

Autoreferat rozprawy doktorskiej

”Scenariusz analityczny badania specjacji cynku w tkankach roślin hałdowych”

mgr Jakub Karasiński

promotor rozprawy: prof. dr hab. Ewa Bulska

Promotor pomocniczy: dr Marcin Wojciechowski

Praca wykonana w Pracowni Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej

Troska o środowisko naturalne i zdrowie człowieka powoduje potrzebę poznania procesów biochemicznych, którym podlegają pierwiastki w różnego rodzaju organizmach. Rolą chemika analityka jest uzyskanie informacji mogących pomóc w wyjaśnieniu metabolizmu danego pierwiastka, takich jak: całkowita zawartość pierwiastka w roślinie i jej poszczególnych częściach, czy rozmieszczenie pierwiastka w tkankach organizmu. Najcenniejsze są jednak informacje dotyczące form występowania badanego pierwiastka w tkankach, co wiąże się z koniecznością zbadania jego specjacji.

Analiza specjacyjna jest z reguły trudnym zadaniem, wymagającym indywidualnego podejścia i opracowania specyficznego schematu postępowania, często polegającego na rozdzieleniu form specjacyjnych (np. w układzie HPLC ICP MS) i porównaniu uzyskanych czasów retencji z czasami retencji substancji wzorcowych, a w celu ostatecznego potwierdzenia struktury – rejestracji widm mas i ich porównania z wzorcem. Sytuacja staje się bardziej skomplikowana, gdy prowadzimy badanie form specjacyjnych pierwiastka, dla których nie dysponujemy wzorcami. W przypadku analizy chromatograficznej, trudniej jest opracowywać metodę rozdzielenia chromatograficznego badanych związków, ponieważ nie dysponujemy żadnymi danymi odnośnie ich cech fizyko-chemicznych, przez co trudno określić czynniki mające istotny wpływ na retencję tych związków, a w związku z tym trudno wskazać odpowiednie mechanizmy rozdzielenia chromatograficznego. W przypadku rejestracji widm mas trudności związane są z niemożliwością wyboru optymalnych warunków rejestracji widma

danej substancji. W przypadku braku wzorca niemożliwe jest wystarczająco długie wprowadzanie do źródła spektrometru badanej substancji pozwalające na wybór optymalnych warunków rejestracji widma. W takim przypadku badana substancja jest wprowadzana przez bardzo krótki czas (równy w przybliżeniu szerokości pików), jako wyciek z kolumny chromatograficznej, przez co czas na wybór optymalnych warunków rejestracji widma ograniczony jest do kilku sekund. W konsekwencji spada czułość analizy i jakość otrzymanego sygnału. Kolejną trudnością jest niemożliwość porównania otrzymanego widma mas oraz ścieżek fragmentacji (widma MS^n) z danymi uzyskanymi dla wzorca. W konsekwencji zdarza się, że dostępnymi informacjami, które można wykorzystać do identyfikacji nieznanego pierwiastka, są dokładna masa cząsteczkowa i profil izotopowy, co czasami okazuje się zbyt mało specyficznym śladem.

W ramach niniejszej pracy opracowano scenariusz analityczny umożliwiający badanie specjacji cynku bez odnoszenia się do substancji wzorcowych. Wykorzystując chromatografię dwuwymiarową z pierwiastkowo specyficznym detektorem ICP MS opracowano metodę rozdzielania związków cynku i sposób przypisania sygnałów do poszczególnych form tego pierwiastka. Następnie dokonano wyboru optymalnych warunków chromatograficznego rozdzielania form cynku pozwalających na połączenie układu rozdzielającego ze spektrometrem umożliwiającym określenie mas cząsteczkowych i struktur rozdzielonych form cynku.

Obiektem badań opisanych w pracy była *Plantago lanceolata* L. (babka lancetowata), popularna roślina lecznicza, której zasięg występowania obejmuje niemal całą północną półkulę Ziemi. Roślina ta wykazuje przystosowanie do wzrostu na terenach zanieczyszczonych metalami (m. in. cynkiem). Prawdopodobnie wykształciła ona mechanizmy obronne, pozwalające unieszkodliwiać i akumulować metale w jej tkankach. Ważnym aspektem badań była próba porównania dwóch populacji rośliny *Plantago lanceolata* L. różniących się tolerancją na cynk. W ten sposób szukano dowodów wpływu wytworzonych przez roślinę mechanizmów tolerancji na specjację cynku w jej poszczególnych częściach. Nasiona roślin obu populacji zostały pozyskane z hałd pokopalnianych, terenów o bardzo dużej zawartości takich pierwiastków jak: cynk, ołów, kadm i tal (populacja hałdowa). Dla porównania badaniom poddano również rośliny hodowane z nasion pochodzących z terenów niezanieczyszczonych (populacja naturalna).

Podstawą podjęcia badań było to, że rośliny z badanej populacji roślin hałdowych wykazują wyższą tolerancję na cynk, w porównaniu do populacji z terenów niezanieczyszczonych.

W pierwszym etapie badań zaproponowano metodę określania całkowitej zawartości cynku w materiale roślinnym, wraz z elementami jej walidacji. Położono nacisk na wybór odpowiedniego izotopu, wybór optymalnych warunków pracy spektrometru, sposobu przygotowania próbek i ich mineralizacji. Dużo miejsca poświęcono ekstrakcji związków cynku z tkanki roślinnej do roztworu. Należy podkreślić, że jest to krok decydujący o sukcesie badania specjacji: zarówno pod kątem ilościowym, jak i jakościowym. Do ekstrakcji związków cynku użyto roztworów buforowych w szerokim zakresie pH (od 4,1 do 10,0), co pozwoliło na zbadanie wpływ pH ekstrahenta na specjację cynku i na ogólną wydajność ekstrakcji. Ekstrakcję prowadzono z materiału poddawanego wcześniej homogenizacji ciekłym azotem w celu zniszczenia ścian komórkowych i ułatwienia dostępu ekstrahenta do poszczególnych organelli komórkowych. Drugim z zaproponowanych sposobów była ekstrakcja CO₂ w stanie nadkrytycznym. Ważnym aspektem pracy było porównanie ekstrakcji po homogenizacji ciekłym azotem i ekstrakcji z zastosowaniem CO₂ w stanie nadkrytycznym pod względem: ogólnej wydajności ekstrakcji, stężenia związków cynku w ekstrakcie, czy zachowania oryginalnej specjacji cynku.

Następnie opracowano scenariusz analityczny umożliwiający oznaczanie cynku i jego związków w tkankach rośliny *Plantago*. Zastosowano dwa mechanizmy rozdzielania w układzie wysokosprawnej chromatografii cieczowa: I - chromatografia wykluczenia; II - chromatografia kationowymienna, a także: I - chromatografia anionowymienna, II – chromatografia kationowymienna. W obu układach rejestrowano sygnały z użyciem spektrometru mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej.

W efekcie możliwa była obserwacja wpływu pH ekstrahenta na całkowitą wydajność ekstrakcji i specjację cynku (2D HPLC ICP MS). Zauważono, że wraz ze wzrostem pH ekstrahenta rośnie różnorodność form cynku, ale maleje ogólna wydajność ekstrakcji. Zaobserwowano, że tylko ekstrahenty o pH 7,4 i 10,0 pozwoliły na rejestrację sygnałów od wielkocząsteczkowej frakcji cynku (HMW). Zastosowanie ekstrakcji CO₂ w stanie nadkrytycznym umożliwia otrzymanie ekstraktów o bardzo wysokim stężeniu poszczególnych form cynku, co wynika

z bardzo korzystnego (wysokiego) stosunku masy próbki roślinnej do ostatecznej masy ekstraktu. Wydajność ekstrakcji z zastosowaniem CO₂ w stanie nadkrytycznym jest natomiast porównywalna do tej otrzymanej dla ekstrakcji po homogenizacji ciekłym azotem. Opracowany scenariusz analityczny zastosowano do porównania pod kątem specjacji cynku dwóch populacji rośliny *Plantago*. Porównano również specjację Zn w podziemnych i nadziemnych częściach roślin obu populacji.

Ostatnim etapem eksperymentu była próba określenia dokładnych mas cząsteczkowych i ewentualnie struktury rozdzielonych związków cynku z użyciem techniki łączonej HPLC ESI MS. W tym celu opracowaną technikę rozdzielania związków cynku zastosowano w połączeniu ze spektrometrem mas z jonizacją przez elektrorozpylenie. Identyfikacja nieznanymi form cynku okazała się jednak zadaniem trudnym. Nie udało się zarejestrować widm mas dla składników frakcji LMW i HMW. Związki cynku obserwowano jedynie przy czasie retencji charakterystycznym dla frakcji lżejszej niż 1360 j.m.a.