

Методи за пробоподготовка при определяне на химичните форми на елементите в растителни тъкани

К. Бърдаров*, В. Любомирова, Р. Джингова

*Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Факултет по химия и фармация,
бул. „Джеймс Баучер“ 1, 1164 София
Ел. поща: krum.bardarov@chem.uni-sofia.bg*

Постъпила на 8.07.2014 г., рецензирана на 23.08.2014 г.

Йонната хомеостаза и специацията

През последните две десетилетия се обособи и бързо се разви нов подход на възприемане и изследване на живите организми – т.н. подход „-omics“ (например genomics, proteomics, metabolomics, metalomics, ionomics [1]). Погледът към елементния състав на живите организми претърпя еволюция в контекста на това ново направление. Елементният анализ на растенията в последното десетилетие все повече се насочва към изясняване не само на качествения и количествения състав, но и към изясняване на връзката между елементен състав и растителната физиология, биохимия, бионеорганични и биоорганични взаимодействия на елементите в организма. Оказва се, че познанието на организма като жива система изисква изучаване не просто кои елементи в какви концентрационни граници варират, но и начина по който те са свързани с биомолекулите и как са разпределени в отделните части на растението (например органи, клетки, органели). Активността на свободните йони в цитозола или органелите трябва да бъде регулирана в относително тесни граници, за да се поддържат основните функции на елементите в организма и да не се допускат фитотоксични реакции. Разпределението на химичните форми на есенциалните и неесенциалните елементи на молекулярно ниво има ключова роля в поддържането на йонната активност в растителните клетки и органели. Finney и съавтори [2] подчертават важността на специацията за биоактивността на елементи в клетките като изследват свързването на Zn и Cu в метало-протеинови съединения с концентрации далеч по-ниски от тези, при които двата елемента се съдържат в клетката (пико- и фемто-диапазона). На клетъчно ниво йонната хомеостаза включва разпределение на елементите в тъкани, клетки, органели [3], свързване с плазмените мембрани [4] и клетъчните стени [5,6], утаяване на биокристали [7,8] и свързване с нискомолекулни лиганди и големи биополимери [9]. Хомеостазата на ниво организъм включва

редица процеси като йонна мобилност в ризосферата, йонен прием и трансмембранен транспорт, съхранение на елементите (например в корените), придвижване и разпределение от корените към стъблото и асимилация в растящите тъкани [10]. Поради сложността на обхващането на тези процеси изследването на йонната хомеостаза в растенията е предизвикателство, изискващо значителни аналитични ресурси, като основното внимание вече е насочено към разделяне, изучаване и количествено определяне на отделни химични видове – (chemical) species. При такъв подход за определяне на химичните форми и разпределение на елементите в организма се използва все по-сложна пробоподготовка и се отделя особено внимание на онези стъпки на анализа, които предхождат инструменталното определяне на елементите. За изпълнение на поставяните пред аналитиците експериментални задачи често пъти се изисква използването на инструментални системи, съставени от няколко паралелно или последователно свързани различни аналитични методи, което налага съобразяване с изискванията на всеки един от тях още при етапа на пробоподготовка.

Основни аспекти на пробоподготовката

След пробовземане и подходящо съхранение на пробите за анализ от биологични обекти, в това число и растителни материали, пробоподготовката е следващият важен етап на анализа. При пробоподготовката обикновено се прилагат повече обработки, при което нараства риска от замърсяване на пробата. Стъпката на пробоподготовка може да бъде дефинирана като обработка, която променя матрицата на пробата и я прави по-подходяща за последващ инструментален анализ. Обикновено това се постига чрез опростяване на химичния състав на пробата чрез различни стъпки на екстракция, филтруване или най-общо – разделяне на определяемите от пречещите компоненти [11]. Конвенционалните протоколи за пробоподготовка включ-

ват няколко етапа, като изолирането на анализите от твърдата матрица е един от най-сложните. Проблеми възникват основно поради възможности за загуби и замърсяване по време на пробоподготовката, поради продължителността на пречистване на анализите от матрични компоненти, както и поради разход на чисти разтворители. Направления за решаване на тези проблеми са развитието на нови методи и подобряване на техниките за екстракция [12].

В етапа на пробоподготовка участват обикновено няколко стъпки на солибилизация, екстракция, пречистване, опепеляване, разграждане и други, като даден подход може да се окаже по-пригоден, в зависимост от конкретните цели на анализа. Например, при определяне на елементите, свързани с биомолекули, е важно да се използват „меки“ условия за пробоподготовка, за да се намалят загубите от разпадането на молекулни форми и промени на анализите в хода на пробоподготовката [11]. В други случаи, значителна част от пробоподготовката може да се пропусне при използване на инструментални методи като LA-ICP-MS или ETV-ICP-MS [13]. На фигура 1 са обобщени някои от етапите за пробоподготовката в биеоорганичния анализ, според Mesko и съавтори [14].

Екстракция и стабилност на елемент-свързаните видове от растителната тъкан

Изследователските подходи за специационен анализ могат да бъдат *in situ* (направо в организма) или *ex situ* (извън организма, след извличане). С изключение на LA-ICP-MS, MALDI-MS, SELDI-MS, останалите ICP-MS методи, а и повечето масспектрални техники

са *ex situ* методи, при които елементите трябва да бъдат екстрахирани от тъканта и прехвърлени в подходяща течна или газова фаза. Най-критичния момент по време на пробоподготовката е екстракцията [15]. Анализът на растения не прави изключения в това отношение [16–18]. Растителните клетки съдържат химични видове с различна кинетична и термодинамична стабилност. Някои химични видове са стабилни и могат да се извлекат от тъканта без да претърпят съществени промени, въпреки че и при тях голяма част от химичните видове могат да се разпаднат, дисоциират или да претърпят лиганден обмен още при хомогенизиране на пробите, като така се губят едни химични видове и се получават артефакти [19,20].

Много металобиомолекули имат химични полиморфизми [21] вследствие на възможността един лиганд да комплексообразува с различни метални йони, поставен в „мултийонната“ среда на клетъчните флуиди [22]. Например анализът на тъкани, богати на протеини/пептиди с много цистеинови и хистидинови аминокиселинни остатъци, е предизвикателство при специационния анализ на преходни метали поради високия афинитет на –SH към координиране с преходни метали [23,24]. Още повече, при пробоподготовката, след разрушаване целостта на тъканта, се освобождават множество ензими като протеази, амилази, пектинази, целулази, липази и фосфатази. Поради това съставът и свързването на елементите в пробата могат да се променят и да станат съществено различни от тези в клетката.

Някои химични видове лесно се окисляват, което изисква екстракцията и много от процедурите на пробоподготовка да се извършват в инертна среда (азот или



Фиг. 1. Схема на стандартен аналитичен ход при определяне на елементи в свързани форми в растителни проби.

аргон) [24]. Установено е утаяване като биокристалити или съутаяване с полизахариди и протеини на Cu и Zn в растителни тъкани [25].

Растителните клетки съдържат химични видове с много различна разтворимост, поради което избора на подходящ екстрагент е много важен [26]. Киселинността във вакуолата (pH=5.5) е по-висока от тази в цитозола (pH=7.5), затова pH е основен параметър при екстракционните процедури. Също така от голямо значение са вида на разтворителите, състава на буферите, йонната сила на разтворите, температурата, състава на екстракционната атмосфера, добавянето на редуциращи агенти и ензимни инхибитори, процедурите на хомогенизиране и времето за екстракция за възможно пълно извличане на анализите от матрицата. За получаване на точни и възпроизводими резултати е необходимо валидиране на всички процедури, а това често изисква матрично наподобени сертифицирани референтни материали, каквито липсват за някои матрици или са трудно достъпни [27].

Методики за екстракция

Най-често използваната процедура за хомогенизиране и екстракция с цел специационен анализ на растителни материали включва начална стъпка, при която изсушен или замразен растителен материал се „стрива“ с течен азот в промити хаванчета [22,28–32]. Този подход е прилаган към химични видове в участието на пептиди като глутатион, фитохелатини (PCs), никотинамин (NA) [33] и металотионини [32,34], макробiomолекули като пектини [35], селеноцистеинови производни [36] и различни свързани форми на арсена [37] и талия [38]. Други подходи включват използването на хидравлични преси за извличането на растителни сокове от корени и листа [39] или механични мелници за смилане на плодовете [30].

Разтворителите използвани за екстракцията са разнообразни – от дейонизирана вода [28,40] до сложни смеси съдържащи няколко буфера с органичен и неорганичен състав, електролити, редуциращи агенти, различни ензимни инхибитори и антибактериални субстанции [23,41]. Аминокиселините, никотинамин и пептидно базирани координационни комплекси, включващи глутатион, фитохелатини и металотионини като лиганди са сред най-често изследваните в растителни тъкани и обикновено се екстрахират с разредени водни буфери като PBS (phosphate buffered saline), TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethane – $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$)-HCl или амониев ацетат с pH между 5.5 и 7.5. Понякога към пробата се добавя малко количество кварцов пясък за подпомагане на стриването и раздробяването на тъканите [22,35]. Ефективността на екстракцията може да се повиши, ако е комбинирана с разбъркване и разклащане [22,29] при температура в диапазона 30–90°C [40]. След това най-често пробите се центрофугират

и се работи със супернатанта, като понякога той се лиофилизира преди специационния анализ [32,33]. Често за намаляване на времето за екстракция или повишаване на ефективността ѝ се използва ултразвук [37,42]. Fang и съавтори [43] показват как с намаляване на времето за екстракция от 20 на 5 часа се намалява окислението на селенометионин при екстракция от ориз. Това се потвърждава и от други автори [44]. Затова ултразвуковата екстракция е често използвана при анализ на арсенови и селенови химични видове с цел намаляване на окислението чрез редуциране на времето за екстракция. Такъв е случаят и при определяне на селено-аминокиселини [45] и метилиран арсен [46], дори при условия на слабо нагряване. Същото не е в сила за повечето пептидно-базирани координационни комплекси като тези на глутатиона, фитохелатините и металотионините, където трябва да се минимизира разпадането по време на всички стъпки на пробоподготовка – от хомогенизиране до крайния анализ. В тези случаи пробоподготовка се извършва в инертна атмосфера в комбинация с леденостудени екстрагенти, с или без редуциращи агенти като меркаптоетанол, дитиотреитол или трис(2-карбоксетил)фосфин [30,32,47].

Различни форми на един и същи елемент обикновено не могат да се екстрахират количествено при използване само на един екстрагент, поради различия в разтворимостта и повърхностния афинитет към клетъчните органели и биополимери (основно протеини и въглехидрати). За решаване на този проблем са разработени последователни [35,48] или паралелни [19,43,46] екстракционни процедури. При първия подход се прави последователна екстракция на химичните видове с различни екстрагенти като по този начин те се разпределят между отделните екстракти. Обикновено се започва с екстракция при меки условия, например с вода или разредени разтвори на соли, след което се използват ензими и органични разтворители, а накрая се прилагат екстракции със силни киселини или техни смеси. Такива подходи са прилагани за специационен анализ на селен в чесън [48], кадмий в *Arabidopsis* [35]. Селеновите видове от чесъна първо са екстрахирани с вода и остатъкът е подложен на пет последователни стъпки: (1) лизис на клетъчните стени със смес от целулаза, протеаза, хитиназа и глуканаза; (2) протеолиза с протеаза XIV; (3) 0.1M HCl; (4) 1M Na_2SO_4 (pH=7) и (5) 25% разтвор на CS_2 . Процедурата позволява извличане на 90% от общия селен при запазване на неговите форми на свързване. Селенът в отделните фракции е определен като: водоразтворим; свързан с клетъчната стена; свързан с протеини; елементен; и селенит. Най-висока е концентрацията на елементния селен, селенат и селенит, които представляват около 95% от екстрахирания селен. Резултатите от това изследване [48] се различават от тези на Larsen и съавтори [19], които използват лиофилизиран чесън и прилагат паралелна екстракция с воден разтвор на хидроксилламин

(ензимен инхибитор на алиназата) или протеолиза с протеаза XIV, и докладват почти 100% ефективност на екстракцията при протеолиза. Резултатите показват, че неорганичният селен е 10%, а 67% от селена е свързан в гама-глутамил-Se, селенометионин и селеноцистеин. Разпространени подходи за екстракция при анализ на растенията са ускорената екстракция при високо налягане (ASE, accelerated solvent extraction) и микровълново подпомогната екстракция в комбинация с разграждащи ензими. Такива са докладвани при анализи на селен и арсен в ориз [49], рапица и *Arabidopsis* [50].

Разрушаване на клетката и методи за солубилизация

Първата стъпка на пробоподготовка при определяне на метали/металоиди и техни свързани форми, като се има предвид наличието на протеини и други биомакромолекули, е разграждането на клетката (лизис) или частично разпадане на клетката с цел извличане на анализите от клетката или тъканта [11,12]. Най-разпространените процедури за раздробяване на клетките включват: (1) механично (с различни устройства за механично смилане и хомогенизиране като хаванчета и пестици със или без използване на течен азот) или (2) химично хомогенизиране (с добавяне на детергенти, при което клетъчните мембрани се солубилизират); (3) лизис на клетките или техни компоненти, с или без добавка на ензими (за разграждане на клетъчните стени или екстракция на анализите се използват специфични ензими); осмоза. Други използвани подходи са замразяване или пресоване [11,51, 52].

Понякога използването само на течен азот е достатъчно за разрушаване на клетъчната структура и последваща екстракция на анализите. Растителните тъкани биха могли просто да се смелят добре и да се екстрахират с участието на течен азот [53,54] или директно да се раздробят или замразят, след което да се смилат/стриват преди следваща стъпка на клетъчен лизис с подходящи буфери [5]. Процедурите за пробоподготовка при растителни и животински тъкани могат да се различават значително, както и при работа с различни тъкани в рамките на един и същи вид.

При механичните методи за хомогенизиране могат да се използват високоскоростни миксери, клатачни машини [55], стъклени сачми [47], стъклени хомогенизатори [56] или ултразвукови прибори [56,57].

Стъпката на екстракция се счита за критичен етап, поради голямото разнообразие на биомолекули, чиито структури трябва да се разрушат, съхранят или освободят, в зависимост от конкретните аналитични нужди. Могат да се използват различни екстракционни процедури [58]. След хомогенизиране на тъканта клетките трябва да се лизират и обработят в зависимост от наличието (или не) на клетъчни стени. Това е по-сложно при растителните тъкани поради наличието на пове-

че слоеве от целулоза, което налага използването на по-ефективни методи за смилане и хомогенизиране. Въпреки, че най-разпространените методи за лизис са физични, в последните години се използват множество процедури, в които основна роля имат химически реагенти, например детергенти, поради по-ниската цена и пригодността за последваща електрофореза, хроматография и маспектрометрия [52,58]. В допълнение, в много публикации се изтъква и преимущество на ултразвуково третиране за повишаване ефективността на екстракцията на анализите след прилагане на изброените процедури [56,57]. Като цяло, екстракцията е продължителна при температура около 37°C [46,51]. В много статии се разглежда специално на арсен и селен, а аналитичните процедури при тези определяния се дискутират широко в различни литературни източници [5,45,46,59,60].

Буфери

За оптимизация на йонната сила на разтворите при протеинова солубилизация се използват солеви буфери, подбрани съгласно типа на протеините/биомолекулите в пробите за анализ [58]. Най-широко използвани са буферите на основата на TRIS – при специалния анализ на Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Na, Pb, Pt, Se, Zn [47,52,54,56,58,61]. TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethane) може да се използва в комбинация със солна киселина в буфери с pH 6–8 (такива буфери са добили популярност като TRIS-буфери), за екстракция на слабо свързани неорганични химични видове и такива, в които участват аминокиселини, като селенит, селенат, селено-аминокиселини. За екстракция на селен е докладвано, че при използване на TRIS-HCl буфер се освобождават около 50% от свързания селен в листа, но не се наблюдават различия, ако се използва само солна киселина [53].

Детергенти

Използването на SDS (натриев додецилсулфонат) или 3(3-холамидопропилдиметиламоний)1-пропансулфонат (CHAPS) е препоръчително при елементарна специация, когато елементите са вградени в асоциати и комплекси или се налага разрушаване на клетките [5]. В този случай детергентите разрушават клетъчните мембрани, намаляват липид-протеиновите взаимодействия и след това солубилизират метал-свързаните протеини и/или предотвратяват хидрофобни взаимодействия [21].

SDS е използван при анализ на селено-протеини в бактерии и тъкани на бозайници, като повишава аналитичния добив на селен и освобождава свързаните аминокиселини в селено-протеин [21,47,60] или при екстракция на метали, като Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb от протеини [62].

Въпреки че някои автори докладват пречения при първата дименсия на последващо двумерно разделение [58], други твърдят, че използването на SDS в комбинация с нейонни или цвтерйонни детергенти (Triton X-100, CHAPS) не е съпроводено с пречения при анализа [63]. Що се отнася до маспектралния анализ, много автори препоръчват премахването на SDS преди инструменталния анализ, тъй като SDS пречи при MALDI (матрично подпомогната лазерна десорбционна йонизация) и ESI (електроспрей йонизация) базираните техники, поради потискане на сигнала, както и при LC-ICP-MS (течна хроматография с ICP-MS детекция) [64]. Друга особеност на SDS е, че реактивът не е подходящ за всякакви протеини, тъй като силнокиселите протеини не се свързват с него. В този случай като алтернатива се предлага използването на цвтерйонни детергенти. Също така SDS не е разпространен при приложения с 2D-GE (двумерно разделение на гелна електрофореза) [63].

Нейонните детергенти като Triton X и NP-40 благоприятстват предотвратяването на денатурация на протеините при първата дименсия на 2D-GE. Използват се в концентрации 0.4–4%, въпреки че се срещат публикации и за по-високи използвани концентрации [52,63]. Цвтерйонният детергент CHAPS показва по-добра ефективност при солубилизация и принадлежи към групата на линейните сулфатаинови сурфактанти [63]. Той показва по-добра съвместимост при изоелектричното фокусиране при използване на електрофореза [21,57].

Днес са търговски достъпни готови реагенти за клетъчен лизис, съдържащи основно детергенти и протеазни инхибитори. Полезно описание на такива търговски реагенти е дадено в [58].

Редуциращи агенти

Някои специфични реагенти могат да участват в пробоподготовката за разкъсване (редукция) на дисулфидни мостове, подпомагайки процеса на денатурация на протеините [58, 63] и намаляване на техното окисление [65]. За тази цел се използват тиол-съдържащи редуциращи агенти като дитиотреитол и меркаптоетанол. Тяхна алтернатива са фосфинови съединения като трибутилфосфин или трис-карбоксиетилфосфин. Възможни са проблеми при йонизирането на редуктора, утаяването на протеини и проблеми при разделянето чрез хроматография [63,66].

Goenaga-Infante и съавтори [67] използват дитиотреитол при екстракция на селенови протеини с метилсулфонилхлорид. Авторите използват тази комбинация като антиоксидант и протеазен инхибитор при специация на селен. Други [60] не намират разлика между резултатите, получени с SDS и комбинацията на SDS с редуциращ агент (фенилметил-сулфонилфлуорид).

Ензими

Принципно, ензими могат да се използват за разграждане на матрицата или селективно освобождаване на анализите от пробата, например селено-киселини [59,60]. В последния случай ензимите са атрактивен подход поради чувствителността на органичните молекули към промени в рН и температурата, а при използването на ензимни реакции условията на протичане са близки до тези в живия организъм. Също така не се очакват странични ефекти поради специфичността на ензимните реакции [68]. За освобождаване на селеновите химични видове от клетъчните стени се предлага търговски ензимен реагент, съдържащ ламинариназа, ксиланаза и целулоза, водещ до получаването на двойно по-големи добиви [60]. При използване на протеолитни ензими почти 90% от селена в бактериални проби се извлича и такива ензими се използват широко при екстракция на химични видове [67–70]. Провеждани са изследвания върху ефективността на различни ензими при извличане основно на селенови съединения [53,65], например като протеаза XIV и протеиназа К от растителни тъкани и последващ специационен анализ с HPLC-ICP-MS. В други изследвания [68,71] се използват протеолитични и разграждащи клетъчните стени ензими като пепсин, трипсин, проназа, например при анализ на гъби.

Ензимна екстракция широко се използва при определяне на химични видове с участието на протеини, като е възможно и комбиниране с микровълнова екстракция с добиви над 95% [53,68,72].

α -Амилазни ензими се използват при специация на As в ябълки. Наблюдава се висока ефективност на екстракцията поради разграждане на скорбялата и свързани с нея химични видове [46].

Методи за подпомагане на екстракцията

Ускорена екстракция при високо налягане

Ускорената екстракция при високо налягане (ASE) е метод за екстракция при повишена температура и налягане с използване на течни екстрагенти. При такива системи се използват температури от 50–200°C (над точката на кипене на разтворителите и малко под критичната точка на разтворителя) при налягане от 500 до 3000 psi. Ефективна екстракция се постига обикновено в рамките на 5–10 min. Такива системи са много подходящи за автоматизирана пробоподготовка и интегриране в рамките на инструменталния ход на анализа. Газ под налягане се използва за пренос на екстракта от клетката на прибора към съда за съхранение на екстракта, който след това автоматично или ръчно се пренася до аналитичната техника за анализ. Тъй като системите са комерсиални и компютърно управлявани, са възможни разнообразни програми, а резултатите са

възпроизводими. Недостатък е високата цена на тези системи. Много подходящи са при анализ на термолабилни съединения и асоциати, тъй като използването на високо налягане позволява провеждане на екстракцията при по-ниска температура, без загуба на ефективност. Предимство на тези системи пред надкритичната течна екстракция (SFE) е богатия избор от органични и неорганични разтворители (вода, органични разтворители, буфери и разнообразни техни смеси). В литературата са налични примери за използването им при специация на As, Se и др. [5,72–74]. Често пъти ефективността на екстракцията с подобни системи е по-висока от тази при ултразвукова екстракция.

Следва да се отбележи, че в литературата липсват данни за SFE и екстракция при температура на кондензация (cloud point extraction – CPE) прилагани към металомиката. Такива подходи са често срещани при протеомиката [13,75].

Микровълнова екстракция

Напоследък използването на микровълново лъчение има много приложения при сушене, почистване, екстракция, както и адсорбция/десорбция и разлагане [11,12,14,76–78]. Причината за ефективността на тази енергия се отдава на молекулните трептения при миграцията на йонните видове и/или миграцията на диполни химични форми в микровълново поле [79]. Затова проби, съдържащи диелектрични материали (молекули/йони с индуциран или постоянен диполен момент), могат да абсорбират микровълновото лъчение и в резултат се получава бързо и равномерно нагряване [80].

Микровълновата екстракция се счита за ефективен и подходящ начин за екстракция на лабилни видове от разнообразни матрици. Частиците на материала се загряват равномерно, могат да се избегнат нежеланите ефекти от прегряване на отделни части от пробата, като се регулира мощността, експозицията, броя и продължителността на циклите на облъчване. Установено е, че не са необходими високи температури за ефективна десорбция на анализите от матрицата с използване на микровълнова екстракция [76]. Като резултат от бързото и контролирано нагряване се постига силно понижаване на времето за екстракция [81] в сравнение с конвенционалното нагряване. Необходимо е, обаче, всяка методика за екстракция да се оптимизира и валидира, за да се избегнат нежелани загуби или промяна на идентичността на анализите поради прекомерно загряване [12,76,81].

Методът е използван при специация на As с последващо CE-ICP-MS определяне [82]. При определяне на Γ , IO_3^- и Vg^- , конвенционалните методи за пробоподготовка като разтваряне със силни киселини в отворени системи, се съпровожда със загуби поради летливостта на продукти като HI или I_2 . Затова микровълновото разлагане е подходящ подход за пробоподготовка

[14,83–86]. За преодоляване на ефекти на памет при ICP-MS се препоръчва използване на алкални разтворители като амоняк, натриево основа, тетраметиламониев хидроксид и водоразтворими третични амини или разреждане на пробите. При това микровълновата екстракция е широко използван подход [86,87]. Методът е приложен и при характеризиране на метал-свързаните протеини с SEC-ICP-MS [88].

Ултразвукова екстракция

Ултразвуковото третиране на пробите спомага за по-добра солубилизация и по-ефективен транспорт на анализите от матрицата към екстрагента [89]. Източникът на ултразвукови високоенергийни вибрации е ултразвуков генератор, който превръща механична или електрична енергия в ултразвук. Разпространените в аналитичната химия електромеханични генератори се използват за захранване на водни бани или ултразвукови сонди [89].

Ефектът на ултразвук се състои предимно в явлението кавитация, което е образуване и растеж на газови мехурчета по време на ултразвукова обработка [78,89]. В резултат на адиабатното свиване в мехурчетата се получава загряване и повишаване на налягането. Тези процеси благоприятстват разтварянето на анализите в екстрахиращата среда и миграцията им от матрицата към екстрагента, както и навлизането на екстрагента в порите на твърди проби. Поради същите причини са възможни разпадане на анализите и загуби, което изисква прецизна оптимизация на методиките [78,89,90,90–93]. Ултразвукова екстракция е използвана при определяне на селено-протеини в бактерии преди 2D-GE разделяне и ICP-MS определяне [57], при специация на никел в растителни тъкани, последвано от LC разделяне и паралелно определяне на анализите с ICP-MS и ESI-MS [28]. В друга публикация с ултразвукова екстракция се подготвят проби за специация на арсен и успоредно определяне с CE-ICP-MS и CE-ESI-MS [95]. Живакът е определян успешно след екстракция от коса с ултразвук и последващ LC-ICP-MS анализ [95].

Цялостна пробоподготовка

Измиването на пробите преди екстракция и специационен анализ е препоръчително при растителните проби поради възможностите за повърхностно замърсяване с елементи от прах върху тъканите. Корените също имат голям капацитет за адсорбция на метални йони от почвата, а е възможна и адхезия на нейонни видове върху тях [96]. Почистването на корените от остатъци от почва е на практика невъзможно без увреждане на тъканта, затова много изследвания се провеждат с растения, отглеждани в хидропоника (водни разтвори с хранителни соли). За намаляване на риска

от лиганден обмен с външни за организма йони при хомогенизиране на пробите, преди хомогенизирането растенията се промиват с разредени разтвори на калциеви соли при ниско рН с добавки или без добавки на ДТРА/EDTA (силни комплексообразуващи съединения), а преди това се промиват с няколко порции деионизирана вода. Разбира се, специфичният подход на всеки анализ използва различен протокол за пробоподготовка в зависимост от целта, използваните техники и конкретните обекти за анализ. Pedas и съавтори [6] измерват концентрацията на Mn^{2+} , адсорбиран по корените на растения и установяват, че концентрацията му е няколко порядъка по-висока от тази в самите корени. За да премахнат неорганичния As, Raab и съавтори [18] използват 10mM KH_2PO_4 с рН=6, докато екипът на Liu [37] почистват растителната тъкан с ледено студен разтвор на K_2HPO_4 с $Ca(NO_3)_2$ и MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) с рН=5,5. В някои случаи при анализ на богати на липиди тъкани като семена, се налага премахване на липидите. Често се използват органични екстрагенти като хлороформ-метанолни смеси [97] или петролев етер [48]. Sussulini и съавтори [61] изследват различни органични смеси за премахване на липидите и наблюдават съществени разлики при екстракцията на металопротеините от соя.

Масов баланс на елементите

Често пъти специационният анализ се провежда само с екстракта с водни буфери, в който се съдържат не повече от 20–40% от общите концентрации на повечето макро и микрокомпоненти на растителните проби [98,26]. При този вариант се пропуска основната фракция от елементи, свързани с твърди фази (клетъчни стени, органели и биополимери) и водонеразтворимите биополимери. Затова накрая на всеки специационен анализ би трябвало да се прави масов баланс и да се установи каква част от общото съдържание на елемента е определена под формата на химични видове в изследваната тъкан [99]. Необходим е и общ елементен анализ на изследваните проби, за да се определи общото съдържание на елементите.

Стабилност на химичните видове по време на съхранение и фракциониране

Сред предварителните стъпки на анализа при определяне на специфични метал-органични съединения, процедурите на пробовземане и съхранение са важни за запазване на информацията за химичните видове по време на целия аналитичен процес. Възможно е да се обобщат две основни стратегии: (1) „консервирането“ и запазването на химичните видове, непроменени през целия аналитичен ход, или (2) количествено превръщане на химичните видове в подходящи деривати за последващо разделяне, концентриране и количествено

определяне [100]. На практика се използват и двете стратегии. Контролът върху химичната стабилност и летливост на анализите може да се счита за толкова важен, колкото и останалите аспекти на анализа. Още повече, при съхранението може да настъпят промени с анализите като разлагане на съединения, което се определя от химичната природа на анализа и може да бъде повлияно от биохимични процеси, например ензимна активност [27]. Това в по-голяма степен важи за животинските, отколкото за растителните тъкани. Важен параметър, регулиращ скоростта на химичните процеси е температурата, която влияе върху степента и скоростта на евентуални превръщания на анализите. Стабилизирането на пробите може да се осигури чрез изсушаване или лиофилизация, но трябва да се внимава за загуби на летливи съединения [86]. Дълбокото замразяване или шоково замразяване на пробите в газова фаза с течен азот също са възможни варианти за предотвратяване на промени с химичните форми и асоциати [27]. Последният подход предлага и предимството на съхранение на пробите в инертна атмосфера. Ако тези манипулации са неподходящи в конкретния случай, то често пробите се замразяват за кратко време при $-20^{\circ}C$.

При условие че почиствените проби трябва да се съхраняват преди специационния анализ, от изключителна важност е да се осигурят условия, при които химичните видове и свързването на елементите да се запазят непроменени. В някои случаи, обаче, споменатите процедури на дълбоко замразяване на пробите при $-80^{\circ}C$ или лиофилизация могат да променят видовия състав поради окисление, разпадане или лиганден обмен [18]. Vacchina и сътрудници [101] наблюдават окисление на фитохелатиновите комплекси при лиофилизация, освен ако не се добавят редуциращи агенти като дитиотреитол. Bluemlein [16] описва разпадане на As-фитохелатиновите комплекси от *Thunbergia alata*, като повече от 90% от As(III)-PC₃ се губи за една нощ.

Поради нетрайността/нестабилността на много химични видове и асоциати с участието на метали, е желателно фракционирането и анализа да стават бързо и по възможност в един ход. Хроматографските техники в едно и двумерен вариант са удачен способ за фракциониране и разделяне на формите на елементите по различни признаци в зависимост от конкретните нужди и налични хроматографски фази. Вариантите за това са или фракционирането да става on-line или off-line. В литературата са описани множество работи и за двата варианта [102–106]. Гел-проникващата хроматография (SEC) е често използван вариант като първа аналитична стъпка след екстракцията. Използва се за фракциониране и изолиране на тези видове, представляващи интерес и последващ анализ посредством ICP-MS в off-line или on-line вариант. SEC е подходящ метод за фракциониране чрез разделяне на химичните видове по размер, а в малка степен – и по форма.

Съществена опасност представлява задържането на молекули, които са потенциални лиганди в колоната, като при последващо хроматографиране на метални комплекси е възможно протичане на лиганден обмен вътре в колоната, тъй като неподвижните фази използвани за направата на молекулно ситови колони често имат остатъчни заряди по повърхността си. Обратно, възможно е задържане и на комплексообразователи в колоната с подобен нежелан резултат [22,30]. За преодоляване на този проблем Persson и съавтори [22] правят инжекции с EDTA след всяко фракциониране, за да са сигурни в изчистването на колоната преди следващото разделяне на свързани с кадмий фитохелатинови (Cd-PC) комплекси и да получат възпроизводим резултати. След SEC-ICP-MS фракционирането по химични видове често за събраните фракции се прилага втора дименсия на ортогонална хроматография (т.е. механизмът на разделяне е с различна селективност от тази на първата дименсия), за да се идентифицират лигандите или свързаните с тях елементи. Обикновено се използва обратнофазова хроматография с MS идентификация на различни PC (фитохелатини) лиганди. Използват се кисели подвижни фази, за да се увеличи задържането върху хидрофобната неподвижна фаза, което обаче крие рискове за дисоциация по време на елуиране вследствие нестабилността на редица комплекси в кисела среда, както и на грешки при последващата интерпретация на масспектралните данни. Хуан и съавтори [107] използват ZIC-HIL-IC (хроматография с цвитерйонна неподвижна фаза за разделяне с хидрофилни взаимодействия) за изследване на фитосидерофорни (PS) видове, като детекцията е с ESI-MS. Малките PS-съдържащи комплекси, особено тези с желязо могат да се дисоциират или окислят по време на разделянето, което води до лиганден обмен и невъзпроизводими времена на задържане. Тук отново в колоната се въвежда EDTA след всеки анализ и преди следваща проба за блокиране на евентуални остатъчни комплексообразователи в колоната. Използването на бърз изократен режим на хроматографиране намалява дисоциацията на анализирани комплекси.

Между пробоподготовката и инструменталния анализ

Пречистване и концентриране на анализите

По време на и след процедурите на разделяне, пречещите съединения трябва да бъдат потиснати или отстранени. Пречещи компоненти са съединения, които взаимодействат с метални или металоидни химични видове от живата клетка или причиняват проблеми при етапа на разделяне [11]. Особено при методи за разделяне като газова и течна хроматография или електрофореза, пречистването на пробите е изключително важно. Много твърди проби (тъкани) съдържат

голям брой съединения със съвсем различна химична природа и свойства, като въглехидрати/полизахариди, въглеродороди, разнообразни липиди, аминокиселини, протеини, което води до получаването на прекалено сложни за интерпретация хроматограми. Анализът е затруднен, когато анализите са в много по-ниски концентрации в пробата, отколкото пречещите компоненти и затова се налага пречистване на пробите и добро разделяне на анализите от матричните компоненти [5]. Проблем представляват липидите. Освен че бързо се разграждат и структурата на евентуални техни асоциати може да бъде изгубена преди анализа, те трудно се отстраняват от пробите, ако не представляват интерес за определяне. Оптимизацията на екстракцията е важна и още на този етап от анализа трябва да се направи всичко възможно за извличане на по-малко пречещи вещества, т.е. да се направи по-селективно извличане. Налагат се стъпки на допълнителни обработки на крайните екстракти, за да се приведат целевите анализи в подходяща форма за инструментален анализ. Лиофилизация, ултрафилтрация, гел-хроматография, твърдофазна екстракция и колонна препаративна хроматография са част от разпространените подходи в тази насока. Понякога може да се използва и селективно утаяване или съутаяване на някои химични видове, но това крие рискове от промяна на химичните форми на анализите и други проблеми [108]. Един подход за премахване на пречения от матрицата е използването на центробежна сила с различни варианти на центрофугиране и ултрацентрофугиране. Тези техники са широко разпространени при работа с кръвни, но и при анализ на растителни проби [54,75,109].

Заедно с опростяването на матрицата, понякога е възможно и концентриране на анализите в изолираните фракции, най-често при off-line процедури. Често при работа със сложни биологични проби се налага първо лиофилизация и микрофилтрация (по-удобно е за количествени цели).

Ултрафилтрацията е друг разпространен off-line подход за мембранна сепарация на вещества според определени размер и маса. Тя е подходящ подход за разделяне на соли и нискомолекулни от вискомолекулни съединения. Основава се на прекарване на екстрактите през полупропусклива мембрана, задържане на големите молекули/частици и пропускане на малките. За създаване на напорна сила се използва центробежната сила при центрофугиране. Мембраните, използвани при молекулна филтрация са с размер на порите от 1 до 1000 Å и обикновено разделят частици с маса до 10⁶Da [5]. Частици с размери под пределния размер на порите преминават през мембраната, а по-големите се задържат, като по този начин се концентрират върху нея. За разлика от утаяването, този метод предлага бързина и минимално нарушаване на структурата на веществата [5]. При анализ на нискомолекулната фракция (химични видове с молекулна маса

под 10 kDa) на екстракти от водорасли се установява наличие на 100% от As от пробата [110]. В друга публикация [111] след ултрафилтрация се определят елемент-свързани видове на арсена (As(III) и As(V) MMA, DMA и арсенобетаини) в кръвни екстракти и клетки чрез LC-ICP-MS след предварително отстраняване на молекулите над 3000 Da. Подобен подход се прилага при анализ на цереброспинални течности за анализ на Ca, Cu, Fe, Mn, Zn с SEC-ICP-MS [112].

Използването на гелфилтрираща хроматография (при ниско налягане) е метод за разделяне с по-добра разделителна способност и широки възможности. Може да се прилага както off-line, така и on-line. Прилаган като стъпка на предварително пречистване най-често се използва за разделяне и премахване на високомолекулни съединения/биополимери (полизахариди и протеини) и други съединения, които биха се сорбирали в хроматографската неподвижна фаза на последващо аналитично разделяне или биха се елуирали заедно с метални съединения при специационния анализ. Така биха могли да се спестят силния спад на хроматографска разделителна способност, намаляване времето на живот на аналитичната колона и потискане на сигнала при MS детекция [5].

Специация на Fe е докладвана от Silva и съавтори [75] в разтвори на човешки серум при физиологични стойности на pH и йонната сила. Използвана е GPC-ICP-MS (гелпроникваща хроматография с ICP-MS детекция), а 2D микро-HPLC-ICP-MS, съставена от комбинация на гелфилтрираща и йонообменна колони е използвана за разделяне и определяне на кадмий-металотионеинови форми [113]. Мултидименсионалните разделяния с комбинация на гелфилтрация преди капилярни HPLC колони и ICP-MS детекция са използвани при анализ на селенови съединения в чешънови екстракти [114].

GPC по своята същност не се различава от SEC, с изключение на химичната природа на използваните полимерни неподвижни фази, които са устойчиви на органични разтворители. Прието е с GPC да се означава разделяне с органични подвижни фази. И при двата метода изборът на неподвижна фаза се ръководи от вида и големината на порите на гела, чиито размер трябва да е по-голям от този на аналитите, за да бъдат те разделени. В противен случай аналитите се елуират в началото заедно с мъртвия обем на системата. Използването на GPC е подходящо за премахването на висококипящи съединения, които кондензират в инжектора на газовия хроматограф при евентуален GC анализ (например при специация на летливи метал-органични съединения като живачни, борни и др.) [108]. Докладван е метод за определяне на дифениларсенова киселина в коса чрез комбинация на хидрофилно полимерна GPC преди HPLC-ICP-MS [1].

Екстрактите от биологични тъкани могат да бъдат пречистени и с използване на класическите хромато-

графски техники и твърдофазната екстракция (SPE), рутинно прилагани при анализ на биологични проби и в клиничната практика. Твърдофазната екстракция се отнася към псевдо-хроматографските методи на разделяне (on-off), като принципът е задържане на определени групи съединения върху твърд сорбент (подобен на хроматографските неподвижни фази, но обикновено с по-голяма дисперсност и размери) и последващо елуиране на задържаните групи от съединения, като резултатът е значително по-чисти разтвори за инструментален анализ. Процедурите са опростени, но е задължителна прецизна оптимизация на тази стъпка, която обикновено изисква много време и опит. SPE е възпроизводима и надеждна техника за премахване на част от матрицата и концентриране на определяемите компоненти. Поради необходимостта от прецизно и времеемко оптимизиране на процедурите тя е подходяща най-вече при рутинна работа и след валидиране. Някои обекти на анализ, при които широко се използва SPE, са стероиди, естери, кетони, глицериди, алкалоиди, въглехидрати, както и катиони, аниони, металоиди, неорганични съединения. Тези методи са търговски добре разработени и са налични големи бази данни с готови методи, предоставяни от производителите на SPE продукти [108,116]. SPME (твърдофазната микроекстракция), макар и по-малко разпространена, също представлява добър метод за предварително пречистване на пробите. Тя се свързва най-вече с газхроматографски приложения, но се отличава с простота на работа, нисък разход на разтворители, бързина, ниска цена, висока продуктивност при автоматизация и микроприложения [117].

Подходящ подход за определяне на метилиран и етилиран живак в биологични проби е head-space SPME при последващ анализ с LC-ICP-MS [118]. Подобна процедура е прилагана и при анализ на органокалаени съединения с GC-ICP-MS [120].

При класическата екстракция са налице недостатъци като нисък добив и екстракция на много пречещи компоненти заедно с аналитите. Често се налага и концентриране на екстрактите преди инструменталния ход с цел понижаване на границите на откриване, както и приваждането на разтворите в съвместима форма с изискванията на инструменталните техники [28]. Това важи особено силно при определяне на следи. За летливи аналити, екстрахиран с летливи разтворители, е възможно изпаряване на разтворителя и довеждане на крайния разтвор за анализ до малък обем (0.05–1 ml при хроматографските методи). Трябва да се избягват загуби на аналитите под формата на аерозол или изпръскване [108]. При дериватизация, в повечето случаи се предпочита концентриране преди процеса с цел намаляване на загубите [28]. Друг разпространен вариант е изпарение под вакуум, подходящо при по-малко летливи разтворителите, по-голямо количество екстракт и/или термична нестабилност на аналитите [108].

Техники за дериватизация

Повечето металосъдържащи съединения имат ниска летливост и не са подходящи за GC анализ. Също така, за много метал-свързани химични видове директната детекция е затруднена или невъзможна. Например, някои органоселенови и органоживачни съединения са прозрачни в ултравиолетова светлина, UV детекцията е неподходяща без предварителна стъпка на превръщане в UV непрозрачни, химична модификация на целевите аналити – дериватизация [37]. Проблем би могъл да бъде недостатъчната чувствителност [120]. За да се удовлетворят изискваните аналитични параметри, също се използва дериватизация на аналитите до такива химични видове, които се определят с по-голяма чувствителност и/или селективност [37]. Дериватизацията при органометалните съединения не бива да променя връзките метал-въглероден скелет, за да се съхрани идентичността на изходните съединения [28]. Основните цели при замисъла на методи за анализ с дериватизация е повишаване на чувствителността, намаляване полярността на аналитите за по-лесна екстракция с органични разтворители, повишаване/намаляване на летливостта и постигане на по-добри хроматографски характеристики. Новите методи основно целят намаляване на себестойността на анализа чрез редуциране на необходимите реактиви, време и количество проба [28,81,121]. „On-column“ дериватизацията е разпространена при методите с капилярна електрофореза, капилярна газова и течна хроматография. Дериватизацията може да се прави преди или след екстракция в зависимост от конкретните приложения. Възможни са странични продукти и е необходимо прецизно оптимизиране и валидиране на процедурите, за да се избегнат нежелани отклонения [122]. Дериватизацията може да се използва в комбинация с всички останали методи за пробоподготовка.

Най-широко използваните методи за дериватизация при елементен анализ са хидридно генериране, генерирането на студени пари, етилиране и Гринярови реакции. Успешно може да се използва и криогенно улавяне (cryotrapping – CT) [123, 124].

Дериватизиране се използва при анализа на селено-протеини преди ESI-MS. Йодоацетамидът и йодооцетната киселина са подходящи реактиви за алкилиране на тио-групите, като предотвратяват тяхното окисление. Реакцията предизвиква увеличаване на масата на деривата с 58 amu [21]. Формирането на летливи хидриди е приложимо за елементите As, Bi, Cd, Hg, Ge, Pb, Sb, Se, Sn, Te [123,125,126]. Реакцията на неорганичните форми на тези елементи с натриев тетрахидроборат води до получаване на неорганични или алкил хидриди, но не всички химични видове реагират еднакво бързо. Този недостатък понякога може да се използва и за специационен анализ. Най-голямото предимство на този подход е разделянето на ана-

литите от матрицата. Хидридно генериране може да се свърже със стъпка на концентриране и фокусиране [124,127]. Разбира се методът има и недостатъци като пречения в течна фаза и потискане на хидридообразуването. Методът на студените пари е класически метод за определяне на живак, при който се използват редуктори като NaBH_4 или Sn(II) [94,128].

Дериватизацията с алкил(арил)борати е друга алтернатива на натриевия тетрахидроборат за определяне на Sn, Se, Hg, Pb. Етилирането с NaBEt_4 (натриев тетраетилборат), който е водоразтворим може да се комбинира с екстракция [129]. Приложения на техниката при анализ на метилживак с GC-ICP-MS са докладвани от Slaets [116]. В тази методика след дериватизиране се прилага Purge&Trap (продухване с инертен газ и улавяне – P&T) техника [119] или екстракция с нонан. Органокалаени съединения са анализирани след NaBEt_4 дериватизация в работите на Vercauteren [130,131]. След дериватизацията може да се приложи екстракция с изооктан, „stir bar“ твърдофазна екстракция (SBSE) [131] или head-space SPME (парофазов анализ с твърдофазна микроекстракция) [130].

Реакции с гринярови реактиви се прилагат за калаени, живачни и оловни химични видове. Техен недостатък е нестабилност и склонност да хидролизират във вода с образуване на Mg(OH)_2 . Като резултат тази пробоподготовката е усложнена и трудоемка [132].

Заклучение

Поради сложността и варибилността на биологичните матрици задължителна стъпка преди инструменталният анализ е качествената пробоподготовка, съобразена с целите на анализа и обекта. Значението на елементния анализ в последното десетилетие все повече се насочва към изясняване не само на качествения и количествен елементен състав, но и към изясняване на връзката между елементен състав и растителната физиология и биохимия. Широкото навлизане на омикс-технологиите в науките за живота, задълбочи интереса на аналитиците към елементната специация и анализа на хетероелементите в техните свързани форми в организма *in-vivo*. Това изисква значително по-сериозно внимание в стъпката на пробоподготовка, екстракция и съхранение на пробите за анализ. Тъй като елемент-свързаните форми са изключително разнообразни, често лабилни, с различно поведение и химичен характер, често експерименталните задачи са силно интердисциплинарни и многостранни. Необходимо е съобразяването с много особености, както в аналитичен и технически, така и в биологичен аспект. Подходите на третиране и пробоподготовка на изследваните обекти, предшествващи инструменталния анализ, в много случаи представляват „ахилесова пета“ при изпълнението на поставените задачи. Сложността и прецизността, с която би следвало да се конструират

и извършват анализите, градира в следния ред: определяне на общото съдържание на елементи в пробата; специация на елементите; определяне на формата на свързване на химичните видове и количественото им определяне. Тази стъпка на аналитичния процес не бива да се подценява и именно при нея аналитиците биха могли да постигнат подобрения и напредък, в рамките на аналитичната лаборатория.

Литература

- R. Lobinski, J. S. Becker, H. Haraguchi, B. Sarkar, *Pure Appl. Chem.*, 82 (2010) 2.
- L. A. Finney, T. V. O'Halloran, *Science*, 300 (2003) 931.
- J. K. Pittman, *New Phytol.*, 167 (2005) 733.
- C. S. Magalhaes, M.A.Z. Arruda, *Talanta*, 71 (2007) 1958.
- J. Szpunar, *Analyst*, 130 (2005) 422.
- P. Pedas, C. A. Hebborn, J. K. Schjoerring, P. E. Holm, S. Husted, *Plant Physiol.*, 139 (2005) 1411.
- R. N. Reese, C. A. White, D. R. Winge, *Plant Physiol.*, 98 (1992) 225.
- F. Van Belleghem, A. Cuypers, B. Semane, K. Smeets, J. Vangronsveld, J. d'Haen, R. Valcke, *New Phytol.*, 173 (2007) 495.
- A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayon, M. L. F. Sanchez, *Anal. Bioanal. Chem.*, 377 (2003) 236.
- J. Jeong, M. L. Guerinot, *Trends Plant Sci.*, 14 (2009) 280.
- C. S. Magalhaes, J. S. Garcia, A. S. Lopes, in M. A. Z. Arruda (Ed.), *Trends in Sample Preparation*, Nova Science Publishers, New York, 2007, p. 245.
- J. L. Luque-Garcia, M. D. L. Castro, *Trends Anal. Chem.*, 22 (2003) 90.
- J. S. Becker, *Inorganic Mass Spectrometry, Principles and Applications*, Wiley, Chichester, 2007.
- M. F. Mesko, J. S. F. Pereira, D. P. Moraes, J. S. Barin, P. A. Mello, J. N. G. Paniz, J. A. Nobrega, M. G. A. Korn, E. M. M. Flores, *Anal. Chem.*, 82 (2010) 2155.
- A. Sussulini, J. S. Garcia, M. F. Mesko, D. Moraes, E. M. M. Flores, C. A. Perez, M. A. Z. Arruda, *Microchim. Acta*, 158 (2007) 173.
- K. Bluemlein, A. Raab, J. Feldmann, *Anal. Bioanal. Chem.*, 393(2009) 357.
- E. M. Krupp, A. Mestrot, J. Wielgus, A. A. Meharg, J. Feldmann, *Chem. Commun.*, (2009) 4257.
- A. Raab, A. A. Meharg, M. Jaspars, D. R. Genney, J. Feldmann, *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 183.
- E. H. Larsen, R. Lobinski, K. Burger-Meyer, M. Hansen, R. Ruzik, L. Mazurowska, P. H. Rasmussen, J. J. Sloth, O. Scholten, C. Kik, *Anal. Bioanal. Chem.*, 385 (2006) 1098.
- R. Rellan-Alvarez, J. Abadia, A. Alvarez-Fernandez, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 22 (2008) 1553.
- H. Chassaigne, R. Lobinski, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 2536.
- 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.
- O. I. Leszczyszyn, C. D. Evans, S. E. Keiper, G. Z. L. Warren, C. A. Blindauer, *Inorg. Chim. Acta*, 360 (2007) 3.
- X. Wan, E. Freisinger, *Metallomics*, 1 (2009) 489.
- J. Wirth, S. Poletti, B. Aeschlimann, N. Yakandawala, B. Drosse, S. Osorio, T. Tohge, A. R. Fernie, D. Gunther, W. Gruissem, C. Sautter, *Plant Biotech. J.*, 7 (2009) 631.
- D. P. Persson, T. H. Hansen, K. H. Laursen, J. K. Schjoerring, S. Husted, *Metallomics*, 1 (2009) 418.
- Z. Mester, R. Sturgeon (Eds.), *Sample Preparation for Trace Element Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2003.
- D. Schaumloffel, L. Ouerdane, B. Bouyssiere, R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.*, 18 (2003) 120.
- L. Ouerdane, S. Mari, P. Czernic, M. Lebrun, R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.*, 21 (2006) 676.
- V. Vacchina, K. Polec, J. Szpunar, *J. Anal. At. Spectrom.*, 14 (1999) 1557.
- D. Baralkiewicz, M. Kozka, A. Piechalak, B. Tomaszewska, P. Sobczak, *Talanta*, 79 (2009) 493.
- L. Q. Chen, Y. F. Guo, L. M. Yang, Q. Q. Wang, *J. Anal. At. Spectrom.*, 22 (2007) 1403.
- V. Vacchina, S. Mari, P. Czernic, L. Marques, K. Pianelli, D. Schaumloffel, M. Lebrun, R. Lobinski, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 2740.
- B. B. M. Sadi, A. P. Vonderheide, J. M. Gong, J. I. Schroeder, J. R. Shann, J. A. Caruso, *J. Chromatogr.*, 861 (2008) 123.
- K. Polec-Pawlak, R. Ruzik, E. Lipiec, M. Ciurzynska, H. Gawronska, *J. Anal. At. Spectrom.*, 22 (2007) 968.
- M. Shah, S. S. Kannamkumarath, J. C. A. Wuilloud, R. G. Wuilloud, J. A. Caruso, *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 381.
- W. J. Liu, B. A. Wood, A. Raab, S. P. McGrath, F. J. Zhao, J. Feldmann, *Plant Physiology*, 152 (2010) 2211.
- A. Nolan, D. Schaumloffel, E. Lombi, L. Ouerdane, R. Lobinski, M. McLaughlin, *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 757.
- G. Weber, N. von Wiren, H. Hayen, *J. Sep. Sci.*, 31 (2008) 1615.
- S. McSheehy, W. J. Yang, F. Pannier, J. Szpunar, R. Lobinski, J. Auger, M. Potin-Gautier, *Anal. Chim. Acta*, 421 (2000) 147.
- E. Eren, D. C. Kennedy, M. J. Maroney, J. M. Arguello, *J. Biol. Chem.*, 281 (2006) 33881.
- A. P. Navaza, M. Montes-Bayon, D. L. LeDuc, N. Terry, A. Sanz-Medel, *J. Mass Spectrom.*, 41 (2006) 323.
- Y. Fang, Y. F. Zhang, B. Catron, Q. L. Chan, Q. H. Hu, J. A. Caruso, *J. Anal. At. Spectrom.*, 24 (2009) 1657.
- E. H. Larsen, J. J. Sloth, M. Hansen S. Moesgaard, *J. Anal. At. Spectrom.*, 18 (2003) 310.
- M. Montes-Bayon, M. J. D. Molet, E. B. Gonzalez, A. Sanz-Medel, *Talanta*, 68 (2006) 1287.
- J. A. Caruso, D. T. Heitkemper, C. B'Hymer, *Analyst*, 126 (2001) 136.
- I. Leopold, D. Gunther, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 359 (1997) 364.
- S. Mounicou, J. Szpunar, R. Lobinski, *Chem. Soc. Rev.*, 38 (2009) 1119.
- J. L. G. Mar, L. H. Reyes, G. A. M. Rahman, H. M. S. Kingston, *J. Agric. Food Chem.*, 57 (2009) 3005.
- M. Quaghebeur, Z. Rengel, M. Smirk, *J. Anal. At. Spectrom.*, 18 (2003) 128.
- M. Dernovics, P. Giusti, R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.*, 22 (2007) 968.
- M. Q. T. Tran, Y. Nygren, C. Lundin, P. Naredi, E. Bjorn, *Anal. Biochem.*, 396 (2010) 76.
- M. Montes-Bayon, E. G. Yanes, C. P. Leon, K. Jayasimhulu, A. Stalcup, J. Shann, J. A. Caruso, *Anal. Chem.*, 74 (2002) 107.
- A. H. S. Munoz, K. Kubachka, K. Wrobel, F. G. Corona, S. K. V. Yathavakilla, J. A. Caruso, K. Wrobel, *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 5137.
- Y. Nuevo-Ordenez, M. Montes-Bayon, E. Blanco-Gonzalez, A. Sanz-Medel, *Anal. Chem.*, 82 (2010) 2387.
- Z. Pedrero, Y. Madrid, C. Camara, E. Schram, J. B. Luten, I. Feldmann, L. Waentig, H. Hayen, N. Jakubowski, *J. Anal. At. Spectrom.*, 24 (2009) 775.
- L. Tastet, D. Schaumloffel, R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.*, 23 (2008) 309.
- B. Canas, C. Pineiro, E. Calvo, D. Lopez-Ferrer, J. M. Gallardo, *J. Chromatogr. A*, 1153 (2007) 235.
- A. Polatajko, N. Jakubowski, J. Szpunar, *J. Anal. At. Spectrom.*, 21 (2006) 639.
- C. Casiot, J. Szpunar, R. Lobinski, M. Potin-Gautier, *J. Anal. At. Spectrom.*, 14 (1999) 645.
- A. Sussulini, J. S. Garcia, M. F. Mesko, D. P. Moraes, E. M. M. Flores, C. A. Perez, M. A. Z. Arruda, *Microchim. Acta*, 158 (2007) 173.
- A. H. S. Munoz, K. Kubachka, K. Wrobel, F. G. Corona, S. K. V. Yathavakilla, J. A. Caruso, K. Wrobel, *J. Agric. Food Chem.*, 53 (2005) 5138.
- M. M. Shaw, B. M. Riederer, *Proteomics*, 3 (2003) 1408.

64. D. Botelho, M. J. Wall, D. B. Vieira, S. Fitzsimmons, F. Liu, A. Doucette, *J. Proteome Res.*, 9 (2010) 2863.
65. K. Wrobel, S. S. Kannamkumarath, K. Wrobel, J. A. Caruso, *Anal. Bioanal. Chem.*, 375 (2003) 133.
66. S. Hoving, B. Gerrits, H. Voshol, D. Muller, *Proteomics*, 2 (2002) 127.
67. H. Goenaga-Infante, G. O'Connor, M. Rayman, R. Wahlen, J. Entwisle, P. Norris, R. Hearn, T. Catterick, *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 1529.
68. Z. Pedrero, Y. Madrid, C. Camara, E. Schram, J. B. Luten, I. Feldmann, L. Waentig, Z. Stefanka, I. Ipolyi, M. Dernovics, P. Fodor, *Talanta*, 55 (2001) 437.
69. M. Montes-Bayon, J. Meija, D. L. LeDuc, N. Terry, J. A. Caruso, A. Sanz-Medel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 153.
70. P. Jitaru, S. Vaslin-Reimann, P. Fiscaro, *Anal. Chim. Acta*, 657 (2010) 100.
71. M. Dernovics, Zs. Stefanka, P. Fodor, *Anal. Bioanal. Chem.*, 372 (2002) 473.
72. E. Peachey, K. Cook, A. Castles, C. Hopley, H. Goenaga-Infante, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 7001.
73. J. W. McKiernan, J. T. Creed, C. A. Brockhoff, J. A. Caruso, R. M. Lorenzana, *J. Anal. At. Spectrom.*, 14 (1999) 607.
74. P. A. Gallagher, J. A. Shoemaker, X. Wei, C. A. Brockhoff-Schwegel, J. T. Creed, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 369 (2001) 71.
75. M. A. O. Silva, M. A. Z. Arruda, *Talanta*, 77 (2009) 985.
76. F. E. Smith, E. A. Arsenault, *Talanta*, 43 (1996) 1207.
77. L. M. Costa, D. C. M. B. Santos, V. Hatje, J. A. Nobrega, M. G. A. Korn, *J. Food Compos. Anal.*, 22 (2009) 238.
78. P. A. Mello, F. A. Duarte, M. A. G. Nunes, M. S. Alencar, E. M. Moreira, M. Korn, V. L. Dressler, E. M. M. Flores, *Ultrason. Sonochem.*, 16 (2009) 732.
79. H. M. Kingston, in S. J. Haswell (Ed.), *Microwave-enhanced Chemistry: Fundamentals, Sample Preparation and Applications*, ACS Professional Reference Books, Washington, DC, 1997.
80. A. Zlotorzynski, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 25 (1995) 43.
81. Y. Chen, Z. Guo, X. Wang, C. Qiu, *J. Chromatogr. A*, 1184 (2008) 191.
82. C. Yeh, S. Jiang, *Electrophoresis*, 26 (2005) 1615.
83. H. Matusiewicz, in Z. Mester, R. Sturgeon (Eds.), *Wet Digestion Methods: Sample Preparation for Trace Element Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2003, p. 193.
84. A. A. Oliveira, L. C. Trevisan, J. A. Nobrega, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 45 (2010) 447.
85. J. Chen, K. Wang, S. Jiang, *Electrophoresis*, 28 (2007) 4227.
86. G. Knapp, B. Maichin, P. Fecher, S. Hasse, P. Schramel, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 362 (1998) 508.
87. E. Al-Ammar, R. M. Reitznerova, J. Barnes, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 370 (2001) 479.
88. M. Gonzalez-Fernandes, T. Garcia-Barrera, A. Arias-Borrego, J. Jurado, C. Pueyo, J. Lopez-Barea, J.L. Gomez-Ariza, *Biochimie*, 91 (2009) 1311.
89. M. D. Luque de Castro, F. Priego-Capote, *Analytical Applications of Ultrasound*, Elsevier, Oxford, 2007.
90. K. S. Suslick, D. J. Flannigan, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 59 (2008) 659.
91. T. J. Mason, J. P. Lorimer, *Applied Sonochemistry: Uses of Power Ultrasound in Chemistry and Processing*, Wiley-VHC, Weinheim, 2002.
92. D. S. Junior, F. J. Krug, M. D. Pereira, M. Korn, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 41 (2006) 305.
93. F. Priego-Capote, M. D. Luque de Castro, *Trends Anal. Chem.*, 23 (2004) 644.
94. C. M. Tseng, A. de Diego, F. M. Martin, D. Amouroux, O. F. X. Donard, *J. Anal. At. Spectrom.*, 12 (1997) 743.
95. S. S. Souza, J. L. Rodrigues, V. C. O. Souza, F. Barbosa Jr., *J. Anal. At. Spectrom.*, 25 (2010) 79.
96. Y. P. Kalra (Ed), *Handbook of Reference Methods for Plant Analysis*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 1998.
97. J. L. Gomez-Ariza, T. Garcia-Barrera, F. Lorenzo, V. Bernal, M. J. Villegas, V. Oliveira, *Anal. Chim. Acta*, 524 (2004) 15.
98. R. Koplík, M. Borkova, B. Bicanova, J. Polak, O. Mestek, J. Kominkova, *Food Chem.*, 99 (2006) 158.
99. K. A. Francesconi, *Environ. Chem.*, 2 (2005) 141.
100. H. Emons, in R. Cornelis (Ed.), *Handbook of Elemental Speciation, Techniques and Methodology*, Wiley & Sons, Chichester, 2003, p. 7.
101. V. Vacchina, R. Lobinski, M. Oven, M. H. Zenk, *J. Anal. At. Spectrom.*, 15 (2000) 529.
102. T. Michel, E. Destandau, C. Elfakir, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 6173.
103. L. Picton, I. Bataille, G. Muller, *Carbohydr. Polym.*, 42 (2000) 23.
104. J. A. Karty, W. E. Running, J. P. Reilly, *J. Chromatogr. B*, 847 (2007) 103.
105. J. Buanuam, M. Miro, E. H. Hansen, J. Shiowatana, *Anal. Chim. Acta*, 570 (2006) 224.
106. E. Gokce, G. Andrews, R. Dean, D. Muddiman, *J. Chromatogr. B*, 879 (2011) 610.
107. Y. Xuan, E. B. Scheuermann, A. R. Meda, H. Hayen, N. von Wiren, G. Weber, *J. Chromatogr. A*, 1136 (2006) 73.
108. B. B. Kebbekus, in S. Mitra (Ed.), *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, Wiley & Sons, New York, NJ, 2003, p. 227.
109. R. A. Assis, I. L. Kuchler, N. Miekeley, M. B. Tozzi, *Anal. Bioanal. Chem.*, 390 (2008) 2107.
110. T. Falta, G. Koellensperger, A. Standler, W. Buchberger, R. M. Mader, S. Hann, *J. Anal. At. Spectrom.*, 24 (2009) 1336.
111. K. Ito, C. D. Palmer, A. J. Steuerwald, P. J. Parsons, *J. Anal. At. Spectrom.*, 25 (2010) 1334.
112. V. Nischwitz, A. Berthele, B. Michalke, *J. Anal. At. Spectrom.*, 25 (2010) 1130.
113. T. Miyayama, Y. Ogra, K. T. Suzuki, *J. Anal. At. Spectrom.*, 22 (2007) 179.
114. Y. Ogra, Y. Anan, *J. Anal. At. Spectrom.*, 24 (2009) 1477.
115. Y. Shibata, K. Tsuzuku, S. Komori, C. Umedzu, H. Imai, M. Morita, *Appl. Organometal. Chem.*, 19 (2005) 276.
116. S. Slaets, F. Adams, I. R. Pereiro, R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.*, 14 (1999) 851.
117. B. Gammelgaard, O. Jons, L. Bendahl, *J. Anal. At. Spectrom.*, 16 (2000) 339.
118. Y. Tsoi, S. Tam, K. S. Leung, *J. Anal. At. Spectrom.*, 25 (2010) 1758.
119. P. Jitaru, H. Goenaga-Infante, F. C. Adams, *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 867.
120. R. M. Harrison, S. Rapsomanikis, *Environmental Analysis using Chromatography Interfaced with Atomic Spectroscopy*, Ellis Horwood, Chichester, 1989.
121. C. F. Harrington, R. Clough, H. R. Hansen, S. J. Hill, J. F. Tyson, *J. Anal. At. Spectrom.*, 25 (2010) 1185.
122. J. M. Rosenfeld, *J. Chromatogr. A*, 843 (1999) 19.
123. J. Dedina, D. L. Tsalev, *Hydride Generation Atomic Absorption Spectrometry*, John Wiley, Chichester, 1995.
124. A. Hernandez-Zavala, T. Matousek, Z. Drobna, D. S. Paul, F. Walton, B. M. Adair, J. Dedina, D. J. Thomas, M. Styblo, *J. Anal. At. Spectrom.*, 23 (2008) 342.
125. L. Ebdon, L. Pitts, R. Cornellis, H. Crews, O. F. X. Donard, Ph. Quevauviller, *Trace Element Speciation for the Environment, Food and Health*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2001.
126. R. Jakob, A. Roth, K. Haas, E. M. Krupp, A. Raab, P. Smichowski, D. Gomez, J. Feldmann, *J. Environ. Monit.*, 12 (2010) 409.
127. R. A. Diaz-Bone, M. Hitzke, *J. Anal. At. Spectrom.*, 23 (2008) 861.
128. J. L. Rodrigues, D. P. Torres, V. C. O. Souza, B. L. Batista, S. S. Souza, A. J. Curtius, F. Barbosa Jr., *J. Anal. At. Spectrom.*, 24 (2009) 1414.
129. R. G. Fernandez, M. M. Bayon, J. I. G. Alonso, A. Sanz-Medel, *J. Mass Spectrom.*, 35 (2000) 639.
130. J. Vercauteren, A. De Meester, T. De Smaele, F. Vanhaecke, L. Moens, R. Dams, P. Sandra, *J. Anal. At. Spectrom.*, 15 (2000) 651.
131. J. Vercauteren, C. Peres, C. Devos, P. Sandra, F. Vanhaecke, L. Moens, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 1509.
132. M. B. de la Calle-Guntinas, R. Scerbo, S. Chiavarini, Ph. Quevauviller, R. Morabito, *Appl. Organometal. Chem.*, 11 (1997) 693.

Sample preparation in speciation analysis of plant tissues

K. Bardarov, V. Lyubomirova, R. Djingova

*Faculty of Chemistry and Pharmacy, St. Kliment Ohridski University of Sofia, 1 J. Bourchier Blvd., 1164 Sofia, Bulgaria
E-mail: krum.bardarov@chem.uni-sofia.bg*

Abstract

Plants are among the most studied biological objects by means of elemental analysis. Qualitative and quantitative elemental determination (of essential and nonessential elements) in plants is of analytical interest from the very beginning of instrumental methods development since plants are in constant relationship with the environment and anthropogenic activities, thus related to human well-being. High quality consistent sample preparation is a crucial preliminary step in the entire analytical process because of the variety and complexity of biological matrices. In the last twenty years, efforts in analytical method development are increasingly being directed towards clarifying linkages between elemental composition and plant physiology, biochemistry and bioorganic/bioinorganic interactions of elements in plants.

‘Omics’ (like genomics, proteomics, metabolomics or metalomics) studies are nowadays a major instrument of life science, directing analytical attention more to elemental speciation and heteroelements analysis of bound chemical forms in organisms *in vivo* than just to determine total concentrations. This requires even more attention to sample preparation, extraction, species preservation, and separation before elemental determination. The present work aims to review the most used and approbated sample preparation strategies for biological and mainly plant tissue samples before elemental speciation analysis published during the last decade. The information might be useful to analysts for constructing their own analytical protocols in consistence with their specific study.