯХ**

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук
Изд. лиц. ИД № 04060 от 20.02.2001.

Подписано к печати и в свет 22.08.2016.

Формат 60×84/16. Бумага № 1. Гарнитура “Times New Roman”

Печать оперативная. Печ. л. 1,2. Уч.-изд. л. 1,1. Тираж 120. Заказ № 130

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН
Просп. Акад. Лаврентьева, 3, Новосибирск, 630090