

Развитие на аналитичната методология за контрол на следи от химични елементи и химични видове в рамките на проекта BSEA по програмата SCOPES

В. И. Славейкова¹, И. Б. Караджова², И. Г. Дакова², Д. Л. Цалев^{2*}

¹ Лаборатория „Биофизикохимия на околната среда“, Федерална политехника на Лозана, EPFL ENAC ISTE-GE, CH-1015 Лозана, Швейцария

² Катедра „Аналитична химия“, Химически факултет, Софийски университет „Св. Кл. Охридски“, бул. „Дж. Баучер“ 1, София 1164
Факс: (02) 9625438, ел. поща: tsalev@chem.uni-sofia.bg

Постъпила на 8.06.2009 г., рецензирана на 29.06.2009 г.

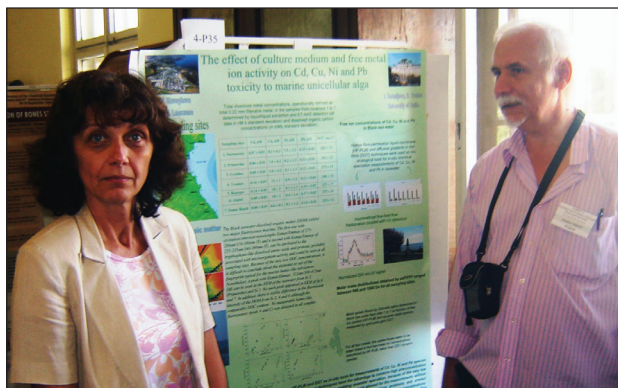
В края на м. септември 2008 г. успешно приключи тригодишният международен проект „Екотоксикологична оценка на Черно море“ (Black Sea Ecotoxicity Assessment, BSEA) по двустранно сътрудничество в рамките на програмата SCOPES на Швейцарската национална научна фондация (SNSF) между лаборатория „Биофизикохимия на околната среда“ към Федералната политехника на Лозана и колектив от катедра „Аналитична химия“ към Химическия факултет на СУ „Св. Кл. Охридски“ (фиг. 1 и 2). Изпълнението на проекта създаде възможности за подобряване на материалната база на Химическия факултет (ХФ) чрез закупуване на атомноабсорбционен спектрометър с приставка за генериране на хидриди и пари на живака в непрекъснат поток и създаване на съответна лаборатория в ХФ (фиг. 3). Беше осъществено плодотворно сътрудничество с редица звена в страната и чужбина: регионалните лаборатории в Бургас и Варна към Министерството на околната среда и водите, лаборатория „Водоразтворими полимери, полиелектролити и

биополимери“ към ХФ (проф. дн Г. С. Георгиев), Институт по химия към университета в Скопие (проф. Т. Стафилов), Институт по химия на храните в Скопие (И. Серафимовски), Национален център за защита на общественото здраве (н.с. I ст. Л. Мечкуева, н.с. I ст. Р. Б. Георгиева), Геологически институт при БАН (ст.н.с. II ст. д-р М. Караджов) и др. Основните научни резултати по проекта са публикувани в специализирани научни списания в чужбина [1–7] и са докладвани на редица конференции у нас и в чужбина [8–21]. В настоящата публикация е даден кратък обзор на някои от основните приноси по проекта, с оглед постигане на по-добро документиране и по-широка публичност сред научната общественост в страната.

Черно море и неговото крайбрежие представляват уникална географска система с неограничено значение за регионалната екология, климат, туризъм, култура и икономика. Съществува добре организирана система за рутинен контрол на замърсяванията и антропогенните въз-



Фиг. 1. Проф. д-р В. Славейкова демонстрира HF-PLM на международната конференция BSCAS-4.



Фиг. 2. Доц. д-р И. Караджова и чл. кор. проф. дн Д. Цалев представят методите HF-PLM и DTG на международната конференция ICOSECS-6.



Фиг. 3. Новата лаборатория по AAS с генериране на пари, създадена по проекта BSEA.

действия. Проектът BSEA даде възможности за нови изследвания извън рамките на традиционните анализи и мониторинг на общите съдържания на токсичните елементи, насочени към модерното и перспективно направление „Специационен анализ“ (speciation analysis) [22], получаване на данни за някои недостатъчно изследвани токсични елементи (As, Cd, Cu, Hg, Ni, Pb) и техни токсикологично-значими химични видове и фракции [1,4,7,12,18], насочване към пробовземане около туристически обекти в края на активния туристически сезон (септември 2006 и 2007), изпитване на нови сорбенти за концентриране на следи от елементи от води с високо солево съдържание [2,3,5,6], вкл. на основата на селективни йонно-отпечатани полимери (ИП) за Hg(II) [5] и Cu(II) [2,10], въвеждане на нови методи за изпитване на място (*in situ, on-site*) [7], изследване на екоотоксичност спрямо морски алги при условия близки до естествените [4,7,14], отнасяне на данните към други параметри (съдържание на хранителни вещества, разтворена органична материя и др.) [4,7,14,18], разширяване на възможностите на методите с генериране на пари [1,4,5,8, 11-13] и др.

Известно е, че определянето на общото съдържание на микроелементите е необходима, но недостатъчна характеристика за оценка на въздействието и поведението им в околната среда, както и на тяхната токсичност/усвояемост във води, храни, напитки и др. [22–24]. Специационният анализ като метод на количествения анализ е насочен към определяне на конкретен химичен вид или форма на елемента (chemical species) в представената за анализ проба [22]. В редица случаи, когато не е възможно да се идентифицира конкретен химичен вид/форма, се определя съдържанието на микроелемента в конкретна фракция на пробата. Етапите на аналитичната процедура включват: количествено отлъчване и концентриране на химичните форми на даден елемент, хроматографското им разделяне и следваща детекция с инструментален метод. Вариант на специационен анализ е приложението на подходящ инструментален метод за селективно определяне на дадени химични форми – широко използвани методи в този аспект са хидридно генериране [23], методът на студените пари за определяне на живак [24] и

волтамперометрията. За количествено определяне на токсичните елементи в концентратите и разделените фракции бяха използвани високочувствителни методи на атомната спектроскопия: атомноабсорбционна (AAS), вкл. пламъкова (FAAS) [2,3,5,6,9], електрогермична (ETAAS) [1,2–4,6,7,10,19], атомноабсорбционна спектроскопия с хидридно генериране (HGAAS) [1,4], метод на студените пари (CVAAS) [5] и атомноабсорбционна спектроскопия с улавяне на хидридите в графитен атомизатор (HG-ETAAS) [1,4,12], атомноемисионна спектрометрия с индуктивно-свързана плазма (ICP-AES) [19,20] и масспектрометрия с индуктивно-свързана плазма (ICPMS) [4,7,20].

Синтезирани, охарактеризирани и изпитани са нови сорбенти за концентриране на следи от елементи, които са приложени към проби от морски води [2,3,5,6,9,10,20]. За селективна твърдофазна екстракция на Cu(II) и Fe(III) при pH 4–5 е предложен микросферичен сорбент от съполимер на метакрилова киселина (МКА) и триметилпропан триметакрилат (ТМТМА), за който са демонстрирани предимствата на монодисперсни микросфери, добра селективност и повторемост, както и ниска празна проба [3]. Йоните от „разтворимата“ фракция (след филтруване през целулозен мембранен филтър 0.2 μm) се концентрират от 50 ml морска вода при pH 4–5 върху 10 mg сорбент в течение на 30 min, след което се елуират с 1 ml 1 M HNO₃ [3,9]. Същият поликарбоксилатен микросферичен полимерен гел, поли(МКА-со-ТМТМА), е приложен в динамичен режим в микроколони за групово концентриране на Cd, Co, Cu, Ni, Fe и Pb от 100 ml проби морска вода при pH 8.0–8.1 върху 100 mg сорбент, след което се елуира с 2 ml 2 M HNO₃, с аналитичен добив 91–96 и 93–99% за проби без и с внесени добавки [6]. Сорбентът може да се използва до 50 цикъла. Границите на откриване на комбинирания ETAAS метод са 0.005–0.05 $\mu\text{g l}^{-1}$, а намерените съдържания на Cd, Cu, Co, Ni, Fe и Pb в крайбрежни морски води (Бургас, Атия, Вромос) са съответно в границите 0.021–0.035, 0.041–0.067, 0.013–0.047, 0.058–0.082, 134–178 и 0.029–0.051 $\mu\text{g l}^{-1}$ [6].

Синтезирани са селективни йонно-отпечатани полимери (ИП) за Cu(II) [2,10] и Hg(II) [5]. Като лиганд за Cu(II) е използван 4-(2-пиридилазо)резорцинол (PAR) [2]. При pH=7.0 и концентриране в прекъснат режим от 50 ml морска вода върху 25 mg сорбент в течение на 30 min и елуиране с 2 ml 1 M HNO₃ е постигнат аналитичен добив 99.4–103.0%, относително стандартно отклонение 4–8%, граница на откриване на ETAAS 0.001 $\mu\text{mol l}^{-1}$ за Cu(II) в морска вода и производителност 20 проби/час [2]. Резултатите са в отлично съгласие с класическата, по-трудоемка екстракционно-атомноабсорбционна процедура с реактивите APDC-MIBK. Намерените концентрации на Cu(II) в проби от крайбрежни морски води, съответно в района на пристанище Варна, Бургас, Русалка и Ахтопол са 1.52, 1.81, 0.66 и 0.58 $\mu\text{mol l}^{-1}$ [2].

Синтезиран е и йонно-отпечатан полимер за Hg(II) [5]. Синтезът е проведен в присъствие на 2,2'-азобисизобутиронитрил като инициатор и Hg(II)-1-(2-тиазолилазо)-2-наф-

тол (TAN) [5]. Сорбентът има висока селективност по отношение на Hg(II) [5]. Той е приложен при определяне на форми на Hg (неорганичен Hg(II) и органичен CH₃Hg⁺ в морски води): аналитичната процедура включва определянето на неорганичен Hg(II) като първа стъпка и определянето на общото съдържание на живака (Hg(II) + CH₃Hg⁺) като втора стъпка след разлагане на пробите, а съдържанието на CH₃Hg⁺ се определя по разликата от измерванията в тези два етапа [5]. При pH=7.0 и концентриране в прекъснат режим от 200 ml морска вода върху 25 mg сорбент и елуиране с 2 ml 4 M HNO₃ е постигната граница на откриване 0.006 μmol l⁻¹ и RSD 5–9% за неорганичния Hg(II) с метода на студените пари в непрекъснат режим [5]. В някои от пробите от крайбрежни морски води се открива неорганичен Hg(II) в границите на 0.03–0.05 μg l⁻¹, а съдържанието на CH₃Hg⁺ е под границата на откриване.

Предложена е аналитична схема за определяне на форми на As (As(III), As(V), монометиларсонат MMA и диметиларсинат, DMA) в морски организми [1,4] и води [4]. Селективното определяне се постига чрез подходящо вариране на киселинността на средата и концентрацията на редуктора NaBH₄. По предложената схема са анализирани проби от крайбрежни води от 30 пункта по българското черноморско крайбрежие: средните съдържания са в интервалите 4–19 nM As(V), 0.2–8.5 nM As(III) и 0.1–0.5 nM DMA (като As) [4]. Повишени концентрации над 75 nM As(V) са открити около големите пристанища Варна и Бургас и залива Вромос.

Селективното хидридно генериране е приложено при определяне на токсикологично-значимата фракция на As [сумата от As(III) + As(V) + MMA + DMA] в морски организми [1,4,11]. Количественото извличане се постига при сравнително меки условия чрез микровълнова екстракция с тетраметиламониев хидроксид (ТМАН) с относително ниска концентрация на ТМАН (1 μL на 1 mg проба) или в смес метанол:вода 80:20 (v/v) [1,4,11]. Дефинирани са оптималните параметри (киселинност на средата и концентрация на разтвора на редуктора за хидридно генериране NaBH₄) за определянето на химичните форми на As. Наблюдаваните матрични пречения изискват метод на стандартната добавка за калибриране.

Изследвани са постъпването, биотрансформациите и токсичността на химичните видове на арсена (As(III), As(V), MMA, DMA) по отношение на зелените морски алги *Chlorella salina* в черноморска вода, в зависимост от различни фактори. Показано е, че с повишение на концентрацията на фосфат се наблюдава значително намаляване на съдържанието на As в клетките на *Chlorella salina* и на токсичния ефект на As(III) и As(V). По своята токсичност спрямо *Chlorella salina* арсеновите химични видове могат да се подредят в реда: As(V) ~ As(III) >> MMA ~ DMA [4].

Хроматографското разделяне на химични форми може да бъде успешно заменено със селективна сорбция, при което се постигат едновременно две цели – предва-

рително концентриране и селективно определяне. Определянето на йонни, силно токсични форми на елементите Cd(II), Cu(II), Ni(II) и Pb(II) в морски води е трудна аналитична задача. Използвани са два биоаналогови сензора – проникваема течна мембрана с кухи влакна (HF-PLM, hollow fibre permeable liquid membrane), през чиито пори могат да преминават само свободни йонни форми на елементите и дифузионни градиенти в тънки филми (DGT, diffusion gradients in thin films), при който разделянето е основано на различия в коефициенти на дифузия и лабилността на комплексите [7].

Измерванията са проведени на място (*in situ*) по Южното Черноморие и е показано, че повече от 95% от Cu(II), 97% от Ni(II) и 90% от Pb(II) са свързани в стабилни комплекси с органичната морска материя, а 70% от Cd(II) и Ni(II) са в свободна йонна форма [7]. Получените данни са използвани за оценка на биологичната достъпност на тези метали за микроорганизмите, които бяха сравнени след това и с експериментални резултати по отношение на зелени микроалги. Това е първото изследване, което комбинира едновременно *in situ* използване на DGT и HF-PLM с биологични изпитвания, с оглед намиране на връзка между химичните форми и биологичната достъпност на Cd, Cu, Ni и Pb в морска вода.

Предложените варианти за специационен анализ са базирани на прости и бързи аналитични процедури и са подходящи за приложение в аналитичната практика.

Благодарност

Авторите благодарят на програма SCOPES на Швейцарската национална научна фондация, в рамките на която беше финансиран и осъществен тригодишният проект между EPFL ISTE-ENAC (Lausanne, Switzerland) и СУ „Св. Кл. Охридски“ (2006–2008) „Black Sea Ecotoxicity Assessment“ (IB7320-110933/1).

Литература

1. I. B. Karadjova, P. K. Petrov, I. Serafimovski, T. Stafilov, D. L. Tsalev, Spectrochim. Acta B 62 (2007) 258.
2. I. Dakova, I. Karadjova, I. Ivanov, V. Georgieva, B. Evtimova, G. Georgiev, Anal. Chim. Acta, 584 (2007) 196.
3. I. Dakova, V. Georgieva, I. Alexandrov, I. Karadjova, G. Georgiev, Ann. Univ. Sofia, Fac. Chim. 100 (2008) 121.
4. I. B. Karadjova, V. I. Slaveykova, D. L. Tsalev, Aq. Toxicol. 87 (2008) 264.
5. I. Dakova, I. Karadjova, V. Georgieva, G. Georgiev, Talanta 78 (2009) 523.
6. I. G. Dakova, I. B. Karadjova, V. T. Georgieva, G. S. Georgiev, Microchim. Acta 164 (2009) 55.
7. V. I. Slaveykova, I. B. Karadjova, M. Karadjov, D. L. Tsalev, Environ. Sci. Technol. 43 (2009) 1798.
8. P. K. Petrov, D. L. Tsalev, in 'European Youth Academic Spring 2006', Workshop 3–7 April 2006, Sofia, Bulgaria, Book of Abstracts, p. 43.
9. И. Александров, И. Дакова, В. Георгиева, И. Караджова, Г. Георгиев, Пета национална конференция по химия за студенти и докторанти, май 2006, София, с. 89.

10. I. Dakova, I. Ivanov, V. Georgieva, I. Karadjova, I. Alexandrov, G. Georgiev, in 'Structure and Properties of Polymer Blends and Composites: Polymers for a Better Life', German-Bulgarian Workshop, 20–23 May 2006, Sofia-Gulechitsa, Bulgaria.
11. D. L. Tsalev, P. K. Petrov, I. B. Karadjova, I. Serafimovski, T. Stafilov, in VII European Furnace Symposium on Atomic Absorption Spectrometry, Electrothermal Vaporization and Atomization (EFS 2006) and XII Solid Sampling Colloquium with Atomic Spectrometry (XII SSC), 2–7 July 2006, Repino, St. Petersburg, Russia, Book of Abstracts, P-29, p. 84.
12. I. Serafimovski, I. B. Karadjova, T. Stafilov, D. L. Tsalev, in Chemical Sciences at the European Crossroads, International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries ICOSECS-5, 10–14 September 2006, Ohrid, Book of Abstracts, Vol. 1, ENV-29, p. 291.
13. D. L. Tsalev, in 'Microwaves and Ultrasound Activation in Chemical Analysis', COST D32WG5 Workshop 2006, 17–19 December 2006, Paisii Hilendarski University of Plovdiv, Plovdiv, L-8.
14. V. Slaveykova, I. Karadjova, D. L. Tsalev, in Fourth Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry, 19–23 September 2007, Sunny Beach, Bulgaria, Book of Abstracts, P147.
15. V. I. Slaveykova, C. Lamelas, N. Parthasarathy, in Fourth Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry, 19–23 September 2007, Sunny Beach, Bulgaria, Book of Abstracts, O8.
16. Y. Nia, S. Dubascoux, V. I. Slaveykova, G. Lespes, presented at GRUTTEE Congress 2007, 29–31 October 2007, Universite de Pau et des Pays de l'Adour, Pau, France.
17. V. I. Slaveykova, I. Karadjova, D. Tsalev, presented at SETAC Europe 18th Annual Meeting, 25–29 May 2008, Warsaw, Poland.
18. I. B. Karadjova, V. I. Slaveykova, D. L. Tsalev, in Chemistry and 21st Century Challenges: Science and Innovation, Sixth International Conference of the Chemical Societies of the South-Eastern European Countries, ICOSECS-6, 10–14 September 2008, Book of Abstracts, 4-P35, p. 239.
19. I. Karadjova, M. Karadjov, in ESAS'08 European Symposium on Atomic Spectrometry: Electrothermal Atomization, Vaporization and Laser Sampling, 28 September – 1 October 2008, Weimar, Germany, Program and Book of Abstracts, P15.
20. I. B. Karadjova, I. G. Dakova, M. G. Karadjov, V. T. Georgieva, G. S. Georgiev, in 6th Aegean Analytical Chemistry Days, 9–12 October 2008, Denizli, Turkey, Book of Abstracts, P142, p. 413.
21. Д. Л. Цалев, Химия и индустрия 79 (2008) 47.
22. Хр. Даиев, Специационен анализ, Библиотека 48, София, 2004.
23. J. Dedina, D. L. Tsalev, Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry, John Wiley & Sons, Chichester, 1995.
24. T. Stoichev, D. Amouroux, R. C. Rodriguez Martin-Doimeadios, M. Monperrus, O. F. X. Donard, D. L. Tsalev, Appl. Spectrosc. Rev. 41 (2006) 591.

Development of analytical methodology for control of trace elements and their chemical species within the frame of BSEA project of SCOPES program

V. I. Slaveykova¹, I. B. Karadjova², I. G. Dakova²,
D. L. Tsalev^{2*}

¹ Laboratory of Environmental Biophysical Chemistry, ISTE-ENAC, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL), CH-1015 Lausanne, Switzerland

² Chair of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, St. K. Ohridski University of Sofia, 1 J. Bourchier Blvd., 1164 Sofia, Bulgaria

Fax: +359-2-9625438, e-mail: tsalev@chem.uni-sofia.bg

A brief overview of the activities and main accomplishments of a three-year project 'Black Sea Ecotoxicity Assessment (BSEA)' funded by the Swiss National Science Foundation SCOPES programme is presented. Much attention is given to elaboration, optimization and combined application of relevant analytical, physicochemical and biophysical approaches to modelling and experimental determination of relevant chemical species, fractions and total amounts of several priority toxic elements, such as As, Cd, Cu, Hg, Ni, and Pb. The most sensitive atomic spectrometric techniques like flame, electrothermal, hydride generation and cold-vapour atomic absorption spectrometry, inductively coupled plasma mass spectrometry and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, with or without enrichment by vapour generation, hydride trapping, liquid/liquid extraction and solid phase extraction were employed.

Emphasis is put on *in vivo* and *in situ* measurements and on calibration and quality control issues, among them: *in vivo* fluorescence for characterization of dissolved organic matter; cell den-

sity; particle counting; mild conditions for alkaline solubilization of marine tissue prior to determination of hydride-active fractions with higher toxicological relevance by AAS; hollow fibre permeation liquid membranes (HF-PLM) for free ion contents; diffusive gradients in thin film gels (DGT) for dynamic metal species; asymmetrical flow-field flow fractionation coupled with UV detection; excitation/emission matrix fluorescence spectroscopy; use of ion-imprinted polymethacrylic microbeads for preconcentration and speciation of mercury (inorganic, methylated) by cold vapour AAS, etc. An 'intrinsic element specific speciation interference' for As in ETAAS was demonstrated.

The biouptake, biotransformations and toxicity of arsenic species arsenite, arsenate, monomethylarsenate (MMA) and dimethylarsinate (DMA) on marine green alga *Chlorella salina* in seawater from the Bulgarian Black Sea coast is evaluated; toxicity towards marine green algae decrease in the order: As(V) ~ As(III) >> MMA ~ DMA. Seawater enrichment with phosphate (up to 1.3 mg P l⁻¹) results in a significant reduction of both intracellular As content and toxicity due to As(III) and As(V). The obtained set of data was further used to evaluate the bioavailability of these metals to the microorganisms, which was then compared with experimental results of metal uptake to green microalga *Chlorella salina*. This is the first study that combines simultaneous *in situ* use of DGT and HF-PLM with bioassays to provide further insight to the relationship between speciation and bioavailability of Cd, Cu, Ni, and Pb in seawater.

Low level of marine pollution of coastal seawater by the examined trace elements at the end of active tourist season in September 2006 and 2007 was measured. Analytical procedures can easily be applied to laboratory practice.

Keywords: Black Sea; Seawater; Marine green algae; *Chlorella salina*; Speciation analysis; Biouptake; Ecotoxicity; Arsenic; Cadmium.