

Получена: 5 септември 2014  
Редактирана: 4 декември 2014  
Приета: 5 декември 2014  
Излязла online: 22 декември 2014

# Масспектрометрията в контекста на омикс технологиите: основен инструмент за бионеорганичния анализ на растения

ОБЗОР

Крум Бърдаров\*, Румяна Джингова

Факултет по химия и фармация, Софийски университет „Св. Климент Охридски“,  
бул. Джеймс Баучер № 1, 1164 София, България

\* Автор за кореспонденция. E-mail: [krum.bardarov@chem.uni-sofia.bg](mailto:krum.bardarov@chem.uni-sofia.bg)

През последните две десетилетия се обособи и бързо се разви нов подход на третиране и изследване на живите организми – “omics”-подходът (например genomics, proteomics, metabolomics, metalomics). В контекста на това ново направление и погледът към елементния състав на живите организми претърпя еволюция. Елементният анализ на растенията в последното десетилетие все повече се насочва към изясняване не само на качествения и количествен състав, но и към изясняване на връзката между елементен състав и физиологията на организма, бионеорганичните и биоорганични взаимодействия на елементите в него. Широко навлезлите масспектрални техники дават големи възможности за комплексно изследване на химичния състав на тъканите. Това насочва интереса на аналитиците по-скоро към елементната специация (разпределението на елементите в организма и химичните форми под които те се намират в него) и анализът на хетероелементите в техните свързани форми в организма *in-vivo*. За целта е необходимо значително по-сериозно внимание при планиране на експериментите, с използване на сложни комбинации от техники, преди всичко с масспектрални инструменти. Настоящата обзорна работа цели да обобщи по-често използваните масспектрални и комбинирани („hyphenated techniques“) техники при анализ на елементите в техните свързани форми и разпределение (елементна специация) в растителни тъкани. Разгледани са EI, CI, ESI, ICP масспектрометрия и комбинацията им с някои от хроматографските и нехроматографски (LA, MALDI, SIMS) методи за разделяне.

Крум Бърдаров завършва магистратура „Съвременни масспектрални и хроматографски методи за анализ“ във Факултета по химия и фармация при Софийски университет „Св. Климент Охридски“ през 2011 г. От 2012 г. е редовен докторант в катедра Аналитична химия под ръководството на проф. Румяна Джингова. През 2010-2012 работи като експерт в Българска агенция по безопасност на храните. Научните му интереси са в областта на аналитичната химия и всичките ѝ практически приложения за органичен и неорганичен (био) химичен и генетичен анализ. Крум Бърдаров е член на Българското фитохимично дружество и американското химическо общество. През 2013 г. Печели проект в рамките на инициативата „Наука-Бизнес“ и специализира в Гьотинген, Германия, в областта на омикс-технологиите.



**Ключови думи:** комбинирани аналитични техники; мас спектрометрия; специационен анализ; омикс; растителни тъкани

**Съдържание:**

<b>Въведение. Науката за растенията – наука за живота.....</b>	<b>112</b>
<b>ОМИКС- технологиите: потенциалните отговори на съществуващите проблеми.....</b>	<b>113</b>
<b>Достатъчна ли е йономиката?.....</b>	<b>114</b>
<b>Бионеорганичният анализ - необходим и полезен.....</b>	<b>114</b>
<b>Масспектрометрията – основен инструментален метод за бионеорганичен анализ.....</b>	<b>114</b>
<b>Масспектрометрия.....</b>	<b>115</b>
<b>Йонизационни източници.....</b>	<b>115</b>
<b>Електронна йонизация и химична йонизация (използват се при GC/MS).....</b>	<b>115</b>
<b>Електроспрей, APPI, APCI (използва се при LC/MS).....</b>	<b>116</b>
<b>ICP-MS .....</b>	<b>117</b>
<b>Йонизационен източник.....</b>	<b>117</b>
<b>Интерфейс плазма / масспектрометър.....</b>	<b>117</b>
<b>Масспектрометри за ICP-MS.....</b>	<b>118</b>
<b>Хроматография.....</b>	<b>118</b>
<b>Комбинирани техники (Hyphenated techniques).....</b>	<b>118</b>
<b>LA-ICP-MS.....</b>	<b>118</b>
<b>SIMS.....</b>	<b>119</b>
<b>Imaging MALDI-MS.....</b>	<b>119</b>
<b>Заклучение.....</b>	<b>120</b>

**Въведение. Науката за растенията – наука за живота**

Растенията представляват една голяма част от света, в който живеем. Те са част от биосферата на Земята и основен източник на енергия и органични вещества за растежа на почти всички организми, обитаващи суша и вода. Използват слънчевата енергия и я превръщат в химична, като синтезират въглеродни хидрати, протеини, липиди, нуклеинови киселини и много други органични вещества от неорганични. Растенията са ключов компонент на всички екосистеми и основен участник в кръговрата на водата и хранителните вещества. Те влияят върху стабилността на почвата и формирането на микроклимата. Усвояват въглеродния диоксид и поддържат нивото на кислорода, като са основен фактор за регулацията на състава на атмосферата. Растенията осигуряват живота на останалите живи организми и представляват основен източник на храна и много суровини за индустрията и медицината.

Растенията са сложни организми, отличаващи се с по-богат геном от някои животни [1]. Те се отличават коренно от животните и гъбите по своето устройство, метаболизъм, начин на развитие и стратегии за набавяне, транспорт на ресурси и комуникация.

С оглед на тенденцията за увеличаване населението на Земята (в рамките на този век се прогнозира то да надвиши 10 милиарда) се налага необходимостта от допълнителни хранителни ресурси, като в същото време човечеството вече използва наличните на Земята подходящи за производство на храни пространства. Нещо повече, те намаляват, вследствие на урбанизация, ерозия или засоляване [2]. Преустройството на гори в селскостопански площи е крайно нежелателно поради дисбаланса на атмосферата и редица екосистеми. Необходими са спешни мерки за незабавно увеличаване ефективността на земеделието, като същевременно се запазват качествата на почвите, икономисва се питейна вода и се намаляват изхвърляните в атмосферата емисии (4).

Румяна Джингова е възпитаник на Първа английска гимназия и Факултета по химия и фармация на СУ"Св. Кл.Охридски" Доктор на химическите науки (2003г), професор по аналитична химия (2005г.), ръководител на катедра Аналитична химия (2007 -2011 г.) и на Лабораторията по „Следови анализ“ към Катедрата по аналитична химия. Титуляр на курсовете по Инструментални методи – I част, Аналитична химия на околната среда, Радиоекология, Радиоаналитична химия. Автор и съавтор е на 140 научни публикации, обзори и глави от монографии. Основните научни интереси са в областта на инструменталните методи за анализ, аналитичната химия на околната среда, радиоекология, биомониторинг, археометрия.



В контекста на тези факти науката за растенията е подходящ инструмент за справяне с дискутираните проблеми, тъй като по-доброто разбиране на тази част от нашата среда, би могло да осигури по-ефективно и правилно използване на растенията, като основен ресурс на храни и суровини. Изследванията на различни организации [3-8] са безспорен признак за тази необходимост.

В Европа [9] през следващото десетилетие ще бъде приоритет работата в направления като: развитие на фундаменталната наука за растенията с цел по-ефективното им отглеждане, развитие на технологиите и разширяване изследването на растенията, подобряване и създаване на нови по-устойчиви и продуктивни растителни видове за изграждане на икономики, базирани на растителните култури и поддържане на селското стопанство в хармония с околната среда.

Познанията за растенията са необходими за разбиране и справяне с климатичните промени и тяхното влияние в селското стопанство и екосистемите. Те ще разкрият възможности за нови приложения в медицината и хигиената на населението и по-устойчиво развитие в експлоатацията и поддържането им като ресурс.

За осъществяването на подобни приоритетни задачи „науките за живота“ са изправени пред редица сериозни предизвикателства и въпроси, на които трябва да дадат разумни отговори.

Напредъкът във фундаменталните природонаучни изследвания позволява големи подобрения в отглеждането на растителни култури от човека, с по-високи добиви, стабилност в реколтите, чрез подобряване на качествата на растенията и осигуряване на по-висока резистентност към патогени. Науките за гените изиграха голяма роля за това. Учените напредват в разбирането на биохимичните и молекулярни процеси, които дават ключ към важните метаболитни и физиологични черти на растенията и онези, свързани с развитието на растенията и преодоляването на неблагоприятните условия на околната среда (абиотични) или патогенната атака (биотични). Всичко това изисква ниво на познание и техника, които едва днес могат да доведат до бърз напредък в дълбокото опознаване на растенията.

### ***ОМИКС- технологиите: потенциалните отговори на съществуващите проблеми***

През последните две десетилетия се обособи и бързо се разви нов подход [10] на третиране и изследване на живите организми - подходът „omics“. Наставката –оме произлиза от гръцкото –ωμα и би следвало да означава напълно, изцяло, последователно и пълно изучаване на състава на даден биологичен вид, тъкан, клетка или друг фрагмент от „живото цяло“. Омикс революцията [11] започна с първата секвенция на част от ДНК през

70-те години на 20-ти век [12], а през 2001 бе секвенирана цялата човешка ДНК. Днес технологиите на геномиката се развиват много бързо и генерират огромни масиви от данни, но „прочитането“ на генома на един организъм би било изключително полезно едва тогава, когато е комбинирано с подробен фенотипен анализ.

Анализът на растителните фенотипове и физиологичните процеси представлява още по-голямо предизвикателство за науката от гените и изисква ефективното съчетаване на всички останали „omics-технологии“. Растителните черти, механизмите на разпределение на веществата, формата под която се намират химичните видове, фината архитектура, пътят на водата и хранителните вещества, ефективните физиологични и нежелани патологични взаимодействия, развитие и устойчивост са все още емпирични и неясни. Необходими са средства за тяхното изследване и описание и разкриване на фундаменталните аспекти на клетъчната биология и растителната физиология. Едновременното използване на ресурсите и откритията на физиката, нанотехнологиите, аналитичните стратегии, наред с информатиката и хемометричните подходи, би било полезно за визуализацията на сложните и динамични процеси в растенията.

Интегрирането на генерираната информация от високопродуктивно генотипиране и фенотипиране изисква прогрес в т.н. "системен изследователски подход", като дава глобален поглед върху това как функционират растенията и как взаимодействат с околната среда. Още по-важно е, че днес цялата област на науките за живота претърпява трансформации, целящи реализирането на такъв интегриран подход [12]. Създават се общи информационни ресурси (като бази данни за ДНК, протеини, липиди и др.).

Чрез тези системно-ориентирани подходи науката за растенията генерира и обобщава познанието и ресурса за разбирането на функциите на растенията, които могат да се пренесат към други области на изследване като ефективно отглеждане, агрономични технологии, медицина, хигиена, биотехнология и екология.

Новите технологии в геномиката доведоха до експоненциален ръст в бързината, мащабите и надеждността на основните техники за секвениране, генотипиране и биотехнологични похвати. Ако през 2001 за прочитането на целия геном на един вид бяха необходими месеци/години, то днес това става в рамките на дни в една лаборатория, а в рамките на следващото десетилетие, вероятно всеки човек ще притежава запис на своето ДНК. Геномът, обаче, е като сценарий, чиято реализация зависи от много фактори извън него. Затова значителен интерес представлява пътят и реализацията на генетичната информация - полето на транскриптомика, протеомика, метаболомика, с всички техни подразделения, интегрирани в един системен подход - **системната**

**биология.** Тя, с нейните омикс е ключ към успеха в опознаването на живота и посрещане на стоящите предизвикателства.

### ***Достатъчна ли е йономиката?***

Йономиката е един от омикс-подходите на системната биология, който изучава йонната хомеостаза на растенията/организмите. Натрупването на елементите в растенията е сложен процес, контролиран от мрежа продукти на генна експресия, които регулират приема, свързването, транспорта и разпределението на елементите в организма. Безспорно локализирането на гените, свързани с „управлението“ на елементите в живия организъм е важна задача, но пътят от един ген до крайните продукти на тази мрежа от регулатори е дълъг и не винаги липсата на дефект в даден ген гарантира липса на дефект по пътя след него. В това би следвало да участват и външни фактори на средата, които повлияват експресията на гени, дори когато липсват „вродени“ генетични дефекти. Много гени и физиологични процеси засягат повече от един елемент, затова от една страна е важно при елементния анализ да се обхващат колкото може повече елементи - всички налични в клетката/тъквата/организма (целият йонем), за да се проследят връзките между даден ген и елементите и взаимните връзки между елементите. От друга страна е необходима и информация за формата и начина на свързване на елементите с органични молекули, което ще даде информация за физиологичните процеси, в които участват. Елементите, които споделят една и съща метаболитна мрежа, от своя страна варират в зависимост от вида организъм/растение, генотипа и околната среда на индивида. Затова истински пълна картина би могла да се получи единствено, ако всички тези фактори се обхванат и наблюдават заедно. Ето защо съчетанието на йономиката с геномиката и останалите омикс технологии е обосновано и с изключение на огромния ресурс, който изисква, няма недостатъци.

### ***Бионеорганичният анализ - необходим и полезен***

Новите комбинирани техники („hyphenated techniques“) базирани на свързването на мас спектралните методи с течната хроматография и LC-ICP-MS значително подобряват разбиранията за елементна специация и нейната важност [13], например, за биоактивността на метал-свързаните форми в растенията. Развитието на методиките за пробоподготовка, екстракция и мултидименсионалните техники за разделяне днес позволяват характеризирането на важни метало-биомолекули в растенията, като например координирането на фитохелатини, металотионини, никотинамин и инозитол фосфати с металите. Това са важни лиганди в йонната хомеостаза,

транслокация и дългосрочно съхранение на елементите в живия организъм. Тъй като ICP-MS (Масспектрометрия с индуктивно-свързана плазма) много ефективно се допълва от бързоразвиващите се молекулни мас спектрални методи за структурен анализ, съчетани с хроматография, то истинският ефект от работа в подобна посока може да се постигне с успоредно използване на всички масспектрални (и други аналитични) методи за анализ на сложните биологични обекти. Силно се развиват и техниките за биоимиджинг, които дават отговор за пространственото разпределение на химичните елементи и органичните молекули в тъканите и органите на организма.

Специацията на елементите, проследяването на техния път и начин на свързване са една стъпка към изясняване на сложните процеси в йонната хомеостаза.

Традиционно, с атомната спектрометрия се идентифицират и определят химичните елементи в дадена проба. Определянето на общата концентрация на един елемент, обаче, не дава достатъчно информация за неговата биологична роля. Такава информация може да се добие чрез химична специация – тоест чрез идентифицирането на химичните видове в пробата и оценка на биологично значими параметри като биотоксичност, бионаличност [14,15] или ефекти допринасящи за „доброто“ здраве на организма [16].

### ***Масспектрометрията – основен инструментален метод за бионеорганичен анализ***

Масспектрометрията (в разновидните си варианти) е една от най-важните аналитични техники за определяне на елементи в следови и ултраниски концентрации, за изотопен анализ и повърхностно характеризирани или структурен анализ както на органични, така и на неорганични химични видове [17,18]. В търсене на информация за токсикологичните и метаболитни трансформации на токсичните и есенциалните елементи са разработени и продължават да се разработват множество аналитични стратегии с участието на масспектралните техники, особено в комбинация с хроматографските методи, за качествено и количествено определяне на елементи, изяснявайки техните трансформации, взаимодействия и функции в биологичните системи. Тъй като определянето на метали/металоиди и техните свързани форми е важен аспект в науките за живота, голямо внимание се отделя на есенциалните елементи като Cu, Fe, Zn и токсичните елементи като Cd, Hg, Pb. Металите могат да са свързани с протеини (металопротеини), ензими (металоензими), като феритин (Cu, Fe, Zn),  $\beta$ -амилаза (Cu), алкохолдехидрогеназа (Zn) или да са по-слабо свързани за транспортни протеини (албумин, трансферин) и други биомолекули [19]. Много изследвания засягат ме-

тал(оид)ните видове в клетките и тъканите, тяхната идентичност, количество, локализация и функции [20], наричани металом. Това включва взаимодействието на металните видове, протеини, метаболити и други молекули в рамките на организмите и екосистемите. Гореспоменатите техники за анализ са основното средство за получаване на информация в подобни изследвания.

През последните три десетилетия ICP-MS и MS-включващите комбинирани техники добиха изключителна популярност и значение за науката за растенията, поради високата чувствителност, толерантност към различни матрици, възможност за свързване с различни хроматографски техники и съчетанието на универсалност и селективност, с което малко методи могат да се характеризират. Чувствителността на ICP-MS позволява достигане на граници на откриване в диапазона ppq [21]. Комбинацията ICP-MS с LC-ESI-MS предлага пълни възможности за структурна информация и работа при много ниски концентрационни нива за широк спектър от аналитични задачи в областта на специацията и изясняване на функционалните особености на метаболизма и природата на химичните видове в живите организми, в това число и в растенията.

### Масспектрометрия

Предпоставките за превръщането на масспектрометрията в основен за аналитичната химия инструментален метод са нейната чувствителност, ниски граници на откриване, скорост на действие и разнообразието на подходящи приложения (универсалност), с които никоя друга техника не може да се сравни. В добавка към това богатата структурна информация и широкият спектър от подходящи за анализ вещества я правят както универсална, така и изключително селективна техника.

През последните десетилетия развитието на MS техниките е много бързо (1995-2012). Този процес доведе до създаване на съвсем нови техники за йонизация [22-25], нови масанализатори, множество хибридни системи, с по няколко допълващи се анализатори, подобрена електроника и бързина. Появи се орбитрап технологията [26]. Представени бяха много нови приложения, като например първия масспектър на цял вирус [27] и спектрите на много големи нековалентни комплекси [27]. Налични са вече свръх продуктивни апарати за нуждите на протеомиката [28,29], метаболомиката [30] и другите „омикс“.

### Йонизационни източници

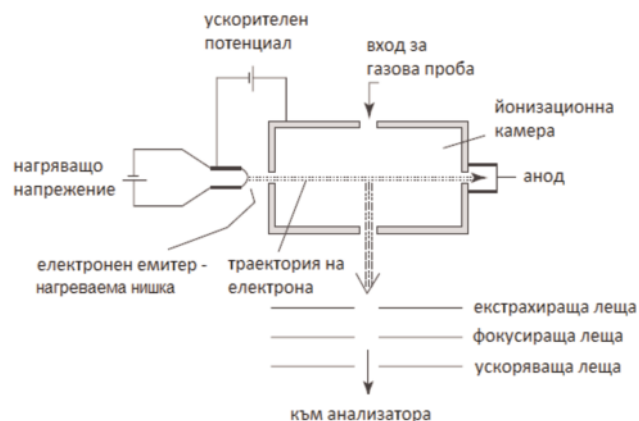
Важен аспект на масспектрометрията е йонизацията на аналитите, тъй като само химични видове, натоварени с електричен заряд подлежат на анализ с масспектралните техники. Налични са много йонизационни техники,

най-разпространените от които – EI (електронна йонизация), CI (химична йонизация) – основно комбинирани с газова хроматография, и ESI (електроспрей-йонизация), ICP (индуктивно-свързана плазма) - най-застъпени при елементна специация и комбинирани с течна хроматография. По-рядко се използват LA, FAB, MALDI, SIMS и SELDI при решаването нестандартни проблеми в елементната специация. Тези техники представляват само една част от „арсенала“ на MS методите по отношение на йонизацията.

### Електронна йонизация и химична йонизация (използват се при GC/MS)

Електронната йонизация и химичната йонизация, са техники използвани или при директен вход на пробата в масспектрометъра, или при свързване на газов хроматограф с него.

Йонизацията се извършва във вакуум, а устройството на йонизационните камери е както следва: нагреваема нишка (катод) създава поток от електрони. Тези електрони се ускоряват към анода и по пътя си се сблъскват с анализираните молекули. Анализираната проба или поток от изхода на газовия хроматограф навлиза в йонизационната камера в газообразно агрегатно състояние.



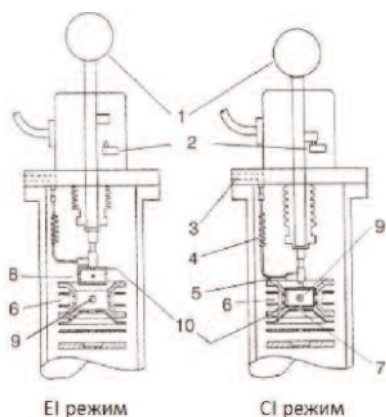
Фигура 1. Диаграма на източник за електронна йонизация

Електронът може да се разглежда като вълна с дължина  $\lambda = h/mv$ , според уравнението на Планк. Тя е с дължина  $2,7 \text{ \AA}$  при кинетична енергия  $20 \text{ eV}$  и  $1,4 \text{ \AA}$  при  $70 \text{ eV}$ . Когато дължината на вълната е близка до тази на химичните връзки в молекулата, тя става комплексна и ако някоя от честотите е с енергия, съответстваща на енергетичен преход в молекулата, молекулата я абсорбира и се възбужда [31]. При достатъчно висока енергия от молекулата може да се отдели електрон. Ако енергията на



електроните (при високи потенциали) е прекалено висока, те не могат да взаимодействат с молекулните енергетични нива, ако е прекалено ниска (при ниски потенциали), тя не е достатъчна, за да възбуди молекулата. Опитно е установено, че 70 eV е оптимална енергия за възбуждане на повечето органични молекули. Тъй като и 10÷20 eV биха могли да възбудят много органични молекули, то излишъкът на енергия предизвиква допълнителна фрагментация. Това се използва за структурно идентифициране на молекулата, поради строго регламентирания начин на фрагментация за всяка молекула при определени, еднакви условия на йонизация и фрагментация.

Електронната йонизация винаги е съпроводена и с допълнителна фрагментация, като в голяма част от случаите не се наблюдава молекулен йон в спектъра. Този проблем се преодолява с друга техника на йонизация – химичната йонизация. При нея условията са по-меки и винаги се наблюдава молекулният йон, но с предвидимо отклонение в масовото число поради образуване на адукти. Спектрите, получени с тази техника на йонизация, са бедни на фрагменти, затова двете техники се допълват. Техниката на химичната йонизация създава условия за сблъсък на молекулите с вече налични в йонизационната камера йони. Това налага изменение на йонизационната камера, като основните разлики са наличието на вход за реагентен газ, работа при ниско налягане (около 60 Pa) и промяна в параметрите на йонния ток. В йонизационната камера се създава йонизационна плазма от йони на реагентния газ (метан, водород, амоняк и др.). В нея броят на анализирания молекули е значително по-малък от този на реагентните йони и така са осигурени условия за чести срещи на анализа с йоните



**Фигура 2.** Комбиниран източник за електронна и химична йонизация: 1) ключ за избор на режим; 2) електронен контакт; 3) вход за реакционния газ; 4) гъвкава капиляра по която тече реакционния газ; 5) диафрагма; 6) нагреваема нишка; 7) отвор за пренасяне на йоните към анализатора; 8) отвор за йонизиращите електрони при режим на химична йонизация; 9) вход за пробата 10) йонен обем

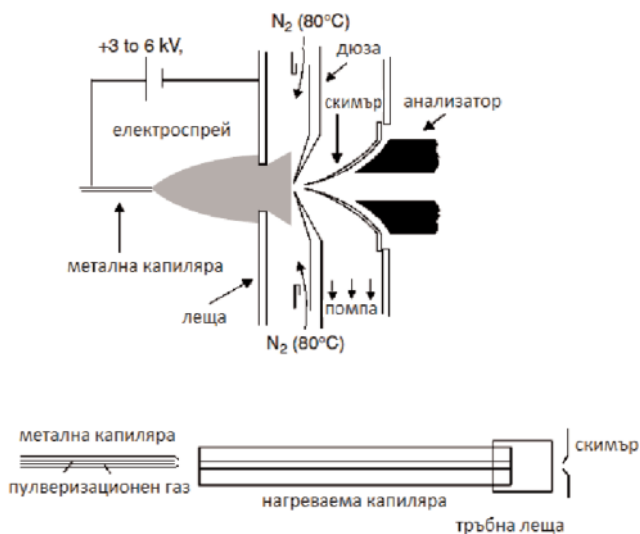
на реагентния газ и на молекулите на реагентния газ помежду им. Йонизацията вследствие на електронен удар претърпяват молекулите на реагентния газ, след което те се прикачват към анализирания молекула и й придават заряд при едни по-меки условия, които потискат фрагментацията.

### Електроспрей, APPI, APCI (използва се при LC/MS)

Първият източник за йонизация при атмосферно налягане, с изключение на ICP и MALDI, но след него бързо се наложи Термоспрейя, в последствие осъвършенстван до Електроспрей (ESI) – наричани API (Atmospheric Pressure Ionization), DESI, DART, APCI, ESI, APPI, последните три от които служат и като интерфейс за свързване на масспектрометъра с изхода на течен хроматограф. Разработването на нови и по-ефективни йонизационни източници продължава.

Тези източници йонизират пробата при атмосферно налягане и след това генерираните йони се насочват към масспектрометъра. При това е необходимо преодоляването на редица проблеми, като прехода от атмосферно към ниско налягане, премахване на клъстерирането на йоните и други, решени чрез различни технически похвати.

Най-масовата и универсална техника от изброените е електроспрей-йонизацията, особено в анализа на комплексни съединения. Тя е най-широко използваният йонизационен източник при LC-MS. Използва се основно при полярни аналити.



**Фигура 3.** Диаграма на електроспрей като йонизационен източник с използване на скимъри нагрят азот за десолватация (отгоре) и с две нагреваеми капиляри за десолватация (отдолу)

Техниката добива популярност след работите на Fenn

[32], основно при изследване на протеини с формиране на мултизаредени йони (носеци заряд по-голям от единица – от 2 до 50), което позволява анализа на съединения със стотици kDa молекулна маса чрез прибори с масов обхват до 2000 m/z.

Електроспреят (ESI) се образува при прилагане на силно електрично поле при атмосферно налягане на изхода на тънка капилара, през която се диспергира малък поток от течност ( $1\div 500 \mu\text{l}/\text{min}$ ) в един или няколко потока от инертен газ – най-често азот - чиито потоци са специфични за инструмента и конкретния режим на работа. Електричното поле се постига с прилагане на  $3\div 6 \text{ kV}$  напрежение между края на капиларата и втори електрод поставен на  $0.3\div 2 \text{ cm}$  разстояние от нея. То създава условия за акумулиране на заряд по повърхността на диспергираните течни капки. Получените високозаредени капки от пробата се срещат с насрещен поток от горещ азот и разтворителят започва да се изпарява. С намаляване на диаметъра на образуваните капки и увеличаване на интензитета на електричното поле акумулираният заряд се увеличава, докато настъпи момент, в които йоните на пробата започват да се десорбират от капката. Когато капката стане много малка, а зарядът ѝ голям, тя се раздробява на още по-малки капки и процесите отново се повтарят. Целта е възможно пълно премахване на разтворителя и получаване на йони в газова фаза, които водени от електричното поле се насочват към входа на масспектрометъра. Това описание е схематично. Процесите в електроспрея са сложни и все още не са обяснени докрай.

### ICP-MS

Свързването на плазмен източник с масспектрометър за първи път е направено през 1974 г. [33], но с плазма в капилара (хелиева плазма), която има ограничения като йонизационен източник. Малко по-късно през 1980 г. ICP плазмата се оказва удачен йонизационен източник за целта. По онова време (1980 г.) тя вече е доказано ефективен способ за атомизация при емисионната спектроскопия, а сътрудничеството между Gray и лабораториите Ames [34] има като резултат първия ICP-MS [35,36]. Днес, 30 години по-късно, този инструментален вариант на масспектрометрията е рутинна техника.

ICP-MS предлага много предимства пред останалите методи за анализ на елементи, като многоелементен анализ, ниски граници на откриване; не на последно място бързина, които позволиха този метод да се превърне в основна техника за елементен анализ след 2000 г. Най-деликатният момент в развитието на техниката е свързването на плазмения йонизационен източник, работещ при атмосферно налягане с масспектрометъра, работещ под висок вакуум. Имайки предвид че 70% от елементите са изотопни смеси, възможността за опред-

еляне на изотопните отношения с ICP-MS е голямо предимство пред други методи за елементен анализ.

### Йонизационен източник

При ICP-MS йонизационният източник е индуктивно-свързана плазма. Тя се формира в кварцова горелка, съставена от три концентрични кварцови тръби. Всяка от трите тръби се захранва с отделен поток аргон, като най-вътрешната е аерозол носещата, през която в плазмата навлиза аерозола на пробата с аргон. Средната тръба осигурява аргон за формиране на плазмата, а външната тръба подава аргон за охлаждане и капсулиране на плазмата. Перпендикулярно на най-външната кварцова тръба е намотана медна тръба (намотка) по която циркулира охлаждаща вода. Именно посредством тази намотка плазмата се захранва с енергия. Намотката е свързана с високочестотен генератор, който типично има мощност  $0.5\text{-}1.5 \text{ kW}$  и честота 27 или 40 MHz. Подаваната мощност осигурява индуцирането на осцилиращо магнитно поле, чийто силови линии са перпендикулярни на горелката вътре в плазмата и елиптични извън индукционната намотка. За да се инициира генериране на плазма за момент носещия газ се спира и се подава високоволтова Тесла искра от съответен източник, който е прикрепен близо до горелката.

Тази искра предизвиква йонизация на аргона. След това този процес се самоподдържа като в създадената плазма съществуват и аргонни йони и електрони. Постоянно подаваният с голяма линейна скорост аргон през горелката изгонва евентуални следи от въздух от областта на плазмата и формира характерната „тороидална“ форма на плазмата. Най-вътрешният поток от аерозолносещ аргон се включва след „запалване“ (всъщност плазмата не гори!) на плазмата и пробива централен канал в нея. Анализите навлизат в плазмата през централния канал, където условията са относително постоянни. В плазмата аерозолът се изпарява, пробата се атомизира, а получените атоми се йонизират и по този начин попадат в масспектрометъра през подходящ интерфейс. Най-разпространеният вариант за доставяне на пробата до плазмата е с пневматичен пулверизатор и пулверизационна камера. Налични са конструкционни разновидности.

### Интерфейс плазма / масспектрометър

Обикновено интерфейсът се състои от водно-охлаждан входен конус (*sampling cone*), който е така позициониран на линията на плазмения горелка, че отрязва върха на плазмата, който е с по-ниска температура и където е възможна рекомбинация на получените йони. Обикновено тази част се прави от никел поради високата му топлопроводимост, относителна устойчивост на ко-

розия и стабилност, или от платина при по-скъпи варианти. Конусът има отвор на върха си с диаметър около 1 mm, което позволява поддържане на вакуум от вътрешната му страна, където е необходим пад на налягането от порядъка на атмосферно налягане / 0.2 mBar, осигуряван от ротационната форпомпа. Същевременно е необходимо фокусиране на йонния лъч, така че възможно повече йони да минат през отвора и да следват стабилна траектория по пътя си по-нататък в масспектрометъра. Всичко това изисква фина конструкция. Тъй като газовият поток през този конус е голям, се налага поставянето на втори конус след него, с подобна форма, наричан „скимър“. В пространството след него се осигурява следващ пад на налягането до около 0.0001 mBar и същевременно изсмукване и премахване на евентуални неутрални частици между двата. Скимърът има отвор с диаметър с 0.5 mm. Така екстрахираните йони се фокусират в тесен сноп с помощта на поредица от йонни (електростатични) лещи. Ако инструментът е снабден с колизионна/реакционна клетка, то тя се намира след фокусиращите лещи.

### Масспектрометри за ICP-MS

Масспектрометърът, или по-точно, масанализаторът, може да се опише на филтър, който филтрира и пропуска йони с определени масови числа, като осигурява безпрепятственото им достигане до детекторната система. Всеки тип масанализатор на практика може да се използва при ICP-MS инструментите. Най-разпространените и евтини комерсиални прибори са снабдени с квадруполни масанализатори. Също така се произвеждат и високоспециализирани апарати с високоразделителни масанализатори от типа на магнитни сектори, TOF и други по-малко разпространени, например мултиколекторни инструменти с няколко детектора и висоразделителни масанализатори, основно използвани за прецизно измерване на изотопни отношения. Такива се използват при изотопен анализ в датирането или за преодоляване на пречения, например изобарното пречене, където е необходима разделителна способност, осигуряваща точно измерване и разграничаване на  $m/z$  до 0.0001 ( $>10\ 000$  FWHM).

### Хроматография

Хроматографските методи са едни от най-широко прилаганите аналитични техники днес. Предложена още през 1903 г. от М. С. Цвет като метод за разделяне, от петдесетте години на миналия век тя много бързо се развива, преди всичко в аналитичен аспект. С уникалните си възможности за разделяне с постигане на висока селективност, за многокомпонентен анализ, за анализ на обекти със сложна матрица и за автоматизация, тя е неотменим елемент от разнообразни комбинирани ана-

литични техники, намерили приложение в много области на практиката и изследователската дейност, в това число и комбинираните методи при елементната специация.

### Комбинирани техники (Hyphenated techniques)

С оглед на това, че аналитичните задачи значително се усложняват при специационния анализ, тъй наречените комбинирани техники, стават все по-актуални при анализа. „Hyphenated“ MS техниките и особено свързването на хроматографски системи с ICP-MS става все по-популярно и важно в анализа на растения през последните 10-15 г.

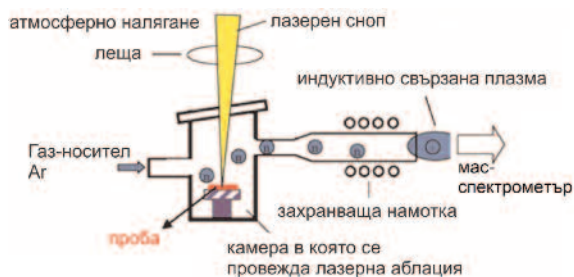
Нараства интересът и към аналитичните техники за получаване на химически биообрази (imaging), като вече са налице различни аналитични подходи за пряко визуализиране на химичния състав на биологични проби. Тези техники основно са масспектрални, например LA-ICP-MS (лазерно изпарение с ICP-MS детекция) [17,18, 37-40], масспектрометрия с вторична йонизация (SIMS) [41,42], специализирана за визуализация, матрично подпомогната лазерно десорбционна масспектрометрия (imaging-MALDI-MS).

Специационният анализ на метали, свързани с протеини е една от най-бързо развиващите се области в бионеорганичната аналитична химия (т.н. металомика) [43-45]. Техниките за гел-електрофореза, базирани на изоелектрично фокусиране или просто миграция в гел (нативната и полиакриламидната гел електрофореза със използване на детергент додецилсулфат – SDS-PAGE), приложени в едно [45-65] и двумерен [40,42,46,49,53] формат са основните техники, използвани за високоразрешаващо разделяне на протеини [46,47]. Хетероелементите в състава на протеините се детектират в гела посредством радиоактивно белязване и радиографска детекция или посредством LA-ICP-MS [48]. Най-много са изследванията, свързани с елемент специфична детекция след гел електрофореза на селенсъдържащи [37,40,42,43,46,47,55,64] и фосфорсъдържащи [38,39,54,56,57,59,60,63 2,3,18,20,21,23,24,27] протеини, тъй като селенът и фосфорът в тези протеини са ковалентно свързани и няма опасност от тяхната загуба по време на разделянето.

### LA-ICP-MS

Лазерното изпарение използва фокусиран лазерен лъч за изпаряване на повърхностния слой от твърди проби. Изпареният материал се транспортира до индуктивно свързаната плазма от газ носител аргон. Масспектрометърът след ICP-източника осигурява възможност за многоелементна детекция с широк динамичен обхват, възможност за разделяне на изотопите на елементите, висока чувствителност и количествен отклик.

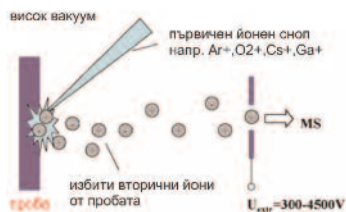




Фигура 4. Схема на интерфейс между лазерно изпарение и ICP маспектрометъра

Техниката е добре развита за анализ на геохимични и металургични проби, но приложенията ѝ при имиджинг на тъкани и биологични матрици тепърва се развиват [77,79]. Ограниченото използване на тази техника при биологични и медицински изследвания може да се обясни с трудностите при изпарение на този тип матрици, с липсата на подходящи стандарти за калибриране и относително високата цена на модерните и мощни системи за лазерно изпарение с добра латерална разделителна способност [80]. Изискването за изпарение на достатъчно материя за чувствително определяне на елементи и с избягване на ефекти на фракциониране при лазерния анализ с латерална разделителна способност в ниския микрометров диапазон изискват лазерна мощност по-голяма от  $1 \times 10^9 \text{ Wcm}^{-2}$  [80]. Поради отсъствието на подходящи матрични референтни материали е необходимо тепърва развитие на методите за калибриране при използването на LA-ICP-MS [79,81].

### SIMS

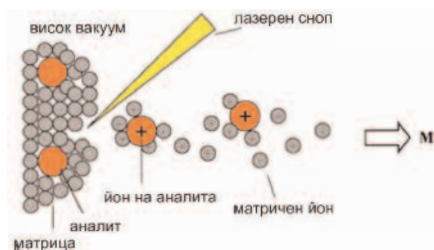


Фигура 5. Схема на интерфейс между SI източник и маспектрометъра

Маспектрометрията с вторична йонизация се базира на взаимодействието на първични йони ( $\text{Ar}^+$ ,  $\text{Xe}^+$ ,  $\text{O}^{2+}$ ,  $\text{Cs}^+$ , ...) с енергия от порядъка на keV с повърхността на твърди проби. Йонният лъч обхожда цялата повърхност на пробата и по този начин я сканира като избива частиците от повърхностния слой на пробата. Атомите или клъстери от атоми могат да се емитират от повърхността в незаредено или електрически заредено състояние. Вторичните йони след това се насочват към маспектралната система и биват анализирани според техните

$m/z$  стойности. SIMS предлага възможността за имиджинг на елементите по повърхността на пробата и се използва с различни типове масанализатори, например квардуполни или TOF [82]. Техниката е многоелементна с възможност за изотопен анализ и се характеризира с граници на откриване 0.1-1 mg/kg в режим на елементарен имиджинг и латерална разделителна способност в порядъка на 50nm. Използва се основно за клетъчен имиджинг [83-85].

### Imaging MALDI-MS



Фигура 6. Схема на интерфейс между MALDI източник и маспектрометъра

Матрично-подпомогнатата лазерно десорбционна маспектрометрия (MALDI-MS) е една от най-важните техники за анализ на големи биомолекули като протеини, пептиди и полимери. Пробата първо се смесва с абсорбираща светлината матрица – разтвор на органични молекули, които силно абсорбират фотони с дължината на вълната на лазера [86]. Тези молекули са в излишък спрямо молекулите на аналитите с цел да ги изолират напълно при десорбцията, абсорбирайки енергията на лазерния лъч. В сравнение с енергията на лазера при LA-ICP-MS, при MALDI, тя е  $2 \div 3$  порядъка по-ниска. При облъчването на пробата, молекулите на матрицата абсорбират енергията на лазера и се йонизират, като същевременно увличат молекулите на аналита и ги предпазват от фрагментация. Благодарение на матрицата, процесът на йонизация протича при меки условия. Молекулите на аналитите по този начин се екстрахират от йонната оптика и се насочват към масанализатора, като носят преимуществено заряд +1.

При използването на техниката за имиджинг, повърхността на твърдата проба (тъкан или клетка) се покрива с органично съединение, абсорбиращо лазерното лъчение (матрица). Налице са и редица модификации, целящи увеличаване на латералната разделителна способност [87-92]. Тази техника би могла добре да се комбинира с LA-ICP-MS при изследване на повърхности с цел органичен анализ и елементарен анализ и получаване на комплексни и максимално информативни биообрази на биологични повърхности.

Специационният анализ на следови елементи в био-

логични матрици се извършва особено успешно при свързване на техника за разделяне като хроматография или електрофореза с ICP-MS за елемент специфична детекция, но при условие, че химичните видове, които носят хетеро-елемента са достатъчно стабилни, за да преминат през етапа на разделяне. ICP-MS е най-подходящ за такава детекция, поради възможността за многоизотопен анализ (включително на неметали като S, P или Se), високата чувствителност, толерантност към матрицата и широк линеен диапазон. Обикновено при анализ на биомолекули, носещи хетероеlement ICP-MS се използва за детекция преди или заедно с ESI-MS/MS за структурно определяне. Фиг. 3 обобщава повечето съобщавани в литературата “hyphenated” техники.

Най-често в литературата се публикуват приложения на LC-ICP-MS, в които като механизъм за разделяне се използва гелфилтрация (SEC) [93] и квадруполен масанализатор, като най-евтин и разпространен, но с който се постигат задоволителни резултати. Полуширината на пиковите е типично около 30s, което позволява едновременното наблюдение на 8-12 изотопа с достатъчна за повечето приложения прецизност. Срещат се работи, в които се използват магнитно секторни анализатори [94-98], както и TOF [99]. Предимствата и особеностите на различните типове масанализатори се дискутират подробно в [100].

Kgurr и съавтори комбинират едновременно течната хроматография с две масспектрометрични техники ICP-MS и ESI-MS [101]. Връзката с индуктивно свързаната плазма се осъществява лесно като подвижната фаза след хроматографската колона директно се свързва с пулверизатора на ICP-MS. Би могло при еднакви хроматографски условия и подходящ подбор на подвижна/и фаза/и да се работи последователно с двете техники или посредством разделяне на потока в един хроматографски цикъл пробата да се анализира и с ICP-MS и с ESI-MS. Изследванията на тези автори имат за цел откриването и характеризирането на няколко нови химични вида на живака и арсена с фитохелатините в *Thunbergia alata*. За разлика от асоциатите на Cd, Cu, Zn с фитохелатините, тези на арсен и живак са стабилни в кисела среда. Затова авторите използват смес от мравчена киселина и метанол/вода за градиентното елуиране на асоциатите чрез обратнофазова хроматография. Такава подвижна фаза е съвместима и с двете йонизационни техники преди MS. Посредством ICP-MS се детектира в кои съединения има живак и арсен, а с помощта на ESI-MS се определя молекулната маса на асоциатите. При използване на масспектрометри с висока разделителна способност и допълнителна фрагментация е възможно и структурно определяне на неизвестните аналити. Подобна комбинация е изключително мощно средство за анализ, особено при трудни матрици, каквито са биологичните, при ниски концентрации на аналитите и множество и не-

известни пречещи ефекти. Авторите откриват 10 нови Hg-PC координационни съединения и в оризови култури. Техните структури са потвърдени с масспектрометрия с висока разделителна способност и многократна фрагментация. Подобни подходи са изключително полезни при търсене на неизвестни метаболити, биомаркери и в разгадаването на сложния свят на взаимодействия в живите организми. Към момента, нямат алтернатива.

Подобни схеми биха могли още повече да се усложнят, ако се усложни етапа на разделяне, което понякога се налага поради сложните матрици за анализ и особеностите на аналитите. В много случаи дори не е известно „какво“ точно се търси. Тук се появяват много трудности и горният пример се оказва едно благоприятно изключение. Трябва да се отбележи, че към всяка аналитична задача от подобен труден характер би трябвало да се подхожда индивидуално и е трудно да се правят обобщения.

Повечето биологични комплекси показват оптимална стабилност в слаби буфери като амониев ацетат, MES, TRIS, HEPES, при физиологично pH (6.5–7.5). В контраст с това ICP-MS и ESI-MS са много чувствителни към такива буфери, поради редица пречения. Това, заедно със сложността на биологичната матрица, води до много силно потискане на сигнала. Затова, за да се идентифицира структурата на даден химичен вид, е необходимо премахване на матрицата. Това обикновено се постига при използване на хроматографско разделяне с подвижни фази, които са прецизно подбрани, от една страна да имат подходящи хроматографски свойства, от друга - да са с ниска йонна сила и с ограничен брой органични модификатори. Най-често при подобни изследвания и анализ на комплекси се прилага off-line хроматографско разделяне с комбинация на SEC, RP-HPLC и след това определени фракции се анализират отново с HPLC-ESI-MS [103,104,107,108].

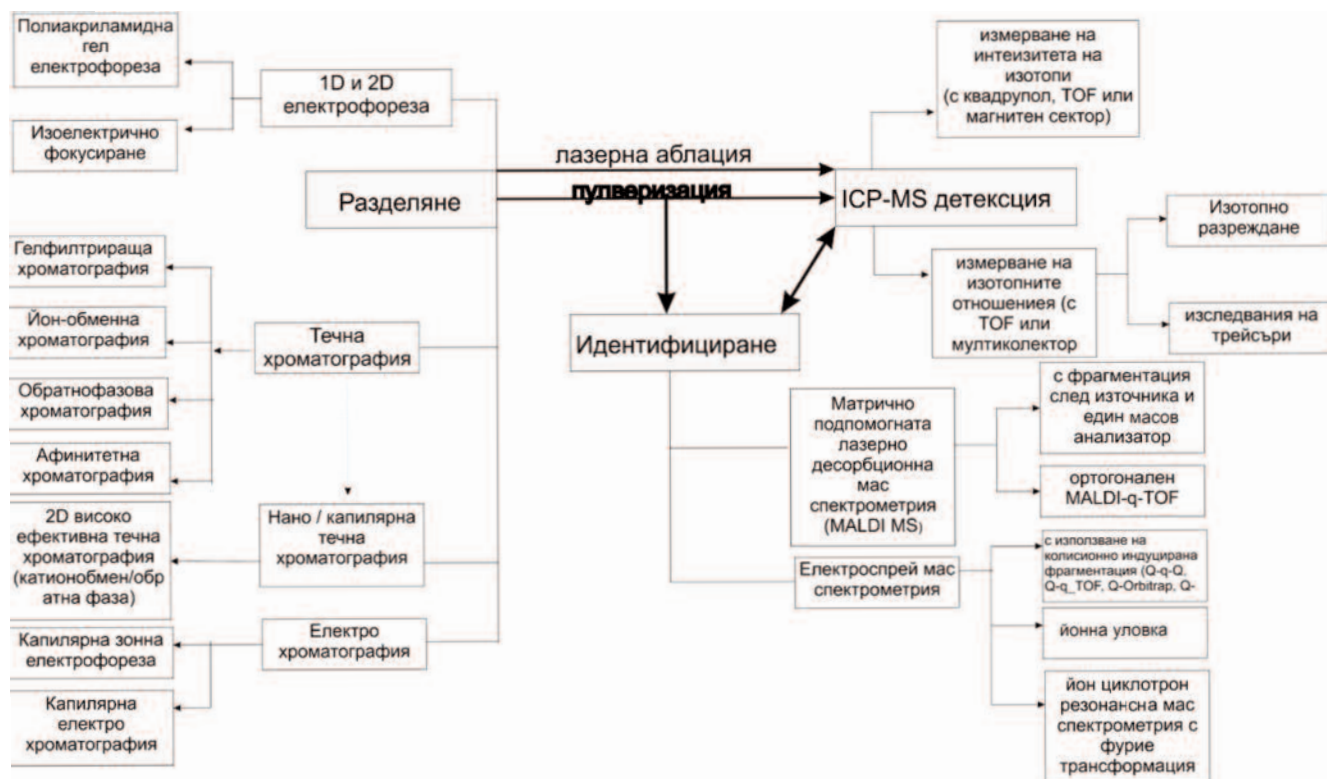
Хроматографската разделителна способност на SEC е недостатъчна за пълно разделяне на голям брой химични видове, които варират по маса с по-малко от няколко стотин Da. Това води до припокриване на пиковите на подобни аналити и съответно ненадеждно идентифициране и определяне. Затова в някои случаи се прибегва до двумерни или много димензионни разделяния с on-line или off-line дизайн. Винаги се използват ортогонални по селективност хроматографски колони, а подбирането на условията е сложно и подчинено на много фактори, на които трудно се намира едновременно решение. Задачите пред аналитичите особено при on-line системите са много комплексни, а понякога нерешими. Самите системи са със сложна конструкция, често – “лабораторно създадени”. Работите по подобни проблеми често пъти са нестандартни и оригинални. Редица автори комбинират следните неподвижни фази при реализация на ортогонални разделя-

ния: SEC, IE, RP, HILIC, като използват дори и капилярната електрофореза като един ортогонален вариант при RP или SEC [20,109,110,111,112,]. Сред ортогоналните хроматографски процедури са RP-HPLC- и CZE- ESI-MS, много използвани при анализа на метало-РС, особено кадмий [104,107,108,113-115] и арсен [102]. Принципът SEC/RP се използва широко при анализа на разнообразни фитометало-биомолекули като Ni-NA [103,116], Se-пептиди [117,118], редкоземни елементи, свързани с пептиди [119], или елементна специация на Fe, Cu, Zn, свързани с пептиди в зърнени култури [104, 120]. Dernovics и съватори [121] използват SEC-/IE/RP nano-HPLC с ICP-MS детекция за анализ на селенови съединения в *Lecythis minor*, които след това са идентифицирани като изоформи на  $\gamma$ -глутамил-селеноцистатин и селеноцистатин чрез ESI-Q-TOF-MS/MS. Трябва да се отбележи, че често при специацията на елементи и търсенето на формите, под които те са свързани с биомолекулите не се използва ICP-MS като първи подход, но това се оказва удачно с оглед на селективното откриване на фракциите, в които се намират търсените елементи. Идентификацията на метал-свързаните лиганди се прави най-вече с широката гама молекулно масспектрометрични техники като ESI-MS, MALDI-TOF-MS, ESI-IT-MS, ESI-Q-TOF, ESI-IonTrap/MSn-Orbitrap [122-126], подпомагани от UV-VIS-IR, и задължително хроматографските техники като вход или предварителна стъпка на разделяне. Широко се използват

зват EPR, NMR, CDS, XAS [118,127-129]. Всичко това затруднява и оскъпява изследването на елемент-съдържащите химични видове.

### Заклучение

От направения преглед става ясно, че хибридни и комбинирани методи (hyphenated-) на MS и ICP-MS се използват успешно в науката за растенията, за разкриване на биоактивността и функционалната роля на елементите в организма. Постоянно навлизат новости във всички стъпки на специационния анализ, от пробоподготовката, през екстракцията и разделянето, до идентифицирането и количественото определяне на химичните видове. Особено през последните две десетилетия се забелязва съществен напредък в анализа на растения, почви и проби от околната среда, благодарение на масовото използване на масспектралните техники във различните им варианти. В същото време, в тази област има много нерешени задачи, най-вече при специацията и анализа на различни биологични координационни съединения, за което са необходими нови аналитични методики и подобрения. Забелязва се необходимост от изследване на формите на свързване на редица есенциални и токсични елементи и тяхната специфична биоактивност. Търсят се възможности за подобряване на състоянието на околната среда, храненето и медицин-



Фигура 7. Схема на най-широко използваните методи при специационния анализ с масспектрална детекция



ската употреба на растенията. Основната част от изследванията в тези направления изискват използването на масспектрални техники, което прави масспектрометрията в комбинация с методите за разделяне (т.н. хибридни техники) основен инструмент за изследване на химическия състав на организмите.

Информацията, получена в подобни изследвания, комбинирана с генетични данни и данни за състоянието на средата, в която са поставени биологичните видове, би била полезно съчетание при изясняване на много от загадките пред системната биология днес и в частност йономиката и разбирането на функционалността на растенията и биологичните системи изобщо.

### Цитирана литература

- [1] Arabidopsis Genome Initiative, *Nature*, 408 (2000) 796.
- [2] B. Halweil, in Abramovitz J. A., (Ed.) Vital signs: the trends that are shaping our future. The Worldwatch Institute in cooperation with the United Nations Environment Programme. Norton Company, New York, 2002, pp. 102.
- [3] World Agriculture: Towards 2015/2030, FAO, 2002 (<http://www.fao.org/docrep/005/y4252e/y4252e00.htm>).
- [4] Plant/crop-based renewable resources 2020, <http://www.oit.doe.gov/agriculture/pdfs/vision2020.pdf>
- [5] The Multinational Coordinated Arabidopsis 2010 Project, <http://www.arabidopsis.org/workshop1.jsp>
- [6] The Rice Research Program in Japan, <http://rgp.dna.affrc.go.jp/index.html>
- [7] The Canadian Crop Genomics Initiative, [www.agr.gc.ca/science, Canada](http://www.agr.gc.ca/science/Canada)
- [8] BBSRC report ([www.bbsrc.ac.uk/media/pressreleases/04\\_05\\_12\\_csr.html](http://www.bbsrc.ac.uk/media/pressreleases/04_05_12_csr.html)), United Kingdom
- [9] European plant science: a field of opportunities, *Journal of Experimental Botany*, 56 (2005) 1699.
- [10] R. Lobinski, J.S. Becker, H. Haraguchi, B. Sarkar, *Pure Appl. Chem.*, 82, (2010) 493.
- [11] M. Debnath, G.B.K.S. Prasad, P.S. Bisen, *Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities*, Springer, 2010, 11.
- [12] E. Pettersson, J. Lundberg, A. Ahmadian, *Genomics* 93 (2009) 5.
- [13] F.C. Kafatos, T. Eisner, *Science* 303 (2004) 1257.
- [14] S. Husted, D. Person, K. Laursen, *J. Anal. At. Spectrom.*, 26 (2011) 52.
- [15] F.J. Zhao, J.F. Ma, A.A. Meharg S.P. McGrath, *New Phytol.* 181 (2009) 777.
- [16] U.S. Lee, S.J. Jeon, Y.K. Lee, D.P. Kim, S. Persson, J.K. Husted, Y. Schjorring, H. Kakei, N.K. Masuda, A.G. Nishizawa, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 106 (2009) 22014.
- [17] Y. Ogra, Y. Anan, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 1477.
- [18] J.S. Becker, *Inorganic Mass Spectrometry, Principles, Applications*, Wiley, Chichester, 2007.
- [19] J.S. Becker, M. Zoriy, A. Matusch, B. Wu, D. Salber, C. Palm, J. Su. Becker, *Mass Spectrom. Rev.* 29 (2010) 156.
- [20] B. Bouysiere, J. Szpunar, M. Potin-Gautier, R. Lobinski, in R. Cornelis (Ed.), *Handbook of Elemental Speciation, Techniques, Methodology*, Wiley, Chichester, 2003, 95.
- [21] S. Mounicou, J. Szpunar, R. Lobinski, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 1119.
- [22] G. Hieftje, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 611.
- [23] D.B. Robb, T.R. Covey, A.P. Bruins, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3653.
- [24] V.V. Laiko, M.A. Baldwin, A.L. Burlingame, *Anal. Chem.* 72 (2000) 652.
- [25] Z. Takats, J.M. Wiseman, B. Gologan, R.G. Cooks, *Science* 5695 (2004) 471.
- [26] R.B. Cody, J.A. Laramée, H.D. Durst, *Anal. Chem.* 77 (2005) 2297.
- [27] A. Makarov, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1156.
- [28] S. Fuerstenau, W. Benner, J. Thomas, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40 (2001) 541.
- [29] J. Reinders, U. Lewrowski, J. Moebius, *Proteomics* 4 (2004) 3686.
- [30] S. Naylor, R. Kumar, *Adv. Protein Chem.* 65 (2003) 217.
- [31] S.G. Villas-Boas, S. Mas, M. Akesson, *Mass Spectrom. Rev.* 24 (2005) 613.
- [32] T.W. Bentley, R.A.W. Johnstone, in V. Gold (Ed), *Mechanism, Structure in Mass Spectrometry*, Academic Press, London, 1970.
- [33] J.B. Fenn, M. Mann C.K. Meng, *Science* 246 (1989) 64.
- [34] A.L. Gray, *Proc. Soc. Anal. Chem.* 11 (1974) 182.
- [35] R.S. Houk, V.A. Fassel, G.D. Flesch, H.J. Svec, A.L. Gray, C.E. Taylor, *Anal. Chem.* 52 (1980) 2283.
- [36] A.L. Gray, *Spectrochim. Acta* 40B (1985) 1525.
- [37] A.L. Gray, *J. Anal. At. Spectrom.* 1 (1986) 403.
- [38] J.S. Becker, A. Matusch, C. Palm, D. Salber, K.A. Morton, J.S. Becker, *Metalomics* 2 (2010) 104.
- [39] J.S. Becker, *Int. J. Mass Spectrom.* 289 (2010) 65.
- [40] M.L. Heien, P.D. Piehowski, N. Winograd, A.G. Ewing, in: S.S. Rubakhin, J.V. Sweedler (Eds.), *Mass Spectrometry Imaging: Principles, Protocols, Humana Press Methods in Molecular Biology series*. doi: 10.1007/978-1-60761-746-4\_4, 2010, pp. 85–97.
- [41] S.G. Boxer, M.L. Kraft, P.K. Weber, *Advances in imaging secondary ion mass spectrometry for biological samples*, *Ann. Rev. Biophys.* 38 (2009) 53.
- [42] J.S. Becker, U. Breuer, H.-F. Hsieh, T. Osterholt, U. Kumtabtim, B. Wu, Z. Qin, A. Matusch, J.A. Caruso, *Bioimaging of metals, biomolecules in mouse heart by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LAICP-MS), secondary ion mass spectrometry (SIMS)*, *Anal. Chem.* 82 (2010) 9528.
- [43] H. Nygren, P. Malmberg, *High-resolution imaging, proteomics of peptide fragments by TOF-SIMS*, *Proteomics* 10 (2010) 1694.
- [44] J. Szpunar, *Analyst (Cambridge, U.K.)* 125 (2000) 963.
- [45] A.S. Medel, M.M. Bayon, M.L. Fernandez Sanchez, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 236.
- [46] J. Szpunar, *Analyst* 130 (2005) 442.
- [47] S. Beranova-Giorgianni, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 273.
- [48] T. Rabilloud, *Proteomics* 2 (2002) 3.
- [49] R.L. Ma, C.W. McLeod, K. Tomlinson, R.K. Poole, *Electrophoresis* 25 (2004) 2469.
- [50] T.W.M. Fan, E. Pruszkowski, S. Shuttleworth, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 1621.
- [51] P. Marshall, O. Heudi, S. Bains, H.N. Freema, F. Abou-Shakra, K. Reardon, *Analyst* 127 (2002) 459.
- [52] C.C. Chery, D. Gunther, R. Cornelis, F. Vanhaecke, L. Moens, *Electrophoresis* 24 (2003) 3305.
- [53] M.R.B. Binet, R.L. Ma, C.W. McLeod, R.K. Poole, *Anal. Biochem.* 318 (2003) 30.
- [54] R. Ma, C.W. McLeod, K. Tomlinson, R.K. Poole, *Electrophoresis* 25 (2004) 2469.
- [55] G. Ballihaut, L. Tastet, C. Pecheyrans, B. Bouysiere, O. Donard, R. Grimaud, R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 493.
- [56] J.S. Becker, M. Zoriy, M. Przybylski, J.S. Becker, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 63.
- [57] A. Polatajko, M. Azzolini, I. Feldmann, T. Stuezel, N. Jakubowski, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 878.
- [58] G. Ballihaut, F. Claverie, C. Pecheyrans, S. Mounicou, R. Grimaud, R. Lobinski, *Anal. Chem.* 79 (2007) 6874.
- [59] G. Ballihaut, C. Pecheyrans, S. Mounicou, H. Preudhomme, R. Grimaud, R. Lobinsky, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 183.
- [60] M.G. Anorbe, J. Messerschmidt, I. Feldmann, N. Jakubowski, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 917.
- [61] J.S. Becker, H. Sela, J. Dobrowolska, M. Zoriy, J.S. Becker, *Int. J. Mass Spectrom.* 270 (2008) 1.
- [62] J.S. Becker, D. Pozebon, V.L. Dressler, R. Lobinski, J.S. Becker, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 1076.



- [63] J.S. Becker, S. Mounicou, M.V. Zoriy, J.S. Becker, R. Lobinsky, *Talanta* 76 (2008) 1183.
- [64] M.S. Jimenez, M.T. Gomez, L. Rodriguez, L. Martinez, J.R. Castillo, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 699.
- [65] A. Raab, B. Pioselli, C. Munro, J. Thomas-Oates, J. Feldmann, *Electrophoresis* 30 (2009) 303.
- [66] J.S. Becker, S.F. Boulyga, C. Pickhardt, E. Damoc, M. Przybylski, *Int. J. Mass Spectrom.* 228 (2003) 985.
- [67] H. Chassaigne, C.C. Chery, G. Bordin, F. Vanhaecke, A.R. Rodriguez, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 85.
- [68] J.S. Becker, M. Zoriy, C. Pickhardt, M. Przybylski, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 149.
- [69] J.S. Becker, M. Zoriy, U. Krause-Buchholz, C. Pickhardt, M. Przybylski, W. Pompe, G. Roedel, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 1236.
- [70] J.S. Becker, M. Zoriy, C. Pickhardt, M. Przybylski, *Int. J. Mass Spectrom.* 242 (2005) 135.
- [71] J.S. Becker, M. Zoriy, C. Pickhardt, E. Damoc, G. Juhacz, M. Palkovits, M. Przybylski, *Anal. Chem.* 77 (2005) 5851.
- [72] U. Krause-Buchholz, J.S. Becker, M. Zoriy, C. Pickhardt, M. Przybylski, G. Roedel, J.S. Becker, *Int. J. Mass Spectrom.* 248 (2006) 56.
- [73] J.S. Becker, M. Zoriy, M. Przybylski, J. Dobrowolska, A. Matush, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 736.
- [74] J.S. Becker, M. Zoriy, J.S. Becker, J. Dobrowolska, M. Dehnhardt, A. Matush, *Phys. Status Solidi C—Curr. Top. Solid State Phys.* 4 (2007) 1775.
- [75] J.S. Becker, M. Zoriy, M. Przybylski, J.S. Becker, *Int. J. Mass Spectrom.* 261 (2007) 68.
- [76] L. Tastet, D. Schaumlöffel, R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 309.
- [77] J.S. Becker, M. Zoriy, B. Wu, A. Matusch, J.S. Becker, *J. Anal. At. Spectrom.* 23 (2008) 1275.
- [78] J.S. Becker, M.V. Zoriy, M. Dehnhardt, C. Pickhardt, K. Zilles, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (2005) 912.
- [79] A. Kindness, C.N. Sekaran, J. Feldmann, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1916.
- [80] J.S. Becker, M.V. Zoriy, C. Pickhardt, N. Palomero-Gallagher, K. Zilles, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3208.
- [81] C. Pickhardt, I.B. Brenner, J.S. Becker, H.J. Dietze, *Fresenius J. Anal. Chem.* 368 (2000) 79.
- [82] J.S. Becker, A. Gorbunoff, M. Zoriy, A. Izmer, M. Kayser, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 19.
- [83] M.L. Pacholski, N. Winograd, Imaging with mass spectrometry, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2977.
- [84] J.L. Guerquin-Kern, T.D. Wu, C. Quintana, A. Croisy, *Biochim. Biophys. Acta* 1724 (2005) 228.
- [85] S. Chandra, D.R. Smith, G.H. Morrison, *Anal. Chem.* 72 (2000) A104–A114.
- [86] R. Strick, P.L. Strissel, K. Gavrilo, R. Levi-Setti, *J. Cell Biol.* 155 (2001) 899.
- [87] C. Austin, D. Hare, T. Rawling, A. McDonagh, Philip Doble, *J. Anal. At. Spectrom.* 25 (2010) 722.
- [88] P. Chaur, K.E. Schriver, R.M. Caprioli, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 476.
- [89] B. Spengler, M. Hubert, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 13 (2002) 735.
- [90] H.R. Aerni, D.S. Cornett, R.M. Caprioli, *Anal. Chem.* 78 (2006) 827.
- [91] W. Bouschen, B. Spengler, *Int. J. Mass Spectrom.* 266 (2007) 129.
- [92] J.C. Jurchen, S.S. Rubakhin, J.V. Sweedler, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 16 (2005) 1654.
- [93] S. Guenther, M. Koestler, O. Schulz, B. Spengler, *Int. J. Mass Spectrom.* 294 (2010) 7.
- [94] J. Szpunar, *Analyst* 125 (2000) 963.
- [95] J. Wang, R.S. Houk, D. Dreessen, D.R. Wiedering, *J. Biol. Inorg. Chem.* 4 (1999) 546.
- [96] J. Wang, D. Dreessen, D.R. Wiedering, R.S. Houk, *Anal. Biochem.* 288 (2001) 89.
- [97] F.A.R. Martino, M.L. F. Sanchez, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* 442 (2001) 191.
- [98] C.N. Ferrarello, M.R.F. de la Campa, C.S. Muniz, A. Sanz-Medel, *Analyst* 125 (2000) 2223.
- [99] S.F. Boulyga, V. Loreti, J. Bettmer, K.G. Heumann, *Anal. Bioanal. Chem.* 380 (2004) 198.
- [100] H.G. Infante, K. Van Campenhout, R. Blust, F.C. Adams, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 79.
- [101] C.N. Ferrarello, M.R.F. de la Campa, A. Sanz-Medel, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 412.
- [102] E.M. Krupp, A. Mestrot, J. Wielgus, A.A. Meharg, J. Feldmann, *Chem. Commun.* (2009) 4257.
- [103] A. Raab, A.A. Meharg, M. Jaspars, D.R. Genney, J. Feldmann, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 183.
- [104] D. Schaumlöffel, L. Ouerdane, B. Bouyssiere, R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 120.
- [105] D.P. Persson, T.H. Hansen, P.E. Holm, J.K. Schjoerring, H.C.B. Hansen, J. Nielsen, I. Cakmak, S. Husted, *J. Anal. At. Spectrom.* 21 (2006) 996.
- [106] D.P. Persson, T.H. Hansen, K.H. Laursen, J.K. Schjoerring, S. Husted, *Metallomics* 1 (2009) 418.
- [107] V. Vacchina, K. Polec, J. Szpunar, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 1557.
- [108] L. Q. Chen, Y. F. Guo, L. M. Yang, Q. Q. Wang, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 1403.
- [109] J. Szpunar, R. Lobinski, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 404.
- [110] J. Meija, M. Montes-Bayon, J. A. Caruso, A. Sanz-Medel, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 44.
- [111] R. Lobinski, D. Schaumlöffel, J. Szpunar, *Mass Spectrom. Rev.* 25 (2006) 255.
- [112] A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayon, M.L.F. Saanchez, *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 236.
- [113] D. Baralkiewicz, M. Kozka, A. Piechalak, B. Tomaszewska, P. Sobczak, *Talanta* 79 (2009) 493.
- [114] K. Polec-Pawlak, R. Ruzik, E. Lipiec, M. Ciurzynska, H. Gawronska, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 968.
- [115] V. Vacchina, R. Lobinski, M. Oven, M. H. Zenk, *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 529.
- [116] V. Vacchina, S. Mari, P. Czernic, L. Marques, K. Pianelli, D. Schaumlöffel, M. Lebrun, R. Lobinski, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 2740.
- [117] M. Shah, S.S. Kannamkumarath, J.C.A. Wuilloud, R.G. Wuilloud, J.A. Caruso, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 381.
- [118] U.P. Rodrigues-Filho, S. Vaz, M.P. Felicissimo, M. Scarpellini, D.R. Cardoso, R.C.J. Vinhas, R. Lers, J.F. Schneider, V. Gergely, M. Montes-Bayon, P. Fodor, A. Sanz-Medel, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 4524.
- [119] Y. Lai, Q.Q. Wang, W.W. Yan, L.M. Yang, B.L. Huang, *J. Anal. At. Spectrom.*, 20 (2005) 751.
- [120] R. Koplik, M. Borkova, B. Bicanova, J. Polak, O. Mestek, J. Kominkova, *Food Chem.* 99 (2006) 158.
- [121] M. Dernovics, P. Giusti, R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.* 22 (2007) 41.
- [122] R. Rellan-Alvarez, J. Abadia, A. Alvarez-Fernandez, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 1553.
- [123] G. Weber, N. von Wiren, H. Hayen, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1615.
- [124] T.Y. Yen, J.A. Villa, J.G. DeWitt, *J. Mass Spectrom.* 34 (1999) 930.
- [125] M.E.V. Schmoger, M. Oven, E. Grill, *Plant Physiol.* 122 (2000) 793.
- [126] D.G. Mendoza-Cozatl, E. Butko, F. Springer, J.W. Torpey, E.A. Komives, J. Kehr, J.I. Schroeder, *Plant J.* 54 (2008) 249.
- [127] X. Wan, E. Freisinger, *Metallomics* 1 (2009) 489.
- [128] E. Eren, D.C. Kennedy, M.J. Maroney, J.M. Arguello, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 33881.
- [129] H. Kupper, A. Mijovilovich, W. Meyer-Klaucke, P.M.H. Kroneck, *Plant Physiol.* 134 (2004) 748.

# Mass spectrometry in context of omics: major tools for bioinorganic analysis of plant tissue

Krum Bardarov\*, Romyana Djingova

Faculty of Chemistry and Pharmacy, University of Sofia "St. Kliment Ohridski", 1 James Bourchier Blvd., 1164 Sofia, Bulgaria

\* Corresponding author. E-mail: krum.bardarov@chem.uni-sofia.bg

## Article history:

Received: 5 September 2014

Revised: 4 December 2014

Accepted: 5 December 2014

Available online: 22 December 2014

The investigations during the last two decades lead to emerging and rapid development of a new systematic approach in the study of living organisms – omics-technologies (for example genomics, proteomics, metabolomics, metallomics). In the context of these new fields, the view on elemental composition of organisms, tissues and cells underwent methodological evolution. Efforts in analytical methodology in plant science are increasingly being directed towards clarifying the links between elemental composition and plant function, bioorganic / bioinorganic interactions of elements in plant. Widely distributed mass spectral techniques give considerable opportunities for complex exploration of the chemical composition of living tissues. This directs analytical interest more to elemental speciation in-vivo (elemental distribution and chemical forms of the elements in organisms) than just analyzing total elemental concentrations. This task needs considerable attention in analytical experimental design. Because the chemical forms of metals and their complexes or associates with biomolecules are highly variable, often labile, with different chemical behaviour, the experimental tasks are interdisciplinary and versatile with many analytical, technical and biological details to be considered. The choice of best "fit-for-purpose" variant or combination needs special attention since great variety of mass spectral techniques are available. The present work aims to review the most widely used mass spectral and hyphenated techniques for biological and plant tissues elemental speciation analysis from the last decade. Electron impact (EI), chemical ionization (CI), electrospray, inductively coupled plasma (ICP) mass spectral techniques are considered as well as their combination with chromatographic and non chromatographic (Laser ablation (LA), matrix assisted laser desorption / ionization (MALDI), secondary ion mass spectrometry (SIMS) separation methods.

**Keywords:** hyphenated techniques; mass spectrometry; omics; plant tissues; speciation analysis