

E2221 Environmentální analytická chemie – cvičení

Kontakt: Jan Kuta (RECETOX PŘF MU) jan.kuta@recetox.muni.cz

Stanovení esenciálních a toxických prvků ve vlasech metodou ICP-MS

I. Teoretický úvod

Lidé a obecně živočichové potřebují ke správné funkci těla kromě kyslíku, vody, bílkovin, vitamínů apod. také dostatečný přísun stopových prvků. Řada esenciálních prvků (např. Fe, Zn, Cu) je klíčovou součástí metaloenzymů nebo jsou spojené s rozhodujícími biologickými funkcemi, jako transport kyslíku nebo hormonální aktivita. Na druhé straně v prostředí existuje mnoho prvků, které nejsou pro lidský organismus esenciální a při určité expozici mohou vykazovat toxické účinky (např. Pb, Cd, Hg, As). Sledováním hladin toxických a esenciálních prvků v populacích ve vztahu k lidskému zdraví se zabývá vědní disciplína zvaná humánní biomonitoring. V rámci humánního biomonitoringu se stanovují v populacích koncentrace tzv. biomarkerů (např. Cd v moči, Zn v krevním séru, Hg ve vlasech). Volba vhodného biomarkeru je vždy odvislá od rychlosti a způsobu metabolismu různých forem (specií) daného prvku (tzv. toxodynamika a toxokinetika). Ideálním biomarkerem by byl obsah prvku v cílovém orgánu. Nicméně to by znamenalo biopsii orgánů, jako jsou játra, ledviny či mozek, což je z etického i praktického hlediska neproveditelné. V praxi se pro posouzení expozice toxickým prvkům či nedostatku esenciálních prvků využívá analýzy vzorků plné krve, krevní plasmy/séra a moči. Dále se studují možnosti využití alternativních biomarkerů/matric. Takovým typem matrice by mohli být vzorky vlasů, které lze snadno a neinvazivně odebrat. Odběr je levný, vzorek snadno uskladnitelný a transportovatelný do laboratoře k analýze. Zajímavá je i možnost analyzovat vzorky po částech a tím rekonstruovat expozici daného jedince v čase zpět (rychlost růstu vlasů je přibližně 1 – 1,25 cm za měsíc). Tyto vlastnosti dělají vlasy atraktivním materiálem pro biomonitoring, nicméně použití vlasů v rutinním biomonitoringu má prozatím své limitace a to např. nejasný vztah mezi expozicí a obsahem prvků ve vlasech a neexistence referenčních mezí pro většinu prvků.

Z analytického hlediska se pro analýzu vlasů využívá především metod atomové spektrometrie, a to konkrétně atomové absorpční spektrometrie s atomizací prvků v plameni (FAAS) či elektricky vyhřívané kyvetě (ETAAS), optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Všechny tyto techniky vyžadují převedení vzorků do roztoku (mineralizaci vzorků). Vlasy je tedy potřeba před analýzou rozložit v prostředí silných kyselin a oxidačních činidel. Mineralizace může být dle povahy analytů (těkavost, riziko kontaminace z vnějšího prostředí) provedena v otevřeném systému (např. v kádince na plotně) či lépe v uzavřeném systému (autoklávy, mikrovlnná rozkladná zařízení).

II. Stanovení obsahu Zn a Cd ve vlasech metodou ICP-MS

1. Úvod

Pro úlohu byly vybrány 2 prvky, které reprezentují jak esenciální (Zn), tak i toxické prvky (Cd). Vzorek vlasů jako matrice byl vybrán z důvodu snadného odběru, manipulace a také pro svou potenciální neinfekčnost. Pracovat byste měli se svým vzorkem vlasů. Pokud z jakéhokoliv důvodu nechcete či nemůžete vzorek poskytnout, poskytnete Vám ho vedoucí cvičení.

Vzorek vlasů před vlastním stanovením je třeba zbavit exogenní kontaminace (proplach vzorku) a převést do roztoku. Vzorek se rozkládá v mikrovlnném rozkladném zařízení za použití koncentrované kyseliny dusičné a peroxidu vodíku. Prvky v roztoku se stanoví hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS).

2. Chemikálie, pomůcky a přístroje

- Aceton, p.a.
- Demineralizovaná vysoce čistá voda (vodivost 0,054 $\mu\text{S}/\text{cm}$)
- Kyselina dusičná konc., p.a.
- Peroxid vodíku konc., p. a.
- Kalibrační standardy Astasol o koncentraci Zn a Cd 1 g/L
- Roztok porovnávacích prvků (Ge, Rh) o koncentraci 100 mg/L
- Odměrné baňky o objemu 25ml
- PE zkumavky o objemu 15 ml
- Nůžky a filtrační papír
- Automatické pipety s nastavitelným objemem v rozsahu 0,01 – 5 ml
- Mikrovlnné rozkladné zařízení MARS-6 vč. PFA rozkladných nádobek o objemu 20 ml
- Hmotnostní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem Agilent 7700x ICP-MS

3. Postup pro odběr a promývání vzorků vlasů

Úzký svazek vlasů se odebere nůžkami z temenní části hlavy, pokud možno co nejbližší kůži. K odstranění exogenní kontaminace a prachu z povrchu vlasů se použije jako promývací medium aceton a demineralizovaná voda v pořadí aceton, demineralizovaná voda, aceton. V každém rozpouštědle se nechají vlasy louhovat 5 minut za občasného promíchání. Následně se nechají vlasy vysušit na filtračním papíře za laboratorní teploty mimo dosah veškerých chemikálií (mimo pracovní plochu v digestoři).

4. Postup pro rozklad vzorků vlasů

Vzorek se rozloží v prostředí kyseliny dusičné a peroxidu vodíku při teplotě 180 °C pomocí mikrovlnného rozkladného zařízení MARS-6 v uzavřených nádobkách z PFA (chemicky rezistentní fluoropolymer). Ohřev vzorku je zabezpečen pomocí mikrovln a teplota v nádobkách je kontrolována infračervenými čidly. Nádobky jsou uzavřeny PTFE inserty a PFA víčky, které umožňují pracovat se vzorky za vysokých tlaků a tím i teplot. Při rozkladu dochází k oxidaci organické hmoty až na oxid uhličitý, případně jiné vodou rozpustné organické sloučeniny. Vysoká teplota urychluje rozklad organické matrice.

Postup pro rozklad vzorků je následující:

- Vzorek umytých a vysušených vlasů vložíme do 20 ml PFA nádobky a zvážíme
- Přidáme 2 ml kyseliny dusičné a 1 ml peroxidu vodíku
- Nádobku uzavřeme PTFE insertem a přišroubujeme PFA víčko. Stejným způsobem připravíme i tzv. slepé pokusy/blanky (nádobky s kyselinou a peroxidem, ale bez vzorku vlasů)
- Sešroubované nádobky umístíme do karuselu mineralizačního zařízení a spustíme mineralizační program
- Po skončení programu nádobky vyjmeme, rozšroubujeme a mineralizát kvantitativně převedeme pomocí deionizované vody do 25 ml odměrných baněk

5. Stanovení kovů metodou ICP-MS

5.1 Úvod do ICP-MS

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) je moderní metoda prvkové analýzy s uplatněním v různých oblastech analytické chemie. V klasickém uspořádání se přístroj skládá ze zmlžovacího systému, iontového zdroje, kónusů, iontové optiky, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Jedinečný je především způsob ionizace analytů, který je pro oblast hmotnostní spektrometrie velmi netypický. Indukčně vázané plazma (ICP) je velmi silný ionizační zdroj, kde dochází k rozrušení všech původních vazeb ve vzorku a tím i ztrátě informací o struktuře sloučenin. Zdrojem iontů v ICP-MS je argonové plazma o teplotě 6000 - 10000 °C, které je udržováno pomocí střídavého vysokofrekvenčního magnetického pole tzv. indukční vazbou.

Zjednodušeně lze princip stanovení popsat následujícím způsobem. Kapalný vzorek je čerpán peristaltickým čerpadlem ke zmlžovači, který z kapalného vzorku vytváří aerosol. Aerosol dále prochází skrz mlžnou komoru, kde dochází k odstranění větších částic (aerosol by měl obsahovat maximum částic s velikostí pod 1 μm). Aerosol následně vstupuje do indukčně vázaného plazmatu (ICP), kde velmi rychle dochází k odpaření vody, atomizaci molekul a ionizaci atomů především do stavu M^+ . Ionty z ICP procházejí přes 2-3 vzorkovací kónusy do vakuové oblasti hmotnostního spektrometru a pomocí iontové optiky jsou vedeny do hmotnostního analyzátoru. V hmotnostním analyzátoru (obvykle jednoduchý kvadrupól) jsou jednotlivé ionty rozděleny dle poměru hmotnost/náboj (m/z) a detekovány elektronásobičem.

Z hlediska analytických vlastností se ICP-MS vyznačuje především možností stanovení naprostě většiny prvků periodické tabulky a to včetně i pro atomovou spektrometrii netypických prvků, jako jsou halogeny (vyjma fluoru), sira či fosfor. Další důležitou vlastností je možnost stanovení více prvků vedle sebe v jednom analytickém kroku, který netrvá obvykle déle, než několik minut. Spolu s atomovou absorpční spektrometrií s elektrotermickou atomizací (ETAAS) se jedná o nejcitlivější metodu prvkové analýzy s mezemi detekce v oblasti \leq ng/L. Nicméně existují jistá omezení ohledně množství a složení matrice vzorků, která může významně ovlivnit kvalitu výsledků. V první řadě je to přítomnost nerozpuštěných látek, které mohou blokovat zmlžovač a ovlivňovat tvorbu aerosolu. Významné problémy mohou způsobit také vyšší koncentrace rozpuštěných látek ve vzorku. Matriční prvky společně s plazmovým plynem (Ar) mohou vytvářet tzv. polyatomické ionty, které mohou interferovat se signály analytů (stejně m/z). Tyto interference se nazývají spektrální. Jako příklad lze uvést iont $^{75}\text{ArCl}^+$, který může navyšovat signál iontu $^{75}\text{As}^+$. Dalším problémem spojeným s vysokými koncentracemi rozpuštěných látek jsou tzv. nespektrální interference. V tomto případě jde o ovlivnění signálu stanovovaných analytů prostřednictvím různých jevů, které však nesouvisí s hmotnostními překryvy iontů. Matrice může ovlivnit míru ionizace analytů v ICP, prostorové rozložení iontů v iontovém paprsku a pod. V neposlední řadě může docházet k depozici matrice na vzorkovacích kónusech a iontové optice, což způsobuje přístrojový drift. Z praktického hlediska je vhodné analyzovat roztoky neobsahující žádné nerozpuštěné látky a rozpuštěné látky anorganické povahy do koncentrace 2 g/L.

5.2 ICP-MS přístroj a jeho nastavení

Měření budou prováděna na přístroji Agilent 7700x ICP-MS. Jde o kvadrupólový hmotnostní spektrometr, jehož součástí je kolizně reakční cela, která slouží k redukci spektrálních interferencí. Pro účely našeho měření bude použito helium jako kolizní plyn. Polyatomické ionty pocházející z matrice mají větší iontový průměr než jednoduché ionty analytů a tím i vyšší pravděpodobnost

srážky s pracovním plynem v kolizní cele. Interferenty srážkami ztrácejí kinetickou energii a při správně nastavené potenciální bariéře na výstupu z cely neprocházejí interferenty dále do hmotnostního spektrometru. Nespektrální interference budou korigovány pomocí porovnávacích prvků Ge a Rh. Do kalibračních grafů se pak bude vynášet poměr signálu analytu k signálu porovnávacího prvku tj. poměr Zn/Ge a Cd/Rh. Tento poměr by při dané koncentraci měl ideálně být nezávislý na složení matrice. Nespektrální interference a přístrojový drift ovlivňují tedy v optimálním případě signál analytu a porovnávacího prvku stejnou měrou.

5.3 Pracovní postup

Připraví se sada směsných kalibračních roztoků o následujících koncentracích:

- Roztok 1: kalibrační nula (0 $\mu\text{g/L}$ Zn a Cd, pouze roztok zředěné HNO_3)
- Roztok 2: 0,2 mg/L Zn a 0,5 $\mu\text{g/L}$ Cd
- Roztok 3: 1 mg/L Zn a 2 $\mu\text{g/L}$ Cd
- Roztok 2: 2 mg/L Zn a 10 $\mu\text{g/L}$ Cd

Pro přípravu kalibračních roztoků se použijí zásobní kalibrační standardy o koncentraci Zn a Cd 1 g/L. Kalibrační roztoky obsahují jako matici zředěnou kyselinu dusičnou o koncentraci 2 ml kyseliny na 25 ml roztoku (tj. stejně jako vzorky). Roztok porovnávacích prvků se připraví ředěním zásobního roztoku 2% HNO_3 na koncentraci 200 $\mu\text{g/L}$ v 50 ml odměrné baňce. Roztok porovnávacích prvků se přimíchává k roztoku vzorku v průběhu měření pomocí peristaltického čerpadla.

Při analýze postupujeme od kalibračního standardu s nejvyšší koncentrací po kalibrační standard s nejnižší koncentrací, následně proměříme slepé pokusy (blanky) společně se vzorky – blanky by v sekvenci měli být rovnoměrně rozprostřeny mezi vzorky.

5.4 Vyhodnocení naměřených dat

Kalibrační závislost se sestaví z poměrů signálu analytů a signálu porovnávacího prvku (tzn. poměr signálů Zn/Ge a Cd/Rh proti koncentraci Zn a Cd v kalibračních roztocích). Tentýž přepočít se provede i pro signály vzorků a slepých pokusů. Přes kalibrační závislost se vypočte koncentrace prvků v roztocích slepých pokusů a vzorků v mg/L resp. $\mu\text{g/L}$. Střední hodnota koncentrace analytů v slepých pokusech (medián) se odečte od koncentrace analytů ve vzorcích. Spočte se mez detekce metody (LOD) jako trojnásobek směrodatné odchylky (SD) koncentrace analytů v slepých pokusech a LOD porovnáme s koncentracemi analytů ve vzorcích po odečtu mediánu slepých vzorků. Najdeme-li ve vzorcích koncentraci nižší, než je hodnota LOD, dále s hodnotou nepočítáme. Koncentrace prvků po odečtení střední hodnoty slepého pokusu přepočteme na obsah prvků ve vlasech v jednotkách $\mu\text{g/g}$ – v úvahu bereme celkový objem roztoku (25 ml) a navážku vzorku. U prvků, které se nacházejí pod hodnotou LOD nahradíme hodnotu obsahu značkou <LOD - LOD je třeba přepočítat z $\mu\text{g/L}$ na $\mu\text{g/g}$ pro daný vzorek a danou navážku.

Protokol by měl obsahovat následující informace:

- Tabulky signálů analytů a porovnávacích prvků v kalibračních roztocích, slepých pokusech a vzorcích
- Poměry signálu Zn/Ge a Cd/Rh a vypočtené koncentrace (i pro kalibrační roztoky)
- Parametry lineární regrese ve formě $y = ax + b$, kde parametry a a b budou vypočteny s přesností alespoň na 3 platné číslice
- Vypočtené střední hodnoty (mediány) u slepých pokusů, jejich SD a vypočtené LOD
- Vypočtené hodnoty obsahů prvků ve vlasech