



Spektrometria mas – możliwości wykorzystania w badaniach metabolomu roślinnego

Dorota Muth¹, Piotr Kachlicki², Maciej Stobiecki¹

¹ Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

² Instytut Genetyki Roślin, Polska Akademia Nauk, Poznań

Mass spectrometry – applications in the studies on plant metabolome

Summary

Identification of gene functions needs information from different molecular levels: transcriptome, proteome and metabolome. Chromatographic techniques combined with different types of detectors are methods of choice for secondary metabolites profiling. Mass spectrometry is one of the best methods for natural products identification due to its high selectivity and sensitivity. However, physico-chemical properties of secondary metabolites present in plant species have very strong influence on the applicability of chromatographic techniques for separation of different classes of organic compounds present in the samples extracted from plant tissue. There does not exist an analytical method capable for separation and identification of all metabolites present in plant tissue during a single analysis. This article describes chromatographic systems combined with different mass spectrometric techniques for identification of different classes of secondary metabolites present in plant material.

Key words:

capillary electrophoresis, gas chromatography, liquid chromatography, mass spectrometry, metabolomics, metabolites profiling, secondary metabolites.

Adres do korespondencji

Maciej Stobiecki,
Instytut Chemii
Bioorganicznej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Noskowskiego 12/14,
61-704 Poznań.

biotechnologia

1 (76) 156–175 2007

1. Wstęp

Związki organiczne są syntetyzowane przez rośliny jako substancje będące ostatecznym produktem ekspresji określonych genów. Wśród niskocząsteczkowych związków organicznych wyróżnić możemy metabolity pierwotne, bezpośrednio związane

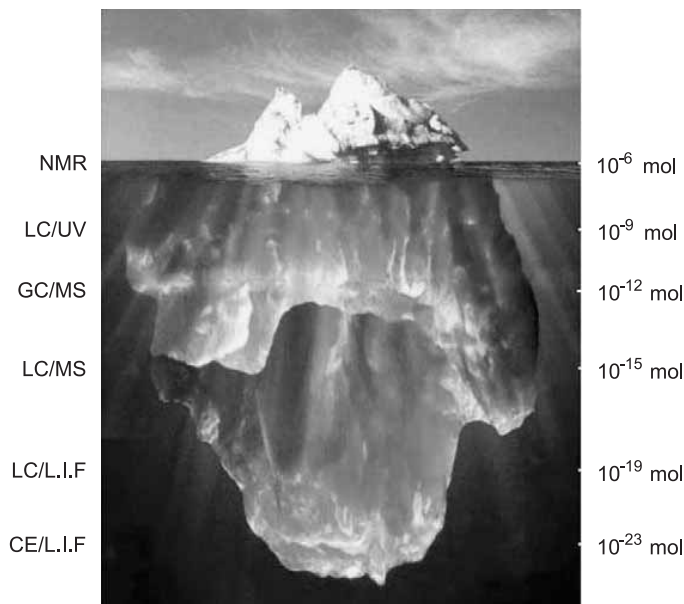
z normalnym wzrostem, rozwojem lub rozmnażaniem organizmu, i metabolity wtórne odgrywające rolę w innych procesach, nie zawsze jeszcze rozpoznanych. Efektywność syntezy danego związku naturalnego jest zależna od wielopoziomowej kontroli i regulacji. Przebieg kontroli poziomu transkrypcji genów oraz dalszej syntezy białek jest zależny m.in. od wpływu na organizm czynników stresowych, zarówno biotycznych jak i abiotycznych (1).

Opracowane dotychczas metody analizy metabolitów w organizmach zwierzęcych i ludzkich, dotyczące szczególnie monitorowania szeregu poważnych schorzeń genetycznych u noworodków, są obecnie szeroko stosowane (2-4). Tego rodzaju badania prowadzone z wykorzystaniem sprzężenia chromatografu cieczonego ze spektrometrem mas – LC/MS (ang. *liquid chromatography mass spectrometry*) są również prowadzone rutynowo w Polsce. Przedmiotem analiz jest ocena ilościowa oraz jakościowa aminokwasów, cukrów, kwasów organicznych cyklu Krebsa oraz kwasów tłuszczowych występujących w płynach fizjologicznych, a szczególnie w moczu (3,5).

Próby zdefiniowania funkcji genów poprzez określenie korelacji pomiędzy poziomem transkrypcji mRNA i ekspresji białek oraz syntezy różnych klas metabolitów zaowocowały opracowaniem nowego podejścia metodycznego, określanego mianem genomiki funkcjonalnej. Głównym celem prowadzenia badań z zakresu genomiki funkcjonalnej jest odpowiedź na pytanie jaką rolę odgrywa charakteryzowany gen. Identyfikację funkcji danej sekwencji w genomie można przeprowadzać przez sprawdzenie analogii, czyli przypisanie genomom o podobnych sekwencjach, występujących w różnych organizmach, tej samej roli. Można też stosować podejście bezpośrednie polegające na sprawdzaniu roli produktów genów poddawanych nadekspresji lub supresji. Alternatywną metodą jest wprowadzenie danego genu do układów heterologicznych, tj. organizmów, w których on nie występuje i wnioskować o jego funkcji na podstawie analizy produktów jego ekspresji na poziomie transkryptomu, gdzie bada się mRNA, proteomu gdzie analizuje się skład białek danego organizmu, czy wreszcie metabolomu, który obejmuje całość niskocząsteczkowych związków występujących w badanym układzie.

Badania produktów naturalnych będących składnikami metabolomu roślinnego zyskują coraz większe znaczenie. W połączeniu z danymi o poziomie transkrypcji mRNA oraz ekspresji białek i ich modyfikacjach potranslacyjnych pozwolą na określenie funkcji genów w organizmach oraz skomplikowanych sprzężeń pomiędzy analizowanymi poziomami – od genów do metabolitów wtórnych w organizmie żywym. Poznanie istniejących zależności pomiędzy szlakami syntezy substancji organicznych i zależności regulatorowych jest celem biologii systemów (6-8). Uzyskanie obrazu wszystkich procesów zachodzących w komórce wymaga całościowego (holistycznego) podejścia do analizy zjawisk obserwowanych w organizmach żywych. Konieczna jest jednak integracja uzyskanych danych i połączenie ich przy wykorzystaniu odpowiedniego modelu matematycznego badanego systemu (9).

W naszym opracowaniu omówimy zagadnienia związane z analizą roślinnych produktów naturalnych. Podstawową trudność podczas analizy składu metabolomu



Rys. 1. Porównanie czułości różnych metod instrumentalnych stosowanych do analizy niskocząsteczkowych metabolitów. Przedrukowano z publikacji (10), za pozwoleniem Elsevier.

stanowią zbliżone właściwości fizykochemiczne oraz znaczna liczba związków niskocząsteczkowych obecnych jednocześnie w tkankach. U roślin wyższych zidentyfikowano dotąd ponad 100 000 metabolitów, a szacuje się, że może to być 10% wszystkich związków obecnych w naturze. Liczba produktów naturalnych w pojedynczej roślinie może osiągać kilka tysięcy (6-11), a różnice w stężeniach związków chemicznych występujących obok siebie w komórkach powodują dodatkowe kłopoty z ich analizą. Na ogół możliwa jest analiza substancji różniących się zakresem stężeń w stosunkowo niewielkich zakresach ze względu na charakterystykę detektorów stosowanych w różnego rodzaju chromatografach. Istotnym parametrem detektorów jest ich czułość, która ma wpływ na uzyskanie wyników ilościowych na odpowiednim poziomie ufności (10). W związku z tym dobór właściwych metod instrumentalnych do analiz produktów naturalnych o odmiennych właściwościach fizykochemicznych ma duże znaczenie (rys. 1).

Definicje pojęć wykorzystywanych w metabolomice:

Metabolom: wszystkie substancje niskocząsteczkowe występujące w organizmie lub tkance.

Metabolomika: podejście badawcze umożliwiające obiektywną (niezafałszowaną) identyfikację jakościową i ilościową wszystkich metabolitów pierwotnych i wtórnych obecnych w danym organizmie.

Metabonomika: termin odnoszący się do badań nie dotyczących roślin, określa on ilościowy pomiar metabolitów w płynach fizjologicznych będący odbiciem zmian

patologicznych na skutek działania czynnika patogennego lub modyfikacji genetycznych.

Metaboliczny odcisk palca (ang. *metabolic fingerprinting*): szybkie i wysoko wydajne monitorowanie składu metabolitów w organizmie lub tkance, mające na celu porównanie próbek i analizę różnicową, bez konieczności identyfikacji poszczególnych składników mieszaniny.

Profilowanie metabolitów (ang. *metabolite profiling*): identyfikacja oraz analiza ilościowa metabolitów występujących w analizowanym organizmie. Z powodów praktycznych to podejście ogranicza się bardzo często do monitorowania (analizy) pojedynczych klas metabolitów wtórnych. Niektóre metody analityczne, umożliwiają jednoczesne analizowanie różnych klas metabolitów.

Analiza celowana (ang. *target analysis*): opiera się na profilowaniu wybranego metabolitu lub wąskiej grupy produktów naturalnych. Analizę tę prowadzi się na podstawie wcześniej zdobytej wiedzy, z użyciem zoptymalizowanych metod ekstrakcji i wstępnego oczyszczania wybranych produktów naturalnych (12,13).

Do identyfikacji produktów naturalnych izolowanych z tkanek organizmów żywych stosuje się metody instrumentalne, w których wykorzystywane są różne zjawiska fizyczne. W przypadku absorpcji lub emisji promieniowania przez substancje analizowane, detektorami są spektrofotometry promieniowania ultrafioletowego i podczerwonego oraz aparaty mierzące poziom fluorescencji. Pośród urządzeń do pomiaru fluorescencji najczęściej stosowane są aparaty wyposażone w lasery do wzbudzania fluorescencji (LIF, ang. *laser induced fluorescence*). W metodach magnetycznego rezonansu jądrowego wykorzystuje się zjawisko absorpcji energii o częstotliwości radiowej przez cząsteczki substancji chemicznych, natomiast w przypadku spektrometrii mas pomiarowi podlegają cząsteczki zjonizowanych substancji. Podstawowym atutem tych metod instrumentalnych jest bardzo wysoka czułość detekcji związków organicznych (na poziomie ułamków pikomoli – 1×10^{-12} g) oraz możliwość jednoznacznej identyfikacji składników mieszanin na podstawie rejestrowanych widm masowych.

Analiza metabolomu staje się obecnie coraz ważniejszym elementem badań prowadzonych w zakresie genomiki funkcjonalnej, jednakże całościowe ujęcie problemu analizy metabolitów wtórnych w próbkach otrzymanyh z roślin wymaga dalszych wysiłków skierowanych na polepszenie czułości i selektywności dostępnych metod analitycznych. Badanie metabolitów zyskało również uznanie w innych dziedzinach nauki niż genomika funkcjonalna, czy też biologia systemów. Analiza różnych klas metabolitów wtórnych ma na przykład duże znaczenie dla identyfikacji roślinnych substancji biologicznie czynnych wykorzystywanych w medycynie naturalnej. Stwierdzenie działania farmakologicznego preparatu roślinnego pociąga za sobą konieczność identyfikacji związku lub związków odpowiedzialnych za tę aktywność biologiczną (14), a analizy tego typu są prowadzone w przemyśle farmaceutycznym na dużą skalę (15-17). Całościowe podejście do analizy roślinnych metabolitów wtórnych określane jest mianem fitomiki (ang. *phytomics*) (16).

Określenie odpowiedniej diety, szczególnie jej składników pochodzenia roślinnego, może zredukować ryzyko chorób i tym samym przyczynić się do polepszenia i, w konsekwencji, przedłużenia życia. Korzystny wpływ na przebieg procesów życiowych niekoniecznie musi zostać przypisany wyłącznie optymalnemu składowi białek, cukrów oraz kwasów tłuszczowych, które są podstawowymi składnikami diety. Inne substancje obecne w pożywieniu, na przykład związki fenolowe będące roślinnymi metabolitami wtórnymi, mogą być odpowiedzialne za pozytywne oddziaływanie na przebieg procesów życiowych u ludzi (18). Kierunek badań, których podstawowym zadaniem jest opis roli metabolitów wtórnych w żywieniu oraz ich wpływu na organizmy zwierząt i ludzi nazywany jest nutromiką (ang. *nutromics*) (18,19).

Znajomość szlaków syntezy metabolitów wtórnych i genów odpowiedzialnych za przebieg syntezy oraz procesów regulatorowych, umożliwia wprowadzenie w roślinach odpowiednich modyfikacji genetycznych prowadzących do wzmożonej produkcji określonej grupy produktów naturalnych (6). W dalszych etapach badań informacje te są wykorzystywane do transformacji organizmów żywych w celu produkcji pożądaných związków. Podejście tego rodzaju jest stosowane do tworzenia roślin zmodyfikowanych genetycznie mogących syntetyzować surowce żywnościowe o odpowiednim składzie. Jednak nie można przewidzieć wszystkich efektów takich modyfikacji w otrzymany materiał roślinny i w konsekwencji w produkcie spożywczym. Konieczne jest zatem badanie metabolomów genetycznie zmodyfikowanych materiałów roślinnych oraz porównanie ich z materiałem niemodyfikowanym. Podejście takie umożliwia wykrycie ubocznych efektów związanych ze zmianami w składzie metabolitów wtórnych u roślin transformowanych (19).

2. Przygotowanie próbek do analiz

Ze względu na znaczną liczbę związków występujących w królestwie roślin, ich zróżnicowane właściwości fizykochemiczne oraz wielką różnorodność strukturalną nader istotny jest wybór odpowiedniej strategii eksperymentalnej umożliwiającej uzyskanie pożądanęj informacji dotyczącej identyfikacji i ilości produktów naturalnych występujących w badanym materiale (20). Podejścia analityczne wykorzystywane podczas badań metabolomu charakteryzują się bardzo różnym poziomem dokładności oraz czułości oznaczeń, a także liczbą możliwych do przeanalizowania i identyfikacji substancji znajdujących się w pojedynczej próbce. Do najmniej precyzyjnych należy metoda pozwalająca na określenie tzw. metabolicznego odcisku palca, dzięki której możliwa jest klasyfikacja próbek na podstawie wartości m/z (stosunku masy – m do ładunku – z) oraz intensywności kolejnych sygnałów (jonów) rejestrowanych na widmie masowym, pochodzących od poszczególnych składników mieszanin. W tego rodzaju podejściu analitycznym nie jest możliwa identyfikacja oraz oznaczenia ilościowe poszczególnych związków. Największą popularność zyskała metoda analityczna pozwalająca na profilowanie metabolitów, w której ozna-

czenia ilościowe i jakościowe obejmują możliwie dużą liczbę związków, a nawet kilka grup produktów naturalnych. Najbardziej ukierunkowanym podejściem jest analiza celowana, która jest prowadzona z nastawieniem na identyfikację konkretnych związków. W zależności od tego jak duża liczba związków ma zostać poddana analizie oraz jakie są ich właściwości fizykochemiczne dobierane są metody izolacji oraz detekcji produktów naturalnych (20).

Badania z zakresu metabolomiki obejmują m.in. zagadnienia związane z określeniem wpływu środowiska życia danego organizmu na jego fenotyp biochemiczny. Badania takie wymagają bardzo ścisłego zachowania procedur zarówno hodowli roślin jak i zbioru materiału (np. pora dnia lub nocy). Nieprecyzyjny dobór warunków wzrostu roślin i ich wieku, nieznajomość ich genetycznej tożsamości, niewłaściwa procedura pobierania materiału do analizy mogą prowadzić do wyciągnięcia nieprawdziwych wniosków z wyników przeprowadzonych analiz. Na przykład przesunięcie momentu zbioru materiału biologicznego na inną porę dnia istotnie wpływa na wyniki analiz metabolitów wtórnych w materiale roślinnym (14). Podczas badań wykonanych na ekstraktach liści *Ginkgo biloba* otrzymanych z roślin rosnących w identycznych warunkach, materiał do ekstrakcji zbierano wczesnym rankiem i późnym popołudniem. Stwierdzono, że zawartość metabolitów wtórnych (laktinonów terpenowych oraz flawonoidów) znacznie się różniła. W próbkach zebranych po okresie naświetlenia znacznie wzrastała zawartość pierwszej grupy związków, zaobserwowano również istotne różnice jakościowe w grupie flawonoidów (14).

Zmiany w procesach metabolicznych są reakcjami bardzo dynamicznymi, odpowiedź na bodźce zewnętrzne może być widoczna już w kilka sekund po wystąpieniu stresu, dlatego też wybór punktów czasowych jest istotnym elementem podczas analiz metabolomu. W celu zahamowania procesów enzymatycznych w zbieranym materiale, próbki zamraża się w ciekłym azocie, a następnie przechowuje w temperaturze -80°C . Niewłaściwe zamrożenie tkanki może spowodować utratę części metabolitów poprzez nieodwracalną ich adsorpcję w ścianach komórkowych. Obserwuje się również wydzielanie związków na zewnątrz, indukowane przez dotyk lub zranienie podczas zbioru materiału biologicznego (21,22). Ponadto kolejne rozmrażanie i zamrażanie próbek również powoduje zaburzenie równowagi pomiędzy poszczególnymi grupami produktów naturalnych występujących w roślinie w momencie zbioru. Alternatywną metodą jest wysuszenie materiału roślinnego. Usunięcie wody hamuje działanie enzymów, jednakże nie pozwala na uniknięcie strat związanych z oddziaływaniem produktów naturalnych z biopolimerami (cukry i białka) w ścianach komórkowych (22).

Badanie szlaków metabolicznych wymaga zastosowania metod ekstrakcji pozwalających na wydzielenie związków o różnicowanej polarności. Jeśli celem analizy są metabolity pierwotne należy wykorzystywać strategię umożliwiające ekstrakcję jak najszerszej grupy związków za pomocą mieszanin rozpuszczalników: metanolu, wody oraz chloroformu i/lub acetonu (23). Jeżeli analizy metabolitów wtórnych prowadzone są z nastawieniem na konkretną grupę związków np. alkaloidów,

flawonoidów, lipidów lub saponin wówczas metodę ekstrakcji dobiera się uwzględniając właściwości fizyczne i chemiczne wybranych produktów naturalnych (24). Wydajność ekstrakcji zwiększa się często podnosząc temperaturę procesu lub stosując techniki, w których podwyższa się ciśnienie podczas izolacji (20). Ekstrakcję pod ciśnieniem wykorzystano na przykład podczas badań składu izoflawonów oraz ich połączeń w soi (25).

Przy określaniu wpływu czynników zewnętrznych na fenotyp biochemiczny organizmu (skład metabolitów) należy wziąć pod uwagę różnorodność biologiczną. Zjawisko to wynika z odmiennych poziomów zawartości poszczególnych związków w ekstraktach otrzymywanych z poszczególnych roślin o takim samym genotypie, wzrastających w identycznych warunkach i traktowanych w ten sam sposób. Nie możemy oszacować zmienności składu pod kątem ilościowym jak i jakościowym, dlatego też aby przeprowadzany eksperyment był wiarygodny pojedyncza próbka powinna zawierać materiał pozyskiwany z kilku roślin (9,10). Na ogół różnice wynikające z różnorodności biologicznej przewyższają błąd wynikający ze stosowania danej metody analitycznej (26). W dotychczas przeprowadzonych badaniach dowiedziono, że zarówno procedury ekstrakcji metabolitów oraz blokowania grup funkcyjnych (derywatyzacji) analizowanych związków jak i sam proces analizy GC/MS wprowadzały przynajmniej dwukrotnie mniejsze odchylenia standardowe wyników od średniej niż te, które wynikały z występowania efektu różnorodności biologicznej (18). W celu zmniejszenia wielkości błędów wynikających ze sposobu prowadzenia izolacji substancji oraz stosowanych metod instrumentalnych, analizy powinny być wykonywane w przynajmniej czterech lub w niektórych przypadkach nawet ośmiu powtórzeniach. Taka liczba przeprowadzonych eksperymentów umożliwia wykonanie odpowiednio wiarygodnych obliczeń statystycznych.

Podczas stosowania niektórych metod instrumentalnych wymagane jest stosunkowo wysokie stężenie związków będących przedmiotem zainteresowania. W niektórych przypadkach należy brać pod uwagę konieczność wcześniejszego oczyszczenia próbek, w celu eliminacji maskującego wpływu innych związków występujących w badanym materiale. Najpowszechniej stosowaną metodą, która umożliwia niespecyficzne zatężenie bądź oczyszczenie analitu (substancji będącej przedmiotem badań) są metody ekstrakcji do fazy stałej – SPE (ang. *solid phase extraction*) (27,28). Mechanizm rozdziału różnych klas składników ekstraktu polega na selektywnej adsorpcji substancji do fazy stałej dzięki oddziaływaniom fizykochemicznym pomiędzy cząsteczkami substancji występującymi w próbkach ekstraktu a drobinami fazy stacjonarnej. Wypełnienia najczęściej wykorzystywane w kolumnkach do ekstrakcji do fazy stałej stanowią żele krzemionkowe z przyłączonymi za pomocą wiązań chemicznych łańcuchami alkilowymi o liczbie atomów węgla od C-2 do C-18, jest to tzw. faza odwrócona – RP (ang. *reversed phase*). Tą metodą można rozdzielać związki organiczne różniące się hydrofilowością lub ładunkiem. Stacjonarne fazy jonowymienne – kationity lub anionity, umożliwiają adsorpcję związków zasadowych lub kwasowych. Silne kationity SCX (ang. *strong cation exchanger*) zawierające

aromatyczne grupy sulfonowe związane chemicznie z drobinami SiO₂ wiążą związki zasadowe, z kolei substancje o właściwościach kwasowych można adsorbować na anionitach zawierających grupy aminowe. Substancje zaadsorbowane na fazie stacjonarnej wymywa się minimalną objętością wodnych roztworów buforów lub rozpuszczalnikami organicznymi. Na przykład zastosowanie w linii dwóch lub więcej kolumniek SPE do oczyszczania różnych analitów pozwala na jednoczesne oddzielenie od siebie alkaloidów (SPE SCX) oraz zateżenie związków fenolowych w próbce (SPE RP) (28).

3. Aparatura wykorzystywana w badaniach metabolomu roślinnego

W chwili obecnej nie istnieje uniwersalna metoda analityczna, która pozwoliłaby na oznaczenie ilościowe i jakościowe wszystkich metabolitów zawartych w badanych ekstraktach roślinnych (9,12). Wynika to m.in. z wysoce zróżnicowanych właściwości fizykochemicznych metabolitów roślin. Zależnie od rodzaju informacji jakie chcemy uzyskać po wykonaniu badań, stosujemy metodę analizy celowanej (ang. *targeted analysis*), bądź niecelowanej (ang. *non-targeted analysis*). Pierwsze podejście odnosi się do oznaczenia jakościowego i ilościowego wybranych składników mieszanki, drugie natomiast polega na klasyfikacji próbek na podstawie różnic w profilach identyfikowanych grup związków, a w kolejnym etapie analizy substancje odpowiadające za obserwowane różnice podlegają bardziej szczegółowej charakterystyce (17).

Metody rozdziału mieszanin substancji takie jak chromatografia lub elektroforeza są wykorzystywane podczas oznaczeń związków obecnych w złożonych mieszaninach, np. w próbkach ekstraktów roślinnych. Rozdział chromatograficzny polega na adsorpcji związków do fazy stałej, którą stanowi wypełnienie kolumny chromatograficznej, a następnie wymywaniu kolejnych składników analizowanej mieszaniny w fazie ruchomej. Fazę tę może stanowić gaz nośny albo ciecz – mamy wtedy do czynienia odpowiednio z chromatografią gazową (GC, ang. *gas chromatography*) lub z chromatografią cieczową (LC, ang. *liquid chromatography*). Roztwór, którym przemywana jest kolumna posiada odpowiednią polarność, wartość pH, albo też siłę jonową (w zależności od rodzaju wypełnienia kolumny chromatograficznej). Różne powinowactwo analizowanych związków do fazy stałej warunkuje ich rozdział. Wymywanie kolejnych substancji z kolumny może odbywać się izokratycznie czyli rozpuszczalnikiem o stałym składzie podczas trwania analizy lub w gradiencie, to znaczy, przy zmiennych warunkach elucji np. zmienne pH, polarność fazy ruchomej. Ważnym parametrem wpływającym na rozdzielczość w chromatografii cieczowej jest również temperatura, w której prowadzony jest rozdział (29).

Analiza złożonych mieszanin wymaga sprzężenia aparatury przystosowanej do rozdziału mieszanin substancji (chromatografy, aparaty do elektroforezy) z odpo-

wiednimi detektorami umożliwiającymi identyfikację związku. Wybór optymalnej metody detekcji substancji w analizowanej mieszaninie powinien uwzględniać następujące parametry opisujące działanie obu elementów w systemie analitycznym:

- selektywność,
- specyficzność,
- zakres dynamiczny detektora (ocena ilościowa w dużym zakresie zróżnicowania stężeń),
- wydajność metody (szybkość wykonania pojedynczej analizy),
- koszt i łatwość przygotowania próbek oraz wykonywania analiz.

Identyfikacja związku jest możliwa na podstawie porównania czasów retencji związku obecnego w mieszaninie oraz standardu. Jednakże w wielu przypadkach następuje jednoczesny wypływ z kolumny chromatograficznej dwóch związków lub nawet większej ich liczby. W takiej sytuacji nie jest możliwa prawidłowa identyfikacja niektórych związków jedynie przy wykorzystaniu danych na temat czasu wypływu z kolumny. Ponadto podczas kolejnych analiz może nastąpić przesunięcie czasu retencji substancji na kolumnie chromatograficznej, zatem stosowanie jedynie tej wartości jest mało przydatne. Dlatego w praktyce stosuje się współczynniki czasu retencji (ang. *retention time indices*), które są ilorazami czasów retencji związków badanych i czasu retencji standardu wewnętrznego, wskaźniki te mają wartości stałe dla danej kolumny (30). W przypadku większości substancji izolowanych z materiału roślinnego wzorce nie są dostępne, zachodzi zatem konieczność połączenia techniki rozdziału z odpowiednim detektorem, który pozwoli na obiektywną identyfikację związku albo nawet określenie struktury analizowanej substancji (31,32). W przypadku wykorzystania chromatografu cieczowego możliwe jest jednoczesne połączenie z kilkoma detektorami, na przykład szeregowo podłączane detektory absorpcji promieniowania UV, magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz spektrometry mas. Zastosowanie układu dwóch lub nawet trzech detektorów pozwala na identyfikację badanych związków z dużą precyzją (33).

Dokładność pomiaru uzyskiwana podczas wykonywania analiz przy wykorzystaniu różnych metod instrumentalnych zmienia się w szerokim zakresie. Dobór odpowiedniego przyrządu do potrzeb wykonywanego eksperymentu opiera się na optymalizacji selektywności systemu w stosunku do jego czułości (rys. 1). Techniki takie jak NMR są selektywne, dostarczają bardzo wiele informacji o strukturze badanej substancji, jednakże ich mankamentem jest stosunkowo niska czułość. Z kolei detektory fluorescencyjne charakteryzujące się bardzo wysoką czułością nie dostarczają żadnej informacji o strukturze analitu. Z dobrą czułością możemy zidentyfikować największą liczbę związków w analizowanych próbkach za pomocą spektrometrów mas, przy czym próg wykrywalności waha się w granicach od 10^{-9} M do 10^{-12} M (26).

3.1. Chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrem mas (GC/MS, ang. *gas chromatography – mass spectrometry*)

W przeszłości największa trudność w łączeniu chromatografów ze spektrometrami mas wynikała z konieczności wprowadzenia wycieku z kolumny chromatograficznej bezpośrednio do komory jonizacyjnej spektrometru, w której panuje wysoka próżnia. W przypadku rozdzielów na kolumnie w chromatografii gazowej cząsteczki analitów znajdują się w gazie nośnym, co ułatwiało łączenie tych instrumentów ze spektrometrami mas (5). Ponadto w przypadku korzystania z kapilarnych kolumn chromatograficznych zagrożenia związane z wprowadzeniem zbyt dużych ilości gazów do analizatora nie mają miejsca.

Ze względu na wysokie temperatury, w których przebiegają rozdziały w chromatografii gazowej metoda ta wykorzystywana jest głównie do analiz niskocząsteczkowych, niepolarnych oraz stabilnych termicznie związków organicznych. Substancje polarne i termolabilne wymagają przekształcenia w związki bardziej lotne i trwałe termicznie poprzez blokadę polarnych grup funkcyjnych (hydroksylowe, aminowe, karboksylowe ewentualnie karbonylowe) odpowiednimi grupami chemicznymi (derywatyzacja) (20). Alternatywą jest zastosowanie chromatografii cieczowej, w której rozdziały przebiegają w temperaturze pokojowej lub nieco tylko wyższej i nie ma w tym przypadku konieczności wcześniejszego blokowania grup polarnych (5).

Wprowadzenie modyfikacji chemicznych do cząsteczki związku organicznego sprawia, że otrzymujemy jego nową pochodną i w konsekwencji podczas analizy instrumentalnej mamy do czynienia ze związkiem o odmiennych właściwościach fizykochemicznych. Ponadto podczas reakcji blokowania grup polarnych może powstać kilka izomerów jednej substancji np. cukrów (31). Należy również pamiętać, że pochodne trójmetylosililowe analizowanych związków są podatne na hydrolizę (21). Rozkładowi pochodnych trójmetylosililowych można przeciwdziałać stosując do blokowania grup polarnych innego rodzaju pochodne krzemowe (związki zawierające także grupy *t*-butylowe) (20). Istotnym problemem podczas analiz GC/MS jest wybór blokad grup polarnych ponieważ w wyniku tej operacji chemicznej następuje zmiana zakresu mas cząsteczkowych badanych substancji. Wykorzystanie grup blokujących opartych na pochodnych sililowych jest ograniczone ze względu na znaczny wzrost masy syntetyzowanych pochodnych i związane z tym późniejsze trudności z interpretacją widm masowych. Innym problemem jest fakt, że w przypadku blokad z wykorzystaniem grup metylowych bądź acetylowych powinny być stosowane substancje znaczone trwałymi izotopami ze względu na możliwość występowania tych samych grup w strukturze badanego związku (34). Z tych względów niektóre klasy metabolitów wtórnych nie mogą być rozdzielane metodami chromatografii gazowej. Ponadto obecność grup blokujących w cząsteczce wpływa na proces fragmentacji związku.

Zastosowanie spektrometrów mas jako detektorów w chromatografii gazowej umożliwia identyfikację i ilościowe oznaczanie szerokiej gamy związków z wysoką

czułością i wiarygodnością. W układach GC/MS wykorzystuje się dwie metody wzbudzenia cząsteczek: jonizację elektronami (EI, ang. *electron ionization*) oraz jonizację chemiczną (CI, ang. *chemical ionization*) (11). Mimo że chromatografia gazowa charakteryzuje się wysoką rozdzielczością, a spektrometria mas wysoką czułością i selektywnością, częstokroć dochodzi do koelucji związków i nakrywania się ich widm masowych. Dzięki wykorzystaniu odpowiednich metod matematycznych podczas analizy wyników możliwe jest rozwiązanie tego problemu poprzez dekonwolucję widm masowych (rozdzielenie nakładających się sygnałów pochodzących od dwóch substancji). Zakres dynamiczny spektrometrów mas jest szeroki, jednakże jednoczesna obecność w analizowanym roztworze podczas jonizacji dużych ilości substancji konkurujących pomiędzy sobą podczas procesu jonizacji powoduje jego zawężenie. Obecność w analizowanej próbce metabolitów pierwotnych np. cukrów przeszkadza w jednoczesnym oznaczaniu metabolitów wtórnych takich jak flawonoidy (10).

Podczas jonizacji elektronami cząsteczki substancji analizowanej poddawane są oddziaływaniom z elektronami o ściśle określonej energii (najczęściej 70 eV). Jeżeli elektrony bombardujące cząsteczki posiadają odpowiednio wysoką energię, mogą powodować wybite z cząsteczki jednego z elektronów, co prowadzi do powstania jonu molekularnego będącego kationorodnikiem o pojedynczym ładunku. W tym przypadku stosunek masy do ładunku (m/z) odpowiada masie cząsteczkowej związku. Powstałe jony molekularne w większości przypadków posiadają nadmiar energii wewnętrznej. Energia przekazana przez elektron jest wystarczająca do rozpadu wiązań w cząsteczkach substancji organicznych, w efekcie na widmie rejestrujemy również jony powstające w wyniku fragmentacji związku. Względna intensywność jonu molekularnego ($M^{+\bullet}$) w widmie masowym różnych substancji chemicznych może być zmienna na skutek zróżnicowanej intensywności rozpadu jonu molekularnego na mniejsze fragmenty. Wysoka próżnia panująca w komorze jonizacyjnej spektrometru mas powoduje, że nie zachodzą wzajemne zderzenia cząsteczek oraz jonów analitu. Umożliwia to rejestrację powtarzalnych widm masowych podczas kolejnych analiz.

Jonizacja chemiczna jest drugą metodą wzbudzenia cząsteczek powszechnie stosowaną w układach GC/MS. W wyniku reakcji zachodzących podczas zderzeń cząsteczek analitu z jonami gazu reakcyjnego (metan, izobutan lub amoniak) powstają jony protonowanych cząsteczek $[M+H]^+$. Ich energia wewnętrzna jest niższa niż jonów molekularnych powstających podczas jonizacji EI, dzięki temu jony te są bardziej stabilne i nie ulegają rozpadowi. W przypadku wielu klas produktów naturalnych jedynie wykorzystanie jonizacji chemicznej pozwala na określenie mas cząsteczkowych analizowanych związków naturalnych. Przykładem mogą być cukry oraz alifatyczne kwasy karboksylowe.

Układy GC/MS są stosowane do analiz związków słabo polarnych, o masach cząsteczkowych poniżej 1 kDa. Do rozdziału jonów powstałych w wyniku wzbudzenia cząsteczek analitu wykorzystuje się różne zjawiska fizyczne, można w związku z tym stosować różne analizatory: kwadropolowy – Q, pułapka jonowa (IT, ang. *ion*

trap), analizator mierzący czas przelotu (TOF, ang. *time of flight*), analizatory rezonansu cyklotronowego z transformacją Fouriera (FT ICR, ang. *Fourier transform ion cyclotron resonance*). Wymienione analizatory różnią się czułością oraz rozdzielczością. Rozdzielczość zapewniającą wiarygodne określenie składu elementarnego jonów zapewniają analizatory TOF i FT ICR (5,32).

Obecnie w chromatografach gazowych wykorzystuje się kolumny kapilarne, umożliwiające minimalizację objętości nastrzykiwanej próbki nawet do poniżej 1 μ l. Taka objętość roztworu wprowadzana do komory nastrzykowej chromatografu pozwala na uzyskanie odpowiedniej rozdzielczości i czułości podczas analiz. W ten sposób rejestrowane są niezwykle złożone chromatogramy, na których obserwuje się setki pików. Identyfikowane są substancje, których ilości w mieszaninie są na poziomie nano-, a nawet pikomoli (10^{-9} M- 10^{-12} M) (21,32). Większość tradycyjnych detektorów stosowanych w chromatografach gazowych pozwala jedynie na określenie czasów retencji substancji znajdujących się w mieszaninie. Jedynie wykorzystanie spektrometrów mas pozwala na obiektywną identyfikację substancji na podstawie zarejestrowanego widma masowego. W tym przypadku można korzystać z bibliotek widm masowych, bez konieczności rejestrowania widm standardów (23, 26,31,35).

Wysoka odtwarzalność analiz wykonywanych z wykorzystaniem układów GC/MS z jonizacją elektronami umożliwia korzystanie z bibliotek widm, które pozwalają na szybką i jednoznaczną identyfikację związku. Każda z substancji posiada charakterystyczne widmo masowe, na którym zarejestrowane są jony o określonych masach i intensywnościach względnych. Stanowią one identyfikator danego związku (MST, ang. *Mass spectral tags*). W Internecie jest wolny dostęp do dwóch baz widm masowych: *Mass spectra of drugs and metabolites*: <http://www.ualberta.ca/~gjones/mslib.htm> oraz *NIST Chemistry Webbook*, posiadająca możliwość przeszukiwania na podstawie nazw związków <http://webbook.nist.gov/chemistry/>. Istnieją również komercyjne bazy danych zawierające po kilkaset tysięcy widm masowych: *NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library of EI mass spectra*: <http://www.nist.gov/srd/nist1a.htm>; oraz *Wiley Registry of Mass Spectral Data of EI mass spectra*: <http://www.wileyregistry.com>. Można również tworzyć własne biblioteki widm masowych związków nowo identyfikowanych w materiale roślinnym. Konstrukcja własnej biblioteki opiera się na dwóch parametrach, jednym z nich jest współczynnik czasu retencji (RI), drugim natomiast widmo masowe. Istnieją programy analizujące dane eksperymentalne, które umożliwiają automatyczny rozdział nakładających się pików oraz obliczenie RI (18). Na podstawie intensywności fragmentów specyficznych dla oznaczanego związku należących do MST można wykonać oznaczenie ilościowe. Utworzenie biblioteki znanych i nieznanymi związków umożliwiło porównanie względnych stężeń metabolitów w różnych częściach rośliny żyjącej w symbiozie z mikroorganizmami (35). Układ GC/MS-TOF łączący wysokorozdzielczy analizator mas z chromatografem gazowym umożliwił identyfikację ponad pięciuset związków podczas jednorazowej analizy próbek ekstraktów z materiału roślinnego (8,36). Podczas realizacji takiego

podejścia analitycznego identyfikuje się głównie metabolity pierwotne oraz lipidy i ich pochodne. Wiele klas metabolitów wtórnych nie może być identyfikowanych ze względu na zakres ich mas cząsteczkowych i zbyt dużą niestabilność termiczną.

3.2. Chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas (LC/MS, ang. *liquid chromatography – mass spectrometry*)

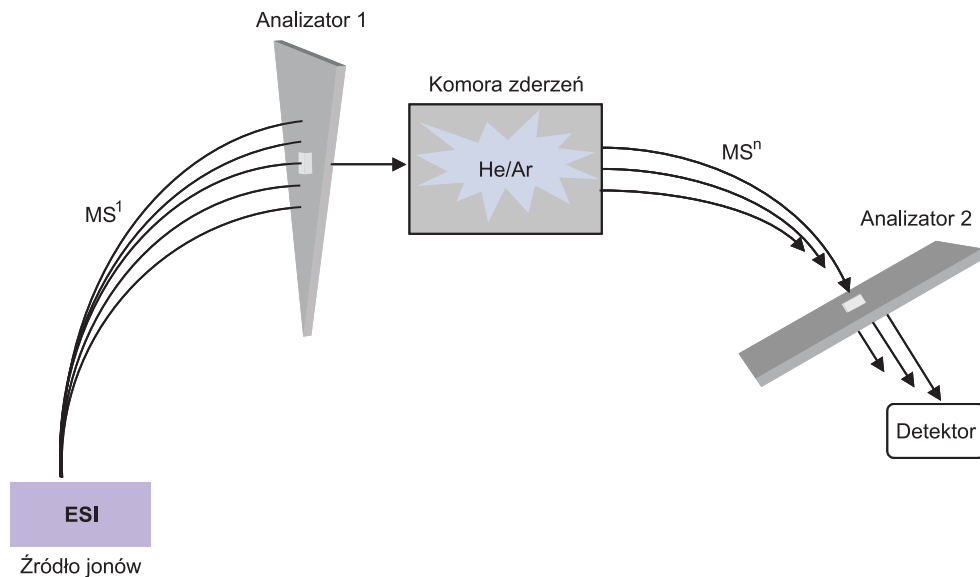
Zastosowanie chromatografów cieczowych umożliwia rozdzielanie zarówno związków polarnych jak i niepolarnych znajdujących się jednocześnie w analizowanej mieszaninie. W badaniach metabolomu najczęściej stosuje się kolumny z fazą odwróconą, w której do ziaren żelu krzemionkowego przyłączone są za pomocą wiązań chemicznych łańcuchy alkilowe C-8 bądź C-18. Jako fazę ruchomą wykorzystuje się mieszaniny rozpuszczalników organicznych (acetonitryl, metanol lub izopropanol) z wodą. Związki bardzo polarne, jak oligosacharydy, rozdzielane są na kolumnach z wypełnieniem hydrofilowym (HILIC, ang. *Hydrophilic Interaction Chromatography*). Ponadto, stosowane są również kolumny chromatograficzne wypełnione niemodyfikowanym żelem krzemionkowym (NPLC, ang. *Normal Phase Liquid Chromatography*). Chromatografia cieczowa to metoda najbardziej uniwersalna ze względu na możliwości analiz produktów naturalnych o szerokim zakresie właściwości fizykochemicznych. Zarówno HILIC jak i NPLC są oparte na oddziaływaniach hydrofilowych jednakże w tej pierwszej metodzie jako eluenty stosowane są bufony wodne w drugiej natomiast rozpuszczalniki niepolarne (29). Wówczas gdy mieszaninę metabolitów pierwotnych (cukry, aminokwasy oraz aminocukry) poddano analizie na kolumnach o fazie normalnej i o oddziaływaniach hydrofilowych to okazało się, że rozdzielczość kolumny z oddziaływaniami hydrofilowymi jest lepsza dla tego typu związków. Ponadto czasy retencji na kolumnie z fazą normalną różniły się znacznie w kolejnych analizach, podczas gdy kolumna HILIC wykazywała większą powtarzalność wyników (37). Niedawno zaczęto wykorzystywać kolumny chromatograficzne ze zmodyfikowanymi fazami stacjonarnymi, w których stosuje się podwyższone ciśnienia. Wypełnienie będące połączeniem cząsteczek organicznych i nieorganicznych przyłączonych do złoża krzemionkowego tworzy struktury o trzykrotnie mniejszej średnicy drobin niż w dotychczasowych kolumnach co poprawia zarówno skuteczność jak i czas rozdziału (38). Nowa technika rozdziału nazwana UPLC (ang. *Ultraformance Liquid Chromatography*) skraca czas analizy, jednocześnie oferując efektywniejsze rozdziały, wymaga jednak wykorzystania nowych pomp przystosowanych do pracy przy ciśnieniach rozpuszczalników wprowadzanych na kolumnę znacznie wyższych niż w HPLC. W starych systemach LC można też wykorzystywać kolumny z wypełnieniami monolitycznymi, które polepszają rozdzielczość systemu.

W przypadku chromatografów cieczowych można stosować różnego rodzaju detektory, często można łączyć szeregowo lub równolegle kilka aparatów. Dzięki informacji uzyskanej z różnych detektorów można poprawić możliwości identyfikacji

związków i ich ilościowego oznaczenia. Detektory oparte na absorpcji fotonów takie jak UV/VIS, IR czy fluorescencyjne generują sygnał proporcjonalny do stężenia związku w próbce. Połączenie chromatografu cieczowego z detektorem UV-Vis pozwala na badanie związków posiadających wiązania podwójne lub inne grupy chromoforowe. Możliwa jest rejestracja chromatogramów przy wybranej długości fali promieniowania, a w przypadku odpowiedniej konstrukcji detektora można również zapisywać widma w zakresie promieniowania UV lub UV/VIS. Należy jednak podkreślić, że detektory drugiego typu mają niższą czułość. Dane o przebiegu absorpcji promieniowania oraz informacja o czasie retencji pozwalają w niektórych przypadkach na obiektywną identyfikację substancji bez konieczności porównywania z czasami retencji oraz widmami UV standardów. Sprzężenie chromatografu cieczowego dodatkowo ze spektrometrem masowym lub/i spektrometrem NMR zwiększa możliwość identyfikacji analizowanych związków. Jakkolwiek czułość spektrometrów NMR jest dramatycznie niższa, specyficzność identyfikacji analitów przy ich zastosowaniu nie ma sobie równych (rys. 1) (1,10). Koszty analiz wykonywanych z wykorzystaniem spektrometru NMR jako detektora są dużo wyższe ze względu na konieczność stosowania deuterowanych rozpuszczalników. Ponadto niższą czułość detektora NMR kompensuje się zazwyczaj zastosowaniem techniki pomiaru przy przepływie eluenta zatrzymywanym na czas niezbędny do akwizycji widma NMR, co jednak niepomrotnie wydłuża czas jednej analizy (39).

Przez długi czas połączenie chromatografu cieczowego ze spektrometrem mas było niemożliwe, ze względu na dużą ilość cieczy, która wpływałaby do komory jonizacyjnej. Trzeba również zwrócić uwagę na konieczność używania w systemach LC/MS lotnych buforów, które nie będą się osadzać we wnętrzu spektrometru mas. Na początku lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku opracowano nowe metody jonizacji, które umożliwiły wydajne analizy związków polarnych i o dużych masach cząsteczkowych. Pierwsze zastosowane metody to jonizacja poprzez termorozpraszanie (TSP, ang. *thermospray ionization*) oraz bombardowanie szybkimi atomami przy stałym przepływie (CF-FAB, ang. *continuous flow fast atom bombardment*) (40). W obydwu przypadkach eluent z kolumny wprowadzany był bezpośrednio do komory jonizacyjnej spektrometru. W kilka lat później pojawiły się nowe sposoby jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym (API, ang. *atmospheric pressure ionization*), takie jak elektrorozpraszanie (ESI, ang. *electrospray ionization*) oraz jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI, ang. *atmospheric pressure chemical ionization*). Obie te metody jonizacji mogą być wykorzystywane w chromatografach cieczowych z przepływem fazy ruchomej do 2 ml/min (5). Niektóre podejścia analityczne z wykorzystaniem układów LC/MS wymagają zmniejszenia objętości przepływu do nl/min, mówimy wówczas o nano-ESI (32). Ta metoda analizy jest wykorzystywana podczas oznaczania (identyfikacji) peptydów i białek na mikrokolumnach o przekrojach nie przekraczających 100 μm . Takie wymiary kolumn oraz stosowane objętości przepływów pozwalają na uzyskanie zasadniczo wyższych czułości w przypadku analizy próbek zawierających pikomolowe lub nawet mniejsze ilości substancji ba-

danych (41). Wykorzystując obie wymienione metody jonizacji można wykonywać analizy jonów dodatnich oraz ujemnych, obie metody dostarczają uzupełniających się informacji strukturalnych. W widmach masowych jonów dodatnich i ujemnych obserwuje się odpowiednio jony protonowanych cząsteczek $[M+H]^+$ oraz deprotonowanych cząsteczek $[M-H]^-$, które ulegają fragmentacji w bardzo niewielkim stopniu. Obecność zanieczyszczeń w postaci jonów soli w próbce oraz związków nielotnych zmniejsza wydajność procesów jonizacji ESI oraz APCI. Ponadto w widmach jonów dodatnich poza jonami protonowanych cząsteczek $[M+H]^+$ obserwuje się też jony kationizowanych cząsteczek $[M+Na]^+$ oraz $[M+K]^+$ (42). Możliwość jonizacji cząsteczek pojedynczej substancji poprzez przyłączenie różnych kationów ma wpływ na obniżenie czułości, jednakże obecność wszystkich wymienionych typów jonów w widmie masowym pozwala na potwierdzenie masy cząsteczkowej produktu naturalnego obecnego w próbce analizowanego ekstraktu (43). Chemiczna jonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym nie jest tak szeroko rozpowszechniona jak elektrorozpraszanie, choć metodę tę często wybiera się podczas analiz cząsteczek substancji niepolarnych, nie zawierających grup funkcyjnych. Zarówno metoda jonizacji poprzez elektrorozpraszanie jak i jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym należą do „miękkich” metod jonizacji. Nadmiar energii wewnętrznej posiadanej przez jony protonowanych cząsteczek $[M+H]^+$ jest niewielki. Nie prowadzi to do ich intensywnej fragmentacji, pozwala natomiast na oznaczenie masy cząsteczkowej związku, jednak nie dostarcza informacji o jego strukturze. Problem uzyskania informacji strukturalnej jest rozwiązywany przy wykorzystaniu techniki tandemowej spektrometrii mas z kolizyjnie indukowaną dysocjacją – CID MS/MS lub MSⁿ (ang. *collision induced dissociation tandem mass spectrometry*) (42). Zasada prowadzenia analiz w tandemowych spektrometrach masowych jest przedstawiona na rysunku 2. Jony protonowanych cząsteczek $[M+H]^+$ lub inne generowane w źródle jonów poddawane są fragmentacji poprzez zderzenia z atomami gazu szlachetnego w komorze kolizyjnej. Jony przechodzące do komory kolizyjnej posiadają ściśle określoną energię kinetyczną, w związku z tym stopień ich fragmentacji podczas oddziaływań z atomami helu lub argonu może być w pewnym zakresie kontrolowany. W wyniku reakcji zachodzących w komorze kolizyjnej następuje rozpad jonów poddawanych zderzeniom. Dzięki temu rejestrowane są widma masowe wytworzonych jonów fragmentacyjnych, dostarczają one informacji strukturalnych o danym związku. Należy jednak podkreślić, że sposób fragmentacji protonowanych cząsteczek $[M+H]^+$ może być odmienny niż ten obserwowany dla jonów molekularnych $M^{+\bullet}$ przy wykorzystaniu jonizacji elektronami. Możliwe jest stosowanie różnego rodzaju układów analizatorów w tandemowych spektrometrach mas. Popularny układ tandemowy to ułożenie szeregowe trzech analizatorów kwadrupolowych (ang. *triple quadrupole*), z których środkowy pełni rolę komory zderzeń. Jon wybrany w pierwszym analizatorze poddawany jest fragmentacji w komorze kolizyjnej (drugi kwadrupol), a następnie powstałe jony fragmentacyjne rozdzielane są w drugim analizatorze (trzeci kwadrupol) (rys. 2). Innym sposobem działania charakteryzuje się pu-



Rys. 2. Schemat przedstawiający zasadę działania tandemowego spektrometru mas wykorzystującego kolizyjnie indukowaną dysocjację jonów (CID MS/MS, ang. *collision induced dissociation tandem mass spectrometry*).

łapka jonowa, która działa okresowo. Jeden cykl, na który składa się wybór jonu do fragmentacji, proces kolizji z atomami gazu oraz analiza jonów fragmentacyjnych odbywa się w jednej komorze. Oba typy analizatorów są układami o niskiej rozdzielczości.

Istnieją również hybrydowe analizatory łączące w sobie wysoką czułość kwadrupola z przepustowością pułapki jonowej. Jon wybrany w analizatorze kwadrupolowym jest fragmentowany w pułapce jonowej. Możliwe jest także wykorzystanie w układach tandemowych analizatorów wysoko rozdzielczych, takich jak analizator czasu przelotu – TOF w połączeniu z kwadrupolem (Q-TOF) (43) oraz analizatora rezonansu cyklotronowego z transformacją Fouriera – FT ICR MS. Tego typu urządzenia umożliwiają określenie składu elementarnego powstających w wyniku kolizji jonów oraz uzyskanie informacji strukturalnej na podstawie fragmentacji analizowanych jonów (44).

Podczas badania mieszanin z wykorzystaniem technik chromatografii cieczowej możemy oznaczyć dużą liczbę związków podczas jednej analizy. Natomiast słabym punktem tej metody jest brak odtwarzalności pomiarów pomiędzy różnymi próbkami i różnymi spektrometrami. W przypadku analizy ilościowej najbardziej przydatny jest spektrometr mas wyposażony w analizator kwadrupolowy. Należy pamiętać, że podczas wykonywania oznaczeń ilościowych konieczne jest dobranie odpowiedniego standardu lub standardów.

3.3. Elektroforeza kapilarna

Metodą najbardziej uniwersalną i szybką do rozdzielów mieszanin substancji jest elektroforeza kapilarna (CE, ang. *capillary electrophoresis*) umożliwiająca jednoczesny rozdział zarówno związków polarnych jak i niepolarnych. Rozdział poszczególnych składników mieszaniny następuje pod wpływem wysokiego napięcia elektrycznego dlatego technikę tę stosuje się w przypadku substancji obdarzonych ładunkiem lub takich, które można zjonizować poprzez zmianę pH. Ze względu na stosowanie małych objętości próbek poddawanych analizie metodami elektroforezy kapilarnej konieczne jest wstępne zatężenie ekstraktu. Cechą charakterystyczną tej metody jest słaba czułość przy granicznie niskich stężeniach substancji badanych (27,40). Istotnym elementem jest oczyszczenie próbki z soli, gdyż zmiana ich stężenia powoduje, że czasy retencji nie są odtwarzane precyzyjnie, ponadto piki poszczególnych związków ulegają poszerzeniu. Do badań metabolomu wykorzystuje się dwa rodzaje elektroforezy kapilarnej: kapilarną elektroforezę strefową (CZE, ang. *capillary zone electrophoresis*) oraz micelną chromatografię elektrokinetyczną (MEKC, ang. *micellar electrokinetic capillary chromatography*). Najczęściej stosowaną techniką jonizacji w systemach sprzężenia aparatu do elektroforezy ze spektrometrem mas jest jonizacja poprzez elektrorozpraszanie. Należy jednak pamiętać, że obecność stałych soli w buforach stosowanych w aparatach do elektroforezy kapilarnej utrudnia wykonywanie analiz w sprzężeniu ze spektrometrem mas. Powodują one bardzo szybkie zanieczyszczenie komory jonizacyjnej oraz szczelin analizatora spektrometru, a obecność buforów obniża wydajność procesu jonizacji (40). Pomimo wymienionych ograniczeń, aparaty do elektroforezy kapilarnej charakteryzują się dobrą powtarzalnością wyników rozdziału oraz wysoką czułością. Przy wykorzystaniu tej metody analitycznej można prowadzić oznaczenia ilościowe dla stężeń rzędu ułamków pikomola. W sprzężeniu z aparatami do elektroforezy kapilarnej stosuje się spektrometry mas tego samego typu jak w przypadku chromatografów cieczowych.

4. Analiza danych

We wszystkich metodach analitycznych stosowanych podczas badań metabolomu mamy do czynienia z bardzo dużą ilością danych eksperymentalnych, które wymagają interpretacji. Wynika to z konieczności wykonywania analiz w kilku powtórzeniach w celu zmniejszenia wartości błędów związanych z przygotowaniem i wykonaniem analiz. Z kolei w przypadku roślin genetycznie modyfikowanych istnieje konieczność sprawdzenia wielu linii otrzymanych w wyniku modyfikacji genetycznych. Współczesna aparatura umożliwia szybkie i precyzyjne oznaczenia poszczególnych składników metabolomu, jednakże konieczne jest opracowanie algorytmów umożliwiających rekonstrukcję zależności, w których badane związki uczest-

niczą (43,45-47). Dane pochodzące bezpośrednio z analiz próbek (ekstraktów) dostarczają niewiele informacji o badanych substancjach w odniesieniu do materiału biologicznego. Wraz z rozwojem metod analitycznych nastąpił postęp w opracowaniu algorytmów umożliwiających zrozumiałe przedstawienie wyników eksperymentu oraz otrzymaniu z nich wartościowych dla badacza wniosków. W metabolomice stosowane są metody analiz wielu zmiennych: Analiza Składowych Głównych (PCA, ang. *principal component analysis*), Hierarchiczna Analiza Klasterów (HCA, ang. *hierarchical cluster analysis*) oraz Samoorganizujące Mapowanie (SOM, ang. *self-organizing mapping*) (10,47). SOM jest metodą wykorzystującą sztuczną inteligencję do klasyfikacji danych eksperymentalnych.

5. Przykłady wykorzystania profilowania metabolitów metodami GC/MS i LC/MS

Profilowanie metabolitów umożliwia jednocześnie oznaczenie zmian w stężeniach związków będących prekursorami, produktami pośrednimi oraz końcowymi szlaków metabolicznych. Tego rodzaju podejście analityczne umożliwia określenie, które metabolity odgrywają rolę w odpowiedzi rośliny na wystąpienie określonego rodzaju stresu. Na przykład, przeprowadzone zostały doświadczenia mające na celu zbadanie odporności siewek *Arabidopsis thaliana* na działanie podwyższonej lub obniżonej temperatury (48).

Profilowanie metabolitów jest również szeroko stosowane podczas badań nad ich rolą w oddziaływaniach roślin z czynnikami stresowymi biotycznymi (mikroorganizmy patogenne lub symbiotyczne) oraz abiotycznymi (temperatura, światło, czynniki chemiczne, brak lub nadmiar wody). Obiektem badań są zarówno rośliny modelowe jak *A. thaliana* (29,50) i *Medicago truncatula* (51,52), jak i rośliny użytkowe: pomidor (53) i ziemniak (26,54), łubin (55) i soja (25) oraz wiele innych gatunków.

Całościowe spojrzenie na problemy realizowane w ramach projektów z dziedziny genomiki funkcjonalnej pozwala postawić tezę, że mamy do czynienia ze sprzężeniem zwrotnym pomiędzy poziomem ekspresji genów oraz syntezy metabolitów (zarówno pierwotnych jak i wtórnych), a ponadto geny oraz ostateczne produkty ich ekspresji wzajemnie na siebie oddziałują. Możliwość obserwacji tego rodzaju sprzężeń jeszcze bardziej komplikuje obraz otrzymywanych wyników. Szybki rozwój badań w dziedzinie genomiki funkcjonalnej, prace nad roślinami genetycznie modyfikowanymi, zapotrzebowanie na nowe farmaceutyki, badania nad żywnością i paszami sprawiają, że analiza roślinnych metabolitów wtórnych będzie odgrywała coraz ważniejszą rolę. W tej sytuacji nacisk na rozwój nowych technologii pozwalających na szybką i skuteczną analizę mieszanin niskocząsteczkowych substancji organicznych będzie coraz większy. Ważnym celem jest opracowanie nowych, skuteczniejszych metod rozdzielania setek lub raczej tysięcy związków chemicznych oraz metod detekcji i identyfikacji substancji. W najbliższym czasie najważniejszą rolę będą od-

grywać metody oparte na spektrometrii mas ze względu na ich bardzo wysoką czułość oraz na magnetycznym rezonansie jądrowym z powodu jego wyjątkowo wysokiej selektywności.

Wykaz skrótów:

- APCI – jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym (ang. *atmospheric pressure chemical ionization*)
- CE – elektroforeza kapilarna,
- CID – kolizyjnie indukowana dysocjacja,
- EI – jonizacja elektronami,
- ESI – jonizacja poprzez elektrorozpraszanie (ang. *electrospray*)
- GC – chromatografia gazowa,
- LC lub HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa,
- MS – spektrometria mas,
- MS/MS – tandemowa spektrometria mas,
- NMR – magnetyczny rezonans jądrowy.

Autorzy pragną wyrazić podziękowanie Panu prof. J. Barciszewskiemu za dyskusje dotyczące sformułowania i przedstawienia opisywanego tematu. Publikacja została przygotowana dzięki finansowaniu przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, projekt badawczy nr 2 P06A 031 27.

Literatura

1. Plant Functional Genomics (2005), Ed. D. Leister, Haworth Press Inc., New York.
2. Chace D. H., (2001), Chem. Rev., 101, 445-477.
3. Kuhara T., (2005), Mass Spectrom. Rev., 24, 814-827.
4. Holmes E., Nicholls A. W., Lindon J. C., Connor S. C., Connelly J. C., Haselden J. N., Damment S. J. P., Spraul M., Neidig P., Nicholson J. K., (2000), Chem. Res. Toxicol., 13, 471-478.
5. Stobiecki M., (2001), Curr. Org. Chem., 5, 335-349.
6. Verpoorte R., Memelink J., (2002), Curr. Opin. Biotech., 13, 181-187.
7. Fiehn O., Kopka J., Dormann P., Altmann T., Trethewey R. N., Willmitzer L., (2000), Nature Biotech., 18, 1157-1161.
8. Fernie A. R., Trethewey R. N., Krotzky A. J., Willmitzer L., (2004), Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 5, 763-769.
9. Dixon R. A., Strack D., (2003), Phytochemistry, 62, 815-816.
10. Sumner L. W., Mendes P., Dixon R. A., (2003), Phytochemistry, 62, 817-836.
11. Stobiecki M., Kachlicki P., (2005), Acta Physiol. Plant., 27, 109-116.
12. Hall R. D., (2005), New Phytol., 169, 453-468.
13. Goodacre R., Vaidyanathan S., Dunn W. B., Harrigan G. G., Kell D. B., (2004), Trends Biotech., 22, 245-252.
14. Wang M., Lamers R. J. A. N., Korthout H. A. A. J., van Nesselrooij J. H. J., Witkamp R. F., van der Heijden R., Verpoorte R., van der Greef J., (2005), Phytotherapy Res., 19, 173-182.
15. Stecher G., Huck C. W., Stöggl W. M., Guggenbichler W., Bakry R., Bonn G. K., (2002), Phytochem. Rev., 1, 413-426.
16. Stecher G., Huck C. W., Stöggl W. M., Bonn G. K., (2003), Trends Analyt. Chem., 22, 1-14.
17. Verpoorte R., Choi Y. H., Kim H. K., (2005), J. Ethnopharmac., 100, 53-56.
18. Oleszek W., (2002), Phytochem. Rev., 1, 163-166.
19. Rischer H., Oksman-Caldeney K. M., (2006), Trends Biotech., 24, 102-104.
20. Fiehn O., (2002), Plant Mol. Biol., 48, 155-171.

21. Dunn W. B., Ellis D. I., (2005), *Trends Anal. Chem.*, 24, 285-294.
22. Marczak Ł., Kawiak A., Łojkowska E., Stobiecki M., (2005), *Phytochem. Anal.*, 16, 143-149.
23. Wagner C., Sefkow M., Kopka J., (2003), *Phytochemistry*, 62, 887-900.
24. Fernie A. R., (2003), *Function. Plant Biol.*, 30, 111-120.
25. Rostagno M. A., Palma M., Barroso C. G., (2004), *Anal. Chim. Acta*, 522, 169-177.
26. Roessner U., Wagner C., Kopka J., Trethewey R. N., Willmitzer L., (2000), *Plant J.*, 23, 131-142.
27. Ramautar R., Demirci A., de Jong G. J., (2006), *Trends Anal. Chem.*, 25, 455-466.
28. Stobiecki M., Wojtaszek P., Gulewicz K., (1997), *Phytochem. Anal.*, 8, 153-158.
29. Neue U. D., (1997), *HPLC Columns – Theory, Technology and Practice*, 1st ed. Wiley-VCH Inc. USA.
30. Glassbrook N., Ryals J., (2001), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4, 186-190.
31. Kopka J., (2006), *J. Biotech.*, 124, 312-322.
32. Want E. J., Cravatt B. F., Siuzdak G., (2005), *Chem. BioChem.*, 6, 1941-1951.
33. Wolfender J. L., Rodriguez S., Hostettmann K., Hiller W., (1997), *Phytochem. Anal.*, 8, 97-104.
34. Frański R., Bednarek P., Wojtaszek P., Stobiecki M., (1999), *J. Mass Spectrom.*, 34, 486-495.
35. Desbrosses G. G., Kopka J., Udvardi M. K., (2005), *Plant Physiol.*, 137, 1302-1318.
36. Hirai M. Y., Yano M., Goodenowe D. B., Kanaya S., Klimura T., Awazuhara M., Fujiwara T., Saito K., (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 10205-10213.
37. Tolsticov V. V., Fiehn O., (2002), *Anal. Biochem.*, 301, 289-307.
38. Chuchwell M. I., Twaddle N. C., Meeker L. R., Doerge D. R., (2005), *J. Chromatogr. B*, 825, 134-143.
39. Holt R. M., Newman M. J., Pullen F. S., Richards D. S., Swanson A. G., (1998), *J. Mass Spectrom.*, 32, 64-70.
40. Niessen W. M. A., (1999), *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*, 2nd ed., Marcel Dekker Inc., New York.
41. Simpson R. J., (2003), *Proteins and Proteomics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
42. Griffiths W. J., Jonsson A. P., Liu S., Rai D. K., Wang Y., (2001), *Biochem. J.*, 355, 545-561.
43. Wolfender J.-L., Waridel P., Ndjoko K., Major H. J., Hobby K. R., Hostettmann Muller A., Duchting P., Weiler E. W., (2002), *Planta*, 216, 44-56.
44. Aharoni A., et al., (2002), *OMICS*, 6, 217-234.
45. Kell D. B., (2004), *Curr. Opin. Microbiol.*, 7, 296-307.
46. Morgenthal K., Weckwerth W., Steuer R., (2006), *BioSystem*, 83, 108-117.
47. Fukusaki E., Kobayashi A., (2005), *J. Biosci Bioengin.*, 100, 347-354.
48. Kaplan F., Kopka J., Haskell D. W., Zhao W., Schiller K. C., Gatzke N., Sung D. Y., Guy Ch. L., (2004), *Plant Physiol.*, 136, 4159-4168.
49. Kliebenstein D. J., Rowe H. C., Denby K. J., (2005), *Plant J.*, 44, 25-36.
50. Bednarek P., Schneider B., Svatos A., Oldham N. J., Hahlbrock K., (2005), *Plant Physiol.*, 138, 1058-1070.
51. Broeckling C. D., Huhman D. V., Farag M. A., Smith J. T., May G. D., Mendes P., Dixon R. A., Sumner L. W., (2005), *J. Exp. Bot.*, 56, 323-336.
52. Huhman D. V., Berhow M. A., Sumner L. W., (2005), *J. Agr. Food Chem.*, 53, 1914-1920.
53. Bino R. J., de Vos C. H. R., Lieberman M., Hall R. D., Bovy A., Jonker H. H., Tikunov Y., Lommen A., Moco S., Levin I., (2005), *New Phytol.*, 166, 427-438.
54. Stobiecki M., Matysiak-Kata W., Frański R., Skafa J., Szopa J., (2003), *Phytochemistry*, 62, 959-969.
55. Bednarek P., Kerhoas L., Einhorn J., Frański R., Wojtaszek P., Rybus-Zajac M., Stobiecki M., (2003), *J. Chem. Ecol.*, 29, 1127-1142.