

# LC-ICP-MS pro speciační analýzu



Viktor Kanický

Katedra analytické chemie PŘF MU v Brně

Laboratoř atomové spektrochemie

3.škola HPLC/LC-MS

Doubí 29.8. – 2.9. 2005

- ◆ Atomová spektroskopie a speciace
- ◆ Tandemové techniky
- ◆ Kapalinová chromatografie
- ◆ Indukčně vázané plazma ICP jako zdroj iontů
- ◆ MS
- ◆ Interference
- ◆ Oblasti speciální analýzy

# Celkový obsah prvku **x** jeho výskyt v různých chemických formách

- ◆ Atomová spektroskopie – stanovení celkových obsahů kovů a metaloidů
- ◆ Výskyt kovů v reálném světě:
  - Zřídka - ryzí nebo jednoduché ionty
  - Převážně - součást sloučenin (specií) vznikajících v řadě bio(geo)chemických procesů
- ◆ Důsledky existence specií:
  - Chyby stanovení: nekvantitativní separace, vliv chemické formy na atomizaci v plameni
  - Odlišné chování v přírodě (mobilita, akumulace) a účinky na organismy (toxicita, esencialita)

# Kovy, specie, biologické účinky

- ◆ Toxické i prospěšné účinky kovů závisejí na biologických, fyzikálních a chemických vlastnostech jejich sloučenin - specií.
- ◆ Specie je nositelem informace o biodostupnosti ⇒ toxicita a esencialita
- ◆ Informace o celkovém obsahu daného stopového prvku v životním prostředí, v organismu, má omezenou výpovědní hodnotu, případně je zavádějící.
- ◆ Požadavky na nové analytické metody, umožňující stanovení daného prvku a současně jeho distribuci v různých formách a stanovení těchto forem

# Speciační analýza

- ◆ Analytická chemie od 80. let 20. století – nový směr „speciace stopových prvků a metaloidů“
- ◆ Termín „speciace“ zavedli spektroskopisté: hledání „nových“ analytů jako východisko z neuspokojivě malého počtu prvků periodického systému 😊
- ◆ Speciační analýza – průnik anorganické a organické analytické chemie
- ◆ Speciace, speciační analýza - stanovení koncentrací jednotlivých fyzikálně-chemických forem prvku, jejichž součet tvoří celkovou koncentraci prvku ve vzorku

# Rozsah speciální analýzy

- ◆ Rozlišované formy prvku:
  - Různá chemická individua (oxidační stavy, organokovové sloučeniny, komplexy)
  - Jednotlivé podíly:
    - ◆ vázané na různé fáze systému (v půdách),
    - ◆ na skupiny sloučenin (bílkoviny, polysacharidy)
    - ◆ na biologické struktury (organely, biomembrány, buňky)
- ◆ Speciální analýza dále zahrnuje postupy pro izolaci, detekci, kvantifikaci, charakterizaci a identifikaci vazebných ligandů

# Zájmové specie ve speciální analýze

Redox stavy	Alkylelementy	Další sloučeniny s vazbou C-heteroel.	Metalopeptidy
Se(IV)/Se(VI)	$\text{Me}_n\text{Et}_m\text{Pb}^{(4-m-n)+}$	Se-aminokyseliny	Fytochelatiny
As(III)/As(V)	$\text{Me}_n\text{Sn}^{(3-n)+}$	organicky vázaný As	Metalothioneniny
Cr(III)/Cr(VI)	$\text{Bu}_n\text{Sn}^{(3-n)+}$	As-cukry	Ceruloplasmin
Co(II)/Co(III)	$\text{Me}_2\text{Hg}$ , $\text{Et}_2\text{Hg}$ ,		Transferin
	$\text{MeHg}^+$		Metaloenzymy
	$\text{MeCd}^+$ , $\text{Me}_2\text{Cd}$		Hemo-proteiny
	$\text{Me}_n\text{Ge}_{4-n}^{(4-n)+}$		Membránové proteiny s Ca
	Methylarseničná kyselina		
	Deriváty cymantrenu		

# Zájmové specie ve speciální analýze

Léčiva	Různé látky
Cisplatina	Komplexy kovů s aminokyselinami
Karboplatina	Metaloporfyriny
Aurothiomalát	Deriváty ferrocenu
Aurothioglukosa	Kobalaminy
Auranofin	
Tc-reagencie pro diagnostické zobrazování	



# Požadavky na speciální techniku

- Jistota, že je stanovována určitá specíe a ne jiná (selektivita)
- Dostatečně nízká mez detekce

X

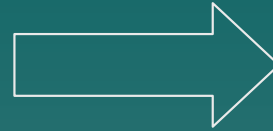
- Speciálně selektivní techniky (Moessbauerova spektroskopie, XPS, ESR, MS a MS/MS mají v přítomnosti matrice reálných vzorků nedostatečné meze detekce
- Nespecifické detektory separačních technik (UV, FID) mají malou citlivost a velký šum

# Kombinované analytické techniky

- ◆ Speciační analýza – soubor tandemových technik založených na on-line spojení separační techniky s vysokým rozlišením s prvkově specifickou detekcí
- ◆ Atomová spektrometrie – dokonalá atomizace, excitace a ionizace prvků nezávislá na jejich původní speciích ⇒ kvantitativní, robustní, spolehlivé stanovení prvku (bez „matrix efektů“)
- ◆ Separační metody – rozdělení specií chromatografickými a elektromigračními technikami

# Tandemové techniky

IZOLACE ZE VZORKU



SEPARACE

## Plynová chromatografie



DERIVATIZACE



-termická desorpce  
-plněné kolony  
-kapilární kolony



DETEKCE  
AAS, AFS

## Kapalinová chromatografie



-rozdělovací  
-iontově párová  
-iontově výměnná  
-vylučovací



(DERIVATIZACE)



DETEKCE  
ICP-OES, MIP-OES

## Další separační techniky



-chromatografie v  
superkrit. kapalině  
-elektroforéza  
-frakcionace (FFF)  
-extrakce  
-iontová výměna  
-dialýza

DETEKCE  
ICP-MS, MIP-MS

# Izolace analytu ze vzorku



- Oddělení analytu od matrice
- Zkoncentrování na detekovatelnou hladinu



- Ztráty nebo kontaminace
- Změna formy daného prvku

## Analyzovaný materiál

- vody
- půdy a sedimenty
- biologické materiály

# Izolace analytu ze vzorku

## ◆ Vody

- extrakce organickými rozpouštědly
- extrakce pevnými sorbenty
- převedení na těkavé látky, jejich zachycení a uvolňování

## ◆ Půdy a sedimenty

- sekvenční extrakce s různými činidly
- Soxhletova extrakce
- kapalinová extrakce pomocí
  - ◆ ultrazvuku
  - ◆ mikrovlnného pole
- superkritická fluidní extrakce

# Izolace analytu ze vzorku

## ◆ Biologické materiály

### – sekvenční extrakce

- ◆ vodou

- ◆ roztoky elektrolytů (izolace bílkovin)

- ◆ organickými rozpouštědly (lipidy a organokovové sloučeniny)

### – solubilizace

- ◆ enzymatická hydrolýza (směs lipáz a proteáz)

- ◆ loužení s kyselinou octovou

- ◆ alkalická hydrolýza s TMAH

- ◆ loužení směsí NaOH-MeOH nebo HCl-MeOH

# Kapalinová chromatografie s ICP-MS

- ◆ rozdílné průtoky mobilní fáze jednotlivými systémy
- ◆ citlivost plazmatu na organická rozpouštědla
- ◆ nové zmlžovací / transportní systémy:
  - mikrokoncentrické s mlžnou komorou:
    - Micro Mist, MCN, HEN
  - ultrazvukový zmlžovač (USN)
  - vysokotlaký (HPN) s desolvatační komorou
  - s přímým dávkováním (DIN, DIHEN)
  - termosprej
  - elektrosprej

# Kapalinová chromatografie s ICP-MS

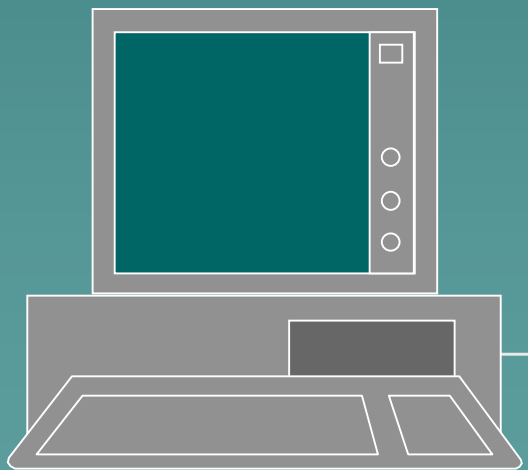
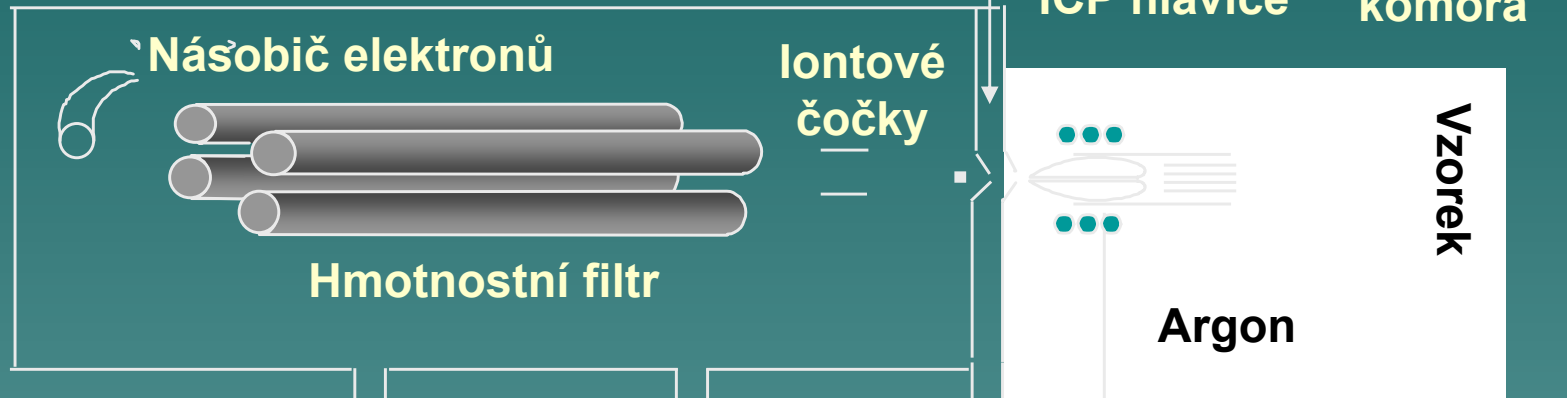
- ◆ Mikrokolony a kapilární kolony s redukovanými průtoky 1-100  $\mu\text{L}/\text{min}$ ; zvýšení koncentrace eluovaného analytu
- ◆ Snižování velikosti částic stacionární fáze  $\Rightarrow$  zkrácení kolony a zvýšení rozlišení při konvenčních průtocích vzorků pro ICP-MS (1 – 1.5  $\text{mL}/\text{min}$ )
- ◆ Post-kolonová derivatizace – chemická volatilizace (mikrovlnná, UV, „thermally assisted“) – generování těkavých hydridů vybraných prvků



# ICP-QMS

Interface Plasma  
Spektrometr

ICP hlavice      Mlžná komora



Turbo  
pumpa

Turbo  
pumpa

Mechan.  
pumpa

RF  
generátor

ICP-MS PC a řídicí elektronika

# Historie

- ❑ 1964 – S. Greenfield, Ar/N<sub>2</sub> ICP-OES
- ❑ 1965 - Wendt a V. Fassel, Ar/Ar ICP-OES
- ❑ 1974 – A. Gray, ARL, DCP vzorkování do MS
- ❑ 1976 - SCIEX Inc., výzkum MIP
- ❑ 1978 – R.S.Houk & Fassel na Iowa State University, ionty z ICP poprvé zachyceny v MS
- ❑ 1979 - Gray z ARL přichází na Iowa State Univ.
- ❑ 1980 - Gray se vrací do U.K., Univ. of Surrey a společně s A. Date (Brit. Geol. Survey): první konstrukce ICP-MS
- ❑ 1981- Douglas & French vyvinuli první prakticky použitelný interface pro přestup iontů z ICP za atmosférického tlaku do MS (vakuum)

# Historie

- ❑ 1983 - SCIEX na Pittsburgh Conference: první komerční ICP-MS: ELAN 250 (kvadrupól)
- ❑ 1989 - VG Elemental uvádí VG PlasmaTrace™, první ICP-MS s vysokým rozlišením
- ❑ 1994: VG Elemental uvádí VG Plasma 54, první ICP-MS s hmotnostním analyzátozem s magnetickým sektorem pro měření izotopových poměrů.
- ❑ Ročně se prodá celosvětově 450 – 500 ICP-MS

# Výrobci ICP-MS

## ◆ Kvadrupólový filtr

- Agilent (HP)
- Micromass
- Perkin-Elmer-Sciex
- **Spectro Analytical**
- TJA Solutions (VG)
- Varian
- Japonsko (Seiko, Shimadzu, Hitachi)

## ◆ Sektorové analyzátory

- Finnigan
- JEOL
- Micromass
- Nu Instruments
- TJA Solutions

## ◆ Průletové analyzátory

- GBC
- **Leco**

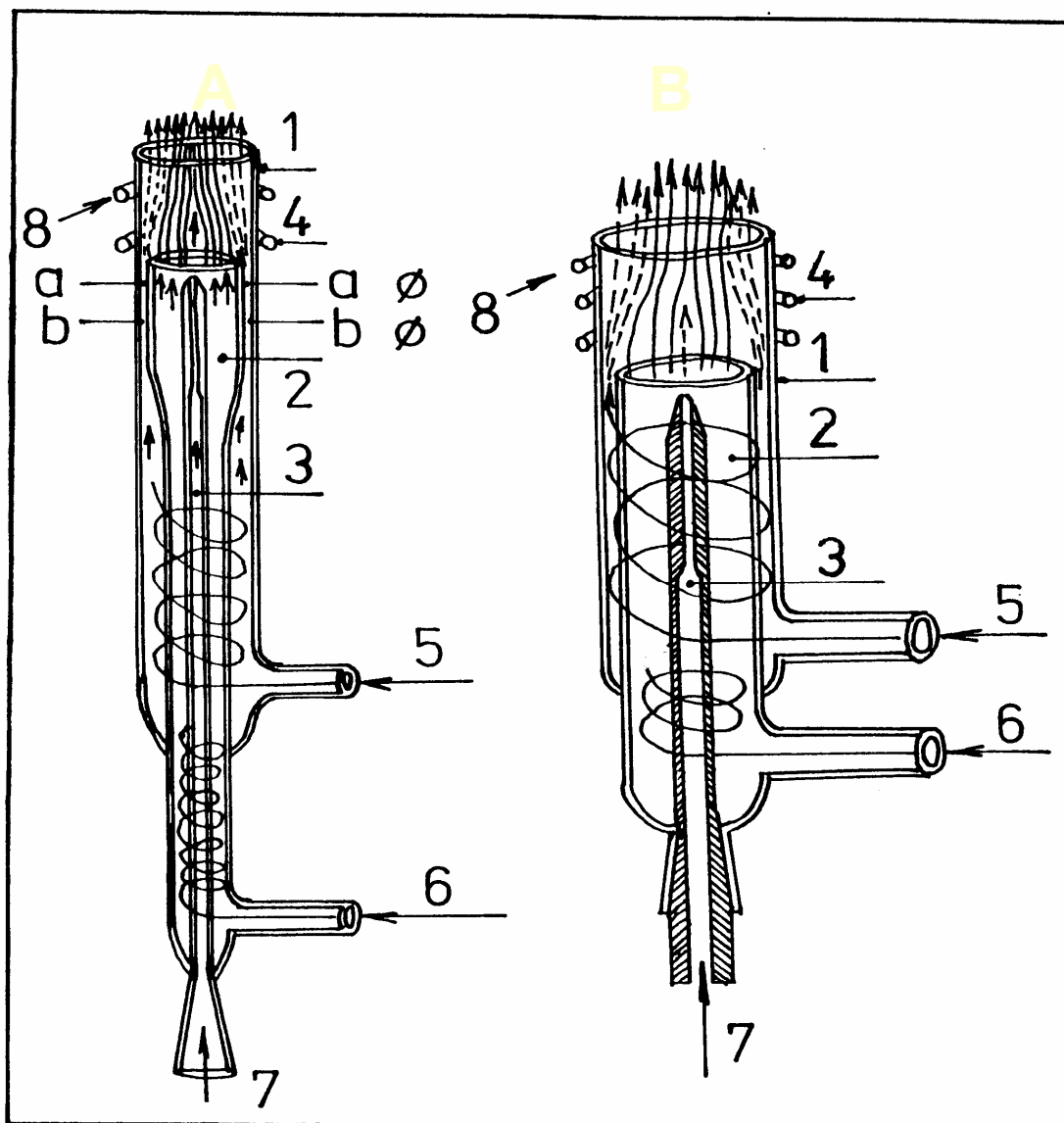
# Specifikace ICP-MS

- Spojení (interface) zdroje ICP a hmotnostního spektrometru musí vykonávat následující funkce a splňovat tyto požadavky:
  - Vzorkovat ionty v místě jejich vzniku, tj. v ICP.
  - Převést ionty z oblasti atmosférického tlaku do vakua.
  - Snížit teplotu z 6000 K na laboratorní teplotu.
  - Zachovat stechiometrii analytů při transportu iontů.

# Princip indukčně vázaného plazmatu ICP

- vysokofrekvenční generator 27 - 64 MHz
- iniciace výboje jiskrou: ionizace – elektrony urychlovány elektromagnetickým polem
- lavinovitá ionizace  $\text{Ar} + e^- \rightarrow \text{Ar}^+ + 2 e^-$
- indukční cívka, 3-5 závitů - primární vinutí transformátoru
- elektrony v plazmatu – sekundární vinutí
- ICP – vnější plazmový plyn 12-15 L/min Ar
- centrálně zaváděný nosný plyn s aerosolem 0.6 - 1 L/min

# Plazmové hlavice pro generování ICP



A - argon/argonové plazma,  
B - argon/dusíkové plazma.

Trubice:

1 – vnější (plazmová),  
2 – prostřední, 3 – injektor.

4 – indukční cívka, 5 – chladicí voda.

Konfigurační faktor plazmové hlavice  
=  $a/b$ , kde  $a$  je vnější průměr  
prostřední trubice,  $b$  je vnitřní průměr  
vnější (plazmové) trubice.

Toky plynů:

A: 5 – vnější plazmový (8-15 l/min Ar),  
6 – střední plazmový (0-1 l/min Ar),  
7 – nosný (0,5-1,0 l/min Ar);

B: 5 – chladicí (15-20 l/min N<sub>2</sub>),  
6 – plazmový (5-10 l/min Ar),  
7 – nosný (1-3 l/min Ar);

**Inductively  
Coupled  
Plasma**

**Analytická zóna**

**Elektromagnetické  
pole  
27 MHz, 40 MHz**

**Indukční cívka  
Výkon 1-2 kW**

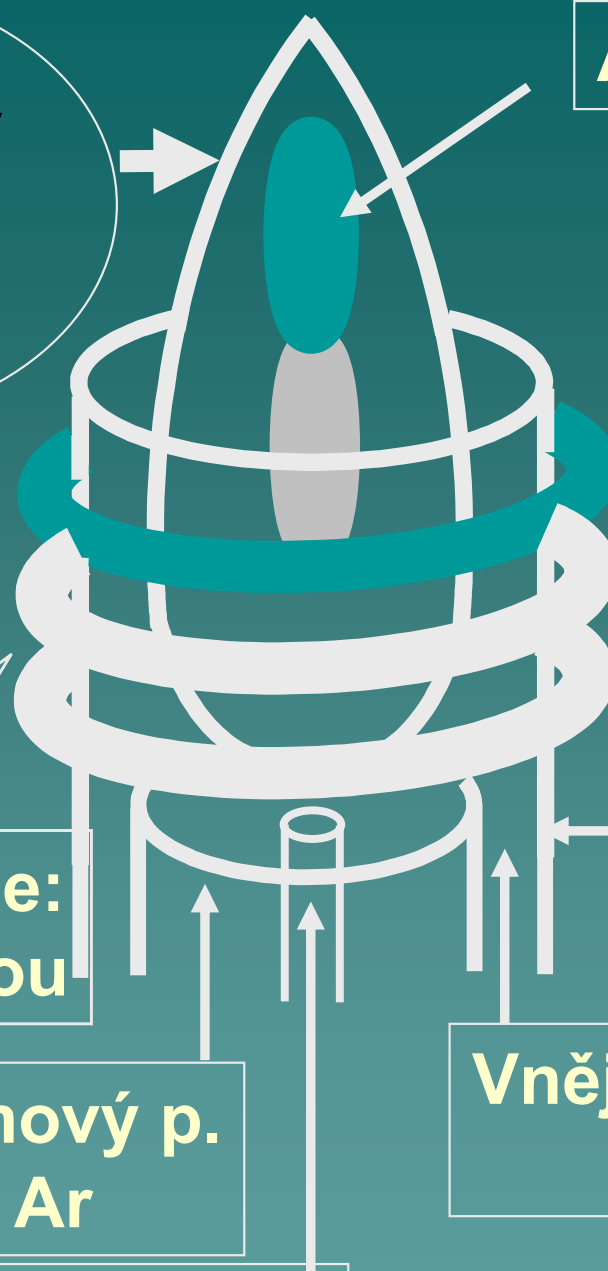
**Plazmová hlavice - křemen  
3 koncentrické trubice**

**Iniciace výboje:  
Ionizace jiskrou**

**Střední plazmový p.  
0-2 L/min Ar**

**Nosný plyn s aerosolem  
1 L/min Ar**

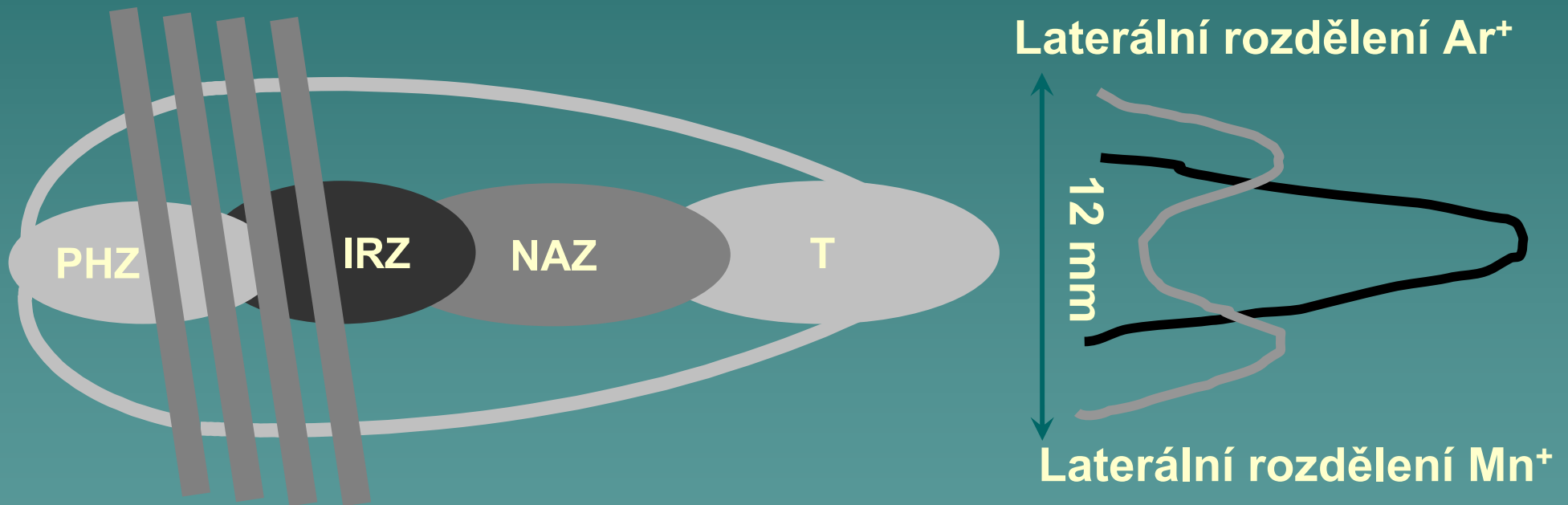
**Vnější plazmový p.  
15 L/min Ar**





# Zóny centrálního (analytického) kanálu ICP

## AXIÁLNÍ POZOROVÁNÍ (OES) A ODBĚR IONTŮ (MS)



Preheating Zone – PHZ  
Initial Radiation Zone – IRZ  
Normal Analytical Zone – NAZ  
Tailflame T



AXIÁLNÍ POZOROVÁNÍ

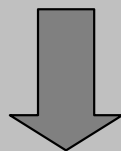
# Ionizace v ICP výboji

- Ionizace v Ar ICP je určována  $E_{i1}(\text{Ar})=15.76 \text{ eV}$
- Kromě F, Ne a He mají všechny prvky  $E_{i1} < 16 \text{ eV} \Rightarrow$  ICP produkuje ionty  $X^+$  pro všechny zájmové prvky
- 87 prvků ze 103 má  $E_{i1} < 10 \text{ eV}$  a tedy  $\alpha > 50\%$
- 69 prvků ze 103 má  $E_{i1} < 8 \text{ eV}$  a tedy  $\alpha > 95 (90)\%$
- S výjimkou Ca, V, Sr, Y, Zr, Sn, Ba, Pb a lanthanoidů jsou ionizační energie do 2. stupně  $E_{i2} > 16 \text{ eV}$ ; tvorba  $X^{2+}$  je významná pouze v případě Sr, Ba (Pb)

# Excitační a ionizační procesy v ICP

- ◆  $\text{Ar}^+ + \text{X} \rightarrow \text{Ar} + \text{X}^{+*} \pm \Delta E$  přenos náboje
- ◆  $\text{Ar}^m + \text{X} \rightarrow \text{Ar} + \text{X}^{+*}$  Penningův efekt
- ◆  $e^- + \text{X} \rightarrow e^- + e^- + \text{X}^+$  srážková ionizace
- ◆  $e^- + \text{X} \rightarrow e^- + \text{X}^*$  srážková excitace  
(X - atom analytu)

supratermická koncentrace  $\text{X}^{+*}$  a  $\text{X}^+$

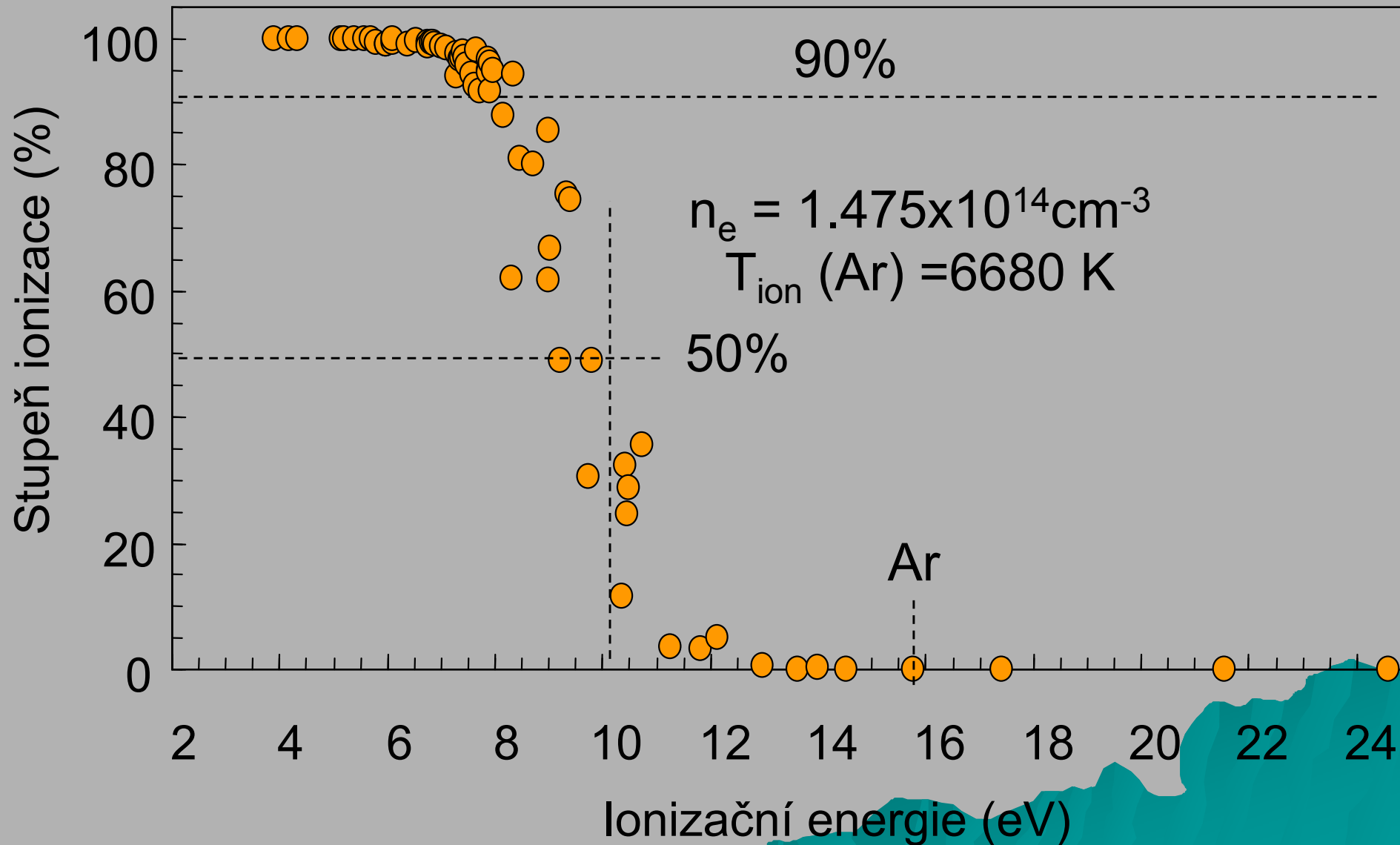


preferenční excitace iontových čar

# Závislost stupně ionizace na ionizační energii

El.	E <sub>i</sub> (eV)	alfa (%)	El.	E <sub>i</sub> (eV)	alfa (%)	El.	E <sub>i</sub> (eV)	alfa (%)
Cs	3,894	99,980	Bi	7,289	94,140	Te	9,009	66,740
Rb	4,177	99,980	Sn	7,344	96,720	Au	9,225	48,870
K	4,341	99,970	Ru	7,370	96,990	Be	9,332	75,360
Na	5,139	99,910	Pb	7,416	97,930	Zn	9,394	74,500
Ba	5,212	99,960	Mn	7,435	97,100	Se	9,752	30,530
Li	5,392	99,850	Rh	7,460	95,870	As	9,810	48,870
La	5,577	99,910	Ag	7,576	94,450	S	10,360	11,470
Sr	5,695	99,920	Ni	7,635	92,550	Hg	10,437	32,310
In	5,786	99,420	Mg	7,646	98,250	I	10,451	24,650
Al	5,986	98,920	Cu	7,726	91,590	P	10,486	28,790
Ga	5,990	99,000	Co	7,860	94,830	Rn	10,748	35,740
Tl	6,108	99,380	Fe	7,870	96,770	C	11,260	3,451
Ca	6,113	99,860	Re	7,880	94,540	Br	11,814	3,183
Y	6,380	98,990	Ta	7,890	96,040	Xe	12,130	5,039
Sc	6,540	99,710	Ge	7,899	91,640	Cl	12,967	0,456
V	6,740	99,230	W	7,980	94,860	O	13,618	0,042
Cr	6,766	98,890	Si	8,151	87,900	Kr	13,999	0,226
Ti	6,820	99,490	B	8,298	62,030	N	14,534	0,042
Zr	6,840	99,310	Pd	8,340	94,210	Ar	15,759	0,013
Nb	6,880	98,940	Sb	8,461	81,070	F	17,422	0,00019
Hf	7,000	98,890	Os	8,700	79,960	Ne	21,563	0,00001
Mo	7,099	98,540	Cd	8,993	85,430	He	24,587	1,01E-09
Tc	7,280	97,500	Pt	9,000	61,830			

# Závislost stupně ionizace na ionizační energii



# Výhody ICP jako ionizačního zdroje

- ICP je účinným atomizačním zdrojem
- ICP ionizuje téměř všechny prvky pouze do 1. stupně a polovina prvků periodické soustavy je ionizována téměř na 100%
- Ionty zůstávají vymezeny v centrálním kanálu výboje, což usnadňuje jejich vzorkování do MS
- Lineární dynamický rozsah 9 řádů
- Meze detekce: ppq, ppt

# ICP-MS vs ICP-OES

- ◆ ICP-OES má některé nedostatky:
  - ✓ Některé prvky ( např. Cd, Pb, U, As, Se) nemají dostatečně nízké meze detekce pro stanovení jejich (i celkových) obsahů.
  - ✓ Meze detekce většiny prvků jsou příliš vysoké pro použití ICP-OES jako prvkově specifického detektoru pro separační techniky (HPLC, GC, CZE) včetně speciace chemických forem
  - ✓ Technika ICP-OES je zatížena četnými spektrálními interferencemi, zejména v případě osnovy, jako je U, W, Fe, Co,...

# ICP-MS vs ICP-OES

## ◆ ICP-OES:

- koncentrace solí v roztocích až do 10%, běžně 1%
- Světlo je „čisté“, spektrometr se nekontaminuje

## ◆ ICP-MS:

- Koncentrace solí max. 0,5 %, koroze konusů
- Kontaminace spektrometru, detektor ...

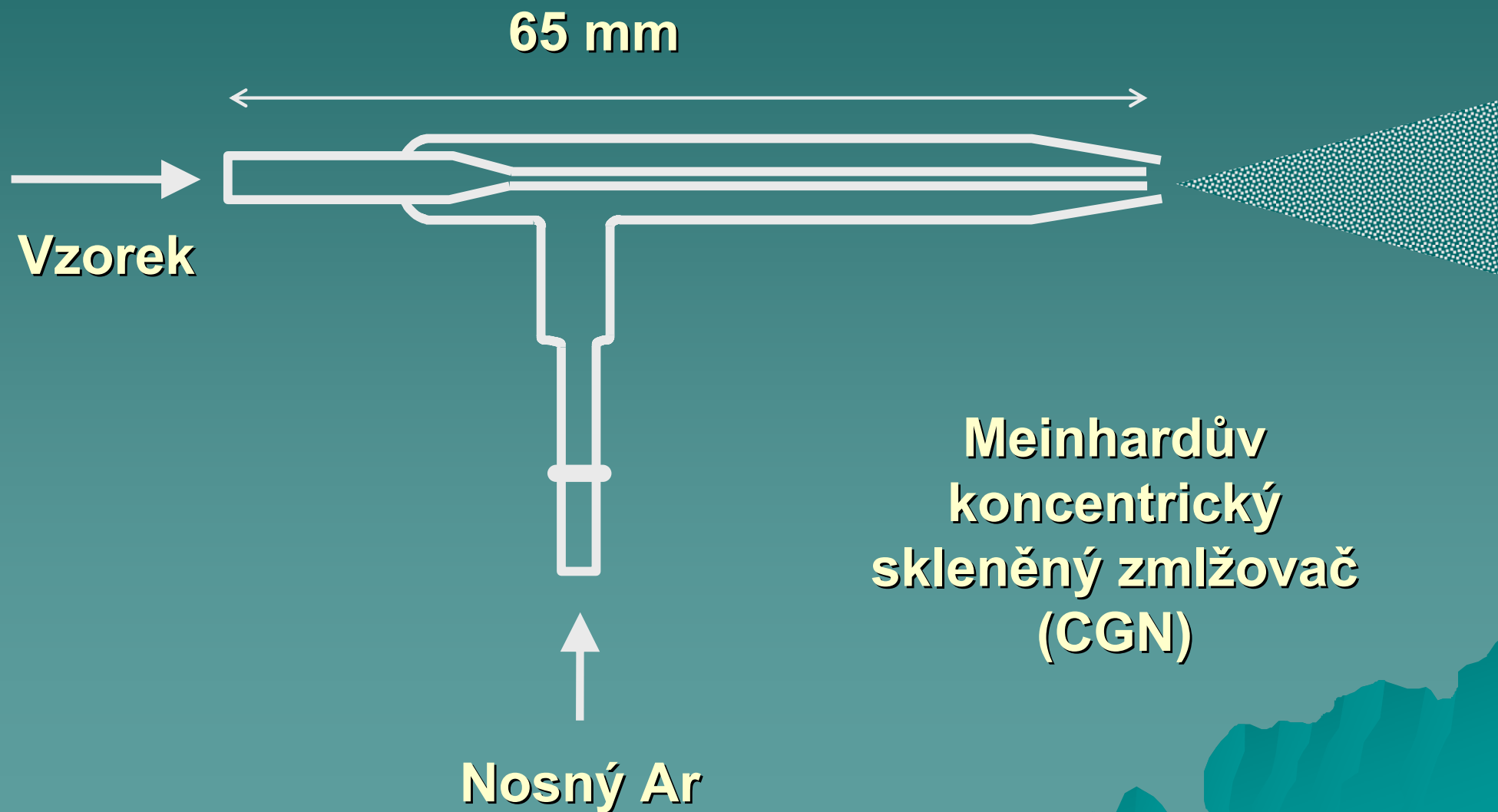


# Meze detekce v ICP-OES/MS

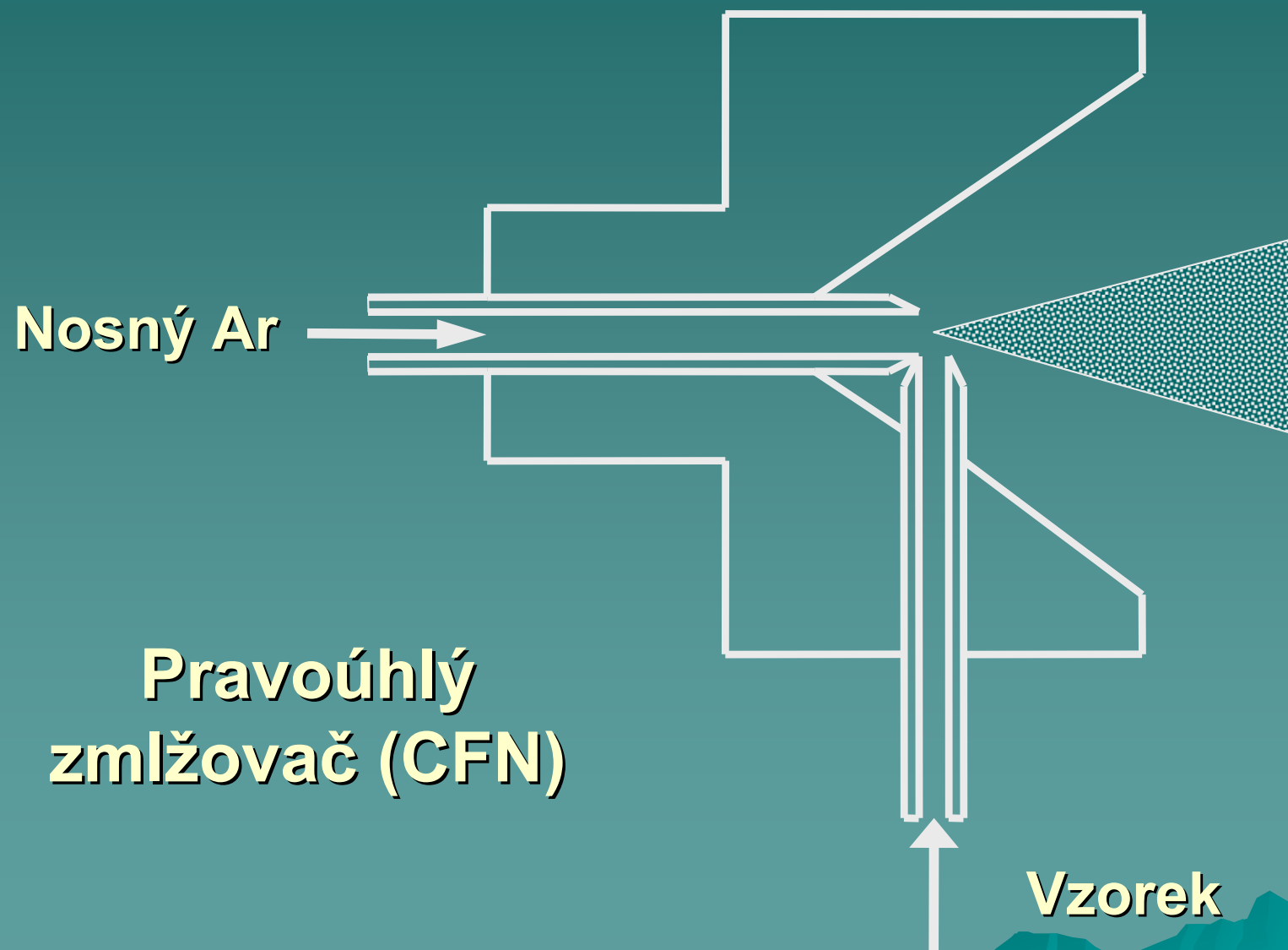
Technika	ICP - AES	ICP - MS
Zmlžovaný roztok	1 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Signál ( pulsy $\text{s}^{-1}$ )	$6 \times 10^6$ fotonů /s	$10^6$ - $10^7$ iontů /s
Pozadí ( pulsy $\text{s}^{-1}$ )	$6 \times 10^4$ fotonů /s	10 iontů /s
Šum pozadí ( $\text{s}^{-1}$ ) $N_b$	$6 \times 10^2$ fotonů /s	1 ion/s
$S/N_b$	$10^4$	$10^6$ - $10^7$
Meze detekce	0,1 $\mu\text{g l}^{-1}$	$\leq \text{ng l}^{-1}$

# Zavádění vzorku do plazmatu

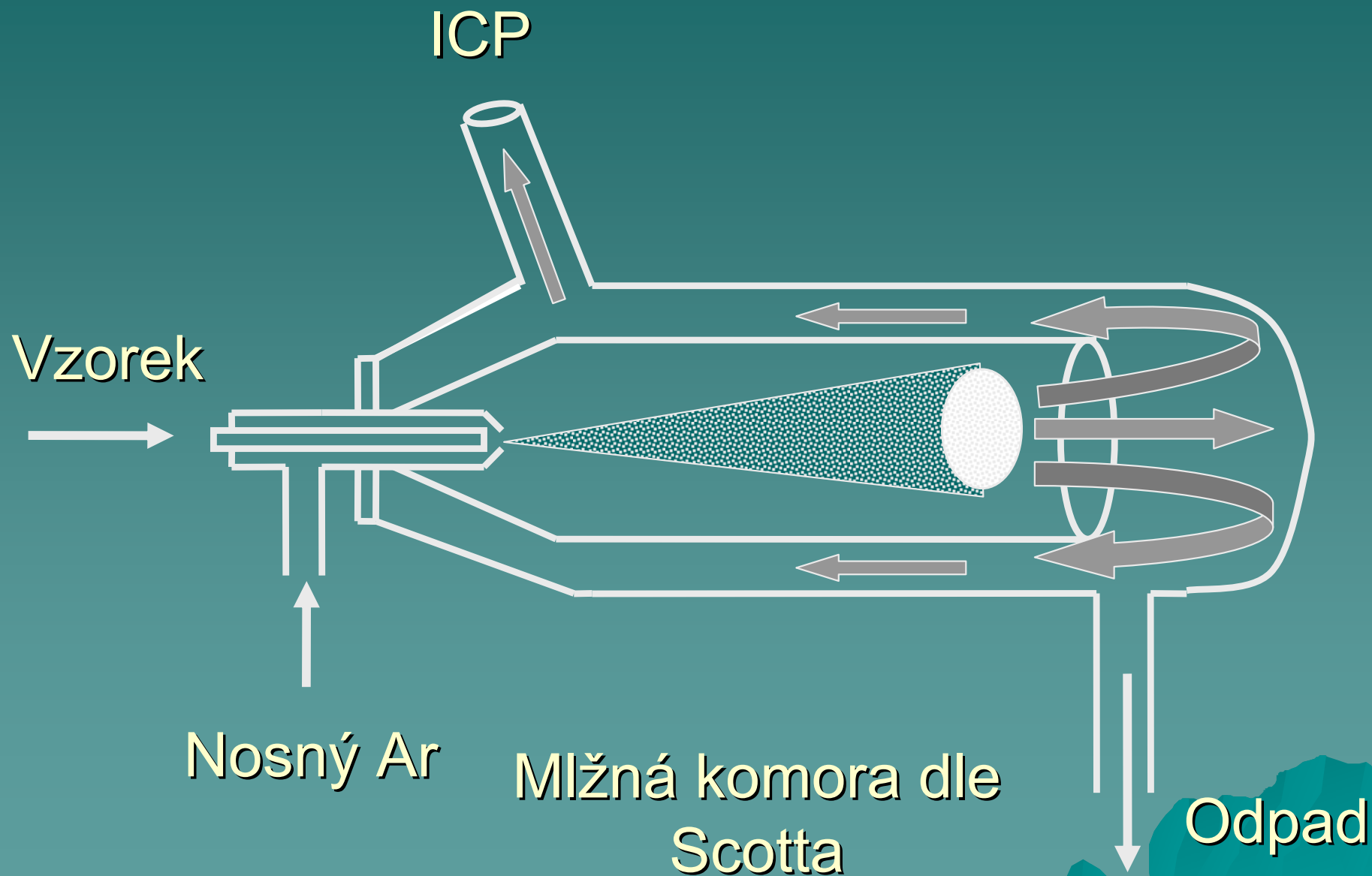
zmlžování



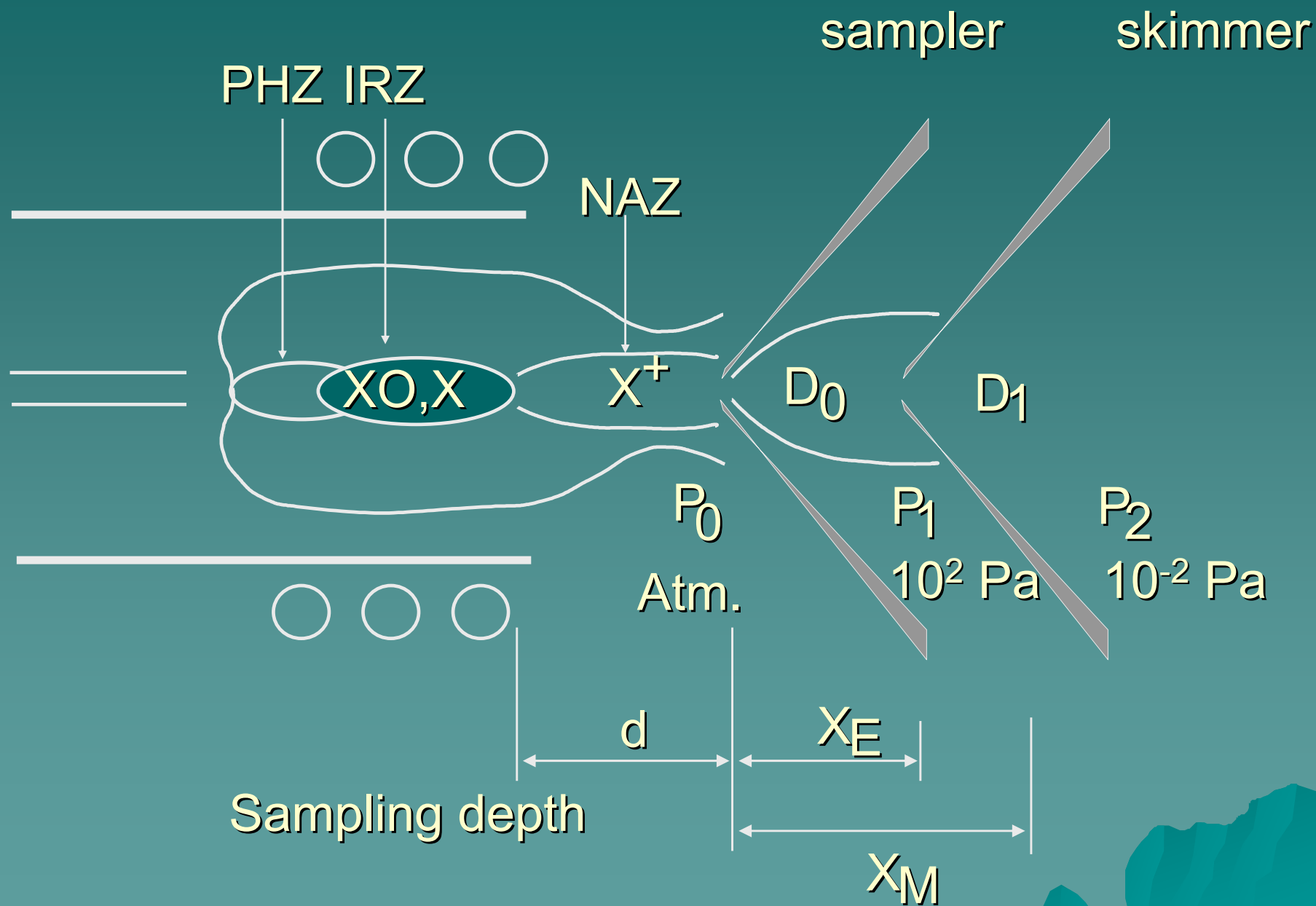
# Zavádění vzorku do plazmatu



# Zavádění vzorku do plazmatu



# Interface ICP - MS



# Dvoustupňový interface

- ◆ Zajišťuje přestup iontů vznikajících za atmosférického tlaku při vysoké teplotě do vakua při laboratorní teplotě.
- ◆ Interface zahrnuje prostor mezi ICP a MS vymezený dvěma kovovými kuželovými clonami, v němž je udržován mechanickou vakuovou pumpou tlak 1 až 2,5 torr, tj.  $10^2$  Pa (1. stupeň) a dále prostor za vnitřní kuželovou clonou před iontovou optikou (2. stupeň), kde klesá tlak na  $10^{-4}$  torr ( $10^{-2}$  Pa) čerpáním olejovou difusní nebo turbomolekulární pumpou.
- ◆ Vnější kužel (sampling cone, sampler, extraction cone) je vnořen do ICP a odebírá z kanálu v oblasti NAZ ionty. Průměr otvoru je cca 1 mm. Vzdálenost mezi otvorem a indukční cívkou se nazývá hloubka vzorkování (sampling depth) a je obdobou výšky pozorování u ICP-OES. Zde vstupuje iontový paprsek, který dále expanduje nadzvukovou rychlostí. Materiál sampleru je Ni, Cu, Pt; chlazení vodou, životnost 2-6 měsíců.

# Dvoustupňový interface

- ◆ Vnitřní kužel (skimmer) je umístěn 2-10 mm za vnějším kuželem. Průměr otvoru je 0.4-0.9 mm. Mezi clonami je udržován tlak 133 Pa (1 torr). Tento kužel vzorkuje nadzvukový proud plynu vznikající při expanzi za sampling cone. Skimmer propustí do spektrometru cca 1% vzorku. Může být zhotoven podobně jako sampler z Ni, Al, Cu, Pt nebo z nerez. oceli a má životnost nejméně rok.
- ◆ Skimmer je oddělen od vlastního spektrometru clonou většího průměru, která odděluje prostor za skimmerem ( $10^{-4}$  torr,  $10^{-2}$  Pa) od prostoru s iontovou optikou ( $10^{-5}$  až  $10^{-6}$  torr,  $10^{-3}$  až  $10^{-4}$  Pa). Za turbomolekulární pumpu je zařazována obvykle ještě rotační olejová pumpa.

# Poloha skimmeru

- ◆ Při expanzi plynu/plazmatu do vakua ( $10^2$  Pa), se paprsek šíří nadzvukovou rychlostí (Mach 10) a plazma se ochlazuje.

- ◆ Vznik Machova disku ve vzdálenosti  $X_M$ :

$$X_M = 0.67 D_0 (P_0/P_1)^{1/2}$$

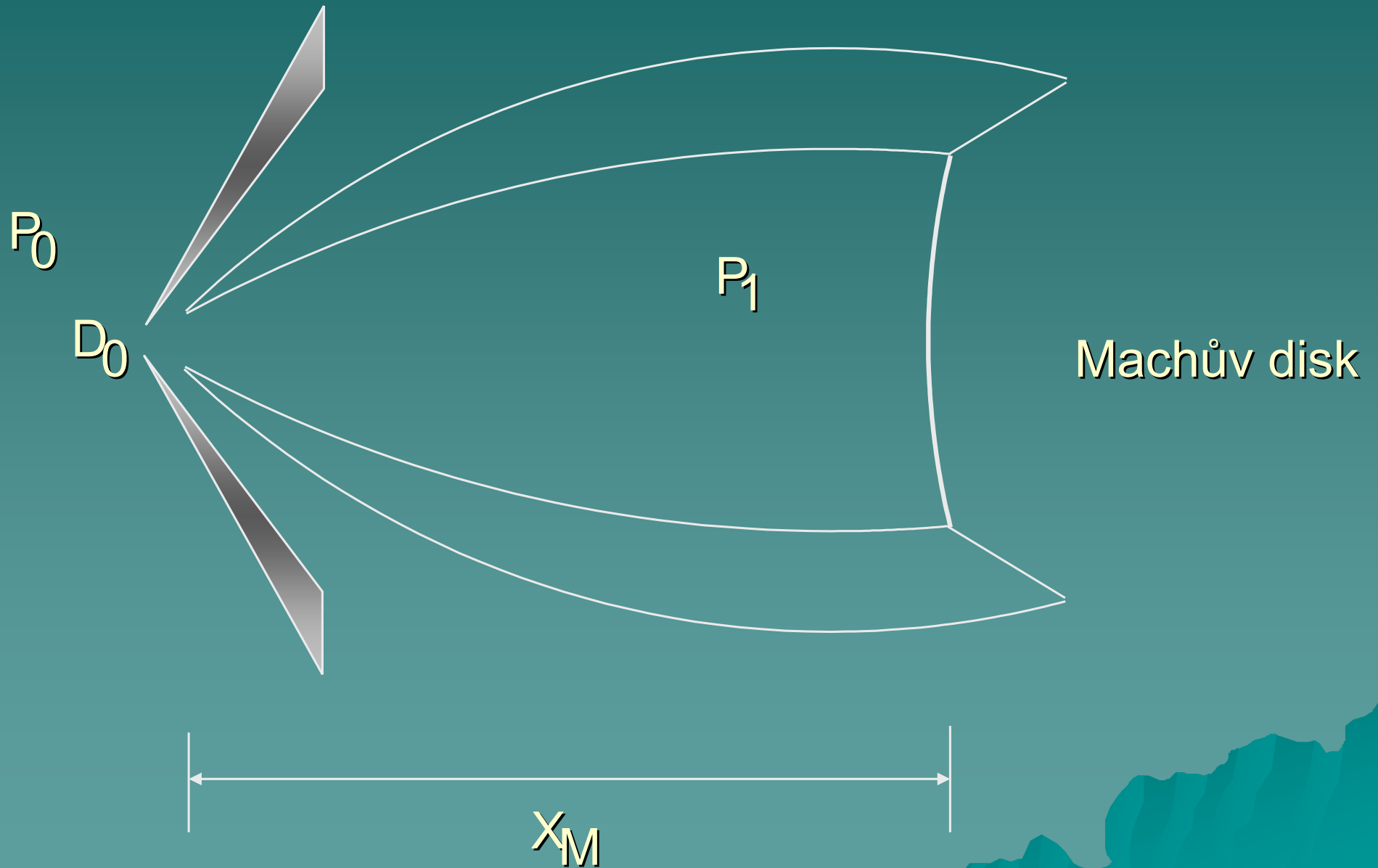
- ◆ Poloha skimmeru vzhledem k Machovu disku:

$$X_E = 2/3 X_M$$

což je 6 - 10 mm.



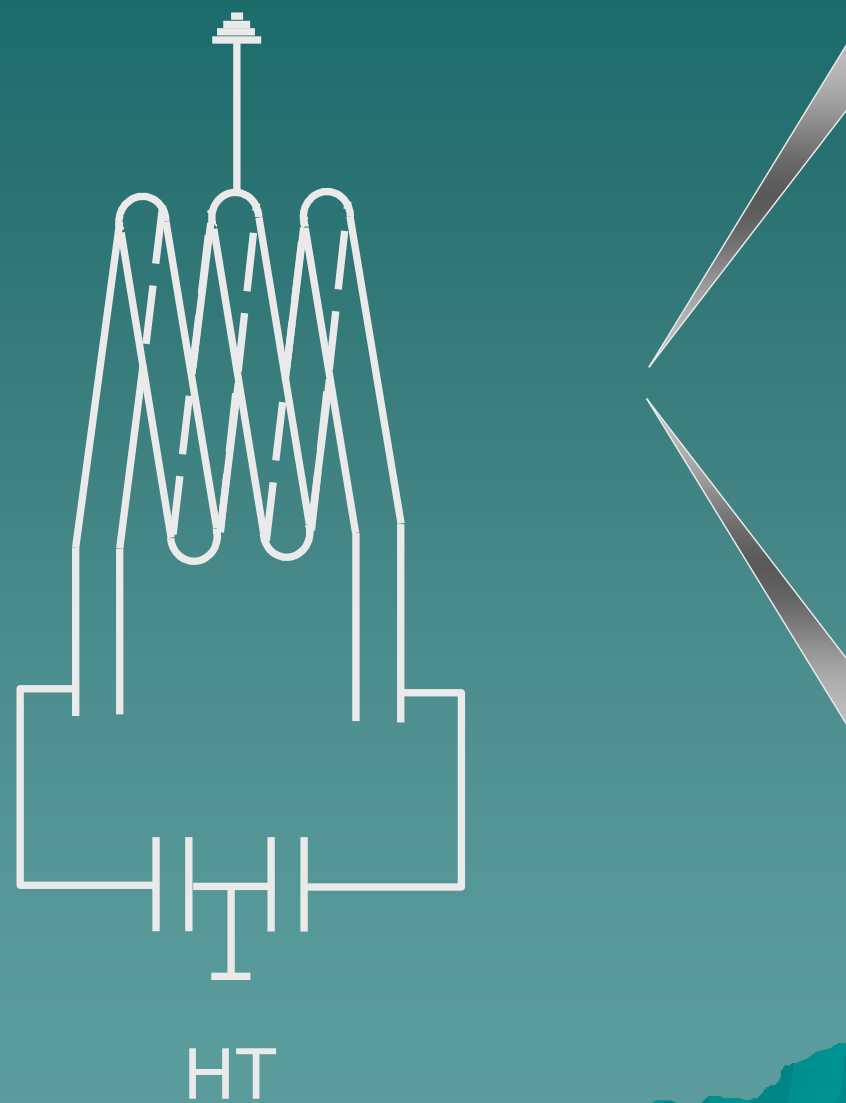
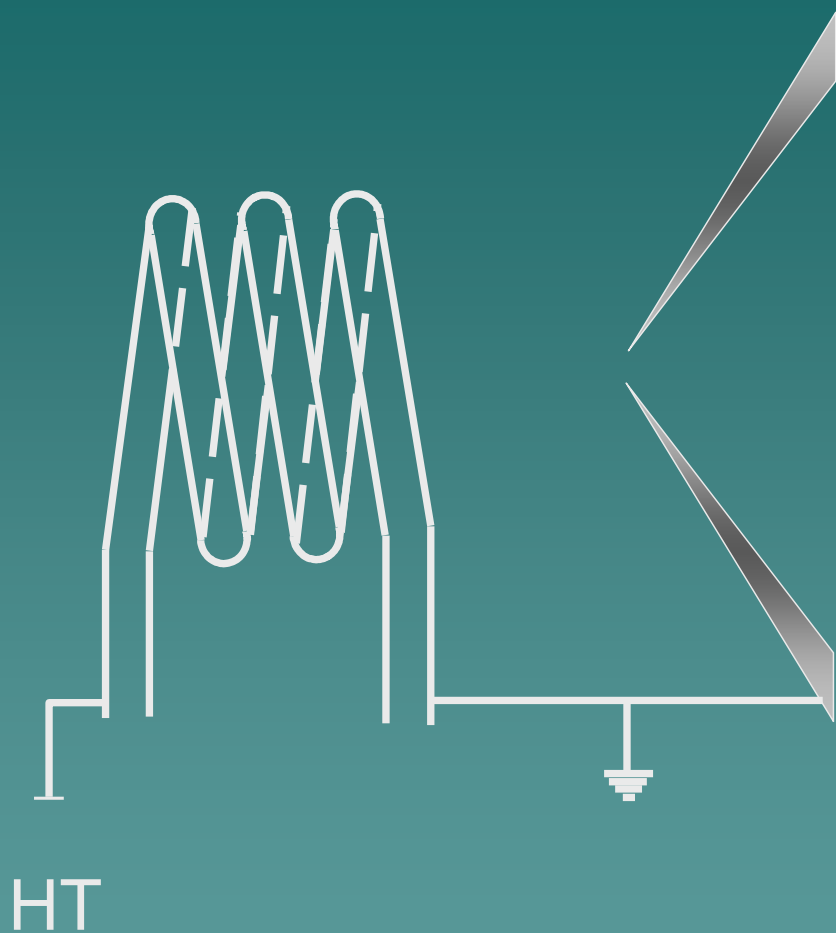
# Vznik Machova disku



# Problém parazitního obloukového výboje

- ◆ ICP vykazuje vůči zemi napětí 100-300 V (kapacitní pole), které může způsobit vznik obloukového výboje mezi ICP a samplerem s následkem eroze sampleru a produkce fotonů.
- ◆ Uzemnění cívky:
  - na sampler
  - cívka se středním vývodem

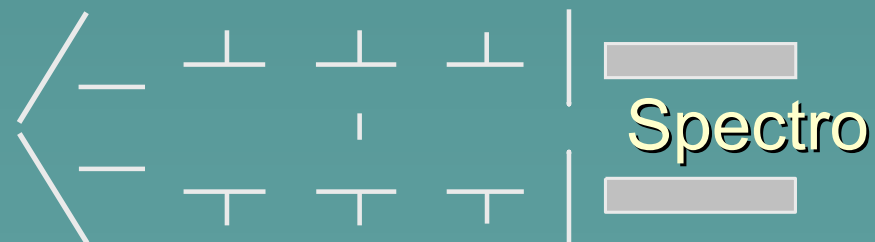
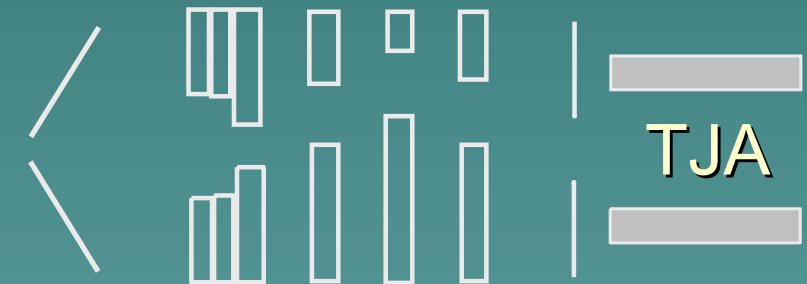
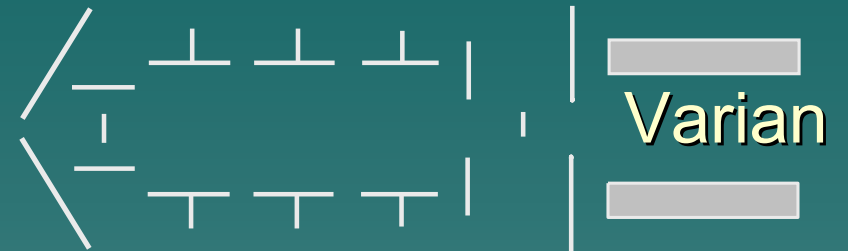
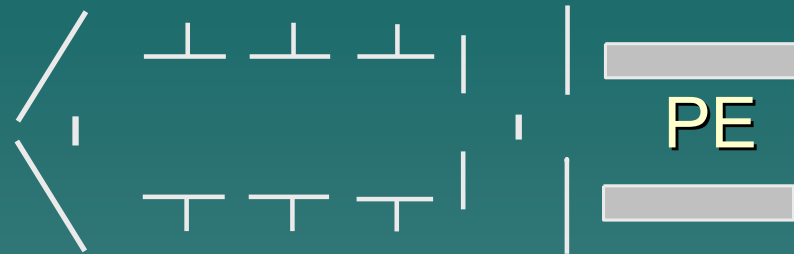
# Uzemnění cívky



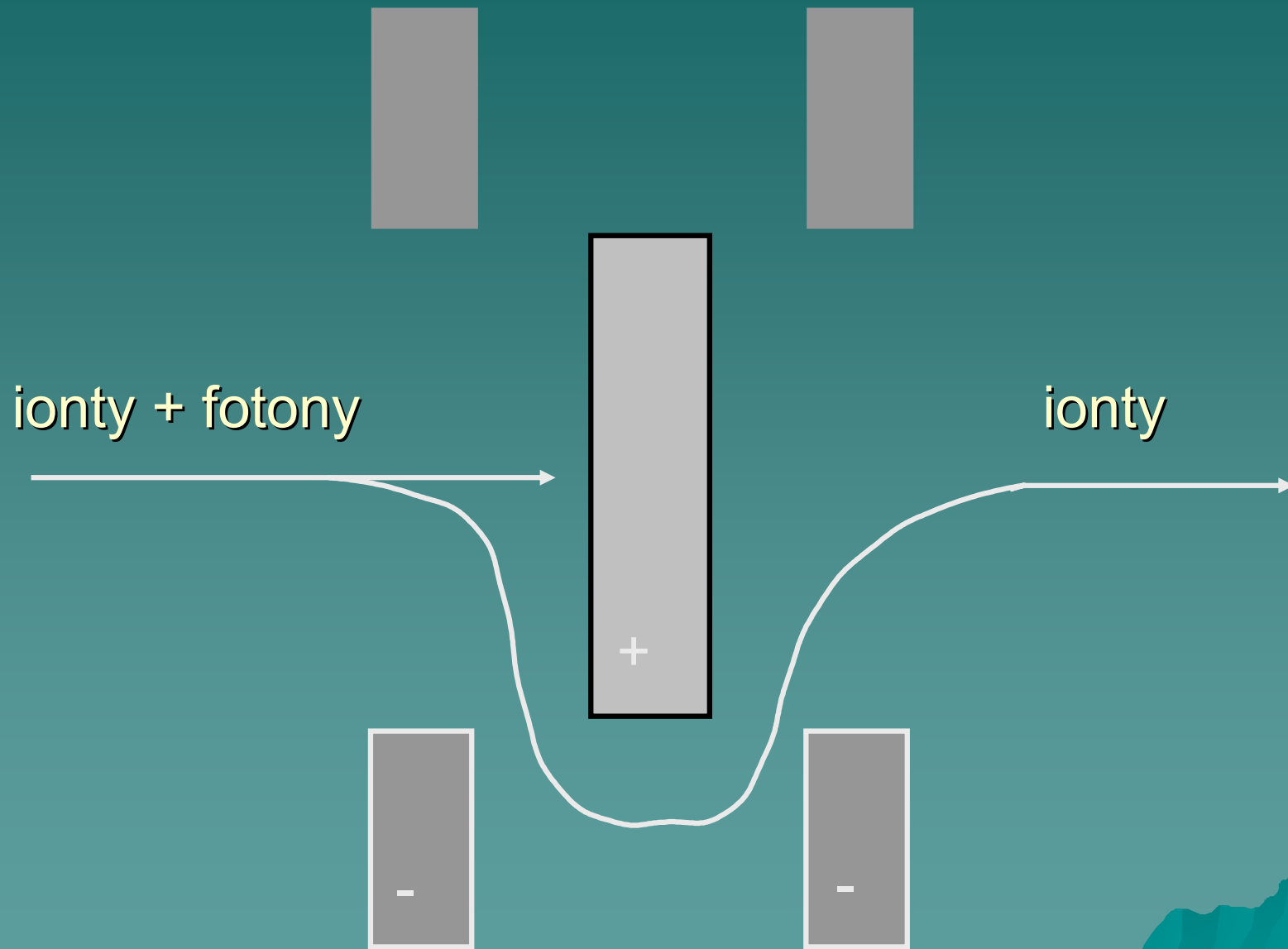
# Iontová optika

- ◆ Paprsek vystupující ze skimmeru je divergentní (space charge effect). Před vstupem paprsku do vlastního spektrometru je třeba vytvořit kolineární paprsek, jehož ionty mají energii v úzkém pásmu.
- ◆ Je třeba odstranit fotony, aby nevyvolávaly parazitní signál na detektoru. Toto řeší iontová optika.

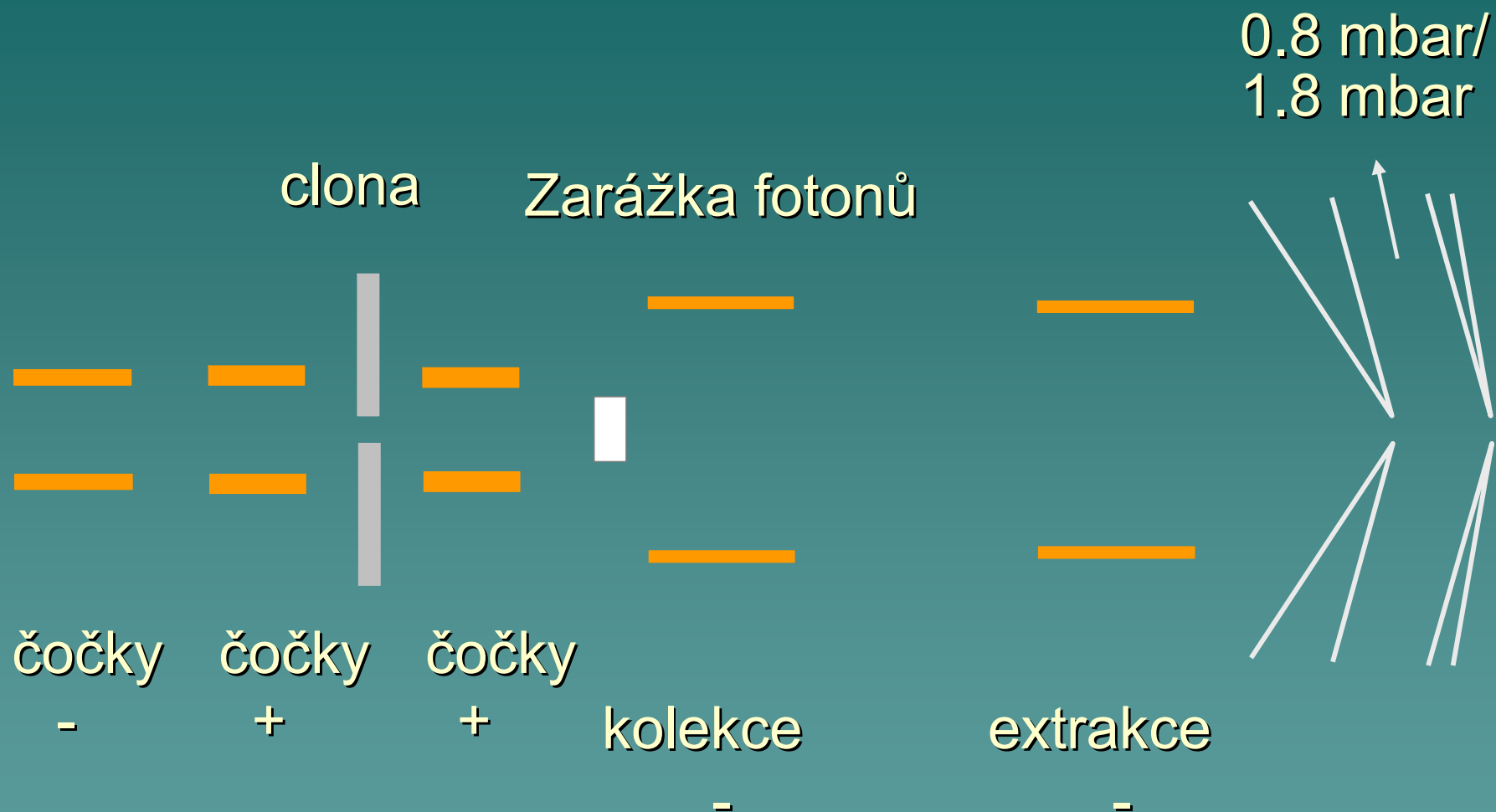
# Různé typy iontové optiky



# Photon stop: Bessel box



# Příklad interface: VG PQ3



# Analyzátory pro ICP-MS

- ◆ Statické analyzátory: analyzátory sektorové = současně disperse a zaostření (hranol + čočka).
  - Ionty zvoleného poměru  $m/z$  jsou přivedeny na centrální dráhu kombinací statických polí – použití zejména pro
    - ◆ spektrometrii vysokého rozlišení (s dvojí fokusací)
    - ◆ měření izotopových poměrů
- ◆ Dynamické analyzátory:
  - stabilní dráhy iontu  $m/z$  mezi zdrojem a detektorem je dosaženo s využitím radiofrekvenčního pole (kvadrupólový filtr)
  - rozdělení iontů podle  $m/z$  se určí z doby letu mezi zdrojem a detektorem (analyzátor z doby letu)

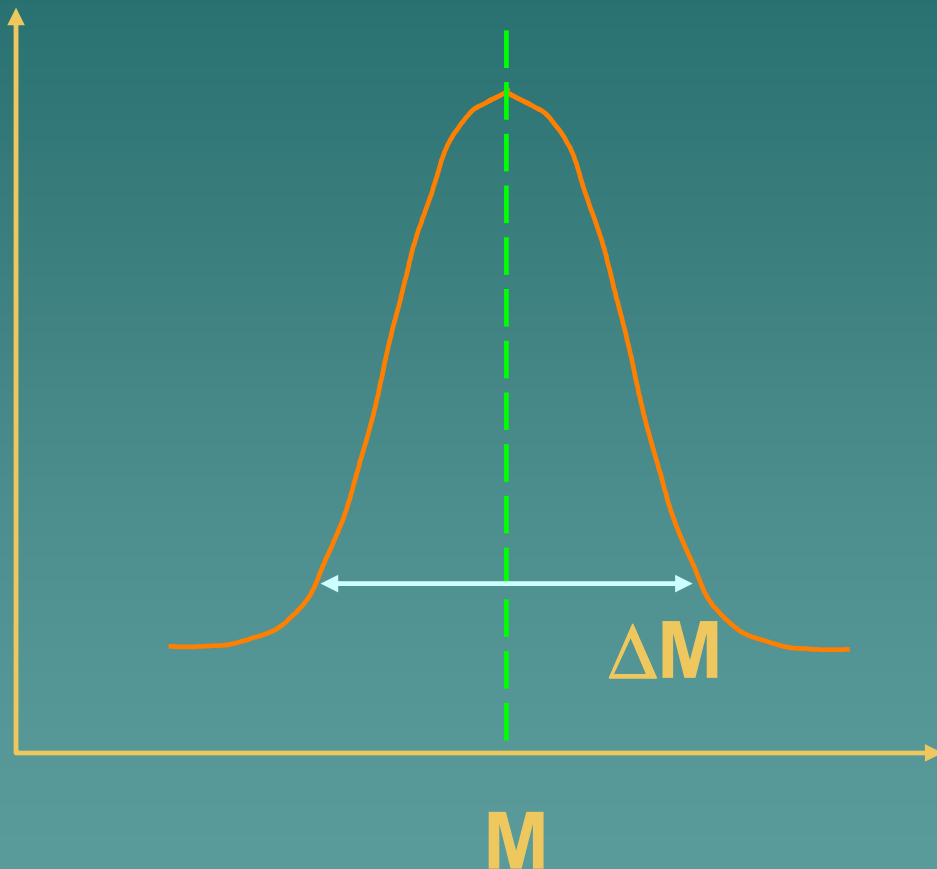


# MS používané s ICP zdrojem

Tytéž systémy jako pro org. analýzu, jen rozsah hmotností je  $< 300$  amu.

- ◆ Kvadrupólový filtr (QMS)
- ◆ Sektorový analyzátor (SFMS), single a multicollector
- ◆ Průletový analyzátor (TOF-MS)
- ◆ Iontová past (IT-MS)

# Rozlišovací schopnost (resolving power)



$$R = \frac{M}{\Delta M}$$

$\Delta M$  se měří při 50%  
nebo 10% maximální  
intenzity píku

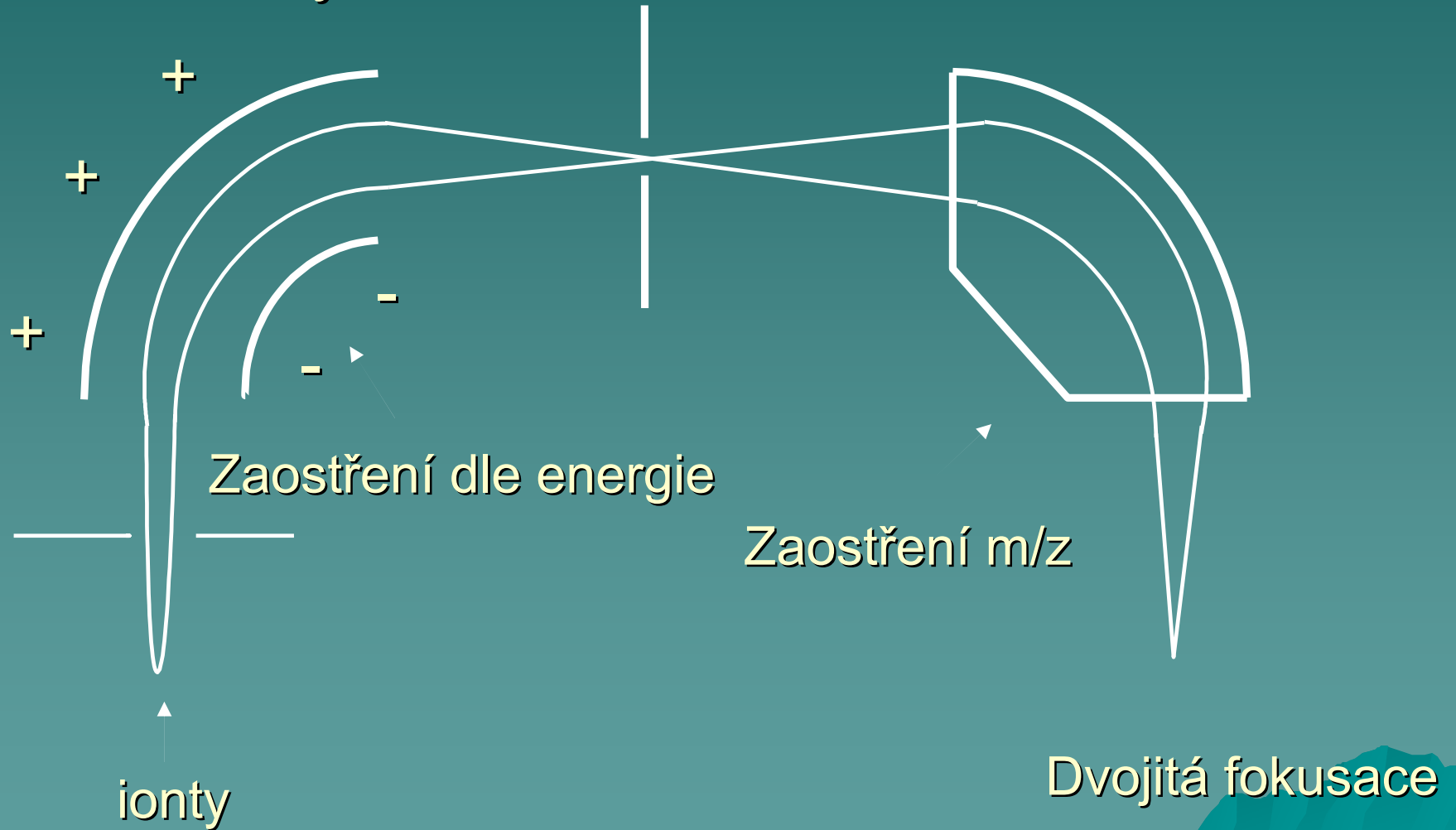
# Praktická rozlišovací schopnost

MS	Rozlišovací schopnost
QMS	0.3 $\mu\text{m}$
SFMS	300 - 20000
IT-MS	1400
TOF-MS	1600
HR QMS	9000
FT-ICR	$> 10^6$

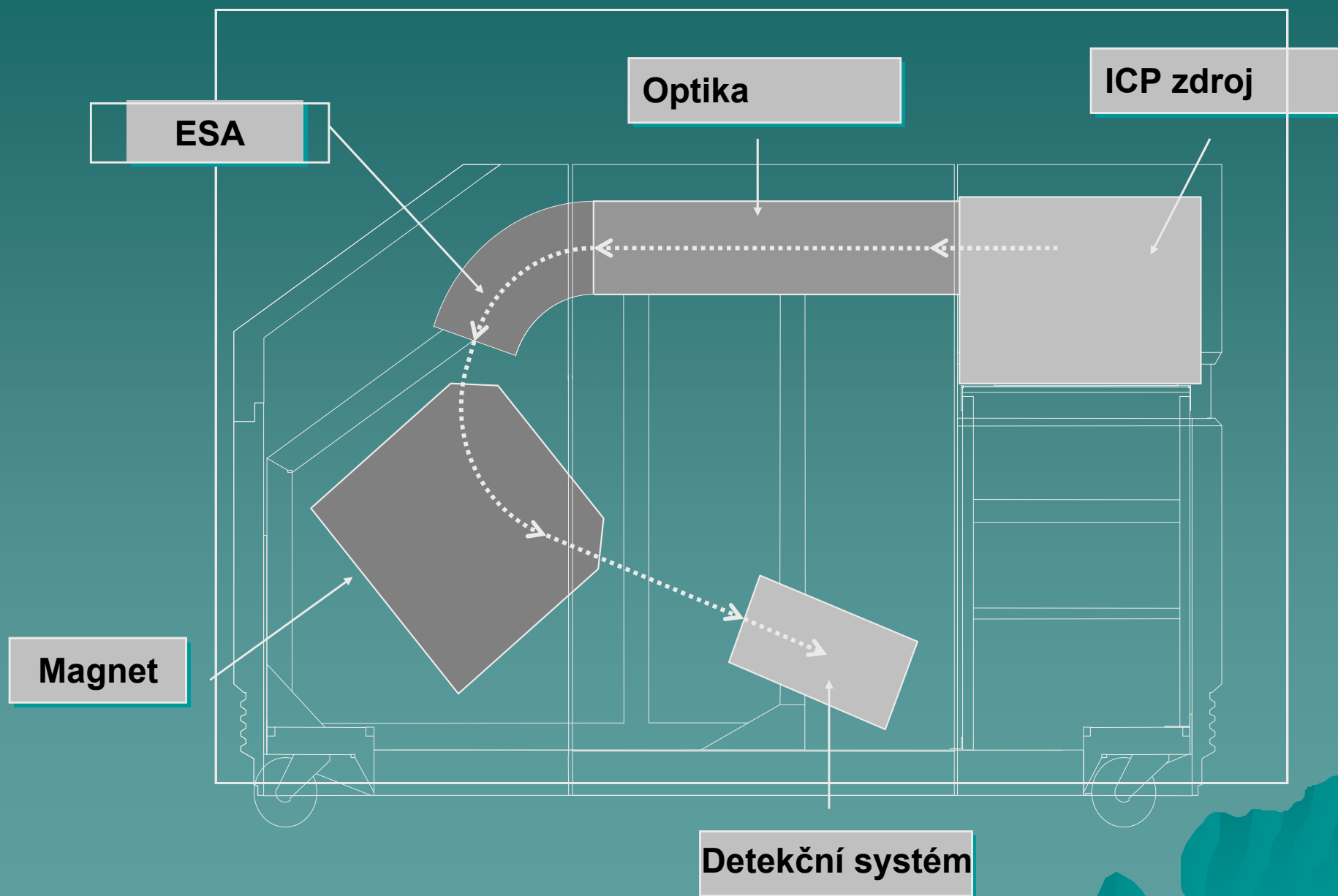
# Uspořádání Nier-Johnson

elektrostatický sektor

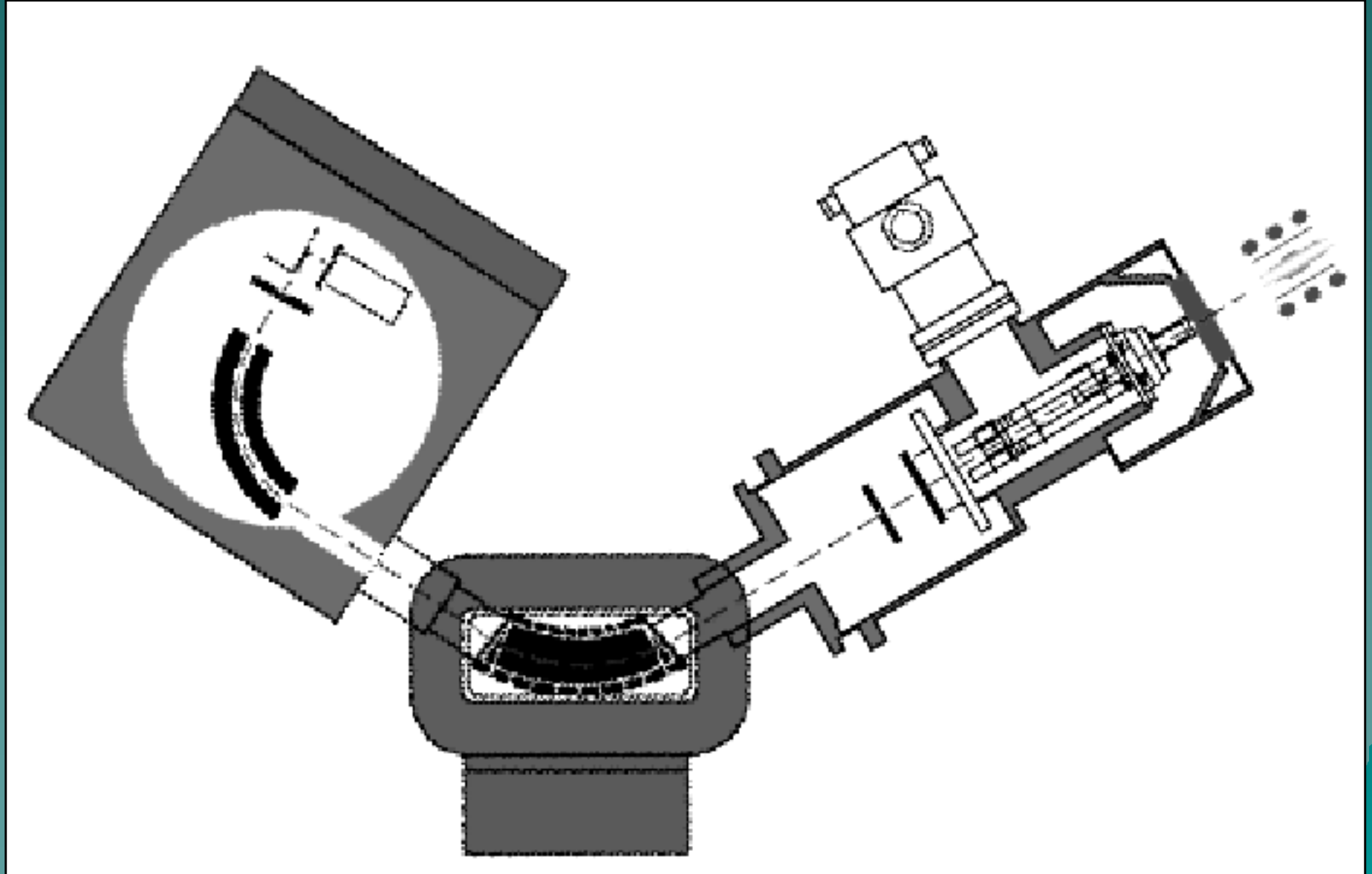
magnetický sektor



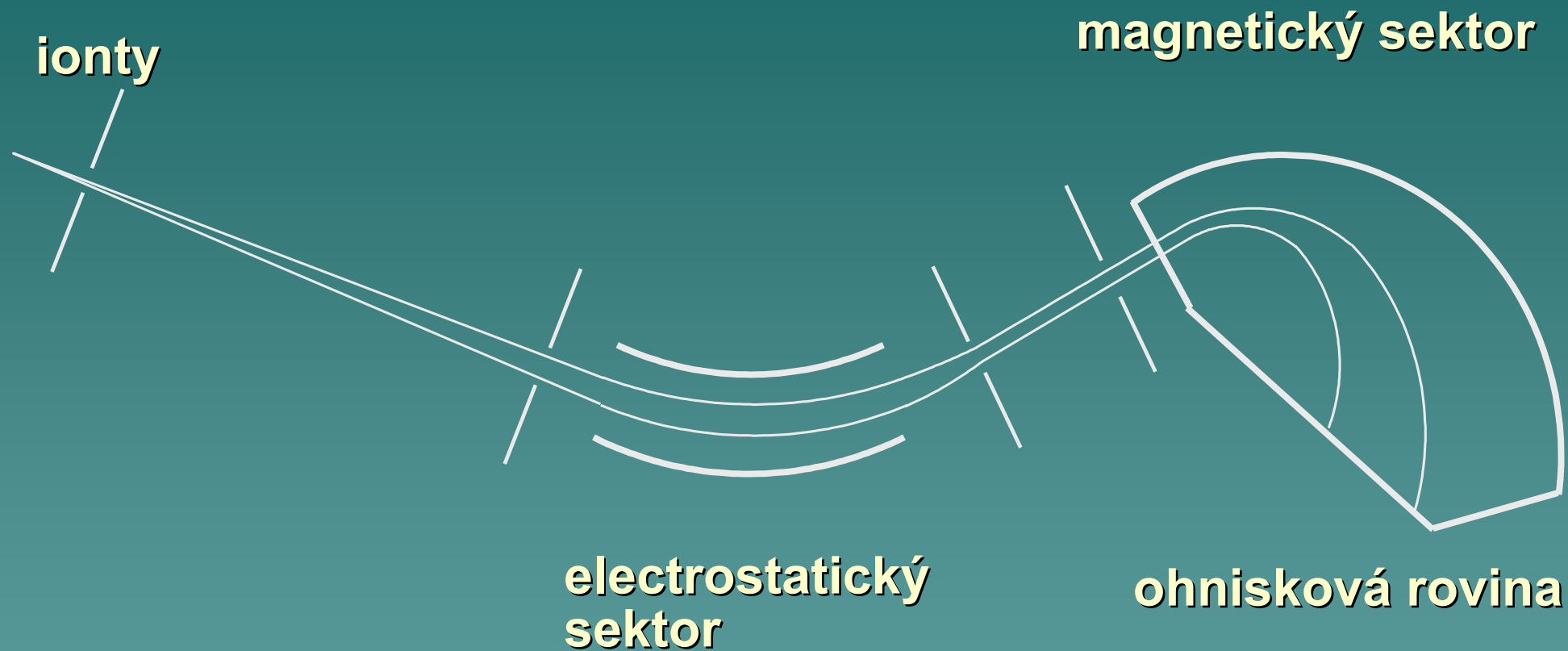
# HR Axiom ICP-MS: E + B



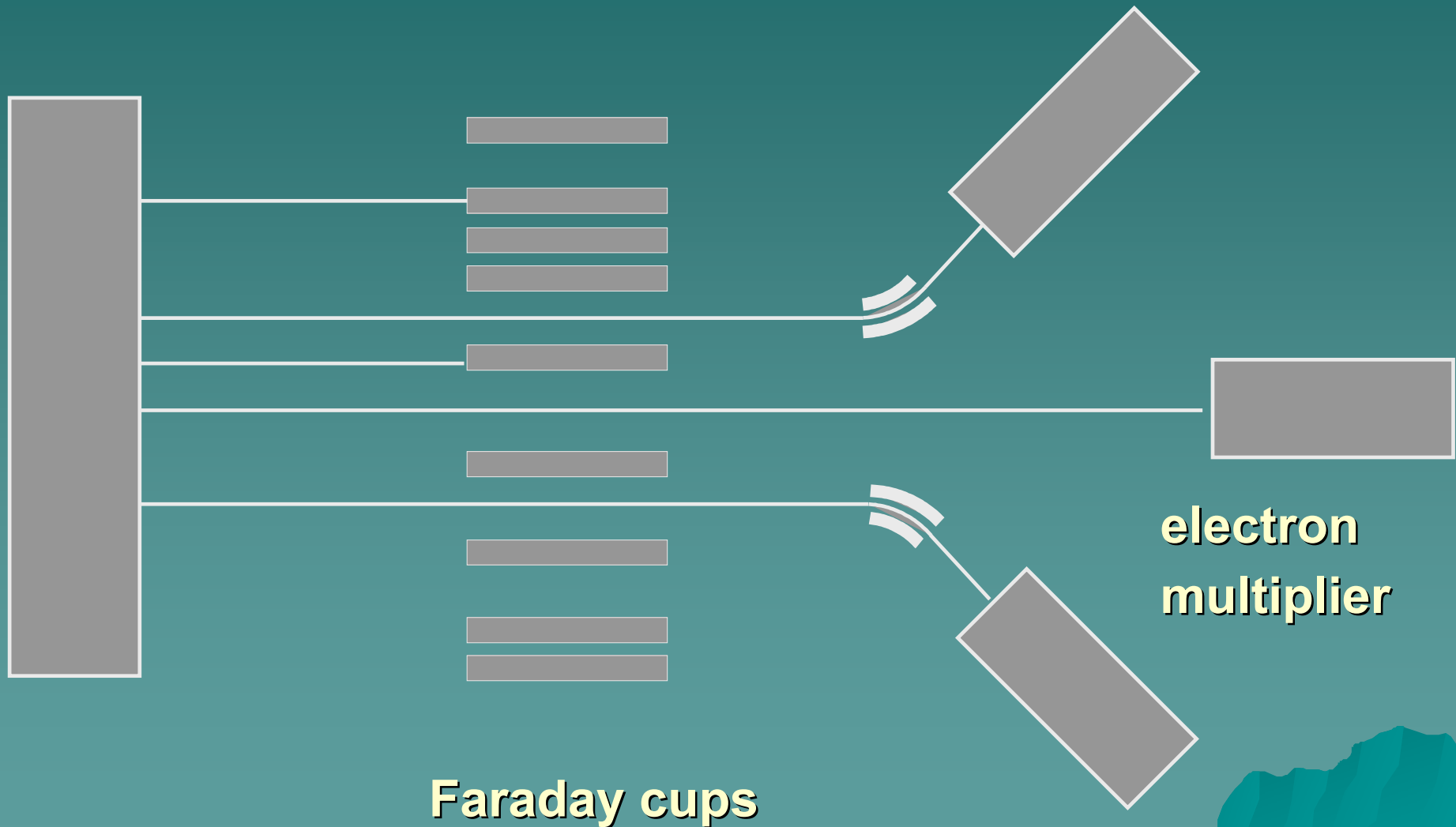
# Finnigan Element: B + E



# E+B uspořádání Mattauch-Herzog



# Multikolektor



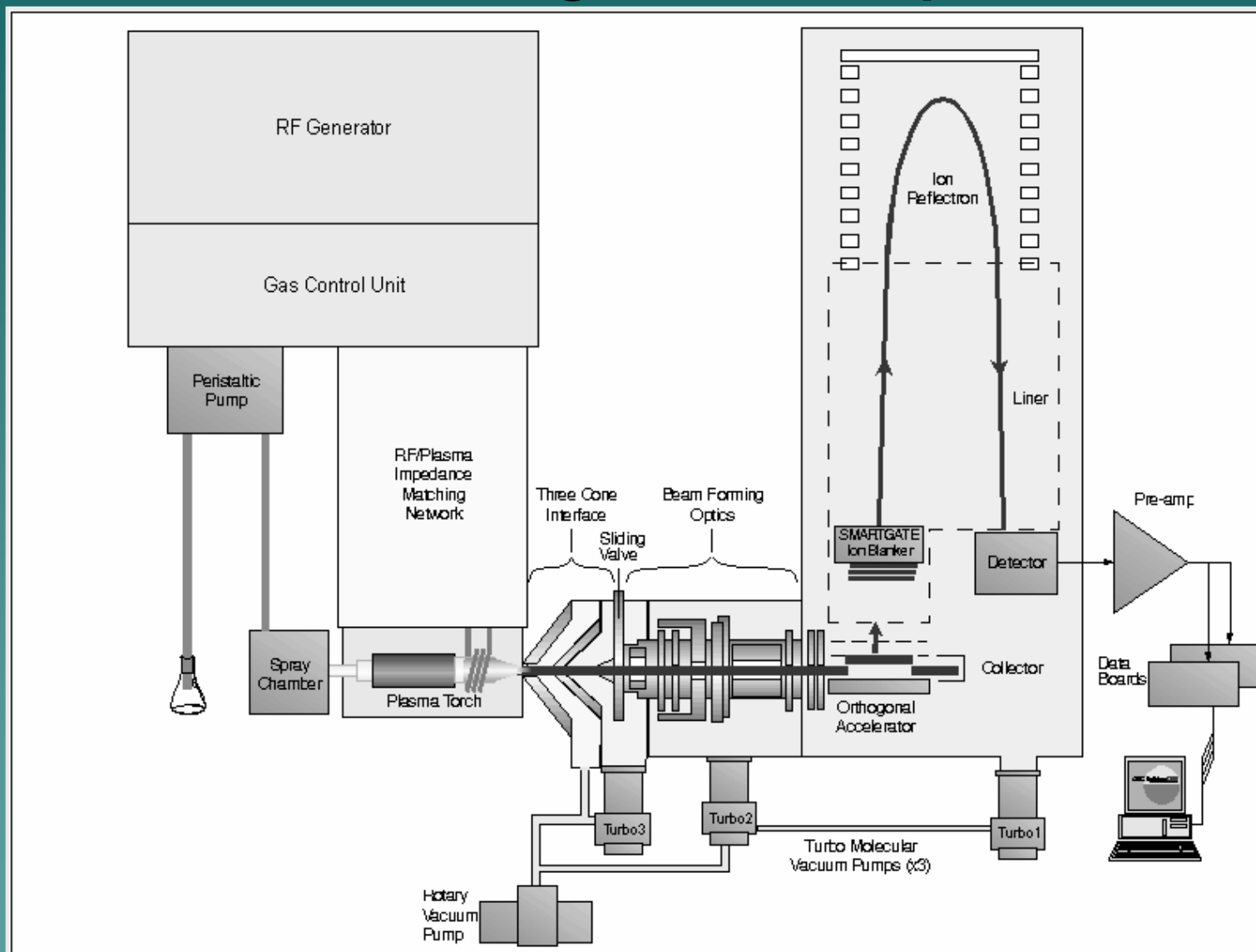
Faraday cups

electron multiplier



# ICP time-of-flight MS (GBC)

## Schema orthogonálního uspořádání



# Laserová ablace s ICP spektrometrií

# Laserová ablace – Laser Ablation

ICP-OES  
ICP-MS

Aerosol

Atomy, ionty,  
shluky, aerosol

Vypařování  
Atomizace  
Excitace  
Ionizace

Laserový paprsek

Mikroplasma

Absorpce záření  
v plazmatu

Emise hv

LM-OES, LIBS

Deponovaný  
materiál

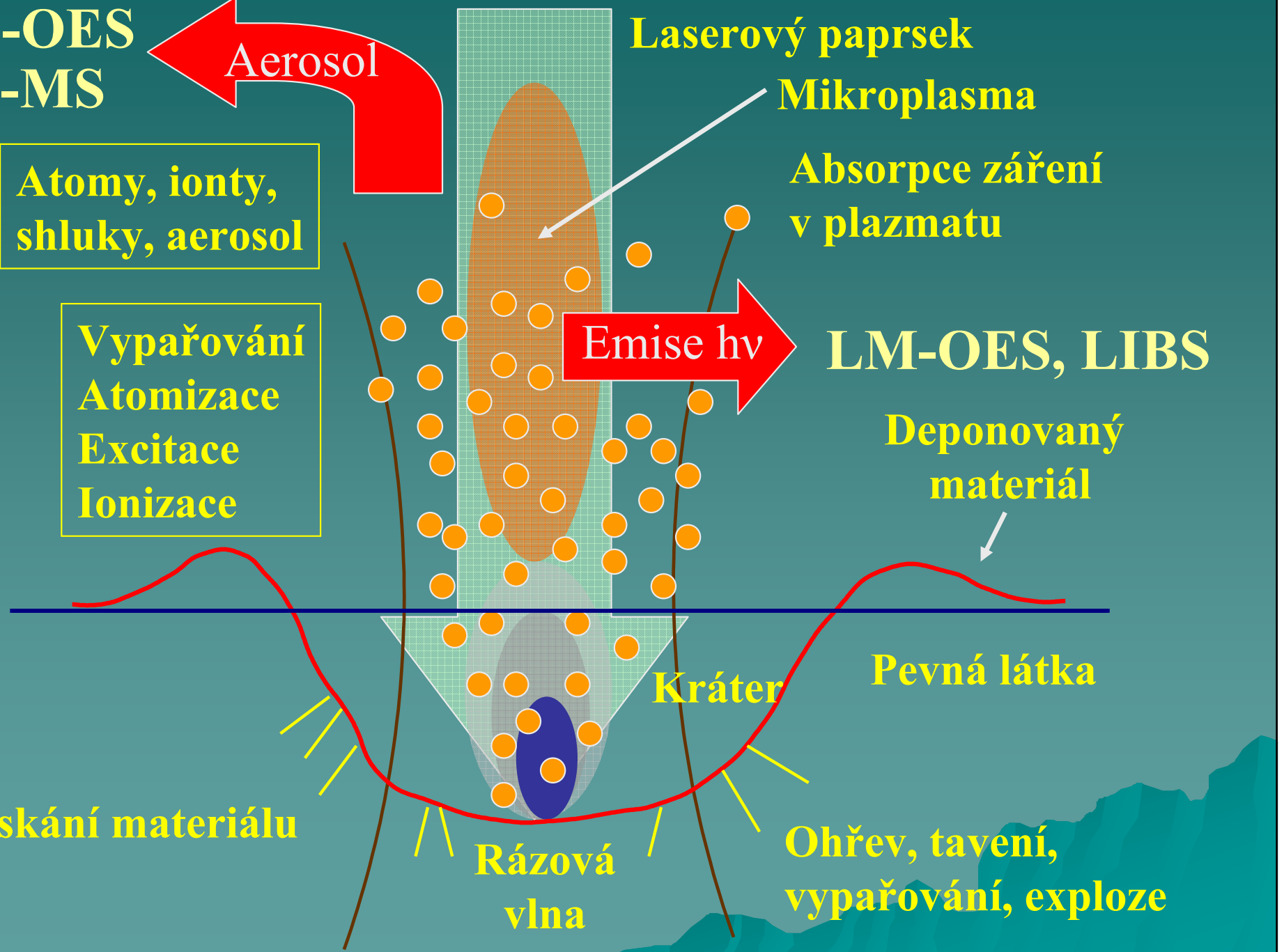
Kráter

Pevná látka

Praskání materiálu

Rázová  
vlna

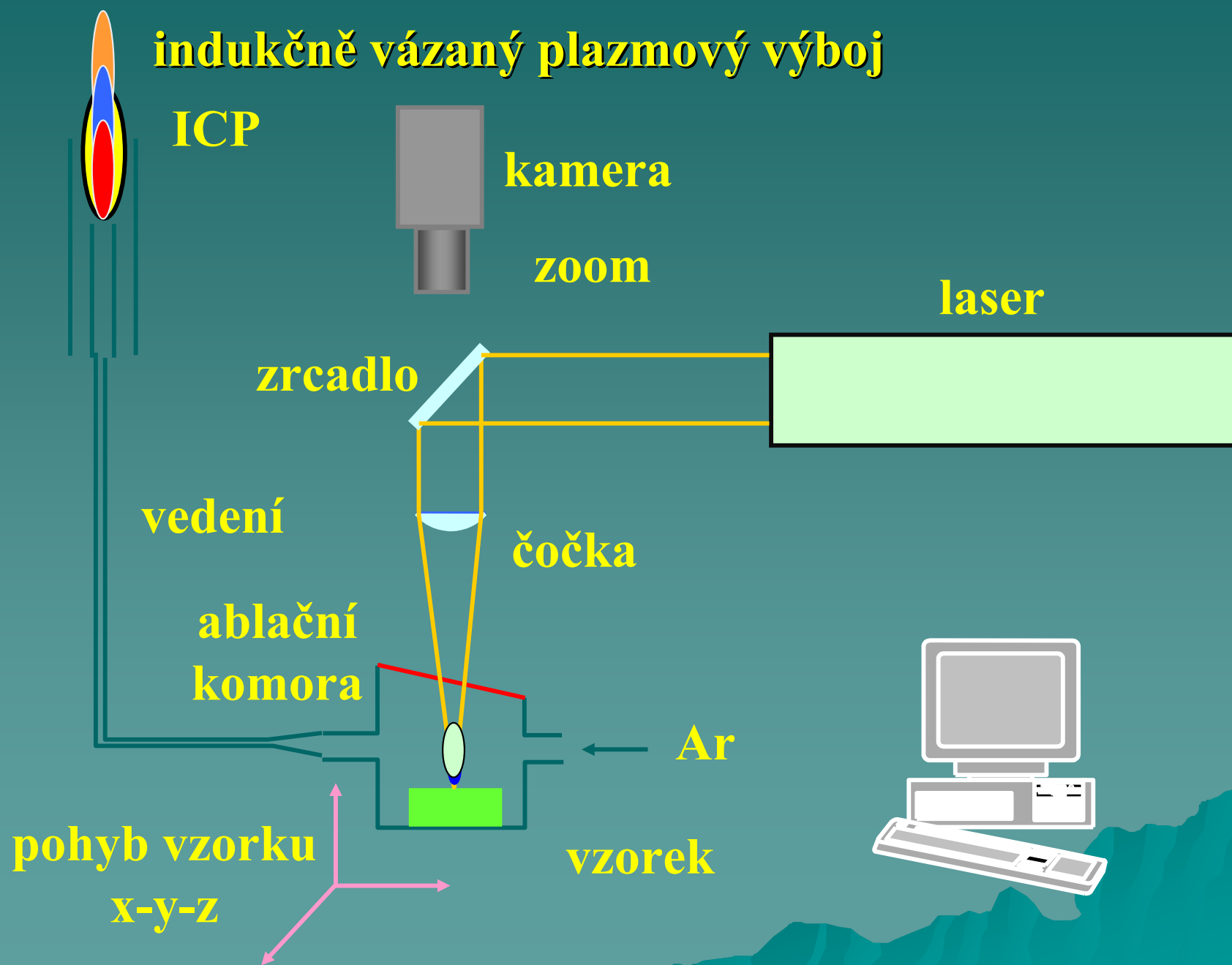
Ohřev, tavení,  
vypařování, exploze



# Spojení laserové ablace (LA) s technikami OES a MS

- Optická emisní spektrometrie v laserem indukovaném plazmatu LM-OES, LIPS, LIBS
- LA –ICP- OES, optická emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem a laserovou ablací
- LA-ICP-MS, hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem a laserovou ablací

# Instrumentace LA-ICP spektrometrie



# Priority spektroskopie s laserovou ablací

- 1) Analýza povrchů a povlaků: lokální analýza, mikroanalýza, plošné mapování (analýza mineralogických výbrusů, gelová elektroforéza)
- 2) Stanovení průměrného složení (bulk analysis)
  - ✓ Materiály elektricky vodivé i nevodivé
  - ✓ Kompaktní materiály (ocel, slitiny, sklo, keramika)
  - ✓ Práškové materiály (lisované tablety nebo vytavená skla, např. s Li-boraxem)
- 3) Pořizování hloubkových koncentračních profilů, analýza inkluzí v minerálech

# GeoLas (Microlas) ArF\* (Lambda Physik)



# GeoLas ablation system + ICP-QMS (PE Elan 6000 DRC)





# Spektrální interference v ICP-MS

# SPEKTRÁLNÍ INTERFERENCE

## Izobarické překryvy I

Interferent	analyt	korekce
$^{48}\text{Ca}^+$	$^{48}\text{Ti}^+$	$^{44}\text{Ca}^+$
$^{58}\text{Fe}^+$	$^{58}\text{Ni}^+$	$^{56}\text{Fe}^+$
$^{64}\text{Ni}^+$	$^{64}\text{Zn}^+$	$^{60}\text{Ni}^+$

## Izobarické překryvy II

- ◆ Prvky tvořící stabilní oxidy : Ca, Ti, Cr, Sr, Zr, Mo, Nb, Ba, Ce, La, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Dy, Tb, Er, Ho, Yb, Tm, Hf, Lu, Ta, W, Th, U.
- ◆ Prvky tvořící 2x nabité ionty : Ca, Sc, Ti, Sr, Y, Zr, Ba, La, Ce, Pr, Nd, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm, Yb, Lu, Th, U.

# Překryvy iontů oxidů

Izotop (%)	Interferent	Analyt
$^{46}\text{Ti}$ ( 7,99)	$^{46}\text{Ti} \ ^{16}\text{O}^+$	$^{62}\text{Ni}^+$
$^{47}\text{Ti}$ ( 7,32)	$^{47}\text{Ti} \ ^{16}\text{O}^+$	$^{63}\text{Cu}^+$
$^{48}\text{Ti}$ (73,98)	$^{48}\text{Ti} \ ^{16}\text{O}^+$	$^{64}\text{Zn}^+$
$^{49}\text{Ti}$ ( 5,46)	$^{49}\text{Ti} \ ^{16}\text{O}^+$	$^{65}\text{Cu}^+$
$^{50}\text{Ti}$ ( 5,25)	$^{50}\text{Ti} \ ^{16}\text{O}^+$	$^{66}\text{Zn}^+$

# Překryvy iontů oxidů, hydroxidů a iontů $X^{2+}$

Izotop		Interferent		Rušený izotop
m (Ba)	(%)	Ion	m/z	výskyt (%)
130	0,101	$Ba^{2+}$	65	$Cu^+$ (30,9)
138	71,66	$Ba^{2+}$	69	$Ga^+$ (60,2)
136	7,81	$Ba^{16}O^+$	152	$Sm^+$ (26,6)
137	11,32	$Ba^{16}O^+$	153	$Eu^+$ (52,2)
135	6,59	$Ba^{16}OH^+$	152	$Sm^+$ (26,6)
136	7,81	$Ba^{16}OH^+$	153	$Eu^+$ (52,2)

# Další polyatomické interference

- ◆ Ar: monomer a dimer, kombinace mezi izotopy 36, 38 a 40.
- ◆ voda: O, OH, kombinace s Ar
- ◆ vzduch: N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>H, N
- ◆ kyseliny, Cl, S, kombinace s Ar, O, H
- ◆ Další specie.

# Překryvy polyatomických iontů

Interference pozadí: argon, voda, kyseliny

Ion	(%)	H <sub>2</sub> O/5%HNO <sub>3</sub>	5% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5% HCl
<sup>28</sup> Si <sup>+</sup>	92,21	<sup>14</sup> N <sup>14</sup> N, <sup>12</sup> C <sup>16</sup> O <sup>+</sup>		
<u><sup>31</sup>P<sup>+</sup></u>	<u>100</u>	<u><sup>14</sup>N<sup>16</sup>OH<sup>+</sup></u>		
<sup>32</sup> S <sup>+</sup>	95,02	<sup>16</sup> O <sup>16</sup> O <sup>+</sup>		
<sup>35</sup> Cl <sup>+</sup>	75,77	<sup>16</sup> O <sup>18</sup> OH <sup>+</sup>	<sup>34</sup> SH <sup>+</sup>	
<sup>39</sup> K <sup>+</sup>	93,08	<sup>38</sup> ArH <sup>+</sup>		
<sup>40</sup> Ca <sup>+</sup>	96,97	<sup>40</sup> Ar <sup>+</sup>		
<u><sup>45</sup>Sc<sup>+</sup></u>	<u>100</u>	<u><sup>12</sup>C<sup>16</sup>O<sup>16</sup>OH<sup>+</sup></u>		
<sup>48</sup> Ti <sup>+</sup>	73,98		<sup>34</sup> S <sup>14</sup> N <sup>+</sup>	
<sup>51</sup> V <sup>+</sup>	99,76			<sup>35</sup> Cl <sup>16</sup> O <sup>+</sup>
				<sup>37</sup> Cl <sup>14</sup> N <sup>+</sup>
<sup>52</sup> Cr <sup>+</sup>	83,76	<sup>40</sup> Ar <sup>12</sup> C <sup>+</sup> , <sup>36</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	<sup>36</sup> S <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	<sup>35</sup> Cl <sup>16</sup> OH <sup>+</sup>
<u><sup>55</sup>Mn<sup>+</sup></u>	<u>100</u>	<u><sup>40</sup>Ar<sup>14</sup>NH<sup>+</sup></u>		
<sup>56</sup> Fe <sup>+</sup>	91,66	<sup>40</sup> Ar <sup>16</sup> O <sup>+</sup>		
<sup>64</sup> Zn <sup>+</sup>	48,89		<sup>32</sup> S <sup>16</sup> O <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	
<sup>69</sup> Ga <sup>+</sup>	60,16			<sup>37</sup> Cl <sup>16</sup> O <sup>16</sup> O <sup>+</sup>
<u><sup>75</sup>As<sup>+</sup></u>	<u>100</u>			<u><sup>40</sup>Ar<sup>35</sup>Cl<sup>+</sup></u>
<sup>79</sup> Br <sup>+</sup>	50,54	<sup>38</sup> Ar <sup>40</sup> ArH <sup>+</sup>		
<sup>80</sup> Se <sup>+</sup>	49,82	<sup>40</sup> Ar <sup>40</sup> Ar <sup>+</sup>	<sup>32</sup> S <sup>16</sup> O <sup>16</sup> O <sup>16</sup> O <sup>+</sup>	

# Isobarické interference - Ar

m/z	molekulové ionty	analyt
40	Ar	Ca
42	ArH <sub>2</sub>	Ca
52	ArC	Cr
54	ArN	Fe,Cr
55	ArNH	Mn
56	ArO	Fe
57	ArOH	Fe
75	ArCl	As
77	ArCl	Se
80	ArAr	Se
91	ArOCl	Zr
93	ArOCl	Nb

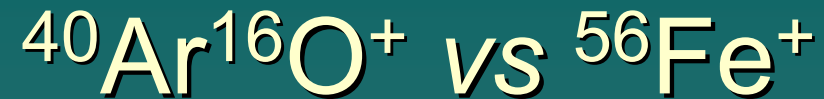


# Spektrální překryvy - Se

isotopy Se	zastoupení (%)	překryv
$^{74}\text{Se}$	0.89	$^{36}\text{Ar}^{38}\text{Ar}$
$^{76}\text{Se}$	9.36	$^{38}\text{Ar}^{38}\text{Ar}/^{36}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$
$^{77}\text{Se}$	7.63	$^{40}\text{Ar}^{37}\text{Cl}$
$^{78}\text{Se}$	23.78	$^{38}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$
$^{80}\text{Se}$	49.61	$^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}$
$^{82}\text{Se}$	8.73	$^{82}\text{Kr}/^{81}\text{Br}^1\text{H}$

# Potlačení spektrálních interferencí

- ◆ Použitím lepšího rozlišení
- ◆ Použitím « cold » podmínek v ICP pro snížení tvorby iontů s argonem.
- ◆ Použitím reakční/kolizní cely pro disociaci/odstranění rušících iontů



◆ Cold plasma:

Snížení tvorby  $\text{Ar}^+$  a tedy i  $\text{ArO}^+$

◆ High resolution:

Separace píků  $\text{ArO}^+$  and  $\text{Fe}^+$

◆ Reakce v plynné fázi/kolize v cele:



# Rozlišení polyatomických interferencí

Analyt	Interferent	Požadované rozlišení
$^{56}\text{Fe}^+$	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$	2500
$^{28}\text{Si}^+$	$^{14}\text{N}_2^+$	960
$^{32}\text{S}^+$	$^{16}\text{O}_2^+$	1800
$^{51}\text{V}^+$	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$	2570
$^{52}\text{Cr}^+$	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$	2370
$^{80}\text{Se}^+$	$^{40}\text{Ar}_2^+$	9640
$^{39}\text{K}^+$	$^{38}\text{Ar}^1\text{H}^+$	5700
$^{40}\text{Ca}^+$	$^{40}\text{Ar}^+$	199000
$^{75}\text{As}^+$	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$	8000

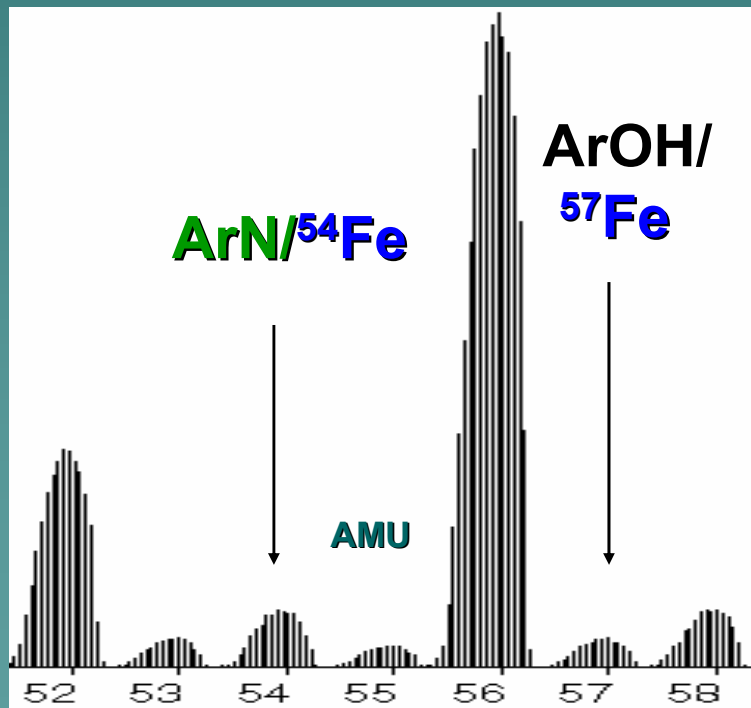
# Podmínky „studeného (cold, cool)“ ICP

- ◆ Nízký příkon, vysoký průtok nosného plynu.
- ◆ Vhodné pro roztoky s malým obsahem rozpuštěných látek.
- ◆ Eliminuje interference  $\text{Ar}^+$ ,  $\text{ArO}^+$ ,  $\text{ArH}^+$ ,  $\text{ArCl}^+$ ,  $\text{ArC}^+$ ,  $\text{C}_2^+$ .
- ◆ Zvyšuje úroveň  $\text{MO}^+$  z  $<1\%$  až na  $>20\%$ .
- ◆ Významné matrix efekty (nerobustní podmínky v ICP).

# Separace signálů analytu a interferentu

## Quadrupole ICP-MS

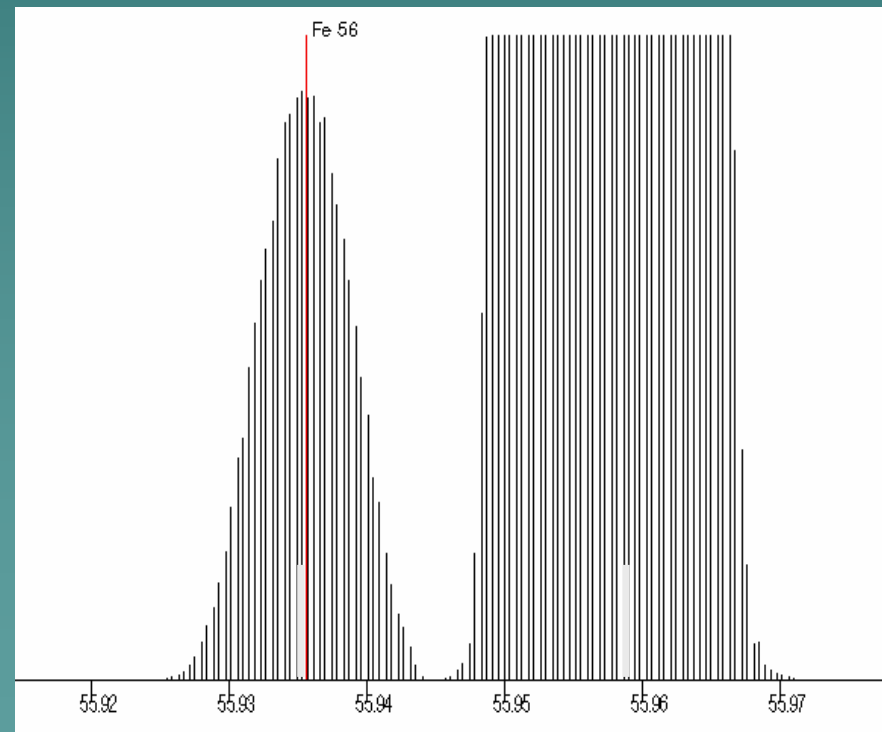
$^{56}\text{Fe}/\text{ArO}$



## High Resolution ICP-MS

$^{56}\text{Fe}$

**ArO**



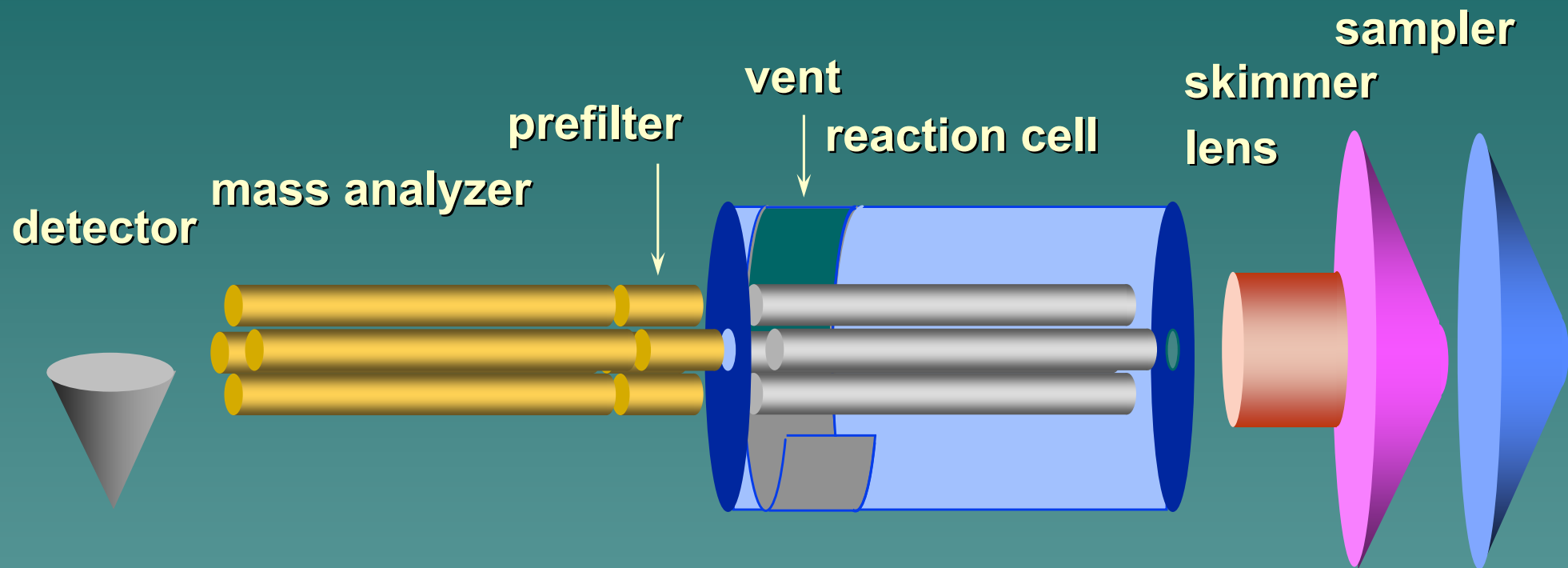
55,935

55,958

# Reakční/kolizní cely

- ◆ Reakce v rf-kvadrupólové cele (DRC, dynamic reaction cell, PE 6100),
- ◆ Kolize v rf-hexapólové cele (Micromass Platform, TJA ExCell).

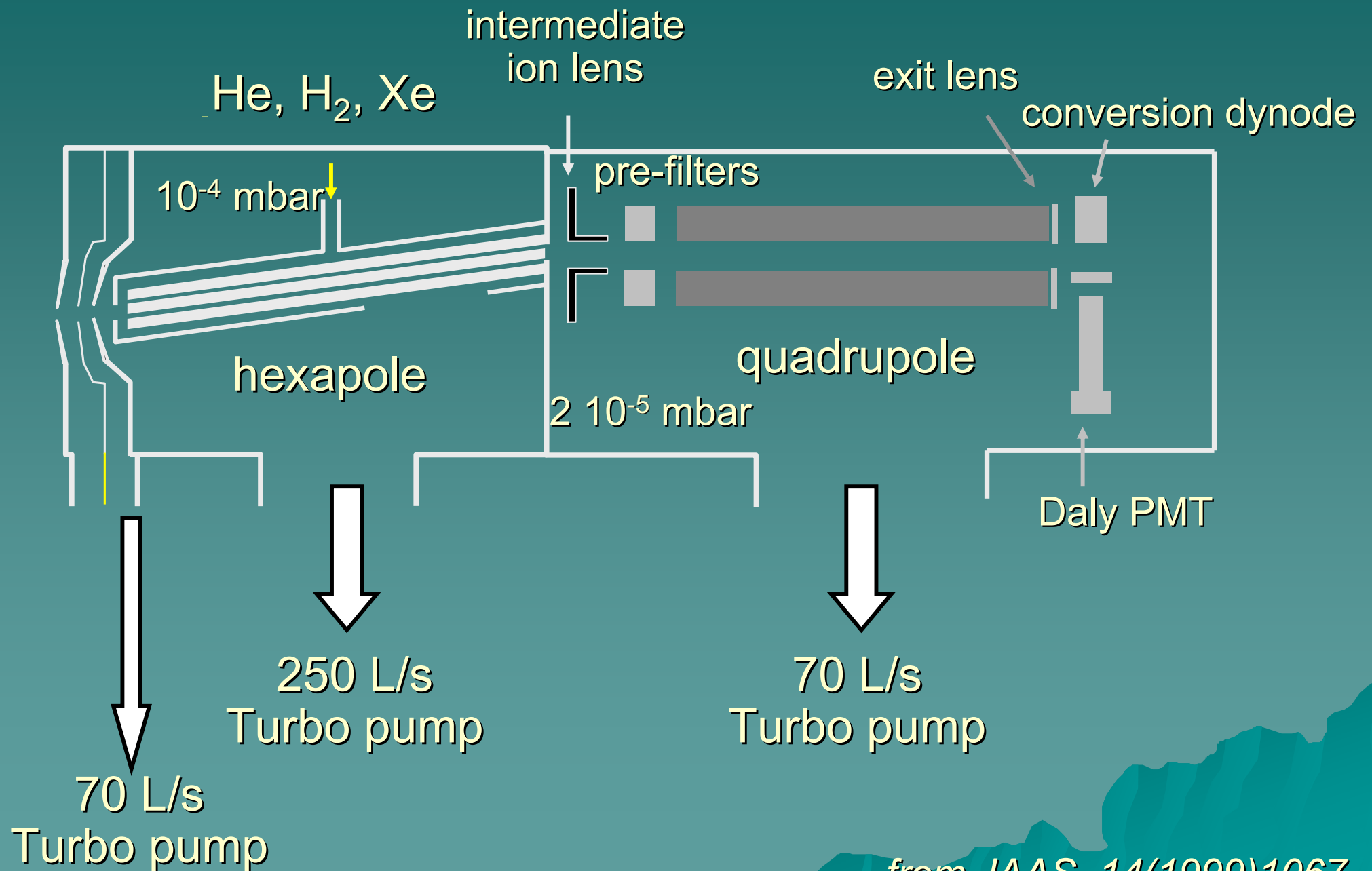
# ELAN 6100DRC



*Courtesy of S. Tanner*



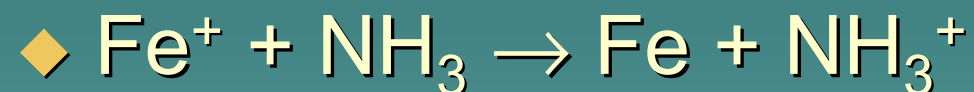
# Kolizní cela, Micromass Platform



# Selektivita reakcí $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ a $^{56}\text{Fe}^+$

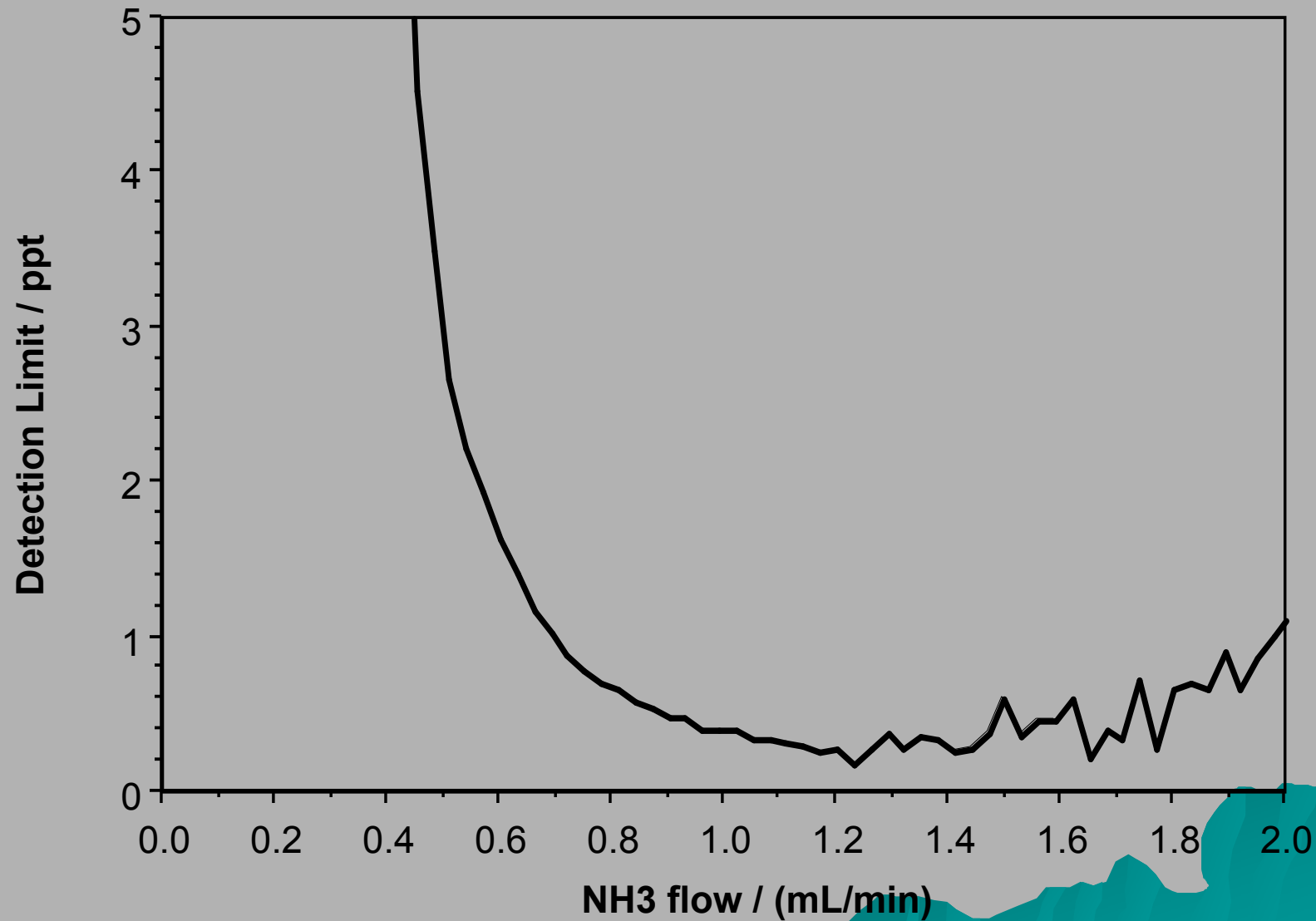


s rychlostní konstantou  $1.4 \times 10^{-9} \text{ cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$ .



s rychlostní konstantou  $0.91 \times 10^{-11} \text{ cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$ .

# Meze detekce pro $^{56}\text{Fe}^+$ jako funkce průtoku $\text{NH}_3$ v reakční cele (S. Tanner)



# „Molekulární“ informace o prvku a účinek

- Chemické, biologické a toxikologické vlastnosti prvku závisejí na formě, v níž se prvek vyskytuje  
⇒ dopad do mnoha oblastí
  - ✓ Hodnocení rizik v životním prostředí
  - ✓ Ekotoxikologie
  - ✓ Potravinářský průmysl
  - ✓ Hygiena a zdraví v pracovním prostředí
  - ✓ Klinická chemie a medicína
  - ✓ Průmyslová analýza

# 1. Hodnocení rizik v životním prostředí

- Monitorování složek životního prostředí (vzduch, voda, půdy, sedimenty, biota) z hlediska antropogenního znečištění toxickými speciemi:
  - ✓ Organoolovem z dříve používaného benzínu
  - ✓ Organocínem z nátěrů lodních trupů
  - ✓ Toxickými redoxními stavy iontů: Cr(VI), Sb(III)
  - ✓ produkty biomethylace kovů (Hg, As, Se)
- Studium biogeochemických procesů, mechanismů transportu a interakcí organických látek s ionty kovů pro účely řízení skládek odpadů a remediace půd

## 2. Ekotoxikologie

- Sledování esenciálních (Zn, Cu) a toxických (Cd, Hg, As) prvků a jejich specií, zejména metalothioneinů (proteiny 6-7 kDa s vysokým obsahem cysteinu schopné vázat kovy, odolné vůči tepelné koagulaci a srážení kyselinami)
- Methylace rtuti
- Tvorba arsenobetainu a arsenocukrů v mořské fauně

# 3. Potravinářský průmysl

- Kontaminace potravin Hg, Sn, Pb:
  - ✓ Ústřice a škeble: organocíničitými sloučeninami
  - ✓ Ryby: organicky vázanou rtuť
  - ✓ Vína: alkylolovem z provozu motorových vozidel
  - ✓ Legislativní opatření na základě speciace: ryby, měkkýši a víno jsou významné komodity.
- Arsen – v potravinách obsažen převážně ve formě netoxického arsenobetainu
- Arsen v aditivech v krmivech pro zvířata
- Organicky vázaný cín se uvolňuje z obalového materiálu PVC
- Biologická dostupnost Cu, Fe, Se z výživových zdrojů závisí na jejich speciaci

## 4. Hygiena a zdraví v pracovním prostředí

- Toxicita prvku závisí na jeho chemické formě
- Identifikace těkavých forem a vdechnutelných částic
- Příklad sledovaného parametru v průmyslové hygieně: Cr(VI) v prachových částicích při svařování oceli
- Studium kinetiky vylučování stopových prvků, jimž je organismus vystaven v pracovním prostředí, se děje prostřednictvím biomarkerů dané expozice (např. speciace As v moči)



# 5. Klinická chemie a medicína

- Metaloproteiny:  
regulace, ukládání, katalýza, transport:
  - ✓ Ferritin (Fe, Cu, Zn),  $\beta$ -amyláza (Cu), anhydráza kyseliny uhličitě (Cu, Zn), alkoholdehydrogenáza (Cd, Zn)
  - ✓ Oxidační stavy těchto prvků
- Esenciální prvky v mateřském mléce, v syntetické výživě
- Terapeutické preparáty:
  - ✓ Diagnostické zobrazování: Tc - merkaptoacetylglucin (ledviny, srdce, mozek, různé formy rakoviny)
  - ✓ Cytostatika: na bázi Pt, Au: cis-platina, auranofin
  - ✓ Antiarthritika: Au: aurothioglukóza
- Doplnky stravy: kontrola Co, Cr, Fe, Se, Zn
- Dialýza: Al, Cr nečistoty, vázané na malé molekuly

## 6. Průmyslová analýza

- Geometaloporfyriny obsahující Fe, V, Co a Ni, jejichž chování je při destilaci a rafinaci ropy podstatně odlišné od chování jednoduchých anorganických iontů těchto prvků, což zvyšuje riziko otravy katalyzátorů
- Analytická kontrola uvolňování organických sloučenin cínu, které se používají jako:
  - ✓ katalyzátory při výrobě farmak
  - ✓ stabilizátory při výrobě polymerů.

# Speciace Se $\mu$ RPC-ICP-MS

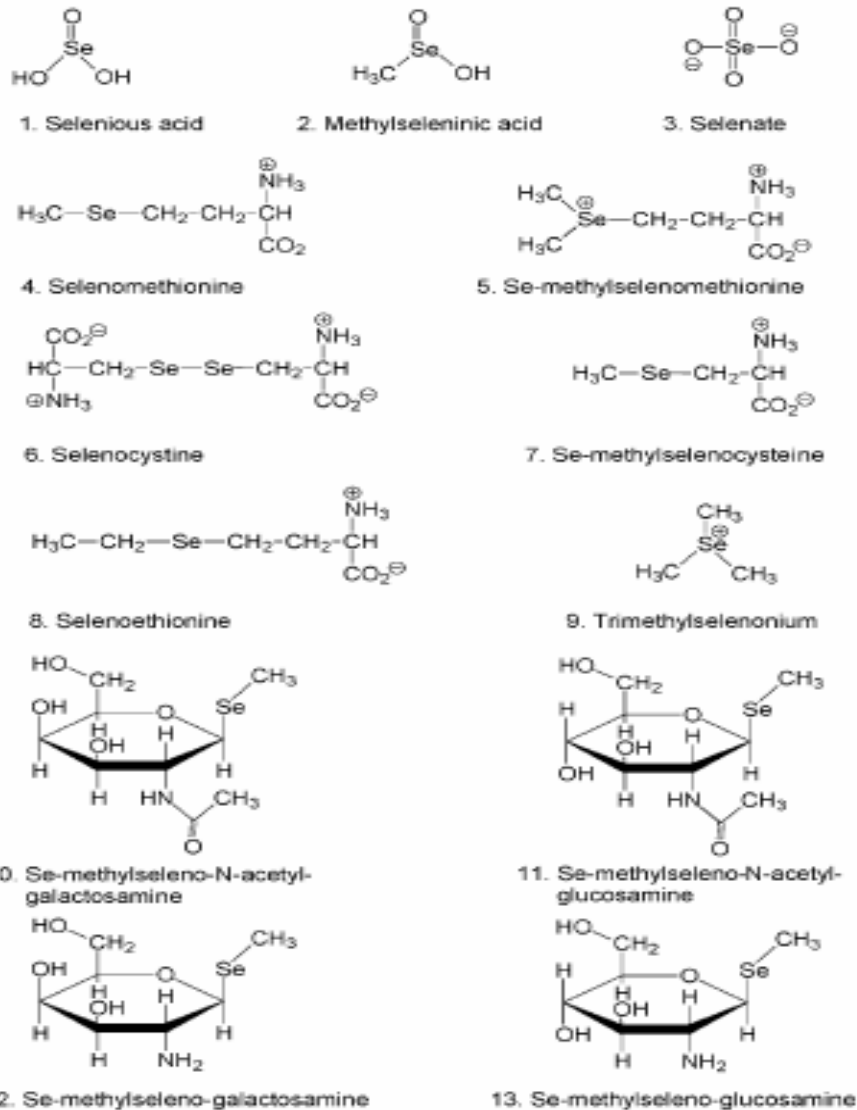


Fig. 2 Structures and names of the selenium standards used for characterization of the sample introduction systems.

- Standardy
- Kvantifikace lidského Se-proteinu P
- Analýza Se-obožených kvasnic

HPLC, kolona C18, C4,  
gradientová eluce 0,67 %HNO<sub>3</sub>  
+ MeOH (10-90%), 0,1 %TFA,  
eluent 50 $\mu$ L/min

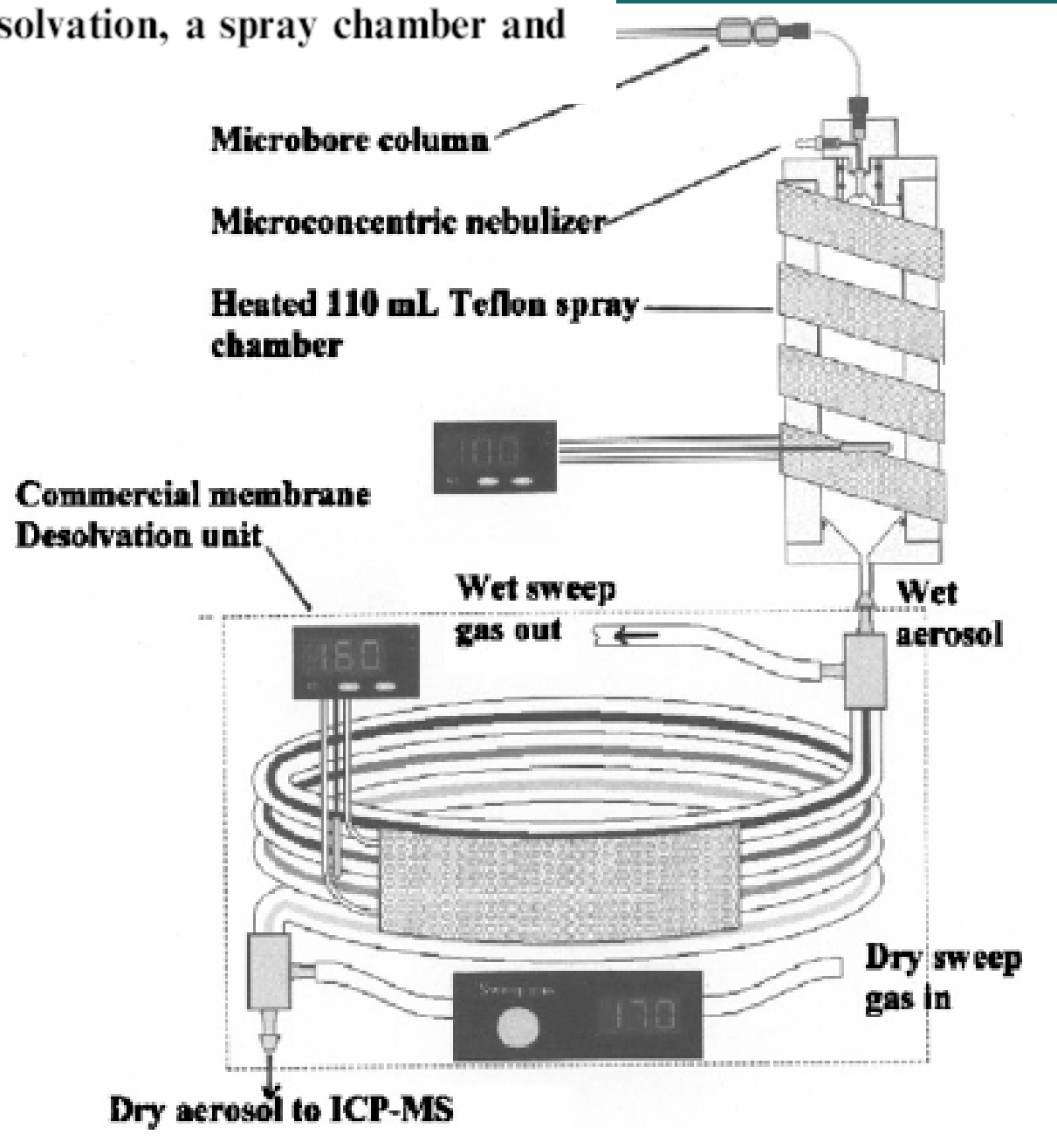
- Mikrokonc. zmlžovač (MCN)s  
desolavací na membráně (MD)

L. Bendahl and B.  
Gammelgaard J. Anal. At.  
Spectrom., 2005, 20,  
410–416

**Sample introduction systems for reversed phase LC-ICP-MS of selenium using large amounts of methanol—comparison of systems based on membrane desolvation, a spray chamber and direct injection**

The MCN-MD system was applied for  $\mu$ RPC analysis of  $^{77}\text{Se}$  enriched yeast samples and more than 30 Se compounds were separated using a linear gradient from 5% to 95% methanol, some of the Se species eluting in 85% methanol.

L. Bendahl and B. Gammelgaard  
*J. Anal. At. Spectrom.*, 2005, 20, 410–416



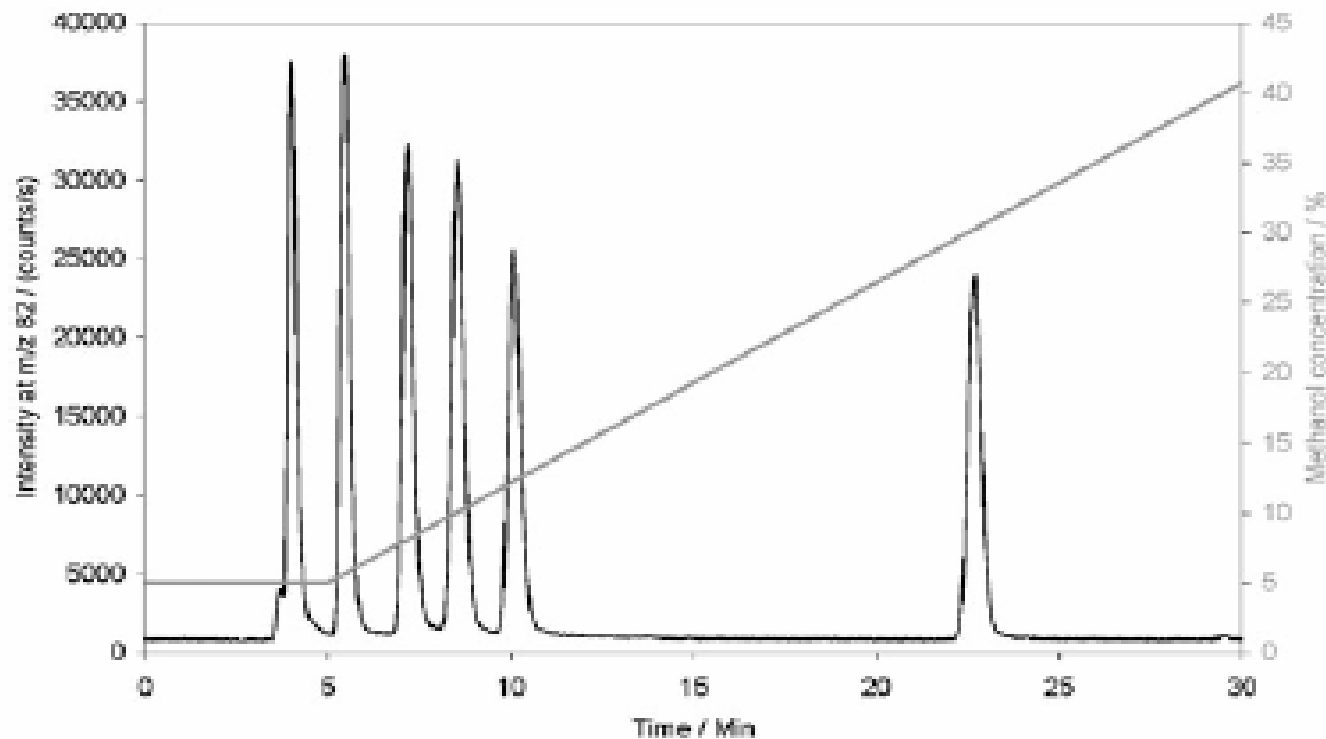
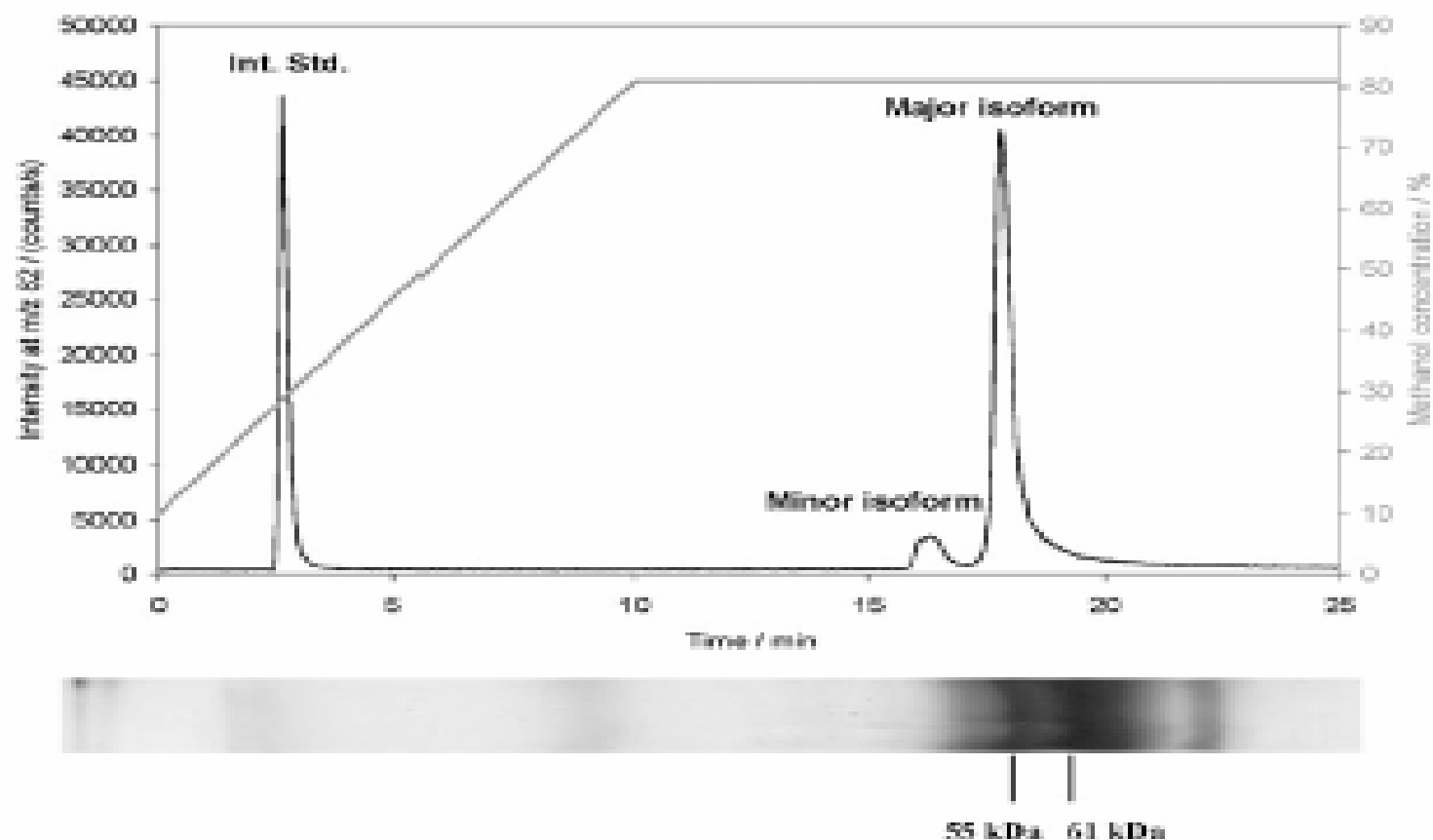


Fig. 5 Chromatogram from gradient reversed phase chromatography of six  $100 \mu\text{g Se L}^{-1}$  selenium standards using the MCN-MD system. Elution order: selenocystine, Se-methylselenocysteine, Se-methylseleno-*N*-acetylgalactosamine, Se-methylseleno-*N*-acetylglucosamine, selenomethionine and selenoethionine. The grey line represents the applied methanol gradient. Experimental conditions are shown in Table 2.



**Fig. 6** Chromatogram from gradient reversed phase chromatography of  $100 \mu\text{g Se L}^{-1}$  human selenoprotein P with added  $50 \mu\text{g Se L}^{-1}$  TMSe as an internal standard using the MCN-MD system (black line). The grey line represents the applied methanol gradient. Experimental conditions are shown in Table 2. A lane from an SDS-PAGE analysis of the selenoprotein P fraction is shown below the chromatogram.

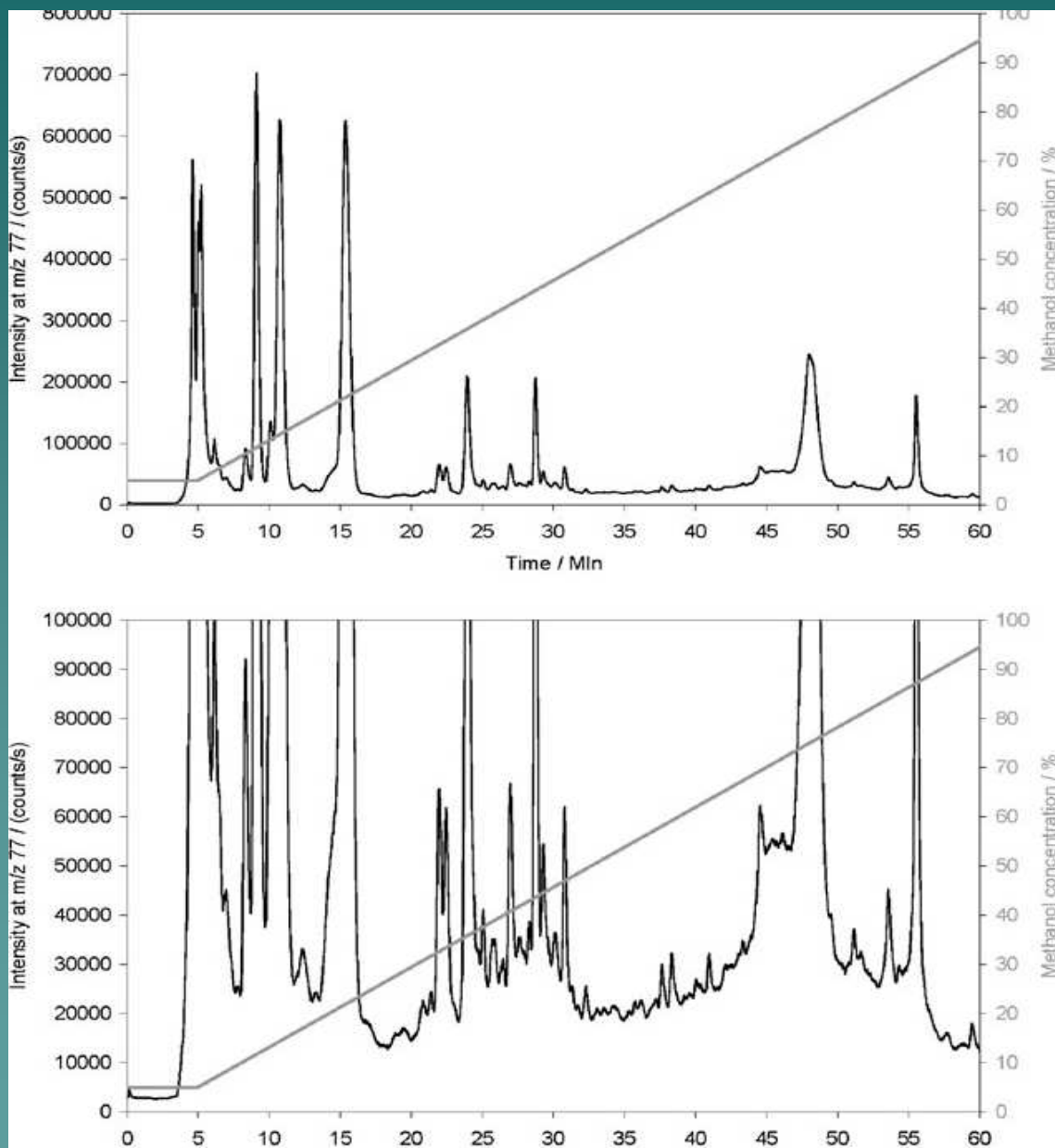


Fig. 7 Chromatograms from gradient reversed phase chromatography of the water soluble fraction of  $^{77}\text{Se}$  enriched yeast using the MCNMD system (black lines). The grey lines represent the applied methanol gradient. Experimental conditions are shown in Table 2. Lower chromatogram is an eight times expansion of the upper one.

L. Bendahl and B. Gammelgaard J. Anal. At. Spectrom., 2005, 20, 410-416

# SEC-ICP-MS

Study of mercury–selenium interaction in  
chicken liver by size exclusion  
chromatography inductively coupled  
plasma mass spectrometry

Ana I. Cabanero, Yolanda Madrid and Carmen Camara\*

J. Anal. At. Spectrom., 2005, 20, 847–855



# SEC-ICP-MS

In order to estimate metal distribution patterns in biomolecules of different sizes and their possible ligands were evaluated. For this purpose 72 chickens were fed under different controlled conditions. Chickens were exposed to Hg(II) and MeHg added to feed with or without selenium supplementation. Size-exclusion chromatography with ICP-MS detection was developed for multielemental (S, P, Cu, Zn, Se, Mn, Fe and Hg) speciation in chicken liver cytosol and optimisation of the separation parameters (25 mM Tris-HCl buffer, 50 mM KCl, pH 6.8, 1 ml min<sup>-1</sup>) was carried out. The liver extracts were injected into the column four times each and the variation between the runs was small (RSD < 10%). The recovery of the chromatographic step varied between 82–102%, indicating some interaction between the liver extracts and the column material. S, Cu, Zn, Fe, Se and Hg appeared mainly associated to high and medium-molecular weight species (4300–45 kDa), whereas Mn is mainly associated to high (116 kDa) and low (0.03 kDa) molecular weight species and P is mainly associated to low molecular weight species (5.5 kDa). Changes in the subcellular distribution and distribution patterns caused by long-term Hg–Se administration have been discussed.

# SEC-ICP-MS

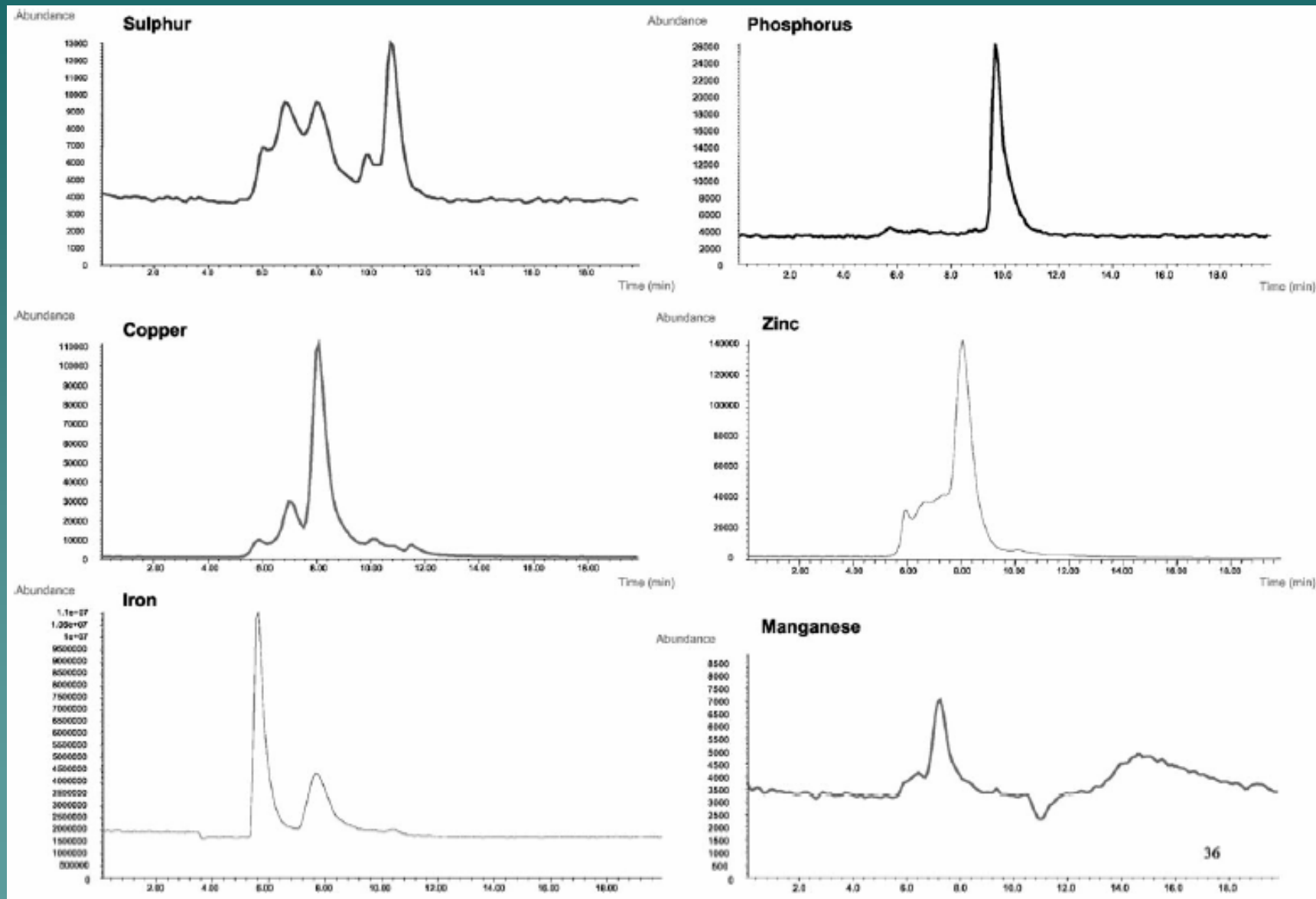


Fig. 2 Chromatograms obtained by SEC (300–1 kDa)-ICP-MS for chicken liver extract.

Děkuji Vám za pozornost

# Speciace a frakcionace

- ◆ Speciace všech forem prvku vyžaduje poměrně náročné vybavení separačními technikami.
- ◆ Frakcionace : rozdělení vzorku do několika frakcí – skupin, ve kterých se vyskytují formy s podobnými chemickými či fyzikálními vlastnostmi ⇒ jednodušší instrumentace
- ◆ V každé z frakcí se stanoví celkový obsah prvku některou z metod, například atomové spektrometrie (AAS, ICP-OES, ICP-MS).

# Speciace a frakcionace

- ◆ Pro vývoj frakcionačního schématu je však třeba mít informace o formách prvku, které se ve vzorku nacházejí, aby bylo možno podle vlastností těchto forem zvolit vhodné kroky frakcionace.
- ◆ Frakcionace
  - mezistupeň mezi stanovením celkového obsahu prvku ve vzorku a speciální analýzou
  - vodítko při volbě vhodného přístupu k přípravě vzorku pro speciaci.