

ZASTOSOWANIE SPEKTROMETRII ATOMOWEJ I SPEKTROMETRII MAS W BADANIU SPECJACJI CHEMICZNEJ

ON THE USE OF ATOMIC AND MASS SPECTROMETRY
FOR THE INVESTIGATION OF CHEMICAL
SPECIATION

Ewa Bulska*, Marcin Wojciechowski

*Wydział Chemii, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych, Uniwersytet Warszawski
ul. Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa
e-mail: ebulska@chem.uw.edu.pl

*Praca została opublikowana w specjalnym numerze
„Wiadomości Chemicznych”, poświęconym pamięci Profesora Stanisława Głaba,
w 70-tą rocznicę Jego urodzin*

Abstract

Wprowadzenie

1. Analiza specjacyjna: możliwości i ograniczenia
2. Badanie specjacji rtęci
3. Badanie specjacji selenu
4. Badanie specjacji antymonu
5. Badanie specjacji cynku
6. Badanie specjacji glinu

Podsumowanie

Podziękowania

Piśmiennictwo cytowane

Prof. dr hab. Ewa Bulska uzyskała stopień naukowy doktora (1986), doktora habilitowanego (1996) oraz tytuł naukowy profesora (2004) na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego (WCh UW). Kieruje Pracownią Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej WCh UW, a od 2013 roku pełni również funkcję dyrektora Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych Uniwersytetu Warszawskiego. Jest autorem lub współautorem ponad 160 publikacji oraz kilku monografii. W latach 1990–1992 pracowała w Instytucie Max-Planck (Niemcy). Jest członkiem Komitetu Chemii Analitycznej PAN. Wyróżniona, między innymi, nagrodą im. Bunsena-Kirchoffa (2004 r.) przyznaną przez Niemieckie Towarzystwo Chemiczne, Medalem Wiktora Kemuli (2012 r.) przyznanym przez Polskie Towarzystwo Chemiczne, oraz tytułem IUPAC'2015 Distinguished Women in Chemistry przyznanym przez Międzynarodową Unię Chemii Czystej i Stosowanej (IUPAC). Prowadzi badania w zakresie rozwoju i zastosowań technik spektrometrycznych w analizie śladowej i w badaniach specjacji.

dr Marcin Wojciechowski uzyskał stopień naukowy doktora nauk chemicznych (2003) na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Pracuje w grupie badawczej profesora Ewy Bulskiej, a jednocześnie współpracuje z grupą badawczą profesora Agaty Michalskiej-Maksymiuk. Prowadzone przez niego badania dotyczą analizy specjacyjnej pierwiastków istotnych dla organizmów żywych oraz zastosowania mikropróbkowania laserowego w badaniu ciał stałych. Współautor ponad 20 publikacji naukowych oraz 8 publikacji branżowych i popularno-naukowych.

ABSTRACT

Selected examples of studies conducted by the research group from Laboratory of the Basic Aspect of Analytical Chemistry (Faculty of Chemistry, University of Warsaw), related to the investigation of chemical speciation with the use of coupled techniques were discussed in this work. The pioneering investigation was focused on the study of the speciation of mercury in fish tissues and in clinical samples. Then, the intensive researches were conducted towards understanding of the speciation of antimony and selenium in water, plants and clinical objects. Interestingly, the evaluation of the speciation of aluminium become a challenge in respect of the establishing of the reliable analytical procedure, and the use of flow injection for sample operation were explored in this case. The last but not least, the non – routine analytical procedure was developed in the case of zinc speciation in plant exposed to the harmful environmental conditions.

Keywords: chemical speciation, atomic spectrometry, mass spectrometry, coupled techniques

Słowa kluczowe: specjacja chemiczna, spektrometria atomowa, spektrometria mas, techniki łączone

WPROWADZENIE

Zagadnienia związane z badaniem wpływu pierwiastków na organizmy żywe od wielu lat interesują badaczy z różnych dziedzin nauki. Szereg badań wskazywało na to, że znajomość jedynie składu pierwiastkowego nie jest wystarczająca, stąd powstało zainteresowanie, w jakich formach chemicznych występuje dany pierwiastek. Zagadnieniem tym zajmuje się analiza specjacyjna, która pozwala na określenie różnorodności form chemicznych występujących w badanym obiekcie.

Wyniki badań specjacyjnych mogą być istotne w wielu dziedzinach. W badaniach geologicznych istotna jest wiedza na temat przemian fizykochemicznych, ekolodzy z kolei szukają odpowiedzi na pytania, jakie substancje chemiczne wprowadzane do środowiska naturalnego wykazują działania toksyczne względem organizmów żywych, farmakolodzy interesują się aktywnością poszczególnych form chemicznych danej substancji, będącej kandydatem na lek, a specjaliści ds. żywienia i fizjologowie zainteresowani są poznaniem zarówno pozytywnego, jak i negatywnego wpływu różnych substancji na organizm ludzki.

Istotnym elementem w badaniach specjacji jest dobór odpowiedniej procedury pomiarowej, poprzedzonej właściwym przygotowaniem obiektów badań, tak aby uzyskana odpowiedź w sposób wiarygodny pozwalała na poznanie składu chemicznego w oryginalnym materiale.

Umieszczone w tytule określenie „specjacja chemiczna” zostało wprowadzone intencjonalnie. Wynika to przede wszystkim z tego, że pierwotne znaczenie terminu „specjacja” ma odniesienie do gatunkotwórczych procesów biologicznych. Termin „specjacja” w odniesieniu do obszaru chemicznego to występowanie danego pierwiastka w różnej postaci, czyli w formie różnorodnych indywiduów chemicznych. Badanie specjacji chemicznej jest ogromnym wyzwaniem dla analityka, przede wszystkim ze względu na konieczność dostosowywania procedury analitycznej do danego problemu. Wyzwaniem jest nie tylko oczekiwana specyficzność i czułość metody pomiarowej, ale zastosowanie takiego postępowania szczególnie na etapie przygotowania próbki, które nie narusza pierwotnych równowag chemicznych w badanym obiekcie.

W Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej (PTPChA) Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego tematyka związana z badaniem specjacji została podjęta z początkiem lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku, wtedy gdy badanie obecności rtęci i jej form chemicznych wzbudzało ogromne zainteresowanie nie tylko chemików, ale przede wszystkim lekarzy, fizjologów, toksykologów i oczywiście badaczy środowiska naturalnego. Badania specjacyjne wymagają jednak dostępu do odpowiedniego instrumentarium, a w szczególności do złożonych układów pomiarowych, w skład których początkowo wchodziły metody spektrometrii atomowej a w dalszych latach spektrometrii mas. Szczególne zainteresowanie zastosowaniem detektorów spektralnych wynikało oczywiście ze specyfiki zainteresowań grupy badawczej. Znaczące osiągnięcia w obszarze badań mechanizmów atomizacji i wzbudzania w technikach spektrometrii atomowej oraz spektrometrii

mas pozwoliły na ich zastosowanie w opracowywanych scenariuszach pomiarowych w badaniu specjacji.

1. ANALIZA SPECJACYJNA: MOŻLIWOŚCI I OGRANICZENIA

Trudno jest przecenić znaczenie analizy specjacyjnej we wszelkiego rodzaju badaniach związanych z poznawaniem procesów zachodzących w organizmach żywych, z ochroną i monitoringiem środowiska naturalnego, z określeniem jakości i bezpieczeństwa żywności czy z nadzorem nad procesami przemysłowymi. Prowadzone w laboratoriach analitycznych pomiary, często z wykorzystaniem najnowszych rozwiązań aparaturowych, umożliwiają poznanie składu materii, a tym samym zapewniają prowadzenie badań zarówno podstawowych, tych dotyczących struktury materii, jak również badań niezbędnych dla różnych obszarów aktywności człowieka w odniesieniu do zapewnieniu zarówno oczekiwanej jakości życia, jak i efektywnej działalności gospodarczej.

Szczególne zainteresowanie poznaniem form chemicznych, w jakich występuje dany pierwiastek zapoczątkowały dramatyczne przypadki skażenia środowiska naturalnego substancjami o niezwykle toksycznych właściwościach. Przełomowa była sytuacja w Japonii, gdzie zdiagnozowano występowanie „dziwnej choroby” u mieszkańców znad zatoki Minamata. Przypadek zatrucia metylowymi pochodnymi rtęci był opisywany w bardzo wielu pracach, można nawet powiedzieć, że przyczynił się do rozpoczęcia badań specjacyjnych, zwłaszcza w obszarze biologicznie aktywnych substancji chemicznych.

Zgodnie z definicjami podanymi przez IUPAC, specjacja (ang. *speciation*) to występowanie danego pierwiastka w różnych formach chemicznych. Natomiast analiza specjacyjna (ang. *speciation analysis*) to badania ukierunkowane na identyfikację poszczególnych indywiduów chemicznych (ang. *species*) oraz ich ilościowe oznaczenie w danym obiekcie. W zakresie takich badań wyróżnia się również frakcjonowanie (ang. *fractionation*), czyli działania pozwalające na identyfikację i ewentualne oznaczenie ilościowe grupy związków zawierających dany pierwiastek, grupy (frakcji) o określonych właściwościach i/lub działaniu [1].

W pierwszych latach rozwoju analizy specjacyjnej badacze zajmowali się przede wszystkim pierwiastkami, które zaliczane były do grupy toksycznych a prowadzone badania pozwoliły na określenie wpływu poszczególnych form chemicznych danego pierwiastka na organizmy żywe. Aktualnie analiza specjacyjna zajmuje się znacznie liczniejszą grupą pierwiastków i ich związków, w znaczącym stopniu w kontekście ich roli w organizmach żywych, obiegu w przyrodzie, jak również w kontekście identyfikacji substancji niezbędnych dla prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych.

Z punktu widzenia właściwości chemicznych, w badaniach specjacji można wyróżnić grupy związków charakteryzujących się zróżnicowaniem pod względem, na przykład stopnia utlenienia, występowaniem w postaci związków nieorganicz-

nych lub ich organicznych pochodnych, a w przypadku połączeń organicznych – związków mało i wysoko cząsteczkowych [2, 3].

Istotnym problemem związanym z badaniem specjacji jest łatwość zakłócenia równowag chemicznych indywidualów, w których występuje dany pierwiastek w badanym obiekcie. Z tego powodu bardzo wiele uwagi poświęca się konieczności stosowania właściwie dobranych procedur analitycznych, co obejmuje zarówno przygotowanie próbek, jak również pomiar zawartości danej substancji [4].

Dostępne są wprawdzie techniki pomiarowe, które zapewniają prowadzenie bezpośrednich badań specjacyjnych, bez konieczności przeprowadzenia poszukiwanych związków chemicznych do roztworu. Do najczęściej polecanych można zaliczyć spektroskopię rentgenowską w obszarze bliskim progu absorpcji (ang. *X-ray Absorption Near Edge Structure*, XANES) oraz spektroskopię Móssbauera. W obu przypadkach możliwe jest poznanie stopnia utlenienia danego pierwiastka wraz z jego otoczeniem chemicznym, bezpośrednio w próbce stałej. Techniki te wykorzystywaliśmy do badania specjacji selenu w roślinach [5] oraz żelaza w papierze [6, 7]. Biorąc pod uwagę, że techniki te wymagają bardzo specjalistycznej aparatury, niedostępnej w wielu laboratoriach analitycznych, większość badań specjacji jest prowadzona za pomocą procedur uwzględniających różnego rodzaju ekstrakcję analitów do roztworu, a następnie wykorzystywanie technik łączonych. Połączenie selektywnych technik rozdzielania indywidualów zawierających dany pierwiastek (najczęściej technik chromatograficznych) z czułymi i specyficznymi technikami detekcji (najczęściej stosowane są techniki spektrometrii atomowej i spektrometrii mas) pozwala na prowadzenie zaawansowanych badań specjacyjnych [8, 9].

2. BADANIE SPECJACJI RTĘCI

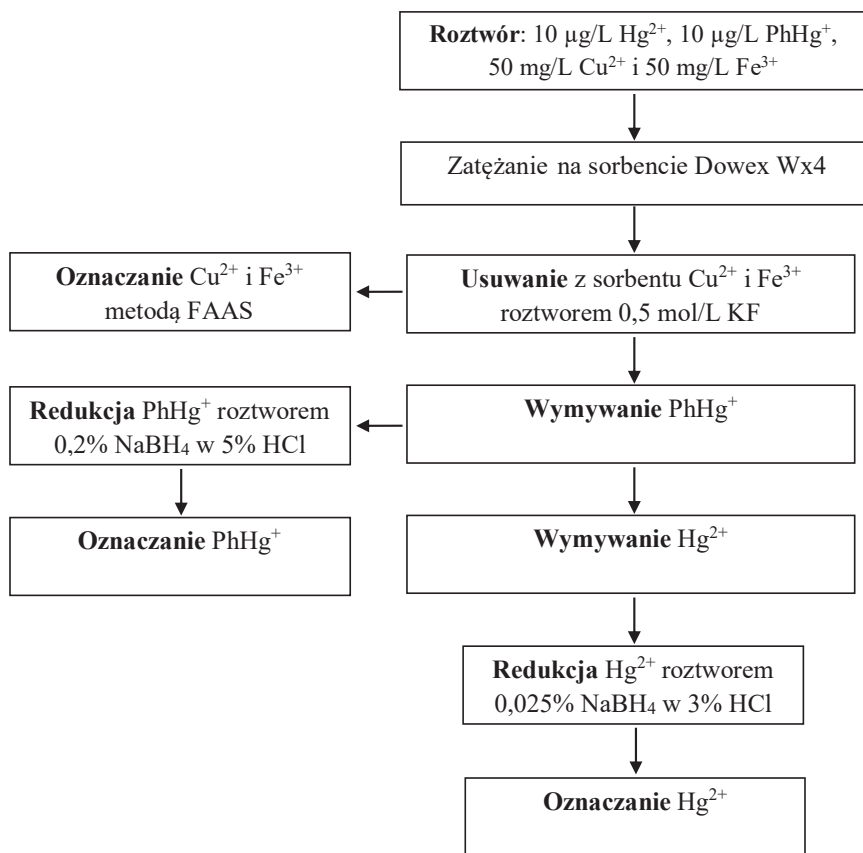
Badanie specjacji rtęci było pierwszym poważnym wyzwaniem analitycznym w aspekcie badań środowiskowych. Poznanie zjawiska wyjątkowo groźnego działania rtęci i wyjaśnienie pojawienia się metylowych pochodnych rtęci w pożywieniu mieszkańców nadmorskiej wioski zapoczątkowało badania nad zróżnicowanym oddziaływaniem poszczególnych form chemicznych danego pierwiastka. Wprawdzie toksyczne działanie rtęci znane było już od czasów starożytnych, to jednak dopiero współczesne badania pozwoliły na poznanie przemian biochemicznych i ich konsekwencji w odniesieniu do organizmów żywych. Szczególnie istotny okazał się proces biometylacji, a następnie kumulacji pochodnych metylowych w łańcuchu pokarmowym.

Do najczęściej stosowanych technik analitycznych pozwalających na badanie specjacji rtęci można zaliczyć chromatografię gazową (ang. *Gas Chromatography*, GC) początkowo wyposażoną w detektor wychwyty elektronów (ang. *Electron-Capture Detector*, ECD), a w miarę rozwoju technik pomiarowych w emisyjny detektor elementarny, co było możliwe dzięki zastosowaniu plazmy wzbudzonej w polu o częstotliwości mikrofalowej (ang. *Microwave Induced Plasma*, MIP). Kluczowym ele-

mentem rozwijanych procedur analitycznych było opracowanie odpowiednich sposobów przygotowania próbek, w tym tkanek ryb oraz surowicy krwi. Przełomowym podejściem okazało się uwolnienie związków rtęci połączonych w matrycy organicznej z grupami tiolowymi, skompleksowanie wydzielonych form, a następnie ich ekstrakcję do fazy organicznej i derywatyzację za pomocą odczynnika Grignarda. Niezmiernie istotne było zastosowanie kolumny kapilarnej, co w początkowym rozwoju analizy specjacyjnej nie było dość powszechne. Opracowana, nowatorska wtedy procedura analityczna umożliwiła jednoczesne oznaczenie zawartości jonów nieorganicznych rtęci, jak również form organicznych, przede wszystkim metylortęci [10].

Dalsze prace pozwoliły na przystosowanie wcześniej opracowanej procedury, do badania specjacji rtęci w krwi ludzkiej, gdzie zawartość rtęci była na znacznie niższym poziomie w porównaniu z tkankami ryb. Badania prowadzono zarówno dla próbek krwi ludzkiej, jak również dla liofilizowanej krwi ludzkiej, kandydata na materiał odniesienia do oznaczania całkowitej zawartości rtęci. Badania umożliwiły zaproponowanie wartości certyfikowanych dla obu form chemicznych rtęci (jonów nieorganicznych oraz metylortęci) w przygotowanym materiale odniesienia [11].

W dalszych badaniach podjęto próbę zastosowania selektywnego rozdzielania związków rtęci z wykorzystaniem odpowiednio dobranych sorbentów. Badania dotyczyły specjacji rtęci w wodach naturalnych techniką atomowej spektrometrii absorpcyjnej z wydzielaniem zimnych par rtęci (ang. *Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry*, CV AAS). Wprawdzie stwierdzono, że nieorganiczne i organiczne formy rtęci zatężają się efektywnie na wielu sorbentach, bez względu na ich właściwości, to jednak zastosowanie selektywnego wymywania pozwoliło na opracowanie użytecznej procedury postępowania, wykorzystującej jednoczesne zatężenie, a następnie selektywne wymywanie jonów rtęci roztworem tiomocznika w obecności 3% HCl (wymywanie nieorganicznych jonów rtęci) lub w obecności 8% HCl (wymywanie jonów metylortęci) [12]. Skutecznie działającą w obecności jonów żelaza i miedzi procedurę przedstawiono schematycznie na Rysunku 1.



Rysunek 1. Procedura oznaczania jonów Hg²⁺ i PhHg⁺ techniką CVAAS w obecności Cu²⁺ i Fe³⁺
 Figure 1. The procedure of Hg²⁺ and PhHg⁺ determination using CVAAS in the presence Cu²⁺ and Fe³⁺

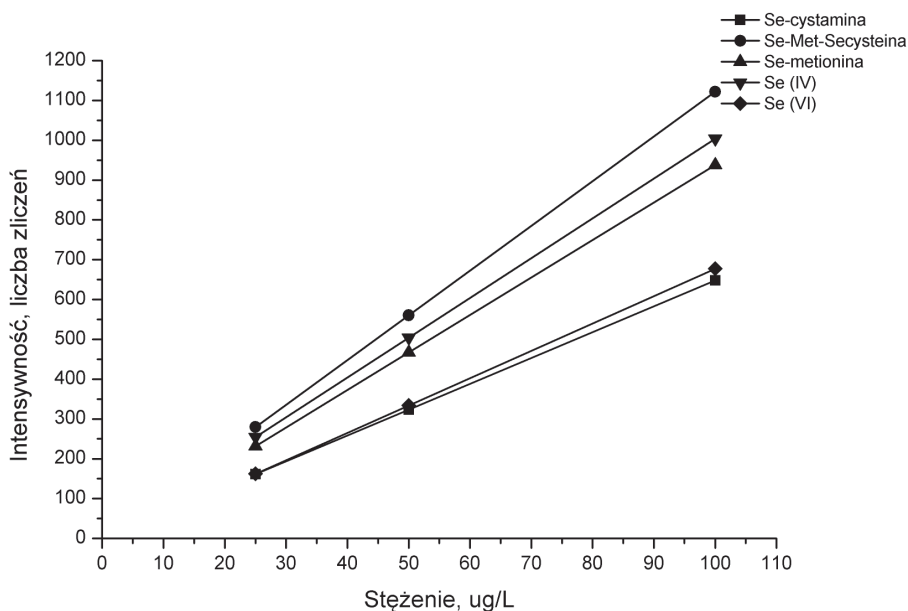
W ostatnich latach wiele prac ukierunkowanych jest na zastosowanie elementarnej spektrometrii mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ang. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, ICPMS), jako detektora w badaniach specjacji chemicznej. W badaniach poświęconych możliwości oznaczania rtęci techniką ICPMS stwierdzono występowanie interferencji specyficznych, wpływających na wszystkie stabilne izotopy rtęci, ale również występowanie interferencji niespecyficznych, związanych z formą chemiczną, w jakiej rtęć występuje w badanym obiekcie. Stwierdzono znaczne różnice w czułości oznaczania, co wskazuje na konieczność stosowania odpowiedniego sposobu kalibracji spektrometru mas [13].

3. BADANIE SPECJACJI SELENU

Selen jest pierwiastkiem wzbudzającym ogromne zainteresowanie badaczy, przede wszystkim z powodu kontrowersyjnych doniesień na temat jego właściwości i oddziaływania na organizmy żywe. Po odkryciu selenu, był on początkowo uważany za całkowicie obojętny, następnie zaliczony został do silnych trucizn, aby po wielu latach badań zostać zaliczony do pierwiastków niezbędnych do funkcjonowania organizmów żywych. Wieloletnie badania wykazały w konsekwencji różnorodność oddziaływania selenu i jego związków, w zależności od stężenia ale również formy, w jakiej występuje w przyrodzie. W związku z tym od dłuższego czasu utrzymuje się ogromne zainteresowanie rozwojem procedur analitycznych pozwalających na badanie związków selenu, w tym występujących na różnych stopniach utlenienia w połączeniach nieorganicznych lub ich pochodnych organicznych [4].

W naszej grupie badawczej od wielu lat prowadzone są badania nad możliwością określenia specjacji chemicznej selenu w obiektach pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego. Głównym celem tych badań jest opracowanie odpowiednich procedur analitycznych wykorzystujących techniki chromatograficzne połączone ze spektrometrią atomową, w tym spektrometrią mas.

Do metod charakteryzujących się dostateczną czułością, pozwalającą na oznaczanie śladowych ilości selenu, zaliczyć można metody spektroskopowe, zarówno te wykorzystujące spektrometrię cząsteczkową, jak i spektrometrię atomową, w tym pierwiastkową spektrometrię mas. Najczulszą techniką analityczną, z grupy metod spektrometrii atomowej, jest spektrometria mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie. Wiadomo jest jednak, że techniki spektrometrii mas pozwalają na oznaczenie całkowitej zawartości danego pierwiastka, natomiast możliwość badania specjacji wymaga nie tylko wstępnego wydzielenia związków selenu z badanego obiektu, na przykład z tkanek roślinnych, ale również ich rozdzielenia. Istotnym problemem, podobnie jak w przypadku oznaczania rtęci, jest wrażliwość odpowiedzi detektora ICPMS na rodzaj związku, w jakim selen występuje w badanym obiekcie. Na Rysunku 2 pokazane są zależności kalibracyjne dla wybranej grupy związków selenu, stosowanych jako substancje wzorcowe.



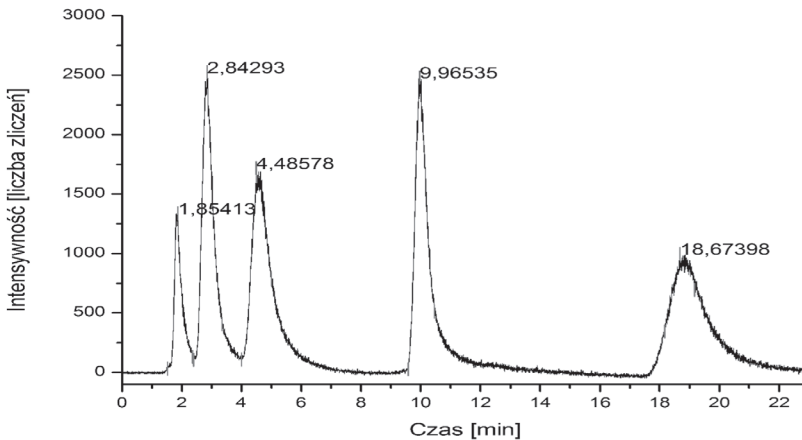
Rysunek 2. Zależności kalibracyjne uzyskane dla pięciu związków selenu: Se-cystaminy, Se-Met-Secysteiny, Se-metioniny, Se(IV), Se(VI) o stężeniu selenu odpowiednio 25, 50 i 100 $\mu\text{g/L}$. Elucja gradientowa, bufor octanowy 5 i 100 mmol/L, pH = 4,7, detekcja ICPMS, badany izotop ^{82}Se

Figure 2. Calibration curves for five selenium compounds: Se-Cystamine, Se-Met-Secysteine, Se-Methionine, Se(IV), Se(VI), with the concentration of selenium at 25, 50 and 100 $\mu\text{g/L}$, respectively. Gradient elution, acetate buffer: 5 and 100 mmol/L, pH = 4.7, detection: ICPMS, monitored isotope: ^{82}Se

Ważnym osiągnięciem było opracowanie procedury pomiarowej oznaczania specjacji selenu w tkankach *Allium Cepa* L., a do tego celu zastosowano chromatografię anionowymienną połączoną z detektorem ICPMS. Związki selenu były wstępnie ekstrahowane za pomocą ekstrahentów, o różnej mocy i różnym powinowactwie chemicznym, a następnie rozdzielane w kolumnie chromatograficznej [14] (Rys. 3). Uzyskane wyniki zostały następnie potwierdzone za pomocą bezpośredniej techniki badania specjacji XANES [5]. Badania prowadzono dla roślin hodowanych w obecności nieorganicznych soli selenu na IV lub VI stopniu utlenienia. Na podstawie obserwacji wzrostu korzeni oraz na podstawie wyników oznaczania całkowitej zawartości selenu w poszczególnych częściach rośliny stwierdzono, że roślina pobiera znacznie bardziej efektywnie jony zawierające selen(VI), zaś w obecności jonów zawierających selen(IV) następuje zahamowanie wzrostu korzeni. Te wyniki były głównym powodem podjęcia szczegółowych badań dotyczących specjacji selenu w tkankach roślin, zwłaszcza w tkankach cebuli jadalnej. Zainteresowanie wzbudziły ewentualne różnice w mechanizmie pobierania różnych form chemicznych selenu z pożywki oraz dalsze możliwości biotransformacji selenu w roślinie. Dzięki zastosowaniu opracowanych procedur badania specjacji możliwe było

poznanie, jakie związki powstały w roślinach hodowanych w obecności soli zawierających nieorganiczne związki selenu na różnych stopniach utlenienia.

Na podstawie wyników uzyskanych za pomocą układu pomiarowego HPLC ICPMS (ang. *High Performance Liquid Chromatography*) (po ekstrakcji z tkanek rośliny) lub za pomocą techniki XANES (bezpośrednio w tkankach rośliny) stwierdzono istotną różnicę w oddziaływaniu selenianów(IV) oraz selenianów(VI). Różnica ta dotyczy przede wszystkim odmiennego mechanizmu transportu obu form chemicznych selenu przez błony komórkowe. Nieorganiczne jony selenu(VI) łatwo wnikają do korzenia, ale są transportowane drogą apoplastyczną, czyli bez przechodzenia do wnętrza komórek korzenia, wraz z prądem wody w niezmienionej chemicznie formie jonowej. Nieorganiczne jony selenu(IV), po wnikięciu do korzenia mają natomiast zdolność do przenikania przez plazmolemę do wnętrza komórek, a w konsekwencji wykorzystując transport symplastyczny podlegają biotransformacji do związków organicznych. Potwierdziły to badania, w których wykryto znaczne ilości Se-metyloselenocysteiny w ekstraktach z tkanek rośliny hodowanej w obecności jonów selenu(IV). W dalszym etapie badań wykorzystano również metody biologiczne pozwalające na ocenę efektywności podziałów mitotycznych do potwierdzenia zaproponowanych mechanizmów oddziaływania różnych związków selenu z tkankami roślin [15].



Rysunek 3. Chromatogram uzyskany dla związków selenu, zawierających selen o stężeniu, o $c = 100 \mu\text{g/L}$: 1,9 min – Se-cystamina, 2,8 min – Se-Met-Se-cysteina, 4,5 min – Se-metionina, 10 min – seleniany(IV), 18,7 – seleniany(VI). Elucja gradientowa, bufor octanowy 5 i 100 mmol/L, pH = 4,7, detekcja ICPMS, badany izotop ^{82}Se

Figure 3. Chromatogram of selenium compounds with selenium concentration $c = 100 \mu\text{g/L}$: 1.9 min – Se-Cystamine, 2.8 min – Se-Met-Se-Cysteine, 4.5 min – Se-Methionine, 10 min – Se(IV), 18.7 min – Se(VI). Gradient elution, acetate buffer: 5 and 100 mmol/L, pH = 4.7, detection: ICPMS, monitored isotope: ^{82}Se

Badania dotyczące specjacji selenu były również istotne w poznaniu metabolizmu w tkankach zwierzęcych. W tym obszarze ciekawa okazała się współpraca z grupą profesora M. Czuderny z Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana

Kielanowskiego PAN. Wspólnie prowadzone badania dotyczyły poznania metabolizmu zwierząt karmionych paszą, zawierającą oprócz innych składników również związki selenu [16–18].

4. BADANIE SPECJACJI ANTYMONU

Zainteresowanie analizą specjacyjną antymonu wśród naukowców pojawiło się w związku z poszerzającym się obszarem zastosowań tego pierwiastka (elektronika, farmacja, metalurgia) i wiążącym się z tym wzrostem ilości antymonu w obiegu w środowisku naturalnym. Najczęściej badanymi formami antymonu były związki nieorganiczne, co wiązało się z ich najszerszym rozpowszechnieniem w środowisku. Warto również podkreślić fakt, że podjęcie badań nad specjacją antymonu było możliwe dzięki opracowaniu nowych, bardzo czułych technik oznaczania antymonu, co jest niezbędne w analizie specjacyjnej.

W początkowym okresie problemem był brak dobrze zdefiniowanych i efektywnych metod ekstrakcji antymonu i jego związków. Często stosowano ekstrakcję ciecz–ciecz, w której wykorzystywane było zjawisko selektywnego tworzenia w środowisku kwaśnym kompleksów antymonu(III) ze związkami takimi jak: kwas mlekowy czy zieleń malachitowa, które to kompleksy były następnie ekstrahowane za pomocą rozpuszczalników organicznych: chloroformu lub ketonu metyloizobutylowego. Określenie stężenia antymonu(V) odbywało się pośrednio, po zredukowaniu Sb(V) do Sb(III), za pomocą jodku potasu. Trudności występujące w tej procedurze to z jednej strony brak odpowiednich wzorców związków organicznych antymonu, a z drugiej strony słaba odtwarzalność wyników przy oznaczaniu antymonu w rozpuszczalnikach organicznych metodami atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w piecu grafitowym (ang. *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*, GF AAS) lub z generowaniem wodorków (ang. *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*, HG AAS). Z tego względu zaproponowano zmianę procedury badania specjacji antymonu poprzez zastosowanie selektywnego dla Sb(III) odczynnika, *N*-benzylo-*N*-fenylohydroksyminy. Zamiast oznaczać zawartość Sb(III) w fazie organicznej, proces ekstrakcji służył do usunięcia jonów Sb(III) z badanej próbki. Oznaczana była zawartość Sb(V) w fazie wodnej i całkowita zawartość antymonu w próbce. Dzięki temu, z różnicy pomiędzy całkowitym stężeniem antymonu i stężeniem Sb(V), możliwe było obliczenie zawartości Sb(III) [19].

W przypadku ekstrakcji ciecz–ciało stałe, selektywne załadowanie wybranej formy antymonu prowadzono przy użyciu takich samych czynników kompleksujących (np. pirolidynoditiokarbaminianu amonu), jak w przypadku ekstrakcji ciecz–ciecz z tym, że zastąpiono etap ekstrakcji do fazy organicznej adsorpcją powstałego kompleksu Sb(III) na kolumnie wypełnionej heksadecylosilanem. Zaadsorbowany kompleks antymonu (III) wymywano metanolem i oznaczano zawartość antymonu za pomocą GF AAS. Całkowitą zawartość antymonu określano na tej samej drodze postępowania poprzedzonej redukcją Sb(V) do Sb(III) przy użyciu L-cysteiny [20].

Inne stałe sorbenty, stosowane do ekstrakcji związków antymonu, zawierały grupy aminowe i amidooksymowe. W trakcie przeprowadzonych badań stwierdzono ilościowe powinowactwo antymonu do wymienionych wyżej grup funkcyjnych. Zmiana pH z kwaśnego na zasadowe pozwoliła na nieselektywną sorpcję nieorganicznych jonów antymonu przy pH = 2 lub na selektywną sorpcję jonów Sb(III) przy pH = 10. Oznaczenie zawartości zaabsorbowanego antymonu prowadzono bezpośrednio w wodnej zawieszynie sorbentu, podawanej do atomizera. Dzięki temu możliwe było istotne obniżenie granicy wykrywalności proponowanej procedury [21].

Modyfikacją powyższej procedury było zastosowanie wymiennicza zawierającego również grupy aminowe, lecz zastosowanego w układzie przepływowo-wstrzykowym z detekcją za pomocą atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w płomieniu (ang. *Flame Atomic Absorption Spectrometry*, F AAS). Pozwoliło to na skrócenie czasu analizy dla pojedynczej próbki przy zachowaniu granic wykrywalności porównywalnych z GF AAS (bez zatężania). Wyznaczenie stężenia jonów Sb(V) było możliwe na podstawie wyników zawartości całkowitej antymonu i zawartości jonów Sb(III) [22].

Rozwinięciem metod ekstrakcji ciecz-ciało stałe w trybie przepływowo-wstrzykowym było zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczonej, w wyniku czego uzyskano lepszą rozdzielczość dla poszczególnych form chemicznych. Badania z zastosowaniem techniki HPLC prowadzono w celu określenia specjacji antymonu w obecności wybranych białek surowicy krwi. Zaproponowane warunki chromatograficzne pozwoliły na rozdzielenie jonów Sb(V) i Sb(III) w czasie 15 minut. W badaniach zastosowano detekcję *off-line* z użyciem atomowej spektrometrii absorpcyjnej z atomizacją w piecu grafitowym [23].

5. BADANIE SPECJACJI CYNKU

Jednym z grupy pierwiastków, które wzbudzają duże zainteresowanie badaczy jest także cynk, który jest składnikiem ponad 200 enzymów odgrywających niezmiernie ważną rolę w procesach fizjologicznych [24]. Z drugiej strony wiele obserwacji wskazuje, że w przypadku zanieczyszczenia środowiska naturalnego związkami cynku, możliwe są efekty toksyczne [25]. Współpraca z fizjologami roślin wskazała, że ciekawym gatunkiem pod względem badawczym jest *Plantago lanceolata* L., roślina, która przystosowała się do warunków wzrostu na hałdach przemysłowych zawierających znaczne zawartości cynku. Podjęte badania miały na celu przede wszystkim opracowanie wiarygodnej procedury analitycznej umożliwiającej badanie specjacji cynku w tkankach roślin [26].

W efekcie szczegółowych badań zaproponowano specyficzny protokół postępowania obejmujący ekstrakcję związków cynku z tkanek rośliny a następnie dwuwymiarowe (2D) rozdzielenia chromatograficzne z detekcją obecności cynku w danej frakcji techniką ICPMS. W odniesieniu do dwuwymiarowego rozdzielania

chromatograficznego zastosowano chromatografię jonową (ang. *Ion Chromatography*, IC) oraz chromatografię wykluczenia (ang. *Size Exclusion Chromatography*, SEC) w układzie sekwencyjnym, zmieniając przy tym kolejność zastosowania obu sposobów rozdzielania. W przypadku SEC zastosowano również detekcję UV, tak aby możliwa była ocena obecności związków o różnej masie cząsteczkowej.

Opracowana procedura okazała się wyjątkowo pomocna w przypadku badania specjacji cynku, przede wszystkim umożliwiając uzyskanie istotnych informacji mimo braku wzorców dla różnych związków cynku. W efekcie możliwa była obserwacja wpływu pH ekstrahenta na całkowitą wydajność ekstrakcji (procedura określania całkowitej zawartości) i specjacje cynku (2D HPLC ICPMS). Zauważono, że wraz ze wzrostem pH ekstrahenta rośnie różnorodność specjacyjna form cynku, ale maleje ogólna wydajność ekstrakcji. Scenariusz analityczny zastosowano do porównania różnorodności specjacji cynku dwóch populacji rośliny *Plantago* – populacji roślin rosnących w warunkach niezanieczyszczonych i populacji łąkowych. Porównano również specjacje cynku w podziemnych i nadziemnych częściach roślin obu populacji. Stwierdzono występowanie różnic pomiędzy ekstraktami z części nadziemnych i podziemnych. W częściach nadziemnych zaobserwowano sygnały od trzech frakcji: (1) związków cynku o masach poniżej 1360 j.m.a., (2) związków cynku o masach od 3000 do 4000 j.m.a., (3) związków cynku o masach około 350 000 j.m.a. W ekstraktach korzeni nie potwierdzono występowania najcięższej frakcji. Zastosowanie chromatografii 2D pozwoliło wykazać, że ekstrakty części nadziemnych i podziemnych różnią się specjacją cynku i względną intensywnością sygnałów pochodzących od poszczególnych form cynku. Zaproponowany scenariusz analityczny nie potwierdził zasadniczych różnic w specjacji cynku między populacjami łąkową i naturalną rośliny *Plantago*. Zaobserwowano natomiast różnice we względnych intensywnościach poszczególnych sygnałów, które mogą być wynikiem osobniczej zmienności pomiędzy poszczególnymi roślinami danej populacji. Otrzymane dane nie wskazują na wpływ pochodzenia rośliny na specjacje cynku w jej poszczególnych częściach, tym samym nie zaobserwowano wpływu mechanizmów tolerancji na specjacje cynku [27].

6. BADANIE SPECJACJI GLINU

Zainteresowanie oznaczaniem glinu oraz jego związków wynika przede wszystkim z faktu, że w środowisku naturalnym występuje w wielu różnych formach, zależnych od pH roztworu oraz do obecności innych substancji. Mimo stosunkowo dużego rozpowszechnienia glinu, w warunkach naturalnych jego zawartość w wodach nie jest duża, co wynika z niewielkiej rozpuszczalności jego związków występujących w minerałach. Zanieczyszczenie środowiska, a w szczególności jego zakwaszenie spowodowało istotny wzrost obecności rozpuszczalnych w tych warunkach substancji, w tym związków glinu. W literaturze pojawiło się wiele doniesień, w których autorzy podkreślają zagrożenie dla organizmów żywych, wskazując na

zależność toksyczności od formy chemicznej glinu [28–30]. Warto również podkreślić, że glin zajmuje szczególne miejsce w badaniach specjacji, z powodu małej stabilności jego form chemicznych, przede wszystkim jonów hydratowanych oraz różnorodnych kompleksów z ligandami nieorganicznymi i organicznymi. W pracy przeglądowej [31] przedstawiono najważniejsze informacje dotyczące toksyczności, biodostępności i obiegu glinu w środowisku naturalnym, w kontekście jego występowania w wodach naturalnych. Zwrócono uwagę na konieczność stosowania odpowiedniego reżimu pobierania próbek oraz właściwych warunków ich przechowywania, tak aby nie zaburzyć oryginalnych równowag chemicznych. Podkreślono również fakt obecności glinu w koloidalnych frakcjach wód naturalnych oraz występowania połączeń z ligandami organicznymi.

W badaniach specjacji glinu ważne miejsce zajmują obliczenia, dzięki którym przewidując skład chemiczny badanego obiektu oraz znając wartości stałych równowag, możliwe jest teoretyczne obliczenie zawartości poszczególnych form chemicznych [32, 33]. Wprawdzie informacje uzyskane w wyniku obliczeń teoretycznych zależą od przyjętego modelu i wartości wyjściowych, mogą być użyteczną wskazówką odnośnie prawdopodobieństwa obecności danego jonu, czy związku zawierającego glin w wybranym otoczeniu chemicznym.

W przypadku metod analitycznych wykorzystuje się różne sposoby wstępnego rozdzielania, w tym najczęściej rozdzielanie chromatograficzne z wykorzystaniem anionowymiennej chromatografii cieczowej lub niechromatograficzne techniki ekstrakcji do fazy ciekłej lub stałej. W kolejnej pracy przeglądowej [34] omówiono możliwości różnych procedur analitycznych wykorzystujących między innymi szybkość reakcji, zdolność sorpcyjną, wielkość jonów do badania specjacji glinu, szczególnie wykorzystując przepływowe systemy pomiarowe. W pracy zwrócono uwagę przede wszystkim na to, że badanie specjacji glinu nie zapewnia oznaczania poszczególnych indywiduów chemicznych, lecz grupy jonów o podobnych właściwościach odnośnie danej cechy. W praktyce wykorzystano opisywane możliwości analityczne do oznaczania zawartości różnych związków glinu w naparach z liści herbaty [35, 36] oraz w ekstraktach glebowych [37].

W literaturze pojawiło się wiele prac, w których autorzy zwracają uwagę na duże zawartości glinu w liściach herbaty [38]. Biorąc pod uwagę to, że napary herbaty są powszechnie stosowane w diecie człowieka w wielu krajach, wydawało się zasadne sprawdzenie, jaka część związków glinu może rozpuszczać się w trakcie zaparzenia oraz w jakich formach glin występuje w naparze. W badaniach wykorzystano ekstrakcję do fazy stałej, stosując do tego celu różne sorbenty, takie jak: chelatujący Chelex 100, kationowymienny Dowex HCR-S oraz anionowymienny AG MP1. Badania prowadzono zarówno dla roztworów modelowych zawierających określoną ilość taniny oraz dla dwóch rodzajów popularnych i dostępnych handlowo w Polsce odmian herbat. Na podstawie uzyskanych wyników oszacowano, że około 60% wyekstrahowanych z liści herbaty związków glinu stanowią formy organiczne.

W przypadku badania specjacji glinu w ekstraktach glebowych zastosowano dwa, spośród wymienionych wyżej sorbentów: Chelex 100 oraz AG MP1. W pracy zaproponowano warunki eksperymentalne prowadzenia badań w kierunku identyfikacji różnych form chemicznych glinu w ekstraktach z gleb o różnej zawartości substancji organicznych. Stwierdzono, że w glebach piaszczystych glin występuje w formie związków o znacznie mniejszej rozpuszczalności w porównaniu z glebami o dużej zawartości substancji organicznych. Poza tym ekstrakty różniły się stosunkiem zawartości form kationowych do anionowych. Na tej podstawie możliwe jest określenie rodzaju gleby, co zostało również potwierdzone wynikami analizy elementarnej (CHNS) oznaczenia zawartości węgla, wodoru, azotu i siarki [37].

PODSUMOWANIE

W niniejszym artykule opisano wybrane przykłady zastosowania technik łączonych wykorzystujących detekcję spektralną do badania specjacji chemicznej wybranych pierwiastków. W pracy wykorzystano przede wszystkim badania prowadzone w Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego. Prowadzone przez naszą grupę badania rozpoczęły się od analizy specjacyjnej związków organicznych rtęci. Następnie rozpoczęliśmy szeroko zakrojone badania specjacji antymonu i seleniu w różnego rodzaju obiektach, w wodzie, w roślinach oraz w próbkach klinicznych. Dużym wyzwaniem były badania dotyczące poznania form chemicznych glinu, przede wszystkim ze względu na niestabilność równowag chemicznych. W tym przypadku badania pozwoliły na poznanie specjacji grupowej, określanej często jako frakcjonowanie. Niezmiernie ciekawym przykładem były podjęte stosunkowo niedawno badania specjacji cynku. Mimo braku wzorców udało się opracować nierutynowy sposób postępowania, w którym zastosowanie w trybie sekwencyjnym dwóch różnych mechanizmów rozdzielania chromatograficznego umożliwiło uzyskanie pożądaných informacji.

PODZIEKOWANIA

Część badań była finansowana w ramach projektu NCN 2012/05/B/ST4/01219

PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] D.M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.G. Danielsson, H. Muntau, H.P. van Leeuwen, R. Lobiński, *Pure Appl. Chem.*, 2000, **72**, 1453.
- [2] A. Hulanicki, *Współczesna chemia analityczna, wybrane zagadnienia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2001.
- [3] D. Barańkiewicz, E. Bulska, *Specjacja chemiczna, problemy i możliwości*, Wydawnictwo MALAMUT, Warszawa 2009.

- [4] M. Wierzbicka, E. Bulska, K. Pyrżyńska, I. Wysocka, B.A. Zachara, *Selen, pierwiastek ważny dla zdrowia, fascynujący dla badacza*, Wydawnictwo MALAMUT, Warszawa 2007.
- [5] E. Bulska, I.A. Wysocka, M. Wierzbicka, K. Proost, K. Janssens, G. Falkenberg, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 7616.
- [6] B. Wagner, E. Bulska, B. Stahl, M. Heck, H.M. Ortner, *Anal. Chim. Acta*, 2004, **527**, 195.
- [7] K. Proost, K. Janssens, B. Wagner, E. Bulska, M. Schreiner, *Nucl. Instrum. Methods*, 2004, **213**, 723.
- [8] *Spektrometria atomowa, możliwości analityczne*, E. Bulska, K. Pyrżyńska (red.), Wydawnictwo MALAMUT, Warszawa 2007.
- [9] E. Bulska, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1991, **7**, 201.
- [10] E. Bulska, D.C. Baxter, W. Frech, *Anal. Chim. Acta*, 1991, **249**, 545.
- [11] E. Bulska, H. Emteborg, D.C. Baxter, W. Frech, D. Ellingsen, Y. Thomassen, *Analyst*, 1992, **117**, 657.
- [12] A. Krata, E. Kopyś, K. Pyrżyńska, E. Bulska, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 2002, **47**, 429.
- [13] M. Wojciechowski, A. Krata, E. Bulska, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 2008, **53**, 797.
- [14] K. Wróbel, K. Wróbel, S.S. Kannamkumarath, J.A. Caruso, I.A. Wysocka, E. Bulska, J. Świątek, M. Wierzbicka, *Food Chemistry*, 2004, **86**, 617.
- [15] M. Michalska-Kacymirow, E. Kurek, A. Smolis, M. Wierzbicka, E. Bulska, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014, **406**, 3717.
- [16] M. Czauderna, J. Kowalczyk, K.M. Niedźwiedzka, I. Wąsowska, J.J. Pająk, E. Bulska, A. Ruszczynska, *J. Anim. Feed Sci.*, 2004, **13**, 105.
- [17] M. Czauderna, J. Kowalczyk, K.M. Niedźwiedzka, I. Wąsowska, B. Pastuszewska, E. Bulska, A. Ruszczynska, *J. Anim. Feed Sci.*, 2004, **13**, 353.
- [18] E. Kurek, A. Ruszczynska, M. Wojciechowski, M. Czauderna, E. Bulska, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 2009, **54**, 43.
- [19] S. Garboś, E. Bulska, A. Hulanicki, Z. Fijałek, K. Sołtyk, *Spectrochim. Acta Part B*, 2000, **55**, 795.
- [20] S. Garboś, M. Rzepecka, E. Bulska, A. Hulanicki, *Spectrochim. Acta Part B*, 1999, **54**, 873.
- [21] S. Garboś, E. Bulska, A. Hulanicki, N.I. Shcherbinina, E. Sedygh, *Anal. Chim. Acta*, 1997, **342**, 167.
- [22] S. Garboś, E. Bulska, A. Hulanicki, *Atomic Spectroscopy*, 2000, **21**, 128.
- [23] M. Piaścik, M. Wojciechowski, H. Bład, E. Bulska, *Proceedings of 4th European Furnace Symposium*, E.Krakowska (Red.), Technical University, Kosice 2000.
- [24] C. Cobbett, P. Goldsbrough, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2002, **53**, 159.
- [25] *Biologia komórki roślinnej*, P. Wojtaszek, A. Woźny, L. Ratajczak (Red.), Tom II, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009.
- [26] J. Karasiński, W. Cegiełkowska, M. Wojciechowski, M. Wierzbicka, E. Bulska, *Chemical Papers*, 2014, **68**, 291.
- [27] J. Karasiński, Scenariusz analityczny badania specjacji cynku w tkankach roślin hałdowych, praca doktorska, Uniwersytet Warszawski Wydział Chemii, 2014.
- [28] G. Berthon, *Coord. Chem. Rev.*, 1996, **149**, 241.
- [29] A.B. Poléo, K. Ostbye, S.A. Oxnevad, R.A. Andersen, E. Heibo, L.A. Vollestad, *Environ. Pollut.*, 1997, **96**, 129.
- [30] K. Wróbel, K. Wróbel, E.M.C. Urbina, *Biol. Trace Elements Res.*, 2000, **78**, 271.
- [31] K. Pyrżyńska, E. Bulska, S. Gucer, A. Hulanicki, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 1999, **44**, 1.
- [32] N. Clarke, L.G. Danielsson, N. Sparén, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 1992, **48**, 77.
- [33] B. Shuping, *Analyst*, 1995, **120**, 2033.
- [34] K. Pyrżyńska, S. Gucer, E. Bulska, *Water Research*, 2000, **34**, 359.
- [35] S. Gucer, Y. Ozdemir, S.B. Erdemoglu, S.B. Yasar, K. Pyrżyńska, E. Bulska, *Proceedings on 1st AEGEAN Analytical Chemistry Days, Turcja, Tureckie Towarzystwo Chemiczne*, 1999.

- [36] A. Ruszczyńska, K. Pyrzyńska, E. Bulska, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 2004, **49**, 19.
- [37] A. Ruszczyńska, P. Bieńkowski, E. Bulska, *Int J Environ Stud*, 2005, **62**, 193.
- [38] C.E. Magalhaes, E.C. Lima, F.J. Krug, M.A. Arruda, *Mikrochim. Acta*, 1999, **132**, 95.

Praca wpłynęła do Redakcji 14 sierpnia 2015