

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ФОРМ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ

**Н.Б. Иваненко<sup>1,2</sup>, Н.Д. Соловьев<sup>1,2</sup>, А.А. Иваненко<sup>1</sup>, Л.Н. Москвин<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт токсикологии» ФМБА России  
192019 Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1

<sup>2</sup>ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет»,  
Химический факультет  
198504 Санкт-Петербург, Старый Петергоф, Университетский пр. 26  
nicksolovev@gmail.com

Поступила в редакцию 23 апреля 2012

Обобщен опыт определения химических форм микроэлементов в биологических объектах, основное внимание уделено клиническим объектам анализа. Обсуждены общие методические подходы к определению форм микроэлементов в биологических средах. В качестве предпочтительного методического подхода к их определению рассматривается гибридная схема анализа, включающая разделение форм и их элементоспецифичное детектирование. Методические решения в области определения форм микроэлементов в биологических объектах обсуждены на примере определения форм селена, мышьяка, ртути и хрома. Библиография – 293 ссылки.

**Ключевые слова:** вещественный анализ, определение специфических форм элементов, микроэлементы, комбинированные методы анализа, масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой, высокоэффективная жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез, селен, мышьяк, ртуть, хром.

**Иваненко Наталья Борисовна** – к.х.н, зав. лаб. ФГУН «Институт токсикологии» ФМБА России, старший преподаватель Санкт-Петербургского государственного университета, докторант СПбГУ.

**Область научных интересов:** элементный анализ природных и биологических объектов методами ААС-ЭТА, ИСП-МС, ИСП-АЭС, контроль качества измерений.

**Соловьев Николай Дмитриевич** – млад. науч. сотр. ФГУН «Институт токсикологии» ФМБА России, аспирант Санкт-Петербургского государственного университета.

**Область научных интересов:** элементный анализ природных и биологических объектов методами ААС-ЭТА, ИСП-МС, ИСП-АЭС, контроль качества измерений, анализ форм элементов.

**Иваненко Анатолий Алексеевич** – к.х.н., стар. науч. сотр. ФГУН «Институт токсикологии» ФМБА России.

**Область научных интересов:** элементный анализ природных и биологических объектов методами ААС-ЭТА, ИСП МС, ИСП АЭС, контроль качества измерений.

**Москвин Леонид Николаевич** – д.х.н., проф., зав. кафедрой Аналитической химии СПбГУ, академик РАЕН

**Область научных интересов:** методы разделения и концентрирования в аналитической химии, методы химического и радиохимического контроля и химические технологии в атомной энергетике.

*Чем совершеннее техника  
исследования состава организмов,  
тем большее число химических  
элементов находим мы в них  
А.Е. Ферсман*

### Введение

Сравнительно недавно возникло, а в настоящее время интенсивно развивается новое междисциплинарное научное направление – металломика.

Металломика объединяет области биологии, химии и медицины, связанные с определением химических форм элементов в живых клетках, изучением их функций и распределения в организме, выяснением молекулярных механизмов металлозависимых био-

логических процессов [1-4]. В рамках металломики изучают функции и распределение химических элементов в биологических системах, а также молекулярные механизмы металлозависимых биологических процессов. Важнейшая область металломики – методы элементного, вещественного и структурного анализа, поскольку только достоверное определение химических форм элементов в биологических средах может обеспечить успешное развитие этого научного направления.

Интерес к этому направлению связан с тем, что различные химические формы одного и того же элемента имеют разную биологическую активность. Согласно рекомендациям IUPAC термин «химическая форма» относится к изотопному составу элемента, его электронному состоянию, степени окисления, а также к молекулярному и/или комплексному строению его соединений [5].

В клетках живых организмов эссенциальные и токсичные металлы могут присутствовать в виде ионных и молекулярных неорганических форм, алкилированных форм, соединений с аминокислотами, углеводами, нуклеиновыми кислотами, белками и другими биогенными соединениями [6]. Результаты определения содержания форм элементов, получаемые при выполнении вещественного анализа биологических объектов, позволяют не только оценить источники и пути поступления элементов в организм, но и установить закономерности транспорта, распределения, биотрансформации элементов в организме, что важно при решении задач токсикологии, фармакологии, биохимии, клинической и экологической химии.

Информативность результатов определения химических форм элемента в биологических объектах значительно выше по сравнению с информативностью величины его общего содержания [7-9]. Например, данные о содержании комплекса кадмия с металлотионеином в плазме крови или моче несут большую диагностическую информацию о длительном воздействии кадмия на организм, чем общая концентрация кадмия [3]. Увеличение концентрации этого комплекса свидетельствует о депонировании кадмия в почках. От химической формы элемента непосредственно зависят процессы абсорбции [10], транспорта, распределения [11, 12], депонирования, биотрансформации, выведения элементов из организма и т.д. [13]. Так, например, абсорбция паров элементарной ртути в альвеолах легких осуществляется практически полностью, в то время как в желудочно-кишечном тракте ее абсорбция незначительна [10, 14, 15]. Транспорт липофильных соединений и незаряженных низкомолекулярных комплексов в основном осуществляется неспецифически, а гидрофильные и заряженные частицы проникают через клеточные мембраны посредством специфических транспортных систем: через ионные каналы или в виде комплексов с соответствующим белком-переносчиком [10]. Более высокая нейроток-

сичность алкильных производных ртути, свинца и олова по сравнению с неорганическими формами [10, 15] связана с их липофильными свойствами, обеспечивающими большую возможность для проникновения в организм и отдельные жизненно важные органы. Липофильные формы легко проникают через гематоэнцефалический барьер и накапливаются в богатой липидами нервной ткани. В свою очередь, токсичность ионов металлов во многом определяется степенью окисления элемента. Шестивалентный хром обладает выраженным канцерогенным действием, в то время как трехвалентный хром участвует в метаболизме углеводов и липидов [16].

Химические формы металлов в организме можно условно разделить на две большие группы – экзогенные и эндогенные формы [17]. К экзогенным формам относятся неорганические формы металлов и металлоорганические соединения, образовавшиеся ещё до поступления в живые организмы и не претерпевшие в них существенных изменений. К их числу относятся, например, алкилртуть, алкилсвинец, бутил- и фенилолово. Формы данной группы в большинстве случаев идентифицированы и доступны или в виде готовых препаратов, или существует возможность их синтеза. Эндогенные химические формы – это соединения, присутствующие в организме и образующиеся в результате деятельности живых клеток в результате трансформации экзогенных форм, вследствие взаимодействия элементов с макромолекулами (протеины, нуклеиновые кислоты, полисахариды) и низкомолекулярными органическими лигандами (цитрат, тартрат, оксалат, фитат, аминокислоты и олигопептиды). Включение атомов микроэлементов в биомолекулы происходит различными путями. Халькофильные элементы Cu, Zn, Cd, Hg и Ag чаще всего связываются с белками и их составными частями (металлотионеины, альбумин, фитохелатины, цистеин, метионин) через атомы серы. Mo, Mn, Fe, Co и Ni в большинстве металлоферментов координируют биомолекулы преимущественно через атомы кислорода и азота. По этой же схеме иногда координируют биолиганды Cu и Zn. Неметаллы As, Se и I образуют связь элемент-углерод (арсеносахара, селеноаминокислоты, тиреоидные гормоны). Основная сложность определения эндогенных форм связана с недостаточной информацией о формах нахождения микроэлементов в конкретной биологической системе и высокой лабильностью этих форм.

Общей проблемой идентификации и определения как экзогенных, так и эндогенных форм является контроль качества измерений, так как наиболее надежным способом доказательства правильности полученных результатов является анализ стандартного образца состава исследуемого объекта [18-20]. Однако стандартные образцы состава клинических образцов, важных с точки зрения диагностики и изучения метаболизма элементов в живых организмах (моча, кровь, спинномозговая жидкость, ткани, волосы и др.), с аттестованными

значениями концентрации химических форм элементов практически отсутствуют. Авторам обзора удалось найти сведения о стандартных образцах состава таких объектов, как рыба и донные отложения, с аттестованными значениями концентрации некоторых экзогенных форм ртути, олова и мышьяка [21]. Что касается клинических образцов, то известно о существовании только контрольного образца мочи с известным содержанием 5 форм мышьяка и образцов состава волос с известной концентрацией ртути (II) и метилртути. Существующих на рынке стандартных образцов состава явно не достаточно для решения задач вещественного анализа биологических объектов. В результате этого, на сегодняшний день для оценки правильности результатов анализа суммарное содержание всех форм элемента, как правило, сравнивают с его общим содержанием в анализируемом образце.

Наличие подобных метрологических проблем, не снижает интереса к определению форм существования микроэлементов в различных биологических объектах. Согласно данным реферативных баз *Scopus* и *Web of Science* по этой тематике опубликовано большое количество оригинальных и обзорных статей. Только за последние 5 лет появилось свыше десятка обзоров [15, 16, 22-31], а также несколько специализированных монографий [32-34]. Тем не менее, в отечественной аналитической практике этой области исследований пока уделяется ограниченное внимание. Особенно это касается определения химических форм микроэлементов в клинических образцах. В сравнительно редких публикациях по тематике вещественного анализа объектами исследования преимущественно являются экологические объекты – вода [35-39], почвы и донные отложения [40].

Авторам удалось найти всего одну обзорную статью на русском языке [8], в которой с медико-биологической точки зрения обосновывается важность определения форм микроэлементов в клинических объектах анализа, но аналитические аспекты этой проблемы авторами практически не обсуждаются.

## **1. Химико-аналитические аспекты определения химических форм микроэлементов в биологических объектах**

### **1.1. Общие методические подходы к исследованию форм в биологических объектах**

Исследование форм существования химических элементов в биологических объектах начинали с биогенных элементов, присутствующих в живых организмах в макроколичествах. При этом на начальных этапах развития бионеорганической химии исследование комплексов макроэлементов с биологическими лигандами проводили путем их

выделения в виде индивидуальных веществ [6]. Для определения структур использовали спектроскопию ЯМР [41], рентгеновские методы [22, 42-45] методы мессбауэровской [46], электронной или инфракрасной спектроскопии [6]. Подобный подход к решению проблемы определения форм оказался неприемлемым для элементов, присутствующих в объектах исследования в микро- и ультрамикроколичествах.

К настоящему времени в организме человека обнаружено до 80 химических элементов. При этом все они в той или иной степени участвуют в процессах жизнедеятельности. Кроме того, практически каждый из микроэлементов, присутствующих в организме, распределяется между несколькими химическими формами, поэтому проблема определения в биологических объектах форм нахождения микроэлементов начинается с поиска общеметодических подходов к ее решению. В настоящее время предложено два общих подхода. Первый – разработка методов непосредственного количественного анализа определённых химических форм микроэлементов на принципе создания чувствительных к ним биосенсоров. Однако успехи в развитии этого направления пока достаточно скромные. Поэтому основное внимание уделяется развитию гибридных методов анализа [47], селективность которых по отношению к определённым формам обеспечивается их предварительным разделением в сочетании с последующим детектированием индивидуальных форм с помощью элементоспецифичных детекторов.

Элементоселективные биосенсоры создаются на основе специальных культур клеток микроорганизмов. Биосенсоры используют для оценки биоустойчивости и токсичности определенных форм микроэлементов (например, Al, As, Cu, Hg, Ni и Zn) при совместном присутствии в анализируемом образце и лишь иногда для количественного определения химических форм [46-49]. Например, в работе [48] помимо определения биодоступности мышьяка, авторам удалось провести количественное определение отдельной его формы – арсенита – в водных экстрактах из почв и донных отложений. Сообщений об определении с применением биосенсоров отдельных форм элементов в клинических объектах анализа авторам данного обзора найти не удалось.

Проведение количественного анализа с использованием биосенсоров возможно только при условии, что матрица образца и нецелевые микрокомпоненты не вызывают необратимых изменений иммобилизованного биологического материала (денатурацию ферментов и мембранных протеинов, лизис клеток и т.п.), не препятствуют воспроизводимому детектированию аналитического сигнала сенсора, а также не вызывают значительной стимуляции роста культур за счет избыточного питательного материала. В работах обзорного

характера [49, 50] изложены общие принципы устройства и работы биосенсоров, примеры их применения в аналитической практике, а также перспективы и ограничения данных аналитических систем как для измерения групповых параметров (биодоступность, токсичность), так и при анализе индивидуальных химических соединений. Как правило, эти условия, в той или иной степени, соблюдаются только в случае сравнительно простых объектов анализа, таких как природные и сточные воды [51] и вытяжки из почвы [52-55].

При интерпретации данных по оценке токсичности и биодоступности отдельных форм микроэлементов, полученных с использованием биосенсоров, необходимо учитывать, что восприимчивость разных групп микроорганизмов к определенным формам значительно отличается и тот факт, что восприимчивость микроорганизмов может существенно отличаться от восприимчивости высших животных [48]. Кроме того, применение биосенсоров затруднительно для анализа биологических объектов, богатых органическим углеродом и, особенно, клинических образцов, в которых велика вероятность присутствия агентов иммунной системы. Нельзя не согласиться с высказанным в [50, 56] мнением, что для того, чтобы сделать подобные аналитические методы применимыми для повседневного количественного определения микроэлементов, необходимы дополнительные исследования.

Как уже было отмечено выше, в настоящее время признано, что наиболее перспективным направлением в методологии определения форм микроэлементов являются гибридные методы, целесообразность применения которых впервые обоснована в конце 1970-х годов в работах Ван Луна и Сузуки (Van Loon, Suzuki) [57, 58]. Основу таких гибридных методов составляют различные сочетания хроматографического или электрофоретического разделения форм элементов с их последующим селективным элементоспецифичным детектированием. При выполнении вещественного анализа биологических сред с применением гибридных методов одной из важнейших стадий является подготовка проб, обязательным требованием к которой является сохранение естественного распределения химических форм микроэлемента в объекте анализа.

## 1.2. Подготовка проб при определении форм микроэлементов в биологических объектах

Операции, выполняемые на стадии подготовки проб, зависят от агрегатного состояния объекта анализа. В случае биологических жидкостей – это разбавление проб для их гомогенизации и снижения вязкости, иногда – экстракция аналитов в органический растворитель [23, 24, 59-68]. Извлечение целевых компонентов из твердофазных образцов на стадии пробоподготовки проводят водными буферными смесями [64, 69, 70], водой [71-73], водно-метанольными смесями [43, 74-80], индиви-

дуальными органическими растворителями [81-88]. При этом необходимо отметить, что применение органических растворителей возможно только в случае относительно инертных форм и недопустимо при определении лабильных компонентов, таких как комплексы металлов с белками. Органические растворители вызывают денатурацию протеинов и нарушение естественного распределения форм. При определении форм, присутствующих в твердофазных образцах, одной из существенных проблем является низкая степень извлечения аналитов из образца в силу невозможности применения высокоэффективных методов, включающих деструкцию матрицы. Для увеличения степени извлечения при выделении форм из образца используют ультразвук [75, 89-91], микроволновое излучение [67, 76, 90-95], ферментативный гидролиз белков [70, 73, 74, 83, 84, 96-103]. Однако при определении, например, селенопротеинов необходимо исключить любой гидролиз и окислительную деградацию аналитов. Для сохранения нативности химических форм всегда требуется строгое соблюдение условий кислотности среды и окислительного потенциала системы [27], а также исключение деградации биомолекул микроорганизмами и собственными ферментами. Для уменьшения деградации белков вводят ингибиторы протеаз [104]. В случае легко окисляемых форм операции с пробой проводят в инертной атмосфере [105]. Все растворы перед введением в систему разделения, как правило, фильтруют через мембранные фильтры. Методические промахи, допущенные на стадии извлечения форм из образца, делают бессмысленным самое эффективное разделение и использование чувствительных и селективных детекторов.

## 1.3. Методы разделения форм микроэлементов, присутствующих в биологических объектах

При анализе сложных многокомпонентных проб, когда одного метода разделения оказывается недостаточно, применяют многомерное разделение (ММР), реализуемое, как правило, комбинированием различных вариантов хроматографии и электрофореза [74, 106-108]. Однако использование ММР значительно усложняет анализ и практически исключает работу в *on-line* режиме.

Универсальным методом разделения форм микроэлементов является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Большое разнообразие стационарных и подвижных фаз позволяет использовать ВЭЖХ для разделения химических форм большинства элементов. При выборе конкретного варианта ВЭЖХ учитывается возможность взаимодействия компонентов пробы с подвижной и стационарной фазами. Одним из наиболее распространенных вариантов ВЭЖХ при определении форм микроэлементов является обращеннофазовая жидкостно-абсорбционная хроматография (ОФЖАХ), с использованием в

качестве стационарных фаз силикагеля, модифицированного прививкой силанольных групп  $C_{18}$  [109]. ОФЖАХ обеспечивает разделение неполярных и малополярных форм элементов. Элюирование проводят водными буферными растворами (ацетатный буфер [96, 102, 110-112], 0.1 % трифторуксусная кислота [99, 112, 113] и др.), в которые в качестве регулятора элюирующей способности вводят смешивающийся с водой органический растворитель, преимущественно метанол [99, 100, 112, 114-117], реже ацетонитрил [118, 119]. ОФЖАХ используют для разделения селеноаминокислот [99, 100, 112-117] и форм ртути, стабилизированных в виде комплексов с тиолсодержащими лигандами – меркаптоэтанолам [94, 95, 110, 120, 121], пирролидиндитиокарбаматом аммония или натрия [122, 123], цистеином [111, 120].

Из других вариантов ВЭЖХ для разделения форм микроэлементов, присутствующих в биологических объектах, чаще всего применяется ионная (ИХ) и ионпарная хроматография (ИПХ). Первая обеспечивает возможность разделения непосредственно ионных форм микроэлементов, присутствующих в биологических жидкостях. Вариант ИПХ позволяет повысить селективность разделения форм элементов за счет использования ион-парных реагентов, образующих электронейтральные, как правило, неполярные ассоциаты только с одной из определенных форм, которые далее определяют методом ОФЖАХ. Вместе с тем применять ИПХ необходимо с осторожностью, поскольку ион-парный реагент может являться дополнительным фактором, влияющим на естественное распределение форм элементов и искажающим результаты анализа.

В ИПХ применяют такие же стационарные и подвижные фазы, как и в ОФЖАХ. Отличие заключается во введении в состав элюента ион-парного реагента, к которому предъявляются следующие требования: зарядовая совместимость с анализируемыми формами, однозарядность, апротонность, хорошая растворимость в подвижной фазе и отсутствие разрушающего действия на материал хроматографической системы и анализы. Широкий выбор ион парных реагентов обеспечивает ИПХ большую гибкость по сравнению с ОФЖАХ. В качестве ион-парного реагента при разделении форм наиболее часто применяют соли тетрабутиламмония [86, 93, 109, 122, 124-128] и других четвертичных аммониевых оснований [129], сульфокислоты [78, 89], перфторкарбоновые кислоты [99, 101, 114, 130-132]. Подвижные фазы – водно-метанольные растворы малоновой кислоты [74, 92, 93, 127], фосфатные [90, 119, 124, 125, 129] и цитратные буферные растворы [89], растворы щелочей [133], трифторуксусной кислоты [84], различных комплексобразователей [126]. С помощью ИПХ разделяют формы As (арсенит, арсенат, мышьякорганические кислоты) [78, 89, 90, 92, 93, 125, 127-129], неоргани-

ческие и органические формы Se [74, 84, 100, 101, 113, 114, 131-133] и Hg [67, 86]. ИПХ обеспечивает хорошее разделение для большого количества химических форм элементов, так как условия разделения обычно можно тонко оптимизировать под конкретную задачу.

Наиболее часто используемый вариант хроматографического разделения и определения форм элементов – ионная хроматография. Для разделения форм чаще применяют колонки с анионообменными ионитами, однако возможно использование и катионообменного разделения. В анионообменной ИХ применяют элюенты в основном на основе фосфатных буферов для форм As [43, 64, 72, 75, 77, 79, 82, 91, 119, 134-138] и цитратных [83, 84, 98, 99, 115, 116, 132, 139, 140] для Se. При определении форм As иногда используют растворы кислот [76, 141] и щелочей [64, 117, 142]. При определении селеноорганических форм в состав элюента часто вводят 1-3 % метанола [70, 83, 84, 98, 99, 103, 117, 132, 140-143], поскольку разделение слабоионизированных форм происходит, вероятно, по смешанному механизму, включающему помимо электростатического взаимодействия аналитов с функциональными группами гидрофобное взаимодействие с неполярным углеводородным скелетом стационарной фазы. Для увеличения ионной силы раствора в подвижную фазу иногда добавляют средние соли, такие как  $NH_4NO_3$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ , например, при определении форм As [82, 135] и Cr [144, 145]. В катионообменной ИХ в качестве подвижных фаз применяют в основном растворы солей пиридиния [71, 75-77, 79, 82, 103, 115, 116, 136, 137, 143, 146-149]. Для разделения большого числа форм Se и As многие авторы параллельно используют как анионообменную, так и катионообменную ИХ [71, 75, 77, 79, 115, 116, 136, 137, 147, 148, 150].

Основное применение ИХ в вещественном анализе находят для определения форм As [43, 64, 65, 69, 72, 75-77, 79, 82, 91, 96, 119, 134-138, 141, 146-148, 150-160] и Se [70, 73, 83, 84, 96-98, 103, 115-117, 130, 132, 139, 140, 142, 143, 149, 161]. ИХ используют также для определения Cr (III) / Cr (VI) [144, 145] и валентных форм других элементов, например Sb (III) / Sb (V) [162, 163]. На долю ИХ приходится не менее половины всех публикаций. Это связано, с одной стороны, с хорошей эффективностью разделения, а с другой, с тем, что многие формы элементов, присутствующих в реальных объектах, представляют собой заряженные частицы или же легко ионизируются при небольшом изменении кислотности среды.

Жидкостно-адсорбционная хроматография (ЖАХ) с полярными стационарными фазами применяется в вещественном анализе биологических объектов сравнительно редко, так как в случае полярных сорбентов часто проявляются эффекты необратимой сорбции химических форм многих микроэлементов. Для определения неустойчивых

и лабильных форм наиболее предпочтительной является гель-фильтрационная хроматография (ГФХ). Разделение методом ГФХ не приводит к нарушению естественного распределения форм, так как обычно используемые в ГФХ подвижные фазы – буферные растворы с близкими к нейтральным значениями pH [99, 100, 102, 104, 164-168]. Таким образом, важная область применения ГФХ – разделение лабильных комплексов металлов с биолгандами. ГФХ позволяет получать информацию о молекулярных размерах молекул и оценивать молекулярную массу аналитов. Эта информация особенно важна при изучении металлоферментов [165, 169], специфического транспорта ионов металлов в организме [107, 164-166, 170, 171], а также селенопротеинов [99, 105, 130, 169]. Данный метод также может быть рекомендован в качестве вспомогательного на начальных стадиях разработки методик для получения первичной информации о распределении форм в образце. Ограничением ГФХ является относительно низкая эффективность разделения по сравнению с другими хроматографическими методами.

К числу хроматографических методов, сравнительно редко применяемых в анализе форм микроэлементов в биообъектах, относится газовая хроматография (ГХ), что связано с ограниченным числом термически устойчивых и одновременно летучих химических форм микроэлементов. Данный метод применяют, в первую очередь, при анализе экзогенных форм ртути и олова [59, 172-180], реже летучих форм селена [181]. Для определения моно-, ди-, трибутилолова, метилртути и неорганической ртути применяют капиллярные колонки с силиконовыми адсорбентами и проводят дериватизацию аналитов преимущественно тетраэтилборатом натрия в кислой среде (ацетатный буферный раствор), причем стадия дериватизации обычно совмещена с извлечением форм из образца.

Существенным дополнением, а иногда альтернативой хроматографическим методам в вещественном анализе биологических объектов в последние годы становится капиллярный электрофорез (КЭ) [182, 183]. КЭ позволяет разделять простые неорганические ионы, элементарноорганические соединения, комплексы элементов с органическими лигандами и биомолекулами. При разделении форм используют простые [87, 105, 184-190] и модифицированные кварцевые капилляры [88, 191-194]. Помимо модификации поверхности капилляра органическими полимерами (полиакриламид и др.) для изменения характеристики электроосмотического потока в ведущий электролит вводят добавки поверхностно активных веществ [184] и растворов полимеров [187, 194, 195], что позволяет улучшить разделение и расширить возможности метода. Для разделения и определения органических и неорганических форм Hg применяют буферные водно-метанольные растворы на основе борной кислоты [87, 88];

для определения форм Cr<sup>III</sup>/Cr<sup>VI</sup> [192-194] и Se<sup>IV</sup>/Se<sup>VI</sup> [184, 191] используют уксуснокислые растворы L-гистидина и фосфатные буферные растворы.

По сравнению с ВЭЖХ КЭ, как правило, обеспечивает более высокое разрешение, уменьшение объемов пробы и времени разделения [188]. При изучении распределения химических форм и метаболизма элементов в живом организме в условиях капиллярного электрофореза по сравнению с ВЭЖХ значительно проще моделировать условия, существующие в живой клетке [189]. Вместе с тем метод КЭ ограничен по чувствительности. Содержание многих форм элементов в ряде случаев оказывается ниже пределов обнаружения (ПО) наиболее чувствительных систем детектирования, что требует дополнительной стадии концентрирования аналитов перед разделением или непосредственно в разделяющем капилляре. Следует отметить, что из-за необходимости поддержания эффективного электрического контакта на краю капилляра интерфейс КЭ с системой детектирования оказывается еще более сложным, чем в случае хроматографического разделения (см. далее).

При выборе компонентов буферных растворов помимо условий сохранения естественного распределения определяемых форм принимается во внимание тип применяемого детектора. В частности, в случае наиболее широко используемых детекторов с индуктивно связанной плазмой (ИСП) недопустимо применение концентрированных фосфатных буферных систем и высоких концентраций органических растворителей в силу интерфейсных проблем, обсуждаемых ниже. Для уменьшения нагрузки на плазму разряда предпочтительно применение легкодиссоциирующих солей, таких как ацетаты, малонаты, формиаты и цитраты аммония. При проведении градиентного элюирования необходимо учитывать, что даже незначительное изменение состава подвижной фазы может значительно отразиться на флуктуациях шумового сигнала детектора и положении базовой линии [196].

#### 1.4. Методы детектирования форм микроэлементов в гибридных методах их определения

Для детектирования форм микроэлементов, присутствующих в биообъектах, применяют различные спектральные методы: атомно-абсорбционную (ААС) [43, 66, 87, 138, 159, 197-200], атомно-флуоресцентную (АФС) [63, 64, 77, 82, 128, 134, 163, 184, 201-203], атомно-эмиссионную (АЭС) спектрометрию [124, 204-206], масс-спектрометрию с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС) [207-209]. Для детектирования в газовой хроматографии используют масс-спектрометрию с ионизацией электронным ударом [173, 177, 179], ИСП-МС [175, 178], атомно-эмиссионные [59] и атомно-флуоресцентные детекторы [180].

Использование классических электрохимических и фотометрических детекторов при хроматографическом или электрофоретическом определении форм микроэлементов ограничено, так как, во-первых, они, как правило, уступают по чувствительности методам атомной и масс-спектрометрии, а во-вторых, обычно требуют предварительного перенесения всех анализируемых форм в одну перед детектированием [210]. Классические детекторы в анализе форм элементов обычно используют в качестве вспомогательных детекторов, например, фотометрические детекторы используют для оценки времен удерживания таких компонентов как селенопротеины, комплексы металлов с белками [211]. Что касается вольтамперометрических методов, то показана их применимость для отдельного определения устойчивых и лабильных форм, а также состояния окисления ионов металлов [212]. Однако ограничения чувствительности и селективности практически не позволяют их использовать при определении форм микроэлементов в реальных биологических системах [213].

Как уже было отмечено выше, наиболее перспективным и широко используемым элементоспецифичным детектором форм микроэлементов является ИСП-МС [214]. Достоинства данного метода общеизвестны: высокая чувствительность, широкий динамический диапазон, хорошая воспроизводимость результатов, применимость для детектирования форм большинства химических элементов, в том числе при их параллельном определении, возможность работать в *on-line* режиме [207, 215]. При анализе биосубстратов, в первую очередь, это относится к таким объектам, как сыворотка и плазма крови, моча, спинномозговая и амниотическая жидкости, экстракты цитозоля клеток, низкие содержания микроэлементов в которых ограничивают применение каких-либо других детекторов, метод ИСП-МС обычно не имеет альтернативы.

Вместе с тем метод ИСП-МС имеет свои ограничения. При использовании индуктивно связанной плазмы в качестве источника ионизации необходимо учитывать возможные спектральные помехи – наложение сигналов полиатомных и двухзарядных ионов, изобарные наложения [216, 217]. Эффективным способом коррекции помех полиатомных ионов в квадрупольной масс-спектрометрии является их фрагментация в результате ионно-молекулярных реакций в столкновительно-реакционных ячейках [216, 218, 219]. Оптимальное разделение ионных сигналов определяемых элементов и полиатомных ионов достигается при использовании масс-спектрометрии высокого разрешения (**ВР-ИСП-МС**) [75, 137, 151, 166, 216]. При отсутствии инструментальных возможностей устранения спектральных помех в простейших случаях применяют математические уравнения, например, измерение  $m/z = 35$  ( $^{35}\text{Cl}^+$ ),  $37$  ( $^{37}\text{Cl}^+$ ) или  $77$  ( $^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}^+$ ) при определении

As ( $m/z = 75$ ) для учета наложения  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$  [79, 90, 91, 136, 141, 147, 150, 155, 171]. Когда это возможно, определение форм элементов производят в *on-line* режиме. Это сокращает время анализа, улучшает воспроизводимость результатов, снижает риск загрязнения проб и вероятность потерь, окисления, деградации аналитов бактериями.

Основной проблемой в технике анализа форм элементов по гибридным схемам его выполнения является связывание системы разделения и детектирования. В конфигурации интерфейса важно, чтобы устройство введения пробы из хроматографической или электрофоретической системы в детектор учитывало физические и физико-химические процессы, обеспечивающие транспорт аналитов в индуктивно связанную плазму детектора. Наличие интерфейса приводит к необходимости компромисса между наилучшим разделением и оптимальными условиями детектирования. Выбор состава элюента, скорости потока подвижной фазы, системы распыления, мощности высокочастотного генератора и скорости плазмообразующего и транспортного потоков аргона является результатом поиска такого компромисса.

Одним из возможных путей решения интерфейсных проблем является перевод аналитов в газообразное состояние с использованием техники холодного пара (Hg), генерации гидридов или других легколетучих соединений. На практике это реализуется следующим образом: после разделения каждую из форм восстанавливают до гидрида и вводят в плазму разряда [125, 220-225]. Есть сообщения об использовании для перевода пробы в газообразное состояние лазерной абляции после разделения химических форм методами гель-электрофореза [226, 227] и тонкослойной хроматографии [228].

Несмотря на то, что газ является оптимальным агрегатным состоянием пробы для ИСП-источников, в большинстве случаев в плазму вводят жидкие пробы в виде тонкодисперсного аэрозоля. При этом система введения образцов в ИСП должна обеспечивать высокий выход тонкодисперсного аэрозоля и воспроизводимую доставку максимального количества аналитов в факел плазмы, а также иметь минимальный «эффект памяти». Для диспергирования проб применяют различные распылительные системы. Их конструктивные особенности подробно описаны [28, 180, 229]. В системе интерфейса необходимо учитывать возможное несоответствие оптимальной скорости потока жидкости в системе разделения и скорости, оптимальной для распыления.

Кроме того, в составе подвижных фаз для элюирования химических форм могут присутствовать высокие концентрации солей и органических растворителей. Это приводит к значительному увеличению спектральных помех полиатомных ионов, изменению температурно-ионизацион-

ных характеристик индуктивно связанного разряда, осаждению солей и углерода на плазменной горелке и конусах масс-спектрометра. Высокая концентрация органического углерода приводит к неустойчивости плазмы вплоть до ее тушения и требует повышения мощности высокочастотного поля для стабилизации разряда. Для регулирования скорости потока, а также уменьшения концентрации солей и органических растворителей применяют постколоночное разбавление [86, 142]. Уменьшения попадания в плазму разряда воды и органических растворителей добиваются охлаждением распылительной камеры. Это позволяет сконденсировать в ней часть воды и органического растворителя и тем самым уменьшить фоновую нагрузку на плазменный разряд [91, 109, 129, 151].

Интерфейс КЭ и ИСП оказывается ещё сложнее, чем в случае ВЭЖХ и ИСП, из-за очень малых скоростей потока жидкости из капилляра и необходимости поддержания эффективного электрического контакта на его конце. Скорости потока, вытекающего из капилляра, чрезвычайно малы (мкл/мин), поэтому перед подачей в ИСП, как правило, требуется смешение потока с подпитывающим буферным раствором. Это негативно отражается на чувствительности и воспроизводимости результатов анализа. Для улучшения воспроизводимости эффективным оказывается применение внутреннего стандарта [230].

Несмотря на все указанные ограничения, анализ публикаций показывает, что ИСП-МС – наиболее востребованный вариант элементоспецифичного детектирования при определении химических форм микроэлементов. На стадии методической разработки для максимального исключения наложения полиатомных ионов имеет смысл применять ВР-ИСП-МС, в первую очередь, при определении форм таких проблемных для ИСП-МС элементов как селен, мышьяк и хром.

Любые элементоспецифичные детекторы не позволяют непосредственно идентифицировать химические формы, поэтому при решении проблемы идентификации форм микроэлементов прибегают к приёмам, общим для идентификации органических аналитов. В случаях, когда идентификация по временам удерживания невозможна, дополнительно используются методы структурного анализа. Например, для идентификации часто применяют масс-спектрометрию с электроспреей ионизацией (**ЭСИ-МС**) [109, 115, 132, 143, 188, 209, 231-236]. Данный метод позволяет получить информацию о молекулярной массе соединения. Для структурной идентификации химических форм еще более информативна тандемная масс-спектрометрия с электроспреей ионизацией (**ЭСИ-МС/МС**) [83, 84, 97, 113, 164, 237-241].

Сказанное выше позволяет сделать вывод, что для решения задачи определения форм микроэлементов в биологических объектах в полном объеме

необходимо комплексное использование разных методов разделения форм (различные варианты ВЭЖХ, в первую очередь ИХ и ОФЖАХ, а также КЭ и ГХ) и различных методов детектирования (ВР и квадрупольная ИСП-МС с реакционно-стокновительными ячейками для количественного детектирования аналитов, а также ЭСИ-МС и тандемная МС для идентификации выделяемых форм).

## **2. Микроэлементы, химические формы которых в биологических объектах привлекают наибольшее внимание исследователей, и методики их определения**

Наибольшее внимание исследователей привлекает определение химических форм селена и мышьяка, а также элементов, которые иногда объединяют общим понятием «тяжёлые металлы», в первую очередь, ртути и хрома. При этом в настоящее время существует тенденция увеличения числа микроэлементов, содержание отдельных форм которых определяют в природных и биологических объектах. Это – марганец [105, 190, 242, 243], сурьма [162, 163], никель [165, 167, 243], свинец [186, 244], олово [173, 175-177, 179], алюминий [170], ванадий [29, 187, 245], галлий [246], железо [187, 242, 247, 248], кобальт [249], медь и цинк [242, 243, 250, 251], платиновые металлы [107, 185]. Большинство перечисленных здесь элементов активно вовлекаются человеком в производственную деятельность. Интерес к формам этих элементов, в первую очередь, связан с ростом внимания к экологическим проблемам.

Предметами исследования в большинстве работ являются объекты окружающей среды – воды, почвы и донные отложения, а также биологические образцы, непосредственно являющиеся продуктами питания или служащие сырьём для их производства: растения и грибы, рыба и морепродукты. На долю этих объектов приходится более двух третей от общего количества публикаций последних лет. Это, вероятно, объясняется более высокими общими содержаниями микроэлементов, а также тем, что присутствующие в них экзогенные химические формы микроэлементов, как правило, менее разнообразны и имеют более простую химическую структуру по сравнению с их формами в клинических объектах анализа. Изучению последних уделяется меньшее внимание [208]. Таких работ из общего числа публикаций по формам селена (табл. 1) и мышьяка (табл. 2) около 30 %, для ртути – около 20 %, а в случае форм хрома (табл. 3) – не более 10 %.

### **2.1. Селен**

Селен является эссенциальным элементом для животных и человека, это незаменимый нутриент. Однако если его поступление в организм

Таблица 1

Химические формы селена и методики их определения в биологических объектах

Объекты	Формы селена	Метод разделения, стационарная фаза	Детектирование	Метрологические характеристики	Ссылка
Сыворотка крови	Se <sup>IV</sup> , Se <sup>VI</sup> , SeCys, SeMet, SeEt, Se-мочевина	ИПХ: Dionex AS 11	ИСП-МС	ПО = 0.11-0.22 мкг·л <sup>-1</sup>	[133]
Кровь коров	Методика полуколичественного скрининга распределения Se, связанного с белками	ГФХ: колонка высокого разрешения Pharmacia Superdex G-75 HR 10/30	ИСП-МС со столкновительной ячейкой	÷	[169]
Молоко	SeCys, SeMet	ИХ: Hamilton PRP X-100 ОФЖАХ: C8 Altima/Alltech	ИСП-МС со столкновительной ячейкой	ПО = 3 нг·г <sup>-1</sup> для молочного порошка и 7.4 нг·г <sup>-1</sup> для свежего молока	[130]
Моча, сыворотка крови, цитозольный экстракт клеток печени	Se <sup>IV</sup> , Se <sup>VI</sup> , SeMet, SeCys, TMeSe <sup>+</sup> , MeSeCys, Se-мочевина	ОФЖАХ: Waters Shield RP18	ИСП-МС со столкновительной ячейкой	ПО = 0.1-1.5 мкг·л <sup>-1</sup> ; S <sub>r</sub> = 1.0-3.3 %	[114]
Моча	Se <sup>IV</sup> , Se <sup>VI</sup> , TMeSe <sup>+</sup> , SeMet, Se-сахара	ИХ: анионообменная Hamilton PRP-X100 Катионообменная Zorbax 300-SCX ОФЖАХ: Waters Atlantis C <sub>18</sub>	ИСП-МС, ЕСИ-МС	ПО = 0.5 мкг·л <sup>-1</sup>	[115]
Моча	DMSe и (MSe) <sub>2</sub> , Se <sup>IV</sup> , Se <sup>VI</sup> , SeMet, SeCys, селеноцистамин, TMeSe <sup>+</sup> , HMeSeO <sub>2</sub> , Se-сахара	ИХ: анионообменная Hamilton PRP-X100 Катионообменная Hamilton PRP-X200 ОФЖАХ: Waters Atlantis C <sub>18</sub> , Shodex Rspak NN-614	ИСП-МС с октопольной ячейкой (H <sub>2</sub> )	СО состава NIES CRM 18	[116]
Моча	Se <sup>IV</sup> , Se <sup>VI</sup> , MeSeCys, SeMet, а также Te <sup>IV</sup> и Te <sup>VI</sup>	ИХ: анионообменная Hamilton PRP-X100	ИСП-МС с динамической реакционной ячейкой (CH <sub>4</sub> )	ПО для Se 0.01-0.03 мкг·л <sup>-1</sup> и 0.01-0.08 мкг·л <sup>-1</sup> для Te	[140]
Моча	Se-сахара, DMSe, (MSe) <sub>2</sub>	ИХ: анионообменная Hamilton PRP-X100 ОФЖАХ: Waters Corporation Atlantis C <sub>18</sub> , ГХ для летучих форм	ИСП-МС MS и АЭС для ГХ	÷	[159]
Моча	Se <sup>IV</sup> , Se <sup>VI</sup> , SeMet, SeEt, TMeSe <sup>+</sup>	Последовательное использование ИХ и ГФХ ИХ: катионообменная Supelco Supelcosil LC-SCX ГФХ: Asahipak GS-220	ИСП-МС	СО состава	[149]
Клетки лимфоциты человека	MeSeCys, SeMet, γ-Glu-MeSeCys, DMSe и (MSe) <sub>2</sub>	ОФЖАХ: Zorbax microbore 300SB-C18 ГХ для летучих форм	ИСП-МС со столкновительной ячейкой (N <sub>2</sub> ), ЕСИ-МС/MS, (ГХ)-MS (временная)	÷	[112]
Гепатоциты крысы	Se <sup>IV</sup> , Se <sup>VI</sup> , MeSeOH, SeMet, MeSeCys	ИХ: Dionex Ionpac AS11-HC ОФЖАХ: Phenomenex Gemini C <sub>18</sub> ГФХ: BioSep S2000	ИСП-МС с реакционной ячейкой (CH <sub>4</sub> )	÷	[117]
Грудное молоко, молочные смеси	Энантиомеры SeMet	Advanced Separation Technologies Inc. 10мкм Chirobiotic T	ИСП-МС, ГГ-АФС	ПО = 0.9 мкг·л <sup>-1</sup> (ИСП-МС), 3.1-3.5 мкг·л <sup>-1</sup> (ГГ-АФС)	[203]

Примечание: «÷» - данные в публикации отсутствуют

превышает необходимый уровень, селен проявляет токсичность. Диапазон оптимального поступления селена в организм человека достаточно узкий – потребление менее 0.1 мг/кг массы тела в сутки

приводит к развитию дефицита Se, в то время как употребление свыше 1 мг/кг в сутки оказывает токсическое действие [27, 30]. Дефицит Se приводит к замедлению роста у детей, к снижению

Таблица 2

Химические формы мышьяка и методики их определения в биологических объектах

Объекты	Формы мышьяка	Метод разделения, стационарная фаза	Детектирование	Метрологические характеристики	Ссылка
Кровь, моча (СО состава)	As <sup>III</sup> , As <sup>V</sup> , MMA <sup>V</sup> , DMA <sup>V</sup> , и AsB	ИХ: анионообменная Hamilton PRP-X100	ИСП-МС с реакционной ячейкой	ПО = 0.2-0.4 мкг·л <sup>-1</sup> ; S <sub>r</sub> = 2-30 %; СО состава	[135]
Моча	As <sup>III</sup> , As <sup>V</sup> , MMA <sup>V</sup> , DMA <sup>V</sup>	ИХ: катионообменная Shodex Rspak NN-614	ИСП-МС	ПО = 0.1 мкг·л <sup>-1</sup> ; СО состава NIES SRM №. 18	[146]
Моча	As <sup>III</sup> , As <sup>V</sup> , MMA <sup>V</sup> , DMA <sup>V</sup> , MMA <sup>III</sup> , DMA <sup>III</sup> , AsB	ИХ: анионообменная IonPac AS11	ИСП-МС	ПО = 0.10-0.75 мкг·л <sup>-1</sup> ; стандартный образец состава мочи NIST SRM2670a	[141]
Моча (терапия As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	As <sup>III</sup> , MMA <sup>III</sup> , DMA <sup>III</sup> , MMA <sup>V</sup> , DMA <sup>V</sup> , As <sup>V</sup>	ИПХ: ODS-3	ИСП-МС	÷	[127]
Моча (262 пробы)	As <sup>III</sup> , As <sup>V</sup> , MMA <sup>V</sup> , DMA <sup>V</sup> , AsB, AsC	ИХ: катионо и анионообменные колонки Hamilton PRP-X100 и PRP-X200	ИСП-МС	ПО = 0.2-2 мкг·л <sup>-1</sup>	[150]
Моча (СО состава)	As <sup>III</sup> , As <sup>V</sup> , MMA <sup>V</sup> , DMA <sup>V</sup> , AsB, AsC, ТМАО, диметил-арсеноил-этанол, диметил-арсеноил-уксусная и диметиларсеноилпро-пионовая кислоты	ИХ: 2 анионообменные ICsep ION-120 и Hamilton PRP X-100 Катионообменная ChromPack Ionospher 5C	ИСП-МС	ПО от 0.04 до 0.2 мкг·л <sup>-1</sup> ; S <sub>r</sub> = 2.0-5.3 %	[147]
Моча, рыба	As <sup>III</sup> , As <sup>V</sup> , MMA <sup>V</sup> , DMA <sup>V</sup> , AsB	ИПХ: Altima C <sub>18</sub>	ИСП-МС	ПО = 44-94 нг·л <sup>-1</sup> ; S <sub>r</sub> = 2-4 %; время разделения 4 мин.	[89]
Моча, речная вода, экстракты растений	Формы As: As <sup>III</sup> , As <sup>V</sup> , MMA <sup>V</sup> , DMA <sup>V</sup> ; Se: Se <sup>IV</sup> , Se <sup>VI</sup> SeCys <sub>2</sub> , SeMet	ИПХ: ZORBAX Eclipse XDB-C <sub>18</sub>	ИСП-МС и ЕСИ-МС	ПО для форм As 19-29 нг·л <sup>-1</sup> ; Se 312-442 нг·л <sup>-1</sup> ; S <sub>r</sub> < 2 %.	[109]
Волосы	As <sup>III</sup> , As <sup>V</sup> , MMA <sup>V</sup> , DMA <sup>V</sup>	ИПХ: C <sub>18</sub> колонка	ВР-ИСП-МС	ПО = 0.01 мкг·г <sup>-1</sup>	[125]
Волосы	As <sup>III</sup> , As <sup>V</sup> , MMA <sup>III</sup> , MMA <sup>V</sup> , DMA <sup>V</sup> , DMAS	ИХ: катионообменная Supelcosil LC-SCX и анионообменная Hamilton PRP X 100	ИСП-МС	ПО = 1 мкг·л <sup>-1</sup> ; СО состава и метод добавок	[148]
Волосы, ногти	As <sup>III</sup> , As <sup>V</sup> , MMA <sup>V</sup> , DMA <sup>V</sup> , DMA <sup>III</sup>	ИХ: анионообменная Shodex Asahipak ES-502N 7C	ИСП-МС	÷	[155]
Лизат эритроцитов, печень, почки крыс	As <sup>III</sup> , As <sup>V</sup> , MMA <sup>III</sup> , MMA <sup>V</sup> , DMA <sup>V</sup> , MMAS, DMAS	ГФХ: Shodex Asahipak GS-220 HQ	ИСП-МС	ПО = 0.19-0.43 мкг·л <sup>-1</sup> ; S <sub>r</sub> = 1.8 – 4.6 %. Ст. добавки и СО состава NIST SRM-1577b	[168]
Корни растения <i>Thunbergia alata</i>	As <sup>III</sup> (фитохелатин-2) <sub>2</sub> , As <sup>III</sup> (фитохелатин-3), As <sup>III</sup> (фитохелатин-4)	ОФЖАХ: Eclipse XDB C <sub>18</sub>	ИСП-МС с ячейкой (Хе) и ВР-ИСП-МС	Доказательство нативности форм рентгеновскими методами	[231]
Рис, ногти, волосы, почва	As <sup>III</sup> , As <sup>V</sup> , MMA <sup>V</sup> , DMA <sup>V</sup> , AsB	ИХ: PRP-X100	ИСП-МС	ПО = 14-20 нг·л <sup>-1</sup> ; S <sub>r</sub> < 5 %	[91]

Примечание: «÷» - данные в публикации отсутствуют

Таблица 3

Методики определения в биологических объектах форм ртути, хрома и других тяжёлых металлов

Объекты	Формы элементов	Метод разделения, стационарная фаза	Детектирование	Метрологические характеристики	Ссылка
Клетки нервной системы человека – U373 и B103	MeHg <sup>+</sup>	GC: DB-5	АФС. Пиролиз 800°C перед детектированием	ПО = 1.6 мкг/л	[112]
Рыба, волосы	MeHg <sup>+</sup>	ОФЖАХ: Advanced Chromatography Technologies ACE 3 C18	ИСП-МС	ПО = 0.5 мкг/г	[94]
Рыба	Hg <sup>II</sup> , MeHg <sup>+</sup>	ОФЖАХ: Gemini C18	ИСП-МС	÷	[270]
Моча	Cr <sup>III</sup> , Cr <sup>VI</sup>	ОФЖАХ: Hamilton PRP-1	ИСП-МС с гексапольной реакционной ячейкой (7.28 % H <sub>2</sub> в He)	ПО = 0.03 мкг/л	[293]
Моделные растворы биологической среды организма	Комплексы <i>транс</i> -Тетрахлоробис(1H-индазол) рутената(III) с трансферрином и альбумином	КЭ: Капилляр из плавленого кварца	ИСП-МС	S <sub>r</sub> < 4 %	[185]
Ткани почек и внутреннего уха крыс	Комплексы препаратов Pt с белками	Одномерное и двумерное ортагональное разделение. ГФХ: Superdex 75 10/300 GL ИХ: Pharmacia Mono-Q H/R 5/5	ИСП-МС	÷	[107]
Сыворотка крови	Комплексы Al-цитрат, Al-трансферрин, Al-оксалат,	ИПХ: C18 колонка, покрытая 3-[(3-холамидопропил)-диметиламмоний]-1-пропилсульфат (CHAPS)	ИСП-МС, фотометрическое	Время разделения 4 мин.; S <sub>r</sub> = 3 %; ПО = 0.74 мкг/л (Al-трансферрин), 0.83 мкг/л (Al-цитрат)	[166]
Цитозоль здоровых и злокачественных клеток человека	Ni связанный с белками (7 форм)	Одномерное и двумерное разделение. ГФХ: Superdex 75 Hiload 16/60 ИХ: PRP-X100 Peek hardware	ВР-ИСП-МС (низкое разрешение)	ПО = 1 нг/л	[167]
Спинномозговая жидкость	Mn-His, Mn-фумарат, Mn-малат, Mn-оксалацетат, Mn-α-кетоглутарат, Mn-NAD <sup>+</sup> , Mn-цитрат, Mn-аденозин, неорганический Mn	КЭ (зонный) немодифицированный капилляр	ИСП-МС с реакционной ячейкой (NH <sub>3</sub> 0.56 мл/мин) или фотометрическое (200 нм)	ПО = 0.1 мкг/л	[190]
Экстракты печени	Mn-зависимые ферменты и Mn-трансферрин	Одномерное и двумерное разделение. КЭ (зонный): капилляр (длина 120 см ГФХ: TSK HW 55 F	ИСП-МС с реакционной ячейкой (NH <sub>3</sub> , 0.55 мл/мин)	÷	[105]
Сыворотка крови	Комплекс Ti <sup>IV</sup> – трансферрин	ГФХ: Superdex 200 10/300 GL	ВР-ИСП-МС (среднее разрешение) с изотопным разбавлением	÷	[168]

Примечание: «÷» - данные в публикации отсутствуют

иммунитета, дерматиту и экземам, нарушению функции печени и репродуктивной системы. Избыток Se вызывает заболевания печени и кожи, нарушения деятельности нервной системы [10, 252, 253]. В результате многочисленных исследований функций селена в организме установлено, что он является необходимым структурным компонентом множества селенопротеинов. Они выполняют различные биохимические функции: обеспечивают антиоксидантную защиту (глутатионпероксидаза, фосфолипидгидропероксидглутатионпероксидаза), участвуют в метаболизме тиреоидных гормонов, синтезе ДНК и фертильности [30]. Большой интерес к метаболизму Se в организме возник после работы Кларка и др. [254], в которой была показана противоопухолевая активность его соединений.

Источником селена для животного организма могут служить как неорганические формы ( $\text{Se}^{\text{IV}}$ ,  $\text{Se}^{\text{VI}}$ ) так и селеноаминокислоты: селеноцистеин (**SeCys**) из животной пищи и селенометионин (**SeMet**) из растительной. Селенит – наиболее токсичная неорганическая форма. В организме  $\text{Se}^{\text{IV}}$  и  $\text{Se}^{\text{VI}}$  ферментативно восстанавливаются до гидроселенид аниона  $\text{HSe}^-$ . Часть образованного  $\text{HSe}^-$  связывается с транспортными белками и направляется на высокоспецифичный синтез селенопротеинов. Избыток  $\text{HSe}^-$  подвергается метилированию с образованием диметилселенида (**DMSe**), диметилдиселенида (**MSe**)<sub>2</sub>, триметилселенионий катиона (**TMeSe<sup>+</sup>**) и выводится с мочой, потом и выдыхаемым воздухом. Возможности утилизации  $\text{HSe}^-$  организмом ограничены, поэтому при поступлении избыточных количеств селена проявляется его токсическое действие. Селеноаминокислоты и продукты их метаболизма менее токсичны, чем неорганические формы Se. Метаболический путь SeMet и SeCys в животном организме различен [255, 256]. SeCys направляется в общий пул селена, а SeMet замещает Met в белках, что обычно не приводит к значимому изменению их свойств. Количество SeMet, которое может включаться в белки без изменения их функций, сравнительно велико. С этим, вероятно, связана меньшая токсичность SeMet по сравнению с неорганическими формами. Конечными продуктами обмена селена являются летучие метилированные формы и селеносахара [30, 139, 257]. Вышеупомянутые формы не исчерпывают перечень форм селена, определяемых в биологических объектах. В самом общем случае речь может идти об определении: селенита –  $\text{Se}^{\text{IV}}$ , селената –  $\text{Se}^{\text{VI}}$ , селеноцистеина – SeCys, селеноцистина – **SeCys**<sub>2</sub>, метилселеноцистеина – **MeSeCys**, селенометионина – **SeMet**, селеноэтионина – **SeEt**, Se-мочевина, Se-цистамина,  $\gamma$ -глутамилселеноцистеина –  $\gamma$ -**Glu-MeSeCys**, диметилселенида – DMSe, диметилдиселенида – (MSe)<sub>2</sub>, триметилселенионий катиона – TMeSe<sup>+</sup>. Наибольшее внимание уделяется определению:  $\text{Se}^{\text{IV}}$ ,  $\text{Se}^{\text{VI}}$ , SeMet и SeCys/SeCys<sub>2</sub>.

Основными объектами анализа при определении форм селена являются биологически активные добавки [74, 84, 97-99, 101, 113] из-за отмеченного выше значительного различия в биодоступности и токсичности разных форм. Из тех же соображений проводится анализ содержания отдельных форм селена в продуктах питания и объектах окружающей среды (растения и грибы [70, 73, 83, 100, 131, 132, 143, 258], рыба и морепродукты [102, 103, 227], вода [184, 199, 259], почва и донные отложения [142, 191, 259]). Определения форм селена в растениях и сельскохозяйственных культурах проводят как для изучения их питательной ценности в качестве источников селена для человека, так и для исследования их биорекультивационных свойств при произрастании на загрязненных селеном почвах. Определение форм селена в моче [114-116, 139, 140, 149], сыворотке крови [114, 130, 169] и культурах клеток [112, 114, 117] проводят как с целью оценки воздействия данного элемента на организм, так и для изучения его метаболизма, в том числе противоопухолевой активности.

Сведения о методиках определения форм селена обобщены в табл. 1. Из анализа приведённых в ней работ можно отметить некоторые общие тенденции к выбору методик анализа. Предпочтительность тех или иных методов разделения форм селена проявляется следующим образом: ИХ > ОФЖАХ > КЭ > ГФХ > ИПХ. При этом многие авторы используют параллельно несколько вариантов хроматографического разделения, в первую очередь ИХ и ОФЖАХ [84, 115, 116, 130, 132, 142, 159]; а также ИХ и ГФХ [117, 149], ОФЖАХ и ГФХ [73, 99, 100, 102], ГХ [112]. Основной метод детектирования – ИСП-МС с использованием столкновительно-реакционных ячеек [70, 98, 100, 102, 112, 132, 140]. Следует учитывать, что без применения инструментальных методов коррекции спектральных помех полиатомных ионов детектирование форм селена обычно затруднительно из-за значительных интерференций со стороны плазмообразующего газа. Многообразие форм Se часто требует сочетания элементного детектирования ИСП-МС и методов идентификации форм с применением ЭСИ-МС/МС [83, 84, 97, 112, 241].

## 2.2. Мышьяк

Мышьяк относится к условно-эссенциальным, иммунотоксичным элементам. Хроническое воздействие мышьяка (арсенизм) приводит к гиперкератозу, онкологическим заболеваниям кожи, легких, печени и мочевого пузыря [260]. Воздействие мышьяка угрожает здоровью населения в ряде регионов мира [141], например, большая часть населения Бангладеш и Западной Бенгалии страдает от хронического отравления мышьяком [155].

Основными химическими формами As в почвах и природных водах являются неорганические соединения As<sup>III</sup> и As<sup>V</sup> [261]. В организме животных

и человека формы As более разнообразны из-за активной биотрансформации неорганических форм [262]. Соединения As<sup>III</sup> подавляют энергетический клеточный обмен, ингибируют ксантинооксидазу и другие молибденсодержащие ферменты. Этим обусловлена нефротоксичность As<sup>III</sup>. Соединения As<sup>V</sup> менее токсичны, чем соединения As<sup>III</sup>. Однако биохимические нарушения, вызываемые арсенатами, более многочисленны. Арсенаты являются аналогами фосфатов, влияют на процессы гликолиза, окислительного фосфорилирования и, при соизмеримых количествах, способны замещать фосфаты в гидроксиапатите костной ткани [3]. В животных клетках и клетках микроорганизмов происходит метилирование неорганических форм As. Органические соединения As менее токсичны по сравнению с растворимыми неорганическими формами, их выведение происходит в 2-2.5 раза быстрее, поэтому в организме животных метилирование – основной механизм детоксикации As. Источником электронов служит глутатион, метильных групп – S-аденозилметионин.

С учётом многообразия химических превращений мышьяка в живых организмах в число его форм, определяемых в биологических объектах входят: арсенит – As<sup>III</sup>, арсенат – As<sup>V</sup>, монометилмышьяковая – MMA<sup>V</sup>, диметилмышьяковая – DMA<sup>V</sup>, монометилмышьяковистая – MMA<sup>III</sup> диметилмышьяковистая – DMA<sup>III</sup> кислоты, триметиларсиноксид – TMAO, тетраметиларсоний катион – TMA<sup>+</sup>, арсенобетаин – AsB, арсенохолин – AsC, и тиопроизводные MMA<sup>V</sup> и DMA<sup>V</sup> – монометилтиомышьяковая – MMAS и диметилтиомышьяковая – DMAS кислоты, As-сахара. Объекты исследования, определяемые в них формы мышьяка и методики анализа обобщены в табл. 2.

Значительно шире перечень работ, посвящённых определению форм мышьяка в объектах окружающей среды и пищевом сырье: вода [64, 119, 128, 134, 138, 152, 156, 157, 159, 220, 263], почвы [43, 64, 72, 156, 158, 160, 225], рыба и морепродукты [75-78, 82, 89-93, 136, 223], сельскохозяйственные культуры и растения [43, 69, 79, 91, 129, 137, 154, 235]. Среди последних работ наиболее важная и часто решаемая задача – определение форм мышьяка в объектах водной экосистемы: в воде, донных отложениях и биоте. Это связано с высокой способностью этого элемента к биоаккумуляции в трофических цепях. Анализ клинических образцов (моча [89, 124, 131, 146, 147, 150, 224], кровь [135, 168], ткани [168], волосы [121, 141, 157]) в основном ограничивается оценкой уровня вредного воздействия мышьяка, в первую очередь на производствах и в эндемических районах. Как и в случае селена, предпочтительным методом разделения форм является ИХ. Соизмеримое внимание уделяется ИПХ, реже ГФХ и ОФЖАХ. Как и в случае селена для определения мышьяка методом ИСП-МС характерны наложения полиатомных ионов, поэтому

для детектирования также обычно используют ИСП-МС со реакционно-столкновительными ячейками [65, 154, 158, 235], с приставками для генерации гидрида (ГГ) As [125, 220, 222, 223], а также спектрометры высокого разрешения (ВР-ИСП-МС) [75, 137, 151, 235]. Иногда для определения форм As применяют ГГ-АФС [64, 77, 82, 128, 134, 264] и ГГ-ААС [43, 109, 138].

### 2.3. Тяжёлые металлы

Из числа тяжёлых металлов с различными формами нахождения в биологических объектах наибольшее внимание привлекли ртуть и хром. Ртуть – токсичный элемент для человека и животных, жизненно-важных функций для этого элемента не обнаружено [265]. Воздействие Hg приводит к поражению центральной нервной системы, почек, пищеварительного тракта и кожи [10]. Соединения ртути – тератогены, вызывающие аномалии развития нервной системы у плода и у детей. Высокое сродство Hg к –SH группам, а также карбоксильным, амидным, аминным и фосфорилильным группам биомолекул являются одной из причин ее высокой токсичности. Нейротоксичность соединений ртути связывают также с индукцией окислительного стресса в результате образования активных форм кислорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO), повреждающих клеточные мембраны [266]. В отличие от ртути хром – жизненно необходимый микроэлемент. Он участвует в регуляции синтеза липидов и обмена углеводов, входит в состав низкомолекулярного органического комплекса – фактора толерантности к глюкозе, который вместе с инсулином регулирует уровень глюкозы в крови. Синдром нарушения толерантности к глюкозе сопутствует сахарному диабету и проявляется гипергликемией и глюкозурией на фоне дефицита Cr. Помимо снижения толерантности к глюкозе дефицит Cr угрожает развитием ишемической болезни сердца, сахарного диабета и атеросклероза. При избыточном поступлении Cr вызывает заболевания кожи, возможно развитие бронхиальной астмы и невротических расстройств [14].

Для обоих элементов характерно многообразие неорганических и металлоорганических форм с различными уровнями токсичности. Окислительно-восстановительные процессы с участием Hg определяют характер распределения и особенности действия этого элемента в организме. С токсикологической точки зрения важны следующие формы ртути: элементарная ртуть (Hg<sup>0</sup>), неорганические соединения Hg (Hg<sup>II</sup>) и органические формы (метилртуть MeHg<sup>+</sup>, этилртуть EtHg<sup>+</sup>, фенилртуть PhHg<sup>+</sup>). Определяемые органические и неорганические формы ртути, по сути, являются только фрагментами тех истинных эндогенных форм ртути, которые присутствуют в организме [12].

После вдыхания паров элементарная ртуть легко абсорбируется в легких через альвеолярные

мембраны и транспортируется кровью в мозг и другие ткани.  $\text{Hg}^0$  легко проникает через гематоэнцефалический барьер [14]. В организме  $\text{Hg}^0$  окисляется до  $\text{Hg}^{\text{II}}$  с участием каталазной ферментной системы. Основными мишенями  $\text{Hg}^{\text{II}}$  являются почечные канальцы, что при хроническом воздействии вызывает развитие почечной недостаточности, а при остром отравлении – уремию из-за обширного токсического некроза почечных канальцев. В отличие от  $\text{Hg}^0$ ,  $\text{Hg}^{\text{II}}$  практически не проникает через гематоэнцефалический барьер [267], поэтому ее воздействие на центральную нервную систему менее выражено. Ртутьорганические соединения более токсичны, чем  $\text{Hg}^{\text{II}}$ . Они легко связываются с липидами и поэтому легко преодолевают гематоэнцефалический и плацентарный барьеры.  $\text{MeHg}^+$  – самая распространенная органическая форма  $\text{Hg}$  [15]. Она образуется в результате ферментативного метилирования неорганических форм ( $\text{Hg}^{\text{II}}$ ) в бактериальных и некоторых животных клетках.  $\text{MeHg}^+$  нейротоксична, поражает зоны головного мозга, ответственные за координацию движения, чувства равновесия и восприятие [14], а также за память и интеллект. При отравлении  $\text{EtHg}^+$  нарушений интеллекта не выявлено, хотя в острой фазе отмечается замедленная речь и атаксия.  $\text{PhHg}^+$  значительно менее токсична, чем  $\text{MeHg}^+$  и  $\text{EtHg}^+$  в силу активной метаболизации в печени. Клиническая картина отравления  $\text{PhHg}^+$  подобна действию  $\text{Hg}^{\text{II}}$  (нефротический синдром, почечная недостаточность).

При формировании состава индивидуальных форм хрома столь же значимы окислительно-восстановительные процессы. Ионы  $\text{Cr}^{\text{III}}$  не способны проникать через клеточные мембраны [3, 14] и, следовательно, их токсичность невелика.  $\text{Cr}^{\text{VI}}$  легко проникает через мембраны, неспецифически связывается с белками и нуклеопротеидами. Окислительные свойства  $\text{Cr}^{\text{VI}}$  обуславливают его генотоксические и канцерогенные свойства. Внутриклеточное восстановление  $\text{Cr}^{\text{VI}}$  до  $\text{Cr}^{\text{III}}$  индуцирует свободнорадикальные процессы в митохондриях, вызывающих тяжелое поражение почечных канальцев и гепатоцитов [14]. Соединения  $\text{Cr}^{\text{VI}}$  чрезвычайно токсичны для человека [16] и являются канцерогенами I класса опасности [10].

Подобно селену и мышьяку разработка методик определения форм тяжелых металлов преимущественно ориентирована на объекты окружающей среды. Так, например, формы  $\text{Hg}$  определяют, в первую очередь, в природных объектах водной экосистемы (вода, донные отложения, биота) [60, 85-88, 94, 95, 110, 111, 118, 120, 268-271] из-за выраженной биоаккумуляции  $\text{Hg}$  в трофических цепях морских организмов [270, 272]. Определение  $\text{Cr}^{\text{III}}$  /  $\text{Cr}^{\text{VI}}$  также преимущественно проводят в воде различной природы [124, 144, 192-194, 273, 274].

Общей с селеном и мышьяком является и методология определения химических форм тя-

желых металлов. Для разделения химических форм  $\text{Hg}$  в основном применяют ОФЖАХ [94, 95, 110, 111, 118, 120-122, 270, 275], при этом часто для увеличения стабильности и гидрофобности этих форм в подвижную фазу вводят тиолсодержащие лиганды [94, 95, 110, 111, 120-123]. В случае хрома дополнительно используют ИХ [144, 145, 276] и КЭ [187-190]. Отличия в случае ртути проявляются в использовании ГХ [176, 177, 268, 277-282]. В свою очередь, для хрома значительное число публикаций посвящено нехроматографическим способам разделения форм, таким как экстракция [66, 283-287], сорбция [288, 289], ионный обмен [290, 291], удаление одной из форм отгонкой [292].

Сведения из сравнительно небольшого числа публикаций, посвященных определению форм ртути, хрома и других тяжелых металлов в биологических объектах обобщены в табл. 3. Помимо ртути и хрома в литературе можно найти отрывочные сведения о формах некоторых других микроэлементов. Например, сведения о формах  $\text{Al}$ ,  $\text{Pb}$ ,  $\text{Mn}$  и их способности проникать через гематоэнцефалический барьер [12, 166, 190], о распределении  $\text{Ni}$  по молекулярным массам цитозольных белков здоровых и злокачественных клеток человека [165]. В связи с проблемами авитаминоза интересна работа по определению различных форм витамина  $\text{B}_{12}$  [249], обладающих различной биодоступностью. Определение химических форм элементов платиновой группы проводят при разработке и изучении действия противоопухолевых препаратов на их основе [107, 181].

## Заключение

Рассмотрение работ в области вещественного анализа, относящихся к проблеме определения химических форм микроэлементов в биологических объектах позволяет отметить существенный прогресс в общей методологии анализа столь сложных объектов как биологические среды, достигнутый за счет развития гибридных схем анализа, основанных на сочетании хроматографических и электрофоретических методов разделения и элементоспецифичного детектирования. Достигнутый прогресс важен для дальнейшего развития металломики в интересах экологии, медицины, биохимии и токсикологии. Дальнейшее развитие рассматриваемого направления в значительной степени зависит от интереса к новым методам вещественного анализа со стороны не только экологов, но и других заинтересованных в этих методах специалистов: токсикологов, профпатологов и биохимиков, чтобы инициировать работы химиков-аналитиков в этом направлении.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Haraguchi H. Metallomics as integrated biometal science // J. Anal. At Spectrom. 2004. V. 19. P. 5-14.

2. RuiGuang G.E., HongZhe S. Metallomics: An integrated biometal science // *Sci. China Ser. B*. 2009. V. 52. P. 2055-2070.
3. Токсикологическая химия / [Под ред. Т.В. Плетеневой]. М.: Издательская группа «ГЕОТАР-Медиа», 2008. 512 с.
4. Szpunar J. Metallomics: a new frontier in analytical chemistry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 378. P. 54-56.
5. Guidelines for terms related to chemical speciation and fraction of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches. (IUPAC Recommendations 2000) / D.M. Templeton et [al.] // *Pure Appl. Chem.* 2000. V. 72. P. 1453-1470.
6. Szpunar J. Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques // *Analyst.* 2000. V. 125. P. 963-988.
7. Kot A., Namiesneik J. The role of speciation in analytical chemistry // *Trend. Anal. Chem.* V. 2000. V. 19. P. 69-79.
8. Скальный А.В., Вятчанина Е.С. Перспективы применения анализа химических форм элементов («speciation analysis») в биологии и медицине // *Клинико-лабораторный консилиум*. 2008. Т. 22. С. 26-32.
9. Element speciation analysis of petroleum and related materials / G. Caumette et [al.] // *J. Anal. At. Spectrom.* 2009. V. 24. P. 263-276.
10. Токсикологическая химия. Метаболизм и анализ токсикантов / [Под ред. Н.И. Калетиной]. М.: Издательская группа «ГЕОТАР-Медиа», 2008. 1016 с.
11. Ouyornkochagorn S., Feldmann J. Dermal uptake of arsenic through human skin depends strongly on its speciation // *Environ. Sci. Technol.* 2010. V. 44. P. 3972-3978.
12. Michalke B., Halbach S., Nischwitz V. JEM spotlight: metal speciation related to neurotoxicity in humans // *J. Environ. Monit.* 2009. V. 11. P. 939-954.
13. Michalke B., Halbach S., Nischwitz V. Speciation and toxicological relevance of manganese in humans // *J. Environ. Monit.* 2007. V. 9. P. 650-656.
14. Ellenhorn M.J. *Medical Toxicology Diagnosis and Treatment of Human Poisoning* / 2nd ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997. 2047 p.
15. Mercury speciation by CE: a review / P. Kubán et [al.] // *Electrophoresis.* 2007. V. 28. P. 58-68.
16. Gomez V., Callao M.P. Chromium determination and speciation since 2000 // *Trend. Anal. Chem.* 2006. V. 25. P. 1006-1015.
17. Szpunar J., Łobinski R., Prange A. Hyphenated Techniques for Elemental Speciation in Biological Systems // *Appl. Spectrosc.* 2003. V. 57 P. 102A-112A.
18. Calibration in analytical chemistry and use of certified reference materials. ISO Guide 32, 1997. 8 p.
19. Uses of certified reference materials. ISO Guide 33, 2000. 23 p.
20. Parsons P.J., Barbosa F.Jr. Atomic spectrometry and trends in clinical laboratory medicine // *Spectrochim. Acta. Part B*. 2007. V. 62. P. 992-1003.
21. Trends in certified reference materials for the speciation of trace elements / R. Cornelis et [al.] // *Fresenius. J. Anal. Chem.* 2001. V. 370. P. 120-125.
22. Wang S., Mulligan C.N. Speciation and surface structure of inorganic arsenic in solid phases — A review // *Environ. International.* 2008. V. 34. P. 867-879.
23. Methods of speciation of metals in soils / J.J. D'Amore et [al.] // *J. Environ. Qual.* 2005, V. 34. P. 1707-1745.
24. Liquid membranes for quantification and speciation of trace metals in natural waters / J.A. Lopez-Lopez et [al.] // *Trend. Anal. Chem.* 2010. V. 29. P. 645-653.
25. Kumar A.R., Riyazuddin P. Non-chromatographic hydride generation atomic spectrometric techniques for the speciation analysis of arsenic, antimony, selenium, and tellurium in water samples - a review // *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 2007. V. 87. P. 469-500.
26. Non-chromatographic atomic spectrometric methods in speciation analysis. A review / M.A. Vieira et [al.] // *Spectrochim. Acta. Part B*. 2009. V. 64. P. 459-476.
27. B'Hymer C., Caruso J.A. Selenium speciation analysis using inductively coupled plasma-mass spectrometry // *J. Chromatogr. A*. 2006. V. 1114. P. 1-20.
28. Alvarez-Llamas G., de laCampa M., Sanz-Medel A. ICP-MS for specific detection in capillary electrophoresis // *Trend. Anal. Chem.* 2005. V. 24. P. 28-36.
29. Liang Chen Z., Owens G. Trends in speciation analysis of vanadium in environmental samples and biological fluids — A review // *Anal. Chim. Acta.* 2008. V. 607. P. 1-14.
30. Ogra Y., Anan Y. Selenometabolomics: Identification of selenometabolites and specification of their biological significance by complementary use of elemental and molecular mass spectrometry // *J. Anal. At. Spectrom.* 2009. V. 24. P. 1477-1488.
31. Zhang L., Wright L.P., Blanchard P. A review of current knowledge concerning dry deposition or atmospheric mercury // *Atmos. Environ.* 2009. V. 43. P. 5853-5864.
32. *Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology* / R. Cornelis et [al.]. John Wiley and Sons, 2003. 670 p.
33. *Handbook of elemental speciation II: species in the environment, food, medicine & occupational health* / R. Cornelis et [al.]. John Wiley and Sons, 2005. 788 p.
34. Szpunar J., Łobinski R. Hyphenated techniques in speciation analysis. Royal Society of Chemistry, 2003. 220 p.

35. Применение гетерополисоединений для определения химических форм мышьяка в природных водах / Кошчева О.С. и [др.] // Химия в интересах устойчивого развития. 2005. Т. 13. С. 469-477.
36. Koshcheeva O.S., Shuvaeva O.V., Kuznetzova L.I. Arsenic speciation in natural and contaminated waters using CZE with in situ derivatization by molybdate and direct UV-detection // *Electrophoresis*. 2009. V. 30. P. 1088-1093.
37. Shuvaeva O.V., Koshcheeva O.S., Beisel N.F. Arsenic Speciation in Water by High-Performance Liquid Chromatography with Electrothermal Atomic Absorption Detection // *J. Anal. Chem.* 2002. V. 57. P. 1037-1041.
38. Separation of Arsenic and Selenium Species by Capillary Zone Electrophoresis in a Coated Capillary / N.G. Vanifatova et [al.] // *J. AOAC Int.* 1999. V. 82. P. 1587-1593.
39. Прокофьев А.К. Определение физико-химических и химических форм следовых элементов в природных водах // *Успехи химии*. 1983. Т. 52. С. 483-498.
40. Shuvaeva O.V., Gustaytis M.A., Anoshin G.N. Mercury speciation in environmental solid samples using thermal release technique with atomic absorption detection // *Anal. Chim. Acta.* 2008. V. 621. P. 148-154.
41. Bankmann D., Giernoth R. Magnetic resonance spectroscopy in ionic liquids // *Prog. Nucl. Mag. Res. Sp.* 2007. V. 51. P. 63-89.
42. Elzinga E.J., Cirno A. Application of sequential extractions and X-ray absorption spectroscopy to determine the speciation of chromium in Northern New Jersey marsh soils developed in chromite ore processing residue (COPR) // *J. Hazard. Mater.* 2010. V. 183. P. 145-154.
43. Extraction and speciation of arsenic in plants grown on arsenic contaminated soils / K.A. Mir et [al.] // *Talanta*. 2007. V. 2. P. 1507-1518.
44. Bacquart T., Deves G., Ortega R. Direct speciation analysis of arsenic in sub-cellular compartments using micro-X-ray absorption spectroscopy // *Environ. Res.* 2010. V. 110. P. 413-416.
45. Stachowicz M., Hiemstra T., Riemsdijk W.H. van. Surface speciation of As(III) en As(V) in relation to charge distribution // *J. Colloid. Interf. Sci.* 2006. V. 302. P. 62-75.
46. Characterization of dugong liver ferritin / I.H.A. Rahman et [al.] // *Anal. Chim. Acta.* 1999. V. 393. P. 235-243.
47. Золотов Ю.А. Гибридные методы анализа // *Ж. аналит. химии*. 1977. Т. 32. С. 2085-2086.
48. Assessment of bioavailable arsenic and copper in soils and sediments from the Antofagasta region of northern Chile / H.C. Flynn et [al.] // *Sci. Total Environ.* 2002. V. 286. P. 51-59.
49. Sole S., Alegret S. Environmental toxicity monitoring using electrochemical bio-sensing systems // *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2001. V. 8. P. 256-264.
50. Aller A.J., Castro M.A. Live bacterial cells as analytical tools for speciation analysis: Hypothetical or practical? // *Trend. Anal. Chem.* 2006. V. 25. P. 887-898.
51. Barrocas P.R.G., Landing W.M., Hudson R.J.M. Assessment of mercury(II) bioavailability using a bioluminescent bacterial biosensor: Practical and theoretical challenges // *J. Environ. Sci.* 2010. V. 22. P. 1137-1143.
52. Copper dynamics and impact on microbial communities in soils of variable organic status / D.P.H. Lejon et [al.] // *Environ. Sci. Technol.* 2008. V. 42. P. 2819-2825.
53. Differential bioavailability of copper complexes to bioluminescent pseudomonas fluorescens reporter strains / O. Nybroe et [al.] // *Environ. Toxicol. Chem.* 2008. V. 27. P. 2246-2252.
54. Peltier E., Lelie D. van der., Sparks D.L. Formation and stability of Ni-Al hydroxide phases in soils // *Environ. Sci. Technol.* 2010. V. 44. P. 302-308.
55. Maderova L., Watson M., Paton G.I. Bioavailability and toxicity of copper in soils: Integrating chemical approaches with responses of microbial biosensors // *Soil Biol. Biochem.* 2011. V. 43. P. 1162-1168.
56. Lead and Cu in contaminated urban soils: Extraction with chemical reagents and bioluminescent bacteria and yeast / P. Peltola et [al.] // *Sci. Total Environ.* 2005. V. 350. P. 194-203.
57. Van Loon J.C. Metal Speciation by Chromatography / Atomic Spectrometry // *Anal. Chem.* 1979. V. 51. P. 1139A-1150A.
58. 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.
59. Organotin speciation in Bizerte lagoon (Tunisia) / N. Mzoughi et [al.] // *Sci. Total Environ.* 2005. V. 349. P. 211-349.
60. Mercury(II) and methyl mercury determinations in water and fish samples by using solid phase extraction and cold vapour atomic absorption spectrometry combination / M. Tuzen et [al.] // *Food Chem. Toxicol.* 2009. V. 47. P. 1648-1652.
61. Wright M.T., Parker D.R., Amrhein C. Critical evaluation of ability of sequential extraction procedures to quantify of ability of selenium in sediments and soils // *Environ. Sci. Technol.* 2003. V. 37. P. 4709-4716.
62. Smith E., Smith J., Naidu R. Distribution and nature of arsenic along former railway corridors of South Australia. // *Sci. Total Environ.* 2006. V. 363. P. 175-182.

63. Arsenic extraction in marine biological materials using pressurized liquid extraction / M.J. Mato-Fernandez et [al.] // *Talanta*. 2007. V. 71. P. 515-520.
64. Evaluation of extraction methods for arsenic speciation in polluted soil and rotten ore by HPLC-HG-AFS analysis / C.-G. Yuan et [al.] // *Microchim. Acta*. 2007. V. 159. P. 175-182.
65. Arsenic contamination of natural waters in San Juan and La Pampa, Argentina / J. O'Reilly et [al.] // *Environ. Geochem. Health*. 2010. V. 32. P. 491-515.
66. Speciation of chromium in mineral waters and salines by solid-phase extraction and graphite furnace atomic absorption spectrometry / J. Chwastowska et [al.] // *Talanta*. 2005. V. 66. P. 1345-1349.
67. Speciation of Mercury in Crude Oil Using Speciated Isotope Dilution Mass Spectrometry / C.M.M. Rahman et [al.] // *Spectroscopy*. 2010. V. 25. P. 36-45.
68. Simultaneous speciation of inorganic selenium and tellurium by inductively coupled plasma mass spectrometry following selective solid-phase extraction separation / C. Yu et [al.] // *J. Anal. At. Spectrom.* 2004. V. 19. P. 410-413.
69. Arsenic in Rice: II. Arsenic Speciation in USA Grain and Implications for Human Health / Y.J. Zavala et [al.] // *Environ. Sci. Technol.* 2008. V. 42. P. 3861-3866.
70. Kapolna E., Fodor P. Speciation analysis of selenium enriched green onions (*Allium fistulosum*) by HPLC-ICP-MS // *Microchem. J.* 2006. V. 84. P. 56-62.
71. Raab A., Feldmann J. Arsenic speciation in hair extracts // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. V. 381. P. 332-338.
72. Coupling Speciation and Isotope Dilution Techniques To Study Arsenic Mobilization in the Environment / R.E. Hamon et [al.] // *Environ. Sci. Technol.* 2004. V. 38. P. 1794-1798.
73. Huerta V.D., Fernández Sánchez M.L., Sanz-Medel A. An attempt to differentiate HPLC-ICP-MS selenium speciation in natural and selenised *Agaricus* mushrooms using different species extraction procedures // *Anal. Bioanal. Chem.* 2006. V. 384. P. 902-907.
74. Zheng J., Shibata Y., Furuta N. Determination of selenoamino acids using two-dimensional ion-pair reversed phase chromatography with on-line detection by inductively coupled plasma mass spectrometry // *Talanta*. 2003. V. 59. P. 27-36.
75. Zheng J., Hintelmann H. Hyphenation of high performance liquid chromatography with sector field inductively coupled plasma mass spectrometry for the determination of ultra-trace level anionic and cationic arsenic compounds in freshwater fish // *J. Anal. At. Spectrom.* 2004. V. 19. P. 191-195.
76. Karthikeyan S., Hirata S. Ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry determination of arsenic species in marine samples // *Appl. Organometal. Chem.* 2004. V. 18. P. 323-330.
77. Šlejkovec Z., Bajc Z., Doganoc D.Z. Arsenic speciation patterns in freshwater fish // *Talanta*. 2004. V. 62. P. 931-936.
78. Determination of Arsenic Species in Fish Oil After Acid Digestion / U. Kohlmeyer et [al.] // *Microchim. Acta*. 2005. V. 151. P. 249-255.
79. Arsenic speciation in plants growing in arsenic-contaminated sites / M.J. Ruiz-Chancho et [al.] // *Chemosphere*. 2008. V. 71. P. 1522-1530.
80. Determination of seven arsenic species in seafood by ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma-mass spectrometry following microwave assisted extraction: method validation and occurrence data / A. Leufroy et [al.] // *Talanta*. 2011. V. 83. P. 770-779.
81. Arsenic Species Determination in Biological Tissues by HPLC-ICP-MS and HPLC-HG-ICP-MS / J. Kirby et [al.] // *Aust. J. Chem.* 2004. V. 57. P. 957-966.
82. Speciation analysis of organoarsenical compounds in biological matrices by coupling ion chromatography to atomic fluorescence spectrometry with on-line photooxidation and hydride generation / S. Simona et [al.] // *Anal. Chim. Acta*. 2004. V. 521. P. 99-108.
83. Capabilities of mixed-mode liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry for the simultaneous speciation analysis of inorganic and organically-bound selenium / E. Peachey et [al.] // *J. Chromatogr. A*. 2009. V. 1216. P. 7001-7006.
84. Selenium speciation analysis of selenium-enriched supplements by HPLC with ultrasonic nebulisation ICP-MS and electrospray MS/MS detection / H.G. Infante et [al.] // *J. Anal. At. Spectrom.* 2004. V. 19. P. 1529-1538.
85. Shade C.W., Hudson R.J. Determination of MeHg in Environmental Sample Matrices Using Hg-Thiourea Complex Ion Chromatography with On-line Cold Vapor Generation and Atomic Fluorescence Spectrometric Detection // *Environ. Sci. Technol.* 2005. V. 39. P. 4974-4982.
86. Speciation analysis of mercury in seafood by using high-performance liquid chromatography on-line coupled with cold-vapor atomic fluorescence spectrometry via a post column microwave digestion / L.-N. Liang et [al.] // *Anal. Chim. Acta*. 2003. V. 477. P. 131-137.
87. Cold vapor generation interface for mercury speciation coupling capillary electrophoresis with electrothermal quartz tube furnace atomic absorption spectrometry: Determination of mercury and methylmercury / B. Deng et [al.] // *Talanta*. 2009. V. 79. P. 1265-1269.
88. Speciation of mercury by hydrostatically modified electroosmotic flow capillary electrophoresis coupled with volatile species

- generation atomic fluorescence spectrometry / X.-P. Yan et [al.] // *Anal. Chem.* 2003. V. 75. P. 1726-1732.
89. Determination of As(III), As(V), monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid and arsenobetaine by HPLC-ICP-MS: analysis of reference materials, fish tissues and urine. / K. Wrobel et [al.] // *Talanta.* 2002. V. 58. P. 899-907.
90. Hirata S., Toshimitsu H. Determination of arsenic species and arsenosugars in marine samples by HPLC-ICP-MS // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. V. 383. P. 454-460.
91. Arsenic speciation in rice, straw, soil, hair and nails samples from the arsenic-affected areas of Middle and Lower Ganga plain / E. Sanz et [al.] // *J. Environ. Sci. Heal. A.* 2007. V. 42. P. 1695-1705.
92. Hirata S., Toshimitsu H., Aihara M. Determination of Arsenic Species in Marine Samples by HPLC-ICP-MS // *Anal. Sci.* 2006. V. 22. P. 39-43.
93. Karthikeyan S., Hirata S., Iyer C.S.P. Determination of Arsenic species by Microwave-assisted extraction followed by Ion-pair chromatography-ICPMS: Analysis of reference materials and fish tissues // *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 2004. V. 84. P. 573-582.
94. The determination of methylmercury in biological samples by HPLC coupled to ICP-MS detection / D.S. Vidler et [al.] // *Appl. Organometal. Chem.* 2007. V. 21. P. 303-310.
95. Total mercury and mercury species in birds and fish in an aquatic ecosystem in the Czech Republic. / P. Houserova et [al.] // *Environ. Pollut.* 2007. V. 145. P. 185-194.
96. 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.L.G. Mar et [al.] // *J. Agric. Food Chem.* 2009. V. 57. P. 3005-3013.
97. Dumont E., Vanhaecke F., Cornelis R. Hyphenated techniques for speciation of Se in in vitro gastrointestinal digests of *Saccharomyces cerevisiae* // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 379. P. 504-511.
98. Total determination and quantitative speciation analysis of selenium in yeast and wheat flour by isotope dilution analysis ICP-MS / V.D. Huerta et [al.] // *J. Anal. At. Spectrom.* 2003. V. 18. P. 1243-1247.
99. Evaluation of the Inorganic Selenium Biotransformation in Selenium-Enriched Yogurt by HPLC-ICP-MS / A. Alzate et [al.] // *J. Agric. Food Chem.* 2007. V. 55. P. 9776-9783.
100. Selenium speciation in *Agaricus bisporus* and *Lentinula edodes* mushroom proteins using multi-dimensional chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry / V. Gergely et [al.] // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1101. P. 94-102.
101. Amoako P.O., Uden P.C., Tyson J.F. Speciation of selenium dietary supplements; formation of S-(methylseleno)cysteine and other selenium compounds // *Anal. Chim. Acta.* 2009. V. 652. P. 315-323.
102. Huerta V.D., Sanchez M.L.F., Sanz-Medel A. Quantitative selenium speciation in cod muscle by isotope dilution ICP-MS with a reaction cell: comparison of different reported extraction procedures // *J. Anal. At. Spectrom.* 2004. V. 19. P. 644-648.
103. Stability of total selenium and selenium species in lyophilised oysters and in their enzymatic extracts / P. Moreno et [al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* 2002. V. 374. P. 466-476.
104. Cabanero A.I., Madrid Y., Camara C. Study of mercury-selenium interaction in chicken liver by size exclusion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry // *J. Anal. At. Spectrom.* 2005. V. 20. P. 847-855.
105. Analysis of size characterized manganese species from liver extracts using capillary zone electrophoresis coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (CZE-ICP-MS) / M. Quintana et [al.] // *Anal. Chim. Acta.* 2006. V. 573-574. P. 172-180.
106. Speciation of seleno compounds in yeast aqueous extracts by three-dimensional liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric and electrospray mass spectrometric detection. / S. McSheehy et [al.] // *Analyst.* 2002. V. 127. P. 223-229.
107. Speciation analysis of platinum antitumoral drugs in impacted tissues / D. Esteban-Fernandez et [al.] // *Talanta.* 2007. V. 72. P. 768-773.
108. Analysis of selenized yeast for selenium speciation by size-exclusion chromatography and capillary zone electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometric detection (SEC-CZE-ICP-MS) / S. Mounicou et [al.] // *J. Anal. At. Spectrom.* 2002. V. 17. P. 15-20.
109. Simultaneous characterization of selenium and arsenic analytes via ion-pairing reversed phase chromatography with inductively coupled plasma and electrospray ionization ion trap mass spectrometry for detection Applications to river water, plant extract and urine matrices / S. Afton et [al.] // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1208. P. 156-163.
110. Determination of organic and inorganic mercury species in water and sediment samples by HPLC on-line coupled with ICP-MS / J.S. dos Santos et [al.] // *Talanta.* 2009. V. 80. P. 207-211.
111. Castillo A., Roig-Navarro A.F., Pozo O.J. Method optimization for the determination of four mercury species by micro-liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry coupling in environmental water samples // *Anal. Chim. Acta.* 2006. V. 577. P. 18-25.
112. Investigation of the selenium species distribution in a human B-cell lymphoma line by HPLC- and GC-ICP-MS in combination with HPLC-ESIMS/MS and GC-TOFMS after incubation with

- methylseleninic acid / H.G. Infante et [al.] // *J. Anal. At. Spectrom.* 2007. V. 22. P. 888-896.
113. Speciation of selenium in diet supplements by HPLC-MS/MS methods / F. Gosetti et [al.] // *Food Chem.* 2007. V. 105. P. 1738-1747.
114. Selenium Speciation in Biological Samples Using a Hyphenated Technique of High-performance Liquid Chromatography and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry / Y. Hongwei et [al.] // *Chinese J. Anal. Chem.* 2006. V. 34. P. 749-753.
115. Selenium metabolites in human urine after ingestion of selenite, L-selenomethionine, or DL-selenomethionine: a quantitative case study by HPLC/ICPMS. / D. Kuehnelt et [al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. V. 383. P. 235-246.
116. Juresa D., Kuehnelt D., Francesconi K.A. Consequences of Vapor Enhancement on Selenium Speciation Analysis by HPLC/ICPMS // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. P. 8569-8574.
117. Gabel-Jensen C., Gammelgaard B. Selenium metabolism in hepatocytes incubated with selenite, selenate, selenomethionine, Se-methylselenocysteine and methylseleninic acid and analysed by LC-ICP-MS // *J. Anal. At. Spectrom.* 2010. V. 25. P. 414-418.
118. Yu L.-P. Cloud Point Extraction Preconcentration Prior to High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Cold Vapor Generation Atomic Fluorescence Spectrometry for Speciation Analysis of Mercury in Fish Samples // *J. Agric. Food Chem.* 2005. V. 53. P. 9656-9662.
119. Shi Y., Acharya R., Chatt A. Speciation of arsenic in natural waters by HPLC-NAA // *J. Radioanal. Nucl. Ch.* 2004. V. 262. P. 277-286.
120. Speciation analysis of mercury in seawater from the lagoon of Venice by on-line pre-concentration HPLC-ICP-MS / W.R.L. Cairns et [al.] // *Anal. Chim. Acta.* 2008. V. 622. P. 62-69.
121. Speciation of mercury in coal using HPLC-CV-AFS system: Comparison of different extraction methods / E.Gao et [al.] // *J. Anal. At. Spectrom.* 2008. V. 23. P. 1397-1400.
122. Determination of trace mercury species by high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction / H. Chen et [al.] // *J. Hazard. Mater.* 2009. V. 172. P. 1282-1287.
123. Segade S.R., Tyson J.F. Determination of methylmercury and inorganic mercury in water samples by slurry sampling cold vapor atomic absorption spectrometry in a flow injection system after preconcentration on silica C18 modified // *Talanta.* 2007. V. 71. P. 1696-1702.
124. Heltai G., Feher B., Horvath M. Coupling of Microwave Induced Plasma Optical Emission Spectrometry with HPLC Separation for Speciation Analysis of Cr(III)/Cr(VI) // *Chem. Pap.* 2007. V. 61. P. 438-445.
125. Arsenic speciation in human hair: a new perspective for epidemiological assessment in chronic arsenicism / J. Yanez et [al.] // *J. Environ. Monit.* 2005. V. 7. P. 1335-1341.
126. Kuo C.-Y., Jiang S.-J., Sahayam A.C. Speciation of chromium and vanadium in environmental samples using HPLC-DRC-ICP-MS // *J. Anal. At. Spectrom.* 2007. V. 22. P. 636-641.
127. Arsenic Speciation in Urine from Acute Promyelocytic Leukemia Patients undergoing Arsenic Trioxide Treatment / Z. Wang et [al.] // *Chem. Res. Toxicol.* 2004. V. 17. P. 95-103.
128. Speciation analysis of arsenic in groundwater from Inner Mongolia with an emphasis on acid-leachable particulate arsenic / Z. Gong et [al.] // *Anal. Chim. Acta.* 2006. V. 555. P. 181-187.
129. Arsenic speciation in Chinese brake fern by ion-pair high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectroscopy / R. Chen et [al.] // *Anal. Chim. Acta.* 2004. V. 504. P. 199-207.
130. Bierla K., Szpunar J., Łobinski R. Specific determination of selenoaminoacids in whole milk by 2D size-exclusion-ion-pairing reversed phase high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (HPLC-ICP MS) // *Anal. Chim. Acta.* 2008. V. 624. P. 195-202.
131. Roberge M.T., Borgerding A.J., Finley J.W. Speciation of Selenium Compounds from High Selenium Broccoli Is Affected by the Extracting Solution // *J. Agric. Food Chem.* 2003. V. 51. P. 4191-4197.
132. Identification of selenium compounds using HPLC-ICPMS and nano-ESI-MS in selenium-enriched rice via foliar application / Y. Fang et [al.] // *J. Anal. At. Spectrom.* 2009. V. 24. P. 1657-1664.
133. Michalke B. Selenium speciation in human serum of cystic fibrosis patients compared to serum from healthy persons // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1058. P. 203-208.
134. Stability study of As(III), As(V), MMA and DMA by anion exchange chromatography and HG-AFS in wastewater samples / M. Segura et [al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* 2002. V. 374. P. 513-519.
135. Arsenic Speciation in Urine and Blood Reference Materials / T.I. Todorov et [al.] // *Microchim. Acta.* 2005. V. 151. P. 263-268.
136. Arsenic Speciation in Farmed Hungarian Freshwater Fish / C. Soeroes et [al.] // *J. Agric. Food Chem.* 2005. V. 53. P. 9238-9243.
137. Arsenic speciation in xylem sap of cucumber (*Cucumis sativus* L.) / V.G. Mihucz et [al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. V. 383. P. 461-466.
138. Niedzielski P., Siepak M., Novotny K. Determination of inorganic arsenic species As (III) and As (V) by high performance liquid chromatography with hydride generation atomic absorption spectrometry detection // *Cent. Eur. J. Chem.* 2004. V. 2. P. 82-90.

139. An HPLC/ICPMS study of the stability of selenosugars in human urine: implications for quantification, sample handling, and storage. / D. Juresa et [al.] // *J. Anal. At. Spectrom.* 2006. V. 21. P. 684-690.
140. Kuo C.-Y., Jiang S.-J. Determination of selenium and tellurium compounds in biological samples by ion chromatography dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1181. P. 60-66.
141. Arsenic speciation analysis of human urine using ion exchange chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry / R. Xie et [al.] // *Anal. Chim. Acta.* 2006. V. 578. P. 186-194.
142. Selenium speciation analysis in a sediment using strong anion exchange and reversed phase chromatography coupled with inductively coupled plasma-mass spectrometry / M. Ochsenkühn-Petropoulou et [al.] // *Anal. Chim. Acta.* 2003. V. 478. P. 219-227.
143. Speciation of cationic selenium compounds in Brassica juncea leaves by strong cation-exchange chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry / S.V.K. Yathavakilla et [al.] // *J. Chromatogr. A.* 2005. V. 1100. P. 153-159.
144. Chen Z., Megharaj M., Naidu R. Speciation of chromium in waste water using ion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry // *Talanta.* 2007. V. 72. P. 394-400.
145. Determination of total and soluble chromium (VI) in compost by ion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry / F. Laborda et [al.] // *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 2007. V. 87. P. 227-235.
146. HPLC-ICP-MS Speciation analysis of Arsenic in urine of Japanese subjects without occupational exposure / A. Hata et [al.] // *J. Occ. Health.* 2007. V. 49. P. 217-223.
147. Sloth J.J., Larsen E.H., Julshamn K. Selective arsenic speciation analysis of human urine reference materials using gradient elution ion-exchange HPLC-ICP-MS // *J. Anal. At. Spectrom.* 2004. V. 19. P. 973-978.
148. Measurement of arsenic compounds in littoral zone algae from the Western Mediterranean Sea. Occurrence of arsenobetaine / T. Llorente-Mirandes et [al.] // *Chemosphere.* 2010. V. 81. P. 867-875.
149. Determination of selenium compounds in urine by high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry / A. Chatterjee et [al.] // *J. Chromatogr. A.* 2003. V. 997. P. 249-257.
150. Development and Application of a Robust Speciation Method for Determination of Six Arsenic Compounds Present in Human Urine / L.S. Milstein et [al.] // *Environ. Health Persp.* 2003. V. 111. P. 293-296.
151. Ammann A.A. Arsenic speciation by gradient anion exchange narrow bore ion chromatography and high resolution inductively coupled plasma mass spectrometry detection // *J. Chromatogr. A.* 2010. V. 1217. P. 2111-2116.
152. A study of method robustness for arsenic speciation in drinking water samples by anion exchange HPLC-ICP-MS / J.A. Day et [al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* 2002. V. 373. P. 664-668.
153. Elizalde-Gonzalez M.P., Mattusch J., Wenrich R. Arsenic Speciation Analysis in Solutions Treated with Zeolites // *Microchim. Acta.* 2005. V. 151. P. 257-262.
154. Accumulation, Distribution, and Speciation of Arsenic in Wheat Grain / F.-J. Zhao et [al.] // *Environ. Sci. Technol.* 2010. V. 44. P. 5464-5468.
155. Mandal B.K., Ogra Y., Suzuki K.T. Speciation of arsenic in human nail and hair from arsenic-affected area by HPLC-inductively coupled argon plasma mass spectrometry // *Toxicol. Appl. Pharm.* 2003. V. 189. P. 73-83.
156. Speciation of arsenic by ion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry using ammonium eluents / Z. Chen et [al.] // *J. Sep. Sci.* 2006. V. 29. P. 2671-2676.
157. Speciation of five arsenic species (arsenite, arsenate, MMAAV, DMAAV and AsBet) in different kind of water by HPLC-ICP-MS / J. Sebastien et [al.] // *Chemosphere.* 2007. V. 66. P. 738-745.
158. Arsenic mobility and speciation in a contaminated urban soil are affected by different methods of green waste compost application / W. Hartley et [al.] // *Environ. Pollut.* 2010. V. 158. P. 3560-3570.
159. Kima M.-J., Nriagu J., Haack S. Arsenic species and chemistry in groundwater of southeast Michigan // *Environ. Pollut.* 2002. V. 120. P. 379-390.
160. Dobran S., Zagury G.J. Arsenic speciation and mobilization in CCA-contaminated soils: Influence of organic matter content // *Sci. Total Environ.* 2006. V. 364. P. 239-250.
161. Liang J., Wang Q., Huang B. Electrochemical vapor generation of selenium species after online photolysis and reduction by UV-irradiation under nano TiO<sub>2</sub> photocatalysis and its application to selenium speciation by HPLC coupled with atomic fluorescence spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. V. 381. P. 366-372.
162. Speciation analysis of inorganic antimony in soil using HPLC-ID-ICP-MS. / S. Amereih et [al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. V. 383. P. 1052-1059.
163. Antimony speciation analysis in sediment reference materials using high-performance liquid chromatography coupled to hydride generation atomic fluorescence spectrometry / M. Potin-Gautier et [al.] // *Anal. Chim. Acta.* 2005. V. 553. P. 214-222.
164. Racemization study on different N-acetylamino acids by a recombinant N-succinylamino acid racemase from *Geobacillus kaustophilus* CECT4264 /

- J. Pozo-Dengra et [al.] // *Process Biochem.* 2009. V. 44. P. 835- 841.
165. Devi P.G., Chakraborty P.K., Dasgupta D. Inhibition of a Zn(II)-containing enzyme, alcohol dehydrogenase, by anticancer antibiotics, mithramycin and chromomycin A(3) // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2009. V. 14. 347-359.
166. Speciation analysis of nickel in the latex of a hyperaccumulating tree *Sebertia acuminata* by HPLC and CZE with ICP MS and electrospray MS-MS detection. / D. Schaumlöffel et [al.] // *J. Anal. At. Spectrom.* 2003. V. 18. P. 120-127.
167. Analysis of nickel species in cytosols of normal and malignant human colonic tissues using two dimensional liquid chromatography with ICP-sector field MS detection / B. Bouyssiére et [al.] // *J. Anal. At. Spectrom.* 2004. V. 19. V. 196-200.
168. HPLC-ICPMS and Stable Isotope-Labeled Approaches To Assess Quantitatively Ti(IV) Uptake by Transferrin in Human Blood Serum / A. Sarmiento-Gonzalez et [al.] // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 8702-8711.
169. Analysis of the selenium species distribution in cow blood by size exclusion liquid chromatography–inductively coupled plasma collision cell mass spectrometry (SEC–ICPccMS) / O. Palacios et [al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. V. 383. P. 516-522.
170. Chen B., Zeng Y., Hu B. Study on speciation of aluminum in human serum using zwitterionic bile acid derivative dynamically coated C18 column HPLC separation with UV and on-line ICP-MS detection // *Talanta.* 2010. V. 81. P. 180-186.
171. Distribution and speciation of arsenic after intravenous administration of monomethylmonothioarsonic acid in rats / H. Naranmandura et [al.] // *Chemosphere.* 2010. V. 81. P. 206-213.
172. Muñoz J., Gallego M., Valcarcel M. Speciation of Organometallic Compounds in Environmental Samples by Gas Chromatography after Flow Pre-concentration on Fullerenes and Nanotubes // *Anal. Chem.* 2005. V. 77. P. 5389-5395.
173. Simultaneous speciation of methylmercury and butyltin species in environmental samples by headspace-stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry / A. Prieto et [al.] // *J. Chromatogr. A.* 2008. V. 1185. P. 130-138.
174. Krystek P., Ritsema R. Mercury speciation in thawed out and refrozen fish samples by gas chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry and atomic fluorescence spectroscopy // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. V. 381. P. 354-359.
175. Contamination of the coastal waters of Gijón (North Spain) by butyltin compounds / P. Rodríguez-Gonzalez et [al.] // *Water Air Soil Poll.* 2006. V. 174. P. 127-139.
176. Simultaneous determination of monomethylmercury, monobutyltin, dibutyltin and tributyltin in environmental samples by multi-elemental species-specific isotope dilution analysis using electron ionisation GC-MS / M.J. Moreno et [al.] // *J. Mass Spectrom.* 2006. V. 41. P. 1491-1497.
177. Muñoz J., Gallego M., Valcarcel M. Speciation analysis of mercury and tin compounds in water and sediments by gas chromatography–mass spectrometry following preconcentration on C60 fullerene // *Anal. Chim. Acta.* 2005. V. 548. P. 66-72.
178. Jitaru P., Adams F.C. Speciation analysis of mercury by solid-phase microextraction and multi-capillary gas chromatography hyphenated to inductively coupled plasma-time-of-flight mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1055. P. 197-207.
179. Speciation of butyltin compounds in marine sediments by preconcentration on C60 and gas chromatography – mass spectrometry / J. Muñoz et [al.] // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1023. P. 175-181.
180. Determination of mercury species in fish reference materials by gas chromatography-atomic fluorescence detection after closed-vessel microwave-assisted extraction / J.J.B. Nevado et [al.] // *J. Chromatogr. A.* 2005. V. 1093. P. 21-28.
181. Comparison of extraction methods for quantitation of methionine and selenomethionine in yeast by species specific isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry / L. Yang et [al.] // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1055. P. 177-184.
182. Michalke B. Capillary electrophoresis – a useful tool in speciation investigations // *Fresenius J. Anal. Chem.* 1996. V. 354. P. 557-565.
183. Li Y., Yin X.-B., Yan X.-P. Recent advances in on-line coupling of capillary electrophoresis to atomic absorption and fluorescence spectrometry for speciation analysis and studies of metal–biomolecule interactions // *Anal. Chim. Acta.* 2008. V. 615. P. 105-114.
184. Lu C.-Y., Yan X.-P. Capillary electrophoresis on-line coupled with hydride generation atomic fluorescence spectrometry for speciation analysis of selenium // *Electrophoresis.* 2005. V. 26. P. 155-160.
185. Platinum group metallodrug-protein binding studies by capillary electrophoresis – inductively coupled plasma-mass spectrometry: A further insight into the reactivity of a novel antitumor ruthenium (III) complex toward human serum proteins / K. Polec-Pawlak et [al.] // *Electrophoresis.* 2006. V. 27. P. 1128-1135.
186. Lee T., Jiang S.-J. Speciation of lead compounds in fish by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry // *J. Anal. At. Spectrom.* 2005. V. 20. P. 1270-1274.
187. Yeh C.-F., Jiang S.-J. Speciation of V, Cr and Fe by capillary electrophoresis–bandpass reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2004. V. 1029. P. 255-261.
188. Kitagawa F., Shiomi K., Otsuka K. Analysis of arsenic compounds by capillary electrophoresis

- using indirect UV and mass spectrometric detections // *Electrophoresis*. 2006. V. 27. P. 2233-2239.
189. Metall(prot)omic studies by capillary electrophoresis using separation capillary as an in-line reactor / A.R. Timerbaev et [al.] // *Metallomics*. 2011. V. 3. P. 761-764.
190. Manganese speciation in human cerebrospinal fluid using CZE coupled to inductively coupled plasma MS / B. Michalke et [al.] // *Electrophoresis*. 2007. V. 28. P. 1380-1386.
191. Kubáň P., Kubáň P., Kubáň V. Rapid speciation of Se(IV) and Se(VI) by flow injection-capillary electrophoresis system with contactless conductivity detection // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 378. P. 378-382.
192. Kubáň P., Kubáň P., Kubáň V. Speciation of chromium (III) and chromium (VI) by capillary electrophoresis with contactless conductometric detection and dual opposite end injection // *Electrophoresis*. 2003. V. 24. P. 1397-1403.
193. Yang W.-P., Zhang Z.-J., Deng W. Simultaneous, sensitive and selective on-line chemiluminescence determination of Cr(III) and Cr(VI) by capillary electrophoresis // *Anal. Chim. Acta.* 2003. V. 485. P. 169-177.
194. King M., Macka M., Paull B. Rapid Capillary Electrophoretic Method for Trace Chromium Speciation Using a Zwitterionic Isoelectric Polymer Coated Capillary and Photodiode Array Detection // *Anal. Lett.* 2004. V. 37. P. 2771-2787.
195. New isoelectric buffers for capillary electrophoresis: N-carboxymethylated polyethyleneimine as a macromolecular isoelectric buffer / M. Macka et [al.] // *Analyst*. 2001. V. 126. P. 421-425.
196. Development of chiral HPLC for selenoamino acids with ICP-MS detection: application to selenium nutritional supplements / K.L. Sutton et [al.] // *Analyst*. 2000. V. 125. P. 281-286.
197. Liang P., Liu R. Speciation analysis of inorganic arsenic in water samples by immobilized nanometer titanium dioxide separation and graphite furnace atomic absorption spectrometric determination // *Anal. Chim. Acta.* 2007. V. 602. P. 32-36.
198. Hu G., Deming R.L. Speciation of bio-available chromium in soils by solid-phase extraction and graphite furnace atomic absorption spectrometry // *Anal. Chim. Acta.* 2005. V. 535. P. 237-242.
199. Determination of selenite and selenate in drinking water: a fully automatic on-line separation/pre-concentration system coupled to electrothermal atomic spectrometry with permanent chemical modifiers / J. Stripeikis et [al.] // *Anal. Chim. Acta.* 2004. V. 502. P. 99-105.
200. Determination of Cr(VI) and Cr(III) species in parenteral solutions using a nanostructured material packed-microcolumn and electrothermal atomic absorption spectrometry / R.P. Monasterio et [al.] // *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2009. V. 23. P. 157-166.
201. Meng-xia L., Tian-long D. Arsenic species analysis in porewaters and sediments using hydride generation atomic fluorescence spectrometry // *J. Environ. Sci.* 2006. V. 18. P. 995-999.
202. Arsenic species and leachability in the fronds of the hyperaccumulator Chinese brake (*Pteris vittata* L.) / C. Tu et [al.] // *Environ. Pollut.* 2003. V. 124. P. 223-230.
203. Gómez-Ariza J.L., Bernal-Daza V., Villegas-Portero M.J. Comparative study of the instrumental couplings of high performance liquid chromatography with microwave-assisted digestion hydride generation atomic fluorescence spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry for chiral speciation of selenomethionine in breast and formula milk // *Anal. Chim. Acta.* 2004. V. 520. P. 229-235.
204. Separation and preconcentration of inorganic arsenic species in natural water samples with 3-(2-aminoethylamino) propyltrimethoxysilane modified ordered mesoporous silica micro-column and their determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry / D. Chen et [al.] // *J. Hazard. Mater.* 2009. V. 164. P. 1146-1151.
205. Jitmanee K., Oshima M., Motomizu S. Speciation of arsenic (III) and arsenic(V) by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry coupled with preconcentration system // *Talanta*. 2005. V. 66. P. 529-533.
206. Preconcentration of selenium compounds on a porous graphitic carbon column in view of HPLC-ICP-AES speciation analysis / K. Abbas-Ghaleb et [al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. V. 377. P. 1026-1031.
207. Michalke B. The coupling of LC to ICP-MS in element speciation: I. General aspects // *Trend. Anal. Chem.* 2002. V. 21. P. 142-153.
208. Michalke B. The coupling of LC to ICP-MS in element speciation – Part II: Recent trends in application // *Trend. Anal. Chem.* 2002. V. 21. P. 154-165.
209. 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.
210. Moreda-Pineiro A., Romaris-Hortas V., Bermejo-Barrera P. A review on iodine speciation for environmental, biological and nutrition fields // *J. Anal. Atom. Spectrom.* 2011. V. 26. P. 2107-2152.
211. Michalke B., Nischwitz V. Review on metal speciation analysis in cerebrospinal fluid – current methods and results: A review // *Anal. Chim. Acta.* 2010. V. 682. P. 23-36.
212. Pesavento M., Alberti G., Biesuz R. Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: A review // *Anal. Chim. Acta.* 2009. V. 631. P. 129-141.

213. Non-chromatographic speciation / A. Gonzalez et [al.] // *Trend. Anal. Chem.* 2010. V. 29. P. 260-268.
214. Sanz-Medel A., Montes-Bayón M., Sánchez M.L.F. Trace element speciation by ICP-MS in large biomolecules and its potential for proteomics // *Anal. Bioanal. Chem.* 2003. V. 377. P. 236-247.
215. Пупышев А.А., Суриков В.Т. Масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой. Образование ионов. Екатеринбург: Изд-во УрО РАН, 2006. 276 с.
216. Пупышев А.А., Эпова Е.Н. Спектральные помехи полиатомных ионов в методе масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой // *Аналитика и контроль.* 2001. Т. 5. С. 335-369.
217. Evans E.H., Giglio J.J. Interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry // *J. Anal. Atom. Spectrom.* 1993. V. 8. P. 1-18.
218. Большаков А.А., Ганеев А.А., Немец В.М. Перспективы аналитической атомной спектроскопии // *Успехи химии.* 2006. Т. 75. С. 322-328.
219. Operational optimisation of ICP—octopole collision/reaction cell—MS for applications to ultra-trace selenium total and speciation determination / J. Darrouzes et [al.] // *J. Anal. At. Spectrom.* 2005. V. 20. P. 88-94.
220. Determination of arsenite, arsenate, and monomethylarsonic acid in seawater by ion-exclusion chromatography combined with inductively coupled plasma mass spectrometry using reaction cell and hydride generation techniques / T. Nakazato et [al.] // *Talanta.* 2002. V. 58. P. 121-132.
221. Arsenic Speciation in Transplanted Lichens and Tree Bark in the Framework of a Biomonitoring Scenario / A. Machado et [al.] // *J. Atmos. Chem.* 2006. V. 53. P. 237-249.
222. Suna Y.C., Chena Y.J., Tsai Y.N. Determination of urinary arsenic species using an on-line nano-TiO<sub>2</sub> photooxidation device coupled with micro-bore LC and hydride generation-ICP-MS system // *Microchem. J.* 2007. V. 86. P. 140-145.
223. Salgado S.G., Nieto M.A.Q., Simon M.M.B. Determination of soluble toxic arsenic species in alga samples by microwave-assisted extraction and high performance liquid chromatography—hydride generation—inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1129. P. 54-60.
224. Speciation of Arsenic Metabolite Intermediates in Human Urine by Ion-Exchange Chromatography and Flow Injection Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry / M. Alauddin et [al.] // *J. Environ. Sci. Heal. A.* 2003. V. A38. P. 115-128.
225. Tu Q., Johnson W.Jr., Buckley B. Mercury speciation analysis in soil samples by ion chromatography, post-column cold vapor generation and inductively coupled plasma mass spectrometry // *J. Anal. At. Spectrom.* 2003. V. 18. P. 696-701.
226. Characterization of metal—humic acid complexes by polyacrylamide gel electrophoresis—laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry / M.S. Jimenez et [al.] // *Anal. Chim. Acta.* 2010. V. 676. P. 9-14.
227. Fan T.W.-M., Pruszkowski E., Shuttleworth S. Speciation of selenoproteins in Se-contaminated wildlife by gel electrophoresis and laser ablation-ICP-MS // *J. Anal. At. Spectrom.* 2002. V. 17. P. 1621-1623.
228. Lafleur J.P., Salin E.D. Speciation of Chromium by High-Performance Thin-Layer Chromatography with Direct Determination by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry // *Anal. Chem.* 2008. V. 80. P. 6821-6823.
229. Суриков В.Т., Пупышев А.А. Введение образцов в индуктивно связанную плазму для спектрометрического анализа // *Аналитика и контроль.* 2006. Т. 10. С. 112-125.
230. Recent progress in the application of analytical techniques to anticancer metallodrug proteomics / A.R. Timerbaev et [al.] // *Trend. Anal. Chem.* 2011. V. 30. P. 1120-1138.
231. McSheehy S., Mester Z. Arsenic speciation in marine certified reference materials Part 1. Identification of water-soluble arsenic species using multidimensional liquid chromatography combined with inductively coupled plasma, electrospray and electrospray high-field asymmetric waveform ion mobility spectrometry with mass spectrometric detection // *J. An. At. Spectrom.* 2004. V. 19. P. 373-380.
232. Multi-elemental speciation analysis of barley genotypes differing in tolerance to cadmium toxicity using SEC-ICP-MS and ESI-TOF-MS / D.P. Persson et [al.] // *J. Anal. At. Spectrom.* 2006. V. 21. P. 996-1005.
233. Investigation of arsenic speciation in algae of the Antarctic region by HPLC-ICP-MS and HPLC-ESI-Ion Trap MS / R.G. Wuilloud et [al.] // *J. Anal. At. Spectrom.* 2006. V. 21. P. 1214-1223.
234. Nischwitz V., Pergantis S.A. Liquid Chromatography Online with Selected Reaction Monitoring Electrospray Mass Spectrometry for the Determination of Organoarsenic Species in Crude Extracts of Marine Reference Materials // *Anal. Chem.* 2005. V. 77. P. 5551-5563.
235. Can we trust mass spectrometry for determination of arsenic peptides in plants: comparison of LC-ICP-MS and LC-ES-MS/ICP-MS with XANES/EXAFS in analysis of *Thunbergia alata* / K. Bluemlein et [al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. V. 390. P. 1739-1751.
236. Kurata K., Suzuki Y., Furuta N. Chemical Speciation Analysis for Bromine in Tap Water by Ion Chromatography/Inductively Coupled Plasma—Mass Spectrometry and Electrospray Ionization—Mass Spectrometry // *Bunseki Kagaku.* 2010. V. 59. P. 811-816.

237. Nischwitz V., Pergantis S.A. Improved arsenic speciation analysis for extracts of commercially available edible marine algae using HPLC-ESMS/MS // *J. Agric. Food Chem.* 2006. V. 54. P. 6507-6519.
238. Speciation of aluminium in tea infusions by use of SEC and FPLC with ICP-OES and ES-MS-MS detection / B. Kralj et [al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. V. 383. P. 467-475.
239. Simultaneous speciation of selenium and sulfur species in selenized odorless garlic (*Allium sativum* L. Shiro) and shallot (*Allium ascalonicum*) by HPLC-inductively coupled plasma-(octopole reaction system)-mass spectrometry and electrospray ionization-tandem mass spectrometry / Y. Ogra et [al.] // *J. Chromatogr. A.* 2005. V. 1093. P. 118-125.
240. In situ arsenic speciation on solid surfaces by desorption electrospray ionization tandem mass spectrometry / Z. Lin et [al.] // *Analyst.* 2010. V. 135. P. 1268-1275.
241. Speciation of Se in *Bertholletia excelsa* (Brazil nut): A hard nut to crack? / E. Dumont et [al.] // *Food Chem.* 2006. V. 95. P. 684-692.
242. Nischwitz V., Berthele A., Michalke B. Rapid size fractionation of metal species in paired human serum and cerebrospinal fluid samples using ultrafiltration with off-line element selective detection // *J. Anal. At. Spectrom.* 2010. V. 25. P. 1130-1137.
243. Wuilloud R.G., Kannamkumarath S.S., Caruso J.A. Speciation of nickel, copper, zinc, and manganese in different edible nuts: a comparative study of molecular size distribution by SEC-UV-ICP-MS // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 379. P. 495-503.
244. Chang L.-F., Jiang S.-J., Sahayam A.C. Speciation analysis of mercury and lead in fish samples using liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry // *J. Chromatogr. A.* 2007. V. 1176. P. 143-148.
245. Mandiwana K.L., Panichev N. You are not entitled to access the full text of this document Speciation analysis of plants in the determination of V(V) by ETAAS // *Talanta.* 2006. V. 70. P. 1153-1156.
246. A quantitative structure-activity approach for lipophilicity estimation of antitumor complexes of different metals using microemulsion electrokinetic chromatography / L.S. Foteeva et [al.] // *J. Pharmaceut. Biomed.* 2011. V. 55. P. 409-413.
247. Preparation of trout liver microsomes for iron speciation in P-450 enzymes by AE-FPLC with ICP-(ORS)MS detection / A. Rodriguez-Cea et [al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. V. 381. P. 388-393.
248. Speciation analysis of calcium, iron, and zinc in casein phosphopeptide fractions from toddler milk-based formula by anion exchange and reversed-phase high-performance liquid chromatography-mass spectrometry/flame atomic-absorption spectroscopy / E. Miquel et [al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. V. 381. P. 1082-1088.
249. Yanes E.G., Miller-Ihli N.J. Cobalamin speciation using reversed-phase micro-high-performance liquid chromatography interfaced to inductively coupled plasma mass spectrometry // *Spectrochim. Acta. Part B.* 2004. V. 59. P. 891-899.
250. Aldrich A.P., Kistler D., Sigg L. Speciation of Cu and Zn in drainage water from agricultural soils // *Environ. Sci. Technol.* 2002. V. 36. P. 4824-4830.
251. Anion-exchange high performance liquid chromatography hyphenated to inductively coupled plasma-isotope dilution-time-of-flight mass spectrometry for speciation analysis of metal complexes with metallothionein isoforms in gibel carp (*Carassius auratus gibelio*) exposed to environmental metal pollution / H.G. Infante et [al.] // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1121. P. 184-190.
252. Коломийцева М.Г., Габович Р.Д. Микроэлементы в медицине. М: Медицина, 1970. 288 с.
253. Скальный А.В., Рудаков И.А. Биоэлементы в медицине. М: Мир, 2003. 272 с.
254. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group / L.C. Clark et [al.] // *JAMA.* 1996. V. 276. P. 1957-1963.
255. Hatfield D., Portugal F.H. Seryl-tRNA in mammalian tissues: Chromatographic differences in brain and liver and a specific response to the codon UGA // *Proc. Natl. Acad. Sciences U.S.A.* 1970. V. 67. P. 1200-1206.
256. The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: the selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon / I. Chambers et [al.] // *EMBO J.* 1986. V. 5. P. 1221-1227.
257. Rayman M.P., Infante H.G., Sargent M. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation // *Brit. J. Nutr.* 2008. V. 100. P. 238-253.
258. On-line pre-reduction of Se(VI) by thiourea for selenium speciation by hydride generation / J. Qiu et [al.] // *Spectrochim. Acta. Part B.* 2006. V. 61. P. 803-809.
259. Inorganic selenium speciation in environmental samples using selective electrodeposition coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry / N.M. Najafi et [al.] // *Spectrochim. Acta. Part B.* 2010. V. 65. P. 334-339.
260. Ngu T.T., Stillman M.J. Arsenic Binding to Human Metallothionein // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V. 128. P. 12473-12483.
261. Speciation analysis of arsenic in biological matrices by automated hydride generation-cryotrapping-atomic absorption spectrometry with multiple microflame quartz tube atomizer (multiatomizer) / A. Hernandez-Zavala et [al.] // *J. Anal. At. Spectrom.* 2008. V. 23. P. 342-351.
262. Cullen W.R., McBride B.C., Reglinski J. The reaction of methylarsenicals with thiols: Some biological implications // *J. Inorg. Biochem.* 1984. V. 21. P. 179-193.

263. Speciation analysis of inorganic arsenic by microchip capillary electrophoresis coupled with hydride generation atomic fluorescence spectrometry / F. Li et al. // *J. Chromatogr. A*. 2005. V. 1081. P. 232-237.
264. Yuan C., Jiang G., He B. Evaluation of the extraction methods for arsenic speciation in rice straw, *Oryza sativa* L., and analysis by HPLC-HG-AFS // *J. Anal. At. Spectrom.* 2005. V. 20. P. 103-110.
265. Оберлис Д., Харланд Б., Скальный А. Биологическая роль макро- и микроэлементов у человека и животных / [Под. ред. А.В. Скального]. СПб: Наука, 2008. 542 с.
266. Modulatory effect of glutathione status and antioxidants on methylmercury-induced free radical formation in primary cultures of cerebral astrocytes / G. Shanker et al. // *Mol. Brain Res.* 2005. V. 137. P. 11-22.
267. Острые и хронические отравления ртутью (клиническая картина, диагностика, профилактика, лечение, экспертиза). / В.В. Шилов и [др.]. СПб: Издательский дом СПбМАПО, 2006. 39 с.
268. Determination of methylmercury in Wsh and seafood using optimized digestion and derivatization followed by gas chromatography with atomic emission detection / T. Kuballa et al. // *Eur. Food Res. Technol.* 2009. V. 228. P. 425-431.
269. Determination of inorganic and methylmercury in fish by cold vapor atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry / I. Serafimovski et al. // *Microchem. J.* 2008. V. 89. P. 42-47.
270. Analytical speciation of mercury in fish tissues by reversed phase liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry with Bi<sup>3+</sup> as internal standard / M.M. Santoyo et al. // *Talanta*. 2009. V. 79. P. 706-711.
271. Tseng C.-M., Hammerschmidt C.R., Fitzgerald W.F. Determination of Methylmercury in Environmental Matrixes by On-Line Flow Injection and Atomic Fluorescence Spectrometry // *Anal. Chem.* 2004. V. 76. P. 7131-7136.
272. Casas S., Bacher C. Modelling of trace metal (Hg and Pb) bioaccumulation in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, applied to environmental monitoring // *J. Sea Res.* 2006. V. 56. P. 168-181.
273. Ali I., Gupta V.K., Aboul-Enein H.Y. Metal ion speciation and capillary electrophoresis: application in the new millennium // *Electrophoresis*. 2005. V. 26. P. 3988-4002.
274. Ma H.-L., Tanner P.A. Speciated isotope dilution analysis of Cr(III) and Cr(VI) in water by ICP-DRC-MS // *Talanta*. 2008. V. 77. P. 189-194.
275. Rahman G.M.M., Kingston H.M. Application of Speciated Isotope Dilution Mass Spectrometry To Evaluate Extraction Methods for Determining Mercury Speciation in Soils and Sediments // *Anal. Chem.* 2004. V. 76. P. 3548-3555.
276. Yusof A.M., Chia C.H., Wood A.K.H. Speciation of Cr(III) and Cr(VI) in surface waters with a Chelex-100 resin column and their quantitative determination using inductively coupled plasma mass spectrometry and instrumental neutron activation analysis // *J. Radioanal. Nucl. Ch.* 2007. V. 273. P. 533-538.
277. Gas chromatography-inductively coupled plasma-time-of-flight mass spectrometry as a tool for speciation analysis of organomercury compounds in environmental and biological samples / J. Leenaers et al. // *J. Anal. At. Spectrom.* 2002. V. 17. P. 1492-1497.
278. Simultaneous speciation of mercury and butyltin compounds in natural waters and snow by propylation and species-specific isotope dilution mass spectrometry analysis / M. Monperreus et al. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2005. V. 381. P. 854-862.
279. Mercury speciation analysis on cell lines of the human central nervous system to explain genotoxic effects / J.J.B. Nevado et al. // *Microchem. J.* 2009. V. 93. P. 12-16.
280. Simultaneous determination of inorganic mercury, methylmercury, and total mercury concentrations in cryogenic fresh-frozen and freeze-dried biological reference materials / D. Point et al. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2007. V. 389. P. 787-798.
281. Using Speciated Isotope Dilution with GC-Inductively Coupled Plasma MS To Determine and Unravel the Artificial Formation of Monomethylmercury in Certified Reference Sediments / R.C.R. Martin-Doimeadios et al. // *Anal. Chem.* 2003. V. 75. P. 3202-3211.
282. Lambertsson L., Björn E. Validation of a simplified field-adapted procedure for routine determinations of methyl mercury at trace levels in natural water samples using species-specific isotope dilution mass spectrometry // *Anal. Bioanal. Chem.* 2004. V. 380. P. 871-875.
283. Chromium speciation, selective extraction and preconcentration by alumina-functionalised 2-pyridenecarboxyladehyde thiosemicarbazone / M.E. Mahmoud et al. // *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 2008. V. 88. P. 1017-1031.
284. Automation of liquid-liquid extraction-spectrophotometry using prolonged pseudo-liquid drops and handheld CCD for speciation of Cr(VI) and Cr(III) in water samples / W. Chen et al. // *Anal. Sci.* 2005. V. 21. P. 1189-1193.
285. Preconcentration and Speciation of Chromium in Water Samples by Atomic Absorption Spectrometry after Cloud-Point Extraction / F. Shemirani et al. // *Anal. Sci.* 2003. V. 19. P. 1453-1456.
286. Speciation of Chromium in Artificially Contaminated Soil Reference Material GSJ JSO-2 Using XANES and Chemical Extraction Methods / H. Tsuno et al. // *Geostand. Geoanal. Res.* 2005. V. 30. P. 55-62.

287. Chromium Speciation Analysis in Bread Samples / M.E. Soares et [al.] // J. Agric. Food Chem. 2010. V. 58. P. 1366-1370.
288. Martendal E., Maltez H.F., Carasek E. Speciation of Cr(III) and Cr(VI) in environmental samples determined by selective separation and preconcentration on silica gel chemically modified with niobium(V) oxide // J. Hazard. Mater. 2009. V. 161. P. 450-456.
289. Borai E.H., El-Sofany E.A., Abdel-Halim A.S. Speciation of hexavalent chromium in atmospheric particulate samples by selective extraction and ion chromatographic determination // Trend. Anal. Chem. 2002. V. 21. P. 741-745.
290. Ball J.W., McCleskey R.B. A new cation-exchange method for accurate field speciation of hexavalent chromium // Talanta. 2003. V. 61. P. 305-313.
291. Stasinakis A.S., Thomaidis N.S., Lekkas T.D. Speciation of chromium in wastewater and sludge by extraction with liquid anion exchanger Amberlite LA-2 and electrothermal atomic absorption spectrometry // Anal. Chim. Acta. 2003. V. 478. P. 119-127.
292. Direct speciation analysis of Cr(VI) by electrothermal atomic absorption spectrometry, based on the volatilization of Cr(III)-thenoyltrifluoroacetate from the graphite furnace / P. Bermejo-Barrera et [al.] // Spectrochim. Acta. Part B. 2003. V. 58. P. 167-173.
293. Using ion-pair reversed-phase HPLC ICP-MS to simultaneously determine Cr(III) and Cr(VI) in urine of chromate workers / H.-J. Wang et [al.] // Talanta. 2010. V. 81. P. 1856-1860.

## TRACE ELEMENT SPECIATION ANALYSIS OF BIOLOGICAL MEDIA

***N.B. Ivanenko<sup>1,2</sup>, N.D. Solovyev<sup>1,2\*</sup>, A.A. Ivanenko<sup>1</sup>, L.N. Moskvina<sup>2</sup>***

*<sup>1</sup>Institute of Toxicology, Federal Medico-Biological Agency of Russia  
192019 St. Petersburg, ul. Behtereva, 1*

*<sup>2</sup>Saint-Petersburg State University  
199034, St. Petersburg, Universitetskaya nab., 7/9*

*\*nicksolovev@gmail.com*

General approaches to the determination of trace elemental species in biological media were summarized. Main attention was paid to the speciation analysis of clinical samples. Hybrid techniques including species separation and their sequential element specific detection are observed as a methodic approach of priority importance. Methodological solutions of the trace element speciation analysis were discussed on the example of selenium, arsenic, mercury and chromium speciation. Literature – 293 references.

**Key words:** speciation analysis, trace elements, chemical species, hyphenated techniques, inductively coupled plasma mass spectrometry, high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis, selenium, arsenic, mercury, chromium