

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ НЕОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ ИМЕНИ А.В. НИКОЛАЕВА
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

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

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук
Шуваева Ольга Васильевна

Новосибирск – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	4
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. Обзор литературы	13
1.1 Понятие химической формы элемента	13
1.2. Формы существования микроэлементов в организме растений	15
1.2.1. Формы связывания кадмия и ртути в растениях	18
1.3 Отбор и подготовка проб при идентификации форм связывания элементов	21
1.4 Методы экстракции химических форм элементов.....	24
1.4.1 Фракционирование соединений элементов	25
1.4.2 Экстракция форм кадмия и ртути.....	28
1.4.2.1 Твердо-жидкостная экстракция.....	28
1.4.2.2 Экстракция с применением микроволнового излучения и ультразвука	29
1.4.2.3 Твердофазная экстракция	29
1.4.2.4 Ферментативная экстракция	31
1.4.2.5 Экстракция с применением ионных жидкостей	32
1.5. Методы определения форм микроэлементов.....	33
1.5.1. Гибридные методы анализа	34
1.5.1.1 Методы разделения форм элементов в гибридных методах анализа	35
1.5.1.1.1 Высокоэффективная жидкостная хроматография	35
1.5.1.1.1.1 Особенности состыковки высокоэффективных жидкостных хроматографов с детекторами	39
1.5.1.1.2 Капиллярный электрофорез.....	41
1.5.1.1.2.1 Особенности состыковки систем капиллярного электрофореза с детекторами	42
1.5.1.1.3 Газовая хроматография	43
1.5.1.1.3.1 Особенности состыковки газовых хроматографов с детекторами	45
1.5.2 Преимущества и недостатки различных методов разделения и детектирования	46
1.6 Заключение и постановка задачи	53
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	54
ГЛАВА 2. Реактивы, оборудование и методики	54
2.1 Оборудование	54
2.2 Реактивы	55
2.3 Методики исследования.....	56
2.3.1 Определение содержания ртути и кадмия в растениях и водах методом ИСП-АЭС.....	56
2.3.2 Определение содержания аминокислот в экстрактах растений методом ВЭЖХ.....	57
2.3.3 Определение содержания сульфгидрильных групп в экстрактах растений методом инверсионной вольтамперометрии	59
2.3.4 Методика проведения лабораторных экспериментов с растениями ...	61
ГЛАВА 3. Идентификация форм связывания кадмия в растениях с применением метода ВЭЖХ-ИСП-АЭС	62
3.1 Распределение кадмия в органах растений	62
3.1.1 Гистохимическое исследование распределения кадмия в растениях	64

3.2 Экстракция соединений кадмия из растений	66
3.3 Оптимизация условий идентификации компонентов экстракта методом ВЭЖХ-ИПС-АЭС	68
3.3.1 Оптимизация параметров гибридной системы ВЭЖХ-ИСП-АЭС	68
3.3.1.1 Выбор условий хроматографического разделения компонентов экстракта	68
3.3.1.2 Оптимизация параметров ИСП-АЭС-детектирования	69
3.3.2 Рабочие параметры ВЭЖХ и ИСП-АЭС при проведении анализа в режиме offline	72
3.4 Выявление соединений кадмия в экстрактах методом ВЭЖХ-ИСП-АЭС	73
3.5 Определение сульфгидрильных групп в компонентах экстрактов гуацанта методом инверсионной вольтамперометрии	75
3.6 Распределение серы в тканях растения и выделенных экстрактах	77
3.7 Определение аминокислотного состава выделенных фракций, содержащих кадмий	78
3.8 Заключение по главе 3	79
ГЛАВА 4. Идентификация форм связывания ртути в растениях с применением метода ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС	80
4.1 Распределение ртути в органах растений	81
4.1.1 Изучение распределения ртути в растениях методом СЭМ-ЭДС	82
4.2 Экстракция соединений ртути из растений	84
4.3 Синтез цистеината и глутатионата ртути и метилртути	86
4.4 Оптимизация условий идентификации компонентов экстракта методом ВЭЖХ-ХП-ИПС-АЭС	88
4.4.1 Оптимизация параметров гибридной системы ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС	89
4.4.1.1 Выбор условий хроматографического разделения компонентов экстракта	89
4.4.1.2 Оптимизация параметров ИСП-АЭС-детектирования	90
4.4.2 Рабочие параметры ВЭЖХ и ИСП-АЭС при проведении анализа в режиме offline	93
4.5 Выявление соединений ртути в экстрактах методом ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС	94
4.6 Определение содержания цистеина в выделенных фракциях, содержащих ртуть	97
4.7 Идентификация форм связывания ртути в растениях зоны рассеяния Урского месторождения	98
4.7.1 Проведение натурного эксперимента	98
4.7.2 Фракционирование ртути в растениях	100
4.7.3 Идентификация форм связывания ртути в водной фракции методом ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС	100
4.8 Заключение по главе 4	101
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	103
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	104
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	106
БЛАГОДАРНОСТИ	127

Список сокращений

ААС – атомно-абсорбционная спектрометрия

АФС – атомно-флуоресцентная спектрометрия

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-ИСП-АЭС – высокоэффективная жидкостная хроматография с детектированием методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой

ВЭЖХ-ИСП-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с детектированием методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой

ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим детектированием

ВЭЖХ-ХП-АФС – высокоэффективная жидкостная хроматография с детектированием методом атомно-флуоресцентной спектрометрии с восстановлением ртути методом холодного пара

ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС – высокоэффективная жидкостная хроматография с детектированием методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно связанной плазмой с восстановлением ртути методом холодного пара

ГХ – газовая хроматография

ГХ-ИСП-МС – газовая хроматография с детектированием методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой

ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

ИВА – инверсионная вольтамперометрия

ИСП-АЭС – атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой

ИСП-МС – масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой

КЭ – капиллярный электрофорез

КЭ-ИСП-МС – капиллярный электрофорез с детектированием методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой

МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

МП-АЭС – атомно-эмиссионная спектрометрия с микроволновой плазмой

СЭМ-ЭДС – сканирующая электронная микроскопия высокого разрешения с энергодисперсионным анализом химического состава

ХП-АФС – атомно-флуоресцентная спектрометрия с восстановлением ртути методом холодного пара

ЭДТА – этилендиаминтетраацетат

ЭТА-ААС – атомно-абсорбционная спектрометрия с электротермической атомизацией

BCF – коэффициент биологического концентрирования (bioconcentration factor)

TF – транслокационный фактор (translocation factor)

Упоминаемые в работе химические соединения:

ММА – монометиларсенат ($\text{CH}_3\text{AsO}_3^{2-}$)

ДМА – диметиларсенит ($(\text{CH}_3)_2\text{AsO}_2^-$)

ТБАГ – тетрабутиламмония гидроксид ($(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{NOH}$)

Трис - трис(гидроксиметил)аминометан ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$)

ФИТЦ – фенилизотиоцианат ($\text{C}_6\text{H}_5\text{NCS}$)

EtHg – этилртуть ($\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$)

Hg(Cys)₂ – цистеинат ртути(II) ($(\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{S})_2\text{Hg}$)

Hg(GS)₂ – глутатионат ртути(II)

$(\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_2\text{CONHCH}(\text{CONHCH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{S})_2\text{Hg}$

MeHg – метилртуть (CH_3Hg^+)

MeHgCys – цистеинат метилртути(II) ($\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)\text{CH}_2\text{SHgCH}_3$)

MeHgGS – глутатионат метилртути(II)

$(\text{HO}_2\text{CCH}(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_2\text{CONHCH}(\text{CONHCH}_2\text{COOH})\text{CH}_2\text{SHgCH}_3$)

PhHg – фенилртуть ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$)

SDS – додецилсульфат натрия ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Идентификация химических форм элементов в природных объектах, а также выявление форм их связывания позволяет изучать их трансформацию и транспорт 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 этого процесса при применении 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 работе с которыми предпочтение следует отдавать гибридным методам анализа, объединяющим разделение и детектирование в рамках одной процедуры. При этом 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 детектиро-

ванием представляется наиболее актуальной задачей современной аналитической химии, решение которой связано с развитием и совершенствованием гибридных методов анализа.

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 2014 г. (ИНХ СО РАН), стипендиями Неправительственного экологического фонда им. В.И. Вернадского в 2013 и 2015 гг.

Степень разработанности темы исследования

Для изучения процессов трансформации и транспорта микроэлементов в биологических объектах чаще всего используют информацию об общем содержании элемента в исследуемых объектах. Однако, подвижность, токсичность, а также физико-химические свойства и, как следствие, роль в природной системе, определяется химической формой элемента. 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, которые позволяют 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**:

1. разработка способов извлечения соединений кадмия и ртути из растений с применением ступенчатой экстракции;
2. идентификации форм связывания кадмия и ртути в растениях методом ВЭЖХ-ИСП-АЭС;
3. изучение распределения кадмия и ртути в органах и тканях растений;
4. 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;
5. оптимизация параметров разделения и детектирования форм связывания кадмия и ртути методом ВЭЖХ-ИСП-АЭС в режимах *online* и *offline*;
6. 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

1. 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.

2. 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.

3. Полученная с применением метода ВЭЖХ-ИСП-АЭС информация о формах связывания ртути в водяном 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 распределения 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 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» (Шереш, 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), Конкурсе-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 всероссийских 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.

ГЛАВА 1. Обзор литературы

1.1 Понятие химической формы элемента

Микроэлементы играют важную роль в функционировании живых организмов [1]. Некоторые из них являются токсичными, другие жизненно необходимы, но, в то же время, могут представлять опасность при высоких концентрациях. Большинство подобных эффектов зависят от химической формы элемента, в которой он присутствует в рассматриваемой системе. Например, ионы Cr(VI) для большинства организмов являются токсичными даже при малых концентрациях, в отличие от ионов Cr(III) [2]. Ионы метилртути и ртути являются токсичными, однако обладают различным механизмом действия на организмы, за счет чего метилртуть оказывает большее воздействие. Понимание того, что химическая форма элемента определяет свойства, оказало значительное влияние на развитие токсикологии, медицинской химии, геохимии и химии окружающей среды. Новые разработки в области аналитического оборудования и методологии проведения измерений позволяют идентифицировать и количественно определять формы элемента, присутствующие в исследуемой системе [3]. Благодаря этим возможностям в последние годы появляется все большее количество работ, посвященных изучению химических форм элементов в различных объектах.

Использование концепций и терминов, относящихся к определению химических форм элементов, в последние годы по-прежнему отражает определенную степень несогласованности в рамках научного сообщества. Международный союз чистой и прикладной химии достиг консенсуса по некоторым основным определениям, которые могут быть использованы при описании процессов, связанных с определением химических форм элементов [4]. Одним из основных выводов этой рабочей группы было то, что термин "определение форм элементов" должен быть ограничен распределением элемента между индивидуальными химическими формами. Четкое различие также было сделано между определением форм элемента и фракционированием. Так как важно в полной мере придерживаться верных определений, они приведены ниже дословно:

Химическая форма (chemical species) – индивидуальная форма элемента, определенная относительно изотопного состава, электронного или окислительно-восстановительного состояния, и/или комплексной или молекулярной структуры.

Анализ химических форм (speciation analysis) – аналитическая деятельность по идентификации и/или определению количества одной или более индивидуальных химических форм в пробе.

Фракционирование (fractionation) - процесс классификации аналита или группы аналитов в определенном образце в соответствии с физическими (например, размер, растворимость) или химическими (например, тип химической связи, реакционная способность) свойствами.

Существуют также некоторые альтернативные определения понятия химической формы элемента в зависимости от преследуемой цели. Так, для описания процессов, происходящих в растворах, предложено следующее определение [5]: *химическая форма в растворе* – стехиометрически (а иногда и пространственно) определенная по отношению к ряду элементов группа химических образований, которые могут иметь различное строение и стехиометрию по отношению к другим элементам, рассматриваемым как компоненты постоянной среды. В этом определении особое внимание уделяется постоянству среды, что указывает на возможную трансформацию форм элемента при выделении и концентрировании аналита, например, при проведении процедуры экстракции. Идентификация химической формы элемента (выявление стехиометрии, определение физико-химических характеристик) происходит благодаря тому, что при существенном изменении равновесных состояний за счет вариаций состава раствора среда модифицируется незначительно с точки зрения ее воздействия на характеристики форм исследуемой системы. При этом изменение количества конкретной формы в растворе рассматривается как изменение числа тождественных друг другу частиц.

Если идентификация и количественное определение химических форм не может быть выполнено, аналитическая процедура может привести только к оперативно или функционально определенной характеристике форм [6, 7]. Такой анализ не рассматривается как истинное определение химических форм, так как идентификация индивидуальной формы, как таковая, отсутствует. Оперативно определенная характеристика форм дает информацию о группе молекул, которые проявляют близкие свойства при проведении какой-либо процедуры, например, экстракции [8]. Характеристика групп молекул сильно зависит от выбранной аналитической процедуры, поэтому информация об индивидуальных формах теряется. В этом смысле фракционирование рассматривается как оперативно определенная характеристика. Функционально опре-

деленная характеристика форм предоставляет информацию о роли отдельных групп химических форм элементов в организмах и их влиянии на живые системы [6]. Часто оказывается, что такой подход является единственной возможностью получить косвенную информацию о формах элемента в сложных образцах, потому что индивидуальные формы не являются доступными ввиду лабильности и трансформации в процессе процедуры извлечения.

Соотношение между химическими формами элемента в исследуемом образце в значительной степени определяет подвижность, биодоступность и токсическое воздействие элемента на организм [4, 9]. Микроэлементы могут входить в состав макромолекул (например, белков, ферментов, гормонов) и присутствовать в ионной форме в различных степенях окисления. В связи с этим только достоверные знания о химических формах элемента дают основание для дальнейшей оценки функции элемента в организме, а также оценки риска, связанного с загрязнением окружающей среды. Стоит отметить, что процедуры отбора пробы, экстракции, разделения, детектирования, идентификации и количественного определения неразрывно связаны между собой. Эти процедуры могут приводить к смещению химического равновесия между формами и переходу одних форм в другие, а также образованию новых соединений [10]. Оценить природу и степень этих изменений зачастую оказывается крайне сложно, в связи с чем критическое обсуждение полученных результатов, должно быть неотъемлемой частью определения элементов на уровне химических форм. Таким образом, понятие «химическая форма элемента» является достаточно сложным и зависит, в некоторой степени, от цели и возможностей анализа.

1.2. Формы существования микроэлементов в организме растений

Биодоступность тяжелых металлов и, как следствие, их воздействие на объекты живой природы в наземных и водных экосистемах зависят от физико-химической формы элемента [9, 11].

Механизмы устойчивости растений к воздействию ионов металлов можно представить как процессы, обеспечивающие толерантность за счет связывания элемента внутри растительной клетки и препятствующие проникновению элемента через плазматическую мембрану. Разнообразие механизмов, не позволяющих иону металла проникнуть через клеточную мембрану, подробно описали Cumming и Taylor [12]. Они включают в себя изменения ризосферы, выделение хелатирующих агентов кор-

невой системой, регулировку проницаемости мембраны, а также связывание компонентами клеточной стенки. Клеточная стенка растений обладает большим количеством отрицательно заряженных групп, что обеспечивает эффективное связывание ионов металлов. В зависимости от вида растения и ткани состав клеточной стенки может различаться, но в среднем в ней содержится 25-30% целлюлозы, 15-25% гемицеллюлозы, 35% пектина и 5-10% гликопротеинов [13]. Анионные карбоксилатные группы пектина и гликопротеинов проявляют высокое сродство к ионам металлов [14, 15]. Известно, что в клетке корня растения пектины обеспечивают 70-90% обменной емкости клеточной стенки по отношению к катионам, а оставшиеся 10-30% относят к функциональным группам гликопротеинов [15]. При этом могут образовываться связи за счет электростатических, ионных и ковалентных взаимодействий. Более прочные связи образуются в случае потери ионом металла гидратной оболочки [16].

Важную роль в питании растений играет выделение корнями экссудатов, содержащих хелатирующие вещества, в ризосферу. Образование комплексных соединений увеличивает растворимость металла и усиливает поступление элемента в организм растения. Ярким примером является выделение при недостатке железа фенольных соединений, таких как кофейная кислота, арахисом *Arachis hypogaea* [17], флавоноидов люпином *Lupinus albus* [18], флавинов свеклой *Beta vulgaris* [19]. Известно, что флавоноиды могут способствовать увеличению толерантности по отношению к тяжелым металлам у *Arabidopsis thaliana* [20]. Помимо хелатирования железа, кверцетин способен образовывать комплексные соединения с ионами меди и урана [21, 22]. Примером, подтверждающим существование связи между поглощением железа и урана, является работа Veihweger и Geipel [23], где демонстрируется значительное усиление аккумуляции урана при недостатке железа растением *Arabidopsis halleri*.

При проникновении иона тяжелого металла в цитоплазму, как правило, сразу же происходит его связывание с внутриклеточными лигандами, что обеспечивает его включение в метаболические процессы, такие как специфическое связывание с протеинами, сопровождаемое детоксикацией. Лигандами в этом случае являются, как правило, соединения с низкой молекулярной массой [24], среди которых известными лигандами являются никотинамин и органические кислоты, такие как цитрат [25, 26]. Никотинамин характеризуется высокими значениями констант устойчивости по отношению к катионам переходных металлов [27] и необходим многим растениям, в частности *Arabidopsis thaliana* [28], для поддержания гомеостаза железа, цинка и меди.

Концентрации этого вещества в растениях-гипераккумулянтах выше, чем в тех, которые не обладают способностью к концентрированию элементов [29]. Цитрат является основным лигандом для цинка в листьях *Noccaea caerulea* [30, 31], в то же время другие органические кислоты, такие как малат, могут принимать участие в формировании толерантности по отношению к тяжелым металлам. Цитрат усиливает транспорт урана от корней к стеблям, влияя, при этом, на перераспределение железа и цинка [32]. Это подчеркивает значение органических кислот в выведении и перераспределении ионов металлов в различных тканях растений и клеточных структурах, таких как вакуоль [33, 34].

Аминокислоты, а именно пролин, также вовлечены в процесс хелатирования ионов металлов [35]. Ключевую роль в связывании никеля выполняет гистидин. Присутствие ионов никеля приводит к увеличению концентрации гистидина в 36 раз в ксилеме (основной проводящей ткани) растения *Alyssum lesbiacum* по сравнению с растением *Alyssum montanum*, которое не является гипераккумулянтом [36].

Еще одним хелатирующим агентом является глутатион (трипептид γ -глутамилцистеинилглицин). Глутатион содержит необычную пептидную связь между аминогруппой цистеина и карбоксильной группой боковой цепи глутамата. Значение глутатиона в клетке определяется его антиоксидантными свойствами. Фактически глутатион не только защищает клетку от таких токсичных агентов, как свободные радикалы, но и в целом определяет редокс-статус внутриклеточной среды. Наличие сульфгидрильных и карбоксильных функциональных групп в составе глутатиона делает его подходящим для образования комплексных соединений с тяжелыми металлами [37, 38]. Кроме того, комплексообразование с тиольными группами приводит к индукции синтеза фитохелатинов, олигомеров глутатиона, синтезируемых ферментом фитохелатинсинтазой [39]. Комплексы металлов с глутатионом транспортируются в вакуоль, тем самым увеличивая толерантность организма растения [40, 41]. Гиперэкспрессия фитохелатинсинтазы приводит к увеличению уровня глутатиона и повышенной толерантности по отношению к никелю, кобальту, цинку и, в меньшей степени, к кадмию у *Arabidopsis thaliana* [42, 43].

Металлотioneины – это протеины с высоким содержанием SH-групп, характеризующиеся большим разнообразием и гибкостью структур, благодаря чему может происходить координация различных металлов. Тем не менее, каждый металлотioneин обладает специфическим сродством по отношению к определенному металлу за счет

наличия карбоксильных и сульфгидрильных групп в составе различных аминокислот, входящих в состав пептида, и различий в их упаковке и устойчивости. Металлотионеины характеризуются высоким содержанием цистеина (до 30% мол.) [44].

Таким образом, в связывании ионов металлов в растениях принимают роль как низкомолекулярные соединения, такие как органические кислоты, флавоноиды и аминокислоты, так и высокомолекулярные белки различной природы, а также компоненты клеточной стенки растений.

1.2.1. Формы связывания кадмия и ртути в растениях

Устойчивость растения по отношению к тому или иному металлу обусловлена наличием соединений, способных связывать ионы этого элемента, а также интенсивностью транспорта [45, 46]. Одним из первых барьеров на пути Cd^{2+} и Hg^{2+} в корень растения является клеточная стенка [47] и выделяемые клетками внеклеточные углеводы [48]. В корнях и листьях бобовых растений кадмий связан преимущественно с пектинами и гистидиновыми группами клеточной стенки [49]. Однако эффективность такого механизма связывания может меняться в зависимости от концентрации кадмия и времени воздействия [50]. Обсуждается возможное участие в связывании Cd^{2+} и Hg^{2+} белков, встроенных в клеточную стенку [51]. Клеточные стенки на поверхности корней растений напрямую взаимодействуют с ионами металлов почвы или воды. Часть металлов связывается с галактуроновой кислотой, по отношению к которой различные ионы металлов имеют разное сродство [52]. Плазматическая мембрана – это первая «живая» структура на пути иона металла. В связи с этим ее вовлечение в механизмы толерантности растений играет важную роль. Токсичность кадмия и ртути по отношению к плазматической мембране обусловлена окислением и связыванием с тиольными группами, ингибированием ключевых мембранных белков, таких как H^+ -АТФаза и изменением состава и вязкости мембранных липидов [53]. Показано, что кадмий и медь оказывают влияние на состав мембранных липидов [54, 55]. Кроме того, воздействие кадмия приводит к уменьшению активности АТФазы плазматической мембраны пшеницы и подсолнуха [54].

Общим механизмом детоксикации растений является хелатирование ионов металлов различными соединениями и, в некоторых случаях, их депонирование в органеллах живой клетки. Депонирование Cd и Hg в вакуоли препятствует свободному перемещению ионов этих металлов в цитозоле [50]. Показано, что в процессе гипе-

раkkкумуляции в вакуоли концентрируются такие элементы как Zn и Cd [52]. Одним из примеров является накопление Cd в форме комплексов с фитохелатинами в вакуолях при участии ABC переносчика [56]. К другим лигандам, способным связывать ионы кадмия и ртути, относятся органические кислоты, аминокислоты, полипептиды [26]. Хелатирование ионов металлов органическими кислотами чаще всего происходит на внеклеточном уровне. Например, синтез малата во внеклеточном веществе корней пшеницы индуцируется под воздействием ионов алюминия и коррелирует с устойчивостью к этому элементу [58].

Существует два наиболее изученных класса полипептидов, играющих важную роль в связывании и выведении ионов кадмия и ртути: металлотионеины – небольшие богатые цистеином полипептиды, которые являются продуктами классического биосинтеза белка, и фитохелатины, которые, в отличие от предыдущих, являются продуктами ферментативного синтеза и также характеризуются высоким содержанием цистеина, обуславливающим наличие SH-групп [59]. Фитохелатины – это небольшие пептиды, связывающие ионы металлов в растительной клетке, строение которых отвечает формулам $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Ser}$, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Glu}$, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gln}$, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$, где $n = 2 - 11$, причем соединения типа $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ встречаются наиболее часто [60] (Glu – глутаминовая кислота $(\text{COOH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH})$, Cys – цистеин $(\text{CH}(\text{NH}_2)(\text{CH}_2\text{SH})\text{COOH})$, Gly – глицин $(\text{CH}_2(\text{NH}_2)\text{COOH})$, Ala – аланин $(\text{CH}_3\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH})$, Ser – серин $(\text{CH}(\text{NH}_2)(\text{CH}_2\text{OH})\text{COOH})$, Gln – глутамин $(\text{CO}(\text{NH}_2)(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH})$. Синтез фитохелатинов из глутатиона ($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$) катализируется ферментом фитохелатинсинтазой (EC 2.3.2.15), активация которого происходит под действием ионов металлов, в том числе Hg и Cd [61]. Фермент осуществляет перенос фрагмента $\gamma\text{-Glu-Cys}$ глутатиона на другую молекулу глутатиона с образованием пептидной связи [62]. Синтез фитохелатина продолжается *in vitro* до тех пор, пока в растворе присутствуют свободные ионы металла.

Присутствие фитохелатинов подтверждено у большинства растений, при этом у различных видов растений также были обнаружены гены, кодирующие металлотионеины. В настоящий момент ясно, что оба класса соединений играют определенную роль в связывании ионов металлов. Кроме того, вполне вероятно, что они выполняют независимые функции в детоксикации растений и метаболизме [59].

Существуют лиганды, связывающие ионы металлов, которые выделяют корни растений. Около половины продуктов фотосинтеза транспортируется в корень и 12-40% выделяется в ризосферу в ходе развития и жизнедеятельности растения: сахара, полисахариды, органические и аминокислоты, пептиды и протеины [63]. Одним из механизмов понижения токсичности металлов является связывание их органическими кислотами. Из широкого круга карбоновых кислот, участвующих в связывании металлов, наибольший вклад вносят малат, цитрат и оксалат [64]. Известно, что низкомолекулярные органические кислоты играют важную роль в уменьшении растворимости и биодоступности ионов Cd^{2+} [65]. Корни некоторых растений, таких как пшеница и гречиха, выделяют лимонную, яблочную и щавелевую кислоту, которые осуществляют связывание Cd^{2+} , что препятствует его проникновению в растение. Известно, что аминокислоты также могут снижать токсичность тяжелых металлов. Кроме того, взаимодействие ионов кадмия с фосфатами приводит к образованию соединений, недоступных для растений. Травянистые растения выделяют фитосидерофоры – вещества пептидной природы, способные связывать такие элементы как Fe, Cd, Zn, Hg и Cu в более прочные комплексы по сравнению с карбоновыми кислотами [66].

Растения водяного гиацинта в ответ на воздействие ионов Cd^{2+} синтезируют металлотионеины - пептиды с высоким содержанием цистеина и молекулярной массой 2300-3000 г/моль [67]. Также известно, что на начальном этапе происходит связывание кадмия с низкомолекулярными соединениями небелковой природы, а при длительном воздействии образуются соединения с пептидами, которые являются продуктами ферментативного синтеза, фитохелатинами. [68]. Таким образом, в настоящий момент вопрос об участии фитохелатинов и металлотионеинов в связывании кадмия в водяном гиацинте остается открытым, так как результаты различных исследований не дают однозначного ответа.

Несмотря на растущий интерес к практическому применению водяного гиацинта для очистки вод от загрязнения ртутью, исследования, посвященные изучению форм связывания этого элемента в растении весьма немногочисленны [69]. Так, исследование ближней тонкой структуры рентгеновского спектра поглощения модельных соединений, корней и побегов гиацинта показало, что в корне растения ртуть связана преимущественно с кислородсодержащими лигандами, вероятнее всего с карбоксильными группами. А в побегах присутствует ковалентная связь Hg-S [70]. Rajan и др. [71] подтвердили наличие ковалентно связанной ртути в корнях. В то же время суще-

ствуют аргументы в пользу того, что ртуть связывается с соединениями большой молекулярной массы. Соединения ртути с молекулярной массой от 1500 до 15000 г/моль были обнаружены в экстракте корня водяного гиацинта, подвергнутого воздействию ионов Hg^{2+} . Белки, вовлеченные в связывание ртути, были идентифицированы с применением эксклюзионной и ионной хроматографии с детектированием методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой с последующим более детальным изучением выделенных соединений методом жидкостной хроматографии с детектированием масс-спектрометрией с ионизацией электрораспылением. Большинство белков, связанных с ртутью, было обнаружено и в листьях растений. Эти белки преимущественно относятся к митохондриальным и белкам хлоропласта, которые вовлечены в фотосинтез, фиксацию углерода и цепь переноса электронов [72].

1.3 Отбор и подготовка проб при идентификации форм связывания элементов

Одной из важнейших особенностей при отборе и подготовке биологических проб к анализу на определение химических форм того или иного элемента является необходимость быстрого анализа или замораживания образцов, что связано с высокой активностью ферментов и приводит к превращению одних форм элемента в другие. Липофильная природа неполярных веществ способствует их накоплению в определенных тканях живых организмов, поэтому процедуре анализа должны предшествовать гомогенизация и разрушение клеток. Клетки растительных тканей растирают в жидком азоте с целью разрушения матрицы. Известно, что хранение в замороженном виде в общем случае позволяет предотвратить трансформацию форм [73, 74].

В случае ВЭЖХ разделения форм элементов подготовленная проба должна представлять собой раствор, причем аналиты должны иметь размеры, не превышающие размеры пор мембранных фильтров (0,22, 0,45 мкм). В настоящее время основным направлением в анализе химических форм элементов в биологических объектах является идентификация соединений металлов с биологическими лигандами (низкомолекулярными соединениями, полипептидами и полисахаридами). Для извлечения ионов металлов, обратимо связанных с клеточной стенкой, ткани обрабатывают буферным раствором на основе трис(гидроксиэтил)аминометана (**Трис**) (рН = 8) с добавлением 1 М этилендиаминтетраацетата (**ЭДТА**) [75]. Для выделения из цитозоля фракции, содержащей металлотioneины, часто применяют метод эксклюзионной

хроматографии [76]. При этом особое внимание уделяется минимизации времени транспортировки и хранения проб для предотвращения процесса окисления металлотионеинов [77]. Водные экстракты животных и растительных тканей готовят путем гомогенизации проб в подходящем буферном растворе. Нейтральные буферные растворы применяют для выделения соединений цинка с металлотионеинами, так как эти соединения диссоциируют при $\text{pH} < 5$. Аналогичные соединения кадмия и меди выделяют и при более низких значениях pH. Чаще всего для решения этой задачи используют 10-50 мМ раствор Трис с pH 7-9. Для экстракции металлотионеинов из растений, в которых синтез этих пептидов был индуцирован под воздействием ионов Cd^{2+} , используют десятикратный избыток буфера, тогда как для растений с естественным содержанием металлотионеинов оптимальным является соотношение ткани к экстракционному буферу 1:1.

Металлотионеины могут окисляться при экстракции за счет наличия большого количества цистеина в их структуре. В ходе окисления образуются дисульфидные мостики, что приводит либо к сополимеризации протеинов, либо к образованию ассоциатов с другими протеинами, что в обоих случаях приводит к увеличению молекулярной массы. В связи с возможностью окисления металлотионеинов, например, под воздействием кислорода, Cu(I) или компонентов гема, гомогенизацию и выделение этих соединений следует проводить в деоксигенированных буферных растворах или в восстановительных условиях [78]. С целью предотвращения образования димерных форм металлотионеинов при экстракции добавляют β -меркаптоэтанол. В некоторых случаях в экстрагент добавляют 0,02% NaN_3 в качестве антибактериального агента и фенилметилсульфонилфторид в качестве ингибитора протеаз [79]. Центрифугирование проводят при низких температурах (4°C) для предотвращения окисления анализов.

В результате получают две фракции: водную и осадок (клеточные стенки и органеллы). Анализу на содержание металлотионеинов подвергают супернатант, который, при необходимости, хранят при -20°C в отсутствие кислорода [79]. Степень извлечения при использовании Трис буфера составляет 30% [77].

Для удаления высокомолекулярной фракции проводят тепловую обработку (при 60°C в течение 15 минут), что приводит к коагуляции крупных молекул, в то время как металлотионеины остаются в растворе, так как сохраняют устойчивость при таких температурах. Такой подход позволяет уменьшить загрузку ВЭЖХ колонки при по-

следующем разделении компонентов экстракта и, как следствие, продлить время ее жизни. Заключительным этапом при подготовке пробы к анализу, как правило, является фильтрация через мембранные фильтры с размеров пор 0,22 или 0,45 мкм. Также при анализе рекомендуется использовать предколонку, что позволяет защитить аналитическую колонку от попадания липидов, которые в противном случае ухудшают разделение [80]. Известно, что некоторые органические компоненты экстракта могут взаимодействовать с материалом колонки, что в последующем может привести к образованию соединений с ионами исследуемых элементов и появлению пиков, не соответствующих реальным компонентам экстракта. Для предотвращения возникновения подобных эффектов рекомендуется тщательно промывать хроматографическую колонку перед каждым вводом пробы [80].

Использование новых экстрагентов и расширение инструментальных возможностей в последние годы позволило упростить и ускорить процедуру выделения соединений того или иного элемента из растительных и животных тканей при подготовке проб к анализу. Актуальной проблемой остается вопрос сохранения форм элементов в ходе процедуры экстракции.

Изучена стабильность и возможность трансформации неорганических форм ртути и метилртути в пробах рыбы. Образцы готовили измельчая в замороженном состоянии, подвергая лиофильной сушке с последующей экстракцией раствором щелочи и определением форм ртути методом газовой хроматографии с детектированием методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (ГХ-ИСП-МС).

Из восьми различных способов экстракции форм ртути из биологических объектов, экстракция с применением ультразвука и микроволновая экстракция оказались наиболее эффективными при использовании щелочных растворов и показали наименьший уровень трансформации форм ($\leq 6\%$). Экстракция 5 М HCl и ферментативная экстракция с протеазой показала несколько меньшую эффективность с относительно низкими величинами трансформации форм (3 и 1,4% для метилртути и неорганической ртути соответственно). Кислотное выщелачивание приводит к наименьшей степени извлечения. Наибольшая степень превращения наблюдалась в случае микроволновой экстракции 4 М HNO₃ или уксусной кислотой (до 30%) [81].

Контроль стабильности форм элементов, для которых существуют коммерчески доступные индивидуальные соединения, представляется возможным и реализуется на практике [82]. Однако многое еще предстоит сделать для контроля превращений

соединений элементов с лигандами биологической природы в ходе экстракции и пробоподготовки в целом. Часто оказывается, что формы элемента в биологическом объекте находятся в сложном химическом равновесии, которое нарушается при добавлении химических реагентов (проведении процедуры экстракции) или физическом воздействии (нагревании, охлаждении). Особое внимание уделяется стабильности анализов при отборе и подготовке проб к анализу.

1.4 Методы экстракции химических форм элементов

Экстракция - метод извлечения вещества из раствора или сухой смеси с помощью подходящего растворителя (экстрагента). С практической точки зрения, процесс может быть исполнен путем выщелачивания, при котором происходит выделение вещества из твердой в жидкую фазу (твердо-жидкостная экстракция), жидкостной или твердофазной экстракции [83]. Эффективность процесса экстракции чаще всего выражается в процентном соотношении. Степень извлечения выражается как доля вещества, перешедшая из одной фазы в другую [84]. Процесс экстракции может быть реализован с использованием различных типов экстрагентов:

– Водные растворы кислот [85], щелочей [86], буферные растворы, вещества, обладающие сильными окислительными или восстановительными свойствами. Применение таких экстрагентов обычно требует длительного времени и приводит к неполному извлечению целевого компонента. Для ускорения процесса используют нагревание, часто в варианте микроволновой экстракции, и ультразвук [87].

– Органические растворители, которые позволяют выделять полярные органические или металлоорганические соединения. Такой вариант экстракции часто реализуется с применением аппарата Сокслета [88], в котором находится в контакте с парами растворителя, что позволяет добиваться экстракции летучих и термически нестабильных веществ. Экстракция также может проходить при повышенном давлении и температуре [89]. В этом случае процесс происходит при давлении 30-200 атм и температуре 50-200°C.

– Ферментативная экстракция. Для матриц биологической природы применяют протеиновые ферменты (протеазы, липазы, трипсин, пепсин, целлюлаза) [87, 90, 91]. Цель такой процедуры – разрушить протеины, полисахариды, цепи жирных кислот, что приводит к высвобождению аминокислот, сахаров и низкомолекулярных соединений. Ферментативное разрушение матрицы может быть усилено путем применения

ультразвука. При этом происходит разрушение клеточной стенки, что, например, приводит к увеличению степени извлечения селена из дрожжей на 20% [92].

– Сверхкритические жидкости (чаще всего CO_2 с добавлением полярных растворителей – метанола, ацетонитрила или воды). В экстракции сверхкритическими жидкостями в качестве добавки чаще всего используют воду, так как увеличение температуры от 50 до 400°C при давлениях, превышающих критическое позволяет достичь перехода в критическое состояние и выделять вещества последовательно от более к менее полярным [93].

Выбор экстрагента зависит от свойств аналита, матрицы пробы и степени их связи между собой. Гидрофобные свойства матрицы оказывают существенное влияние на эффективность экстракции, даже если выделяемые соединения обладают высокой полярностью. Разрушение матрицы путем физического, химического или ферментативного воздействия увеличивает вероятность того, что исследуемые вещества будут переведены в раствор. В случае выделения форм микроэлементов из растений чаще всего проводят разрушение клеточной стенки путем замораживания в жидком азоте (-78°C) или добавления поверхностно-активного вещества, такого как додецилсульфат натрия (**SDS**), что приводит к разрушению упорядоченной структуры фосфолипидов в клеточной мембране и отщеплению гидрофобных белков.

1.4.1 Фракционирование соединений элементов

Так как поведение элементов в системе почва-растение зависит от их формы, при изучении процессов, происходящих в этих объектах, в некоторых случаях применяют ступенчатую экстракцию. Процедура включает в себя последовательное выделение фракций, содержащих различные формы связывания элементов за счет использования экстрагентов с различными физико-химическими свойствами (кислотность, окислительно-восстановительный потенциал, наличие комплексообразователя). При этом в каждую из фракций экстрагируется определенная доля от общего количества элемента, связанная с теми или иными соединениями. Наиболее часто при фракционировании почвы применяют схему, предложенную Tessier и др. [94], состоящую из пяти этапов, при которых происходит выделение обменных форм элементов, форм, связанных с карбонатами, с оксидами Fe и Mn, с органическим веществом и остаточной фракции (табл. 1). Метод ступенчатого выщелачивания также используют для изучения распределения химических форм радионуклидов в объектах окружающей

среды. Как и для тяжелых металлов, для радионуклидов чаще всего применяют метод, предложенный Tessier и др. [94], однако существуют некоторые вариации схемы ступенчатого выщелачивания [95-98].

В основе ступенчатой экстракции лежит извлечение форм элементов в зависимости от их физико-химических свойств. Отсутствие унифицированного подхода к последовательному выделению фракций элемента не позволяет сравнивать результаты разных исследований между собой. Зачастую оказывается, что конечный результат зависит от типа пробы и примененной схемы экстракции. Таким образом возникает необходимость создания унифицированной процедуры ступенчатой экстракции [97].

Многие исследователи отмечают недостатки процедуры ступенчатого выщелачивания, наиболее распространенным из них является низкая селективность реагентов, за счет чего химические формы элементов не всегда распределяются соответствующим образом между фракциями [99]. Необходимость создания более адекватных подходов к ступенчатому выщелачиванию для проб со сложной матрицей является одним из шагов к последующему развитию методов определения форм связывания (существования) химических элементов, особенно при определении экстрагируемых форм тяжелых металлов. Унифицированная трехступенчатая процедура фракционирования почв и донных осадков была предложена Европейским бюро стандартных образцов состава. Данный подход включает в себя выделение фракции, содержащей формы, экстрагируемые водой, связанные с карбонатами и обменные формы элемента; фракции, связанной с оксидами железа и марганца; фракции, связанной с органическим веществом и сульфидами (табл. 1). Такой подход дает воспроизводимые результаты. Кроме того, существуют стандартные образцы состава для фракционирования элементов в почвах и донных осадках, выпускаемые Европейским бюро стандартных образцов состава, использование которых позволяет убедиться в достоверности получаемых результатов [100, 101]. Использование стандартных образцов состава является признанным подходом для подтверждения правильности методик, применяемых при определении элементов на уровне их форм (химических, существования и связывания).

В настоящее время наиболее часто ступенчатая экстракция применяется для фракционирования элементов в почвах и донных осадках, тогда как работы, посвященные изучению растений, встречаются редко (табл. 1). На каждой последующей стадии экстракции для извлечения соответствующей фракции постепенно увеличи-

вают ионную силу экстрагента, уменьшают pH или применяют растворы комплексообразователей.

Т а б л и ц а 1

Экстрагенты, применяемые при ступенчатом выщелачивании элементов из почв, донных осадков и растений

Трехстадийная схема экстракции элементов из почв и донных осадков [101]	Ступенчатая экстракция элементов из почв по Tessier [94]	Ступенчатая экстракция элементов из растений [102]
1) Металлы в почвенном растворе, связанные с карбонатами, обменная фракция: 0,11 М CH_3COOH	1) Обменные формы: 1,0 М MgCl_2 (pH 7,0)	1) Водорастворимые формы, пептиды цитозоля и вакуоли: 10 мМ Трис·HCl, pH 7,4
	2) Формы, связанные с карбонатами: 1,0 М $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$, pH 5,0	2) Формы, связанные с пептидами и полисахаридами клеточной стенки: 2% целлюлаза в 10 мМ Трис·HCl, pH 7,4
2) Формы, связанные с оксидами железа и марганца: 0,1 М $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (pH 2)	3) Формы, связанные с оксидами железа и марганца: 0,04 М раствор $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ в 25%-ой CH_3COOH	3) Формы, связанные с гидрофобными белками: 2% додецилсульфат натрия в 10 мМ Трис·HCl, pH 7,4
3) Формы, связанные с органическим веществом и сульфидами: 8,8 М H_2O_2 , затем 1,0М $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ при pH 2	4) Формы, связанные с органическим веществом: 0,02 М HNO_3 + 30% H_2O_2 , pH 2,0 (с HNO_3), затем 3,2 М $\text{CH}_3\text{COO NH}_4$ в 20%-ой HNO_3	4) Формы, связанные с органическими кислотами: 10 мМ $\text{CH}_3\text{COO NH}_4$, pH 4,5
	4) Остаточная фракция: конц. H_2O_2 + конц. HNO_3	

Процедура экстракции зачастую зависит от природы исследуемого элемента. Так, при фракционировании мышьяка, не рекомендуется использовать экстрагенты, обладающими окислительными или восстановительными свойствами, так как это может привести к изменению степени окисления аналитов и получению недостоверных результатов. В некоторых случаях последовательная экстракция позволяет моделировать процессы, происходящие в окружающей среде. Так, если целью исследования является определение степени подвижности элемента в почве или растении [102] (табл. 1), предпочтение отдается ступенчатому выщелачиванию, а не определению общего содержания элемента или идентификации индивидуальных химических форм [103]. Стоит отметить, что ступенчатая экстракция ранее не применялась для идентификации форм связывания кадмия и ртути в водяном гиацинте.

1.4.2 Экстракция форм кадмия и ртути

Одной из наиболее важных задач при идентификации форм связывания микроэлементов в растениях и биологических объектов в целом является сохранение химического равновесия между химическими формами при проведении процедуры экстракции. Для решения этой задачи используют мягкие экстрагенты, стараясь избежать воздействия сильных кислот и щелочей, комплексообразователей. Если говорить о кадмии и ртути, то большее внимание в литературе уделяется идентификации химических форм ртути. Однако исследователи чаще всего не ставят перед собой целью определение индивидуальных форм, а обращают внимание на «неорганическую ртуть» - долю элемента присутствующую в пробе в виде Hg^{2+} и ее производных и «органическую ртуть» - метилированные формы ртути. Такой подход не позволяет получить информацию об исходной природе соединений ртути и обусловлен большим интересом к оценке возможных токсических эффектов по сравнению с изучением процессов приводящих к образованию таких форм элементов и их роли в живых организмах.

1.4.2.1 Твердо-жидкостная экстракция

Экстракцию Hg(II) и метилртути (**MeHg**) из биологических объектов часто проводят используя раствор NaOH . В каждом отдельном случае, как правило, эффективность экстракции подтверждают путем введения добавок соответствующих соединений и анализа стандартных образцов состава [104, 105]. Для увеличения скорости экстракции MeHg из рыбы применяют обработку ультразвуком. Процедуру проводят с использованием 7 М HCl с последующим ферментативным гидролизом протеазой в присутствии 2-меркаптоэтанола [106].

Для эффективной экстракции Hg(II) , MeHg и этилртути (**EtHg**) в некоторых случаях используют серосодержащие реагенты, которые позволяют достичь высоких степеней извлечения за счет образования химических связей соединений ртути с тиольными группами. Предложена методика, согласно которой формы ртути извлекаются в виде комплекса с тиомочевинной, причем для образования незаряженных комплексов добавляется иодид ион. Далее эти соединения предлагается концентрировать методом твердофазной экстракции на колонке, заполненной гидрофобной смолой на основе полидивинилбензола, расположенной непосредственно перед петлей ввода в колонку высокоэффективного жидкостного хроматографа. После разделения соединения ртути переводят в атомарную ртуть пропусканием через постколоночную сис-

тому, состыкованную с атомно-флуоресцентным спектрометром. Пределы обнаружения достигают 0,050-0,10 мг/кг для пробы массой 20 мг [107].

1.4.2.2 Экстракция с применением микроволнового излучения и ультразвука

Для повышения эффективности извлечения форм микроэлементов из природных объектов применяют методы микроволновой и ультразвуковой экстракции. MeHg и EtHg из донных отложений предлагается экстрагировать с применением ультразвука раствором тетраметиламмоний гидроксида с добавлением мелкодисперсной меди при 70°C в течение 30 минут [108]. Количественное определение этих форм ртути в данной работе проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием методом атомно-флуоресцентной спектрометрии после восстановления методом холодного пара (**ВЭЖХ-ХП-АФС**). Экстракцию форм ртути из 0,5 г ткани рыбы проводят раствором 10 мл 6 М соляной кислоты в ультразвуковой ванне при 50°C (40 кГц, 160 Вт) [109]. Полного извлечения форм ртути в этом случае удалось добиться за 60 секунд. Перед анализом методом атомно-флуоресцентной спектрометрии с восстановлением ртути методом холодного пара (**ХП-АФС**) экстракт центрифугировали при 3000 об/мин в течение 3 минут. Для достижения максимальной эффективности экстракции варьируют время, температуру, частоту и мощность ультразвукового излучения и химический состав экстрагента (используют добавки метанола, муравьиной кислоты, соляной кислоты и хлорида натрия). Общей закономерностью является падение эффективности при использовании больших величин вышеперечисленных параметров, что связывают с образованием и испарением элементной ртути [110].

Несколько групп исследователей разработали подходы к микроволновой экстракции химических форм As, Hg и Se в различных матрицах [111, 112]. Если говорить о ртути, то применение микроволнового излучения позволяет ускорить процесс извлечения форм элемента и увеличить эффективность экстракции. Однако применять подобный подход следует с осторожностью, так как интенсивное воздействие излучения может привести к изменению равновесия между разными формами [113].

1.4.2.3 Твердофазная экстракция

Новая процедура извлечения Hg^{2+} и CH_3Hg^+ была предложенная для получения информации о содержании этих ионов в вине [114] с применением материалов,

имеющих структуру ядро-оболочка, которые были синтезированы на основе силика-геля, модифицированного 3-(триметоксисилил)пропил триметакрилатом. Наилучшие свойства продемонстрировал материал, полученный сополимеризацией метакриловой кислоты и триметилпропан триметакрилата в присутствии комплекса ртути с 1-пирролидиндитиокарбоновой кислотой. Для разделения неорганической ртути и метилртути 20 мл пробы пропускают через колонку с полученным материалом со скоростью 2 мл/мин. При этом Hg^{2+} удерживается на колонке, а CH_3Hg^+ - нет. Колонку промывают 10 мл ацетонитрила для элюирования Hg^{2+} , 2 мл 0,2 М тиомочевины в 0,1 М соляной кислоте. Содержание ртути определяют методом атомно-абсорбционной спектроскопии с восстановлением методом холодного пара. Предел обнаружения составляет 0,02 мкг/л. Общее содержание ртути в этом случае определяют путем разложения пробы в присутствии азотной кислоты, а содержание метилртути рассчитывают по разнице между полученными значениями.

Селективного отделения Hg(II) удастся добиться при использовании полиакриламида привитого к поли-4-винилпиридину при рН 1-2. Экстракция производится путем интенсивного перемешивания 50 мг смолы в 10 мл раствора пробы. Перевод Hg(II) в раствор производят путем обработки смолы концентрированной азотной кислотой. Одним из недостатков этого подхода является деградация смолы после обработки азотной кислотой, что не позволяет использовать ее повторно [115]. После фильтрования азотную кислоту выпаривают, а остаток растворяют в воде. При использовании такого подхода для концентрирования пробы при детектировании методом атомно-флуоресцентной спектроскопии (АФС) удастся добиться пределов обнаружения на уровне 2 нг/л.

Для концентрирования Hg(II) и MeHg предлагается использовать колонку, в которой в качестве сорбента выступают модифицированные L-цистеином волокна целлюлозы. Элюирование неорганических форм ртути и метилртути осуществляется смесью азотной кислоты и L-цистеина с детектированием методом ХП-АФС [116]. Процедура была применена для серии проб воды и экстрактов водорослей. Пределы обнаружения составляют 1 и 3 нг/л для ртути и метилртути соответственно. Однако для достижения таких низких величин требуется концентрировать большие объемы растворов и экстрактов на колонке: 1000 мл пробы пропускают через колонку с последующим промыванием 100 мл элюента. Стоит отметить, что подобные подходы требуют использования большого объема пробы, что зачастую оказывается значи-

тельным ограничением при работе с реальными объектами и экстрактами проб биологической природы [117].

Применение твердофазной микроэкстракции позволяет осуществить концентрирование метил и этилртути. Аналиты экстрагируются в течение 45 минут на полидиметилсилоксан-дивинилбензоле из 15 мл пробы при 75°C. Затем сорбент помещают в десорбционную ячейку емкостью 60 мкл, заполненную подвижной фазой. После 5 мин десорбции проба вводится в хроматограф, состыкованный с масс-спектрометром с индуктивно связанной плазмой. Предел обнаружения составляет 60 нг/л [118].

Экстракцию химических форм ртути можно осуществить и с применением иммобилизованного на полиуретановой пене N,N'-дициклогексилкарбодиимида. При работе с водами и донными осадками удается добиться степени извлечения в диапазоне от 96,3 до 97,3% для MeHg, EtHg и фенилртути (**PhHg**) [16]. Показано, что Hg²⁺ и MeHg удерживаются на силикагеле с обращенной фазой C₁₈, модифицированной дитизоном, 2-меркаптоэтанолом, 3-меркаптопропионовой кислотой, диэтилдитиокарбаматом натрия или аммонийной солью 1-пирролидинкарботионовой кислоты [120].

В некоторых случаях для твердофазной экстракции используют и достаточно необычные сорбенты. Например, бактерии, иммобилизованные на твердой фазе: *Staphylococcus aureus* на сорбенте Dowex Optipore V-493, *Streptococcus pyogenes* на сорбенте Dowex Optipore SD-2. Разделение химических форм ртути в этом случае достигается за счет последовательного элюирования. На первом этапе 0,1 М HCl элюируют MeHg, затем 2 М HCl – неорганические формы ртути [121, 122].

1.4.2.4 Ферментативная экстракция

Все большее применение на практике обретает ферментативная экстракция. Для извлечения метилртути из риса применяли такие ферменты, как трипсин, пепсин, протеаза К, химотрипсин, α-амилаза. Наилучших результатов удалось добиться при использовании трипсина: 200 мг измельченной пробы смешивали с 5 мг трипсина, добавляли 5 мл аммонийно-ацетатного буфера (pH = 8) и перемешивали при 27°C в течение 24 часов при 20 об/мин в темноте. Явным преимуществом применения трипсина является то, что при экстракции не происходит разрушения соединений ртути с цистеином и глутатионом, кроме того полученный раствор легко фильтруется [123].

Lemes и Wang показали, что метилртуть во внутриклеточном веществе связана преимущественно с тиол-содержащими молекулами биологического происхождения.

Для экстракции и идентификации этих соединений требуется метод, который бы позволил разделять и детектировать такие формы как комплексы ртути с цистеином и глутатионом. Была разработана процедура, первым этапом которой является ферментативный гидролиз трипсином. Этот подход был применен для идентификации форм связывания ртути в мышцах акулы и позволил получить первые доказательства того, что в тканях рыбы присутствует соединение, представляющее собой аддукт метилртути и аминокислоты цистеина [124].

1.4.2.5 Экстракция с применением ионных жидкостей

Экстракцию форм ртути, а также мышьяка и селена из проб растительной природы, вод и косметических средств возможно осуществить с использованием ионных жидкостей [125]. Для извлечения Hg(II) , MeHg^+ и EtHg^+ используют пирролидин дитиокарбамат аммония для осуществления реакции комплексообразования в растворе. Далее аналиты экстрагируют 1-гексил-3-метилимидазолием [126]. Такой подход позволяет экстрагировать и одновременно концентрировать аналиты. При этом коэффициент концентрирования варьируется от 115 для Hg(II) до 760 для MeHg , что приводит к достижению пределов обнаружения на уровне 1-7 нг/л при анализе полученного экстракта методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (**ВЭЖХ-ИСП-МС**).

Существует подход, позволяющий сконцентрировать пары ртути, полученные в ходе реализации метода холодного пара в капле ионной жидкости. В этом случае осуществляют селективное восстановление неорганической ртути до молекулярной формы в реакции с хлоридом олова из 10 мл пробы, при этом органические формы остаются в растворе. Добавление KMnO_4 к тетрадецил(тригексил)фосфоню увеличивает эффективность концентрирования ртути более чем в два раза. Определение ртути проводят методом атомно-абсорбционной спектрометрии с электротермической атомизацией (**ЭТА-ААС**). Капля объемом 6 мкл вводится напрямую в графитовую кювету вместе с 10 мг палладия. Температурная программа включает в себя помимо двух стадий сушки при 110 и 130°C пиролиз при 400°C. Предел обнаружения составляет 10 нг/л [127].

Использование кислот и щелочей для выделения химических форм ртути позволяет идентифицировать и определить содержание Hg(II) и метилированных форм [128]. Стоит отметить, что недостатком подобных методик является разрушение комплексов ртути и метилртути с биологическими лигандами, такими как органические кислоты, пептиды, полисахариды, при экстракции, что приводит к потере необходимой информации при изучении процессов, происходящих в живых системах.

В работах, посвященных идентификации химических форм ртути в природных объектах, как правило, особое внимание уделяется определению содержания Hg(II), которую часто называют «неорганическая ртуть» и MeHg^+ , что обусловлено высокой токсичностью метилированной формы ртути. При этом экстракцию часто проводят с использованием кислот, щелочей и комплексообразователей, что приводит к диссоциации исходных форм ртути и метилртути - соединений с карбоновыми кислотами, пептидами, углеводами. Таким образом, большинство описанных в настоящее время подходов к экстракции соединений кадмия и ртути из объектов живой природы не позволяют в дальнейшем получить информацию о составе и концентрации исходных химических форм элемента, так как использование агрессивных экстрагентов приводит к изменению равновесия между химическими формами элемента в растворе и образованию новых соединений.

1.5. Методы определения форм микроэлементов

Признание того факта, что определение общего содержания элемента является недостаточным для оценки биодоступности и/или токсичности дало стимул к активному развитию в последнее десятилетие методологии определения химических форм элементов. Стоит отметить, что интерес к изучению форм элементов возник задолго до появления терминологии, связанной с определением индивидуальных соединений элемента. Так, ранее активно изучали биогеохимические циклы элементов в гидросфере. С точки зрения аналитической химии основным подходом являлось фракционирование: отделение сорбированных на взвешенном веществе металлов путем фильтрования через фильтры с диаметром пор 0,45 мкм [129]. Позже, с развитием электрохимических методов анализа, стало возможным более глубокое изучение водной фракции. В общем случае стали выделять свободные и комплексные формы ионов металлов. Параллельное развитие подходов к математическому моделированию химического равновесия форм элементов в растворе (в основном применительно к

органическим и неорганическим лигандам, окислительно-восстановительным процессам) позволило сделать вывод о широком разнообразии соединений элементов даже в такой, на первый взгляд простой системе, как природная вода [8]. В 1976 году была предложена схема для идентификации химических форм микроэлементов в водах. При этом рассматривалось семь основных физико-химических форм: свободные ионы; лабильные органические комплексы; инертные органические комплексы; лабильные неорганические комплексы; инертные неорганические комплексы; формы, сорбированные на органическом веществе; формы, сорбированные на неорганическом веществе [130].

Определение форм существования химических элементов в биологических объектах начинали с биогенных элементов, присутствующих в живых организмах в макроколичествах (более 0,01%). При этом на начальных этапах развития бионеорганической химии исследование комплексов макроэлементов с биологическими лигандами проводили путем их выделения в виде индивидуальных веществ с последующим исследованием методами спектроскопии ядерно-магнитного резонанса, рентгеновскими методами, электронной или инфракрасной спектроскопии. Подобный подход к решению проблемы определения форм оказался неприемлемым для элементов, присутствующих в объектах исследования в микроколичествах (на уровне < 0,01%) [131].

1.5.1. Гибридные методы анализа

Практически каждый из микроэлементов, присутствующих в живом организме, распределяется между несколькими формами, поэтому проблема их определения в биологических объектах начинается с поиска общих подходов к ее решению. В настоящее время предложено два общих подхода. Первый – разработка методов непосредственного количественного определения химических форм микроэлементов, основанных на принципе создания чувствительных к ним биосенсоров. Однако успехи в развитии этого направления пока достаточно скромные. Поэтому основное внимание уделяется развитию гибридных методов анализа, селективность которых по отношению к определённым формам обеспечивается их предварительным разделением в сочетании с последующим детектированием индивидуальных форм с помощью элемент-селективных детекторов.

Широкий спектр гибридных методов анализа был разработан для решения задач, связанных с определением форм элементов в различных объектах. В первых работах, посвященных вопросам идентификации химических форм элементов, было показано, что анализ проб, характеризующихся сложным химическим составом, требует применения разделительных методов, однако неселективные детекторы не позволяют получить информацию об элементном составе того или иного аналита. В связи с этим возникла необходимость создания гибридных систем, сочетающих разделение компонентов пробы с последующим элемент-селективным детектированием. Пионерские работы в этом направлении были опубликованы Van Loon [132] и Suzuki [133] в конце 70х, начале 80х годов XX века и посвящены созданию приборов, сочетающих разделение компонентов пробы методами ВЭЖХ и газовой хроматографии (ГХ) с элемент-селективным детектированием методом атомно-абсорбционной спектрометрии (ААС) [134].

1.5.1.1 Методы разделения форм элементов в гибридных методах анализа

В настоящее время гибридные методы анализа являются основным инструментом при решении задач, связанных с идентификацией форм элементов, что во многом обусловлено возможностью использования чувствительных и селективных детекторов, достоинства которых могут быть полностью реализованы при состыковке с высокоэффективными системами разделения. В качестве методов разделения чаще всего используют ВЭЖХ, КЭ и ГХ, причем каждый из вышеперечисленных методов имеет свои преимущества и недостатки для решения конкретной задачи.

1.5.1.1.1 Высокоэффективная жидкостная хроматография

Применение ВЭЖХ в качестве метода разделения в гибридных методах анализа открывает широкие возможности для исследователей за счет простоты реализации и возможности варьирования различных параметров. Преимуществом ВЭЖХ также является возможность термостатирования колонки при разделении, что приводит к возможности анализа термически нестабильных соединений. Кроме того, за счет разнообразия механизмов разделения, доступных для реализации в практике ВЭЖХ, этот метод может быть использован для анализа различных по природе соединений, например, биологических молекул, метаболитов ксенобиотиков, металлоорганических соединений. Такая гибкость метода позволяет применять его для решения задач в об-

ласти анализа объектов окружающей среды, пищевой и фармацевтической промышленности, медицины и токсикологии [135].

При применении жидкостной хроматографии для разделения компонентов пробы в гибридных методах анализа чаще всего используют вариант обращенно-фазовой, ион-парной обращенно-фазовой, ионообменной или эксклюзионной хроматографии. Такие свойства, как полярность, растворимость и молекулярная масса аналитов являются определяющими при выборе механизма разделения. Краткое описание неподвижных и подвижных фаз, применяемых для реализации того или иного механизма разделения приведено в таблице 2.

Т а б л и ц а 2

Механизмы, реализуемые при применении ВЭЖХ в качестве метода разделения в гибридных методах анализа

Механизм хроматографии	Неподвижная фаза	Подвижная фаза	Аналиты
Обращенно-фазовая	Силикагель, модифицированный алкильными группами: октильными (C ₈), октадецильными (C ₁₈); сополимеры стирола и дивинилбензола.	Полярные растворители: вода, метанол, ацетонитрил	Малополярные и неполярные молекулы
Ион-парная обращенно-фазовая		Полярный растворитель + ион-парный реагент анионной (R-SO ₃ ⁻ , R-SO ₄ ⁻ и др.) или катионной природы (R-NH ₃ ⁺ , R-N(CH ₃) ₃ ⁺ и др.)	Соединения ионной и неионной природы
Ионообменная	Силикагель, модифицированный анионными группами (-SO ₃ ⁻ , -CO ₂ ⁻ и др.) или катионными группами (-NH ₃ ⁺ , -N(CH ₃) ₃ ⁺ и др.)	Водные растворы солей: фосфатов, ацетатов, боратов, формиатов, карбонатов в случае анионообменной; гидроксония, пиридиния, аммония в случае катионообменной хроматографии	Органические и неорганические ионы
Эксклюзионная	Органические гели (полидекстроза, сополимер полистирола и дивинилбензола); модифицированный силикагель	Вода или органические растворители	Макромолекулы (M > 2000 г/моль)

Обращенно-фазовая хроматография является одним из наиболее часто используемых для разделения компонентов пробы вариантом в жидкостной хроматографии. Аналиты распределяются между неполярной стационарной фазой и полярной подвижной фазой: более удерживаемые формы имеют большее сродство к стационарной фазе по сравнению с подвижной фазой. В случае реализации такого механизма селек-

тивность разделения может быть увеличена путем изменения состава и концентрации органического растворителя в подвижной фазе. Подвижная фаза может представлять смесь определенного органического растворителя с водой, однако чаще применяют градиентное элюирование, при котором постепенно увеличивают концентрацию органического растворителя в подвижной фазе. Удерживание аналита также зависит от рН элюента, значение которого определяет степень его диссоциации. Преимуществами обращено-фазовой хроматографии является гибкость параметров, что позволяет повысить эффективность разделения. Однако недостатком этого механизма разделения является то, что при использовании в качестве элемент-селективного детектора ИСП-АЭС или масс-спектрометра с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) возникают значительные ограничения относительно концентрации органического компонента в составе подвижной фазы, что обусловлено нестабильностью горения плазмы при высоких содержаниях углерода в аэрозоле пробы.

Ион-парная обращено-фазовая хроматография позволяет разделять заряженные полярные химические формы элементов. Ионная пара при этом образуется между аналитом и соответствующим ионом противоположного заряда, содержащемся в подвижной фазе, в составе которого имеются гидрофобные фрагменты. Образовавшаяся ионная пара, таким образом, становится гидрофобной и распределяется между подвижной и неполярной стационарной фазой по законам схожим с механизмом обращено-фазовой хроматографии. Эффективность разделения аналитов зависит от выбора ионной пары, состава неподвижной фазы, рН элюента, которое влияет на степень диссоциации аналитов. Противоион должен также удовлетворять некоторым требованиям, а именно: растворяться в подвижной фазе, быть инертным по отношению к материалу колонки. Так как в случае ион-парной хроматографии рН элюента влияет на разделение аналитов, то элюент должен обладать буферными свойствами. Достоинства этого механизма разделения схожи с достоинствами обращено-фазовой хроматографии, однако отличительной чертой является еще большая вариативность параметров разделения. Однако введение ионной пары может привести к смещению равновесия между формами элемента в пробе и образованию новых форм.

Суть механизма ионообменной хроматографии заключается в распределении аналитов ионной природы между подвижной фазой и неподвижной фазой, имеющей места для связывания противоположного заряда. В качестве элюентов чаще всего используют различные буферные растворы. На процесс разделения можно повлиять,

меня состав и концентрацию элюента. В некоторых случаях в состав элюента добавляют органические растворители для изменения вязкости элюента, времени удерживания аналитов и повышения эффективности разделения. Однако добавление органических растворителей, так же как и в случае обращено-фазовой хроматографии, нежелательно при использовании в качестве детекторов ИСП-АЭС и ИСП-МС, так как может привести к гашению плазмы. Часто для достижения оптимального результата используют режим градиентного элюирования, постепенно увеличивая ионную силу элюента в ходе процесса хроматографирования. Стоит отметить, что высокие концентрации солей в составе подвижной фазы не всегда совместимы с элемент-селективными детекторами, такими как ИСП-АЭС и, особенно, с ИСП-МС [136]. Ионообменную хроматографию чаще всего применяют для решения задач, связанных с определением химических форм Cr(III)/Cr(VI), Sb(III)/Sb(V), а также для разделения форм селена (Se(IV), Se(VI), соединения селена с аминокислотами) и мышьяка (As(III), As(V), монометиларсената (ММА), диметиларсенита (ДМА), арсеносахаров, арсенолипидов) [135].

Эксклюзионная хроматография применяется для разделения молекул по молекулярной массе: крупные молекулы, размеры которых превосходят размеры пор сорбента, не удерживаются на колонке, а небольшие молекулы, проникающие внутрь пор, выходят позже. Так как разделение обусловлено преимущественно физическими взаимодействиями, то состав подвижной фазы не оказывает существенного влияния на разделение форм элемента. В качестве элюентов обычно используют буферные растворы. Эксклюзионная хроматография позволяет получить информацию о молекулярной массе аналита. В сравнении с другими механизмами разделения, реализуемыми в хроматографии, взаимодействия между аналитом и сорбентом в эксклюзионной хроматографии являются наиболее слабыми, что является значимым преимуществом при определении именно химических форм элементов, так как позволяет минимизировать трансформацию одних форм в другие. Недостатком является то, что удерживание соединений ионной природы с высоким отношением заряда к массе может усложнять процесс разделения за счет вклада вторичных факторов (сорбция, диффузия). Метод эксклюзионной хроматографии чаще всего применяется для разделения крупных белков и полипептидов, например, для разделения и идентификации макромолекул биологической природы с использованием гидрофильных сорбентов и элюентов на водной основе.

Возможность реализации различных механизмов разделения в ВЭЖХ позволяют добиваться разделения форм элементов различной природы, что в сочетании с чувствительными элемент-селективными детекторами приводит к возможности идентификации микроколичеств этих форм в пробах природных и биологических объектов [137].

1.5.1.1.1 Особенности состыковки высокоэффективных жидкостных хроматографов с детекторами

Среди различных методов разделения, используемых в гибридных системах, ВЭЖХ оказывается наиболее распространенным и удобным в реализации, что во многом обусловлено относительной простотой организации интерфейса между системой разделения и детектирования. Как правило, состыковка приборов осуществляется путем соединения выхода из колонки хроматографа, с системой ввода пробы в детектор. Для ИСП-АЭС и ИСП-МС состыковка осуществляется через пневматический распылитель спектрометра. Причем длину соединительного капилляра следует по возможности минимизировать с целью уменьшения мертвого объема, приводящего к уширению пиков аналитов. Основным недостатком состыковки ВЭЖХ с ИСП-АЭС или ИСП-МС является введение в плазму вместе с аналитами различных компонентов элюата, что может приводить к тушению плазмы. Подвижная фаза, как правило, представляет собой буферный раствор, содержащий органический растворитель, концентрация которого может меняться в ходе анализа при использовании градиентного режима элюирования. Высокие концентрации солей и органических растворителей могут приводить к загрязнению конусов и горелок, нестабильности плазмы [138, 139]. Подобные эффекты, связанные с высоким солевым фоном, часто наблюдаются в гибридных методах на основе ионообменной хроматографии [140, 141]. В результате изменяется чувствительность измерений, а также стабильность работы элемент-селективного детектора во времени. Во избежание подобных проблем следует промывать систему 1% азотной кислотой и использовать элюенты с общей концентрацией солей не превосходящей 2%. Альтернативным подходом является применение органических веществ вместо неорганических солей в составе подвижной фазы [142]. При этом выбирают такие органические соединения, которые обладают высокой летучестью, чтобы избежать засорения распылителей и загрязнения конусов [143], т.к. высокие концентрации органических растворителей в элюенте приводят к осаждению

углерода на горелке и конусах [144,145]. Поэтому параметры разделения ВЭЖХ должны быть адаптированы в соответствии с требованиями, предъявляемыми к детекторам, которые позволяют вводить в плазму лишь небольшие количества органических растворителей (1-3%) [146]. Для устранения или частичного нивелирования подобных влияний используют распылительные камеры с внешним водяным контуром охлаждения. Добавление небольших количеств кислорода в распылительный поток газа-носителя и работа при высоких значениях мощности плазмы также приводят к получению удовлетворительных результатов [144].

Для решения проблем, связанных с высокой загрузкой плазмы при введении элюата в детектор с большим содержанием органических растворителей, используют также подход, основанный на миниатюризации хроматографических систем. Микроколонок имеют преимущества по сравнению со стандартными колонками в ВЭЖХ при применении в гибридных методах анализа, так как характеризуются меньшими потоками элюентов и позволяют вводить в детектор меньшие количества органических растворителей и солей [147]. Внутренний диаметр микроколонок варьирует в диапазоне 0,5-2 мм. Также как и стандартные, эти колонки могут использоваться в различных вариантах разделения за счет применения соответствующих сорбентов. Другим преимуществом микроколонок является меньшая поперечная диффузия аналитов [148, 149]. Как правило, в хроматограф вводится 5-10 мкл пробы. В этом случае применение микроколоночной хроматографии накладывает некоторые ограничения на всю систему.

Ключевым этапом при состыковке микроколоночного хроматографа с элемент-селективным детектором является ввод пробы. В случае ИСП-МС в первую очередь оценивается эффективность ввода аэрозоля пробы в плазму через распылитель [150]. Пневматический распылитель в сочетании с распылительной камерой традиционно используется в ИСП-АЭС и ИСП-МС. Однако, обычно эффективность транспорта аэрозоля пробы достаточно низка (< 5%), а оптимальная работа детектора осуществляется при скорости подачи пробы 1-2 мл/мин. При использовании стандартных колонок это не вызывает особых затруднений, но в случае малых объемов пробы и низких скоростях элюирования, характерных для микроколоночной хроматографии, приводит к резкому увеличению пределов обнаружения аналитов. При использовании стандартного пневматического распылителя при малых скоростях подачи пробы возникает проблема, связанная с неоднородным формированием аэрозоля в распыли-

тельной камере. Разработано несколько распылителей для более низких скоростей подачи пробы, которые позволяют получать однородный первичный аэрозоль и характеризуется высоким коэффициентом его транспорта в плазму, таким образом увеличивая чувствительность при малых скоростях подачи пробы [151].

Еще одним подходом, обеспечивающим высокую чувствительность при использовании микроколоночной хроматографии, является применение распылителя для прямого ввода пробы в плазму без распылительной камеры [152, 153]. Абсолютные пределы обнаружения в этом случае оказываются на порядок ниже по сравнению с системой с распылительной камерой. Такое различие объясняется 100% введением пробы в плазму без потери какой-либо доли аналита в процессе распыления.

1.5.1.1.2 Капиллярный электрофорез

Значение капиллярного электрофореза (КЭ) как метода разделения в аналитической химии в последнее десятилетие активно возрастает. Эффективность разделения до 1000000 теоретических тарелок и возможность анализа положительно и отрицательно заряженных частиц в одной пробе являются неоспоримыми преимуществами этого метода. Состыковка КЭ с чувствительным элемент-селективным детектором, таким как ИСП-АЭС и ИСП-МС, значительно увеличивает возможности метода, расширяя круг его применений для определения химических форм элементов. Однако, с момента первого упоминания метода КЭ-ИСП-МС в 1995 году [154], стали очевидны технические сложности состыковки этих приборов [155]. В связи с этим в последующие несколько лет происходила активная разработка интерфейсов, позволяющих в полной мере использовать преимущества КЭ как метода разделения и ИСП-МС как метода детектирования.

КЭ применяют для разделения заряженных частиц. При этом аналиты мигрируют с разными скоростями внутри тонкого кварцевого капилляра под действием электрического поля. Скорость движения заряженной частицы определяется электрофоретической подвижностью, которая пропорциональна соотношению заряда частицы к гидродинамическому радиусу. Наиболее распространенным вариантом КЭ является капиллярный зонный электрофорез, в котором скорость миграции иона определяется его электрофоретической подвижностью и скоростью электроосмотического потока. Состав разделительного электролита влияет на скорость электроосмотического потока и качество разделения компонентов пробы. Разделительный электролит, как пра-

вило, представляет собой буферный раствор. При этом рН буферного раствора выбирают таким образом, чтобы обеспечить присутствие аналитов в ионной форме. КЭ может быть состыкован с ИСП-АЭС и ИСП-МС через специальный интерфейс, который замыкает электрическую цепь и разбавляет разделительный электролит до такой степени, чтобы создать поток, оптимальный для введения в распылительную систему детектора, что приводит к снижению чувствительности при детектировании [156, 157]. По этой причине в гибридных системах на основе КЭ используют высокочувствительные детекторы, такие как ИСП-МС и масс-спектрометры с ионизацией электрораспылением [158, 159].

1.5.1.1.2.1 Особенности состыковки систем капиллярного электрофореза с детекторами

Наиболее важной особенностью КЭ в качестве метода разделения в гибридных методах анализа является необходимость транспорта малых количеств пробы (порядка нескольких нанолитров) к детектору без потери эффективности разделения компонентов пробы. Первая состыковка КЭ и ИСП-МС была осуществлена с использованием стандартного пневматического распылителя [154] и показала, что требуется более тонкий подход к созданию интерфейса. Были обозначены следующие требования:

- интерфейс должен быть адаптирован к низким скоростям потока в КЭ (нл/мин) путем применения разбавителя (буферного раствора, схожего по составу с разделительным электролитом), так как оптимальное функционирование детектора достигается при скорости вводимой пробы, варьируемой в диапазоне мкл/мин – мл/мин;
- электрическая цепь должна быть замкнута путем заземления выходного конца капилляра. Стабильный электрический ток имеет важное значение для получения воспроизводимых результатов;
- интерфейс не должен способствовать возникновению ламинарного потока внутри капилляра;
- вклад интерфейса в величину мертвого объема, который оказывает сильное влияние на уширение пиков, должен быть минимизирован.

Конструкция интерфейса чаще всего основывается на использовании распылителя и камеры, обеспечивающих наиболее эффективный транспорт раствора с минимальными потерями. Чаще всего применяют микро-распылители [160, 161], оптимальная работа которых достигается при скоростях потока 0,05-0,20 мл/мин, ультра-

звуковые распылители [156], а также, распылители, позволяющие осуществлять прямой ввод пробы без использования распылительной камеры [162, 163]. Как правило, используют распылительные камеры с минимальным мертвым объемом, например, циклонного типа, для уменьшения эффекта памяти и мертвого объема системы. Schaumlöffel и Prange предложили интерфейс, сочетающий модифицированный микро-распылитель с камерой, обеспечивающей эффективный транспорт аэрозоля в плазму спектрометра [164].

Большинство интерфейсов предполагают наличие добавочного потока раствора-разбавителя, обеспечивающего разбавление потока раствора, выходящего из системы КЭ (< 150 нл/мин). Зачастую интерфейс имеет крестообразную форму, при этом поток разбавителя направлен перпендикулярно потоку зоны буфера КЭ. Поток разбавителя подается за счет разрежения, создаваемого распылителем, без участия дополнительного насоса [165]. Такая конструкция оказывается оптимальной с точки зрения уменьшения мертвого объема и противодействия возникновению ламинарного потока в капилляре, который обусловлен разрежением, создаваемым распылителем спектрометра.

Пределы обнаружения в ИСП-МС определяются абсолютным количеством аналитов, вводимым в плазму в единицу времени. Поэтому эффективность введения пробы в ИСП-МС собственно и определяет пределы обнаружения метода капиллярного электрофореза с детектированием методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (КЭ-ИСП-МС). Интерфейсы, включающие в себя распылитель и камеру, характеризуются эффективностью транспорта аналита в детектор < 100%. Эта величина зависит от конструкции распылителя и скорости потока пробы. Чувствительность системы ввода раствора в элемент-селективный детектор может быть увеличена до 100% путем использования специальных распылителей без применения распылительной камеры.

1.5.1.1.3 Газовая хроматография

Газовая хроматография применяется для разделения химических веществ, обладающих высокой и средней летучестью и термической стабильностью. Большинство металлоорганических соединений, встречающихся в природе, требуют предварительной дериватизации с целью получения летучих производных. Помимо боргидрида натрия (NaBH_4), который используют для генерации летучих гидридов, для дериватиза-

ции часто применяют тетраалкилбораты [166]: NaBEt_4 для получения этильных производных соединений ртути; NaBPr_4 для получения пропильных производных соединений олова, ртути и свинца; NaBBu_4 для получения бутильных производных в неводных средах с присутствием реактива Гриньяра [167, 168]. Применение тетрапропилбората делает возможным одновременное определение соединений Sn, Hg и Pb [169]. Этерификация карбоксильной группы селенометионина 2-пропанолом после ацилирования аминогруппы [170] приводит к изменению структуры молекулы, делая возможным определение этого соединения методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС).

Большинство летучих металлорганических соединений или гидридов (при температуре ниже 100°C) разделяют в изократическом режиме элюирования на насадочных колонках. Одновременное введение больших количеств органических веществ может привести к падению мощности плазмы и её тушению.

Применение капиллярных колонок позволяет добиться лучшего разделения и позволяет одновременно определять алкильные производные соединений разных элементов. Однако такие колонки имеют меньшую емкость и могут быть перегружены пробой, что в общем случае требует введения меньших объемов пробы, по сравнению с насадочными колонками. Увеличение чувствительности и разрешения в капиллярной ГХ, а также значительное уменьшение времени анализа, может быть достигнуто путем применения поликапиллярных колонок. Еще одним преимуществом поликапиллярных колонок является возможность введения бóльших объемов пробы, что особенно важно при работе с природными объектами, характеризующимися низкими содержаниями химических форм элементов. Кроме того, в этом случае требуется меньшее разбавление газа носителя при введении в детектор. Короткое время анализа в сочетании с возможностью использования высоких скоростей потока газаносителя позволяет проводить разделение аналитов с различающимися температурами кипения в изотермическом режиме [171].

На практике при определении металлорганических соединений в качестве детекторов используют атомно-эмиссионные спектрометры с микроволновой плазмой (МП-АЭС) и ИСП-МС. В редких случаях при определении химических форм ртути применяют ААС и АФС. При необходимости проведения многоэлементного детектирования предпочтение отдается ИСП-МС. Наилучших результатов удастся добиться при использовании столкновительной ячейки. Получить более точные результаты

удаётся путем многомерного детектирования. В этом случае газовый поток из хроматографа подается сразу в два детектора, например, квадрупольный и времяпролетный масс-спектрометр или секторный масс-спектрометр с многоканальным детектором. Градуировка ГХ-ИСП-МС проводится путем оценки интенсивности сигналов, полученных от различных изотопов одного элемента. Метод изотопного разбавления в ГХ-ИСП-МС применяется преимущественно при анализе летучих форм свинца, олова и селена. Возможность применения этого метода ограничивается наличием стандартов, обогащенных определенным изотопом [172].

Основной сложностью применения ГХ в качестве метода разделения в гибридных методах анализа является необходимость дериватизации с целью получения летучих производных форм элементов. По причине высокой токсичности получаемых производных, предъявляются высокие требования к автоматизации процедуры предколоночной дериватизации и ввода пробы. Одним из доступных решений является проточный реактор для алкилирования или восстановления, применяемый при анализе форм Pb, Hg, Se и As. Образующиеся в ходе реакции алкилирования летучие формы переносятся потоком газа в капилляр, где происходит их конденсация при -100°C и последующее введение в поликапиллярную колонку при нагревании. Такой подход позволяет сократить время дериватизации и пробоподготовки в целом с нескольких часов до нескольких минут [173].

1.5.1.1.3.1 Особенности состыковки газовых хроматографов с детекторами

Основной задачей, возникающей при состыковке ГХ с элемент- или молекулярно-специфичным детектором, является необходимость создания интерфейса, препятствующего образованию конденсата паров разделяемых соединений при понижении температуры на выходе из хроматографа. Обычно интерфейс имеет форму нагреваемого капилляра, соединенного с детектором одним из следующих способов:

- напрямую, что позволяет минимизировать мертвый объем системы и сохранить высокую чувствительность [174];
- через распылитель, при этом элюат из хроматографа смешивается с дополнительным потоком жидкости из распылителя с последующим формированием аэрозоля. Такой подход используется для реализации метода изотопных отношений, так как стандарты, обогащенные стабильным изотопом исследуемого элемента, обычно представляют собой водные растворы. Разбавление элюата снижает чувствительность

анализа, однако, в случае миниатюризации интерфейса, не приводит к ухудшению разделения, обусловленному наличием мертвого объема [175];

– через проточную камеру, при этом поток элюата может смешиваться со стандартом, диффундирующим через дополнительную мембрану [176];

Таким образом, на практике, для получения достоверных и воспроизводимых результатов при состыковке ГХ с ИСП-АЭС или ИСП-МС, должны быть выполнены следующие требования:

– аналиты должны вводиться в плазму без потерь и деструкции в ходе разделения;

– интерфейс должен обеспечивать такую скорость ввода элюата, чтобы можно было достичь оптимальных параметров работы спектрометра;

– как правило, скорость потока газа носителя недостаточна, и требуется введение вспомогательного потока газа;

– соединение ГХ с элемент-селективным детектором должно быть «гибким», так при решении различных задач требуется изменение параметров работы приборов;

– все поверхности интерфейса, которые контактируют с аналитами, должны быть инертными для предотвращения сорбции и химического взаимодействия с аналитами.

Вышеперечисленный список не является исчерпывающим. Однако, преодоление подобных трудностей при использовании гибридных методов, сочетающих ГХ, которая позволяет отделить аналиты от матрицы и добиться их 100% введения в плазму, и элемент-селективных детекторов, обладающих высокой чувствительностью и монго-элементностью, позволяет достичь положительных результатов в тех случаях, когда другие методы неприменимы [177].

1.5.2 Преимущества и недостатки различных методов разделения и детектирования

Каждый из гибридных методов обладает особенностями, обусловленными используемыми методами разделения и детектирования. В таблице 3 и 4 приведены основные достоинства и недостатки наиболее часто используемых методов разделения и детектирования с точки зрения их применения в гибридных системах.

Преимущества и недостатки методов разделения, используемых в гибридных методах анализа при исследовании растительных объектов

Метод разделения	Преимущества	Недостатки
<i>Обращенно-фазовая ВЭЖХ</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Высокая селективность разделения 2. Возможность варьирования большого количества параметров – «гибкость» системы 3. Простота организации интерфейса ввиду близких оптимальных величин потока элюата и потока пробы, поступающей в детектор 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Возможная трансформация форм при взаимодействии с элюентом и сорбентом 2. Возникновение эффекта сорбции аналита на сорбенте 3. Применение органических растворителей приводит к ограничениям в выборе параметров разделения при стыковке с элемент-селективными детекторами
<i>Ионообменная хроматография</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Высокая селективность разделения 2. Возможность варьирования большого количества параметров – «гибкость» системы 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Возможность диссоциации химических форм элементов при взаимодействии с элюентом и сорбентом
<i>Эксклюзионная хроматография</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Определение молекулярной массы аналита 2. Использование инертных элюентов – возможность разделения лабильных аналитов 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ограничение по молекулярной массе – разделение только высокомолекулярных соединений 2. Низкая эффективность разделения 3. Низкая пиковая емкость колонок 4. Возможность сорбции аналитов
<i>Капиллярный электрофорез</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Высокая эффективность разделения 2. Использование относительно инертных по отношению к аналитам и детекторам разделительных электролитов 3. Возможность варьирования большого количества параметров – «гибкость» системы 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Низкая скорость потока разделительного электролита и необходимость заземления выходного конца капилляра приводят к использованию сложных интерфейсов 2. Малые объемы пробы приводят к низкой чувствительности
<i>Газовая хроматография</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Возможность введения 100% аналитов в детектор с током газ-носителя 2. Совместимость состава газ-носителя с требованиями детекторов 3. Высокая скорость анализа при использовании поликапиллярных колонок 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Часто необходима предколоночная дериватизация для получения летучих соединений 2. Сложность организации интерфейса ввиду высокой температуры разделения аналитов

Каждый из методов разделения имеет свои преимущества и недостатки. При этом, как правило, каждая конкретная задача может быть решена с применением одного или нескольких наиболее оптимальных методов. Так, в жидкостной хроматогра-

фии возможность выбора сорбента позволяет влиять на селективность разделения аналитов. Стоит отметить, что различные варианты ВЭЖХ дают возможность разделения аналитов по специфическим свойствам, например, эксклюзионная хроматография позволяет определить молекулярную массу вещества и используется для анализа высокомолекулярных соединений. Капиллярный электрофорез обладает уникально высокой эффективностью разделения, тогда как газовая хроматография позволяет добиваться быстрого разделения летучих соединений.

Т а б л и ц а 4

Преимущества и недостатки основных методов детектирования, используемых в гибридных методах анализа при исследовании растительных объектов

Метод детектирования	Преимущества	Недостатки
<i>Атомно-абсорбционная спектрометрия</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Высокая чувствительность (ААС с электротермической атомизацией) 2. Возможность применения метода холодного пара для минимизации матричных эффектов 3. Относительно низкая стоимость аппаратуры 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Низкая чувствительность пламенной ААС 2. Интенсивность сигнала детектора сильно зависит от состава аналита
<i>Атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Многоэлементность 2. Высокая чувствительность 3. Возможность реализации режима <i>online</i> детектирования 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ограничения по использованию органических растворителей, связанные с их дестабилизирующим влиянием на плазму
<i>Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Многоэлементность 2. Высокая чувствительность 3. Реализация режима <i>online</i> детектирования 4. Информация об изотопном составе, возможность реализации метода изотопного разбавления 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Ограничения по использованию органических растворителей и скорости потока элюата, связанные с их дестабилизирующим влиянием на плазму 2. Полиатомные интерференции (в варианте квадрупольной масс-спектрометрии) 3. Необходимость регистрации нескольких изотопов
<i>Масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением</i>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Возможность работы с очень низкими потоками 2. Информация о структуре аналита 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Внутримолекулярные превращения аналитов в газовой фазе 2. Образование кластерных ионов

В качестве детекторов в гибридных методах анализа используются различные системы, обладающие, своими отличительными особенностями. Основным недостатком применения ЭТА-ААС в качестве детектора в гибридных методах анализа является сложность реализации режима *online* на практике. Масс-спектрометрия с иони-

защией электрораспылением позволяет получить информацию о структуре аналита, однако, ввиду того, что информация об элементном составе пробы недоступна для данного детектора, этот метод целесообразно использовать преимущественно в системах, где реализуется многомерное детектирование: один детектор дает информацию об элементном составе аналита (чаще всего ИСП-АЭС или ИСП-МС), второй – о структуре. Метод ИСП-АЭС характеризуется высокой чувствительностью и многоэлементностью, однако, ограничением этого метода является чувствительность по отношению к высоким содержаниям органических растворителей в пробе. Метод ИСП-МС обладает еще большей чувствительностью, но, в тоже время, имеет еще большие ограничения по содержанию органических растворителей в растворе, вводимом в спектрометр, и общей загрузке плазмы по сравнению с методом ИСП-АЭС.

1.5.3 Гибридные методы определения форм кадмия и ртути в растениях

Реакция разных видов растений на повышенное содержание тяжелых металлов и радионуклидов в почвах и водных экосистемах неодинакова. Химическая природа таких различий остается малоисследованной, так как идентификация форм связывания элемента в подобных объектах является нетривиальной задачей. Для определения химических форм элементов в растениях целесообразно использовать гибридные методы анализа. Существуют растения, способные накапливать большие дозы металлов в своих тканях, такие как, например, водяной гиацинт. Несмотря на растущий интерес к вопросам практического применения этого растения для очистки водоемов, существует ограниченное число работ, посвященных идентификации форм связывания элементов в нем. Так, в работе Fujita [67] обсуждается способность гиацинта к синтезу металлотионенинов с молекулярной массой 2300 и 3000 г/моль в ответ на воздействие кадмия. Для экстракции форм связывания кадмия использовали раствор 20 мМ Трис·НСl (рН 8,0), содержащий 0,25 М сахарозы. В работе использовали метод эксклюзионной хроматографии для разделения компонентов экстракта с последующим сбором фракций и определением содержания кадмия в режиме *offline* методом ААС. Более подробное изучение соединений кадмия, образующихся в водяном гиацинте, показало, что, при проникновении в растительный организм, элемент связывается с соединениями с относительно низкой молекулярной массой, не содержащими в своем составе большого количества цистеина [68]. При более длительном воздействии кадмий депонируется в тканях корня растения в виде комплексов с фитохелатинами, не-

большими пептидами, характеризующимися наличием сульфгидрильных групп цистеина и имеющими молекулярную массу 1000 и 6500 г/моль. В листьях растения также были обнаружены соединения кадмия пептидной природы. В данной работе процедуру экстракции проводили также с применением раствора 20 мМ Трис·НСl (рН 8,0), содержащего 0,25 М сахарозы, с разделением компонентов экстракта методом эксклюзионной хроматографии с *offline* атомно-абсорбционным детектированием. Для идентификации соединений кадмия проводили сбор фракций в процессе хроматографирования экстрактов с последующим определением аминокислотного состава и исследованием методом масс-спектрометрии с электрораспылением. Стоит отметить, что в двух приведенных выше исследованиях применяли практически одинаковые процедуры экстракции и разделения компонентов экстракта, выделенного из одного и того же вида растения, однако, результаты, полученные в этих работах, несколько отличаются, что может быть связано со сложностью процессов, происходящих внутри растения. Недостатком применения эксклюзионной хроматографии для решения подобных задач является невозможность разделения соединений элементов, обладающих низкой молекулярной массой, к коим относится, например, трипептид глутатион ($M = 307$ г/моль) и его производные, характеризующиеся наличием сульфгидрильной группы в своем составе и проявляющими высокое сродство к ионам кадмия и ртути в организме растений.

Часто оказывается, что применение одного гибридного метода не дает необходимой информации о формах связывания элемента в исследуемом объекте. Так, для идентификации форм кадмия и свинца в горохе использовали методы эксклюзионной хроматографии с ИСП-МС детектированием и ВЭЖХ с детектированием методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением. Экстракцию проводили раствором 30 мМ Трис·НСl, при этом отмечалось, что следует использовать нейтральные экстрагенты ввиду возможной диссоциации соединений кадмия и свинца в кислой среде. В работе показано, что выделенные соединения относятся к классу фитохелатинов. Однако применение подобных экстрагентов приводит к извлечению только 3-8% кадмия, что, по-видимому, обусловлено прочным связыванием элемента с такими структурами растительных клеток как клеточная стенка [178].

Методом эксклюзионной хроматографии с ААС детектированием в режиме *offline* форм связывания кадмия в экстрактах растения *Datura innoxia* удалось получить информацию о фракциях, содержащих исследуемый элемент. Дальнейшее изу-

чение выделенных соединений проводили методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением. Для этого были синтезированы соединения кадмия с фитохелатинами. Результаты подтверждали путем применения метода ВЭЖХ для разделения компонентов экстракта с *online* детектированием методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением [179].

В некоторых случаях однозначно идентифицировать формы кадмия в экстрактах растений удастся и с применением одного гибридного метода. Однако при этом возникает необходимость использования стандартов для идентификации форм элемента, которые часто являются труднодоступными. Так, удалось идентифицировать комплексы фитохелатинов с кадмием, выделенные из растения *Arabidopsis thaliana*. Экстракцию соединений кадмия проводили с использованием 10 мМ Трис·НСl (рН 7,5), разделение и идентификацию методом ВЭЖХ-ИСП-МС. Для решения задачи идентификации форм кадмия в экстракте растения были синтезированы комплексы кадмия с различными фитохелатинами [180].

Применение масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением в качестве метода детектирования в режиме *offline* после разделения компонентов экстракта методом ВЭЖХ и сбора фракций позволило идентифицировать формы связывания кадмия в растениях *Silene cucubalus*, *Agrostis tenuis* и *Rauvolfia serpentina*, подвергавшихся воздействию высоких концентраций этого элемента. Экстракцию форм связывания проводили 10 мМ Трис·НСl (рН 8,0). Отмечается, что использование в качестве экстрагентов нейтральных буферов позволяет выделить формы элементов, растворенные в цитоплазме и межклеточном веществе. Для идентификации форм связывания кадмия в данной работе также были синтезированы соединений кадмия с фитохелатинами [181].

Фитохелатины представляют собой класс соединений, структурной единицей которых является дипептид γ -глутамилцистеин. За счет возможности образования соединений, в которых данный фрагмент повторяется от 2 до 11 раз, возникает большое разнообразие возможных форм комплексов кадмия и ртути с этими соединениями. Для изучения состава таких соединений, полученных *in vitro*, применяют методы проточно-инжекционного анализа [182] и матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) с детектированием методом времяпролетной масс-спектрометрии [183].

Для идентификации форм связывания ртути в растениях в качестве методов разделения применяют жидкостную хроматографию [184], ГХ [185], КЭ [186]. В большинстве случаев жидкостная хроматография оказывается оптимальным методом, так как позволяет избежать таких сложностей, как, например, дериватизация в случае ГХ и КЭ [187]. Хроматографические системы применяются в совокупности с такими элемент-селективными детекторами, как ИСП-АЭС и ИСП-МС [188]. Основной проблемой, возникающей при решении задачи определения форм связывания ртути в растениях, является очень низкая концентрация аналитов в объектах анализа [189]. Снижения пределов обнаружения элемент-селективного детектора можно добиться, используя прием генерации холодного пара путем восстановления соединений ртути боргидридом натрия или хлоридом олова(II). Атомарная ртуть при этом отделяется от основы пробы и вводится в плазму, что позволяет уменьшить загрузку плазмы, фоновый сигнал и увеличить чувствительность [190]. Однако в вышеупомянутых работах в качестве аналитов рассматриваются ион ртути Hg^{2+} , MeHg^+ , в некоторых случаях также и EtHg^+ . Экстракция проводится в относительно жестких условиях, с применением щелочей или кислот, что приводит к разрушению соединений ртути с карбоновыми кислотами, пептидами, содержащими сульфгидрильные группы и другими лигандами, присутствующими в растительной клетке и межклеточном веществе. Таким образом, предложенные методики не позволяют получать информацию о тех формах ртути, которые разрушаются в кислой и щелочной среде или при применении комплексообразователей, таких как 2-меркаптоэтанол [191], тем самым не позволяя получать информацию о процессе трансформации ртути в растениях.

Известны работы, в которых выделение форм ртути проводили с использованием более мягких экстрагентов, таких как 1% муравьиная кислота, что позволяет выделить соединения ртути, образовавшиеся в растении в ходе жизнедеятельности [192]. Для идентификации форм связывания ртути в таких случаях применяют метод ВЭЖХ с детектированием методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением [193], а также ВЭЖХ-ИСП-МС для подтверждения результатов [194]. При этом предварительно изучают масс-спектры реперных соединений ртути с пептидами, которые, как правило, синтезируются непосредственно перед анализом ввиду их быстрого окисления кислородом воздуха. Для экстракции соединений ртути с фитохелатинами используют 2% раствор SDS в 30 мМ Трис·HCl (pH 7,0). Для идентификации этих соединений использовали метод эксклюзионной хроматографии с ИСП-МС детектиро-

ванием, а также метод ВЭЖХ с АФС детектированием с восстановлением ртути методом холодного пара. Были выделены фракции, содержащие формы ртути, и исследованы методом масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением [195].

1.6 Заключение и постановка задачи

При изучении природных объектов наибольшую информативность демонстрируют результаты определения форм элементов, т.к. подвижность, токсичность, а также физико-химические свойства и, как следствие, роль в природной системе, определяется именно его формой (химической, физико-химической, формой связывания). Подобные исследования наиболее активно ведутся в рамках изучения процесса биоаккумуляции элементов растениями, что особенно важно для их последующего применения в фиторемедиации загрязненных природных сред.

Число работ, посвященных изучению форм связывания элементов в растениях, весьма ограничено, а данные различных исследований зачастую носят противоречивый характер. Наиболее информативным методом идентификации форм элементов в растительных образцах является масс-спектрометрия с ионизацией электрораспылением, но отнесение масс-спектров представляется достаточно проблематичным из-за отсутствия соответствующих стандартов, поэтому авторы нередко ограничивают рамки исследований соединениями, для которых доступны стандарты.

При изучении форм связывания ртути в растениях, как правило, проводят экстракцию аналитов растворами кислот и щелочей и определяют содержание ионной формы Hg^{2+} и метилртути. При этом происходит разрушение исходных форм, присутствующих в растении и полученная информация не позволяет в полной мере понять процессы, происходящие в исследуемом объекте.

Развитие комплексного подхода к решению задачи, связанной с выявлением и идентификацией форм элементов в биологических объектах, в том числе в растениях, является актуальной задачей современной аналитической химии, причем наиболее перспективным представляется применение гибридных и комбинированных методов анализа, которые позволяют выявлять зоны локализации аналитов и исследовать вещественный состав соединений, образующихся в объектах живой природы.

Таким образом, существует необходимость в разработке подхода к идентификации форм связывания элементов в растениях с применением гибридных методов анализа, в которых разделение и детектирование объединены в рамках одной процедуры.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. Реактивы, оборудование и методики

2.1 Оборудование

Основное и вспомогательное оборудование, использованное в работе, представлено в табл. 5 и 6 соответственно.

Т а б л и ц а 5

Основное оборудование

Метод	Оборудование	Назначение
ВЭЖХ	Хроматограф «Миличром А-02», колонка Ø 2×75 мм с сорбентом ProntoSIL 120-5-C18AQ («Эконова», Россия)	1. Разделение компонентов экстрактов растений 2. Определение аминокислотного состава соединений кадмия и ртути
ИСП-АЭС	Спектрометр «iCap 6500 Duo» («Thermo Scientific», США)	1. Детектирование соединений кадмия и ртути 2. Определение концентрации кадмия и ртути в растениях и в воде
Микроволновое разложение	Микроволновая система прободготовки «Mars 5» («СЕМ», США)	Минерализация растительных проб
Гистохимический метод	Оптический микроскоп «Axio Scope 40», оборудованный камерой «Axio Cam MRc5» («Carl Zeiss», Германия)	Выявление зон локализации кадмия в растениях
СЭМ-ЭДС	Сканирующий электронный микроскоп «S-3400N SEM» («Hitachi», Япония)	Выявление зон локализации ртути в растениях
Инверсионная вольтамперометрия	Анализатор «ИВА-5» (НПО «ИВА», Россия)	Определение сульфгидрильных групп
СНNS анализ	Анализатор «Vario Micro Cube» («Elementar Analysensysteme», Германия)	Определение содержания С, Н, N, S
рН-метрия	Иономер «Анион-4100» («Инфраспак-Аналит», Россия)	Контроль рН

Т а б л и ц а 6

Вспомогательное оборудование

Оборудование	Назначение
1. Аквадистилятор «ДЭ 4-2» («СЗМО», Россия) 2. Очиститель воды «ULTRA» (Германия)	Очистка воды
Весы аналитические «CAUW 220D» («CAS», Южная Корея)	Отбор навесок проб
Автоматические дозаторы переменного объема («Ленпипет», Россия)	Приготовление растворов

В работе использовали лабораторную посуду: полипропиленовые пробирки «Ахуген» объемом 5, 15 и 50 мл с закручивающимися крышками, полипропиленовые пробирки «Eppendorf» объемом 1,5 и 2,0 мл, стеклянные стаканы объемом 50 мл, стеклянные мерные колбы. Фильтрацию растворов осуществляли с применением мембранных фильтров «Durapore» («Merck Millipore Ltd», США) с диаметром пор 0,45 мкм. Химическую посуду промывали водопроводной водой, водным раствором азотной кислоты (1:20), затем последовательно дистиллированной и деионизованной водой.

2.2 Реактивы

В экспериментах с растениями использовали $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, HgCl_2 (осч) («Реахим», Россия). Для минерализации растительных проб и консервации проб воды применяли HNO_3 (осч), HCl (осч) и H_2O_2 (осч) («Реахим», Россия). При проведении ИСП-АЭС анализа в качестве образцов сравнения применяли многоэлементные аттестованные смеси производства ООО НПП «Скат» (Россия). Для генерации холодного пара при определении ртути методом ИСП-АЭС использовали NaBH_4 (осч) («Sigma-Aldrich», Германия), NaOH (осч) («Реахим», Россия).

Экстракцию соединений кадмия и ртути из растений проводили с применением трис(гидроксиметил)аминометана (осч) (Sigma-Algrich, Германия) $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$, динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 (осч) («Реахим», Россия).

Для приготовления элюентов для ВЭЖХ применяли ацетонитрил (осч) («Криохром», Россия) CH_3CN , CH_3COOH (осч), $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (хч), CH_3COONa (хч), тетрабутиламмония гидроксид (ТБАГ) $(\text{C}_4\text{H}_9)_4\text{NOH}$, додецилсульфат натрия $\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$ (осч) («Chemapol», Czech Republic), 10% раствор.

Для синтеза соединений ртути и метилртути использовали глутатион (осч) («AppliChem», Германия).

Для определения аминокислотного состава пептидных соединений кадмия и ртути в качестве образцов сравнения применяли аминокислоты, фенилизотиоцианат (ФИТЦ) $\text{C}_7\text{H}_5\text{NS}$ (хч) («Sigma-Aldrich», Германия), Na_2CO_3 (осч), изопропиловый спирт $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$ (осч) («Реахим», Россия).

Для гистохимического исследования срезов растений использовали дитизон (хч) («Chemapol», Czech Republic) $C_{13}H_{12}N_4S$ и органические растворители: ацетон C_3H_6O , хлороформ $CHCl_3$ (осч) («Реахим», Россия).

2.3 Методики исследования

2.3.1 Определение содержания ртути и кадмия в растениях и водах методом ИСП-АЭС

Для определения содержания ртути и кадмия в растительных пробах и воде применяли метод ИСП-АЭС. Для учета матричных эффектов применяли метод внутреннего стандарта, в качестве которого использовали раствор нитрата скандия. Микроволновое разложение растений проводили смесью 2 мл конц. HNO_3 (осч) и 0,5 мл H_2O_2 (осч) на 0,100 г сухой массы растения в автоклавах HP-500 (из политетрафторалкоксииэтилена) в микроволновой печи Mars-5 при подводимой мощности 120 Вт на один автоклав. Программа микроволнового разложения приведена в табл. 7.

Т а б л и ц а 7

Параметры процедуры микроволнового разложения проб растений

Стадия	Температура, °С	Время нагрева (мин)	Время выдерживания (мин)
1	90	10	10
2	150	10	10
3	180	10	10

После завершения процедуры минерализации пробы количественно переносили в мерные пробирки и доводили объем до 10 мл добавлением деионизованной воды, затем отбирали 1 мл полученного раствора, переносили в мерную пробирку, добавляли 0,250 мл конц. HNO_3 и 0,250 мл раствора Sc с концентрацией 20 мг/л (внутренний стандарт), доводили объем до 10 мл и определяли содержание микроэлементов методом ИСП-АЭС.

Определение содержания ртути проводили методом холодного пара. Для этого после завершения процедуры минерализации пробы количественно переносили в мерные пробирки и доводили объем до 30 мл добавлением деионизованной воды, затем отбирали 1 мл полученного раствора, переносили в мерную пробирку, добавляли 1,0 мл конц. HCl , доводили объем до 10 мл и определяли содержание ртути методом ИСП-АЭС с восстановлением ртути 0,5% раствором боргидрида натрия в 0,05% $NaOH$.

Параметры работы спектрометра, выбранные как оптимально-компромиссные для одновременного определения нескольких элементов, приведены в табл. 8. Обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения «iTeva» («Thermo Scientific», США).

Т а б л и ц а 8

Параметры работы ИСП-АЭС при анализе растительных проб

Параметр	Значение
Мощность	1150 Вт
Охлаждающий поток Ar	12 л/мин
Вспомогательный поток Ar	0,5 л/мин
Распылительный поток Ar	0,7 л/мин

2.3.2 Определение содержания аминокислот в экстрактах растений методом ВЭЖХ

Для определения аминокислотного состава соединений кадмия и ртути в экстрактах растений, применяли метод обращённо-фазовой ВЭЖХ с УФ детектированием с после кислотного гидролиза и дериватизации аминокислот в фенилтиогидантоиновые производные.

Определение аминокислот проводили с УФ-детектированием в многоволновом режиме на (240, 250, 280, 300 нм). При выборе оптимальных параметров разделения опирались на известные методики определения аминокислот [196], принимая во внимание литературные данные о составе пептидов, ответственных за связывание тяжелых металлов в растениях. Таким образом, основное внимание было уделено определению глицина, глютаминовой кислоты и цистеина.

Т а б л и ц а 9

Условия градиентного элюирования производных аминокислот

Колонка	Ø 2×75 мм Prontosil 100-5 C18
Длина волны детектирования	240, 250, 280, 300 нм
Скорость потока элюента	200 мкл/мин
Состав элюента А	6,0 мМ ацетат натрия (рН 5,5)
Состав элюента В	ацетонитрил
Таблица градиента	
Время, мин	Объемная доля элюента В, %
0	0
5	8
16	70

Хроматографический анализ проводили в градиентном режиме скорости элюирования 200 мкл/мин (табл. 9) и температуре колонки 40°C. В качестве подвижной фазы использовали смесь 6,0 мМ раствора ацетата натрия с рН 5,5 (элюент А) и ацетонитрил (элюент В).

Для построения градуировочной зависимости использовали индивидуальные растворы аминокислот в 0,1 М растворе соляной кислоты с концентрацией 50 ммоль/л, которые также подвергали процедуре дериватизации. Точный объем кислоты (мл) вычисляли как $V=5 \times [\text{навеска, мг}] / [\text{вес } 0,25 \text{ ммоль, мг}]$. Исходная концентрация аминокислот – 50 ммоль/л, для тирозина – 2,5 ммоль/л ввиду плохой растворимости вещества.

Процедура дериватизации аминокислот:

В кварцевую чашку помещали соответственно по 5, 10, 20, 50, 100 мкл исходного раствора и высушивали в токе воздуха. К высушенным аликвотам добавляли 0,10 мл 0,1 М раствора Na_2CO_3 и тщательно перемешивали. Затем приливали 0,30 мл раствора ФИТЦ в изопропиловом спирте (0,2 мл ФИТЦ в 12 мл изопропилового спирта), выдерживали 30 мин при комнатной температуре и сразу высушивали в токе воздуха в течение 40-50 мин. Сухой остаток растворяли в 0,30 мл дистиллированной воды и центрифугировали в течение 15 минут. Полученные растворы последовательно вводили в хроматографическую колонку (рис. 8).

Пробоподготовка реальных объектов (экстрактов водяного гиацинта и отдельных фракций) также включала кислотный гидролиз проб и дериватизацию аминокислот раствором ФИТЦ. Для проведения гидролиза в бюксы, снабжённые плотно закручивающимися крышками, помещали 1 мл экстракта или фракции, выделенной в процессе хроматографического разделения, высушивали в токе воздуха. Далее добавляли 2 мл 6 М раствора соляной кислоты. Смесь тщательно перемешивали, бюксы плотно закрывали крышками и помещали в термостат. Гидролиз проводили при температуре 110°C в течение 15 часов. После охлаждения гидролизаты фильтровали, перемешивали и отбирали аликвоты 1,0 мл. Аликвоты высушивали при комнатной температуре в токе воздуха. К высушенным аликвотам добавляли 0,10 мл 0,1 М раствора Na_2CO_3 и тщательно перемешивали. Затем приливали 0,30 мл раствора фенилизотионата в изопропиловом спирте, перемешивали. Растворы выдерживали 30 мин при комнатной температуре и сразу высушивали в токе воздуха в течение 40-50 мин. Сухой остаток растворяли в 0,30 мл дистиллированной воды, фильтровали и центрифуги-

гировали в течение 15 минут. Полученные растворы подвергали хроматографическому анализу. Расчет содержания аминокислот в пересчете на экстракт осуществляли по формулам, приведенным ниже.

$$C \text{ (мкмоль/л)} = (50/45 * A_s) * (5 * 5 / 50) / (A_{s+ad} - A_s) / 200 / 1000 * 2, \text{ где}$$

A_s – сигнал пробы (AU), A_{s+ad} – сигнал пробы с добавкой (AU),

50/45 – разбавление при введении добавки,

5*5/50 – концентрация добавки с учетом разбавления при введении в пробу (ммоль/л),

200 – коэффициент концентрирования экстракта по сравнению со стандартом,

1000 – переводной коэффициент в мкмоль/л,

2 – коэффициент разбавления при гидролизе проб.

2.3.3 Определение содержания сульфгидрильных групп в экстрактах растений методом инверсионной вольтамперометрии

Для определения содержания сульфгидрильных групп в экстрактах растений и сопоставления результатов с данными по определению содержания серы и цистеина в отдельных фракциях применяли метод инверсионно-вольтамперометрического (ИВА) титрования, основанного на реакции осаждения органических соединений, содержащих сульфгидрильные группы, серебром(I) в аммиачном буферном растворе (pH=9,5) ($RSH + AgNO_3 \rightarrow AgSR + HNO_3$). Данная методика была разработана в Аналитической лаборатории ИНХ СО РАН [197].

Все измерения проводили на автоматического программно-управляемого вольтамперометрического анализатора ИВА-5 в трехэлектродной электрохимической ячейке. Вспомогательным электродом служил графитовый или стеклоуглеродный стержень, электродом сравнения – хлорид-серебряный (Ag/AgCl) электрод, заполненный насыщенным раствором KCl. В качестве рабочего использовали платиновый электрод. Перед началом каждой серии экспериментов поверхность платинового электрода активировали путем обработки концентрированной азотной кислоты (30 сек) и раствором сульфата натрия (40 сек) с последующим промыванием деионизованной водой. В качестве фонового раствора использовали аммиачный буферный раствор (pH 9,5). Метод дает возможность быстрого определения сульфгидрильных групп при небольших объемах пробы.

Если $V_{\text{ячейки}} > V_{\text{пробы}}$, то: $I_0 = k \cdot C_0 \cdot V_0$, где C_0 и V_0 – концентрация и объем аликвоты стандартного раствора соли серебра, k – коэффициент пропорциональности.

$$(I_0 - I_1)/I_0 = C_{\text{пробы}} \cdot V_{\text{пробы}}/C_0 \cdot V_0 = \Delta_{\text{пробы}}$$

$\Delta_{\text{пробы}}$ – относительное понижение сигнала серебра при введении в раствор аликвоты анализируемой пробы

$$C_{\text{пробы}} = C_0 \cdot V_0 \cdot \Delta_{\text{пробы}}/V_{\text{пробы}}$$

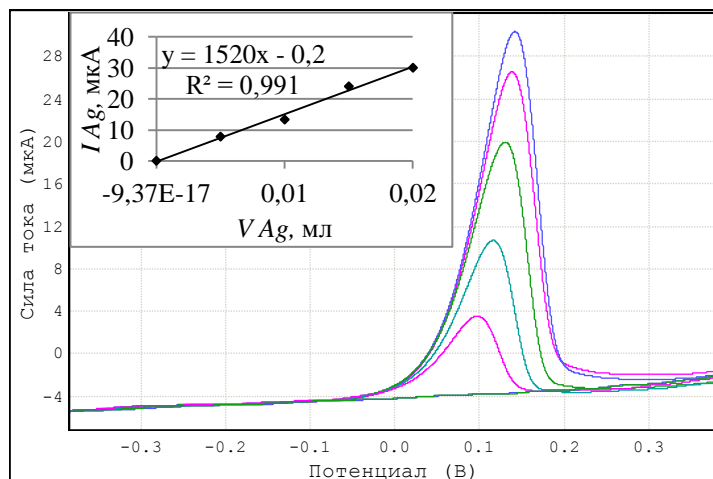


Рис. 1. Градуировочная зависимость аналитического сигнала Ag ($C_{\text{Ag}}=1,0 \cdot 10^{-2} \text{M}$)

Для подтверждения стехиометричности протекания реакции и проверки безэталонного метода пользовались методом “введено-найдено”. В ячейку с 10 мл буферного раствора вводили 0,2 мл унитиола с концентрацией $5 \cdot 10^{-4} \text{M}$ ($\text{CH}_2(\text{SH})\text{CH}(\text{SH})\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$), который титровали раствором серебра с концентрацией $1 \cdot 10^{-3} \text{M}$ (рис. 2).

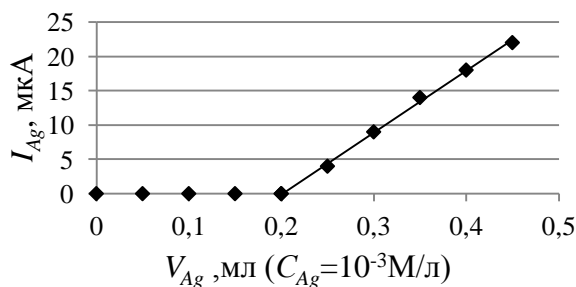


Рис. 2. Кривая титрования раствора унитиола нитратом серебра

Определение содержания сульфгидрильных групп в экстрактах растений и отдельных фракциях проводили следующим образом. В ячейку с фоновым раствором (5 мл) вводили последовательно 0,005 мл раствора серебра с концентрацией 10^{-2} моль/л, а затем дважды аликвоту анализируемого раствора, фиксируя значение тока серебра после введения каждой из добавок. Для каждого случая подсчитывали Δ_1 , Δ_2 и кон-

центрацию сульфгидрильных групп. Ниже приведены расчеты для одной из фракций, выделенных из экстракта гиацинта.

Первая добавка аликвоты пробы: $\Delta_1 = (I_0 - I_1)/I_0 = (13,5\text{мкА} - 12,5\text{мкА})/13,5\text{мкА} = 0,074$, $C_{SH} = C_0 \cdot V_0 \cdot \Delta_1 / V_{пробы} = 1,0 \cdot 10^{-2}\text{М} \cdot 0,005\text{мл} \cdot 0,074 / 0,02\text{мл} = 0,185\text{мМ}$

Вторая добавка аликвоты пробы: $\Delta_2 = (I_0 - I_2)/I_0 = (13,5\text{мкА} - 11,5\text{мкА})/13,5\text{мкА} = 0,148$, $C_{SH} = C_0 \cdot V_0 \cdot \Delta_2 / V_{пробы} = 1,0 \cdot 10^{-2}\text{М} \cdot 0,005\text{мл} \cdot 0,148 / 0,04\text{мл} = 0,185\text{мМ}$

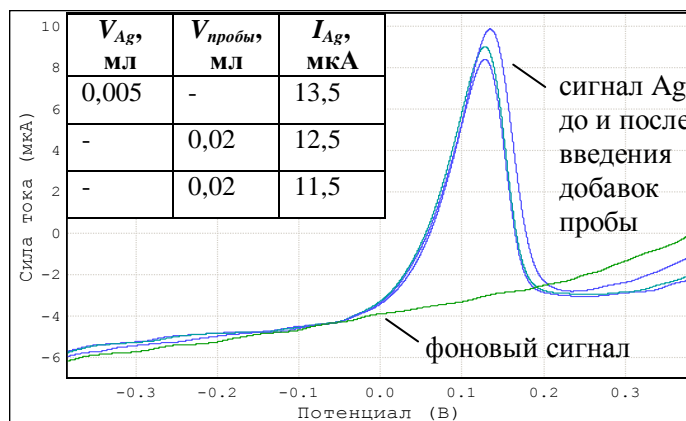


Рис. 3. Изменение величины аналитического сигнала серебра при последовательном введении двух аликвот пробы.

2.3.4 Методика проведения лабораторных экспериментов с растениями

С целью наработки биоматериала были проведены эксперименты с водяным гиацинтом в лабораторных условиях. В ходе эксперимента растения помещали в пластиковые емкости объемом 10 литров, в которые вводили 1,0 мг/л кадмия или ртути 1,0 мг/л и выдерживали в течение 7 суток.

В каждую из емкостей помещали по одному предварительно взвешенному растению (масса растения – 56-93 г). Во время проведения эксперимента проводили отбор проб воды для определения температуры и рН воды, остаточной концентрации кадмия и ртути в растворе. По завершению эксперимента растения взвешивали, разделяли на части и сушили при комнатной температуре до постоянной массы. Измельченные с помощью механической мельницы ткани подвергали микроволновому разложению для последующего определения кадмия и ртути. Кроме того, часть ткани корня, стебля и листа каждого растения была заморожена в жидком азоте для последующей экстракции и идентификации форм связывания кадмия и ртути.

ГЛАВА 3. Идентификация форм связывания кадмия в растениях с применением метода ВЭЖХ-ИСП-АЭС

С целью идентификации форм связывания кадмия в растениях на примере водяного гиацинта был предложен подход, суть которого представлена в виде схемы (рис. 4).

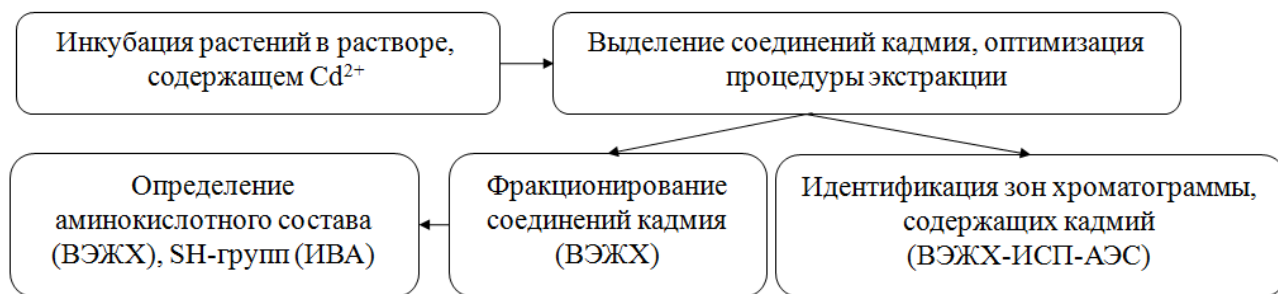


Рис. 4. Общая схема идентификации форм связывания кадмия в растениях

После завершения лабораторного эксперимента, в котором растениях водяного гиацинта инкубировались в растворе, содержащем кадмий, соединения кадмия экстрагировали, после чего экстракт подвергали процедуре хроматографического разделения, в ходе которого выявляли зоны локализации кадмия методом ВЭЖХ-ИСП-АЭС в режиме *online*. Стыковка хроматографа и спектрометра позволяет установить время выхода соединений кадмия в режиме реального времени (*online*), что позволяет достаточно быстро идентифицировать основные зоны хроматограммы, содержащие искомые соединения, а также получать предварительную информацию об их составе. При проведении анализа в режиме *offline*, процедуры разделения и детектирования форм связывания кадмия разнесены во времени. В режиме ВЭЖХ с *offline* детектированием методом ИСП-АЭС из экстрактов выделяли и собирали фракции, содержащие кадмий. В выделенных фракциях проводили определение аминокислотного состава и содержание сульфгидрильных групп.

3.1 Распределение кадмия в органах растений

Для решения задачи идентификации форм связывания микроэлементов в растениях требуется информация и об общем содержании элемента в исследуемом объекте. Поэтому на первом этапе в растениях, подвергавшихся воздействию кадмия, определяли общее содержание элемента и его распределение между частями растения (корнями, стеблями и листьями). Для оценки способности живых организмов к аккумуляции тяжелых металлов используют коэффициент биологического концентриро-

вания (**BCF** – bioconcentration factor). $BCF = (C_t - C_0) / C_w$, где C_t - концентрация металла в ткани растения после эксперимента (мг/кг сухой массы), C_0 - концентрация металла в ткани растения до эксперимента (мг/кг сухой массы), C_w – исходная концентрация металла в среде (мг/л). Критерием высокой способности растения к аккумуляции металла является $BCF > 1000$ [198]. Сравнение BCF водяного гиацинта с другими растениями [199] приведено в табл. 10.

Т а б л и ц а 10

Значения коэффициента биологического концентрирования (BCF) для разных видов растений

Вид растения	BCF
<i>Eichhornia crassipes</i> *	1200±200
<i>Lemna polyrrhiza</i> **	650
<i>Elodea nuttalli</i> **	1700
<i>Vasora monnieri</i> **	400

*результаты собственных исследований, **литературные данные [199]

Известно, что в процессе биоаккумуляции происходит перераспределение поллютанта между органами растения. На рис. 5 представлена временная динамика изменения содержания кадмия между корнем, стеблем и листьями.

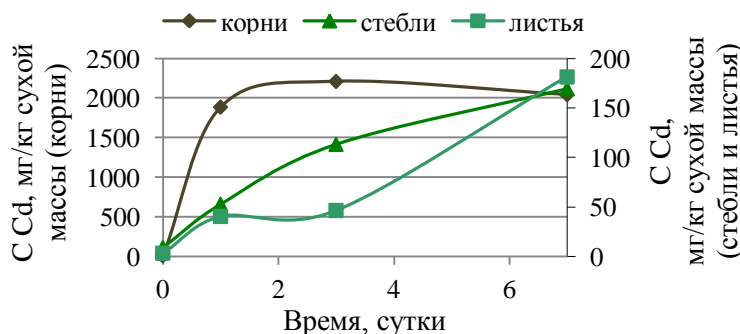


Рис. 5. Временная динамика накопления кадмия в органах водяного гиацинта

Видно, что концентрация кадмия в корне быстро возрастает, достигая насыщения в течение 24 часов. По мере накопления в корне растения происходит интенсификация его транспорта в ткани стебля. В течение суток концентрация кадмия в листьях меняется слабо, однако при более длительных временах наблюдается ее возрастание.

Накопление поллютанта во многом зависит от его перераспределения между корнями, стеблями и листьями ввиду ограниченной сорбционной емкости корней, находящихся в непосредственном контакте с кадмием. По прошествии 7 суток одно растение аккумулирует 7,4-7,8 мг кадмия, в корне растения накапливается около 83%,

в стеблях и листьях – 13% и 4% соответственно (рис. 6). Концентрация элемента в растворе в ходе эксперимента уменьшается от 1,0 мг/л до 290-370 мкг/л.

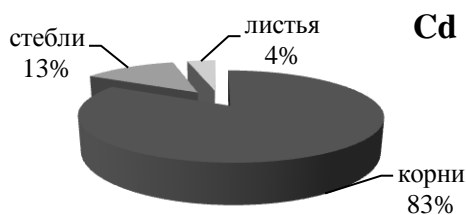


Рис. 6. Распределение кадмия между частями растения

Для количественной оценки перераспределения Cd 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. Рассчитанная нами величина транслокационного фактора для кадмия: $TF(Cd)$ оказалась равной $0,15 \pm 0,02$, что хорошо согласуется с результатами других исследований [200]: $TF(Cd) = 0,17 \pm 0,03$. Из литературных данных известно, что разные элементы обладают различной способностью к миграции в стебли и листья растений, что, по-видимому, связано с наличием металлоспецифичных физиологических барьеров в организме растения: $TF(Cu) = 0,068$, $TF(Pb) = 0,12$, $TF(Ni) = 0,18$, $TF(Zn) = 0,30$ [200] (эксперимент проводился на заболоченной территории Тайваня, расположенной вблизи промышленной зоны и характеризующейся превышением ПДК в воде по вышеперечисленным элементам за счет сброса стоков предприятий).

3.1.1 Гистохимическое исследование распределения кадмия в растениях

Для выявления зон преимущественной локализации кадмия в корне растения, характеризующемся его максимальным содержанием применяли методику гистохимического исследования, в основе которого лежит образование оранжево-красного комплекса кадмия с дитизоном [201].

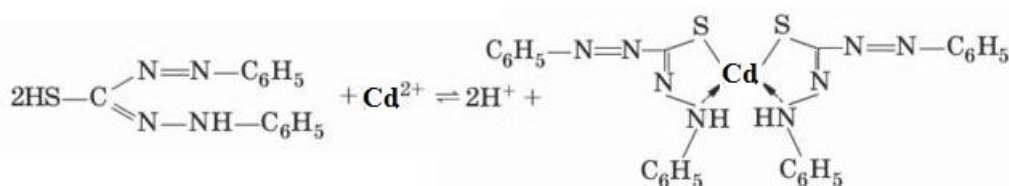


Рис. 7. Реакция образования дитизоната кадмия

Для того чтобы с помощью микроскопа оценить интенсивность окраски образца необходимо в первую очередь подготовить срезы. Согласно методике обработку срезов проводят следующим образом: на предметное стекло с каплей раствора дитизона наносят срезы, удаляют избыток влаги и накрывают покровным стеклом [202].

Из литературы известно, что дитизиновая методика применялась ранее для изучения аккумуляции распределения элементов в таких растениях как кукуруза, фасоль, подсолнечник. Ввиду того, что корни водных растений отличаются по своей структуре от корней наземных растений (являются более мягкими, клетки быстро теряют тургор при действии органических растворителей), методика была модифицирована применительно к исследуемому объекту. Использование хлороформа, ацетонитрила, ацетона в качестве растворителя показало, что оптимальный растворитель дитизона – смесь ацетона с водой 3:1.

Для исключения потери тургора клеток и как следствие – непригодности образцов для дальнейшего исследования под микроскопом, на предметное стекло предварительно наносили каплю воды и срезы, затем удаляли избыток влаги и добавляли раствор дитизона. Для анализа корней срезы снимались преимущественно с апикальной части и прилегающей к стеблю ввиду более плотной структуры и отсутствия корневых волосков. Для наиболее полной характеристики образцов снимали срезы с нескольких корней и листьев одного и того же растения. Адаптированная дитизиновая методика позволила установить тканеспецифичность накопления кадмия и выявить основные зоны локализации элемента [203].

Необходимо отметить, что корни водяного гиацинта имеют первичную структуру. В строении корня можно различить ризодерму, первичную кору и центральный цилиндр (стелу) (рис. 8).

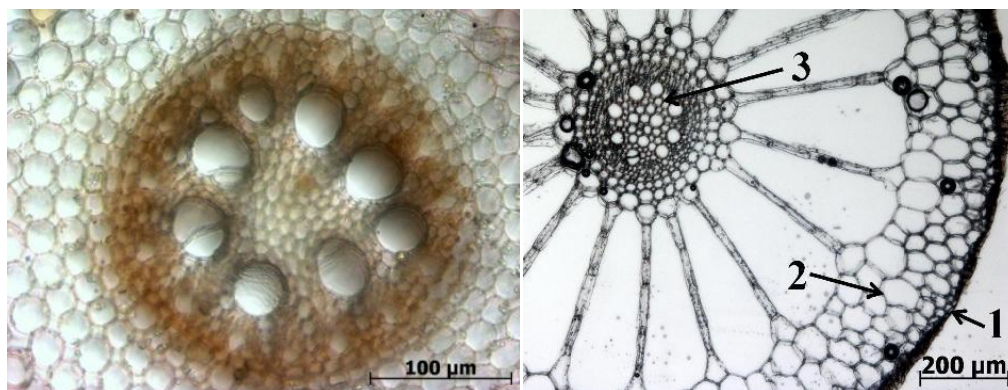


Рис. 8. Стела корня (слева) и срез корня водяного гиацинта (справа),
1 – ризодерма, 2 – первичная кора, 3-центральный цилиндр

Присутствие кадмия в тканях растений устанавливали путем сравнения окраски образца с контрольным (красное окрашивание обусловлено образованием комплекса кадмия с дитизоном). На рис. 9 представлены фотографии срезов корня водяного гиацинта, подвергавшегося воздействию кадмия (слева) и контрольного растения (справа). Установлено, что в корне водного гиацинта кадмий локализуется преимущественно в ризодерме и первичной коре.

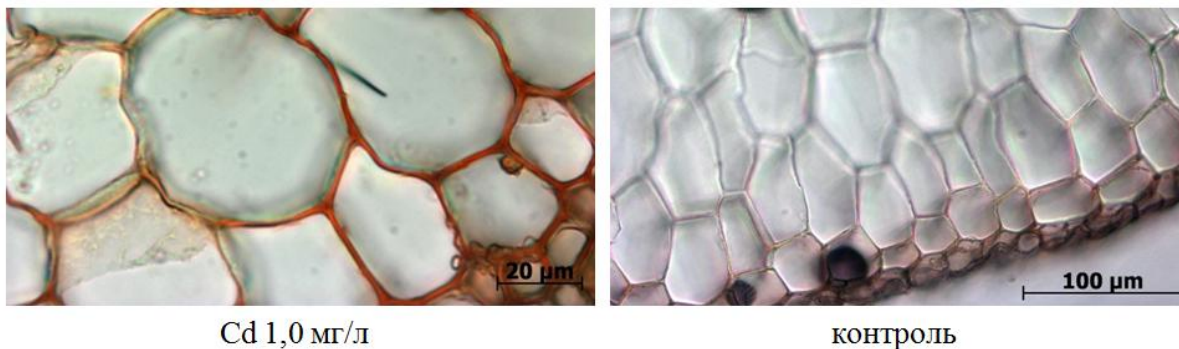


Рис. 9. Локализация кадмия в первичной коре водяного гиацинта

Можно предположить, что проникновению кадмия к стеле корня (центральному цилиндру) препятствуют пояски Каспари – утолщения из суберина и лигнина, расположенные на внутренних стенках эндодермы, а также дубильные вещества и компоненты клеточной стенки. Поскольку в эндодерме клетки располагаются плотно, то поступление кадмия к центральному цилиндру корня затруднено.

3.2 Экстракция соединений кадмия из растений

Для извлечения соединений кадмия из корней, стеблей и листьев водяного гиацинта, экстрагируемых водой, применяли следующую процедуру: к 1,0 г измельченной замороженной ткани растения добавляли 3 мл экстракционного буфера, гомогенизировали полученную смесь в ступке из оргстекла на льду, выдерживали 30 мин и центрифугировали при температуре 4°C в течение 30 мин при 18000 об/мин. Супернатант фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и хранили при -20°C до проведения анализа. При выборе экстракционного буфера ориентировались на литературные данные [180]. С целью интенсификации процесса извлечения соединений кадмия, экстрагируемых водой, было оптимизировано время экстракции и изучено влияние ультразвука на степень его извлечения.

Экстрагенты для извлечения из растений форм кадмия из растений

Состав экстракционного буфера	Степень извлечения кадмия из корня, %
Деионизованная вода, ультразвуковая экстракция	9-10%
Деионизованная вода	5-7%
200мМ фосфатный буфер, рН 7,2	4-6%
10мМ Трис НСl, рН 8,0	0,5-1,5%

Как видно из табл. 11, максимальная эффективность извлечения (9-10%) форм кадмия достигается при использовании в качестве экстрагента деионизованной воды в сочетании с воздействием ультразвука в течение 15 мин. Выделенная фракция в дальнейшем подвергалась хроматографическому анализу с элемент-селективным детектированием с целью идентификации форм связывания кадмия.

Клеточная стенка растений обладает большим количеством отрицательно заряженных групп, что обеспечивает эффективное связывание ионов металлов. В зависимости от типа ткани и вида растения состав клеточной стенки может отличаться. В среднем она содержит 25-30% целлюлозы, 15-25% гемицеллюлозы, 35% пектина и 5-10% гликопротеинов [13]. Анионные карбоксильные группы пектина и гликопротеинов проявляют высокое сродство к ионам металлов [14, 15]. В некоторых случаях пектины обеспечивают 70-90% обменной емкости клеточной стенки корня по отношению к катионам [15]. Для извлечения кадмия, связанного с пектинами, после отделения форм, экстрагируемых водой, использовали раствор 0,05 М ЭДТА в 0,05 М ацетате аммония [204]. Экстракцию проводили из остатка, полученного после первой стадии. Максимальная степень извлечения достигается при экстракции в течение 4х часов. Оказалось, что в корне растения с пектинами связано $55\pm 7\%$ от его общего количества. Можно предположить, что оставшиеся $35\pm 5\%$ кадмия прочно связаны с компонентами клеточной стенки.

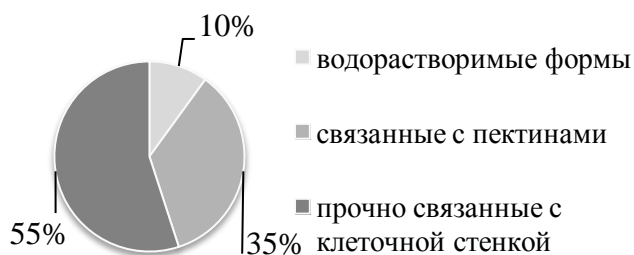


Рис. 10. Формы связывания кадмия в корне водяного гиацинта

3.3 Оптимизация условий идентификации компонентов экстракта методом ВЭЖХ-ИПС-АЭС

Для идентификации форм связывания кадмия в водном гиацинте, проводили хроматографическое разделение компонентов экстракта с оценкой содержания аналита в выделенных фракциях. Проведение анализа в режиме *online*, позволяет получить информацию об основных зонах локализации кадмия на хроматограмме. Для реализации данного подхода были проведены эксперименты по выбору оптимальных параметров работы системы, сочетающей ВЭЖХ и ИПС-АЭС, обеспечивающих ее стабильное функционирование.

Для этой цели была предложена схема соединительного интерфейса ВЭЖХ-ИПС-АЭС, которая представлена на рис. 11.

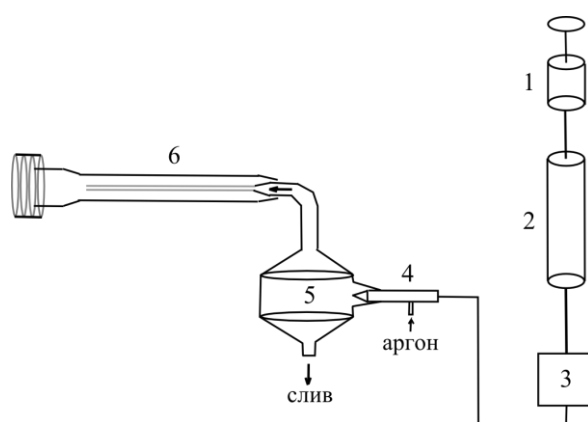


Рис. 11. Принципиальная схема состыковки хроматографа и ИПС-АЭС спектрометра для идентификации форм связывания кадмия:

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

3.3.1 Оптимизация параметров гибридной системы ВЭЖХ-ИПС-АЭС

3.3.1.1 Выбор условий хроматографического разделения компонентов экстракта

Опираясь на литературные данные [180], с целью разделения пептидсодержащих соединений кадмия, на первом этапе исследования в качестве элюента использовали раствор ацетата аммония и, содержащий добавку тетрабутиламмония гидроксид в качестве ион-парного реагента (табл. 12), присутствие которого необходимо для разделения отрицательно заряженных комплексов кадмия с пептидами.

Условия разделения пептидных комплексов тяжелых металлов [180]

Колонка	Ø 2×75 мм ProntoSIL 120-5-C18AQ
Скорость потока элюента	200 мкл/мин
Длина волны детектирования	250 нм
Состав элюента А	20 мМ ацетат аммония, 0,04% ТБАГ, рН=7,3
Состав элюента В	20 мМ ацетат аммония, 0,04% ТБАГ, 80% ацетонитрил, рН=7,3
Градиент элюента В	0-3 мин 0% В, 4,5 мин 20% В, 10 мин 35% В, 15 мин 50% В

Однако, несмотря на то, что применение ион-парной обращено-фазовой в градиентном режиме элюирования позволило добиться разделения компонентов экстракта, присутствие в подвижной фазе ацетонитрила и ион-парного реагента на уровне ≈ 10 и 0,04% соответственно приводило к дестабилизации индуктивно связанной 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 снижено (табл. 13).

Т а б л и ц а 13

Оптимальные условия разделения компонентов экстракта

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 20%В, 10 мин 20%В

3.3.1.2 Оптимизация параметров ИСП-АЭС-детектирования

Для обеспечения стабильной работы гибридной системы, сочетающей хроматографическое разделение с ИСП-АЭС детектированием, были оптимизированы условия подачи и транспортировки пробы в плазму.

Эффективность подачи пробы в распылительную камеру спектрометра и параметры формирования аэрозоля пробы зависят от сочетания режимов функционирования перистальтического насоса и распылительного потока аргона. Закономерности формирования аналитического сигнала определяемого элемента были изучены на модельных растворах, содержащих молибдат натрия. Такой выбор модельного объекта был обусловлен возможностью проведения хроматографического анализа с применением двойного детектирования молибдат иона, а именно: УФ и ИСП-АЭС, что позволило подобрать оптимальные условия работы системы (рис. 12, табл. 14).

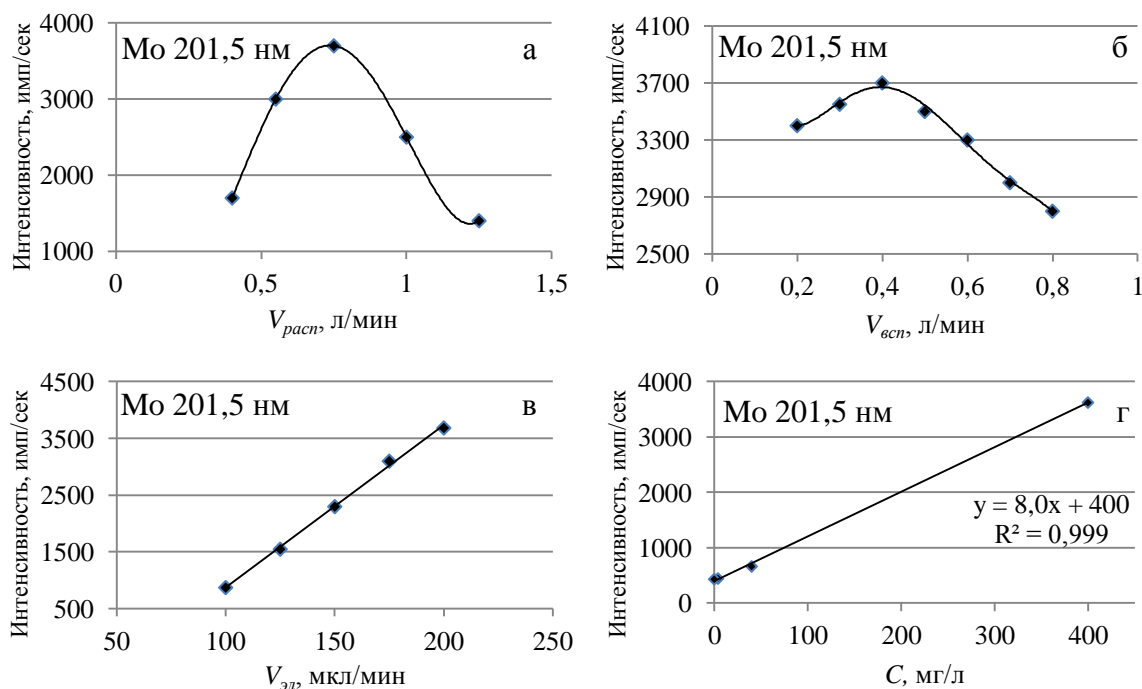


Рис. 12. Зависимости интенсивности аналитического сигнала молибдена (имп/сек) от скорости распылительного ($V_{расп}$) (а) и вспомогательного потока аргона ($V_{всп}$) (б), скорости элюирования ($V_{эл}$) (в) и концентрации молибдена в растворе (г)

Т а б л и ц а 14

Оптимальные параметры работы ИСП-АЭС в режиме *online*

Параметр	Значение
Мощность	1350 Вт
Охлаждающий поток аргона	12 л/мин
Вспомогательный поток аргона	0,5 л/мин
Распылительный поток аргона	0,75 л/мин

На основании проведенных исследований было установлено, что синхронизация подачи пробы из разделительной колонки хроматографа в индуктивно связанную плазму достигается при скорости работы перистальтического насоса 5 об/мин (200 мкл/мин). С учетом объема соединительного тракта, запуск ИСП-АЭС осуществлялся одновременно с вводом пробы в хроматографическую колонку.

Скорость распылительного потока аргона оказывает влияние на эффективность формирования капель аэрозоля пробы. Оказалось, что при низких скоростях распыления пробы интенсивность сигнала молибдена снижается, поэтому в качестве оптимального варианта было выбрано значение скорости потока 0,75 л/мин (рис. 12а).

С целью уменьшения длины соединительного тракта выход хроматографической колонки (после УФ-детектора) был напрямую соединен с распылителем спектрометра, при этом роль перистальтического насоса сводилась только к удалению жидкости из распылительной камеры. Между последовательными вводами пробы в ВЭЖХ ка-

меру промывали деионизованной водой путем подключения капилляра распылителя к перистальтическому насосу. Стоит отметить, что при промывке камеры следует избегать резкого увеличения скорости работы насоса, приводящего к изменению давления в распылительной камере и, как следствие, тушению плазмы, особенно при работе с элюентами, содержащими органические растворители.

Объем соединительного тракта является одним из важнейших параметров, влияющих на уширение пика при транспортировке пробы из хроматографической колонки в распылительную камеру спектрометра. На примере модельной системы с молибдат-ионом было показано, что ширина формирующегося пика аналита, линейно зависит от объема соединительного тракта (рис. 13). Расчет объема соединительного тракта проводили, принимая во внимания скорость потока элюента и время его прохождения через капилляр. Исходя из скорости элюирования (200 мкл/мин), были рассчитаны соответствующие значения объема тракта. С учетом полученных результатов объем соединительного капилляра был минимизирован до 200 мкл.

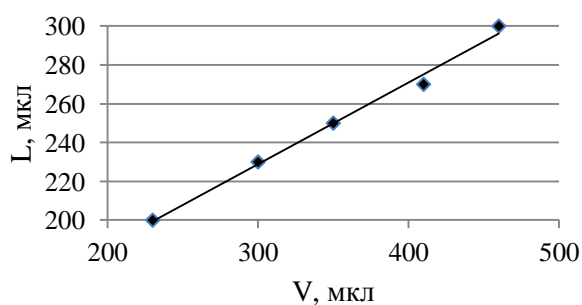


Рис. 13. Зависимость ширины пика молибдена (L) от объема соединительного капилляра (V)

Особое внимание при организации интерфейса ВЭЖХ-ИСП-АЭС следует также обратить на синхронизацию запуска хроматографа, спектрометра и подключения выходного капилляра хроматографа к системе транспортировки пробы в плазменную горелку, которое необходимо осуществлять одновременно с запуском хроматографа и началом последовательности измерений на спектрометре. Это позволяет избежать резких скачков изменения давления в распылительной камере, приводящих к гашению плазмы и невозможности проведения последующих измерений без повторной промывки и запуска системы. На рис. 14 приведены хроматограммы молибдат аниона с последовательным УФ и ИСП-АЭС детектированием в режиме *online* ($C_{\text{MoO}_4^{2-}} = 10 \text{ мг/л}$) при оптимальных параметрах работы приборов.

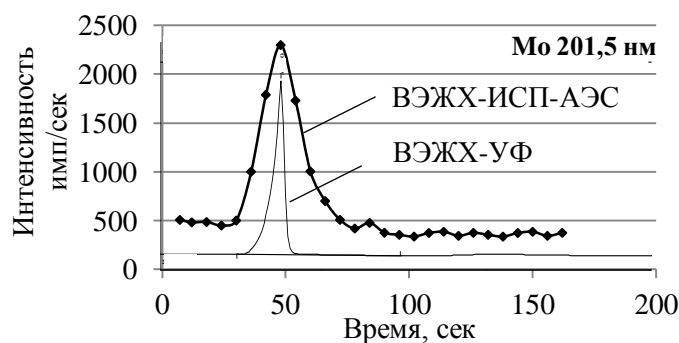


Рис. 14. ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-ИСП-АЭС хроматограммы модельного раствора молибдат аниона.

Параметры хроматографирования: элюент – деионизованная вода;

скорость элюирования – 200 мкл/мин; объем пробы – 2 мкл; изократический режим;

температура колонки – 35°C; длина волны детектирования – 230 нм;

Параметры ИСП-АЭС-детектирования: скорость перистальтического насоса – 5 об/мин;

распылительного потока аргона – 0,75 л/мин; охлаждающего потока аргона – 12 л/мин;

мощность источника – 1150 Вт

3.3.2 Рабочие параметры ВЭЖХ и ИСП-АЭС при проведении анализа в режиме *offline*

Для проведения исследований, связанных с изучением состава фракций, содержащих кадмий с целью последующей идентификации присутствующих соединений экстракт водяного гиацинта хроматографировали в условиях аналогичных проведению ВЭЖХ-ИСП-АЭС анализа в режиме *online*. Содержание кадмия и серы определяли во фракциях объемом 100 мкл, которые последовательно отбирали в течение 0,5 мин на выходе из колонки после УФ-детектирования в мерные пробирки. Для стандартизации условий ИСП-АЭС анализа в каждую из пробирок добавляли 62,5 мкл HNO_3 (осч), доводили объем до 2,5 мл деионизованной водой, определяли концентрацию кадмия и серы методом ИСП-АЭС, используя параметры работы прибора, приведенные в табл. 8 главы 2 экспериментальной части. На рис. 15 приведены градуировочные зависимости для кадмия и серы.

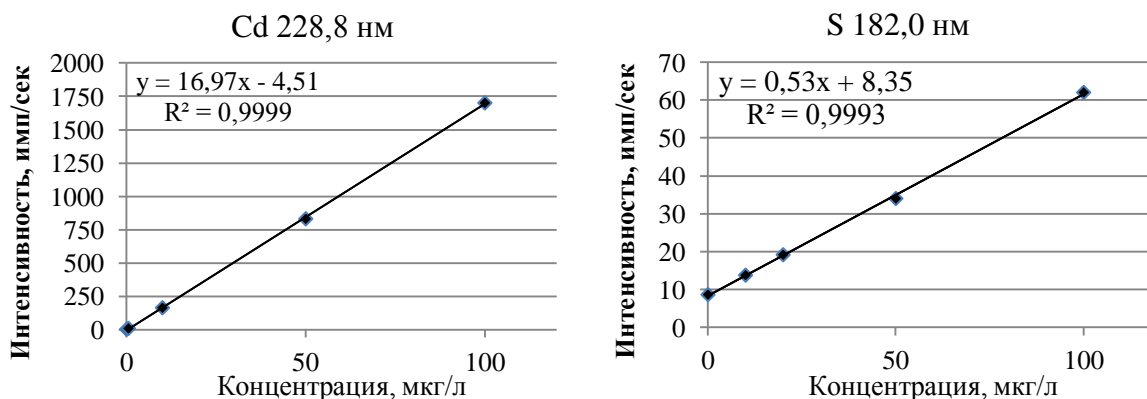


Рис. 15. Градуировочные зависимости для линий кадмия и серы

Для проверки предположения о пептидной природе исследуемых соединений проводили сбор фракций (100 мкл, 0,5 мин), содержащих кадмий, с последующим проведением кислотного гидролиза и определением аминокислотного состава. В результате предварительных экспериментов было установлено, что, в связи с низким содержанием аналитов (≤ 10 мкмоль/л), для определения аминокислот, содержащихся в пептидах, принадлежащих к классу фитохелатинов, а именно, глутаминовой кислоты, глицина и цистеина, необходимо обеспечить объем фракции не менее 1,0 мл. Поэтому сбор фракций на выходе из хроматографической колонки проводили в ходе десяти последовательных разделений компонентов экстракта.

3.4 Выявление соединений кадмия в экстрактах методом ВЭЖХ-ИСП-АЭС

Для выявления соединений кадмия в экстрактах растений применяли метод ВЭЖХ с последующим элемент-селективным детектированием. На первом этапе исследования получали предварительную информацию об основных зонах хроматограммы, содержащих кадмий, путем проведения ВЭЖХ-ИСП-АЭС анализа в режиме *online* (параметры работы приборов при осуществлении стыковки хроматографа и спектрометра описаны в разделе 3.3.1). Оказалось, что на хроматограмме экстракта корня растения присутствует пик соединения, содержащего исследуемый элемент. В экстрактах стеблей и листьев присутствие кадмия не было установлено, что обусловлено содержанием элемента на уровне ниже предела обнаружения (рис. 16).

Элемент-селективное детектирование использовали также и для определения серы. На представленных ниже хроматограммах видно, что в экстрактах корней, стеблей и листьев растений присутствуют достаточно гидрофильные соединения серы, не удерживающиеся на колонке.

Проведение анализа в режиме *online* позволяет одновременно получать информацию от двух детекторов – УФ-детектора хроматографа, с возможностью записи спектра исследуемых соединений, и элемент-селективного детектора ИСП-АЭС. На рис. 17 представлены результаты ВЭЖХ-ИСП-АЭС анализа экстракта корня гиацинта. Видно, что на УФ-хроматограмме присутствуют два пика, характерные для всех проб корней, как подвергавшихся воздействию кадмия, так и контрольных растений. Первый пик (0,5-1,0 мин) соответствует неудерживаемым соединениям, по-видимому, не содержащим кадмий, в отличие от второго пика (3,5-4,0 мин), характеризующегося наличием исследуемого элемента.

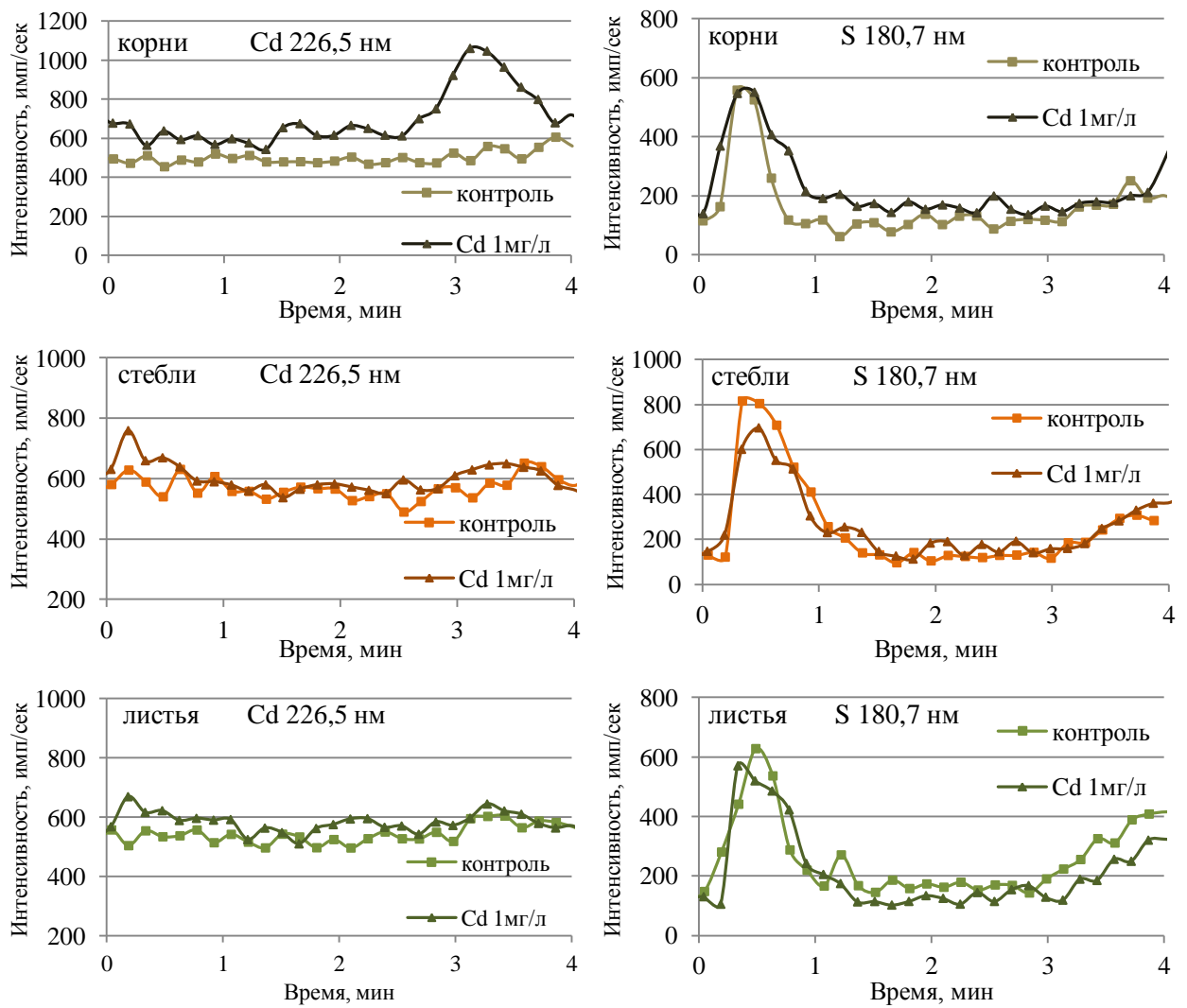


Рис. 16. Идентификация зон, содержащих кадмий и серу в экстрактах контрольных растений и растений, подвергавшихся воздействию кадмия (1 мг/л).

Параметры хроматографирования: элюент – деионизованная вода; скорость элюирования – 200 мкл/мин; объем пробы – 10 мкл; градиентный режим – 0-1 мин 20% В, 10 мин 20% В; температура – 35°C; длина волны детектирования – 254 нм.

Параметры ИСП-АЭС-детектирования – аналогично рис. 14

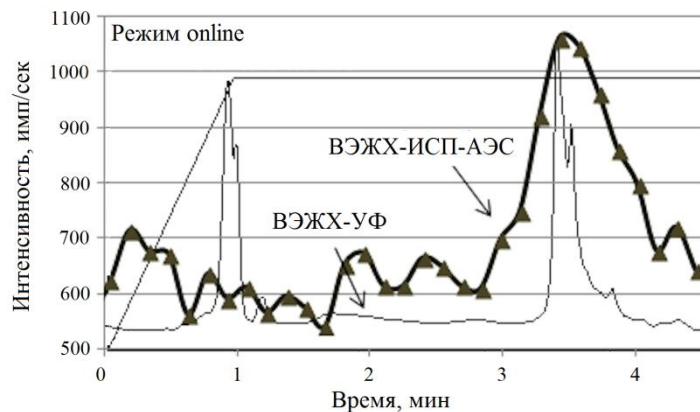


Рис. 17. Результаты ВЭЖХ-ИСП-АЭС идентификации кадмия в экстракте корня (режим *online*). Условия разделения и детектирования: аналогично рис. 16

Как уже упоминалось ранее, в выделенных в режиме *offline* фракциях также проводили определение кадмия, содержания сульфгидрильных групп и аминокислот для идентификации форм связывания Cd. На рис. 18 представлена хроматограмма экстракта корня гиацинта, подвергавшегося воздействию поллютанта, и результаты количественной оценки содержания кадмия в выделенных фракциях.

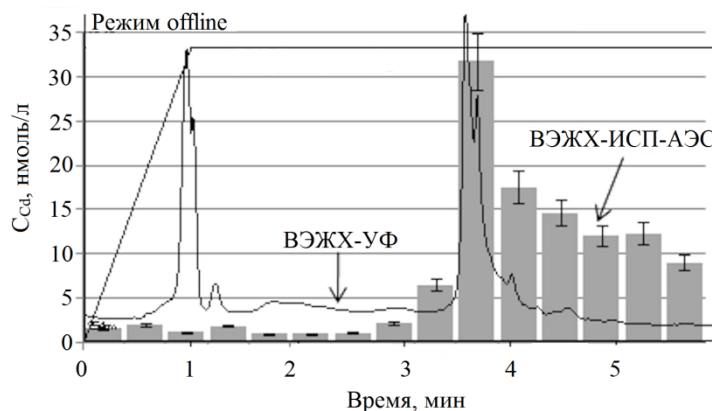


Рис. 18. Распределение кадмия по фракциям, полученным путем хроматографирования экстракта корня растения (режим *offline*). Условия разделения и детектирования: аналогично рис. 16

Зная концентрацию элемента в экстракте и каждой из фракций, можно рассчитать долю кадмия, содержащегося в выделенном пике, от общего количества, введенного в колонку. Для стеблей и листьев выполнить подобные расчеты не удалось ввиду низкой концентрации элемента во фракциях ($< 0,5$ мкг/л). Для экстрактов корня растения соблюдается баланс концентраций кадмия во фракциях и общего количества, введенного в колонку, что указывает на преимущественное концентрирование аналита во втором пике (3,5-4,0 мин) (табл. 15).

Т а б л и ц а 15

Количество кадмия, вводимого в колонку, и суммарное содержание во фракциях, выделенных в ходе хроматографирования экстракта

Проба	Количество кадмия, введенного в колонку, нг (n=5)	Суммарное содержание кадмия во фракциях, нг (n=5)
корни (7к)	9,5±2,0	9,7±2,0
корни (9к)	5,0±1,2	6,9±1,4

3.5 Определение сульфгидрильных групп в компонентах экстрактов гиацинта методом инверсионной вольтамперометрии

Как отмечалась в литературном обзоре, кадмий в растениях может связываться с серосодержащими лигандами (тиолами). Для идентификации последних в экстрактах гиацинта и выделенных фракциях, содержащих кадмий, применяли метод инверсионной вольтамперометрии (методика описана в разделе 2.3.3). Этот метод позволяет

экспрессно получить информацию о содержании тиолов, что особенно важно ввиду лабильности сульфгидрильных групп и их быстрому окислению кислородом воздуха. Определение SH-групп во фракциях, соответствующих пику хроматограммы, содержащему кадмий, позволяет также оценить долю соединений серы, участвующих в связывании кадмия, и сопоставить результаты с данными по суммарному содержанию элемента, полученными методом ИСП-АЭС.

Оказалось, что концентрации сульфгидрильных групп в экстрактах корня и стебля гиацинта близки по величине, а в экстрактах листьев содержание тиолов несколько ниже по сравнению с корнями и стеблями. Сопоставление данных по содержанию тиолов и суммарному содержанию серы в экстрактах показало, что доля серы, присутствующей в экстракте в тиольной форме, близка к 100% в корнях и стеблях гиацинта, тогда как в листьях эта величина ниже. Полученные результаты приведены на рис. 19 и в табл. 16.

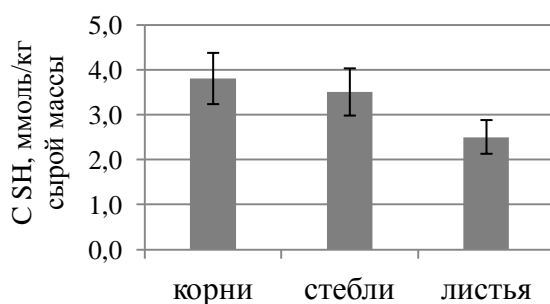


Рис. 19. Концентрации SH-групп в экстрактах корней, стеблей и листьев растений

Т а б л и ц а 16

Доля тиольных форм серы (%) в экстрактах различных частей гиацинта

Орган	Доля тиолсодержащих форм от общего количества серы, % (n=5)
корни	103±21
стебли	112±22
листья	76±15

Помимо информации об общем содержании сульфгидрильных групп в экстрактах, интерес представляет также информация о содержании тиольных групп непосредственно во фракциях, содержащих кадмий. Установлено, что распределение SH-групп по фракциям совпадает по относительному содержанию с таковым для кадмия, что указывает на его возможное связывание тиольными группами (рис. 20). Кроме того, суммарное количество серы, введенное в колонку, практически совпадает с ее содержанием в выделенных фракциях хроматографического пика, содержащего кадмий.

Мольное отношение тиольных групп к кадмию составляет 40 / 1. Вероятно, ионы кадмия либо связываются с достаточно большими молекулами, содержащими большое количество сульфгидрильных групп (например, белками – металлотионеинами), либо взаимодействуют с более мелкими молекулами, например, пептидами – фитохелатинами, общее количество которых, во фракциях велико по сравнению с кадмием [205]. Для того чтобы более подробно изучить выделенные соединения и установить их природу, был проведен кислотный гидролиз фракций с последующим определением аминокислотного состава методом ВЭЖХ.

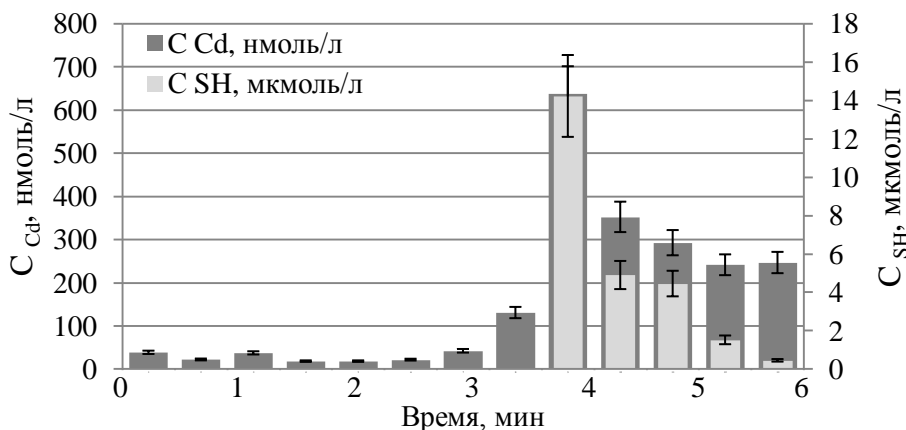


Рис. 20. Содержание кадмия и тиольных групп во фракциях, выделенных из экстракта корня

3.6 Распределение серы в тканях растения и выделенных экстрактах

В организме растения сера является одним из элементов, входящих в состав веществ, участвующих в метаболизме соединений кадмия. Поступая в ткани растения в форме сульфатов, соединения серы быстро восстанавливаются и участвуют в синтезе глутатиона и фитохелатинов. Известно, что в растениях, проявляющих высокую устойчивость к воздействию тяжелых металлов, наблюдается интенсификация синтеза мРНК, кодирующей белки, участвующие в транспорте сульфата, биосинтеза фитохелатинов [206]. Ниже приведены данные по содержанию серы в тканях водяного гиацинта (рис. 21).

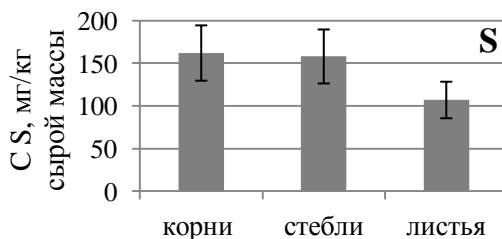


Рис. 21. Содержание серы в тканях гиацинта

Концентрацию серы определяли методом ИСП-АЭС после микроволнового разложения проб. В корнях и стеблях растения содержится 0,16%, в листьях – 0,11% серы относительно сухой массы. Концентрация серы в растительных организмах в среднем составляет около 0,2% сухой массы растения (за исключением семейства крестоцветных, имеющих более высокие показатели) [206]. Таким образом, общее содержание серы в гиацинте близко к среднему значению для растений. Во фракциях, содержащих соединения кадмия, экстрагируемые водой, присутствует 89 ± 18 , 78 ± 16 , 72 ± 15 мг S на кг сырой массы в пересчете на корни, стебли и листья соответственно. Степень извлечения серы составляет 55-67%, что говорит о присутствии серы в тканях растения преимущественно в форме гидрофильных соединений.

3.7 Определение аминокислотного состава выделенных фракций, содержащих кадмий

Определение аминокислотного состава соединений исследуемого элемента проводили во фракциях, содержащих кадмий, в соответствии с методикой, приведенной в разделе 2.3.2. При этом также отбирали фракции с участка хроматограммы, не содержащего кадмий для подтверждения отсутствия в них пептидных соединений. Результаты определения аминокислотного состава фракций приведены в табл. 17.

Т а б л и ц а 17

Аминокислотный состав фракций, содержащих кадмий (n=5)

Аминокислота	корни 7к (Cd)	корни 8к (Cd)	корни, контроль	стебли 7s (Cd)
C Glu, мкмоль/л	1,4±0,3	1,0±0,2	7,2±1,4	0,3±0,1
C Cys, мкмоль/л	0,5±0,2	1,4±0,4	3,9±1,0	0,2±0,1
C Gly, мкмоль/л	3,0±0,6	2,5±0,5	9,1±1,8	0,4±0,1

Видно, что выделенные соединения характеризуются наличием нескольких аминокислот, причем содержание цистеина достигает 30% мол. Эта аминокислота представляет наибольший интерес с точки зрения связывания кадмия. Доля сульфгидрильных групп цистеина достигает 40-50% от общего количества SH-групп. Однако, установить закономерность между содержанием цистеина во фракциях, выделенных из экстрактов различных частей контрольных и подвергавшихся воздействию кадмия растений, не удалось, что может быть связано с высокой погрешностью определения цистеина ввиду его быстрого окисления кислородом

воздуха. В состав всех фракций входит и глицин, но его содержание во многих случаях превышает значения, полученные для двух других компонентов фитохелатинов. Высокое содержание глицина может быть обусловлено его распространенностью и присутствием в пробах других соединений пептидной природы, характеризующихся близкими параметрами удерживания.

3.8 Заключение по главе 3

Таким образом, в результате проведенных исследований предложен подход, позволяющей выявить наиболее вероятные формы связывания кадмия в растениях. При этом с применением гистохимического метода анализа показано, что кадмий локализуется в ризодерме и первичной коре корня.

Предложена процедура ступенчатой экстракции форм связывания кадмия, применение которой позволяет оценить долю элемента, связанного с компонентами клеточной стенки и долю подвижных форм в водном экстракте. Установлено, что в корне растения 10% представлено водорастворимыми соединениями, с пектинами связано 55%, а 35% кадмия прочно связаны с компонентами клеточной стенки.

Применение гибридного метода, сочетающего ВЭЖХ разделение с фотометрическим и элемент-селективным детектированием позволяет установить наличие и тип соединений исследуемого элемента в экстрактах. Выделение и изучение вещественного состава фракций, содержащих кадмий, позволяет установить природу компонентов экстракта. В рамках проведенных исследований оптимизированы параметры состыковки хроматографа с элемент-селективным детектором, обеспечивающие максимальную чувствительность анализа, а также условия разделения и детектирования соединений, содержащих кадмий, методами ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-ИСП-АЭС. Установлено, что в водной фракции, содержащей подвижные формы элемента, кадмий связан преимущественно с полипептидами с высоким содержанием цистеина (до 30% мол.).

ГЛАВА 4. Идентификация форм связывания ртути в растениях с применением метода ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС

Из литературы известно, что ртуть может присутствовать в организме растения как в виде иона Hg^{2+} , так и в метилированной форме. Как правило, внимание уделяется только этим двум формам, в связи с чем экстракцию проводят растворами кислот и щелочей. Такой подход приводит к потере информации об исходных химических формах ртути в растениях, к коим могут относиться комплексы с карбоновыми кислотами, аминокислотами, пектинами и другими компонентами клеточной стенки [187]. Для решения задач, связанных с идентификацией форм ртути без их разрушения в ходе экстракции, предложен подход, основанный на применении метод ВЭЖХ с элемент-селективным детектированием (рис. 22).

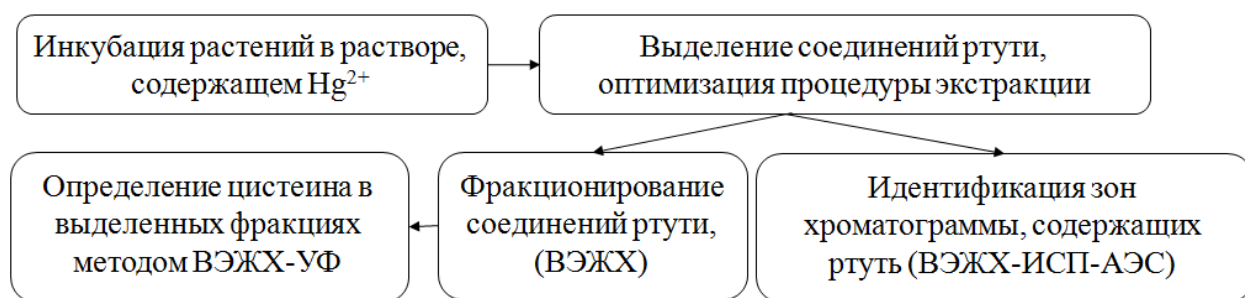


Рис. 22. Общая схема идентификации форм связывания ртути в растениях

После завершения лабораторного эксперимента, в котором растениях водяного гиацинта инкубировались в растворе, содержащем ртуть, проводили экстракцию соединений ртути с последующим хроматографическим разделением компонентов экстракта и выявлением основных зон, содержащих ртуть методом ВЭЖХ-ИСП-АЭС. С целью снижения пределов обнаружения и уменьшения влияния органической компоненты элюата 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 с восстановлением ртути методом холодного пара (ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС) в режиме *online* позволило получить предварительную информацию о формах связывания ртути. При проведении анализа в режиме *offline*, процедуры разделения и детектирования форм ртути разнесены во времени. Отбор фракций, содержащих ртуть, в процессе хроматографического разделения компонентов экстракта дает возможность изучить их вещественный состав, в том числе, определение содержания аминокислот.

4.1 Распределение ртути в органах растений

На первом этапе исследования в растениях, подвергавшихся воздействию ртути, определяли общее содержание элемента и его распределение между корнями, стеблями и листьями. Способность водяного гиацинта к аккумуляции ртути оценивали с помощью коэффициента биологического концентрирования (BCF). Для корней гиацинта величина BCF после 3 и 72 часов воздействия ртути при исходной концентрации в растворе 1 мг/л составила 2200 ± 300 и 5000 ± 400 , соответственно, что говорит о высокой способности растения к аккумуляции ртути и активном протекании процесса накопления элемента уже в первые часы эксперимента. Оказалось, что через несколько часов скорость накопления элемента в корне растения снижается, и происходит его транспорт в стебли и листья растения (рис. 23). Стоит отметить, что в первые 6 часов эксперимента не происходит значимого изменения концентрации ртути в листьях гиацинта, но через 72 часа она увеличивается с $4,0 \pm 0,6$ до 51 ± 4 мг/кг сухой массы, что говорит о постепенном перераспределении элемента в листья растения за счет преодоления физиологических барьеров. В корне растения через 72 часа концентрация ртути составляет 5000 ± 400 мг/кг сухой массы. По завершению эксперимента остаточная концентрация ртути в растворе снизилась с $1,00 \pm 0,05$ до $0,04 \pm 0,01$ мг/л. Lenka и др. [207] показали, что водяной гиацинт способен аккумулировать до 600 мг/кг ртути за 4 суток при исходной концентрации в растворе 0,04 мг/л, тогда как Skinner и др. [208] получили значение 26,2 мг/кг в корне растения после 30 дней выращивания в растворе 2 мг/л ртути. Причина столь значимых различий в настоящее время остается малоизученной. Известно, что наличие питательных веществ, интенсивность освещения, температура окружающей среды и возраст растения могут оказывать влияние на интенсивность аккумуляции элементов растениями [209].

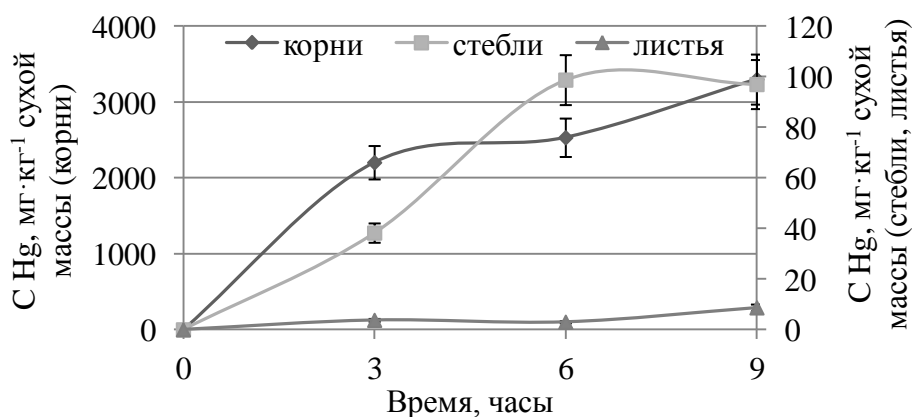


Рис. 23. Временная динамика накопления ртути в органах водяного гиацинта

Накопление ртути во многом зависит от ее перераспределения между корнями, стеблями и листьями ввиду ограниченной сорбционной емкости корней, находящихся в непосредственном контакте с ртутью. В результате проведения лабораторного эксперимента была получена следующая величина транслокационного фактора для ртути: $TF(Hg) = 0,018 \pm 0,003$, что указывает на медленный транспорт ртути в стебли и листья растения и ее концентрирование в корне растения по сравнению с кадмием ($TF(Cd) = 0,15 \pm 0,02$).

4.1.1 Изучение распределения ртути в растениях методом СЭМ-ЭДС

Для визуализации пространственного распределения ртути в тканях растения применяли сканирующий электронный микроскоп высокого разрешения с энергодисперсионным анализатором химического состава. Для получения качественной картины существенную роль играет подготовка среза ткани растения.

Для того чтобы с помощью сканирующего электронного микроскопа изучить распределение того или иного элемента в растительной ткани необходимо в первую очередь подготовить срезы. Для анализа корней срезы снимались преимущественно с апикальной части и прилегающей к стеблю ввиду более плотной структуры и отсутствия корневых волосков. Для наиболее полной характеристики образцов снимали срезы с нескольких корней одного и того же растения. Корни гиацинта имеют первичную структуру. В строении корня можно различить ризодерму, первичную кору и центральный цилиндр (стелу). Поверхность корня покрыта ризодермой, состоящей из живых мелких клеток с корневыми волосками.

Результаты исследования срезов корня водяного гиацинта методом СЭМ-ЭДС показали, что основная часть ртути сконцентрирована в ризодерме растения. Рис. 24 иллюстрирует участок ризодермы корня, подвергавшегося воздействию ртути (1,0 мг/л). На основании энергодисперсионных спектров различных зон среза корня установлено, что ртуть распределена в ткани растения в виде мелких частиц. Стоит отметить, что запись спектров проводится под вакуумом, что в принципе может привести к трансформации форм исследуемого элемента ввиду потери воды. В этой связи метод СЭМ-ЭДС в данной работе использовался исключительно с целью выявления зон локализации ртути.

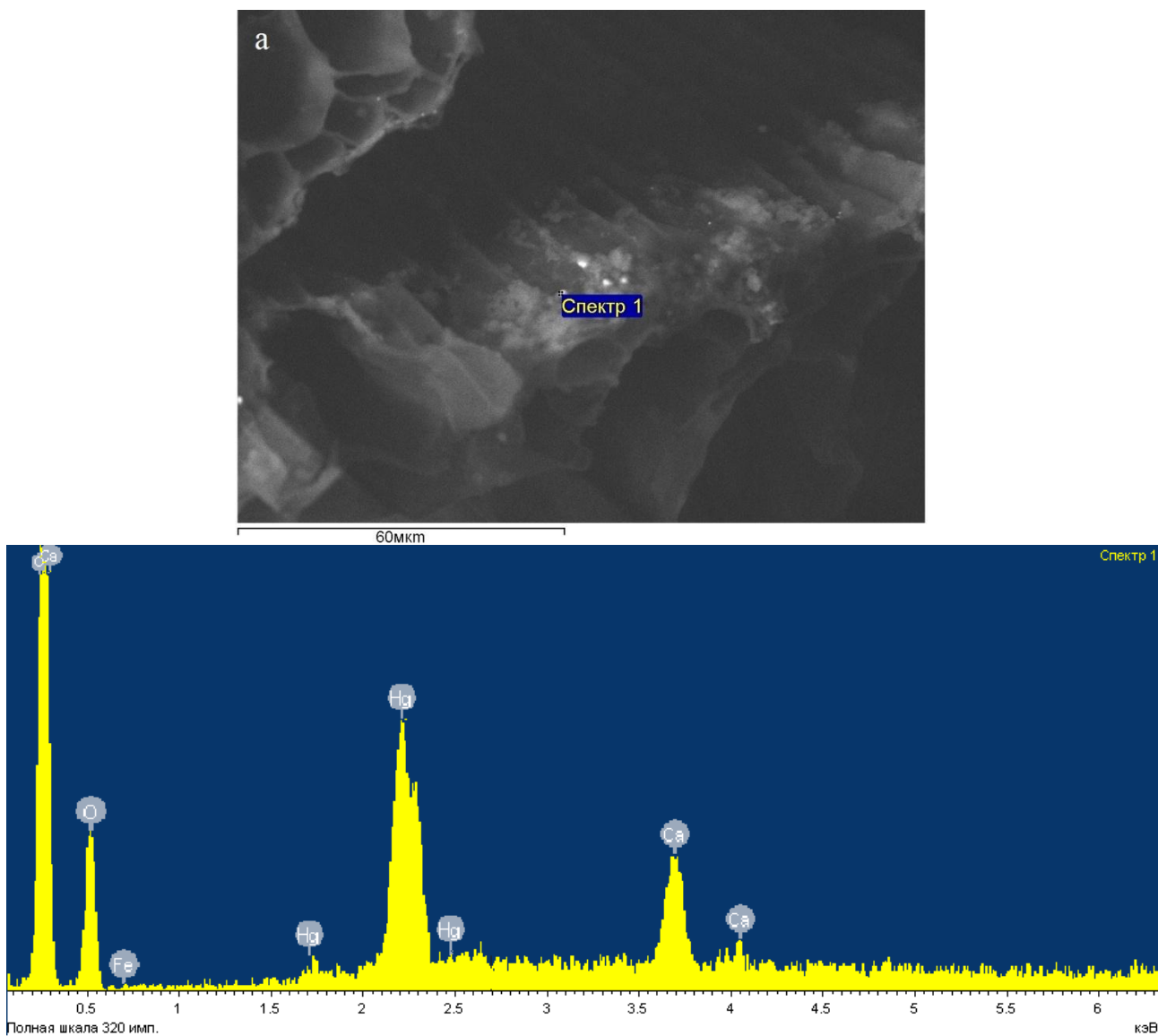


Рис. 24. а) локализация ртути в корне водяного гиацинта; б) энергодисперсионный спектр зоны, содержащей ртуть

Установлено, что ртуть также концентрируется непосредственно на поверхности корня растения (рис. 25). При этом наблюдается присутствие отдельных частиц ртути (рис. 25а) и образование пленки, покрывающей поверхность корня (рис. 25б).

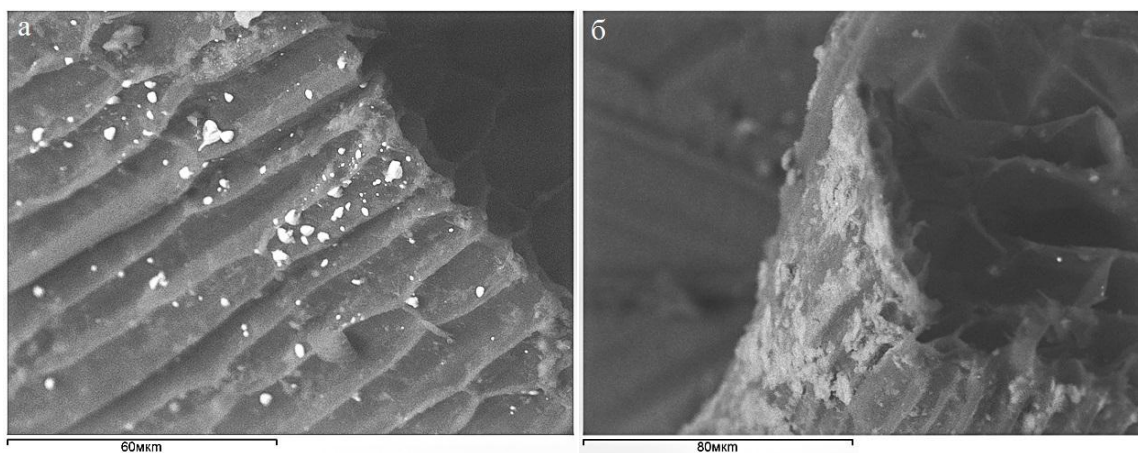


Рис. 25. Локализация ртути на поверхности корня водяного гиацинта (светлые зоны содержат ртуть)

4.2 Экстракция соединений ртути из растений

Для изучения форм связывания ртути в растениях была предложена процедура фракционирования (последовательного выщелачивая). Клеточная стенка растения обладает способностью связывать положительно заряженные ионы металлов за счет наличия отрицательно заряженных групп на поверхности. Состав клеточной стенки варьируется в зависимости от типа клеток, ткани и вида растения. В среднем клеточная стенка содержит 25-30% целлюлозы, 15-25% гемицеллюлозы, 35% пектина и 5-10% гликопротеинов. Наличие отрицательно заряженных карбоксильных групп пектина и гликопротеинов обуславливают высокое сродство к ионам металлов [14]. При этом пектины обеспечивают 70-90% катионной обменной емкости клеточной стенки. Оставшиеся 10-30% относят к функциональным группам гликопротеинов [15]. Получение информации о подвижных и связанных с клеточной стенкой формах элементов возможно при проведении процедуры последовательного фракционирования, позволяющей извлекать долю элемента, связанную с теми или иными группами. В данной работе предложена следующая трехступенчатая процедура фракционирования ртути, представленная ниже.

Для извлечения подвижных соединений ртути из растений брали 1,0 г измельченной замороженной ткани растения, добавляли деионизованную воду, гомогенизировали полученную смесь в кварцевой ступке на льду, выдерживали 15 мин и центрифугировали в течение 15 мин при 18000 об/мин при температуре 4°C. Супернатант фильтровали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и хранили при -20°C до проведения анализа. На второй и третьей стадии остаток подвергали аналогичной процедуре с использованием в качестве экстрагента $1,0 \cdot 10^{-3}$ М HCl и 2 М HCl соответственно. Для оптимизации процедуры экстракции изучали влияние объема экстрагента на степень извлечения ртути, используя растения с различным общим содержанием ртути (от 200 мкг/кг до 1000 мг/кг сырой массы). Показано, что при соотношении $m_{\text{экстрагента}}/m_{\text{навески}} = 9$ (на каждой из стадий) происходит 100% извлечение элемента (рис. 26).

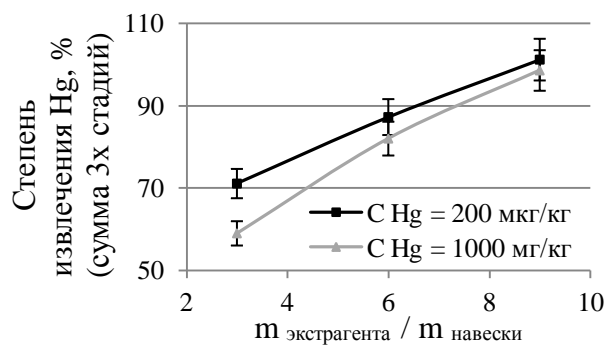


Рис. 26. Зависимость степени извлечения ртути после трех стадий экстракции от объема экстрагента

Как показано ранее, ртуть концентрируется преимущественно в корне растения, что согласуется с результатами других исследований [210, 211]. Для идентификации форм связывания ртути в растении в первую очередь требуется провести экстракцию. Для идентификации форм связывания ртути в тканях растения их необходимо извлечь, при этом не исключена возможность превращения одних форм в другие. Для предотвращения этого эффекта, как правило, используют мягкие экстрагенты (вода, буферные растворы с нейтральным или слабокислым pH) [212]. Однако 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 [213]. Riddle и др. [70] показали, что в корне водяного гиацинта ртуть связана преимущественно с кислородсодержащими функциональными группами (вероятнее всего - карбоксильными). В связи с этим на второй стадии ступенчатой экстракции использовали раствор $1,0 \cdot 10^{-3}$ М соляной кислоты, чтобы извлечь ртуть, связанную с карбоксильными группами за счет диссоциации связи Hg-O в кислой среде. При увеличении концентрации кислоты до 2 М на третьей стадии экстракции происходит выделение ртути, прочно связанной с компонентами клеточной стенки [214].

Для корней водяного гиацинта, подвергавшихся воздействию 1,0 мг/л ртути, водная фракция содержит 8,6-13,9% ртути от общего количества. Кроме того, наблюдается уменьшение относительного содержания ртути в этой фракции при увеличении времени воздействия. На втором этапе при экстракции $1,0 \cdot 10^{-3}$ М соляной кислоты извлекается 2,2-10,4% от общего количества ртути. С увеличением времени воздействия также происходит уменьшение содержания ртути в данной фракции.

Стоит отметить, что доля ртути, связанная с компонентами клеточной стенки достаточно высока, составляет 77-93% и увеличивается с увеличением времени воздействия элемента (рис. 27). Такое распределение ртути по фракциям можно объяснить ограниченной емкостью растительной ткани по отношению к формам, экстрагируемым водой. При увеличении концентрации ртути, по-видимому, происходит более эффективное связывание элемента с компонентами клеточной стенки, так как межклеточное и внутриклеточное вещество не имеет достаточного количества лигандов для связывания больших количеств ртути [72].

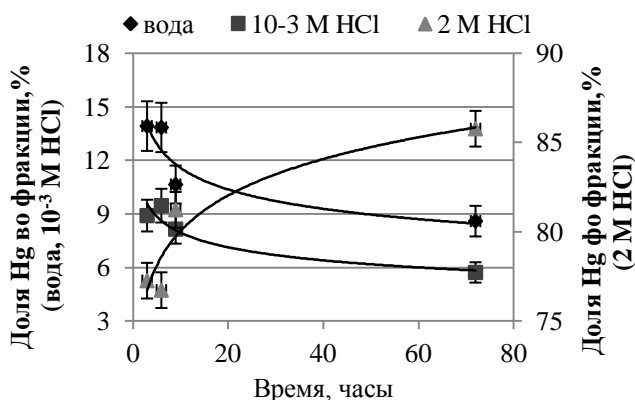
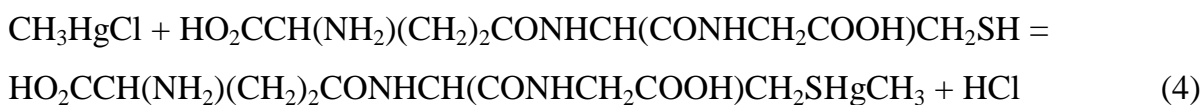
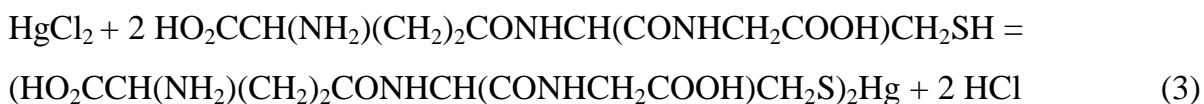


Рис. 27. Распределение ртути по фракциям в корне водяного гиацинта в зависимости от времени воздействия ($C_{0Hg} = 1$ мг/л)

4.3 Синтез цистеината и глутатионата ртути и метилртути

В литературе имеются данные об образовании в растениях соединений ртути с аминокислотой цистеином и трипептидом глутатионом, участвующем в также в окислительно-восстановительных процессах [192]. Для идентификации форм ртути в водяном гиацинте были синтезированы соединения ртути и метилртути с цистеином и глутатионом. Синтез осуществляли по методике, описанной Krupp и др. [192] путем добавления раствора цистеина или глутатиона к раствору ртути или метилртути в стехиометрическом отношении.



Растворы готовили таким образом, чтобы концентрация полученного соединения в пересчете на ртуть составляла 10 мг/л. Цистеинат ртути ($\text{Hg}(\text{Cys})_2$, $\lg\beta_2=40,0$

[215]) (1), цистеинат метилртути (**MeHgCys**, $\lg\beta_1=15,56$ [215]) (2), глутатионат ртути (**Hg(GS)₂**, $\lg\beta_2=52,29$ [216]) (3) и глутатионат метилртути (**MeHgGS**, $\lg\beta_1=15,99$ [217]) (4) получали непосредственно перед анализом в связи с возможностью их окисления в присутствии кислорода воздуха.

Известно, что при сливании растворов ртути или метилртути и соответствующего лиганда возможно образование разных соединений в зависимости от мольного отношения между реагентами [218]. В связи с этим, с целью подтверждения состава, полученные соединения были выделены в чистом виде и охарактеризованы с помощью методов CHNS и ИСП-АЭС анализа (табл. 18). Для определения ртути полученные комплексы растворяли в воде и анализировали методом ИСП-АЭС с генерацией паров ртути.

Т а б л и ц а 18

Элементный состав синтезированных соединений ртути и метилртути

Соединение	C _{эксп} ,% / C _{теор} ,%	H _{эксп} ,% / H _{теор} ,%	N _{эксп} ,% / N _{теор} ,%	S _{эксп} ,% / S _{теор} ,%	Hg _{эксп} ,% / Hg _{теор} ,%
Hg(Cys) ₂ (1)	16,0 / 16,3	3,0 / 2,7	6,2 / 6,4	14,2 / 14,5	45,1 / 45,5
MeHgCys (2)	14,2 / 14,3	2,9 / 2,7	4,0 / 4,2	9,6 / 9,5	60,1 / 59,8
Hg(GS) ₂ (3)	29,3 / 29,5	4,1 / 3,9	10,1 / 10,3	7,7 / 7,9	24,5 / 24,7
MeHgGS (4)	25,0 / 25,3	3,8 / 3,6	7,9 / 8,1	6,0 / 6,1	38,4 / 38,5

Для получения цистеината ртути (1), навески HgCl₂ и цистеина растворяли в воде и слили. Моментально выпал белый осадок. Для лучшего осаждения которого добавляли этанол. Полученный осадок отфильтровали через бумажный фильтр, промыли этанолом и сушили до постоянной массы.

Для синтеза комплекса метилртути с цистеином (2), навески CH₃HgCl и цистеина растворяли в этаноле и воде соответственно. Наблюдали помутнение раствора. С целью выделения продукта реакции в чистом виде изучали его осаждение в различных растворителях, а именно хлороформе, четыреххлористом углероде и ацетоне. Для этого повторяли предыдущий опыт, после чего к полученному раствору добавляли небольшое количество растворителя. Использование ацетона позволило добиться выпадения белого осадка, который затем отфильтровали, промыли ацетоном, высушили и взвесили.

Синтез глутатионата ртути (3) осуществляли путем смешивания водных растворов HgCl₂ и глутатиона. Наблюдали помутнение раствора. Для осаждения глутатио-

ната ртути добавляли этанол. Полученный осадок отфильтровали через бумажный фильтр, промыли этанолом и сушили до постоянной массы.

Для получения комплекса метилртути с глутатионом (4), навески CH_3HgCl и глутатиона растворили в этаноле и воде соответственно. С целью выделения продукта реакции в чистом виде изучали его осаждение в различных растворителях, а именно хлороформе, четыреххлористом углероде и ацетоне. Использование ацетона позволило добиться выпадения белого осадка, который затем отфильтровали, промыли ацетоном, высушили и взвесили.

4.4 Оптимизация условий идентификации компонентов экстракта методом ВЭЖХ-ХП-ИПС-АЭС

Принципиальная схема системы ВЭЖХ-ХП-ИПС-АЭС с генерацией холодного пара ртути представлена на рис. 28. В случае идентификации форм связывания ртути пневматический распылитель спектрометра был заменен на приставку для генерации паров ртути. При этом атомарная ртуть отделяется от основы пробы и вводится в плазму, что позволяет уменьшить загрузку плазмы, фоновый сигнал и увеличить чувствительность.

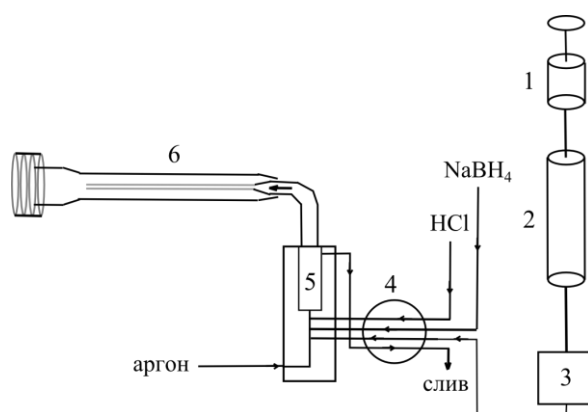


Рис. 28. Принципиальная схема состыковки хроматографа и спектрометра для идентификации форм связывания ртути:

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

На рис. 29а приведена хроматограмма $\text{Hg}(\text{Cys})_2$, $\text{Hg}(\text{SG})_2$ (1,0 мг/л по ртути), полученная с применением стандартного пневматического распылителя для ввода элюата в плазму ($\lambda_{\text{Hg}} = 189,4$ нм). Видно, что аналитические сигналы, отвечающие соединениям ртути на хроматограмме отсутствует, что, по всей видимости, обусловлено пост-колоночным размытием пика. Этот эффект можно скомпенсировать при ис-

пользовании вместо пневматического распылителя генератора холодного пара ртути за счет повышения эффективности ввода пробы в индуктивно связанную плазму в виде газа, что наглядно иллюстрируется хроматограммой на рис. 29б.

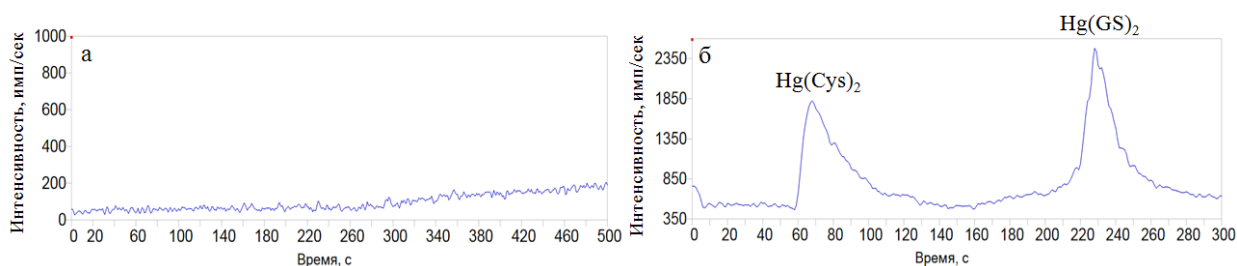


Рис. 29. ВЭЖХ-ИСП-АЭС разделение цистеината и глутатионата ртути с вводом элюата в плазму через пневматический распылитель (а) и с применением генератора паров ртути (б)

4.4.1 Оптимизация параметров гибридной системы ВЭЖХ-ИСП-АЭС

4.4.1.1 Выбор условий хроматографического разделения компонентов экстракта

Для обеспечения оптимальных параметров разделения соединений ртути (эффективности, разрешения и площадей пиков), были апробированы подвижные фазы различного состава. Так, на первом этапе была предпринята попытка разделить данные соединения с использованием в качестве элюентов воды и ацетонитрила, однако, ввиду малого различия гидрофобности исследуемых соединений добиться удовлетворительного разделения $\text{Hg}(\text{Cys})_2$ и $\text{Hg}(\text{GS})_2$ не удалось (рис. 30а). Принимая во внимание наличие в структуре цистеината и глутатионата ртути карбоксильных и аминогрупп, предложено осуществлять разделение цистеината и глутатионата ртути в режиме ион-парной обращено-фазовой хроматографии с использованием ТБАГ в качестве анион-парного реагента (рис. 30б, табл. 19). Варьирование концентрации ион-парного реагента в элюентах от 0,01 до 0,08% показало, что оптимальное разделение комплексов ртути и метилртути достигается при $C_{\text{ТБАГ}} = 0,04\%$. Скорость потока элюента выбирали максимально возможную, что сокращает время анализа, а также позволяет снизить предел обнаружения ртути за счет ввода большего объема элюата в индуктивно связанную плазму. Более сильное удерживание глутатионата ртути по сравнению с цистеинатом ртути в режиме ион-парной обращено-фазовой хроматографии, вероятно, обусловлено наличием в структуре комплекса двух свободных карбоксильных групп, благодаря чему происходит образование ионной пары с катионом тетрабутиламмония.

Условия разделения цистeinата и глутатионата ртути 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

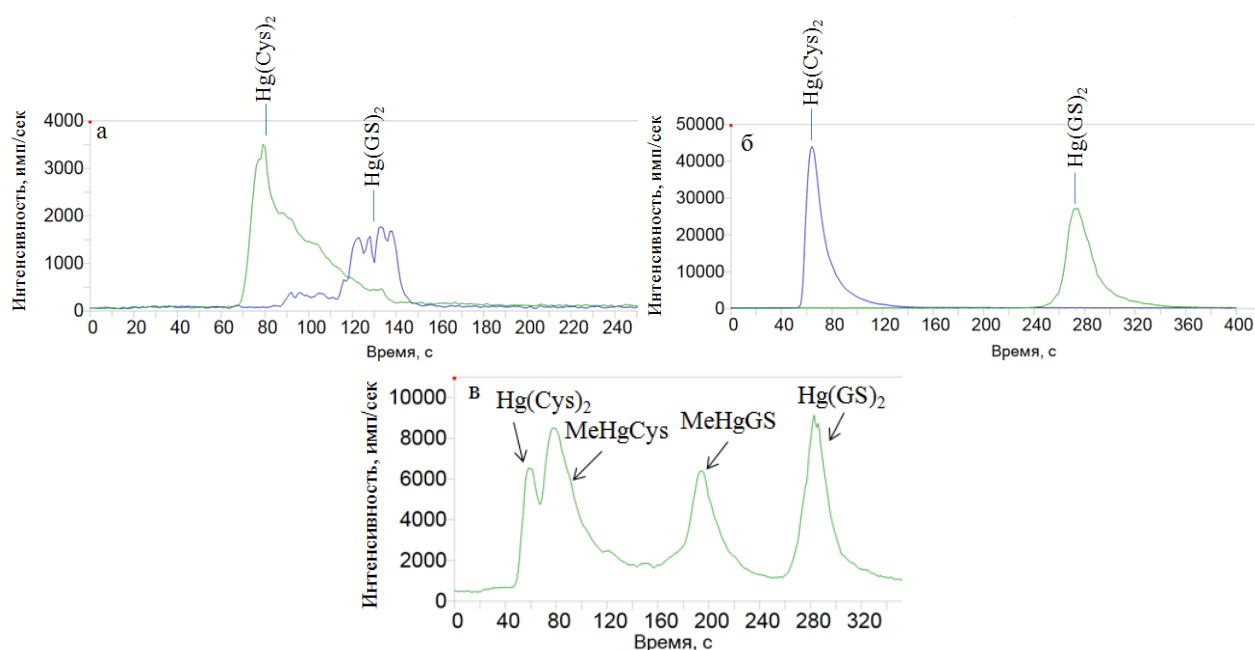


Рис. 30. Разделение форм ртути в режиме обращенно-фазовой (а), в режиме ион-парной обращенно-фазовой хроматографии ($C_{\text{ТБАГ}} = 0,04\%$) (б,в)

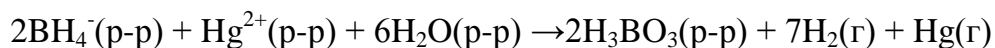
4.4.1.2 Оптимизация параметров ИСП-АЭС-детектирования

При использовании ИСП-АЭС в качестве элемент-селективного детектора для ВЭЖХ возникают следующие проблемы:

- возрастание предела обнаружения элемента за счет пост-колоночного размывания пиков в капилляре соединительного тракта;
- влияние состава элюента на интенсивность спектральной линии аналита.

Один из наиболее эффективных подходов для решения обеих проблем – генерация холодного пара ртути, благодаря которому происходит отделение аналита от матрицы, а значит, устраняется эффект влияния состава на его сигнал. Кроме того, за счет ввода в плазму газовой фазы концентрация элемента в индуктивно связанной

плазме повышается, что приводит к повышению чувствительности его определения. Образование свободной ртути происходит в соответствии с уравнением:



Далее с током аргона атомарная ртуть поступает в индуктивно-связанную плазму. Для обеспечения стабильной работы гибридной системы были оптимизированы условия подачи элюата и восстановления соединений ртути, а также параметры работы спектрометра.

Закономерности формирования аналитического сигнала определяемого элемента были изучены на модельных растворах, содержащих цистеинат ртути. Такой выбор модельного объекта был обусловлен возможностью проведения хроматографического анализа в максимально простых условиях, что позволило подобрать оптимальные условия работы системы (рис. 31, табл. 20).

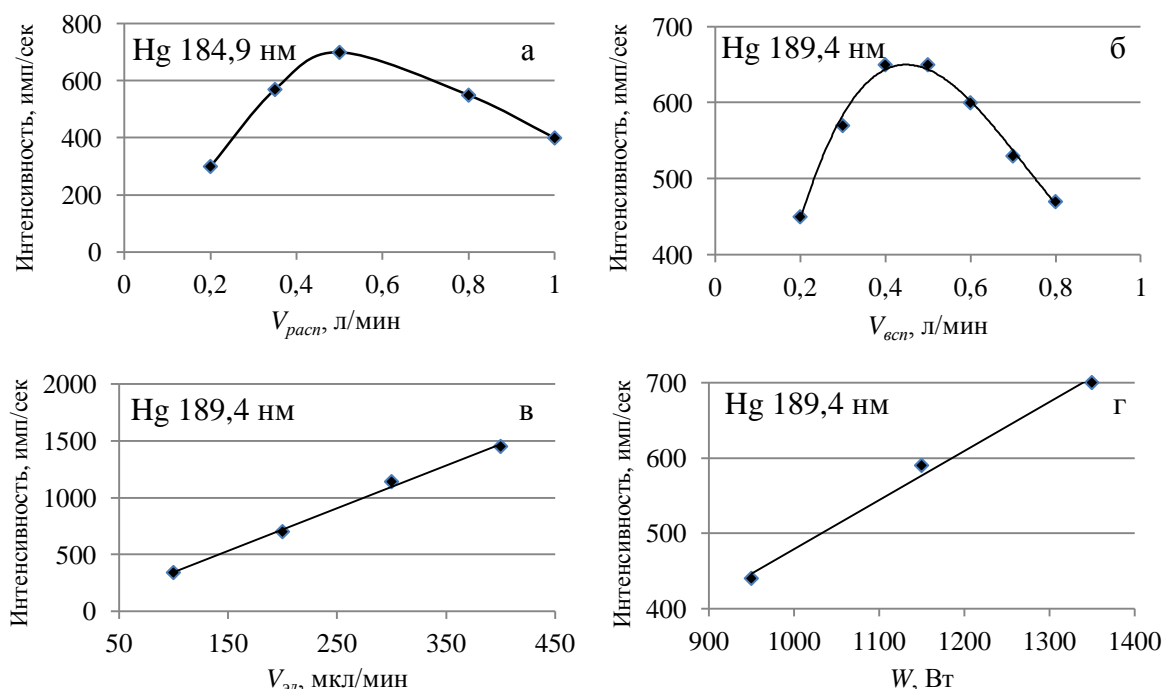


Рис. 31. Зависимости интенсивности аналитического сигнала ртути (имп/сек) от скорости распылительного ($V_{расп}$) (а) и вспомогательного потока аргона ($V_{всп}$) (б), скорости элюирования ($V_{эл}$) (в) и мощности источника W (г)

Т а б л и ц а 20

Оптимальные параметры работы ИСП-АЭС в режиме *online*

Параметр	Значение
Мощность	1350 Вт
Охлаждающий поток аргона	12 л/мин
Вспомогательный поток аргона	0,5 л/мин
Распылительный поток аргона	0,5 л/мин

При использовании генератора паров ртути перистальтический насос спектрометра осуществляет подачу восстановителя (0,5% NaBH₄ в 0,05% NaOH) и 50% раствора соляной кислоты для создания кислой среды, необходимой для протекания реакции восстановления ртути. В данном случае скорость работы перистальтического насоса выбирается исходя из необходимости создания непрерывного потока восстановителя и составляет 75 об/мин. С учетом объема соединительного тракта, запуск спектрометра осуществлялся одновременно с вводом пробы в хроматографическую колонку, таким образом, достигалась синхронность работы системы.

Скорость распылительного потока аргона оказывает влияние на эффективность транспорта паров ртути в индуктивно-связанную плазму. Оптимальная подача паров ртути достигается при $V_{расп} = 0,5$ л/мин (рис. 31а).

Для уменьшения соединительного тракта выходной капилляр спектрофотометрической кюветы был напрямую соединен с генератором паров ртути, при этом перистальтический насос обеспечивал своевременное удаление излишка элюата и восстановителя из генератора паров ртути. Между анализами генератор промывался деионизованной водой. При промывке генератора избегали резкого увеличения скорости работы насоса, приводящего к изменению давления паров ацетонитрила и, как следствие, тушению плазмы при работе в градиентном режиме элюирования.

Можно предположить, что эффективность восстановления ртути зависит от ее химической формы, поэтому влияние химического окружения ртути на полноту ее восстановления оценивали для всех изучаемых комплексов, т.е. для Hg²⁺, MeHg⁺, Hg(Cys)₂, MeHgCys, Hg(GS)₂, MeHgGS. Для этого каждую из форм с концентрацией 25 мг/л (по ртути) хроматографировали, причем в качестве подвижной фазы использовали деионизованную воду и рассчитывали площадь пика ртути (табл. 21).

Т а б л и ц а 21

Площади пиков различных форм ртути, регистрируемых ИСП-АЭС ($\lambda = 189,4$ нм), $C_{Hg} = 25$ мг/л

Форма ртути	Время выхода, сек	Площадь пика, имп ($\cdot 10^{-6}$), n=5
Hg(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
Hg(GS) ₂	275±2	1,02±0,11
Hg ²⁺	350±4	1,10±0,16

Значимых различий в площадях пиков для разных соединений при одинаковой вводимой концентрации ртути в колонку не наблюдалось, что говорит о независимо-

сти степени восстановления от формы ртути и возможности использования данного подхода для количественной оценки содержания ртути в исследуемых образцах.

Стоит отметить, что время выхода ионной формы ртути достаточно велико, по сравнению с другими исследуемыми формами, что является достаточно неожиданным результатом. Ввиду катионной природы данный ион не должен образовывать ионной пары с катионом тетрабутил аммония и удерживаться на колонке. Однако, сильное удерживание иона ртути(II) на колонке с обращенной фазой ранее уже наблюдалось Lemes и др. [124] и объяснялось возможным протеканием процесса сорбции ртути на поверхности силикагеля.

4.4.2 Рабочие параметры ВЭЖХ и ИСП-АЭС при проведении анализа в режиме *offline*

Для идентификации соединений и количественной оценки содержания элемента в них, проводили последовательный отбор фракций, содержащих ртуть, после хроматографирования в условиях, аналогичных таковым для режима *online*, на выходе из УФ-детектора хроматографа по 200 мкл (0,5 мин) в мерные пробирки. Добавляли 800 мкл HCl (осч), доводили объем до 8,0 мл, затем определяли концентрацию ртути методом ИСП-АЭС с генерацией паров ртути (рис. 32).

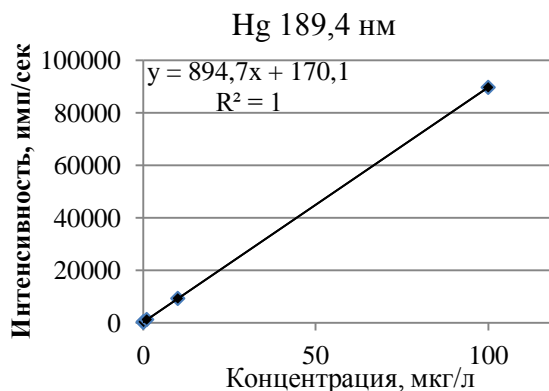


Рис. 32. Градуировочная зависимость интенсивности сигнала от концентрации ртути

Как уже упоминалось в литературном обзоре, металлы в водной фракции могут быть связаны с фрагментами белковой природы, например, пептидами. Для проверки данного предположения проводили сбор фракций (200 мкл, 0,5 мин), содержащих ртуть, с последующим определением аминокислотного состава после кислотного гидролиза. Фракции собирали последовательно в течение десяти вводов пробы. Таким образом, суммарный объем каждой из них составил 2,0 мл.

4.5 Выявление соединений ртути в экстрактах методом ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС

Было показано, что большее количество ртути (около 90%) аккумулируется в корне водяного гиацинта, что согласуется с литературными данными [219]. В связи с этим при идентификации форм связывания ртути именно корни являлись объектом исследования. Для извлечения ртути из растений использовали метод последовательной экстракции, который подробно описан в разделе 4.2. Предполагается, что на первой стадии благодаря использованию «мягкого» экстрагента, деионизованной воды, снижается вероятность трансформации форм ртути. Для проверки этого предположения и контроля правильности полученных результатов к замороженной ткани растений перед проведением первой стадии экстракции добавляли один из синтезированных комплексов ртути, Hg^{2+} или их смесь и оценивали степень извлечения (в качестве примера на рис. 33 представлена хроматограмма экстракта с добавкой цистeinата ртути).

Показано, что результаты «найдено» согласуются с результатами «введено» в пределах доверительного интервала (табл. 22), что позволяет сделать вывод о том, что применение деионизованной воды в качестве экстрагента не приводит к значимой трансформации форм связывания ртути, экстрагируемых водой.

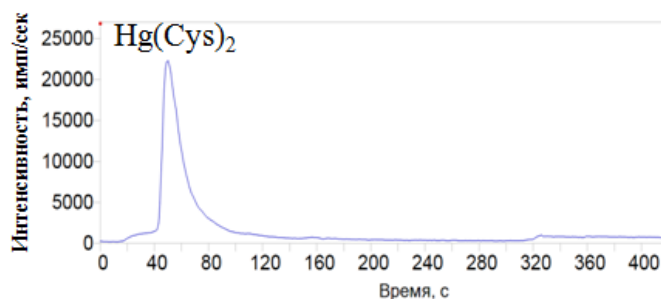


Рис. 33. ВЭЖХ-ИСП-АЭС хроматограмма водного экстракта из корня контрольного растения с добавкой $\text{Hg}(\text{Cys})_2$

Т а б л и ц а 22

Результаты «введено-найдено» для разных форм ртути применительно к водной фракции экстракта из корня контрольного растения ($C_{\text{Hg}} = 10 \text{ мг/л}$, $n = 5$)

Форма ртути	Найдено, мг/л
$\text{Hg}(\text{Cys})_2$	$9,3 \pm 1,9$
MeHgCys	$8,8 \pm 1,4$
MeHg^+	$10,3 \pm 1,1$
MeHgGS	$9,4 \pm 1,3$
$\text{Hg}(\text{GS})_2$	$10,5 \pm 1,6$
Hg^{2+}	$9,7 \pm 1,8$

На последующих двух стадиях экстракции извлечение ртути происходит за счет разрыва химических связей с применением растворов соляной кислоты разной концентрации. Так как концентрация ртути в экстрактах не превышает $1,0 \cdot 10^{-4}$ М, то можно предположить, что при использовании растворов $1,0 \cdot 10^{-3}$ М и 2,0 М HCl в качестве экстрагентов весьма вероятно образование хлоридных комплексов ртути состава HgCl^+ , HgCl_2^0 ($\lg K_1 = 6,74$, $\lg K_2 = 13,22$, $\lg K_3 = 14,07$, $\lg K_4 = 15,07$) [220]. Так как в случае применения растворов соляной кислоты при экстракции ртути происходит разрушение исходных соединений ртути с образованием иона ртути и/или хлоридных комплексов, то исследование полученных растворов методом ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС с генерацией паров ртути не дает информации об исходных формах связывания ртути в растении. При анализе данных экстрактов во всех случаях регистрировали один пик, соответствующий иону ртути Hg^{2+} и хлоридным комплексам HgCl^+ , HgCl_2^0 . При хроматографировании модельного раствора, содержащего ион ртути в $1,0 \cdot 10^{-3}$ М соляной кислоте также регистрировали один пик, время выхода которого совпадает с временем выхода Hg^{2+} .

При изучении форм связывания ртути в водной фракции на первом этапе выявляли зоны локализации ртути методом ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС в режиме *online* (условия проведения анализа описаны в разделе 4.4.1). На хроматограмме экстракта корня растения, подвергавшегося воздействию ртути, присутствует два пика, содержащих ртуть (рис. 34), причем время выхода второго пика соответствует таковому для катиона Hg^{2+} .

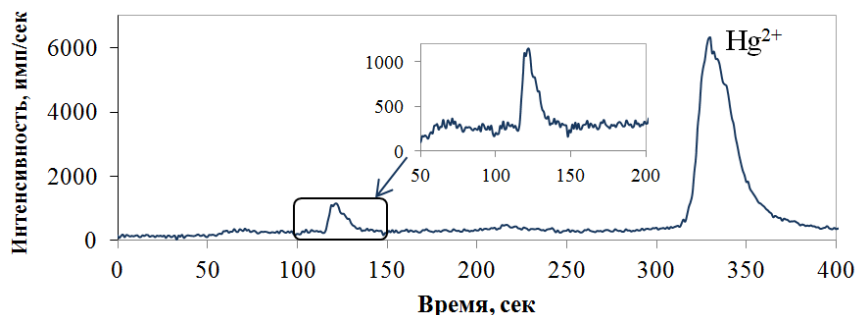


Рис. 34. ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС хроматограмма водной фракции из корня растения, подвергавшегося воздействию ртути

Время выхода первого пика (125 сек) близко к времени выхода MeHg^+ (табл. 21). Для проведения корректной идентификации был проведен следующий эксперимент. При хроматографировании экстракта растения в качестве подвижной фазы применяли раствор, содержащий 0,5% цистеина и 60 мМ ацетата аммония (рН 5). Элюирование

проводили в изократическом режиме. В этом случае Hg^{2+} , $\text{Hg}(\text{Cys})_2$ и $\text{Hg}(\text{GS})_2$ выходят с мертвым объемом (48 сек). Метилртуть и ее соединения (MeHgCys , MeHgGS) также не делятся в данных условиях и выходят одним пиком (75 сек). При этом метилртуть при взаимодействии с цистеином образует комплекс состава MeHgCys (рис. 35а).

При хроматографировании экстракта корня растения в аналогичных условиях было зарегистрировано два пика, содержащих ртуть, один из которых выходил с мертвым объемом, тем самым подтверждая ранее полученные данные о том, что в водной фракции этот элемент присутствует преимущественно в форме Hg^{2+} . Время выхода второго пика составляет 207 сек и не совпадает с временем выхода метилртути и ее соединений (75 сек), таким образом опровергая предположение о наличии в экстракте метилртути (рис. 35б). Полученная информация была использована для последующего сбора фракций, содержащих ртуть, определения содержания цистеина в них.

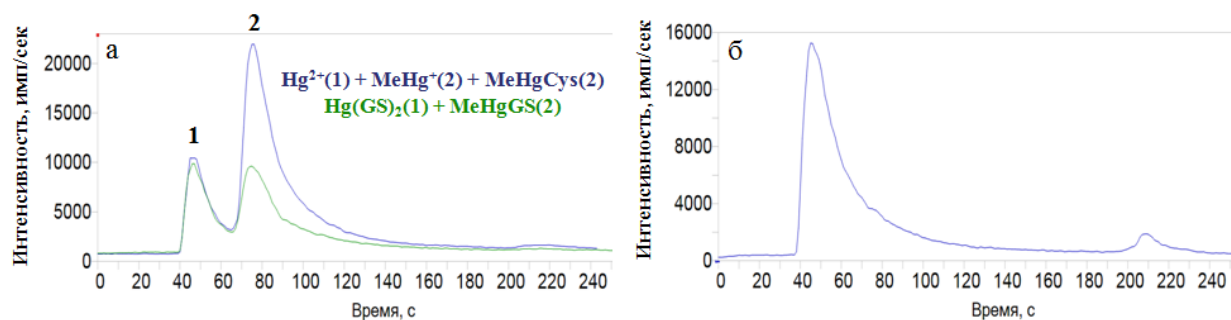


Рис. 35. Элюирование модельных растворов (а) и экстракта корня растения 0,5% раствором цистеина в 60 мМ ацетате аммония (рН 5) (б)

Последовательное выделение фракций, содержащих ртуть, с последующим выявлением и количественным определением содержащихся в них компонентов проводили в режиме *offline* с целью идентификации присутствующих в образце соединений ртути. Зная концентрацию элемента в экстракте и каждой из фракций, можно рассчитать долю ртути, относящуюся к определенному пику хроматограммы от общего количества, введенного в колонку. Для экстрактов корня растения баланс по ртути в пределах доверительного интервала можно считать удовлетворительным (табл. 23).

Баланс по ртути, введенной в колонку, и суммарному содержанию во фракциях, выделенных в ходе хроматографирования экстракта (n=3)

Проба	Количество ртути, введенное в колонку, нг	Суммарное содержание ртути во фракциях, нг
корни (3ч)	35±4	40±6
корни (6ч)	44±5	49±8
корни (9ч)	40±4	47±5
корни (72ч)	56±5	53±7
корни (7д)	61±7	69±6

4.6 Определение содержания цистеина в выделенных фракциях, содержащих ртуть

Для определения содержания цистеина в отобранных фракциях, проводили кислотный гидролиз с последующей предколоночной дериватизацией фенилизотиоцианатом. Также отбирали фракции с участка хроматограммы, не содержащего ртуть для подтверждения отсутствия в них пептидных соединений (рис. 36). Стоит отметить, пик, соответствующий Hg^{2+} , не содержит цистеина и других аминокислот.

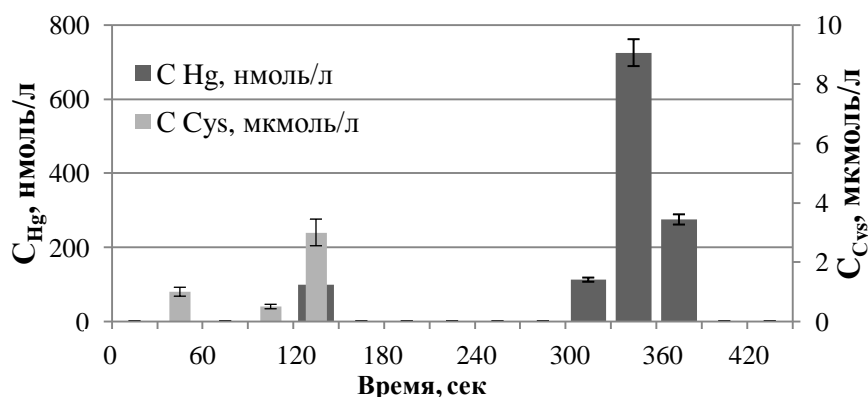


Рис. 36. Содержание ртути и цистеина во фракциях, выделенных из экстракта из корня

Для пика, время выхода которого составляет 125 сек, было установлено соотношение $\text{Cys} / \text{Hg} = 30$, что является аргументом в пользу пептидного соединения ртути. Среди пептидных соединений, которые могут связывать ионы металлов в растениях, выделяют фитохелатины и металлотионенины. Фитохелатины являются производными глутатиона и имеют в своей структуре фрагмент ($\gamma\text{-Glu-Cys}$), который повторяется от 2 до 11 раз. Таким образом, при связывании ртути фитохелатинами соотношение $\text{Cys} / \text{Hg} = 30$ не может быть достигнуто, так как одна молекула фитохелатина содержит не более 11 остатков цистенина. Помимо фитохелатинов, в растениях существу-

ют белки – металлотионеины, которые являются продуктами классического рибосомального биосинтеза белка и могут содержать в своем составе 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 [221]. Таким образом, можно предположить, что выделенные соединения относятся к металлотионеинам.

4.7 Идентификация форм связывания ртути в растениях зоны рассеяния Урского месторождения

С целью апробации разработанного подхода к реальным объектам проводилась идентификация форм связывания ртути в растениях водяного гиацинта, подвергавшихся воздействию дренажных вод отходов Урского месторождения (п. Урск, Кемеровская область) в естественных условиях. Данные отходы представляю собой продукты цианидирования первичных полиметаллических руд и руд зоны окисления. Отходы на 80% сложены пиритом (FeS_2) и баритом (BaSO_4). Основным источником ртути является киноварь (HgS). Переработанные первичные руды и руды зоны окисления сложены в кучи высотой 10-12 м. В результате окисления пирита под воздействием кислорода воздуха происходит образование серной кислоты, что также приводит к процессам вторичного минералообразования. Естественный ручей, протекающий по территории хвостохранилища, взаимодействуя с материалом отходов, закисляется до $\text{pH} = 2$. Таким образом, растительность на территории, прилегающей к хвостохранилищу отходов, выжжена кислыми растворами. Материал отходов не закреплен и с течением времени размывается дождевыми и паводковыми водами, что приводит к распространению и миграции элементов, содержащихся в материале отходов [222].

4.7.1 Проведение натурного эксперимента

Исследование проводилось на территории Урского хвостохранилища в июле 2014 г. По территории хвостохранилища протекает ручей, воды которого, взаимодействуя с материалом отходов становятся кислыми ($\text{pH} = 2$), что приводит к подавлению жизнедеятельности растений. В этой связи эксперимент проводили в месте впадения дренажного ручья в реку Ур (рис. 37), где происходит нейтрализация кислого раствора, что создает благоприятные условия для произрастания плавающих растений. В

качестве фоновой точки использовали пруд, расположенный в двух километрах выше по течению реки Ур.

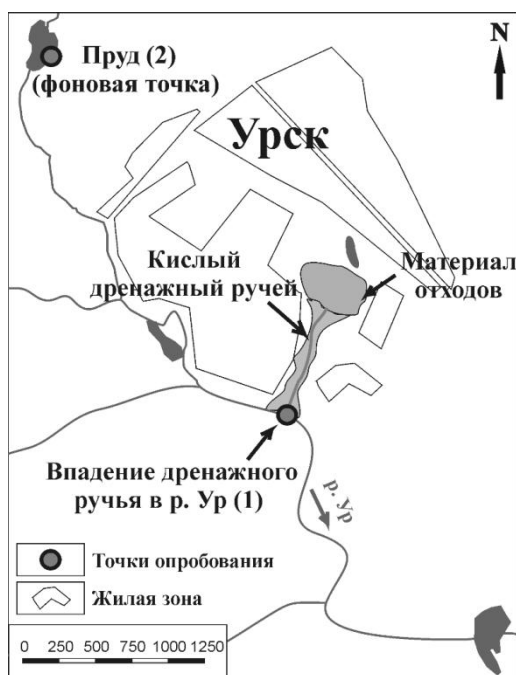


Рис. 37. Схема Урского хвостохранилища (54°27'11.03" N, 85°24'09.76" E).
Точки опробования: впадение дренажного ручья в реку Ур (1); фоновая точка (пруд) (2)

Т а б л и ц а 24

**Температура, рН, Eh, концентрация ртути (мкг/л) в воде
в точке впадения дренажного ручья в реку Ур (1) и в фоновой точке (2)**

Точка	Hg	T, °C	pH	Eh, мВ
1	0,05±0,01	22	7,45	+ 325
2	< 0,01	23	7,60	+ 291

Величина рН, окислительно-восстановительный потенциал, температура и концентрации элементов в воде представлены в табл. 24. Растения водяного гиацинта выращивали в Институте цитологии и генетики СО РАН и помещали на несколько дней в фоновую точку (пруд) для адаптации к естественным условиям. В каждую из точек помещали по пять растений водяного гиацинта. Ранее в натурном эксперименте было показано, что процесс аккумуляции кадмия и меди происходит наиболее интенсивно в первые сутки [223]. Эксперимент проводили в течение двух суток. Значимых различий в изменении биомассы растений в точке впадения дренажного ручья в р. Ур и фоновой точке не наблюдалось.

4.7.2 Фракционирование ртути в растениях

Концентрация ртути в зоне впадения дренажного ручья в реку Ур составляет $0,05 \pm 0,01$ мкг/л, что значительно ниже, чем в лабораторном эксперименте (1,0 мг/л). По завершении эксперимента перед проведением процедуры фракционирования была оценена способность водяного гиацинта к аккумуляции ртути и определена общая концентрация элемента в растении, которая составила 220 ± 30 мкг/кг сухой массы. При этом $BCF = 4030 \pm 450$, что говорит о высокой способности растения к аккумуляции ртути даже при очень низких концентрациях элемента в воде. $TF = 0,13 \pm 0,04$ демонстрирует, что при более низких концентрациях элемента в растениях доля ртути в стеблях и листьях растет.

Процедуру фракционирования ртути осуществляли по методике, описанной в разделе 4.2. Водная фракция и фракция, выделяемая $1,0 \cdot 10^{-3}$ М HCl, содержит 22-29 и 9-10% ртути, соответственно, что в процентном соотношении превышает величины, полученные в лабораторном эксперименте. Ртуть, прочно связанная с компонентами с клеточной стенки составляет 63-67%. Такой эффект можно объяснить более низкими абсолютными содержаниями ртути, что приводит к возможности связывания большей доли ртути растворенными в цитоплазме и межклеточном веществе лигандами [224].

4.7.3 Идентификация форм связывания ртути в водной фракции методом ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС

В случае проведения натурального эксперимента концентрация ртути в растениях оказалась в среднем на три порядка ниже по сравнению с лабораторным. К сожалению, при проведении анализа в режиме *online* зарегистрировать сигнал ртути не удалось ввиду низкой концентрации ртути в экстракте.

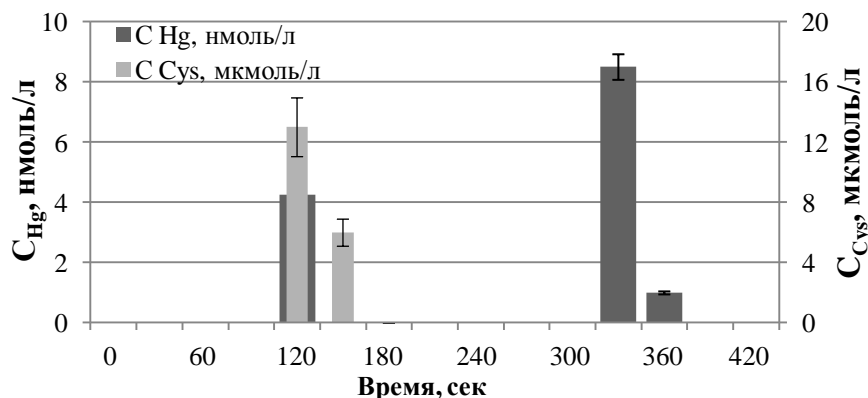


Рис. 38. Содержание ртути и цистеина во фракциях, выделенных из экстракта корня

Применение режима *offline* показало, что ртуть присутствует в виде двух форм, одна из которых соответствует иону ртути(II), а вторая пептидному соединению (рис. 38). Причем в данном случае на долю пептидного соединения приходится около 30% ртути, что превосходит значение, полученное в лабораторном эксперименте.

4.8 Заключение по главе 4

Предложен подход для изучения форм связывания ртути в растениях, применение которого позволило выявить зоны локализации ртути в тканях растений. Показано, что ртуть, как и кадмий, локализуется преимущественно в ризодерме и первичной коре корня.

Предложена процедура ступенчатой экстракции форм связывания ртути, применение которой позволяет установить долю элемента, связанную с компонентами клеточной стенки и выделить подвижные формы элемента в водную фракцию. Для корней водяного гиацинта, подвергавшихся воздействию 1,0 мг/л ртути, водный экстракт содержит 8,6-13,9% ртути от общего количества в корне растения. Кроме того, наблюдается уменьшение относительного содержания ртути в этой фракции при увеличении времени воздействия. На втором этапе при экстракции $1,0 \cdot 10^{-3}$ М соляной кислоты извлекается 2,2-10,4% от общего количества ртути. С увеличением времени воздействия также происходит уменьшение содержания ртути в данной фракции. Стоит отметить, что доля ртути, связанная с компонентами клеточной стенки достаточно высока, составляет 77-93% и увеличивается с возрастанием времени воздействия элемента. Такое распределение ртути по фракциям можно объяснить ограниченной емкостью растительной ткани по отношению к формам, экстрагируемым водой.

Применение гибридного метода, сочетающего хроматографическое разделение с фотометрическим и элемент-селективным детектированием с генерацией паров ртути позволило установить присутствие в водном экстракте содержащих ртуть соединений, дальнейшее выделение и изучение вещественного состава которых позволило установить природу компонентов экстракта. Оптимизированы условия разделения и детектирования соединений, содержащих ртуть, методами ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-ХП-ИСП-АЭС. Установлено, что в водном экстракте, содержащем подвижные формы элемента, ртуть присутствует как в ионной форме, так и в составе пептидных соединений, характеризующихся соотношением $Cys / Hg = 30$. Разработанный подход применен для идентификации форм связывания ртути в растениях, подвергавшихся воз-

действию элемента в естественных условиях в ореоле рассеяния отходов высоко-сульфидного месторождения. Показано, что водный экстракт, и извлекаемая $1,0 \cdot 10^{-3}$ М HCl фракция, содержит 22-29 и 9-10% ртути, соответственно, что в процентном соотношении превышает величины, полученные в лабораторном эксперименте. Доля ртути, прочно связанной с компонентами с клеточной стенки составляет 63-67%. Такой эффект можно объяснить более низкими абсолютными содержаниями ртути в растении, что приводит к возможности связывания большей доли ртути растворенными в цитоплазме и межклеточном веществе лигандами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящей работы предложен комплексный подход к идентификации форм связывания элементов на примере кадмия и ртути в растениях, в основе которого лежит применение ступенчатой экстракции для последовательного извлечения форм элементов в зависимости от характера связывания элементов с компонентами тканей растения и применение гибридного метода ВЭЖХ-ИСП-АЭС для выявления соединений элемента с последующим определением их вещественного состава.

Разработаны два типа интерфейса для реализации гибридного метода анализа, сочетающего хроматографическое разделение с элемент-селективным детектированием при условии обеспечения максимальной эффективности разделения, стабильной работы источника индуктивно связанной плазмы и минимизации внеколоночного размывания сигнала в координатах «время выхода – интенсивность ИСП-АЭС сигнала». Для идентификации форм связывания кадмия оптимизированы параметры работы гибридной системы с вводом элюата в спектрометр через пневматический распылитель, для идентификации форм связывания ртути – с восстановлением соединений ртути и вводом в индуктивно связанную плазму в газовой фазе с током аргона.

Предложенный подход позволяет идентифицировать водорастворимые формы связывания кадмия и ртути в экстрактах растений, выделить фракции, содержащие аналиты и, при необходимости, провести дополнительные исследования для установления предполагаемого состава форм связывания элементов в них. Показано, что в водном экстракте из корня водяного гиацинта кадмий связан с пептидами, характеризующимися высоким содержанием цистеина (до 30% мол.), в то время как основная доля ртути присутствует в виде иона Hg^{2+} , а также в виде пептидных соединений, характеризующихся соотношением $\text{Cys} / \text{Hg} = 30$.

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. По результатам гистохимического анализа установлено, что кадмий локализуется в ризодерме и первичной коре корня. 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 (до 30% мол.).

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 $Cys / Hg = 30$. 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. С применением разработанной схемы ступенчатой экстракции оценена доля элемента, связанного с компонентами клеточной стенки и доля водораствори-

мых форм элемента. 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 мг/л ртути, водная фракция содержит 8,6-13,9% ртути от общего содержания. Причем 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, причем на долю пептидного соединения приходится около 30% ртути от общего количества в водном экстракте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Underwood E. Trace elements in human and animal nutrition / E. Underwood. Academic Press: New York. – 1977. – 545 p.
2. Katz S.A. The biological and environmental chemistry of chromium / S.A. Katz, H. Salem. Wiley: New York. – 1994. – 214 p.
3. Kot A., Namiesneik J. The role of speciation in analytical chemistry // *Trend. Anal. Chem.* – 2000. – V. 19. – P. 69–79.
4. Templeton D.M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L.-G., Muntau H., van Leeuwen H.P., Lobinski R. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects and methodological approaches // *Pure Appl. Chem.* – 2000. – V. 72. – N. 8. – P. 1453–1470.
5. Белеванцев В.И. Исследование сложных равновесий в растворе / В.И. Белеванцев, Б.И. Пещевицкий. Наука: Новосибирск. – 1978. – 256 с.
6. Caroli S. Element speciation in bioinorganic chemistry / S. Caroli. Wiley: New York. – 1996. – 474 p.
7. Michalke B. Quality control and reference materials in speciation // *Fresen. J. Anal. Chem.* – 1999. – V. 363. – P. 439–445.
8. Ure A.M., Quevauviller P., Muntau H., Griepink B. Speciation of heavy metals in soils and sediments: an account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the commission of the European communities // *Int. J. Environ. Anal. Chem.* – 1993. – V. 51. – P. 135–151.
9. Batley G.E. Trace element speciation: analytical methods and problems / G.E. Batley. CRC Press: Boca Raton. – 1989. – 357 p.
10. Lustig S., Michalke B., Beck W., Schramel P. Platinum speciation with hyphenated techniques: application of RP–HPLC–ICP–MS and CE–ICP–MS to aqueous extracts from a platinum treated soil // *Fresen. J. Anal. Chem.* – 1998. – V. 360. – P. 18–25.
11. Mortvedt J.J. Plant and soil relationships of uranium and thorium decay series radionuclides - a review // *J. Environ. Qual.* – 1994. – V. 23. – P. 643–650.
12. Cumming J.R., Taylor G.J. Mechanisms of metal tolerance in plants: physiological adaptations for exclusion of metal ions from the cytoplasm. / R.G. Alscher, J.R. Cumming. Wiley-Liss Inc.: New York. - 1990. – 356 p.
13. Wang J., Evangelou V.P. Metal tolerance aspects of plant cell wall and vacuole. / M. Pessarakli. Marcel Dekker Inc.: New York. - 1995. – 717 p.

14. Crist D.R., Crist R.H., Martin J.R., Watson J.R. Ion exchange systems in proton-metal reactions with algal cell walls // *FEMS Microbiol. Rev.* – 1994. - V. 14. – P. 309–314.
15. Haynes R.J. Ion exchange properties of roots and ionic interactions within the root apoplasm: their role in ion accumulation by plants // *Bot. Rev.* – 1980. – V. 46. – P. 75–79.
16. Van Cutsem P., Gillet C. Activity coefficients and selectivity values of Cu^{++} , Zn^{++} and Ca^{++} ions adsorbed in the *Nitella flexilis* L. cell wall during triangular ion exchanges // *J. Exp. Bot.* – 1982. – V. 33. – P. 847–853.
17. Römheld V., Marschner H. Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses // *Plant. Physiol.* – 1986. – V. 80. – P. 175–180.
18. Weisskopf L., Tomasi N., Santelia D., Martinoia E., Langlade N.B., Tabacchi R., Abou-Mansour E. Isoflavonoid exudation from white lupin roots is influenced by phosphate supply, root type and cluster-root stage // *New. Phytol.* – 2006. – V. 171. – P. 657–668.
19. Cesco S., Neumann G., Tomasi N., Pinton R., Weisskopf L. Release of plantborne flavonoids into the rhizosphere and their role in plant nutrition // *Plant. Soil.* – 2010. – V. 329. – P. 1–25.
20. Keilig K., Ludwig-Müller J. Effect of flavonoids on heavy metal tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings // *Bot. Studies.* – 2009. – V. 50. – P. 311–318.
21. El Hajji H., Nkhili E., Tomao V., Dangles O. Interactions of quercetin with iron and copper ions: complexation and autoxidation // *Free Radic. Res.* – 2006. – V. 40. – P. 303–320.
22. Pekal A., Biesaga M., Pyrzynska K. Interaction of quercetin with copper ions: complexation, oxidation and reactivity towards radicals // *Biometals.* – 2011. – V. 24. – P. 41–49.
23. Viehweger K., Geipel G. Uranium accumulation and tolerance in *Arabidopsis halleri* under native versus hydroponic conditions // *Environ. Exp. Bot.* – 2010. – V. 69. – P. 39–46.
24. Haydon M.J., Cobbett C.S. Transporters of ligands for essential metal ions in plants // *New. Phytol.* – 2007. – V. 174. – P. 499–506.
25. Curie C., Cassin G., Couch D., Divol F., Higuchi K., Jean M., Misson J., Schikora A., Czernic P., Mari S. Metal movement within the plant: contribution of nicotianamine and yellow stripe 1-like transporters // *Ann. Bot.* – 2009. – V. 103. – P. 1–11.

26. 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.
27. Blindauer C.A., Schmid R. Cytosolic metal handling in plants: determinants for zinc specificity in metal transporters and metallothioneins // *Metallomics* - 2010. – V. 2. – P. 510–529.
28. Krämer U. Metal hyperaccumulation in plants // *Ann. Rev. Plant. Biol.* – 2010. – V. 61. – P. 517-534.
29. Vacchina V., Mari S., Czernic P., Marques L., Pianelli K., Schaumlöffel D., Lebrun M., Lobinski R. Speciation of nickel in a hyperaccumulating plant by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray MS/MS assisted by cloning using yeast complementation // *Anal. Chem.* – 2003. – V. 75. – P. 2740–2745.
30. Salt D.E., Prince R.C., Baker A.J.M., Raskin I., Pickering I.J. Zinc ligands in the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as determined using X-ray absorption spectroscopy // *Environ. Sci. Technol.* – 1999. – V. 33. – P. 713–717.
31. Küpper H., Lombi E., Zhao F.J., McGrath S.P. Cellular compartmentation of cadmium and zinc in relation to other elements in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri* // *Planta* – 2010. – V. 212. – P. 75–84.
32. Mihalik J., Henner P., Frelon S., Camilleri V., Fevrier L. Citrate assisted phytoextraction of uranium by sunflowers: Study of fluxes in soils and plants and resulting intra-planta distribution of Fe and U // *Environ. Exp. Bot.* – 2012. – V. 77. – P. 249–258.
33. Krämer U., Pickering I.J., Prince R.C., Raskin I., Salt D.E. Subcellular localization and speciation of nickel in hyperaccumulator and non-accumulator *Thlaspi* species // *Plant Physiol.* – 2010. – V. 122. – P. 1343–1354.
34. Ma J.F., Ueno D., Zhao F.J., McGrath S.P. Subcellular localisation of Cd and Zn in the leaves of a Cd-hyperaccumulating ecotype of *Thlaspi caerulescens* // *Planta*. – 2005. – V. 220. – P. 731–736.
35. Sharma S.S., Dietz K.J. The significance of amino acids and amino acid derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress // *J. Exp. Bot.* – 2006. – V. 57. – P. 711–726.

36. Krämer U., Cotter-Howells J.D., Charnock J.M., Baker A.J.M., Smith J.A.C. Free histidine as a metal chelator in plants that accumulate nickel // *Nature*. – 1996. – V. 379. – P. 635–638.
37. Canovas D., Vooijs R., Schat H., de Lorenzo V. The role of thiol species in the hypertolerance of *Aspergillus* sp P37 to arsenic // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279 – P. 51234–51240.
38. Frost L., Geipel G., Viehweger K., Bernhard G. Interaction of uranium(VI) towards glutathione – an example to study different functional groups in one molecule // *Proc. Radiochim. Acta* – 2011. – V. 1. – P. 357–362.
39. Vatamaniuk O.K., Mari S., Lu Y.P., Rea P.A. Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase - Blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 31451–31459.
40. Mendoza- Cozatl D.G., Zhai Z., Jobe T.O., Akmakjian G.Z., Song W.Y., Limbo O., Russell M.R., Kozlovskyy V.I., Martinoia E., Vatamaniuk O.K., Russell P., Schroeder J.I. Tonoplast-localized Abc2 transporter mediates phytochelatin accumulation in vacuoles and confers cadmium tolerance // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – P. 40416–40426.
41. Song W.Y., Park J., Mendoza-Cozatl D.G., Suter-Grotemeyer M., Shim D., Hortensteiner S., Geisler M., Weder B., Rea P.A., Rentsch D., Schroeder J.I., Lee Y., Martinoia E. Arsenic tolerance in *Arabidopsis* is mediated by two ABC-type phytochelatin transporters // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 2010. – V. 107. – P. 21187–21192.
42. Freeman J.L., Salt D.E. The metal tolerance profile of *Thlaspi goesingense* is mimicked in *Arabidopsis thaliana* heterologously expressing serine acetyltransferase // *BMC Plant. Biol.* – 2007. – V. 7. – P. 63-73.
43. Freeman J.L., Persans M.W., Nieman K., Albrecht C., Peer W., Pickering I.J., Salt D.E. Increased glutathione biosynthesis plays a role in nickel tolerance in *Thlaspi* nickel hyperaccumulators // *Plant Cell* – 2004. – V. 16. – P. 2176–2191.
44. Leszczyszyn O.I., Schmid R., Blindauer C.A. Toward a property/function relationship for metallothioneins: Histidine coordination and unusual cluster composition in a zinc-metal lothionein from plants // *Prot.-Struct. Funct. Bioinform.* – 2007. – V. 68. – P. 922–935.

45. Benavides M.P., Gallego S.M., Tomaro M.L. Cadmium toxicity in plants // *Braz. J. Plant Physiol.* – 2005. – V. 17(1). – P. 131-136.
46. Clemens S., Palmgreen M.G., Kramer U. A long way ahead: understanding and engineering plant metal accumulation // *Trends Plant. Sci.* – 2002. – V. 7. – P. 309-315.
47. Nishizono H., Kubota K., Suzuki S., Ishii F. Accumulation of heavy metals in cell walls of *Polygonum cuspidatum* roots from metalliferous habitats // *Plant Cell Physiol.* – 1989. – V. 1030. – P. 595–598.
48. Wagner G.J. Accumulation of cadmium in crop plants and its consequences to human health // *Adv. Agron.* – 1993. – V. 51. – P. 173–212.
49. Leita L., De Nobili M., Cesco S., Mondini C. Analysis of intercellular cadmium forms in roots and leaves of bush bean // *J. Plant Nutr.* – 1996. – V. 19. – P. 527–533.
50. Sanitá di Toppi L., Gabbrielli R. Response to cadmium in higher plants // *Environ. Exp. Bot.* – 1999. – V. 41. – P. 105–130.
51. Verkleij J.A.C., Schat H. Mechanisms of metal tolerance in higher plants. / J. Shaw. CRC Press: Boca Raton. – 1990. – 357 p.
52. Ernst W.H.O., Verkleij J.A.C., Schat H. Metal tolerance in plants // *Acta Bot. Neerl.* – 1992. – V. 41. – P. 229-248.
53. Meharg A.A. The role of plasmalemma in metal tolerance in angiosperms // *Physiol. Plant.* – 1993. – V. 88. – P. 191-198.
54. Fodor A., Szabó-Nagy A., Erdei L. The effects of cadmium on the fluidity and H⁺-ATPase activity of plasma membrane from sunflower and wheat roots // *J. Plant Physiol.* – 1995. – V. 14. – P. 787–792.
55. Hernández L.E., Cooke D.T. Modification of the roots plasma membrane lipid composition of cadmium-treated *Pisum sativum* // *J. Exp. Bot.* – 1997. – V. 48. – P. 1375-1381.
56. Hall J.L. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance // *J. Exp. Bot.* – 2002. – V. 53. – P. 1-11.
57. Larsen P.B., Degenhardt J., Stenzler L.M., Howell S.H., Kochian L.V. Aluminum-resistant *Arabidopsis* mutant that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots // *Plant Physiol.* – 1998. – V. 117. – P. 9–18.
58. Cobbett C.S. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification // *Plant Physiol.* – 2000. – V. 123. – P. 825-832.

59. Cobbett C., Goldsbrough P. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis // *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* - 2002. – V. 53. – P. 159-82.
60. Grill E., Winnacker E.-L., Zenk M.H. Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants // *Science*. – 1985. – V. 230. – P. 674-676.
61. Klapheck S., Schlunz S., Bergmann L. Synthesis of phytochelatins and homophytochelatins in *Pisum sativum* L. // *Plant Physiol.* – 1995. – V. 107. – P. 515-521.
62. Cobbett C.S. Heavy Metal Detoxification in Plants: Phytochelatin. Biosynthesis and Function // *IUBMB Life*. – 2001. – V. 51. – P. 183-188.
63. Lin Q., Chen Y.X., Chen H.M., Zheng C.M. Study on chemical behavior of root exudates with heavy metals // *Plant Nutr. Fertil. Sci.* – 2003. – V. 9. – P. 425–431.
64. Hinsinger P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review // *Plant Soil*. – 2001. – V. 237. – P. 173–195.
65. Meach M., Martin E. Mobilization of cadmium and other metals from two soils by root exudates of *Zea may* L., *Nicotiana tabacum* L. and *Nicotiana rustica* L. // *Plant Soil*. – 1991. – V. 132 – P. 187–196.
66. Römheld V. The role of phytosiderophores in acquisition of iron and other micronutrients in graminaceous species: an ecological approach // *Plant Soil*. – 1991. – V. 130. – P. 127–134.
67. Fujita M. The presence of two Cd-binding components in the roots of water hyacinth cultivated in a Cd²⁺-containing medium // *Plant. Cell. Physiol.* - 1985. – V.26(2). – P. 295–300.
68. Wu J.S., Ho T.C., Chien H.C., Wu Y.J., Lin S.M., Juang R.H. Characterization of the high molecular weight Cd-binding complex in water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) when exposed to Cd // *J. Agric. Food. Chem.* – 2008. – V. 56(14). – P. 5806–5812.
69. Giri A.K., Patel R.K. Toxicity and bioaccumulation potential of Cr (VI) and Hg (II) on differential concentration by *Eichhornia crassipes* in hydroponic culture // *Water Sci. Technol.* – 2011. – V. 63. – P. 899-907.
70. Riddle S.G., Tran H.H., Dewitt J.G., Andrews J.C. Field, laboratory, and X-ray absorption spectroscopic studies of mercury accumulation by water hyacinths // *Environ. Sci. Technol.* – 2002. – V. 36. – P. 1965-1970.

71. Rajan M., Darrow J., Hua M., Barnett B., Mendoza M., Greenfield B.K., Andrews J.C. Hg L3 XANES study of mercury methylation in shredded *Eichhornia crassipes* // *Environ. Sci. Technol.* – 2008. – V. 42. – P. 5568–5573.
72. Pacheco P., Hanley T., Figueroa J.A. Identification of proteins involved in Hg-Se antagonism in water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) // *Metallomics.* – 2014. – V. 6. – P. 560-571.
73. Nygren O., Nilsson C.A. Determination of trimethyllead salts in blood using high-resolution gas chromatography-graphite furnace atomic absorption spectrometry // *J. Anal. Atom. Spectrom.* – 1987. – V. 2. – P. 805-808.
74. Lobinski R. Elemental speciation and coupled techniques // *Appl. Spectrosc.* – 1997. – V. 51. – P. 260-278.
75. Takatera K., Osaki N., Yamaguchi H., Watanabe T. HPLC/ICP mass spectrometric study of the selenium incorporation into cyanobacterial metallothionein induced under heavy-metal stress // *Anal. Sci.* – 1994. – V. 10. – P. 567-572.
76. Steinebach O.M., Wolterbeek H.T. Determination of zinc-65, copper-64 and sulphur-35 labelled rat hepatoma tissue culture metallothioneins by high-performance liquid chromatography with on-line radioactivity detection // *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* – 1993. – V. 619. – P. 199-214.
77. Suzuki K.T., Sato M. Preparation of biologic sample for quantification of metallothionein with care against oxidation // *Biomed. Res. Trace Elem.* – 1995. – V. 6. – P. 51-56.
78. High K.A., Methven B.A., McLaren J.W., Siu K.W.M., Wang J., Klaverkamp J.F., Blais J.S. Physico-chemical characterization of metal binding proteins using HPLC-ICP-MS, HPLC-MA-AAS and electrospray-MS // *Fresenius' J. Anal. Chem.* – 1995. – V. 351. – P. 393-402.
79. Van Beek H., Baars A.J. Isolation and quantitation of cadmium-, zinc- and copper-metallothioneins by high-performance liquid chromatography-atomic absorption spectrometry // *J. Chromatogr.* – 1988. – V. 442. – P. 345-352.
80. Crews H.M., Dean J.R., Ebdon L., Massey R.C. Application of high-performance liquid chromatography - Inductively coupled plasma mass spectrometry to the investigation of cadmium speciation in pig kidney following cooking and in vitro gastrointestinal digestion // *Analyst.* – 1989. – V. 114. – P. 895-899.

81. Reyes L.H., Rahman G.M.M., Fahrenholz T., Kingston H.M.S. Comparison of methods with respect to efficiencies, recoveries, and quantitation of mercury species interconversions in food demonstrated using tuna fish // *Anal. Bioanal. Chem.* - 2008. - V. 390. P. 2123–2132.
82. Amaral C.D.B., Nobrega J.A., Nogueira A.R.A. Investigation of arsenic species stability by HPLC-ICP-MS in plants stored under different conditions for 12 months // *Microchem. J.* – 2014. – V. 117. – P. 122–126.
83. Bouyssiere B., Szpunar J., Potin-Gautier M., Lobinski R. Sample preparation techniques for elemental speciation studies / R. Cornelis. Wiley: West Sussex. – 2003. – 670 p.
84. Hardy S., Jones P. Development of a capillary electrophoretic method for the separation and determination of trace inorganic and organomercury species utilizing the formation of highly absorbing water soluble dithizone sulphonate complexes // *J. Chromatogr. A.* – 1997. – V. 791. – P. 333–352.
85. Rapsomanikis S., Craig P.J. Speciation of mercury and methylmercury compounds in aqueous samples by chromatography-atomic absorption spectrometry after ethylation with sodium tetraethylborate // *Anal. Chim. Acta.* – 1991. – V. 248. – P. 563–567.
86. Potin-Gautier M., Gilon N., Astruc M., De Gregori I., Pinochet H. Comparison of selenium extraction procedures for its speciation in biological materials // *Int. J. Environ. Anal. Chem.* – 1997. – V. 67. – P. 15–25.
87. Gomez-Ariza J.L., Sanchez-Rodas D., Giraldez I., Morales E. Comparison of biota sample pretreatments for arsenic speciation with coupled HPLC-HG-ICP-MS // *Analyst.* – 2000. – V. 125. – P. 401–407.
88. Schmidt A.C., Reisser W., Mattusch J., Popp P., Wennrich R. Evaluation of extraction procedures for the ion chromatographic determination of arsenic species in plant materials // *J. Chromatogr. A.* – 2000. – V. 889. – P. 83–91.
89. Richter B.E., Jones B.A., Ezzell J.L., Porter N.L., Avdalovic N., Pohl C. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation // *Anal. Chem.* – 1996. – V. 68. – P. 1033–1039.
90. Ceulemans M., Witte C., Lobinski R., Adams F.C. Simplified sample preparation for GC speciation analysis of organotin in marine biomaterials // *Appl. Organomet. Chem.* – 1995. – V. 8. – P. 451–461.

91. Pannier F., Astruc A., Astruc M. Determination of butyltin compounds in marine biological samples by enzymatic hydrolysis and HG-GC-QFAAS detection // *Anal. Chim. Acta.* – 1996. – V. 327. – P. 287–293.
92. Guzmán Mar J.L., Hinojosa Reyes L., Mizanur Rahman G.M., Skip Kingston H.M. Simultaneous extraction of arsenic and selenium species from rice products by microwave assisted enzymatic extraction and analysis by ion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry // *J. Agric. Food Chem.* – 2009. – V. 57. – P. 3005–3013.
93. Gopalakrishnan N., Narayanan C.S. Carbon dioxide extraction of Indian jasmine concrete // *Flav. Fragrance J.* – 2006. – V. 6. – P. 135-138.
94. Tessier A., Campbell P.G.C., Bisson N. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals // *Anal. Chem.* – 1979. – V. 51. – P. 844-851.
95. Quevauviller P., Ure A., Muntan H., Griepink B. Improvement of analytical measurements within the BCR-programme: single and sequential extraction procedures applied to soil and sediment analysis // *Int. J. Environ. Anal. Chem.* – 1993. – V. 51. – P. 129-134.
96. Forstner U. Metal speciation - general concepts and applications // *Int. J. Environ. Anal. Chem.* – 1993. – V. 51. – P. 5-23.
97. Quevauviller P. Operationally defined extraction procedures for soil and sediment analysis I. Standardization // *Trends Anal. Chem.* – 1998. – V. 17. – P. 289-298.
98. Vidal M., Rauret G. Two approaches for sequential extraction of radionuclides in soils: Batch and column methods // *Int. J. Environ. Anal. Chem.* – 1993. – V. 51. – P. 85-95.
99. Davidson C.M., Duncan A.L., Littlejohn D., Ure A.M., Garden L.M. A critical evaluation of the three-stage BCR sequential extraction procedure to assess the potential mobility and toxicity of heavy metals in industrially-contaminated land // *Anal. Chim. Acta.* – 1998. – V. 363. - P. 45-55.
100. Quevauviller P., Rauret G., Lopez-Sanchez J.F., Rubio R., Ure A., Muntan H. Certification of trace metal extractable contents in a sediment reference material (CRM 601) following a three-step sequential extraction procedure // *Sci. Total Environ.* – 1997. – V. 205. – P. 223-234.

101. Quevauviller P. Requirements for production and use of certified reference materials for speciation analysis: a European Commission perspective // *Spectrochim. Acta Part B.* – 1998. – V. 53. – P. 1261-1279.
102. Ruzik L., Pawlak K., Jarosz M. Inorganic and bioinorganic speciation analysis: problems and prospects / I. Baranovska. Springer: New York. – 2015. – 453 p.
103. Gleyzes C., Tellier S., Astruc M. Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments: a review of sequential extraction procedures // *Trends Anal. Chem.* – 2002. – V. 21. – P. 1–17.
104. Harrington C.F., Clough R., Drennan-Harris L.R., Hilld S.J., Tyson J.F. Atomic spectrometry update. Elemental speciation // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2011. – V. 26. – P. 1561-1595.
105. Miyamoto K., Kuwana T., Ando T., Yamamoto M., Nakano A. Methylmercury analyses in biological materials by heating vaporization atomic absorption spectrometry // *J. Toxicol. Sci.* – 2010. – V. 35. – P. 217–224.
106. Lopez I., Cuello S., Camara C., Madrid Y. Approach for rapid extraction and speciation of mercury using a microtip ultrasonic probe followed by LC-ICP-MS // *Talanta.* – 2010. – V. 82. – P. 594–599.
107. Dorea J.G., Wimer W., Marques R.C., Shade C. Automated speciation of mercury in the hair of breastfed infants exposed to ethylmercury from thimerosal-containing vaccines Automated speciation of mercury in the hair of breastfed infants exposed to ethylmercury from thimerosal-containing vaccines // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2011. – V. 140. – P. 262–271.
108. Gao E., Liu J.S. Rapid determination of mercury species in sewage sludge by high-performance liquid chromatography on-line coupled with cold-vapor atomic-fluorescence spectrometry after ultrasound-assisted extraction // *Anal. Sci.* – 2011. – V. 27. – P. 637–641.
109. Zhang W.B., Xue J.J., Yang X.A., Wang S.B. Determination of inorganic and total mercury in seafood samples by a new ultrasound-assisted extraction system and cold vapor atomic fluorescence spectrometry // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2011. – V. 26. – P. 2023–2029.
110. Clough R., Drennan-Harris L.R., Harrington C.F., Hilld S.J., Tyson J.F. Atomic spectrometry update. Elemental speciation // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2012. – V. 27. – P. 1185-1224.

111. Mar J.L.G., Reyes L.H., Rahman G.A.M., Kingston H.M.S. Simultaneous extraction of arsenic and selenium species from rice products by microwave-assisted enzymatic extraction and analysis by ion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry // *J. Agric. Food Chem.* – 2009. – V. 57. – P. 3005–3013.
112. Reyes L.H., Mar J.L.G., Rahman G.M.M., Seybert B., Fahrenholz T., Kingston H.M.S. Simultaneous determination of arsenic and selenium species in fish tissues using microwave-assisted enzymatic extraction and ion chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry // *Talanta.* – 2009. – V. 78. – P. 983–990.
113. Reyes L.H., Rahman G.M.M., Kingston H.M.S. Robust microwave-assisted extraction protocol for determination of total mercury and methylmercury in fish tissues // *Anal. Chim. Acta.* – 2009. V. 631. – P. 121–128.
114. Dakova I., Yordanova T., Karadjova I. Non-chromatographic mercury speciation and determination in wine by new core-shell ion-imprinted sorbents // *J. Hazard. Mater.* – 2012. – V. 231. – P. 49–56.
115. Yayayuruk O., Henden E., Bicak N. Determination of mercury(II) in the presence of methylmercury after preconcentration using poly(acrylamide) grafted onto cross-linked poly(4-vinyl pyridine): Application to mercury speciation // *Anal. Sci.* – 2011. – V. 27. – P. 833–838.
116. Chen M.L., Ma H.J., Zhang S.Q., Wang J.H. Mercury speciation with L-cysteine functionalized cellulose fibre as adsorbent by atomic fluorescence spectrometry // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2011. – V. 26. – P. 613–617.
117. Krishna M.V.B., Chandrasekaran K., Karunasagar D. On-line speciation of inorganic and methyl mercury in waters and fish tissues using polyaniline micro-column and flow injection-chemical vapour generation-inductively coupled plasma mass spectrometry (FI-CVG-ICPMS) // *Talanta.* – 2010. – V. 81. – P. 462–472.
118. Tsoi Y.K., Tam S., Leung K.S.Y. Rapid speciation of methylated and ethylated mercury in urine using headspace solid phase microextraction coupled to LC-ICP-MS // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2010. – V. 25. – P. 1758–1762.
119. dos Santos J.S., de la Guardia M., Pastor A., dos Santos M.L.P. Determination of organic and inorganic mercury species in water and sediment samples by HPLC on-line coupled with ICP-MS // *Talanta.* – 2009. – V. 80. – P. 207–211.

120. Stepankova Z., Komarek J., Pelcova P., Kuban V. Microcolumn preconcentration of mercury species from water samples prior to HPLC/CV-AFS speciation // *Chem. Anal.* – 2009. – V. 54. – P. 269–279.
121. Tuzen M., Karaman I., Citak D., Soylak M. Mercury(II) and methyl mercury determinations in water and fish samples by using solid phase extraction and cold vapour atomic absorption spectrometry combination // *Food Chem. Toxicol.* – 2009. – V. 47. – P. 1648–1652.
122. Tuzen M., Uluozlu O.D., Karaman I., Soylak M. Mercury (II) and methyl mercury speciation on *Streptococcus pyogenes* loaded Dowex Optipore SD-2 // *J. Hazard. Mater.* – 2009. – V. 169. – P. 345–350.
123. Li L., Wang F.Y., Meng B., Lemes M., Feng X.B., Jiang G.B. Speciation of methylmercury in rice grown from a mercury mining area // *Environ. Pollut.* – 2010. – V. 158. – P. 3103–3107.
124. Lemes M., Wang F.Y. Methylmercury speciation in fish muscle by HPLC-ICP-MS following enzymatic hydrolysis // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2009. – V. 24. – P. 663–668.
125. Martinis E.M., Escudero L.B., Berton P., Monasterio R.P., Filippini M.F., Wuilloud R.G. Determination of inorganic selenium species in water and garlic samples with on-line ionic liquid dispersive microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry // *Talanta.* – 2011. – V. 85. – P. 2182–2188.
126. Jia X.Y., Han Y., Wei C., Duan T.C., Chen H.T. Speciation of mercury in liquid cosmetic samples by ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2011. – V. 26. – P. 1380–1386.
127. Martinis E.M., Wuilloud R.G. Cold vapor ionic liquid-assisted headspace single-drop microextraction: A novel preconcentration technique for mercury species determination in complex matrix samples // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2010. – V. 25. – P. 1432–1439.
128. Harrington C.F., Clough R., Hansen H.R., Steve J.H., Tyson J.F. Atomic spectrometry update. Elemental speciation // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2010. – V. 25. – P. 1185–1216.
129. Kot A., Namiesnik J. The role of speciation in analytical chemistry // *Trends Anal. Chem.* – 2000. – V. 19. – P. 69–79.

130. Batley G.E., Florence T.M. A novel scheme for the classification of heavy metal species in natural waters // *Anal. Lett.* – 1976. – V. 9. – P. 379-388.
131. Michalke B., Caroli S. Speciation of trace elements / O. Selinus. NY: Springer. – 2013. – P. 611-632.
132. Van Loon J.C. Metal speciation by chromatography / atomic spectrometry // *Anal. Chem.* – 1979. – V. 51. – P. 1139–1150.
133. Suzuki K.T. Direct connection of high-speed liquid chromatograph (equipped with gel permeation column) to atomic absorption spectrophotometer for metalloprotein analysis: metallothionein // *Anal. Biochem.* – 1980. – V. 102. – P. 31–34.
134. Rosen A.L., Hieftje G.M. Inductively coupled plasma mass spectrometry and electrospray mass spectrometry for speciation analysis: applications and instrumentation // *Spectrochim Acta Part B* – 2004. – V. 59. – P. 135–146.
135. Krupp E., Seby F., Martin-Doimeadios R.R., Holiday A., Moldovan M., Kollensperger G., Hann S., Donard O.F.X. Trace metal speciation with ICP-MS detection / S.M. Nelms. Hoboken: Blackwell Publishing Ltd. – 2005. – P. 259-335.
136. Иваненко Н.Б., Соловьев Н.Д., Иваненко А.А., Москвин Л.Н. Определение химических форм микроэлементов в биологических объектах // *Аналитика и контроль.* – 2012. – Т. 16, № 2. – С. 108-133.
137. Szpunar J. Trace element speciation analysis of biomaterials by high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection // *Trends Anal. Chem.* – 2000. – V. 19. – P. 127–137.
138. Caruso J.A., Montes-Bayon M. Elemental speciation studies – new directions for trace metal analysis // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* – 2003. – V. 56. – P. 148–163.
139. Sutton K.L., Sutton R.M.C., Caruso J.A. Inductively coupled plasma mass spectrometric detection for chromatography and capillary electrophoresis // *J. Chromatogr. A.* – 1997. – V. 789. – P. 85–126.
140. Blanco Gonzalez E., Sanz-Medel A. Liquid chromatography techniques for trace element speciation analysis / J.A. Caruso, K.L. Sutton, K.L. Ackley. Amsterdam: Elsevier. – 2003. - P. 81–115.
141. Michalke B. The coupling of LC to ICP-MS in element speciation, I: General aspects. // *Trends Anal. Chem.* – 2002. – V. 21. – P. 142–153.

142. Larsen E.H. Method optimization and quality assurance in speciation analysis using high performance liquid chromatography with detection by inductively coupled plasma mass spectrometry // *Spectrochim. Acta B.* – 1998. – V. 53. – P. 253–265.
143. Guerin T., Astruc A., Astruc M. Speciation of arsenic and selenium compounds by HPLC hyphenated to specific detectors: a review of the main separation techniques // *Talanta.* – 1999. – V. 50. – P. 1–24.
144. Cairns W.R.L., Ebdon L., Hill S.J. A high performance liquid chromatography inductively coupled plasma-mass spectrometry interface employing desolvation for speciation studies of platinum in chemotherapy drugs // *Fresenius J. Anal. Chem.* – 1996. – V. 355. – P. 202–208.
145. Boorn A.W., Browner R.F. Effects of organic solvents in inductively coupled plasma atomic emission spectrometry // *Anal. Chem.* – 1982. – V. 54. – P. 1402–1410.
146. Sutton K.L., Caruso J.A. Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* – 1999. – V. 856. – P. 243–258.
147. Garraud H., Woller A., Fodor P., Donard O.F.X. Trace elemental speciation by HPLC using microbore columns hyphenated to atomic spectrometry: a review // *Analisis.* – 1997. – V. 25. – P. 25–31.
148. Lindsay S. High performance liquid chromatography. - Chichester: John Wiley & Sons, 1992. – 360 p.
149. Ishii D. Introduction to microscale high-performance liquid chromatography. - New York: VCH Publishers, 1998. – 191 p.
150. Marchante-Gayon J.M., Thomas C., Feldmann I., Jakubowski N. Comparison of different nebulizers and chromatographic techniques for the speciation of selenium in nutritional commercial supplements by hexapole collision and reaction cell // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2000. – V. 15. – P. 1093–1102.
151. Todoli J.L., Mermet J.-M. New torch design with an in-built chamber for liquid sample analysis by ICP-AES // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2002. – V. 17. – P. 345–351.
152. Chao W.-S., Jiang, S.-J. Determination of organotin compounds by liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry with a direct injection nebulizer // *J. Anal. At. Spectrom.* – 1998. – V. 13. – P. 1337–1341.
153. Acon B.W., McLean J.A., Montaser A. A direct injection high efficiency nebulizer interface for microbore high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry // *J. Anal. At. Spectrom.* – 2001. – V. 16. – P. 852–857.

154. Olesik J.W., Kinzer J.A., Olesik S.V. Capillary electrophoresis inductively coupled plasma spectrometry for rapid elemental speciation // *Anal. Chem.* – 1995. – V. 67. – P. 1–12.
155. Kannamkumarath S.S., Wrobel K., B'Hymer C., Caruso J.A. Capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: an attractive complementary technique for elemental speciation analysis // *J. Chromatogr. A.* – 2002. – V. 975. – P. 245–266.
156. Kirlew P.W., Castillano M.T.M., Caruso, J.A. Evaluation of ultrasonic nebulizers as interfaces for capillary electrophoresis of inorganic anions and cations with inductively coupled plasma mass spectrometric detection // *Spectrochim. Acta Part B.* – 1998. – V. 53. – P. 221–237.
157. Prange A., Schaumlöffel D. Determination of element species at trace levels using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma sector field mass spectrometry // *J. Anal. Atom. Spectrom.* – 1999. – V. 14. – P. 1329–1332.
158. Magnuson M.L., Creed J.T., Brockhoff C.A. Speciation of selenium and arsenic compounds by capillary electrophoresis with hydrodynamically modified electroosmotic flow and on-line reduction of selenium(VI) to selenium(IV) with hydride generation inductively coupled plasma mass spectrometric detection // *Analyst.* – 1997. – V. 122. – P. 1057–1062.
159. Hsieh M.-W., Liu C.-L., Chen J.-H., Jiang S.-J. Speciation analysis of arsenic and selenium compounds by CE-dynamic reaction cell-ICP-MS // *Electrophoresis.* – 2010. – V. 13. – P. 2272–2278.
160. Majidi V., Millerihli N.J. Two simple interface designs for capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry // *Analyst.* – 1998. – V. 123. – P. 803–808.
161. Van Holderbeke M., Zhao Y.N., Vanhaecke F., Moens L., Dams R., Sandra P. Speciation of six arsenic compounds using capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry // *J. Anal. At. Spectrom.* – 1999. – V. 14. – P. 229–234.
162. Kinzer J.A., Olesik J.W., Olesik S.V. Effect of laminar flow in capillary electrophoresis – model and experimental result on controlling analysis time and resolution with inductively coupled plasma mass spectrometry detection // *Anal. Chem.* – 1996. – V. 68. – P. 3250–3257.

163. Liu Y., Lopezavila V., Zhu J.J., Wiederin D.R., Beckert W.F. Capillary electrophoresis coupled on-line with inductively coupled plasma mass spectrometry for elemental speciation // *Anal. Chem.* – 1995. – V. 67. – P. 2020–2025.
164. Schaumlöffel D., Prange A. A new interface for combining capillary electrophoresis with inductively coupled plasma-mass spectrometry // *Fresenius' J. Anal. Chem.* – 1999. – V. 364. – P. 452–456.
165. Nurmi J., Köllensperger G., Stingeder G. Interfacing capillary electrophoresis to inductively coupled plasma mass spectrometry // *ICP Inf. Newsl.* – 2002. – V. 4. – P. 242–245.
166. Bermejo-Barrera P., Moreda-Pineiro J., Moreda-Pineiro A., Bermejo-Barrera A. Selective medium reactions for the arsenic(III), arsenic(V), dimethylarsonic acid and monomethylarsonic acid determination in waters by hydride generation online electrothermal atomic absorption spectrometry with in situ preconcentration on Zr-coated graphite tubes // *Anal. Chim. Acta.* – 1998. – V. 374. – P. 231–240.
167. Liu W.P., Lee K. Chemical modification of analytes in speciation analysis by capillary electrophoresis, liquid chromatography and gas chromatography // *J. Chromatog. A.* – 1999. – V. 834. – P. 45–63.
168. Leal-Granadillo I.A., Alonso J.I.G., Sanz-Medel A. Determination of the speciation of organolead compounds in airborne particulate matter by gas chromatography – inductively coupled plasma mass spectrometry // *Anal. Chim. Acta.* – 2000. – V. 423. – P. 21–29.
169. Fernandez R.G., Bayon M.M., Alonso J.I.G., Sanz-Medel A. Comparison of different derivatization approaches for mercury speciation in biological tissues by gas chromatography / inductively coupled plasma mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* – 2000. – V. 35. – P. 639–646.
170. Da Smaele T., Moens L., Dams R., Sandra P., Van ser Eycken J., Vandyck J. Sodium tetra(n-propyl)borate: a novel aqueous in situ derivatization reagent for the simultaneous determination of organomercury, -lead and -tin compounds with capillary gas chromatography – inductively coupled plasma mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* – 1998. – V. 793. – P. 99–106.
171. Palaez M.V., Bayon M.M., Alonso J.I.G., Sanz-Medel A. A comparison of different derivatisation approaches for the determination of selenomethionine by GC-ICP-MS // *J. Anal. Atomic Spectrom.* – 2000. – V. 15. – P. 1217–1222.

172. Bouyssiere B., Szpunar J., Lespes G., Lobinski R. Gas chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection in speciation analysis // *Spectrochim. Acta Part B.* – 2002. – V. 57, № 5. – P. 805–828.
173. Namiesnik J. Trends in environmental analytics and monitoring // *J. Crit. Rev. Anal. Chem.* – 2000. V. 30. – P. 221–269.
174. De Smaele T., Verrept P., Moens L., Dams R. A flexible interface for the coupling of capillary gas chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry // *Spectrochim. Acta Part B.* – 1995. – V. 50. – P. 1409–1416.
175. Rodriguez I., Mounicou S., Lobinski R., Sidelnikov V., Patrushev Y., Yamanaka M. Species selective analysis by microcolumn multicapillary gas chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric detection // *Anal. Chem.* – 1999. – V. 71. – P. 4534–4543.
176. Montes-Bayon M., Gutierrez Cambor M., Garcia Alonso J.I., Sanz-Medel A. An alternative GC-ICP-MS interface design for trace element speciation // *J. Anal. At. Spectrom.* – 1999. – V. 14. – P. 1317–1322.
177. Pecheyran C., Quetel C., Martin Lecuyer F.M., Donard, O.F.X. Simultaneous determination of volatile metal (Pb, Hg, Sn, In, Ga) and nonmetal species (Se, P, As) in different atmospheres by cryofocusing and detection by ICP-MS // *Anal. Chem.* – 1998. – V. 70. – P. 2639–2645.
178. Baralkiewicz D., Kózka M., Piechalak A., Tomaszewska B., Sobczak P. Determination of cadmium and lead species and phytochelatins in pea (*Pisum sativum*) by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-MSⁿ // *Talanta.* – 2009. – V. 79. – P. 493-498.
179. Yen T.-Y., Villa J.A., DeWitt J.G. Analysis of phytochelatin–cadmium complexes from plant tissue culture using nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry and capillary liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* – 1999. – V. 34. – P. 930–941.
180. 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.
181. Vacchina V., Chassaigne H., Oven M., Zenk M.H., Lobinski R. Characterization and determination of phytochelatins in plant extracts by electrospray tandem mass spectrometry // *Analyst.* – 1999. – V. 124. – P. 1425-1430.

182. Золотов Ю.А. Проточный анализ // Журнал аналит. химии. – 2000. – Т. 55. – С. 677.
183. Rodrigo M.A.M., Zitka O., Kominkova M., Adam V., Beklova M., Kizek R. Analysis of cadmium-phytochelatins 2 complexes using flow injection analysis coupled with electrochemical detection mass spectrometry // Int. J. Electrochem. Sci. – 2013. – V. 8. – P. 4409-4421.
184. Harrington C.F. The speciation of mercury and organomercury compounds by using high-performance liquid chromatography // Trends Analyt. Chem. – 2000. – V. 19. – P. 167-179.
185. Nevado J.J.B., Martin-Doimeadios R.C.R., Krupp E.M., Bernardo F.J., Farinas N.R., Moreno M.J., Wallace D., Ropero M.J. Comparison of gas chromatographic hyphenated techniques for mercury speciation analysis // J. Chromatogr. A. – 2011. – V. 1218. – P. 4545–4551.
186. Kuban P., Pelcova P., Margetinova J., Kuban V. Mercury speciation by CE: An update // Electrophoresis. – 2009. – V. 30. – P. 92-99.
187. Malisova K., Koplík R., Mestek O. Speciation of mercury in terrestrial plants using vapor generation and liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry // Anal. Lett. – 2015. – V. 48. – P. 2446–2462.
188. Montes-Bayon M., DeNicola K., Caruso J.A. Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry // J. Chromatogr. A. – 2003. – V. 1000. – P. 457-476.
189. da Silva D.G., Portugal L.A., Serra A.M., Ferreira S.L., Cerda V. Determination of mercury in rice by MSFIA and cold vapour atomic fluorescence spectrometry // Food Chem. – 2013. – V. 137. – P. 159–163.
190. D'Ulivo A., Dedina J., Mester Z., Sturgeon R.E., Wang Q., Welz B. Mechanisms of chemical generation of volatile hydrides for trace element determination (IUPAC technical report) // Pure Appl. Chem. – 2011. – V. 83. – P. 1283-1340.
191. Lin L.-Y., Chang L.-F., Jiang S.-J. Speciation analysis of mercury in cereals by liquid chromatography chemical vapor generation inductively coupled plasma-mass spectrometry // J. Agric. Food Chem. – 2008. – V. 56. – P. 6868–6872.
192. 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. 1753–1764.

193. Chen L., Yang L., Wang Q. In vivo phytochelatins and Hg–phytochelatin complexes in Hg-stressed *Brassica chinensis* L // Metallomics. – 2009. – V. 1. – P. 101–106.
194. Krupp E.M., Mestrot A., Wielgus J., Meharg A.A., Feldmann J. The molecular form of mercury in biota: identification of novel mercury peptide complexes in plants // Chem. Commun. – 2009. – V. 28. – P. 4257–4259.
195. Spisso A.A., Cerutti S., Silva F., Pacheco P.H., Martinez L.D. Characterization of Hg-phytochelatins complexes in vines (*Vitis vinifera* cv *Malbec*) as defense mechanism against metal stress // Biometals. – 2014. – V. 27. – P. 591–599.
196. 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.
197. Zakharchuk N.F., Borisova N.S., Gusel'nikova 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.
198. Romanova T.E., Shuvaeva O.V., Belchenko L.A. Phytoextraction of trace elements by water hyacinth in contaminated area of gold mine tailing // Int. J. Phytorem. – 2016. – V. 18. – P. 190-194.
199. Lu X., Kruatrachue M., Pokethitiyook P., Homyok K. Removal of cadmium and zinc by water hyacinth, *Eichhornia crassipes* // Science Asia. – 2004. – V. 30. – P. 93-103.
200. Liao S.-W., Chang W.-L. Heavy metal phytoremediation by water hyacinth at constructed wetlands in Taiwan // J. Aquat. Plant Manage. – 2004. – V. 42. P. 60-68.
201. Серегин И.В., Иванов В.Б. Гистохимические методы изучения распределения кадмия и свинца в растениях // Физиология растений. – 1997. – Т. 44. – С. 915-921.
202. Племенков В.В. Введение в химию природных соединений. – Казань: Казань. - 2001. – 376 с.
203. Shuvaeva O.V., Belchenko L.A., Romanova T.E. Studies on cadmium accumulation by some selected floating macrophytes // Int. J. Phytorem. – 2013. – V. 15. – P. 979-990.
204. Brett C.T., Waldron K.W. Physiology and biochemistry of plant cell walls / C.T. Brett. Springer: Netherlands. – 1996. – 256 p.

205. Romanova T.E., Shuvaeva O.V. Identification of the binding forms of cadmium during accumulation by water hyacinth // *Chem. Spec. Bioavailab.* – 2015. – V. 27. – P. 139–145.
206. Vestena S., Cambraia J., Oliva M.A., Oliveira J.A. Cadmium accumulation by water hyacinth and salvinia under different sulfur concentrations // *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* – 2007. – V. 2. – P. 269–274.
207. Lenka M., Panda K.K., Panda B.B. Studies on the ability of water hyacinth (*Eichhornia crassipes*) to bioconcentrate and biomonitor aquatic mercury // *Environ. Pollut.* – 1990. – V. 66. – P. 89–99.
208. Skinner K., Wright N., Porter-Goff E. Hg uptake and accumulation by four species of aquatic plants // *Environ. Pollut.* – 2007. – V. 145. – P. 234–237.
209. Deng H., Ye Z.H., Wong M.H. Accumulation of lead, copper and cadmium by 12 wet-land plant species thriving in metal contaminated sites in China // *Environ. Pollut.* – 2004. – V. 132. – P. 29–40.
210. Mishra V.K., Tripathi B.D., Upadhyay A.R., Pandey S.K. Concentrations of heavy metals and nutrients in water, sediments and aquatic macrophytes of GBP Sagar an anthropogenic lake affected by coal mining effluent // *Environ. Monit. Assess.* – 2008. – V. 141. – P. 49–58.
211. Swain G., Adhikari S., Mohanty P. Phytoremediation of copper and cadmium from water using water hyacinth, *Eichhornia Crassipes* // *Int. J. Agric. Sci. Tech.* – 2014. – V. 2. – P. 1–7.
212. 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. 1753–1764.
213. Caffall K.H., Mohnen D. The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides // *Carbohydr. Res.* – 2009. – V. 344. – P. 1879–1900.
214. Romanova T.E., Shuvaeva O.V. Fractionation of mercury in water hyacinth and pondweed from contaminated area of gold mine tailing // *Water. Air. Soil. Pollut.* – 2016. – V. 227. P. 171–180.
215. Stary J., Kratzer K. Radiometric determination of stability constants of mercury species complexes with L-cysteine // *J. Radioanal. Nucl. Chem.* – 1988. – V. 126. – P. 69–75.

216. Oram P.D., Fang X., Fernando Q. The formation constants of mercury(II)-glutathione complexes // *Chem. Res. Toxicol.* – 1996. – V. 9. – P. 709-712.
217. Arnold A.P., Canty A.J. Methylmercury(II) sulfhydryl interactions. Potentiometric determination of the formation constants for complexation of methylmercury(II) by sulfhydryl containing amino acids and related molecules, including glutathione // *Can. J. Chem.* – 1983. – V. 61. – P. 1428-1434.
218. Shindo H., Brown T.L. Infrared spectra of complexes of L-cysteine and related compounds with zinc(II), cadmium(II), mercury(II), and lead (II) // *J. Am. Chem. Soc.* – 1965. – V. 87. – P. 1904-1909.
219. Diwan H., Ahmad A., Iqbal M. Uptake related parameters as indices of phytoremediation potential // *Biologia.* – 2010. – V. 65. – P. 1004–1011.
220. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. – М.: Химия. – 1971. – 456 с.
221. Dallinger R., Berger B., Hunziker P., Kagi J.H. Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism // *Nature.* – 1997. – V. 388. – P. 237–238.
222. Myagkaya I.N., Lazareva E.V., Gustaytis M.A., Zhmodik S.M. Gold and silver in a system of sulfide tailings. Part 1: migration in water flow // *J. Geochem. Explor.* – 2016. – V. 160. – P. 16–30.
223. 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 // *Int. J. Environ. Anal. Chem.* – 2015. – V. 95. – P. 1186-1194.
224. 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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю д.х.н. Шубаевой 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.