

LC-ICP-MS w analizie specjacyjnej antymonu w próbkach pochodzenia biologicznego

Magdalena Jabłońska-Czapla*

Analityka specjacyjna jest jedną z najprężniej rozwijających się gałęzi chemii analitycznej. Powodem, dla którego jest ona tak ważna jest fakt, iż nie całkowita zawartość danego pierwiastka ma wpływ na organizmy żywe, lecz forma jonowa, w jakiej on występuje. Z tego też powodu konieczny jest rozwój technik analitycznych, w tym technik łączonych takich jak LC-ICP-MS czy HPLC-ICP-MS. Antymon to pierwiastek, którego wpływ na organizmy biotyczne nie jest w pełni poznany, stąd budzi duże zainteresowanie chemików, biologów i genotoksykologów. W pracy zawarto szereg interesujących informacji dotyczących antymonu, jego organicznych i nieorganicznych form specjacyjnych. Przedstawiono szereg aplikacji techniki łączonej HPLC-ICP-MS w analizie specjacyjnej antymonu w próbkach pochodzenia biologicznego.

Wstęp

Analytyka specjacyjna pomimo znacznych kosztów ma coraz większe znaczenie w rozwiązywaniu zagadnień wymagających nie tylko oznaczenia całkowitej zawartości pierwiastków, lecz również uwzględnienia roli poszczególnych form, w których one występują. Odgrywa ona ważną rolę między innymi w: badaniach cykliów biochemicznych wybranych związków chemicznych; oznaczaniu toksyczności i ekotoksyczności pierwiastków, kontroli jakości produktów żywnościowych oraz farmaceutyków, kontroli procesów technologicznych, ocenie ryzyka zdrowotnego oraz w analizie klinicznej [1]. Wyniki badań toksykologicznych świadczą o tym, że w wielu wypadkach nie całkowita zawartość danego pierwiastka, lecz udział jego

poszczególnych form ma decydujący wpływ na organizmy żywe. Dlatego ważniejsza niż informacja na temat całkowitej zawartości pierwiastka jest wiedza na temat występowania różnych jego form [2]. Początek XXI wieku to czas kolejnych wyzwań w chemii analitycznej, w tym w analizie środowiskowej. Obniżanie granic wykrywalności do ekstremalnie niskich poziomów spowodowało, że dotychczas stosowane metody analityczne nie zawsze pozwalały na oznaczanie śladowych zawartości analitów w badanych próbkach. W związku z tym obserwuje się tendencję do łączenia różnych technik i metod, co określane jest nazwą techniki łączone [3]. Jako metody separacyjne wykorzystuje się przede wszystkim metody chromatograficzne, a jako metody detekcji – metody

spektroskopowe. Najbardziej obiecującym rozwiązaniem jest technika łączona: wysokosprawna chromatografia cieczowa połączona z detektorem spektrometrii mas sprzężonym z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (HPLC-ICP-MS).

Opis

Antymon to pierwiastek wszechobecny w środowisku naturalnym i pochodzący z naturalnych procesów jak i z działalności człowieka. W zachowaniu geochemicznym antymon zbliżony jest do arsenu i bizmutu [4-7]. Biologiczna rola antymonu nie jest w pełni poznana, ale podobnie jak arsen jest on toksyczny już na niskim poziomie, antymon trójwartościowy ma około 10 krotnie silniejsze właściwości toksyczne jak pięciwartościowy, stąd duże zainteresowanie analizą

specjacyjną tego pierwiastka [7-10]. Antymon i jego sole działają toksycznie głównie na ośrodkowy układ nerwowy i krew. Powodują także zapalenie spojówek oraz skóry, uszkodzają mięsień sercowy i wątrobę. Związki antymonu wykazują działanie mutagenne i kancerogenne [4,10].

Największe antropogeniczne pochodzenie antymonu jest związane z przemysłem przeróbki rud miedzi oraz spalania węgla i odpadów komunalnych. Przemysł na terenie Górnośląskiego Okręgu Przemysłowego (GOP) oparty jest na hutnictwie i górnictwie węgla kamiennego, stąd duże zainteresowanie wzbudza poziom stężenia antymonu w wodach pitnych na terenie górnego Śląska. Antymon jest jednym z głównych pierwiastków, którego występowaniem zainteresowała się US EPA (Environ-



mental Protection Agency of the United States, 1979) i Unia Europejska (Council of the European Communities, 1976). Podane przez USEPA maksymalne dopuszczalne stężenie antymonu w wodzie pitnej – 6 $\mu\text{g/l}$ (US EPA, 1999) jest nieco wyższe od tego, na które zezwala Unia Europejska. Zgodnie z ustaleniami w Unii Europejskiej maksymalne dopuszczalne stężenie antymonu w wodzie do spożycia wynosi 5 $\mu\text{g/l}$. Antymon znalazł się na liście substancji szkodliwych po konwencji w Bazylei (United Nations Environmental Program, 1999) [11].

Antymon jest pierwiastkiem, który do wód gruntowych przechodzi w kompleksach z kwasami huminowymi. W środowisku wodnym antymon wykazuje duże podobieństwo do arsenu, zwłaszcza, jeśli chodzi o dystrybucję i specjację.

W wodach naturalnych wykrywane są nieorganiczne formy antymonianów(III) i antymonianów(V), oraz pochodnych metyloowych: kwas monometyloantymonowy (MMSbA) i kwas dimetyloantymonowy (DMSbA). Poza tym związki Sb(III) oraz Sb(V) ulegają hydrolizie odpowiednio jako $\text{Sb}(\text{OH})_3$ i $\text{Sb}(\text{OH})_6$. W Polsce zawartość antymonu w wodzie jest aktualnie normowana, i wynosi 5 $\mu\text{g/l}$ [12]. Związki antymonu są łatwo pobierane przez rośliny zwłaszcza, gdy występują w postaci rozpuszczonej. Stężenie antymonu w tkankach roślin waha się w granicach od 0,06 do 50 $\mu\text{g/g}$. Stężenie antymonu w częściach nadziemnych (0,01 ÷ 0,03 $\mu\text{g/g}$) jest średnio

10-krotnie niższe niż w korzeniach (0,1 ÷ 0,2 $\mu\text{g/g}$), gdzie jest zatrzymywany w związku z jego łatwą fitoprzyswajalnością [13]. TMSbCl_2 w roztworze wodnym występuje jako $[\text{TMSbOH}]^+$ [14].

Zawartość antymonu w tkankach zwierzęcych zawiera się od dziesiątych części do setek ng/g , największe ilości spotykane są w tkankach twardych ssaków lądowych i w organizmach morskich. Pobierany antymon kumuluje się głównie w nerkach, przy narażeniu na wysokie stężenia zawartość we włosach może stanowić wartość monitoringową osiągając przy ekspozycji na antymon 15 $\mu\text{g/g}$. Przemiany biochemiczne antymonu przypominają zachowanie się arsenu z tym, że związki antymonu cechuje mniejsza toksyczność. Związki antymonu wchłaniane są przez organizmy drogą pokarmową i oddechową. Występują w tkankach zwierzęcych w stężeniu od 0,000X do 0,X $\mu\text{g/g}$, przy czym największe ilości – w tkankach twardych ssaków lądowych oraz organizmów morskich. Zawartość antymonu w tkankach człowieka mieści się w granicach od 5 do 500 $\mu\text{g/kg}$, przy czym dzienna dawka w pożywieniu osoby dorosłej wynosi 30÷50 μg , a szkodliwa dawka to 100 mg/dzień . Antymon ulega kumulacji głównie w nerkach, włosach, wątrobie i tarczycy. Trójwartościowe związki antymonu kumulują się głównie w krwinkach czerwonych i wątrobie, natomiast pięciowartościowe w osoczu. Zróżnicowanie widoczne jest także w wydalaniu antymonu: trójwartościowe związki, gro-

madzące się w wątrobie, wydalane są z kałem, natomiast pięciowartościowe z moczem. Zawartość antymonu we włosach człowieka uzależnione jest od stopnia zanieczyszczenia powietrza, a w nerkach, od jakości i ilości pobieranego pokarmu. Oznaczanie form specjacyjnych antymonu ma fundamentalne znaczenie w badaniach środowiskowych i klinicznych ze względu na skutki dla zdrowia człowieka, toksyczność i zachowanie biologiczne antymonu w zależności od stopnia utlenienia. Choć dla roślin to pierwiastek o dużym znaczeniu, to dla zwierząt jego rola nie została w pełni określona, co gorsza antymon ma właściwości toksyczne. Mimo to nadal stosowana jest terapia wielu zmian chorobowych wywołanych przez Leiszmaniozę, na przykład u psów stosuje się antymonian megluminy [15].

Związki antymonu od dawna stosowane w leczeniu Leiszmaniozy takie jak: antymonian megluminy (Glucantime) w czasie produkcji leku oprócz Sb(V) mogą zawierać śladowe ilości Sb(III). Prowadzono badania tego leku mające na celu określenie zawartości form specjacyjnych antymonu w układzie HPLC-ICP-MS wykorzystując kolumnę Hamilton PRP X100 [16].

Trimetylostibina (Trimethylstibine Me_3Sb) wykazuje właściwości genotoksyczne. Metabolizm antymonu u ssaków i ludzi nie był jak do tej pory badany wystarczająco szczegółowo, ale ogólnie dobrze znana jest biometylacja antymonu zachodząca w mikroorganizmach. Prowadzono

badania nad metabolizmem dichlorokutrimetyloantymonu u ludzi narażonych na ekspozycję antymonem i wykryto w ich moczu śladowe ilości monometylkoantymonu, di oraz trimentyloantymonu. Tak, więc w organizmie ludzkim jednym z mechanizmów karcenogennych właściwości form specjacyjnych trimetyloantymonu(V) może być ich redukcja do trimetylostibiny (Me_3Sb), która powoduje mutację i uszkodzenia DNA [17]. W literaturze opisano wiele przykładów zastosowań metod łączonych w analizie specjacyjnej antymonu m. in. w próbkach: środowiskowych [18], w tym w glebach [19], roślinach [20], faunie i florze morskiej [21], a także w popiołach [22], pyłe zawieszonym [23], pyłe wulkanicznym [24] oraz w próbkach żywności [25] i materiałach referencyjnych w postaci osadów dennych [26] Antymon często jest oznaczany jednocześnie z innymi pierwiastkami, takimi jak arsen [27] oraz selen i tellur [28]. Wiele prac dotyczy analiz zawartości antymonu i jego związków w próbkach biomedycznych [29] jak również w wodach wodociągowych [30].

Mobilność, biodostępność i biologiczne efekty antymonu jak na przykład wychwyty antymonu przez faunę i florę zależy w dużej mierze od ich form chemicznych. W organizmach żywych występuje duże prawdopodobieństwo przekształcania organicznych form antymonu w nieorganiczne, dlatego ważne jest jednocześnie oznaczanie organicznych i nieorganicznych

form antymonu. Jedną z technik, która pozwala na tego typu oznaczenia jest wykorzystanie układu technik łączonych. W analityce specjacyjnej dominują metody chromatograficzne, aczkolwiek zastosowania innych metod jest również praktykowane. Połączenie chromatografu z detektorem ICP-MS realizowane jest bezpośrednio, poprzez rozpylacz (dla kolumnowych technik rozdzielania) lub poprzez ablację laserową (ang. Laser Ablation, LA) dla technik planarnych. Pomimo, że detektor ICP-MS nie daje informacji na temat chemicznych czy strukturalnych form analitów jest on znakomitym analizatorem elementarnym szczególnie w połączeniu z chromatografem gazowym lub ciekowym. Układ HPLC-ICP-MS pozwala na jednocześnie oznaczenia zarówno organicznych (TMSb(V)) jak i nieorganicznych (Sb(III), Sb(V)) form specjacyjnych. Muller i inni [31] prowadzili badania w układzie HPLC-ICP-MS wykorzystując do rozdzielania silnie anionowymienną kolumnę IonPac AS15/AG15 i elucję gradientową, następnie oznaczając izotop ^{121}Sb za pomocą spektrometru ICP-MS. Badania nad *Pteris vittata* wykazały, że rośliny hodowane na kompoście wzbogaconym dużymi ilościami antymonu, w liściach, a w największej ilości w korzeniach zawierały bardzo duże ilości antymonu. Sb(V) był główną formą specjacyjną, w jakiej występował antymon w badanych próbkach biologicznych, jednak znaleziono również Sb(III) i TMSb(V).

Ogólnie dobrze wiadomo, że Sb(III) jest bardziej toksyczny jak Sb(V). Badania Wu i innych [32] wykazały, że Sb(V) była dominującą formą specjacyjną w warzywach, wodzie zdanej do spożycia oraz włośach. Stężenie Sb(III) wynosiło odpowiednio <1%, 5,4% oraz 36% całkowitej zawartości antymonu w próbce. Chociaż stężenie Sb(III) w rybach było wysokie (92%) to ze względu na niski stopień konsumpcji wkład ryb w diecie w stosunku do całkowitej podaży wynosił 2,1%. W przeciwieństwie do wysokiej podaży warzyw i wody, ich wkład w diecie wynosił odpowiednio 86% i 12%. Badania wykazały znaczny wpływ diety na zawartość antymonu w organizmach badanych osób.

Podsumowanie

Jak podkreśla wielu autorów eksperymenty i rozważania nad wpływem różnych form specjacyjnych antymonu na żywe organizmy są jeszcze w fazie badań. Wykorzystanie wyrafinowanych technik analitycznych takich jak wysokosprawną chromatografię ciekową sprzężoną z spektrometrem ICP-MS pozwala na ilościowe i jakościowe oznaczanie zarówno organicznych jak i nieorganicznych form specjacyjnych antymonu, z coraz to niższymi granicami oznaczalności. Jest to istotne ze względu na wzrost stężenia antymonu w środowisku naturalnym, wynikającym z jego zanieczyszczenia, spowodowanego działalnością człowieka. A dokładne poznanie jego roli, wpływu i sposobu oddziaływania na rośliny i zwierzęta powinno leżeć w gestii wielu naukowców.

Spis literatury

- [1] Kot, A. Namiesnik, J. The role of speciation in analytical chemistry. Trends in Analytical Chemistry 2000, 19, 69-79.
- [2] Michalski R., Jabłońska M., Szopa S., (2013) Role and Importance of Hyphenated Techniques in Speciation Analysis [in] Speciation Studies in Soil, Sediment and Environmental Samples, Eds. Sezgin-Bakirdere, Science Publishers/CRC Press/Taylor&Francis Group, 14 August 2013.
- [3] Jabłońska M., Szopa S., Michalski R., Łyko A. Analiza nieorganicznych form specjacyjnych arsenu w wodach Zbiornika Goczałkowickiego z wykorzystaniem techniki łączonej HPLC-ICP-MS. [w] Chromatografia Jonowa 2012, 215-232.
- [4] Kabata-Pendias A., Pendias H., Biogeochemia pierwiastków śladowych, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 1999.
- [5] Niedzielski P., Siepak M., Siepak J., Występowanie i zawartości arsenu, antymonu i selenu w wodach i innych elementach środowiska, Rocznik Ochrony Środowiska, 2000, 1, 317-341.
- [6] Smiechowski P., Antimony in the environment as a global pollutant: A review on analytical methodologies for its determination in atmospheric, Talanta, 75 (2008) 2-14.
- [7] Marcellino S., Attar H., Lievreumont D., Lett M.C., Barbier F., Lagarde F., Heat-treated *Saccharomyces cerevisiae* for antimony speciation and antimony(III) preconcentration in water samples. Analytica Chimica Acta 2008, 629, 73-83.
- [8] Leonard A., Gerber G. B., Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of anti-

mony compounds., Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology. 1996, 366, 1-8.

[9] Garboś S., Bulska E., Hulanicki A., Fijalek Z., Sołtyk K., Determination of total antimony and antimony(V) by inductively coupled plasma mass spectrometry after selective separation of antimony(III) by solvent extraction with N-benzoyl-N-phenylhydroxylamine. Spectrochimica Acta B, 2000, 55, 795-802.

[10] W. Semczuk, Toksykologia, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 1990.

[11] Filella M., Belzile N., Chen Y. W., Antimony in the environment: a review focused on natural waters: I. Occurrence. Earth-Science Reviews. 2002, 57, 125-176.

[12] ROZPORZĄDZENIE MINISTRA ZDROWIA z dnia 20 kwietnia 2010 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi.

[13] Zheng J., Hintelmann H., Dimock B., Dzurko M. S. Speciation of arsenic in water, sediments, and plants of the Moira watershed, Canada, using HPLC coupled to high resolution ICP-MS. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2003, 377, 14-24.

[14] Lintschinger J. Schramel O. Kettrup A. The analysis of antimony species by using ESI-MS and HPLC-ICP-MS, Fresenius Journal of Analytical Chemistry 1998, 361, 96-102.

[15] Sapieryński R., Wojtczak M., Sapieryńska E., Leiszmanioza u psów, Życie Weterynaryjne 2008, 83(2), 113-117.

Dokończenie na str. 80.

konwersję do siarkowodor. Rys. 3. przedstawia test starzeniowy w okresie 18 miesięcy mieszanek o niskich stężeniach COS i H₂S. Jak widać mieszanek zachowały swoje właściwości w badanym okresie.

Podsumowanie

W artykule przedstawiono szereg czynników mających wpływ na zachowanie stabilności mieszanek o niskim stężeniu (<1ppm) siarczków. Przeprowadzone badania wykazały istotny wpływ za-

stosowanego materiału konstrukcyjnego butli i zaworu, ilości wilgoci oraz jakości i typu powłoki ochronnej na zachowanie stabilności mieszanek. Dowiedziano jednoznacznie, że poprzez zastosowanie odpowiedniej technologii pokrycia wewnętrznego butli można wydłużyć czas w jakim mieszanek zachowuje stabilność. Należy jednak pamiętać, iż nie ma jednego uniwersalnego sposobu przygotowania butli do użytku na potrzeby mieszanin o niskich stężeniach anali-

tów, a rodzaj powłoki ochronnej i sposób przygotowania mieszanek musi być dobierany indywidualnie do rodzaju i stężenia gazów wchodzących w skład mieszanek.

* *Luiza Kos, Lechosław Barchański, Joanna Śmiałek-Hill. Artykuł opracowany na podstawie materiałów firmy AirLiquide: „The Stability of 100ppb Hydrogen Sulfide Standard” by Robert Benesch, Malik Haouchine, and Tracey Jacksier; Air Liquide Group oraz literatury:*

1. *Borzio, R. Spec. Gas Rep. 1999, 2, 16.*

2. *Kramer, F. J.; Wechter, S. G. J. Chromatogr. Sci. 1980, 18, 674. Artykuł sponsorowany.*

Grupa AirLiquide Polska Sp. z o. o. jest do Państwa dyspozycji i służy fachową pomocą. W przypadku jakichkolwiek pytań prosimy o kontakt na adres gazspecjalne.pl@airliquide.com lub zapraszamy do odwiedzenia naszej strony internetowej: <http://www.pl.airliquide.com/pl/nasza-oferta/laboratoria-5.html>.

Dokończenie ze str. 32.

[16] Séby F., Gleyzes C., Grosso O., Plau B., Donard O. F. X., Speciation of antimony in injectable drugs used for leishmaniasis treatment (Glucantime®) by HPLC-ICP-MS and DPP. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 2012, 404, 2939-2948.

[17] Andrewes P., Kitchin K. T., Wallace K., Plasmid DNA damage caused by stibine and trimethylstibine *ecology and Applied Pharmacology*, 2004, 194, 41-48.

[18] Vinas P., Lopez-Garcial., Merino-Merono B., Hernandez-Cordoba M., Liquid chromatography-hydride generation-atomic fluorescence spectrometry hybridation for antimony speciation in environmental samples, *Talanta* 2006, 68, 1401-1405.

[19] Amereih S., Meisel T., Kahr E., Wegscheider W., Speciation analysis of inorganic antimony in soil using HPLC-ID-ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 383, 1052-1059.

[20] R. Miravet, E. Bonilla, J. F. Lopez-Sanchez, R. Rubio, Antimony speciation in terrestrial-

plants. *Comparative studies on extraction methods. Journal of Environmental Monitoring* 2005, 7, 1207-1213.

[21] De Gregori., Quiroz W., Pinochet H., Pannier F., Potin-Gautier M., Speciation analysis of antimony in marine biotabs by HPLC-(UV)-HG-AFS: Extraction procedures and stability of antimony species, *Talanta* 2007, 73, 458-465.

[22] Miravet R., Lopez-Sanchez J. F., Rubio R., Leachability and analytical speciation of antimony in coal fly ash, *Analytica Chimica Acta*, 2006, 576, 200-206.

[23] Iijima A., Sato K., Ikeda T., Sato H., Kozawa K., Furuta N., Concentration distributions of dissolved Sb(III) and Sb(V) species in size-classified inhalable airborne particulate matter. *Journal of Analytical Atomic Spectroscopy*, 2010, 25, 356-363.

[24] R. Miravet, J. F. López-Sánchez, R. Rubio, P. Smichowski, G. Polla, Speciation analysis of antimony in extracts of size-classified volcanic ash by HPLC-ICP-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007, 387, 1949-1954.

[25] H. R. Hansen, S. A. Pergantis, *Anal. Chem.*, Identification of Sb(V) complexes in biological and food matrixes and their stibine formation efficiency during hydride generation with ICPMS detection. 2007, 79, 5304-5311.

[26] M. Potin-Gautier, F. Pannier, W. Quiroz, H. Pinochet, I. de Gregori, Antimony speciation analysis in sediment reference materials using high-performance liquid chromatography coupled to hydride generation atomic fluorescence spectrometry *Analytica Chimica Acta* 2005, 553, 214-222.

[27] Y. Morita, T. Kobayashi, T. Kuroiwa, T. Narukawa, Study on simultaneous speciation of arsenic and antimony by HPLC-ICP-MS. *Talanta* 2007, 73, 81-86.

[28] T. Guerin, M. Astruc, A. Batel, M. Borsier, Multielement speciation of As, Se, Sb and Te by HPLC-ICP-MS. *Talanta*, 1997, 44, 2201-2208.

[29] Y. Petit de Pen, O. Vielma, J. L. Burguera, M. Burguera, C. Rondo, P. Carrero, On-line determination of antimony(III) and antimony(V) in liver tissue and whole blood by flow in-

jection – hydride generation – atomic absorption spectrometry. *Talanta* 2001, 55, 743-754.

[30] M. Jabłońska, S. Szopa, R. Skorek, Arsenic and antimony in municipal water of Upper Silesian Industrial Region [w] *Monography of the Committee of Environmental Engineering PAS, Lublin*, 2009, 97-105.

[31] Müllera K., Dausb B., Matuschka J., Stärka H. J., Wennrich R., Simultaneous determination of inorganic and organic antimony species by using anion exchange phases for HPLC-ICP-MS and their application to plant extracts of *Pteris vittata*. *Talanta* 2009, 78, 820-826.

[32] F. Wu, Z. Fu, B. Liu, C. Mo, B. Chen, W. Corns, H. Liao, Health risk associated with dietary co-exposure to high levels of antimony and arsenic in the world's largest antimony mine area, *Science of the Total Environment* 2011, 409, 3344-3351.

* *Dr Magdalena Jabłońska-Czapla, Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska PAN w Zabrzu; magdalena.jablonska-czapla@ipis.zabrze.pl*