

# VYUŽITÍ DYNAMICKÉ REAKČNÍ CELY PRO STANOVENÍ FOSFORU METODOU HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE S INDUKČNĚ VÁZANÝM PLAZMATEM

ANTONÍN KAŇA\* a OTO MESTEK

Ústav analytické chemie, Fakulta chemicko-inženýrská,  
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5,  
166 28 Praha 6-Dejvice  
kanaa@vscht.cz

Došlo 18.6.10, přijato 25.11.10.

Klíčová slova: fosfor, ICP-MS, DRC

## Úvod

Fosfor je jedním z hlavních prvků vyskytujících se v organismech. Je součástí skeletu, nukleových kyselin, energetických fosfátů (ATP), fosfolipidů a mnoha dalších důležitých látek. Významně se tak podílí na metabolismu<sup>1</sup>. Z toho plyne potřeba kvantitativního stanovení fosforu, ať už z důvodu nutnosti studia metabolických dějů nebo monitorování jeho výskytu např. v potravinách či životním prostředí.

Vhodnou metodou pro prvkovou analýzu je hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Přímá aplikace na stanovení fosforu je však komplikována přítomností spektrálních interferencí polyatomických iontů<sup>2</sup>. Tyto ionty mají téměř stejný poměr hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) jako analyt, takže u ICP-MS s nízkým rozlišením dochází k překryvu signálů těchto iontů a analytu. Polyatomické ionty odvozené od atomů uhlíku, kyslíku, vodíku, dusíku a dalších prvků pocházejí převážně z matrice vzorku<sup>3</sup>. V případě fosforu měřeného na linii  $^{31}\text{P}^+$  se jedná především o ionty  $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ ,  $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^{1}\text{H}^+$  a  $^{12}\text{C}^1\text{H}_3^{16}\text{O}^+$ . Z dalších potenciálních interferentů lze uvést seskupení  $^{15}\text{N}^{15}\text{N}^1\text{H}^+$ ,  $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^1\text{H}^+$ ,  $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^+$  nebo  $^{30}\text{Si}^1\text{H}^+$  (cit.<sup>2–9</sup>). Situace je navíc ztížena tím, že fosfor je monoisotopický prvek, a tak k jeho stanovení nelze zvolit jiný isotop<sup>2,6</sup>. Proto byla testována také možnost stanovení fosforu ve formě oxidu  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ , kterou ve své práci uvádí Bandura a spol.<sup>3</sup>, využívající reakce fosforu s kyslíkem v dynamické reakční cele (DRC). Jeho práce popisuje možnost výrazné redukce interferencí a ukazuje nízké detekční limity<sup>3</sup>. Ani seskupení  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$  však není zcela bez interferencí. Více či méně závažných interferencí existuje celá řada:  $^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}^+$ ,  $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$ ,  $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$ ,  $^{30}\text{Si}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$ ,  $^{32}\text{S}^{15}\text{N}^+$  a mnoho dalších<sup>2–9</sup>.

Průběh reakce kyslíku s fosforem v DRC lze ovlivnit nastavením některých parametrů, z nichž nejvýznamnější jsou parametr  $a$  ( $RP_a$ ), parametr  $q$  ( $RP_q$ ) a průtok reakčního plynu.  $RP_a$  a  $RP_q$  jsou parametry úzce související s intenzitou elektrického pole na tyčích kvadrupólu uvnitř DRC a jsou definovány rovnicemi (1) a (2), kde  $e$  je náboj elektronu,  $V_{dc}$  stejnosměrné napětí vložené na tyče kvadrupólu,  $V_{rf}$  střídavé napětí vložené na tyče kvadrupólu,  $m$  hmotnost iontu a  $\omega$  frekvence vložení střídavého elektrického pole. Změnou těchto parametrů lze docílit destabilizaci prekurzorů interferujících iontů a částečně tak zabránit jejich vzniku<sup>3</sup>.

$$a = \frac{4eV_{dc}}{m\omega^2r^2} \quad (1)$$

$$q = \frac{2eV_{rf}}{m\omega^2r^2} \quad (2)$$

Cílem práce bylo optimalizovat metodiku stanovení fosforu. K dosažení tohoto cíle bylo nutné kvantifikovat interference na liniích  $m/z = 31$  a  $m/z = 47$ , najít optimální podmínky tvorby iontu  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$  a nakonec stanovit parametry získané metody, jako jsou linearita a mez detekce. Správnost metody byla ověřena analýzou certifikovaného referenčního materiálu a vzorku fazolí, ve kterých byl obsah fosforu stanoven spektrofotometricky.

## Experimentální část

Vzorky pro kvantifikaci interferencí a optimalizaci DRC obsahující fosfor, dusík, uhlík a chlor byly připravovány ředěním roztoků 99,999%  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  ( $1,000 \pm 0,002 \text{ g l}^{-1}$ , Analytika, spol. s r.o., Praha, ČR), 65%  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$  1:10 (obě Suprapur®, Merck, Darmstadt, SRN) a  $\text{CH}_3\text{OH}$  (Uvasol®, Merck, Darmstadt, SRN). K ředění byla používána demineralizovaná voda Milli-Q (Millipore, Bedford, USA). Zásobní roztok vnitřních standardů obsahoval  $2 \text{ mg l}^{-1} \text{ Ge}$ ,  $\text{Rh}$  a  $1 \text{ mg l}^{-1} \text{ In}$  v  $0,5 \text{ mol l}^{-1} \text{ HNO}_3$  a byl připraven ředěním roztoků obsahujících dané kovy o koncentraci  $1,000 \pm 0,005 \text{ g l}^{-1}$  (Analytika, spol. s r.o., Praha, ČR). V DRC byl jako reakční plyn použit kyslík čistoty 5.0 (Siad, Braňany u Mostu, ČR).

Pro ověření správnosti stanovení byl použit vzorek fazolí s obsahem fosforu  $4,77 \pm 0,47 \text{ mg g}^{-1}$ . Daný obsah fosforu v nich byl stanoven spektrofotometricky metodou molybdenové modři<sup>13</sup>. Dále byl analyzován certifikovaný referenční materiál sušeného mléka BCR 063R (IRMM, Geel, Belgie) s obsahem fosforu  $11,10 \pm 0,13 \text{ mg g}^{-1}$ .

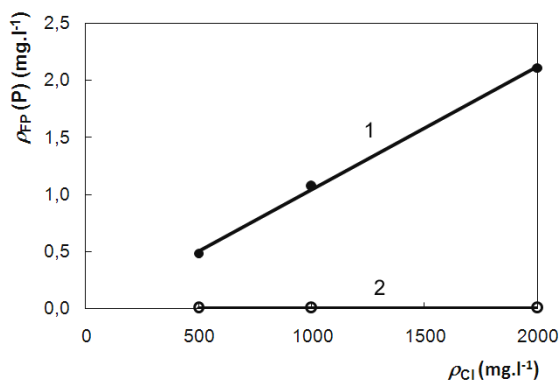
Měření byla realizována na hmotnostním spektrometru s indukčně vázaným plazmatem PerkinElmer Sciex

\* Antonín Kaňa tuto práci úspěšně prezentoval na soutěži O cenu firmy Merck 2010 za nejlepší studentskou vědeckou práci v oboru analytické chemie.

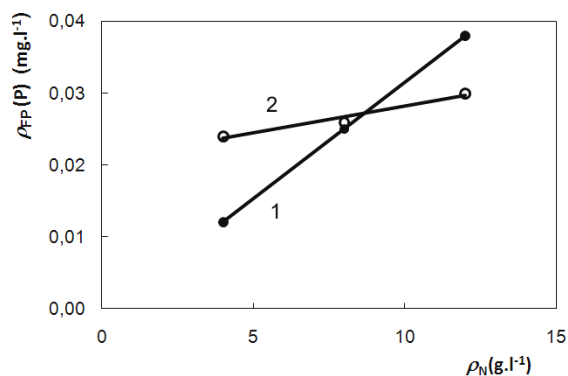
Elan DRC-e (Concord, Kanada) vybaveným dynamickou reakční celou s tzv. Axial field technologií. Vzorek je zaváděn koncentrickým zmlžovačem s cyklonickou mlžnou komorou. Hmotnostním analyzátozem je zde kvadrupól.

Parametry DRC byly optimalizovány v následujícím rozsahu:  $RPq$  0,1–0,9 s krokem 0,1;  $RPa$  0,01–0,10 s krokem 0,01 a průtok reakčního plynu kyslíku 0,3 až 1,5 ml min<sup>-1</sup> s krokem 0,1 ml min<sup>-1</sup>.

Kvantitativní stanovení fosforu bylo realizováno na linii  $m/z = 31$  odpovídající iontu  $^{31}\text{P}^+$  a  $m/z = 47$  odpovídající iontu  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ . Vnitřní standardy byly měřeny na liniích  $m/z = 72$  (Ge),  $m/z = 103$  (Rh) a  $m/z = 115$  (In). Veškerá kvantitativní měření byla realizována metodou vnitřního standardu.



Obr. 1. Závislost falešně pozitivního signálu fosforu na koncentraci HCl v roztoku s obsahem  $\text{CH}_3\text{OH}$  1000 mg l<sup>-1</sup>; 1 – signál na linii  $m/z = 47$ , 2 – signál na linii  $m/z = 31$



Obr. 2. Závislost falešně pozitivního signálu fosforu na koncentraci  $\text{HNO}_3$  v roztoku; 1 – signál na linii  $m/z = 31$ , 2 – signál na linii  $m/z = 47$

## Výsledky a diskuse

### Kvantifikace interferencí polyatomických iontů

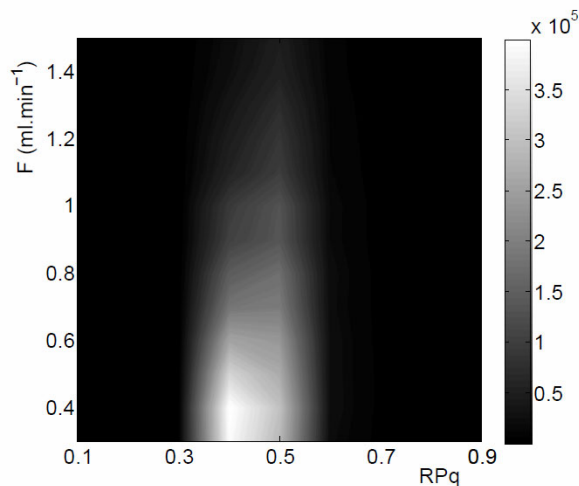
Pozadí vytvářené interferujícími ionty bylo měřeno při  $m/z = 31$  a  $m/z = 47$  ve standardním režimu bez aplikace DRC. K určení, zda jsou interference některých polyatomických iontů významnější než ostatní, byl měřen zvlášť roztok obsahující kyselinu dusičnou a zvlášť roztok obsahující kyselinu chlorovodíkovou s methanolem. Methanol simuluje přítomnost zbytkového uhlíku po mikrovlnném rozkladu biotických vzorků. Závislost falešně pozitivního signálu na koncentraci prvků v roztoku je uvedena na obr. 1 a obr. 2.

Na obr. 1 je možné pozorovat nízkou úroveň falešně pozitivní koncentrace  $^{31}\text{P}^+$  málo závislou na koncentraci. Z toho lze usoudit, že možné interference způsobené ionty obsahující uhlík ( $^{12}\text{C}^{1}\text{H}_3^{16}\text{O}^+$ ,  $^{12}\text{C}^{18}\text{O}^1\text{H}^+$ ,  $^{13}\text{C}^{18}\text{O}^+$ ) jsou zanedbatelné. Naproti tomu falešně pozitivní signál  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$  je o tři řády vyšší a značně závislý na koncentraci HCl. To znamená, že interference iontů kombinujících uhlík a chlor ( $^{12}\text{C}^{35}\text{Cl}^+$ ,  $^{13}\text{C}^{16}\text{O}^{18}\text{O}^+$ ) jsou významné.

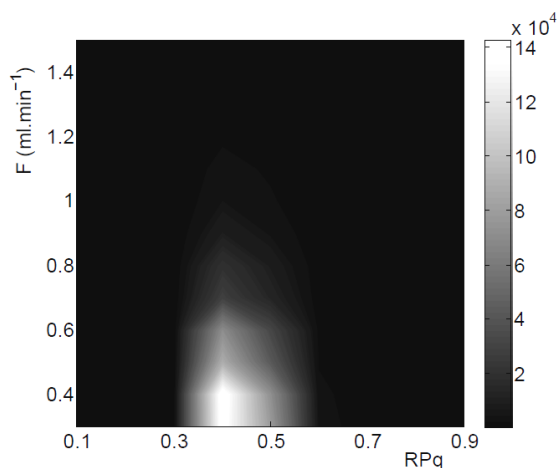
Na obr. 2, který zobrazuje falešně pozitivní signál analytu v prostředí zředěné  $\text{HNO}_3$ , lze pozorovat velmi podobnou úroveň interferencí pro  $^{31}\text{P}^+$  i  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ . Polyatomické ionty obsahující dusík ( $^{15}\text{N}^{16}\text{O}^+$ ,  $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$ ,  $^{15}\text{N}^{15}\text{N}^1\text{H}^+$  a  $^{14}\text{N}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^1\text{H}^+$ ) tedy vznikají v přibližně stejném množství, které však u  $^{31}\text{P}^+$  výrazněji závisí na koncentraci  $\text{HNO}_3$ .

### Optimalizace DRC

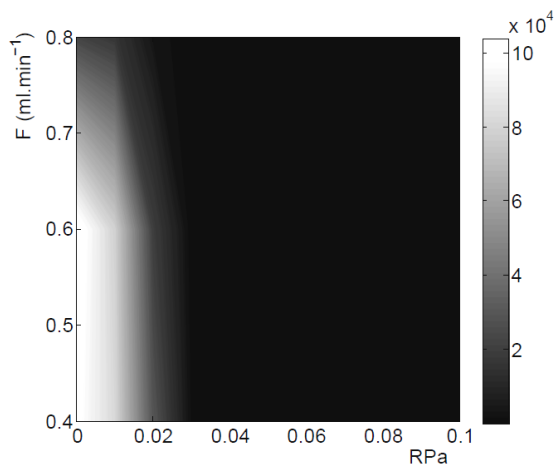
Cílem optimalizace reakční cely bylo nalézt takovou kombinaci hodnot parametrů  $RPq$ ,  $RPa$  a průtoku reakční



Obr. 3. Závislost intenzity signálu  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$  na průtoku kyslíku  $F$  a  $RPq$  pro roztok obsahující 4 mg l<sup>-1</sup> fosforu



Obr. 4. Závislost intenzity signálu  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$  na průtoku kyslíku  $F$  a  $RPq$  pro roztok 2%  $\text{HNO}_3$



Obr. 6. Závislost intenzity signálu  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$  na průtoku kyslíku  $F$  a  $RPa$  pro roztok 2%  $\text{HNO}_3$

ho plynu, při které by bylo dosaženo maximálního signálu fosforu ve formě iontu  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$  a zároveň co nejnižšího falešně pozitivního signálu interferentů. Falešně pozitivní signál byl stejně jako v případě kvantifikace měřen pro roztok obsahující dusík a roztok obsahující chlor s uhlíkem zvlášť. Velikost falešně pozitivního signálu byla charakterizována koncentrací ekvivalentního pozadí ( $BEC$ ).

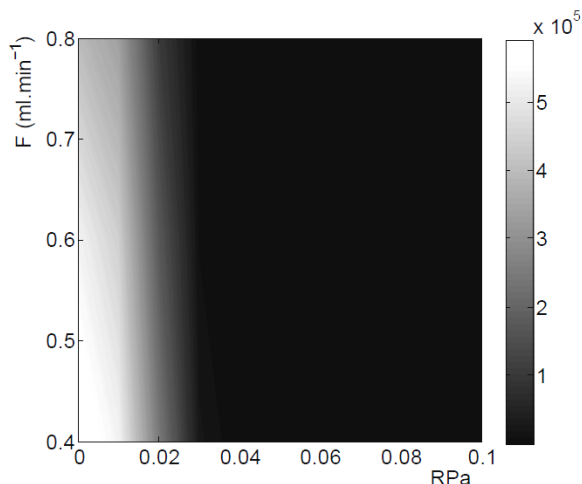
Maximum signálu fosforu bylo dosaženo při průtoku kyslíku  $0,4 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $RPq = 0,4$  a  $RPa = 0$ . Závislost intenzity signálu měřeného na linii  $m/z = 47$  na průtoku kyslíku a  $RPq$ , resp. průtoku a  $RPa$ , pro roztok obsahující  $4 \text{ mg l}^{-1}$  P je zobrazena na obr. 3 a 5. Při těchto parametrech je však pozorována rovněž zvýšená  $BEC$ . Ta je způsobena tím, že ve stejné oblasti leží také maximum intenzi-

ty signálu interferentů. Závislost intenzity signálu měřeného na linii  $m/z = 47$  na průtoku kyslíku a  $RPq$ , resp. průtoku a  $RPa$ , pro roztok 2% kyseliny dusičné je zobrazena na obr. 4 a 6. Úroveň  $BEC$  dosahuje hodnot srovnatelných s hodnotami získanými při kvantifikaci interferencí bez použití DRC.

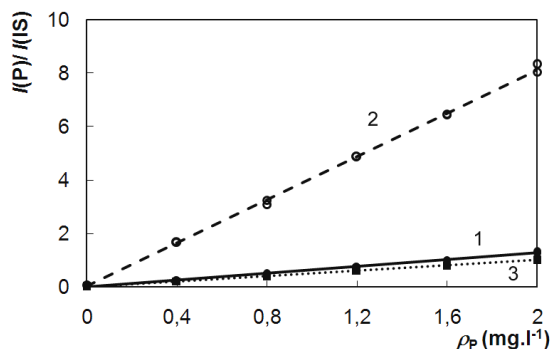
Jelikož se nepodařilo významně snížit intenzitu interferencí oproti měření bez použití reakční cely, bylo jako vhodnější zvoleno měření bez tohoto prvku. V dalších měřeních tak nebyla DRC využita.

#### Linearita a mez detekce

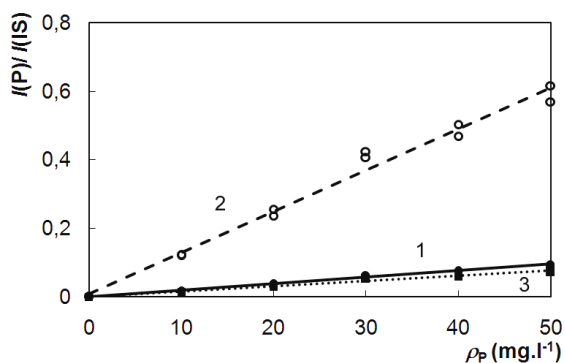
Linearita kalibrační závislosti byla testována v koncentračním rozsahu  $0\text{--}2 \text{ mg l}^{-1}$  P pro měření na linii  $^{31}\text{P}^+$  a v rozsahu  $0\text{--}50 \text{ mg l}^{-1}$  P pro měření na linii  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ ,



Obr. 5. Závislost intenzity signálu  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$  na průtoku kyslíku  $F$  a  $RPa$  pro roztok obsahující  $4 \text{ mg l}^{-1}$  fosforu



Obr. 7. Závislost poměru intenzit signálů fosforu a vnitřního standardu měřených na linii  $m/z = 31$  na koncentraci fosforu v roztoku. 1 – vnitřní standard In, 2 – vnitřní standard Ge, 3 – vnitřní standard Rh



Obr. 8. Závislost poměru intenzit signálů fosforu a vnitřního standardu měřených na linii  $m/z = 47$  na koncentraci fosforu v roztoku. 1 – vnitřní standard In, 2 – vnitřní standard Ge, 3 – vnitřní standard Rh

viz obr. 7 a 8. Vyhodnocení bylo provedeno Mandelovým F-testem<sup>10</sup>. Současně byla testována vhodnost tří různých vnitřních standardů (IS): Rh, Ge, In. Lineární závislost byla u  $^{31}\text{P}^+$  zjištěna pouze pro IS Ge, a to v celém rozsahu 0–2 mg l<sup>-1</sup>. Pro  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$  byla zjištěna linearita jen pro IS In, avšak v rozsahu koncentrací fosforu pouze 0–30 mg l<sup>-1</sup>.

Mez detekce byla určena analýzou slepých pokusů také za použití vnitřních standardů Rh, Ge a In. Mez detekce se na rozdíl od linearit v rámci různých vnitřních standardů téměř neliší. Pro  $^{31}\text{P}^+$  byla stanovena na 33  $\mu\text{g l}^{-1}$  a pro  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$  na 29  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Tato zdánlivě vysoká mez detekce je však zcela dostačující, protože v běžných biologických materiálech se koncentrace fosforu pohybuje v desítkách až tisících mg kg<sup>-1</sup> resp. mg l<sup>-1</sup> (cit.<sup>11</sup>). Lze tak analyzovat i poměrně hodně zředěné roztoky. To je praktické zejména z hlediska eliminace nespektrálních interferencí<sup>12</sup>.

#### Správnost stanovení

Analýzou certifikovaného referenčního materiálu sušeného mléka BCR 063R, které obsahuje  $11,10 \pm 0,13$  mg g<sup>-1</sup> fosforu, a vzorku fazolí, který obsahu-

Tabulka I  
Stanovené obsahy fosforu v CRM BCR 063R ( $11,10 \pm 0,13$  mg g<sup>-1</sup>)

Vnitřní standard	P na linii $m/z = 31$ [mg g <sup>-1</sup> ]	P na linii $m/z = 47$ [mg g <sup>-1</sup> ]
<sup>72</sup> Ge	$11,35 \pm 0,47$	$14,2 \pm 1,0$
<sup>103</sup> Rh	$11,42 \pm 0,48$	$14,4 \pm 1,0$
<sup>115</sup> In	$11,32 \pm 0,49$	$14,5 \pm 1,0$

Tabulka II

Stanovené obsahy fosforu ve fazolích ( $4770 \pm 460$   $\mu\text{g g}^{-1}$ )

Vnitřní standard	P na linii $m/z = 31$ [ $\mu\text{g g}^{-1}$ ]
<sup>72</sup> Ge	$4780 \pm 500$
<sup>103</sup> Rh	$4790 \pm 500$
<sup>115</sup> In	$4740 \pm 500$

je  $4770 \pm 460$   $\mu\text{g g}^{-1}$  fosforu byla ověřena správnost stanovení fosforu metodou ICP-MS. Obsah fosforu v těchto vzorcích byl stanoven pro různé vnitřní standardy na liniích  $m/z = 31$  i  $m/z = 47$ . Stanovené obsahy fosforu včetně nejistot jsou uvedeny v tab. I a II. Nejistoty obsahu fosforu ve vzorku byly vypočteny podle rovnice (3) jako kombinace opakovatelnosti a nejistoty odhadnuté jako 2 % z výsledku analýzy, kde  $s$  je výběrová směrodatná odchylka dat,  $n$  počet naměřených hodnot a  $x_c$  průměr naměřených dat.

$$u(x_c) = \sqrt{\frac{s^2(x_c)}{n} + (0,02 \cdot x_c)^2} \quad (3)$$

ných dat.

Vyhodnocení správnosti stanovení obsahu P ve vzorcích bylo provedeno testem výtěžnosti. Ten ukázal, že stanovení fosforu na linii iontu  $^{31}\text{P}^+$  v CRM sušeného mléka poskytuje výsledky, které nejsou statisticky významně odlišné od certifikované hodnoty. Naopak stanovení na linii iontu  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$  dává výsledky mírně vyšší, které jsou již významně odlišné od certifikované hodnoty. Stanovení fosforu při  $m/z = 31$  ve vzorku fazolí poskytuje také správné výsledky. Z důvodu měření falešně pozitivních koncentrací na linii  $m/z = 47$  již nebylo toto stanovení ve vzorku fazolí provedeno.

#### Závěr

Optimalizací nastavení reakční cely nebylo dosaženo významného snížení intenzity interferencí u iontu  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ . Pozadí se pohybuje na téměř stejné úrovni, jako při měření bez použití reakční cely. Nebylo dosaženo ani zvýšení citlivosti měření. Z tohoto důvodu bylo za vhodnější zvoleno stanovení bez DRC. Z forem iontů byl pak vybrán  $^{31}\text{P}^+$ , který trpí méně závažnými interferencemi než  $^{31}\text{P}^{16}\text{O}^+$ . Pro měření  $^{31}\text{P}^+$  bez DRC byla zjištěna linearita kalibrační závislosti v koncentračním rozsahu 0–2 mg l<sup>-1</sup> pro vnitřní standard <sup>72</sup>Ge a mez detekce 33  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Analýzou certifikovaného referenčního materiálu sušeného mléka a vzorku fazolí analyzovaného kontrolní metodou byla potvrzena správnost stanovení.

Tato práce vznikla za podpory výzkumného záměru MŠMT ČR MSM 6046137307.

## LITERATURA

1. Jabor A. a kol.: *Vnitřní prostředí*. Grada Publishing a.s., Praha 2008.
2. Yang Ch. H., Jiang S. J.: *Spectrochim. Acta*, B 59, 1389 (2004).
3. Bandura D. R., Baranov V. I., Tanner S. D.: *Anal. Chem.* 74, 1497 (2002).
4. Pröfrock D., Leonhard P., Wilbur S., Prange A.: *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 623 (2004).
5. Tan S. H., Horlick G.: *Appl. Spectrosc.* 40, 445 (1986).
6. Yang L., Sturgeon R. E., Lam J. W. H.: *J. Anal. At. Spectrom.* 16, 1302 (2001).
7. Kovačević M., Leber R., Kohlwein S. D., Goessler W.: *J. Anal. At. Spectrom.* 19, 80 (2004).
8. Wu M. C., Jiang S. J., Hsi T. S.: *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 154 (2003).
9. Kovačević M., Goessler W., Mikac N., Veber M.: *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 145 (2005).
10. Funk W., Dammann V., Donnevert G., Iannelli S.: *Quality Assurance in Analytical Chemistry: Applications in Environmental, Food, and Materials Analysis, Biotechnology, and Medical Engineering*, 2. vyd. Wiley-VCH, Weinheim 2007.
11. Velický I.: *Mikroelementy v teorii a praxi: úvod do biochemie a fyziologie stopových prvků u zvířat a rostlin*. Slovenské vydavateľstvo pôdohospodárskej literatúry, Bratislava 1964.
12. Grotti M., Frache R.: *J. Anal. At. Spectrom.* 22, 1481 (2007).
13. Valášková M.: *Diplomová práce*, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2009.

**A. Kaňa and O. Mestek** (*Department of Analytical Chemistry, Institute of Chemical Technology, Prague*):  
**Determination of Phosphorus by Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry**

Determination of P by inductively-coupled plasma MS is complicated by spectral interference of polyatomic ions. In this work the possibility of P determination in biological samples was tested. P was determined as  $P^+$  and  $PO^+$  ion. Formation of  $PO^+$  ions was supported by the reaction with oxygen in a dynamic reaction cell with optimized parameters. The measurements show smaller interference of  $P^+$  than that of  $PO^+$ . The use of a dynamic reaction cell did not lead to improvement of measured parameters. The limit of detection and linearity of calibration curve were determined for this method. Its accuracy was verified by analysis of certified reference skim milk powder and bean samples.