



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Kemijski odsjek

Nikolina Beljan

PRIMJENA SPEKTROMETRIJE MASA UZ INDUKTIVNO SPREGNUTU  
PLAZMU S LASERSKIM OTPARAVANJEM ZA MULTIELEMENTNO  
OSLIKAVANJE BIOLOŠKIH TKIVA

C. Arnaudguilhem, M. Larroque, O. Sgarbura, D. Michau, F. Quenet, S. Carrère, B. Bouyssière,  
S. Mounicou, *Talanta* **222** (2021) 121537.

**KEMIJSKI SEMINAR I**

Poslijediplomski sveučilišni studij Kemije

Zagreb, 2024.

---

## SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>2</b>
<b>2. METALI U BIOLOŠKIM TKIVIMA</b> .....	<b>3</b>
<b>3. METODA LA-ICP-MS</b> .....	<b>4</b>
3.1. Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu .....	4
3.2. Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu s laserskim otparavanjem .....	5
3.2.1. <i>Lasersko otparavanje</i> .....	5
3.2.2. <i>Instrumentacija za metodu LA-ICP-MS</i> .....	6
3.2.3. <i>Pristupi u kalibraciji</i> .....	9
<b>4. PRIMJENA METODE LA-ICP-MS</b> .....	<b>10</b>
4.1. Primjena za analizu uzoraka iz okoliša.....	10
4.2. Primjena za analizu geoloških uzoraka.....	11
4.3. Primjena za analizu bioloških uzoraka .....	12
<b>5. MULTIELEMENTNO OSLIKAVANJE U BIOLOŠKIM TKIVIMA</b> .....	<b>13</b>
5.1. Kalibracija i kvantitativno oslikavanje .....	13
5.2. Daljnja istraživanja i napredak.....	16
<b>6. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>17</b>
<b>7. LITERATURA</b> .....	<b>18</b>

## 1. UVOD

Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu s laserskim otparavanjem (engl. *Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry*, LA-ICP-MS) prvi put je uvedena 1985. godine te je od tada postala standardna metoda elementnog mapiranja.<sup>1</sup> Zbog visoke osjetljivosti, osim za određivanje glavnih elemenata i elemenata u srednjem koncentracijskom području, pogodna je za određivanje elemenata u uzorcima s vrlo niskim udjelom elemenata. Upravo radi dobrog prostornog razlučivanja i mogućnosti određivanja elemenata u koncentracijskom području tragova i ultratragova, upotrebljava se u morfološkoj i kvantitativnoj analizi uzoraka deponiranih na različite čvrste supstrate, poput različitih tkiva.<sup>2</sup>

Prva publikacija ove tematike potječe iz 1992. godine u radu Durranta i Warda, koji su istraživali studiju izvodljivosti i potencijal metode za multielementnu analizu bioloških uzoraka, uz korištenje bioloških referentnih materijala.<sup>3</sup> Za proučavanje prostorne elementne distribucije zainteresirao se Wang sa suradnicima, predstavivši koncept bioimaginga pomoću metode LA-ICP-MS, dvije godine kasnije.<sup>4</sup> Od tada se ova metoda naširoko uvrježila u području metalomike, proteomike, nanotehnologije, kliničkih medicinskih studija i u drugim područjima.

Studije bioimaginga pomoću metode LA-ICP-MS usmjerene su na proučavanje distribucije lijekova ili nanočestica i markera označenih ionima metala u presjecima biološkog tkiva ili pojedinačnim stanicama, te na vizualizaciju metaloma unutar biološkog tkiva, primjerice u mozgu. Na ovaj se način mogu uspoređivati bolesna i zdrava tkiva.<sup>4-6</sup> Homeostaza metala unutar bioloških sustava od iznimne je važnosti za imunosti odgovor, unutarstaničnu signalizaciju i metabolizam uopće. Odavno je poznato da su povišene i neregulirane koncentracije određenih elemenata povezane s različitim bolestima. Stoga su metode pogodne za kvantitativnu procjenu njihovih razina unutar bioloških uzoraka od izrazite važnosti te su danas aktualna mnogobrojna istraživanja u ovom području.<sup>7</sup> Ubrzani napredak ove mikroanalitičke metode potaknula je i modernija računalna oprema, smanjeno vrijeme trajanja impulsa lasera, a sveukupno je rezultiralo boljim odnosom signala i šuma, te posebice mogućnošću snimanja više spektara u jedinici vremena uz visoko razlučivanje i poboljšanu kvalitetu slike.<sup>8</sup>

## 2. METALI U BIOLOŠKIM TKIVIMA

Izloženost teškim metalima iz okoliša postala je velika prijetnja ljudskom zdravlju. Antropogene aktivnosti uključujući urbanizaciju i industrijalizaciju povećale su izloženost čovjeka teškim metalima. Rudarstvo, upotreba gnojiva i pesticida, sagorijevanje fosilnih goriva, proizvodnja kemijskih stabilizatora, baterija, plastike, tekstila, mikroelektronike samo su neki od primjera izvora teških metala koji dospijevaju u okoliš. Metali se zatim akumuliraju u biljkama, voću i povrću čijom konzumacijom dolazi do unosa zagađivača u ljudski organizam.

Esencijalni metali kao što su krom (Cr), kobalt (Co), bakar (Cu), željezo (Fe), mangan (Mn), molibden (Mo), selenij (Se) i cink (Zn) imaju važnu biokemijsku i fiziološku ulogu u organizmima pri niskim koncentracijama. Ti elementi u tragovima su značajni u građi nekih enzima uključenih u redoks reakcije, biosintezu, prijenos i ostale metaboličke aktivnosti. Za neke neesencijalne metale poput arsena (As), kadmija (Cd), žive (Hg), nikla (Ni) i vanadija (V) nije poznata biološka svrha, već upravo suprotno, poznati su njihovi štetni učinci na zdravlje. Ipak, i esencijalni kao i neesencijalni metali mogu biti toksični za organizam ukoliko njihove koncentracije prelaze određene vrijednosti. Prema Međunarodnoj agenciji za istraživanje raka (engl. *International Agency for Research on Cancer*, IARC), arsen, krom (VI), kadmij i nikal su klasificirani u grupu 1 kancerogenih tvari. Arsen i kadmij djeluju štetno na metabolizam glukoze i ostale metaboličke puteve, dok zajedno s olovom i živom čine problem za kardiovaskularni sustav. Isto tako, poznato je da uz arsen i kadmij, izloženost bakru, niklu, olovu i cinku može dovesti do rizika nastanka dijabetesa.<sup>9</sup>

Raspodjela metala na razini organizma i stanice je presudna za razumijevanje kako metali djeluju te kako se njihovo djelovanje može promijeniti. Štoviše, mjerenje koncentracije metala u specifičnom području biološkog tkiva je od velike važnosti. Nedostatak metala ili njihova prevelika koncentracija može biti dokaz bolesti. Neravnoteža željeza može ukazivati na neurološke bolesti, visoke razine bakra u serumu su česta pojava kod pacijenata s rakom dojke. Osim bolesti, provode se razna istraživanja lijekova na bazi metala koji se koriste kod liječenja tumora.<sup>10</sup>

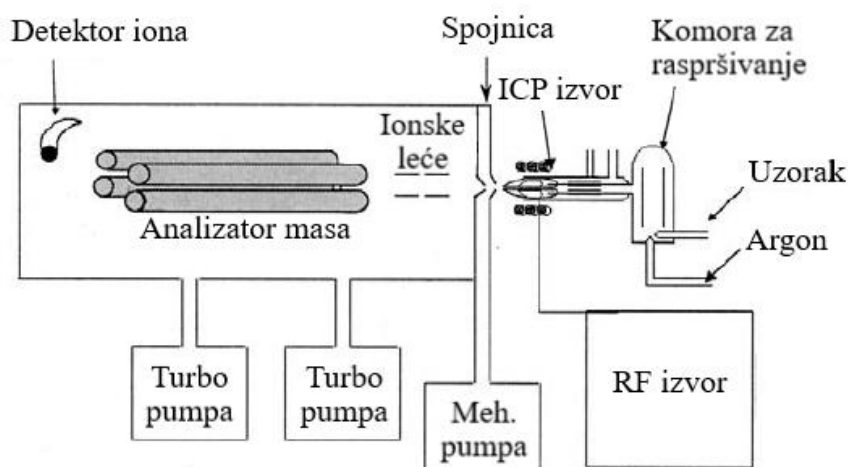
### 3. METODA LA-ICP-MS

#### 3.1. Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu

Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu (engl. *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, ICP-MS) je spektrometrijska metoda u kojoj induktivno spregnuta plazma (ICP) služi kao ionizacijski izvor, dok se detekcija iona provodi pomoću spektrometra masa. Zbog niskih detekcijskih granica i visoke rezolucije, osjetljivosti kod simultanog multielementnog određivanja, širokog dinamičkog raspona te mogućnosti kvalitativnog i kvantitativnog određivanje elemenata u različitim koncentracijskim područjima i velike brzine mjerenja, primjenjuje se u mnogim područjima.

U instrument se uvodi tekući uzorak koji se pod utjecajem visoke temperature prevodi u aerosol, nakon čega slijedi uparavanje i proces kidanja kemijskih veza. Posljedično, nastaju ionizirani atomi (ioni) koji iz plazme ulaze u spektrometar masa te se razdvajaju na temelju odnosa mase i naboja ( $m/z$ ), što čini osnovu njihove identifikacije i detekcije. Kod povezivanja plazma sustava i spektrometra, problem predstavlja prijenos iona iz plazme prema analizatoru masa, upravo radi velike razlike u tlakovima unutar različitih dijelova instrumenta. Plazma nastaje i održava se konstantnim dotokom argona pri atmosferskom tlaku, a spektrometar masa zahtijeva vrlo visoki vakuum ( $10^{-6}$  torr). Za prevladavanje ovoga problema, plinska faza uzorka pod atmosferskim tlakom se prevodi u evakuiranu komoru što omogućava spojnicu (engl. *interface*), koja se sastoji od dva cilindra, jedan za takozvano skupljanje, a drugi za obiranje uzorka.

Interferencije kod metode ICP-MS dijele se na spektralne te one uzrokovane zbog razlike u sastavu matrice. Kod spektralnih interferencija smetnje mogu nastati zbog ionskih specija koje imaju isti omjer  $m/z$  kao i ioni analita. Tu valja spomenuti oksidne ione, višeatomne ione i dvostruko nabijene ione. Korištenjem analizatora mase s visokom rezolucijom mogu se u znatnoj mjeri ukloniti spektralne interferencije. Budući da u slučaju zahtjevnijih matrica može doći do značajnijeg narušavanja omjera signala i šuma pri mjerenju signala analita, smetnje uzrokovane matricom mogu se umanjiti razrijeđivanjem uzorka, promjenom postupka uvođenja uzorka, ili u određenim slučajevima, separacijom analita od matrice. Slika 1 shematski prikazuje sustav ICP-MS.<sup>11</sup>



Slika 1. Shematski prikaz sustava ICP-MS<sup>11</sup>

### 3.2. Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu s laserskim otparavanjem

Lasersko otparavanje (ablacija) postaje dominantna tehnologija za izravno uzorkovanje čvrstih tvari, a posebnu primjenu našla je i u analitičkoj kemiji. Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu s laserskim otparavanjem (LA-ICP-MS) je načelno nedestruktivna metoda kojom je za analizu potrebno ukloniti samo površinski sloj uzorka, dok ostatak ostaje netaknut. Osim elementne analize koja se postiže konvencionalnom metodom ICP-MS, metoda LA-ICP-MS ima mnoge prednosti. Naime, moguće je prostorno okarakterizirati nehomogenosti na površini uzorka koja se može i oslikati na temelju elementnog sastava.<sup>1</sup>

#### 3.2.1. Lasersko otparavanje

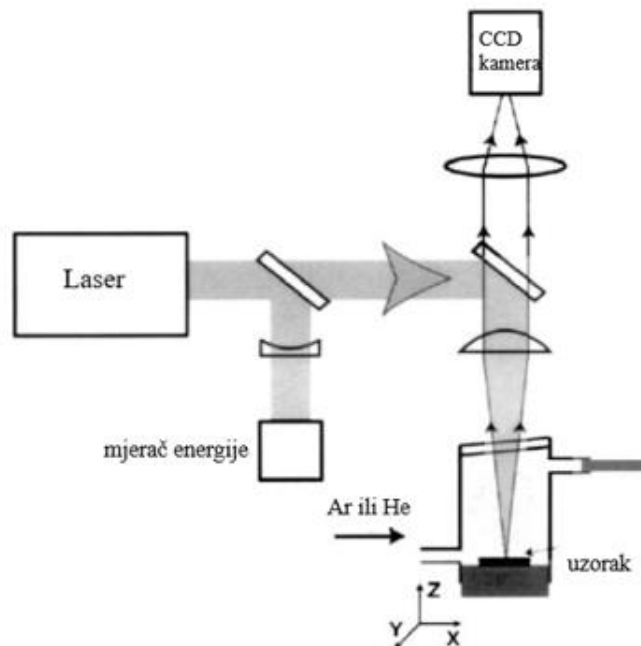
Lasersko otparavanje (ablacija) se odnosi na proces pri kojem se zračenje pulsnog lasera velike snage fokusira na površinu čvrstog uzorka pri čemu dolazi do prelaska određenog volumena u plinovito stanje. Interakcijom materije i laserske zrake dolazi do izbijanja atoma, iona i molekula s površine uzorka te nastajanja plazme uz površinu. Iako mehanizam ablacije nije u potpunosti jasan, pretpostavlja se da uključuje termičke i netermičke procese.<sup>12</sup> Lasersko zračenje (gustoća snage) te termička i optička svojstva materijala kritični su parametri koji utječu na konačni rezultat.

Interakcija materije i laserske zrake se može opisati dvama procesima: isparavanjem i otparavanjem (ablacijom). Kada laserska zraka traje nekoliko mikrosekundi i kada je intenzitet zračenja manji ili jednak  $10^6 \text{ W/cm}^2$ , isparavanje je dominantni proces koji utječe na uklanjanje materije s površine uzorka. Termička i optička svojstva uzorka utječu na količinu materije koja se otklanja pomoću laserskog zračenja. Optička svojstva (apsorpcija i refleksija) određuju i udio snage koja se apsorbira te dubinu optičke apsorpcije unutar uzorka. Iako je ova interakcija definirana kao isparavanje, energija je lokalizirana i dana u kratkom vremenu, pri čemu termodinamički modeli ne opisuju ovu interakciju u potpunosti. Proces taljenja je, uz isparavanje, također česta pojava, pri čemu je zbog razlika u latentnim toplinama isparavanja para obogaćena hlapljivijim, a osiromašena manje hlapljivim elementima u odnosu na čvrsti uzorak. Ovako opisano otklanjanje materijala s površine uzorka ovisno o termičkim svojstvima naziva se frakcionacija i nepoželjna je, jer smanjuje točnost analize.

Nadalje, pri visokom intenzitetu laserskog zračenja ( $> 10^9 \text{ W/cm}^2$ ) površina izuzetno brzo postiže temperaturu potrebnu za isparavanje. Prije nego površinski sloj ispari, temperatura i tlak dostignu vrijednost iznad kritične što uzrokuje „eksploziju“ površinskog sloja. Takva interakcija se može opisati i kao netermički proces i dobila je naziv laserska ablacija, odnosno izravan prelazak u plinovito stanje bez opazivog taljenja i uz minimalnu frakcionaciju. Pri tom procesu dolazi do pojave tzv. laserski inducirane plazme iznad otvorene površine. Temperatura inducirane plazme prelazi vrijednosti od  $10^4 \text{ K}$  te zbog radijativnog prijelaza topline na površinu dolazi do plazma zasjenjenja. Laserski inducirana plazma traje nekoliko mikrosekundi, što je više od trajanja laserskog pulsa i uzrokuje poteškoće kod metode LA-ICP-MS kao što je frakcionacija koja može biti većeg opsega nego ona koja se dogodi kod izravnog isparavanja.<sup>13</sup> Naime, na emisiji karakterističnog zračenja iz takve plazme temelji se još jedna metoda: laserski inducirane spektroskopije sloma (engl. *Laser Induced Breakdown Spectrometry, LIBS*).<sup>14</sup>

### 3.2.2. Instrumentacija za metodu LA-ICP-MS

Sustav LA-ICP-MS sastoji se od lasera s cjelokupnim optičkim sustavom te ablacijskom ćelijom, induktivno spregnute plazme kao ionizacijskog izvora te spektrometra masa kao detekcijskog sustava. Laser s optičkim sustavom i ablacijskom ćelijom prikazan je shematski na slici 2.



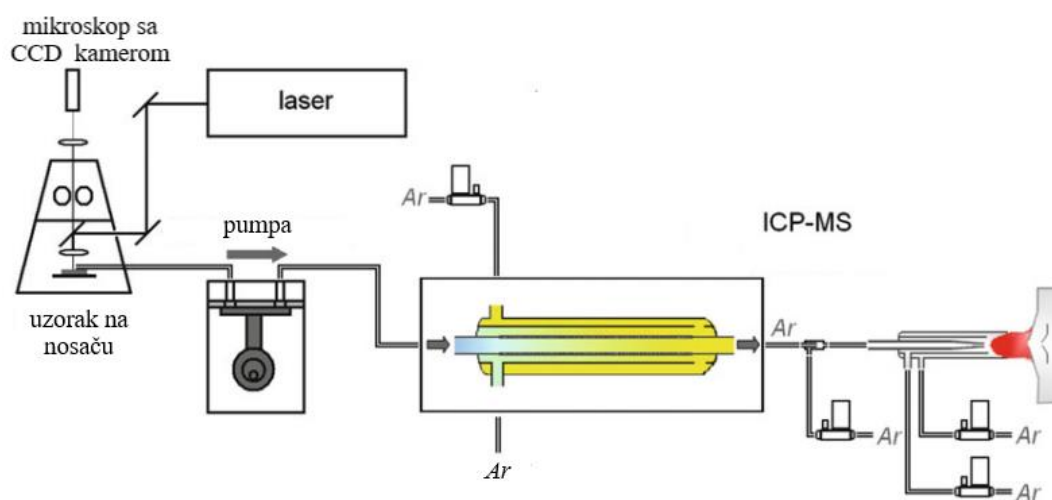
Slika 2. Shematski prikaz lasera s optičkim sustavom i ablacijskom ćelijom<sup>12</sup>

Lasери koji se koriste kod tehnike laserskog otparavanja mogu se kategorizirati prema izvoru, valnoj duljini emitiranog zračenja te trajanju pulsa. Najčešći laseri koji se koriste u metodi LA-ICP-MS su laseri u čvrstom stanju poput Nd:YAG te plinski laseri kao što je ArF excimer. Osnovna valna duljina Nd:YAG lasera, kao i većine lasera u čvrstom stanju je u bliskom infracrvenom području i iznosi 1064 nm. Naime, što je kraća valna duljina lasera, to je veća učinkovitost ablacije i manje je izražena frakcionacija. Smanjenjem valne duljine raste energija fotona za cijepanje veza što pogoduje ablaciji, a također i manjem učinku plazma zasjenjenja. Stoga se za lasersko otparavanje umjesto osnovne valne duljine generiraju harmonici, osobito treći (355 nm), četvrti (266 nm) i peti (213 nm) harmonik u ultraljubičastom području.<sup>12</sup> Excimer laseri sadrže komore ispunjene molekulama plina koje emitiraju zračenje karakteristične valne duljine. Najčešće se koriste halogeni elementi ili halogenidi plemenitih plinova, koji emitiraju zračenje valnih duljina u ultraljubičastom području, poput XeCl (308 nm), KrF (248 nm), ArF (193 nm) te F<sub>2</sub> (157 nm).<sup>15</sup>

Osim lasera, sustav sadrži i optičke elemente koji usmjeravaju zračenje na površinu uzorka te optički mikroskop s ugrađenom lećom za fokusiranje i CCD kameru koji daju pregled površine uzorka. Uzorak je smješten u ablacijsku komoru s prozorom od kvarcnog stakla propusnog za ultraljubičasto zračenje. Ablacijska komora je smještena na postolju koje se može pomicati duž



sve tri prostorne osi pomoću računala, kroz koju se održava protok inertnog plina nositelja (obično argon ili helij) koji nosi otpareni dio uzorka do plazme. Visok protok plina nositelja može smanjiti depoziciju uzorka u komori i cijevi za prijenos te se na taj način može povećati učinkovitost prijenosa, a smanjiti efekt memorije. Većina sustava LA-ICP-MS (slika 3) koristi spektrometar masa s kvadrupolnim analizatorom kao sustav detekcije zbog velike brzine skeniranja spektra masa. Nedostatak kod kvadrupolnih analizatora je kada se u otparenom volumenu nalaze velike čestice pri čemu dolazi do prostorne promjene u ionskom oblaku što dovodi do pogoršanja signala. Zbog toga se često koriste drugi analizatori poput analizatora mase s dvostrukim fokusiranjem, kojeg odlikuje visoka razlučivost te analizator mase s mjerenjem vremena leta koji istodobno analizira mase iona.<sup>12</sup>



Slika 3. Shematski prikaz sustava LA-ICP-MS<sup>16</sup>

Sustav laserske ablacije je idealan pristup u analizi kako bi se mehanička i kemijska energija zamjenile energijom svijetla. Tradicionalni pristup u analizi je mikrovalno potpomognuta razgradnja koja se i danas često koristi.<sup>17</sup> Velika prednost analize uz lasersko otparavanje je upravo priprema uzorka koja načelno nije ni potrebna ili je vrlo jednostavna. Pri analizi površine materijala ili dubinskom profiliranju nema pripreme uzorka, dok je pri elementnoj analizi uzorka potrebna homogenizacija ukoliko je uzorak heterogen, što se može postići mljevenjem te prešanjem u čvrstu pastilu.<sup>12</sup>

### 3.2.3. Pristupi u kalibraciji

Metoda LA-ICP-MS je postala standardna tehnika za elementnu analizu koju karakteriziraju niske granice detekcije, visoka prostorna razlučivost, široko linearno dinamičko područje i jednostavna priprema uzorka. Jedan od najvećih izazova na koji se nailazi kod metode LA-ICP-MS je mogućnost točne i pouzdane kvantitativne analize. Neki od razloga su frakcionacija koja se događa tokom procesa otparavanja, prijenos aerosola, ionizacija u plazma izvoru i odstupanja zbog instrumentnog drifta. Budući da učinkovitost otparavanja, a tako i ovi procesi ovise o sastavu matrice uzorka, za pouzdane i točne rezultate poželjno je koristiti standarde čija se matrica podudara s matricom uzorka. Baždarenje vanjskim standardima, koji se ili temelje na dostupnim certificiranim referentnim materijalima, ili su pripremljeni u laboratoriju, glavni je način baždarenja kod metode LA-ICP-MS.

Certificirani referentni materijali (engl. *Certified Reference Materials*, CRMs) omogućuju kalibraciju s visokim stupnjem sljedivosti te moraju odgovarati uzorku u koncentracijama analita kao i u kemijskom sastavu te fizikalnim svojstvima. Primjer za certificirani referentni materijal su stakleni referentni materijali serije NIST SRM 61X. Iako se koriste za kalibraciju, nerijetko se matrica standarda ne podudara s matricom uzorka. Takav slučaj je vrlo čest kod analize bioloških uzoraka gdje gotovo i ne postoje standardi koji odgovaraju uzorku svježeg tkiva. Ograničena dostupnost odgovarajućih referentnih materijala za kvantitativnu LA-ICP-MS analizu dovelo je do razvoja alternativnih strategija u kalibraciji. Ipak, kompleksnost i heterogenost bioloških tkiva čine oponašanje matrice uzorka teško izvedivom pa još nije razvijen prikladan način kalibracije kako bi se dobila željena točnost, preciznost i robustnost. U većini slučajeva, standardi se pripremaju u laboratoriju i podvrgavaju internoj karakterizaciji i validaciji pomoću različitih metoda kao što je spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu nakon mikrovalno potpomognute razgradnje.<sup>8</sup>

Prvi protokol za standardne materijale tkiva predstavili su Becker i suradnici 2005. godine, a temeljio se na homogenizaciji uzoraka moždanog tkiva.<sup>18</sup> Ovi tkivno specifični standardi se uobičajeno proizvode uzorkovanjem iz istog tipa tkiva ciljane vrste (npr. mozak, jetra, ili krv) te su dopirani različitim koncentracijama analita i presječeni na istu debljinu kao uzorak.<sup>19–21</sup> U tom kontekstu u više relevantnih literaturnih izvora opisana je upotreba standarda na bazi polimera kao polimernih filmova prethodno nanešenih centrifugiranjem, standarda ugrađenih u epoksidnu

smolu i standarda printanih pomoću inkjet printera.<sup>22-24</sup> Korištenje želatine kao matrice za kalibraciju elemenata u mekom biološkom tkivu i stanicama pruža nekoliko prednosti, upravo zbog mogućnosti finog podešavanja svojstava želatine. Najčešći želatinski standardi za biološku primjenu kod metode LA-ICP-MS su u obliku takozvanih presjeka, zatim mikročipovi, standardi napunjeni u kalupe, kapljice dobivene pipetiranjem ili standardi dobiveni uz pomoć robotiziranih dozirajućih uređaja.<sup>25-29</sup>

## 4. PRIMJENA METODE LA-ICP-MS

Zbog brojnih prednosti pred konvencionalnim pristupima analize čvrstih uzoraka, ova metoda se primjenjuje za analizu različitih uzoraka: geoloških uzoraka poput stijena, ruda i fosila, različitih bioloških uzoraka, uzoraka povijesnih artefakata (za koje je osobito važna nedestruktivnost metode), mikroplastike, polimera, uzoraka iz okoliša i dr.

### 4.1. Primjena za analizu uzoraka iz okoliša

Ova metodologija izvrstan je pristup u određivanju kemijskog sastava u uzorcima stabla zbog visoke prostorne razlučivosti koju pruža fokusirano lasersko zračenje. Određivanje kemijskog sastava stabla može se koristiti kako bi se pratili atmosferski uvjeti, kemija u tlu te zagađenja. Zbog velike osjetljivosti, moguće je provesti multielementnu analizu pri vrlo niskim granicama detekcije. Watmough i suradnici proveli su kvantitativnu multielementnu analizu te odredili 11 elemenata za uzorke crvenog javora. Značajne promjene u koncentracijama elemenata primjećene su kod stabala koja su rasla na zagađenom tlu blizu talionice metala.<sup>12</sup>

Analiza lebdećih čestica može ukazati na zagađenje zraka i na taj se način može pratiti kvaliteta istoga. Na primjer, arsen se smatra velikim pokazateljem zagađenja i jedan je od najopasnijih zagađivača zraka dobiven antropogenim utjecajima. Konvencionalna metoda analize uključuje membranske filtre sa sitnim porama u kojima se skupljaju lebdeće čestice te se potom razgrađuju i analiziraju. Lasersko otparavanje je izvrsna alternativa za takvu analizu zato što se čestice mogu otpariti direktno iz filtra.<sup>12</sup>

Elementna analiza provedena je na uzorcima koralja s područja Velikog koraljnog grebena u Australiji kako bi se promotrio utjecaj čovjeka i prirode na okoliš grebena. Nakon validacije

dobiveni su točni i reproducibilni podatci pri niskim koncentracijama elemenata rijetkih zemalja (engl. *Rare Earth Elements*, REEs) pri 1 do 100 ppb. Sadržaj lantanoida u uzorcima koralja odgovarao je sastavu vode koja je okruživala koralje. Međutim, frakcionacija elemenata rijetkih zemalja ukazala je na snažan sezonski ciklus koji je usko povezan s koncentracijom mangana. Ova metoda zasigurno je dobar alat za utvrđivanje biološke aktivnosti u morskom okolišu.<sup>30</sup>

## 4.2. Primjena za analizu geoloških uzoraka

Jedno od prvih istraživanja metode objavljeno je 1985. godine u kojem su se analizirali uzorci različitih geoloških materijala.<sup>1</sup> Iako su slabo zastupljeni, elementi u tragovima mogu ukazivati na razne geološke procese koji su slijedili po postanku Zemlje. Njihova analiza je vrlo bitna što je dovelo do širenja primjene ove metode u geološkim istraživanjima. Za potrebe analize dostupni su različiti certificirani referentni materijali geoloških uzoraka, dobiveni prešanjem praškastih uzoraka ili taljenjem čime se dobivaju staklasti uzorci. Za minerale poput silikata primjereni su i sintetički stakleni referentni materijali poput NIST SRM 612 ukoliko nije dostupan standard koji odgovara matrici uzorka.<sup>31</sup>

Napredak u instrumentaciji sustava za lasersko otpravanje zajedno sa ICP-MS sustavom omogućuje preciznu analizu elemenata pri niskim razinama koncentracije. Zadnje desetljeće donijelo je inovaciju u 2D i 3D elementnom i izotopnom mapiranju uzorka. Naime, mapiranje pomoću metode LA-ICP-MS je brzorastuće područje u geoznanostima zbog bogatstva prostornih informacija koje daje o procesima kao što je petrogeneza magmatskih, metamorfnih i sedimentnih stijena.

Važna je primjena i u području geokronologije za datiranje geoloških materijala poput stijena, fosila i minerala te geoloških događaja. Najčešće se koristi za U-Pb geokronologiju u kojoj se starost materijala procjenjuje na temelju odnosa između izmjerenih količina izotopa  $^{238}\text{U}$  i stabilnog izotopa  $^{206}\text{Pb}$ . Mjerenjima se mogu identificirati potencijalno homogena područja u podrijetlu ili starosti promatranjem dobivenih karakterističnih mapa za glavne elemente i elemente u tragovima. Glavni elementi (npr. Mg, Ca, Sr, Mn, Fe, Ba) pomažu u otkrivanju potencijalnih promjena u sastavu minerala, dok elementi u tragovima pomažu pri otkrivanju prisutnosti detritalnih materijala (npr. Ga, Rb, Zr, Th) ili migraciji te preraspodjeli elemenata tijekom dijagenese ili deformacije (npr. Mg, V, Mn, Cu, Rb, Sr, U).<sup>32</sup>

### 4.3. Primjena za analizu bioloških uzoraka

Prva primjena u analizi bioloških uzoraka započela je 90-ih godina prošlog stoljeća. Godine 1992. objavljen je rad u kojem su dva biljna certificirana referentna materijala analizirana metodom LA-ICP-MS te je kvantitativno određen sadržaj dvadeset i šest elemenata.<sup>3</sup>

Pogodna je za analizu elemenata u tragovima u biološkim uzorcima upravo zbog visoke osjetljivosti, jer ne zahtijeva složenu pripremu uzorka te je kompatibilna s drugim metodama analize koje se često koriste za biološke uzorke poput imunohistokemijskih metoda, gel elektroforeze i dr. Razlučivost pri oslikavanju bioloških uzoraka metodom LA-ICP-MS nije toliko visoka kao kod nekih drugih metoda poput mikroanalize rendgenskom fluorescencijom, ali je i dalje dovoljno visoka da omogućuje elementno mapiranje na razini stanica.<sup>33</sup>

Raspodjela metala u tkivima organa i na razini stanica je od kritične važnosti za razumijevanje njihove uloge u organizmu i kako njihovo ponašanje može biti povezano sa fiziološkim funkcijama. Razvijena je metoda za kvantitativno oslikavanje esencijalnih metala uključujući Mg, Mn, Fe, Cu i Zn koristeći metodu LA-ICP-MS. Kalibracija je provedena na želatinskim standardima koji su dopirani elementima od interesa. Razvijena metoda primjenjena je na uzorcima bubrega štakora kako bi se regulirala razina bakra koja je povezana s Wilsonovom bolešću.<sup>34</sup>

Veliku pozornost u raznim istraživanjima dobiva određivanje koncentracija elemenata pomoću metode LA-ICP-MS u ljudskoj kosi koja može biti pokazatelj zagađenja okoliša, unosa kontaminirane hrane ili konzumacije lijekova. Brom i jod su uključeni u nekoliko fizioloških funkcija kao što je regulacija osmotskog tlaka, kiselo-lužnata ravnoteža organizma, ravnoteža kolagena IV i sinteza tiroidnih hormona. Njihova koncentracija u biološkim uzorcima povezuje se s raznim bolestima kao što su cistična fibroza, hipertireoza i hipotireoza. Analiza je ukazala na povišenu koncentraciju joda pacijenata koji se liječe od hipotireoze u odnosu na zdravu populaciju.<sup>35</sup>

Sve je veća primjena i u analizi tkiva koja su podvrgnuta određenim pretragama koja zahtijevaju unos različitih kontrastnih sredstava. Kontrastna sredstva na bazi gadolinija koriste se kod pretrage oslikavanja magnetskom rezonancijom i smatra se da imaju samo limitirane nuspojave te se brzo izbacuju iz organizma preko bubrega. Kako bi se promotrio utjecaj gadolinija u organizmu, analizirani su uzorci ljudskog mozga pacijenta koji je tretiran kontrastnim sredstvom.

Analiza je pokazala ostatke gadolinija u različitim područjima mozga s najvišom vrijednosti koncentracije od  $800 \text{ ng g}^{-1}$  čak i nakon dvije godine primjene kontrastnog sredstva čime se može utvrditi kako metoda pruža vrlo bitne informacije o prostornoj distribuciji gadolinija, ali i drugih metala u biološkom tkivu.<sup>36</sup>

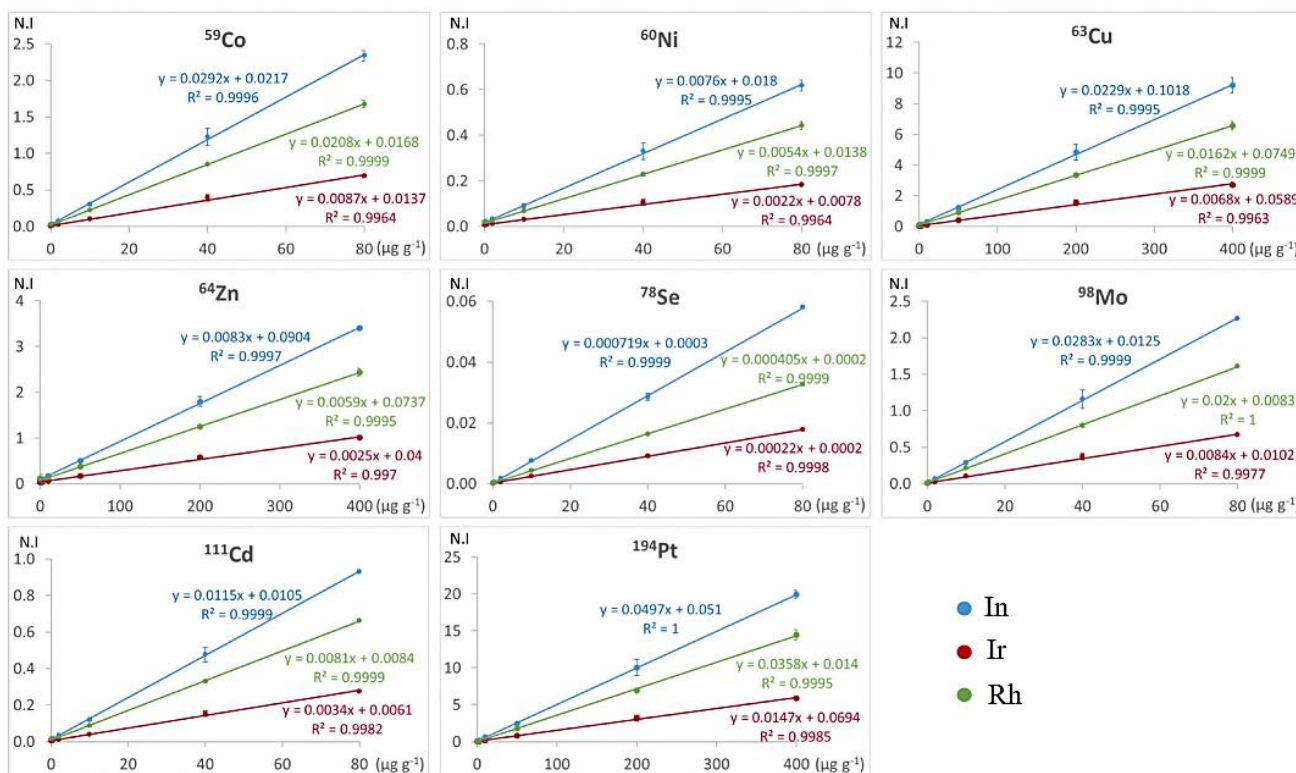
## 5. MULTIELEMENTNO OSLIKAVANJE U BIOLOŠKIM TKIVIMA

Arnaudguilhem i suradnici proveli su istraživanje o razvoju metodologije za kvantitativnu primjenu temeljene na polimernom filmu i internoj standardizaciji. Prvotno su pripravili otopinu dekstrana te su na jedan dio otopine primjenili metodu dodatka standarda (tzv. “spiking”) sa standardnim otopinama indija (In), rodija (Rh) i iridija (Ir), a na drugi dio otopine s ostalim standardnim otopinama (Fe, Cu, Zn, Pt, P, Co, Ni, Se, Mo, Hg, Cd) kako bi pripravili kalibracijske standarde za kvantifikaciju. Također, pripravili su standarde mekog tkiva na način da su homogenizirali svinjski bubreg, izvagali ga te dodali standarde određenih koncentracija. Metodom kriomikrotomije dobiveni su tanki slojevi bubrežnog tkiva od 8, 10, 14 i 30  $\mu\text{m}$ . Isto tako, prikupljeni su i uzorci ljudskog tkiva (jajnika i tumorskih izraslina) te su zajedno s uzorcima bubrega podvrgnuti analizi pomoću metode LA-ICP-MS.<sup>10</sup>

### 5.1. Kalibracija i kvantitativno oslikavanje

Za svaki standard polimera koncentracija 0, 2,5, 10, 100 i 400  $\mu\text{g g}^{-1}$  skeniran je set od 3 uzastopne linije te je intenzitet signala svakog iona normaliziran prema intenzitetu signala internog standarda uz prosječnu vrijednost izračunatu na temelju tri skena. Na temelju prosječne vrijednosti, provedena je linearna regresija kao funkcija koncentracija standarda i na temelju nje određene su koncentracije elemenata uzimajući u obzir razliku u otparenim volumenima (zbog različite debljine slojeva). Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je i pronalazak najprikladnijeg internog standarda (koji ne bi bio prisutan u promatranim tkivima) za svaki element uzimajući u obzir njegovu masu i ionizacijski potencijal. Promatrajući ova dva parametra,  $^{115}\text{In}$  (5,79 eV),  $^{103}\text{Rh}$  (7,46 eV) i  $^{192}\text{Ir}$  (8,97 eV) uzeti su u obzir kao interni standardi zbog pokrivanja velikog broja masa

i ionizacijskih potencijala elemenata od interesa. Kalibracijske krivulje ovih elemenata prikazane su na slici 4.

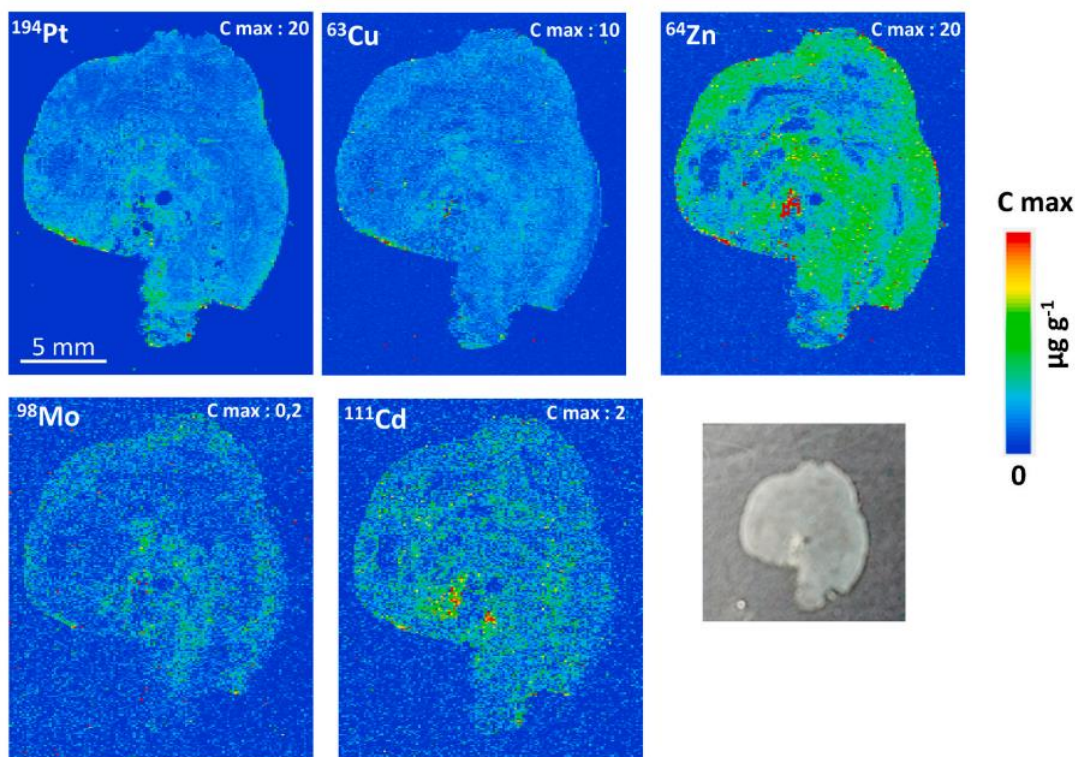


Slika 4. Kalibracijske krivulje elemenata dobivene kao funkcija intenziteta signala internih standarda<sup>10</sup>

Dobiveni su korelacijski koeficijenti u vrijednostima od 0,995 do 1 što ukazuje na dobro slaganje, osim za P (<0,5), Fe (<0,2) i Hg (<0,09). Vrijednost korelacijskog koeficijenta za živu može se objasniti gubitkom žive procesom isparavanja, dok su niske vrijednosti za željezo i fosfor rezultat prisutnosti istih u polimeru i predmetnom stakalcu koje se također površinski otparava pri čemu se povećava pozadinski signal, a smanjuje linearnost. Nadalje, kalibracijske krivulje pokazuju da je indij interni standard kojeg odlikuje najviša osjetljivost što dovodi do zaključka da je upravo In najprikladniji interni standard za sve elemente. Pouzdanost razvijene metodologije utvrđena je pomoću standarda i homogeniziranih tkiva bubrega s različitim količinama metala te različitim debljinama slojeva. Granice detekcije određene su prema podacima linearne regresije za polimerne standarde uzimajući u obzir različite gustoće i debljine polimernih filmova. Koristeći In kao interni

standard za najtanji sloj (8  $\mu\text{m}$ ) dobivena je granica detekcije za elemente Co, Mo, Pt ( $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ ), te Cu ( $0,2 \mu\text{g g}^{-1}$ ), Cd ( $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ ), Ni ( $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ ), Zn ( $0,9 \mu\text{g g}^{-1}$ ) i Se ( $1 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

Standardni protokol kod osoba oboljelih od peritonealne karcinomatose je uklanjanje oba jajnika ili liječenje kemoterapijom za koju se koriste lijekovi poput cisplatina i oksaliplatina. Razvijena metodologija primjenjena je za oslikavanje elemenata za dva tipa uzoraka različitih pacijenata. Slika 5 prikazuje kvantitativnu raspodjelu platine iz lijeka te endogenih elemenata Cu, Zn, Mo i Cd.



Slika 5. Kvantitativno oslikavanje elemenata metodom LA-ICP-MS u uzorku jajnika pacijenta liječenog oksaliplatinom<sup>10</sup>

Najveće vrijednosti koncentracije za Pt ( $15\text{--}20 \mu\text{g g}^{-1}$ ) bile su u perifernom predjelu jajnika što ukazuje na tip liječenja – direktni kontakt lijeka sa tkivom i organima. Također,  $5\text{--}10 \mu\text{g g}^{-1}$  Pt može se kvantificirati u središnjem dijelu jajnika, što bi moglo odgovarati ostatku Pt od prethodnog sistematičnog liječenja kemoterapijom. Bakar je također homogeno raspodijeljen pri nižim koncentracijama od  $2,5$  do  $5 \mu\text{g g}^{-1}$ . Molibden, element uključen u neke biološke procese, identificiran je pri granici kvantifikacije ( $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Zabrinjavajuća je prisutnost kadmija ( $1\text{--}2 \mu\text{g g}^{-1}$ ) te se postavlja veliko pitanje o njegovom porijeklu i potencijalnim toksičnim učincima za



normalno funkcioniranje jajnika. Analiza bioimaginga ukazala je kako platina utječe na tkivo čime se omogućuje usporedivost kliničkih protokola i promatranje njihove učinkovitosti. Naposljetku, kvantifikacija endogenih elemenata (Cu, Zn, Ni, Mo) je također od velike važnosti jer se može pratiti potencijalni utjecaj lijeka na ove esencijalne elemente.<sup>2</sup>

## 5.2. Daljnja istraživanja i napredak

Može se reći da je laserska ablacija pristup 21. stoljeća u kemijskoj analizi i mnoge su kompanije svjesne o povećanoj potražnji za komercijalnim instrumentima koji će brzo analizirati svaki uzorak s dobrom osjetljivošću, točnošću i preciznošću. Također, laserska ablacija omogućuje primjenu u kemijskoj analizi u stvarnom vremenu kao što je mjerenje u naprednoj industriji (baterije, solarne ćelije), proizvodnji hrane i farmaceutskih pripravaka te mnogim drugim industrijskim procesima.

Razvoj i poboljšanja u tehnologiji, a time i izvedba te komercijalizacija lasera uvelike su utjecali na broj primjena koji svakim danom sve više raste. Rana instrumentacija nije mogla biti u koraku s razvojem industrije jer laseri u početku nisu bili dovoljno pouzdani niti su imali dovoljnu snagu kao što je slučaj danas. Laseri s većom energijom, kraćim pulsevima i visokom stopom ponovljivosti postaju sve više učinkoviti, pouzdani i cjenovno prihvatljivi. Laserska ablacija je toliko napredovala da je danas postala rutinski pristup u mnogim industrijskim procesima. Umjetna inteligencija će zasigurno doprinijeti u napretku laserske ablacije za razne primjene te potencijalno pomoći u boljem razumijevanju samog procesa.<sup>17</sup>

I dalje je kalibracija te potreba za referentnim materijalima jedan od najvećih problema i nedostataka ove metode. Automatizacija standardne proizvodnje različitim procesima trebala bi drastično povećati učinkovitost u generiranju referentnih materijala. Tako bi moglo doći do njihove masovne proizvodnje i potencijalne komercijalizacije. Povećana je potreba za proizvodnjom kalibracijskih standarda koji se temelje na materijalu (npr. polimeri i želatina) sa svojstvima i karakteristikama koje su lake za kontrolirati i modificirati za specifičnu primjenu. Tako više univerzalne matrice mogu se podudarati s biološkim uzorkom i mogu savladati probleme kao što su rukovanje s biološkim materijalom i obilje pozadinskog signala endogenih elemenata unutar standarda koji mogu utjecati na kalibracijski raspon i granice detekcije.<sup>8</sup>

---

## 6. ZAKLJUČAK

Akumulacija metala u okolišu sve je veća zbog utjecaja industrijalizacije i urbanizacije. Povećana prisutnost metala, ali i njihov nedostatak u organizmu može ukazivati na razne bolesti stoga je mjerenje koncentracija u specifičnim područjima biološkog tkiva od velike važnosti. Spektrometrija masa uz induktivno spregnutu plazmu sa laserskim otparavanjem je jedna od najnaprednijih metoda za kvantifikaciju specija metala koju odlikuju izvrsna osjetljivost i visoka prostorna razlučivost.

Iako je primjena metode LA-ICP-MS u geoznanosti najviše zastupljena, zadnjih godina primjena u analizi bioloških uzoraka i uzoraka iz okoliša sve se više povećava. Za uzorke iz okoliša postoji velik broj certificiranih referentnih materijala, međutim kako su ti materijali prvotno osmišljeni za tekućinsku analizu, nisu primjenjivi za direktnu analizu metodom LA-ICP-MS zbog nehomogenosti na mikroskali.

Također, iako su u dosadašnjim istraživanjima prikazana brojna istraživanja vezana za kvantifikaciju metala u biološkom tkivu metodom LA-ICP-MS, nailazi se na iste probleme – heterogenost uzoraka i nedostatak prikladnih certificiranih referentnih materijala. Budući da se i dalje najčešće koristi pristup pripreme standardnih materijala u laboratoriju, potreban je daljnji razvoj novih i poboljšanje postojećih referentnih materijala koji će biti cjenovno prihvatljivi.

Metoda LA-ICP-MS se sve više primjenjuje u različitim područjima, međutim potrebna su daljnja istraživanja u svrhu dodatnih poboljšanja, što će zasigurno uvelike unaprijediti modernu analitiku.

## 7. LITERATURA

1. A. L. Gray, *Analyst* **110** (5) (1985) 551–556.
2. D. Spanu, G. Binda, M. Marelli, L. Rampazzi, S. Recchia, D. Monticelli, *Chemosensors* **9** (2021) 77.
3. S. F. Durrant, N. I. Ward, *Food Chem.* **49** (3) (1994) 317–323.
4. S. Wang, R. Brown, D. J. Gray, *Appl. Spectrosc.* **48** (11) (1994) 1321–1325.
5. D. Pozebon, G. L. Scheffler, V. L. Dressler, *J. Anal. At. Spectrom.* **32** (5) (2017) 890–919.
6. T. J. Stewart, *Metallomics* **11** (1) (2019) 29–49.
7. P.A. Doble, R.G. de Vega, D.P. Bishop, D.J. Hare, D. Clases, *Chem. Rev.* **121** (19) (2021) 11769–11822.
8. K. Mervič, M. Šala, S.Theiner, *TrAC, Trends Anal. Chem.* **172** (2024) 117574
9. Z. Haidar, K. Fatema, S. Samad Shoily, A. Ashafaqur Sajib, *Toxicol. Rep.* **10** (2023) 554-570.
10. C. Arnaudguilhem, M. Larroque, O. Sgarbura, D. Michau, F. Quenet, S. Carrère, B. Bouyssière, S. Mounicou, *Talanta* **222** (2021) 121537.
11. R. Thomas, *Practical guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners*, Third Edition, Taylor & Francis Group, Florida, 2013, str. 1–4.
12. R. E. Russo, X. Mao, H. Liu, J. Gonzalez, S. Mao, *Talanta* **57** (2002) 425–451
13. R. E. Russo, Laser Ablation, *Appl. Spectrosc.* **49** (1995) 14A–28A
14. R. E. Russo, X. L. Mao, C. Liu, J. Gonzalez, *J. Anal. At. Spectrom.* **19** (2004) 1084–1089
15. M. B. Fricker, *Design of ablation cells for LA-ICP MS: from modeling to high spatial resolution analysis applications*, Doktorski rad, Sveučilište u Zürichu, 2012, str. 15.
16. L. Dussubieux, M. Golitko, B. Gratuze, *Recent Advances in Laser Ablation ICP-MS for Archaeology*, Springer, Berlin, 2016.
17. R. E. Russo, *Appl. Phys. A* **129** (2023) 168
18. J. S. Becker, M. V. Zoriy, M. Dehnhardt, C. Pickhardt, K. Zilles, *J. Anal. At. Spectrom.* **20** (9) (2005) 912–917.
19. D. J. Hare, J. Lear, D. Bishop, A. Beavis, P.A. Doble, *Anal. Methods* **5** (8) (2013) 1915–1921.
20. A. E. Egger, S. Theiner, C. Kornauth, P. Heffeter, W. Berger, B.K. Keppler, C. G. Hartinger, *Metallomics* **6** (9) (2014) 1616–1625.
21. J. A. T. Pugh, A.G. Cox, C.W. McLeod, J. Bunch, B. Whitby, B. Gordon, T. Kalber, E. White, *J. Anal. At. Spectrom.* **26** (8) (2011) 1667–1673.

- 
22. C. Austin, D. Hare, T. Rawling, A.M. McDonagh, P. Doble, *J. Anal. At. Spectrom.* **25** (5) (2010) 722–725.
  23. O. Reifschneider, C.A. Wehe, I. Raj, J. Ehmcke, G. Ciarimboli, M. Sperling, U. Karst, *Metallomics* **5** (10) (2013) 1440–1447.
  24. M. Bonta, H. Lohninger, V. Laszlo, B. Hegedus, A. Limbeck, *J. Anal. At. Spectrom.* **29** (11) (2014) 2159–2167.
  25. S. J. M. Van Malderen, E. Vergucht, M. De Rijcke, C. Janssen, L. Vincze, F. Vanhaecke, *Anal. Chem.* **88** (11) (2016) 5783–5789.
  26. M. T. Westerhausen, T. E. Lockwood, R. Gonzalez de Vega, A. Rohnelt, D.P. Bishop, N. Cole, P. A. Doble, D. Clases, *Analyst* **144** (23) (2019) 6881–6888.
  27. D. Gholap, J. Verhulst, W. Ceelen, F. Vanhaecke, *Anal. Bioanal. Chem.* **402** (6) (2012) 2121–2129.
  28. T. Van Acker, T. Buckle, S.J.M. Van Malderen, D.M. van Willigen, V. van Unen, F. W.B. van Leeuwen, F. Vanhaecke, *Anal. Chim. Acta* **1074** (2019) 43–53.
  29. A. Schweikert, S. Theiner, D. Wernitznig, A. Schoeberl, M. Schaier, S. Neumayer, B.K. Keppler, G. Koellensperger, *Anal. Bioanal. Chem.* **414** (2022) 485–495.
  30. S. F. Durrant, N. I. Ward, *J. Anal. At. Spectrom.* **20** (2005) 821–829.
  31. Y. Liu, Z. Hu, M. Li, S. Gao, *Chin. Sci. Bull.* **58** (2013) 3863–3878.
  32. D. Chew, K. Drost, J. H. Marsh, J. A. Petrus, *Chem. Geol.* **559** (2021) 119917
  33. D. Pozebon, G. L. Scheffler, V. L. Dressler, M. A. G. Nunes, *J. Anal. At. Spectrom.* **29** (2014) 2204–2228.
  34. S. Strekopytov, K. Billimoria, H. Goenaga-Infante, *J. Anal. At. Spectrom.* **38** (2023) 704–715.
  35. D. La Rosa Novo, T. Van Acker, J. Belza, F. Vanhaecke, M. Foster Mesko, *J. Anal. At. Spectrom.* **37** (2022) 775–782.
  36. S. Fingerhut, A. Niehoff, M. Sperling, A. Jeibmann, W. Paulus, T. Niederstadt, T. Alikemper, W. Heindel, M. Holling, *J. Trace Elem. Med. Biol.* **45** (2018) 125–130.