МЕТОДИЧЕСКАЯ СТАТЬЯ

МЕТОДЫ РАЗДЕЛЕНИЯ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ SPECIATION-АНАЛИЗА В БИОМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Д.М. Ляпуновский

ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»;
Российская Федерация,117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6
АНО «Центр биотической медицины»;
Российская Федерация, 105064, Москва, ул. Земляной Вал, д. 46

РЕЗЮМЕ. Speciation-анализ (анализ химических форм элементов) – это важное направление в аналитической химии, которое позволяет определять не только общее содержание элемента, но и его конкретные химические формы (виды). Как правило, для speciation-анализа микроэлементов необходимы два взаимодополняющих метода – разделение и обнаружение. Первый обеспечивает эффективное и надежное разделение форм, а второй – адекватное обнаружение и количественную оценку. Это особенно важно для понимания биодоступности, токсичности и экологического воздействия элементов. Рассмотрены наиболее современные, применяемые и доступные методы разделения форм некоторых химических элементов. Прогресс в аналитических инструментах и методологии позволяет идентифицировать и анализировать формы, представленные в конкретной индивидуальной системе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: speciation-анализ, масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой, высокоэффективная жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез, селен, мышьяк, ртуть.

Для цитирования: Ляпуновский Д.М. Методы разделения при проведении speciation-анализа в биомедицинских исследованиях. Микроэлементы в медицине. 2025;26(2):55–62. DOI: 10.19112/2413-6174-2025-26-2-55-62.

ВВЕДЕНИЕ

Для speciation-анализа обычно используется сочетание хроматографических методов, таких как газовая хроматография (ГХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с высокочувствительным и селективным детектором. Химическая форма и количественная информация об элементе могут быть получены также с помощью базовых химических методов, которые могут обеспечить простые способы получения достаточной информации о разновидностях элементов. К ним относятся экстракция и селективное восстановление.

Ограничением, связанным с переносом технологии в биомедицинские исследования, является малый объём пробы, вводимой в систему, что приводит к необходимости использования очень чувствительного детектора. Представляется, что не хроматографические методы являются более подходящими, если объем пробы не ограничен, и таким образом можно использовать менее чувствительные и менее дорогие детекторы благодаря возможности разделения и предварительного концентрирования желаемых веществ. Кроме того, инвестиционные и эксплуатационные расходы, связанные с использованием не хроматографических методов, иногда также играют важную роль в ограничении распространения speciation-анализа в качестве рутинной задачи.

МЕТОДЫ ЭКСТРАКЦИИ

Экстракция обычно используется для выделения одного или группы видов из сложных матриц, особенно для образцов окружающей среды и биологических образцов (Ibrahim et al., 2017). Жидкостная экстракция (ЖЭ) является старейшим методом предварительного концентрирования и выделения для анализа видообразования и может быть непосредственно применена для нефильтрованных образцов со сложными матрицами (Pena-Pereira et al., 2009). Процедуры последовательной экстракции с использованием водных растворов, такие как метод Тессье или метод фракционного анализа тяжёлых металлов, обычно используются для определения подвижности, биодоступности и потенциальной токсич-

* Адрес для переписки:
Ляпуновский Дмитрий Михайлович
E-mail: 1142240109@pfur.ru

© Микроэлементы в медицине/Trace elements in medicine, 2025

DOI: 10.19112/2413-6174-2025-26-2-55-62

ности микроэлементов в почве и донных отложениях. Жидкостная экстракция может наилучшим образом работать с окислительно-восстановительными элементами, такими как As, Sb и Se, для которых из-за различий в степени окисления может образовываться больше отдельных биогеохимических соединений. В настоящее время ЖЭ редко применяется для определения элементарных частиц в пробах воды, за исключением извлечения различных ограниченных частиц из донных отложений или почвы. Некоторые модифицированные методы ЖЭ также используются для speciation-анализа. Например, Panhwar и соавт. использовали ультразвуковую дисперсионную микроэкстракцию жидкость-жидкость (ЖЖМЭ) (Panhwar et al., 2017) для анализа Se(IV) и Se(VI) в образцах воды и пищевых продуктов. Метод вихревой дисперсионной микроэкстракции жидкость-жидкость, основанный на замораживании глубокого эвтектического растворителя, разработан (Akramipour et al., 2018) для определения органической и неорганической ртути в образцах крови. На основе принципов экстракции разработаны некоторые другие методы экстракции, включая жидкофазную микроэкстракцию (ЖМЭ) (Haghnazari et al., 2018), твердофазную экстракцию (ТЭ), твердофазную микроэкстракцию (ТМЭ) (Panhwar et al., 2018) и др. Для снижения расхода растворителя используется ЖМЭ, в котором капля органического растворителя взвешивается на кончике микроприемника и контактирует с аналитическим образцом. Затем капля извлекается и переносится в специальный аналитический прибор после экстракции. Например, Zeng и соавт. (Zeng et al., 2017) разработали анализ форм As(III) и As(V) на основе полого волоконного ЖМЭ Triton X-100 в сочетании с пламенной атомно-абсорбционной спектрометрией, в ходе которого Triton X-100 использовался в качестве экстрагента и акцепторного раствора.

В современной научной практике выделяют два основных направления в изучении микроэлементов. Первое связано с созданием специализированных биосенсоров, способных напрямую определять конкретные химические формы элементов. Однако данная технология пока находится на ранних стадиях развития и требует значительных улучшений. Больше внимания сегодня уделяется гибридным методам анализа (Золотов, 1977), которые сочетают предварительное разделение форм микроэлементов с последующим детектированием с помощью специализированных приборов. В основе таких систем лежат биосенсоры, созданные с использованием культур микробных клеток. Эти устройства позволяют оценивать как доступность, так и токсичность различных форм микроэлементов (например, алюминия, мышьяка, меди, ртути, никеля и цинка) в сложных мультиэлементных смесях.

Особенно примечательна возможность количественного определения отдельных форм элементов. Так, в одном из исследований удалось успешно провести анализ арсенита в водных экстрактах почвенных образцов и донных отложений. При этом применение биосенсоров для клинических анализов пока не получило широкого распространения (Rahman et al., 1999; Flynn et al., 2002).

Эффективность использования биосенсоров во многом зависит от особенностей матрицы образца. Критически важными факторами являются отсутствие веществ, вызывающих повреждение иммобилизованного биологического материала (например, денатурацию ферментов или мембранных белков), возможность воспроизводимого считывания сигнала и контроль над ростом микробных культур, чтобы избежать их чрезмерного размножения вследствие наличия питательных веществ в образце.

Сорбенты с иммобилизованным хелатообразующим реагентом, такие как дитиокарбамат пирролидина аммония (A-PDC), широко используются в методе твердофазной экстракции. Например, Ли et al. (Li et al., 2015) предложили новый магнитный метод ТЭ с использованием наночастиц Fe_3O_4 (C_8-Fe_3O_4·SiO_2), покрытых диоксидом кремния, для определения следовых количеств Sb(III) и Sb(V) в воде, при котором Sb(III) образует гидрофобную пленку. Образуется комплекс с A-PDC при pH 5,0 и удерживается на наночастицах C_8-Fe_3O_4·SiO_2, тогда как Sb(V) остается в свободном виде в водном растворе. Группа авторов (Zhang et al., 2007) разработала метод многоэлементного анализа неорганического состава As(III, V), Se(IV, VI) и Sb(III, V) в природной воде с применением технологии SPE. При этом использовали TiO_2 для адсорбции общего количества неорганических As, Se и Sb, в то время как As(III), Se(IV) и Sb(III) были совместно осаждены с дитиокарбаматом пирролидина ртути Pb-PDC. Затем по разностям была рассчитана абсолютная концентрация As(V), Se(VI) и Sb(V). Отмечается, что ТМЭ также часто используется в качестве ме-

тода предварительной обработки для разделения или предконцентрации анализируемых веществ перед хроматографическим разделением (Yang et al., 2018). Также разрабатывается прямая связь ТМЭ с конкретными детекторами. Например, ТМЭ использовали Panhwar и соавт. (Panhwar et al., 2018) для определения неорганического Sb-образования. Соединение Sb(III) образует гидрофобный комплекс с диэтилдитиокарбаматом при pH 5,5 и впоследствии адсорбируется на имидазольном полимере полистирола с олеиновой кислотой.

Используется также и селективное восстановление, основанное на различиях в потенциалах восстановления различных видов. Потенциал восстановления может регулироваться концентрацией восстановителей, pH, а также наличием катализаторов или хелатообразующих агентов. Селективное восстановление обычно связано с методами химического парообразования (ГХП), с помощью которых в процессе восстановления образуются летучие производные (Welna, Pohl, 2017). Следует отметить, что некоторые органические соединения Se и Hg нелегко восстанавливаются с помощью BH_4^-, который является наиболее часто используемым восстановителем при проведении ГХП. В связи с этим часто используется фотохимическое восстановление путем воздействия ультрафиолетового облучения или ультразвука (УЗИ). Например, Hg(II) и метилртуть (MeHg) были определены методом атомно-флуоресцентной спектроскопии (АФС) Hu и соавт. (Hu et al., 2018) с использованием ультрафиолетового распыления с образованием гидрида. В то же время Hg(II) может быть непосредственно измерен в режиме и без ультрафиолетового излучения после снижения с использованием 0,1% (м/об) KBH_4, в то время как MeHg требует преобразования в пары элементарной ртути под воздействием ультрафиолетового излучения. Общее содержание Hg и MeHg в биологических образцах измеряли после обработки тканей либо муравьиной кислотой, либо гидроксидом тетраметиламмония (ТМАН) после снижения содержания обеих форм путем воздействия на раствор ультрафиолетовым излучением, в ходе которого MeHg селективно определяли количественно, добавляя 10% уксусной кислоты в раствор ТМАН (Vieira et al., 2007). Раннее были оценены окислительно-восстановительные реакции, вызванные ультрафиолетовым излучением и УЗИ, для определения Se(IV), Se(VI), SeMet и SeCys в модельной воде, обогащенной природной воде и экстрактах почвы/летучей золы с использованием ГРГ-ААС (ртутно гидридная генерация) и АФС (Mendez et al., 2006). Кроме того, исследователи (Chen et al., 2009) систематически изучали фотохимическое поведение селена и некоторых его органических соединений в различных водных матрицах при ультрафиолетовом облучении при длине волны 300 нм. Замечено, что скорость фотохимического окисления Se(IV) в Se(VI) значительно возрастает в присутствии HNO_3 в концентрации, превышающей $1–10^3$ М.

В более узких случаях, например, из-за различной летучести ртути и ее соединений, термическая десорбция также используется для различения видов соединений. Так, анализ термического выделения в сочетании с ААС был разработан и применен Шуваевой и соавт. (Shuvaeva et al., 2008) для определения Hg(II), MeHg и сульфида ртути в озерных отложениях и планктоне. Кроме того, в одном из исследований, чтобы провести окислительно-восстановительный анализ Sb в воде (Xi et al., 2015), систематически тестировали несколько соединений в качестве маскирующих агентов для ингибирования образования стибина из Sb(V), и результаты показали, что лимонная кислота и NaF могут успешно подавлять этот процесс. Следует отметить, что любые процессы предварительной обработки во время speciation-анализа, даже такие рутинные, как изменение pH, температуры и давления, могут привести к необратимой трансформации анализируемого вида.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Наиболее подробную информацию, касающуюся анализа форм, можно получить с помощью методов, которые включают разделение с помощью ВЭЖХ, ГХ или капиллярного электрофореза (КЭ) с использованием далее детекторов ИСП-МС или атомной спектрометрии. Основными преимуществами этих методов являются чрезвычайно низкий предел обнаружения, незначительные помехи, высокая точность и повторяемость и т.д. Выбор надлежащего метода разделения зависит от физико-химических свойств различных компонентов, таких как летучесть, заряд или полярность, иногда также применяется комбинация двух или более методов разделения.

Газовая хроматография в основном используется для разделения Hg. В процессе разделения

летучие соединения ртути удаляются из раствора образца после дериватизации и затем предварительно концентрируются главным образом путем сорбции, экстракции и т.д. (Giraaldez et al., 2017; Teran-Baamonde et al., 2018). Далее захваченные производные ртути термически высвобождаются и количественно передаются в газохимический анализатор для разделения на частицы. Колонки с насадкой приводят к плохой воспроизводимости, поэтому для обеспечения большей мощности разделения и более высоких пределов обнаружения обычно используются капиллярные или многокапиллярные колонки для ГХ (Gajdosechova et al., 2018). Как правило, после разделения с помощью ГХ, производные ртути необходимо количественно перенести в подходящую систему обнаружения. Сравнительное исследование ГХ в сочетании с АФС, АЭС и МС для анализа MeHg и EtHg после водной дериватизации показало, что как ГХ-АФС, так и ГХ-АЭС показали себя превосходными методами с пределами обнаружения в диапазоне субпикограммовых границ. Nevado с соавт. (Nevado et al., 2018) также оценили преимущества и недостатки трех описанных методов, в том числе ГХ-МС, ГХ-ИСП-МС и ГХ-pyrolysis-АФС, для speciation-анализа исследования ртути в различных матрицах образцов после водного этилирования тетраэтилборатом натрия. Абсолютные пределы обнаружения и количественной оценки находились в диапазоне от 1 до 4 пг для GC-MC, от 0,05 до 0,21 пг для ГХ-ИСП-МС и от 2 до 6 пг для метода ГХ-pyro-АФС.

Одним из популярных вариантов исследования, получившим наибольшее развитие, является сочетание различных методов жидкостной хроматографии (ЖХ), ионообменной хроматографии (ИОХ) и обратно-фазной хроматографии (ОФХ) с использованием специальных детекторов (Rekhi et al., 2017). Показано применение методов, основанных на ЖХ-разделении, для анализа специфики As, Hg, Sb и Se в экологических и биологических образцах с различными фазами. В качестве детектора преобладает метод ИСП-МС. Разделение частиц в ИОХ основано на взаимодействиях между положительно или отрицательно заряженными частицами и неподвижной фазой, которая содержит катионную функциональную группу (анионообменную) или анионную функциональную группу (катионообменную). Мицеллярная электрокинетическая хроматография (МЭКХ) является идеальным методом для разделения неорганических As, Sb, Se и многих заряженных металлоорганических ионов, таких как селеноорганические и мышьякорганические соединения. В качестве элюентов для МЭКХ используются буферные растворы, концентрация которых не превышает 25 мм. Обратно-фазная хроматография применяется для разделения анализируемых веществ на неполярную стационарную фазу, в которой обычно содержится ковалентно связанный линейный углеводород C_{8-} или C_{18-}, и относительно полярную подвижную фазу. Этот метод превосходит метод ИОХ при разделении металлоорганических соединений (Chen et al., 2013). Как анионообменные, так и катионообменные колонки иногда используются в качестве дополнительного оборудования. Исходя из требований к pH, в качестве буферов, как правило, используются фосфаты (Sánchez-Rodas et al., 2016), карбонаты (Chu, Jiang, 2011), нитраты, ацетаты и др. Анионообменный режим с элюированием фосфатным буфером выбирается для разделения As(III), As(V), MMA и DMA. Натриево-солевой буфер оставляет углеродистый осадок на пробоотборнике и скиммере ИСП-МС, что приводит к нестабильности плазмы и сдвигу времени удерживания. Поэтому часто используются подвижные фазы на основе солей аммония. Например, показано, что использование NH_4NO_3 в качестве подвижной фазы обеспечивает хорошую стабильность сигнала на ИСП-МС при минимальном отложении солей на образце и конусах скиммера (Reyes et al., 2012). Для разделения элементов используются как изократические, так и градиентные ионообменные хроматографические системы. Градиентное разделение, как правило, обеспечивает лучшую разрешающую способность для различных видов и часто используется для сокращения времени анализа хорошо удерживаемых образцов.

Метод гель-фильтрационной хроматографии (ГФХ) занимает особое место в анализе лабильных соединений благодаря своей способности сохранять нативную структуру молекул. В отличие от других хроматографических методов, разделение происходит в мягких условиях, с использованием буферных растворов с нейтральным pH, что минимизирует дестабилизацию комплексов (Huerta et al., 2004; Alzate et al., 2007; Sarmiento-Gonzalez et al., 2008). Это делает ГФХ незаменимой при исследовании неустойчивых систем, таких как металл-биолигандные соеди-

нения. Ключевое достоинство ГФХ – возможность определения молекулярных параметров, включая размеры и массу аналитов. Такие данные критически важны при изучении металлоферментов, где сохранение третичной структуры влияет на активность (Devi et al., 2009) механизмов транспорта ионов металлов в биологических системах (Chen et al., 2010; Naranmandura et al., 2010), селенопротеинов, чувствительных к изменению условий среды (Birla et al., 2008).

На начальных этапах разработки методик, ГФХ служит инструментом предварительной оценки и разработки новых методик анализа, позволяя получить базовые сведения о распределении форм в образце, что упрощает выбор стратегии для последующих этапов анализа. Однако метод имеет ограничение: разрешающая способность разделения уступает таковой у высокоэффективной жидкостной или ионообменной хроматографии. Несмотря на умеренную эффективность разделения, ГФХ остается востребованной в биоаналитике благодаря сочетанию щадящих условий и информативности. Ее применение особенно оправдано в исследованиях, где приоритетом является сохранение нативных свойств лабильных соединений.

КАПИЛЛЯРНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ

Капиллярный электрофорез представляет собой инновационный подход к анализу химических элементов, который дополняет традиционные методы газовой хроматографии (ГХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Этот метод выделяется высокой разрешающей способностью и экологичностью благодаря использованию водных буферных растворов с оптимальным уровнем pH. При этом расход реагентов и проб сведен к минимуму, что делает КЭ особенно привлекательным для современных лабораторий.

Пример успешного применения данного метода можно увидеть в исследовании Liu с соавт. (Liu et al., 2024), где было выполнено одновременное определение десяти соединений мышьяка, включая As(III), As(V), MMA, DMA, AsB, AsC, Rox, о-арсаниловую кислоту, п-уреидофениларсоновую кислоту и 4-нитрофениларсоновую кислоту. В данном случае использована комбинация капиллярного электрофореза с масс-спектрометрией с индуктивно-связанной плазмой. Однако стоит отметить, что при работе со сложными матрицами может потребоваться предварительная обработка образцов, например микроэкстракция (Li et al., 2018). Несмотря на это, разделение компонентов с помощью КЭ происходит значительно быстрее, чем при использовании жидкостной хроматографии, что делает этот метод особенно эффективным для срочных анализов.

Несмотря на то, что КЭ дополняет традиционные методы ВЭЖХ, он демонстрирует уникальные возможности для целей speciation-анализа, лишь незначительное нарушая существующее равновесие между различными видами. Отсутствие неподвижной фазы позволяет избежать проблем, возникающих из-за большой площади поверхности и различных возможностей нежелательных взаимодействий. Следовательно, целостность видов не будет так сильно нарушена, как при ВЭЖХ. Однако использование КЭ влечет за собой несколько ограничений, среди которых небольшой объём образца, всего несколько нанолитров, который можно проанализировать. Это вызывает проблемы с репрезентативностью и требует крайней однородности выборки. Кроме того, пределы обнаружения концентрации обычно на один-два порядка выше, чем при разделении методом ЖХ. Высокое напряжение само по себе может изменить целостность элементарных частиц. Аналогичным образом состав буфера/электролита и природа добавок могут оказывать негативное воздействие на стабильность (Michalke, 2003).

Хотя КЭ эффективен для разделения, все еще существуют серьезные проблемы, которые ограничивают его практическое применение. Так, нет достаточной осторожности и точности в отношении возможных изменений в формообразовании во время электрофореза, отсутствует возможность надлежащего контроля при валидации метода и пригодности системы в целом (Timerbaev, 2001).

В не хроматографических методах анализа часто используются многоступенчатые процедуры, что приводит к высокому риску потери анализируемых веществ или видовой конверсии. Эти особенности затрудняют автоматизацию таких методов и их интеграцию в современные системы. Таким образом, высокоселективные и чувствительные аналитические методы разделения, такие как ВЭЖХ, ГХ, КЭ, методы жидкой и твердофазной экстракции без предварительной обработки или с небольшим количеством этапов предварительной обработки являются более подходящими для точечного speciation-анализа.

Интеграция speciation-анализа в биомедицинскую практику для ранней диагностики заболеваний сталкивается с базовыми техническими вызовами ещё на этапе подбора и выбора необходимой методики и оборудования. Возможны как классическое масштабирование и дополнение уже известных и отработанных программ, так и использование новейших уникальных наноматериалов для улучшения разделения и детектирования, включение в анализ и селекция некоторых биосенсоров.

Активно и успешно развивается speciation-анализ в направлении медицинской элементологии (Айсувакова, Скальный, 2018), что подтверждается актуальными исследованиями биосубстратов человека (волосы, сыворотка) тандемными методами разделения и детекции. Результаты измерений (Серебрянский и др., 2003) по ряду элементов подтверждены за счет их независимого определения ИСП-МС и ИСП-АЭС. Интеграция двух приборов в единую компактную систему существенно экономит ресурсы, необходимые для поддержания требуемых параметров лабораторного микроклимата и чистоты. В работах (Ajsuvakova et al., 2021; Miroshnikov et al., 2022) проведено комплексное исследование сыворотки крови ИСП-МС в тандеме с гель фильтрационной хроматографией и ВЭЖХ, впервые доказывающее, что железодефицитное состояние, вызванное десферриоксамином, провоцирует дисбаланс гомеостаза эссенциальных металлов, с наиболее выраженным воздействием на цинк. Также были отмечены значительные сдвиги в концентрациях металлов, зафиксировано повышение уровней марганца, меди и цинка. Большая часть меди, вероятно, в меньшей степени связывается с церулоплазмином и макроглобулином, в то время как вклад связанной с альбумином меди в общий уровень металлов в сыворотке крови оказался незначительным. Доля низкомолекулярных соединений, представленных аминокислотными комплексами, была незначительной. В свою очередь, основные высокомолекулярные фракции сывороточного цинка были отнесены к α2-макроглобулину и альбумину. Содержание цинка в сыворотке крови, связанной с аминокислотами, было более высоким по сравнению с соответствующей фракцией меди. Полученные данные демонстрируют особенности переноса цинка и меди, которые могут быть использованы для оценки содержания микроэлементов в рационе.

Важным моментом является достоверная классификация форм элемента, их приложение и значимость в исследуемых образцах, что необходимо для учёта обработки и реализации матрицы при проведении анализа. В современной научной практике наблюдается значительный прогресс в методологии исследования химических форм микроэлементов в биологических объектах. Этот успех во многом обусловлен внедрением инновационных гибридных технологий, сочетающих хроматографические и электрофоретические подходы к разделению веществ с высокоспецифичными методами детектирования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Интеграция методов исследования позволяет значительно углубить понимание сложных биологических систем и открыть новые горизонты в таких важных областях как экология, медицина, биохимия и токсикология. Особенно актуально применение этих технологий для изучения металлоорганических соединений и их роли в живых организмах. Дальнейшее развитие данного направления исследований требует междисциплинарного сотрудничества. Особую роль здесь играют взаимодействия между представителями разных научных школ – от экологов и токсикологов до специалистов по профессиональным заболеваниям и биохимиков. Именно их совместная заинтересованность способна стимулировать аналитиков к созданию все более совершенных методов исследования, что, в конечном счете, приведет к новым открытиям в области металломики, speciation-анализа и их влияния на живые системы.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

Айсувакова О.П., Скальный А.В. Применение масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой для speciation-анализа соединений мышьяка и ртути в волосах человека. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018; 21(7): 36. [Ajsuvakova O.P., Skalny A.V. Primenenie mass-spektrometrii s induktivno svyazannoj plazmoj dlya speciation-analiza soedinenij myshyaka i rtuti v volosah cheloveka. Voprosy biologicheskoj, medicinskoj i farmacevticheskoj himii. 2018; 21(7): 36. (In Russ.)].

Золотов Ю.А. Гибридные методы анализа. Журнал аналитической химии. 1977; 32: 2085–2086. [Zolotov Yu.A. Gibridnye metody analiza. Zhurnal analiticheskoj himii. 1977; 32: 2085–2086. (In Russ.)].

Серебрянский Е.П., Скальный А.В., Чечеватова О.А. и др. Комплексный подход к элементному анализу волос с использованием методов ИСП-АЭС и ИСП-МС. Микроэлементы в медицине. 2003; 4(1): 41–46. [Serebryanskij E.P., Skalny A.V., Chechevatova O.A. i dr. Kompleksnyj podhod k elementnomu analizu volos s ispolzovaniem metodov ISP-AES i ISP-MS. Mikroelementy v medicine. 2003; 4(1): 41–46. (In Russ.)].

Ajsuvakova O.P., Skalnaya M.G., Michalke B. et al. Alteration of iron (Fe), copper (Cu), zinc (Zn), and manganese (Mn) tissue levels and speciation in rats with desferioxamine-induced iron deficiency. Biometals. 2021: 34(4): 923–936.

Akramipour R., Golpayegani M.R., Gheini S., Fattahi N. Speciation of organic/inorganic mercury and total mercury in blood samples using vortex assisted dispersive liquid-liquid microextraction based on the freezing of deep eutectic solvent followed by GFAAS. Talanta. 2018; 186: 17–23.

Alzate A., Cañas B., Pérez-Munguía S. et al. Evaluation of the Inorganic Selenium Biotransformation in Selenium-Enriched Yogurt by HPLC-ICP-MS. J. Agric. Food Chem. 2007; 55: 9776–9783.

Birla K., Szpunar J., Robinson R. Specific determination of selenoamino acids 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; 624: 195–202.

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. Atlanta. 2010; 81: 180–186.

Chen X.P., Han C., Cheng H.Y., Wang Y.C., Liu J.H., Xua Z.G., Hu L. Rapid speciation analysis of mercury in seawater and marine fish by cation exchange chromatography hyphenated with inductively coupled plasma mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 2013; 1314: 86–93.

Chen Y.W., Zhou M.D., Tong J., Belzile N. Application of photochemical reactions of Se in natural waters by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. Anal. Chim. Acta. 2009; 545: 142–148.

Chu Y.L., Jiang S.J. Speciation analysis of arsenic compounds in edible oil by ion chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 2011; 1218: 5175–5179.

Devi P.G., Chakraborty P.K., Dasgupta D. Inhibition of Zn(II)-containing enzyme, alcohol dehydrogenase, by anticancer antibiotics, mithramycin and chromomycin A(3). J. Biol. Inorg. Chem. 2009; 14: 347–359.

Flynn H.C., McMahon V., Diaz G.C. et al. Assessment of bioavailable arsenic and copper in soils and sediments from the Antofagasta region of northern Chile. Sci. Total Environ. 2002; 286: 51–59.

Gajdosechova Z., Pagliano E., Zborowski A., Mester Z. Headspace in-tube microextraction and GC-ICP-MS determination of mercury species in petroleum hydrocarbons. Energy Fuels. 2018; 32: 10493–10501.

Giraaldez I., Ruiz-Azcona P., Vidal A., Morales E. Speciation of selenite and selenoamino acids in biota samples bdual stir bar sorptive extraction-single desorption-capillary gas chromatography/mass spectrometry. Microchim. J. 2017; 122: 197–204.

Haghnazari L., Mirzaei N., Arfaeinia H., Karimyan K., Sharafi H., Fattahi N. Speciation of As(III)/As(V) and total inorganic arsenic in biological fluids using new mode of liquid-phase microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. Biol. Trace Elem. Res. 2018; 183: 173–181.

Hu P.Y., Wang X., Yang L., Yang H.Y., Tang Y.Y., Luo H., Xiong X.L., Jiang X., Huang K. Speciation of mercury by hydride generation ultraviolet atomization-atomic fluorescence spectrometry without chromatographic separation. Microchem. J. 2018; 143: 228–233.

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. Spectrum. 2004; 19: 644–648.

Ibrahim A.S.A., Al-Farawati R., Hawas U., Shaban Y. Recent microextraction techniques for determination and chemical speciation of selenium. Open Chem. 2017; 15: 103–122.

Li J.H., Liu J.Y., Lu W.H., Gao F.F., Wang L.Y., Ma J.P., Liu H.T., Liao C.Y., Chen L.X. Speciation analysis of mercury by dispersive solid-phase extraction coupled with capillary electrophoresis. Electrophoresis. 2018; 39: 1763–1770.

Li P.; Chen Y.J.; Hu X.; Lian H.Z. Magnetic solid phase extraction for the determination of trace antimony species in water by inductively coupled plasma mass spectrometry. Talanta. 2015; 134: 292–297.

Liu L.H., He B., Yun Z.J., Sun J., Jiang G.B. Speciation analysis of arsenic compounds by capillary electrophoresis on-line coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry using a novel interface. J. Chromatogr. A. 2014; 1304: 227–233.

Mendez H., Lavilla I., Bendicho C. Mild sample pretreatment procedures based on photolysis and sonolysis-promoted redox reactions as a new approach for determination of Se(IV), Se(VI) and Se(-II) in model solutions by the hydride generation technique with atomic absorption and fluorescence detection. J. Anal. Atom. Spectrom. 2006; 19: 1379–1385.

Michalke B. Element speciation definitions, analytical methodology, and some examples. Ecotoxicology and Environmental Safety. 2003; 56(1): 122–139.

Miroshnikov S.A., Notova S.V., Skalnaya M.G. et al. Speciation of serum copper and zinc-binding high-and low-molecular mass ligands in dairy cows using HPLC-ICP-MS technique. Biological Trace Element Research. 2022; 200(2): 591–599.

Naranmandura H., Bu N., Suzuki K.T., Lou Y., Ogra Y. Distribution and speciation of arsenic after intravenous administration of monomethyl monothioarsenate acid in rats. Chemosphere. 2010; 81: 206–213.

Nevado J.J.B., Martín-Doimeadios R.C.R., Krupp E.M., Bernardo F.J.G., Fariñas N.R., Moreno M.J., Wallace D., Ropero M.J.P. Comparison of gas chromatographic hyphenated techniques for mercury speciation analysis. J. Chromatogr. A. 2011; 1218: 4545–4551.

Panhwar A.H., Tuzen M., Hazer B., Kazi T.G. Solid phase microextraction method using a novel polystyrene oleic acid imidazole polymer in micropipette tip of syringe system for speciation and determination of antimony in environmental and food samples. Talanta. 2018; 184: 115–121.

Panhwar A.H., Tuzen M., Hazer B., Kazi T.G. Solid phase microextraction method using a novel polystyrene oleic acid imidazole polymer in micropipette tip of syringe system for speciation and determination of antimony in environmental and food samples. Talanta. 2018; 184: 115–121.

Panhwar A.H., Tuzen M., Kazi T.G. Ultrasonic assisted dispersive liquid-liquid microextraction method based on deep eutectic solvent for speciation, preconcentration and determination of selenium species (IV) and (VI) in water and food samples. Talanta. 2017; 175: 352–358.

Pena-Pereira F., Lavilla I., Bendicho C. Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review. Spectrochim. Acta B. 2009; 64: 1–15.

Rahman I.H.A., Chua-anusorn W., Webb J. et al. Characterization of dugong liver ferritin. Anal. Chim. Acta. 1999; 393: 235–243.

Rekhi H., Rani S., Sharma N., Malik A.K. A review on recent applications of high-performance liquid chromatography in metal determination and speciation analysis. Crit. Rev. Anal. Chem. 2017; 47: 524–537.

Reyes L.H., Mar J.L.G., Rahman G.M.M., Seybert B. Simultaneous determination of arsenic and selenium species in fish tissues using microwave-assisted enzymatic extraction and ion chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. Talanta. 2012; 78: 983–990.

Sánchez-Rodas D., Mellano F., Martínez F., Palencia P., Giráldez I., Morales E. Speciation analysis of Se-enriched strawberries (*Fragaria ananassa* Duch) cultivated on hydroponics by HPLC-TR-HG-AFS. Microchem. J. 2016; 127: 120–124.

Sarmiento-Gonzalez A., Ensinar J.R., Cantarero-Roldan A.M. et al. HPLC-ICP MS and Stable Isotope-Labeled Approaches To Assess Quantitatively Ti(IV) Uptake by Transferrin in Human Blood Serum. Anal. Chem. 2008; 80: 8702–8711.

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; 621: 148–154.

Teran-Baamonde J., Bouchet S., Tessier E., Amouroux D. Development of a large volume injection method using a programmed temperature vaporization injector-gas chromatography hyphenated to ICP-MS for the simultaneous determination of mercury, tin and lead species at ultra-trace levels in natural waters. J. Chromatogr. A. 2018; 1547: 77–85.

Timerbaev A.R. Element speciation analysis by capillary electrophoresis: What are the hints on becoming a standard analytical methodology. Anal. Chim. Acta. 2001; 433: 165–180.

Vieira M.A., Ribeiro A.S., Curtius A.J., Sturgeon R.E. Determination of total mercury and methylmercury in biological samples by photochemical vapor generation. Anal. Bioanal. Chem. 2007; 388: 837–847.

Welna M., Pohl P. Potential of the hydride generation technique coupled to inductively coupled plasma optical emission spectrometry for non-chromatographic As speciation. J. Anal. Atom. Spectrom. 2017; 32: 1766–1779.

Xi J.C., He M.C., Wang K.P., Zhang G.Z. Comparison of masking agents for antimony speciation analysis using hydride generation atomic fluorescence spectrometry. Front. Environ. Sci. Eng. 2015; 9: 970–978.

Yang Y., Tan Q., Lin Y., Tian Y.F., Wu L., Hou X.D., Zheng C.B. Point discharge optical emission spectrometer as a gas chromatography (GC) detector for speciation analysis of mercury in human hair. Anal. Chem. 2018; 90: 11996–12003.

Zeng C.J., Yan Y.Y., Tang J., Wu Y.H., Zhong S.S. Speciation of Arsenic (III) and Arsenic(V) based on Triton X-100 hollow fiber liquid phase microextraction coupled with flame atomic absorption spectrometry. Spectrosc. Lett. 2017; 50: 220–226.

Zhang L., Morita Y., Sakuragawa A., Isozaki A. Inorganic speciation of As(III, V), Se(IV, VI) and Sb(III, V) in natural water with GF-AAS using solid phase extraction technology. Talanta. 2007; 72: 723–729.

Информация об авторе:

Дмитрий Михайлович Ляпуновский – аспирант, стажер-исследователь НИИ Молекулярной и клеточной медицины, Медицинский институт; ведущий химик-аналитик;
ORCID: 0009-0003-4863-1792

SEPARATION METHODS FOR SPECIATION ANALYSIS IN BIOMEDICAL RESEARCH

D.M. Lyapunovsky

Peoples' Friendship University of Russia;
6 Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russian Federation
ANO "Center for Biotic Medicine",
Zemlyanoy Val str., d. 46, Moscow, 105064, Russian Federation

ABSTRACT. Speciation analysis (analysis of chemical forms of elements) is an important field in analytical chemistry, which makes it possible to determine not only the total content of an element, but also its specific chemical forms (types). As a rule, two complementary methods are needed for speciation analysis of trace elements – separation and detection. The first ensures efficient and reliable separation of forms, while the second ensures adequate detection and quantification. This is especially important for understanding the bioavailability, toxicity, and environmental impact of the elements. The article considers the most modern, applied and available methods of separation of forms of some chemical elements. Progress in analytical tools and methodology makes it possible to identify and analyze the forms presented in a specific individual system.

KEYWORDS: speciation analysis, inductively coupled plasma mass spectrometry, high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis, selenium, arsenic, mercury.

For citation: Lyapunovsky D.M. Separation methods for speciation analysis in biomedical research. Trace elemets in medicine. 2025;26(2):55–62. DOI: 10.19112/2413-6174-2025-26-2-55-62.

Information about the author:

D.M. Lyapunovsky – Post-graduate Student, Research Intern, Research Institute of Molecular and Cellular Medicine, Medical Institute; Leading Analytical Chemist;
ORCID: 0009-0003-4863-1792

Поступила 10 февраля 2025 года
Принята к публикации 30 мая 2025 года