

**OPTIMALIZACJA PARAMETRÓW PRACY APARATURY POMIAROWEJ
W ANALIZIE PIERWIASTKOWEJ TKANEK MIĘKKICH TECHNIKĄ ABLACJI
LASEROWEJ Z DETEKcją W SPEKTROMETRZE MAS Z PLAZMĄ
SPRZEŻONĄ INDUKCYJNIE**

**OPTIMIZATION OF OPERATING PARAMETERS OF THE MEASURING
APPARATUS IN ELEMENTAL ANALYSIS OF SOFT TISSUES USING LASER
ABLATION TECHNIQUE WITH THE DETECTION IN THE MASS
SPECTROMETER WITH INDUCTIVELY COUPLED PLASMA**

Wiktor Lorenc

Danuta Baralkiewicz

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Chemii
Pracownia Analizy Spektroskopowej Pierwiastków
ul. Umultowska 89b
61-614 Poznań
e-mail: lorenc.wiktor@gmail.com
e-mail: danutaba@amu.edu.pl

Abstract: Operating parameters of measurement equipment for the laser ablation of detection in the mass spectrometer with inductively coupled plasma were optimized. Optimization was employed in order to choose the conditions for carrying analyzes to ensure high analytical signal intensities and low values of relative standard deviation. Optimization was performed on a model sample with physicochemical properties similar to those of real samples of soft tissue. The following parameters underwent optimization: the energy of the laser pulse frequency, beam diameter and scanning speed. The selection of the optimal operating parameters was determined based on the intensity of the signal analysis, RSD value and visual evaluation of the process of ablation. Measurements were made using a quadrupole ICP-MS spectrometer (Elan DRC II PerkinElmer) with a laser ablation system (LSX-500 Cetac).

Keywords: laser ablation, inductively coupled plasma mass spectrometry, optimization of operating parameters of instruments, soft tissue.

Wprowadzenie

Ablacja laserowa (LA, ang. laser ablation) to technika wprowadzania próbek, która w połączeniu ze spektrometrem mas z plazmą sprzężoną indukcyjnie (ICP-MS, ang. inductively coupled plasma mass spectrometer) pozwala na bezpośrednią, pierwiastkową analizę próbek stałych. Ze względu na specyfikę procesu ablacji, którego przebieg ściśle zależy od właściwości fizykochemicznych badanego materiału, przed rozpoczęciem pomiarów metodą LA-ICP-MS (ang. laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry) konieczna jest optymalizacja parametrów pracy aparatury. Zaniedbanie lub pominięcie etapu optymalizacji może skutkować uzyskaniem błędnych wyników pomiarów. Do przeprowadzenia optymalizacji wykorzystano przygotowaną w laboratorium wielopierwiastkową stałą próbkę modelową. W poniższym artykule przedstawiono sposób prowadzenia optymalizacji parametrów pracy

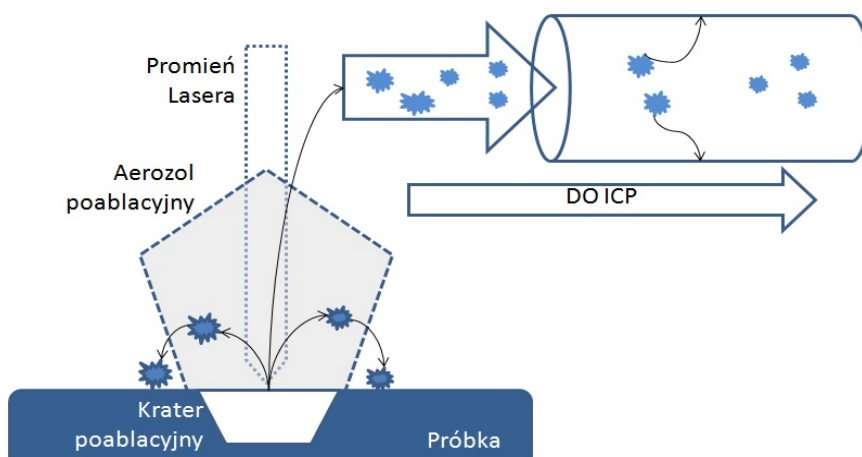
aparatury pomiarowej wraz z interpretacją wyników i metodyką przygotowania próbki modelowej.

Opis zagadnienia

Ablacja laserowa polega na działaniu na powierzchnię próbki wiązką wysokoenergetycznego promieniowania laserowego (rys. 1). W wyniku działania lasera z powierzchni próbki następuje oderwanie z powierzchni próbki cząstek, atomów, jonów oraz elektronów które formują chmurę aerozolu nad miejscem uderzenia wiązki promieniowania lasera. W zależności od właściwości fizykochemicznych materiału poddawanego ablacji takich jak na przykład: skład chemiczny, barwa, temperatura topnienia i parowania, absorbancja, współczynnik rozpraszania światła czy pojemność i przewodnictwo cieplne zmienia się energia potrzebna do oderwania cząstek materiału z powierzchni próbki. Właściwości badanej

próbki mają bezpośredni wpływ na rozmiary odrywanych cząsteczek, morfologię krateru poablacyjnego czy wydajność procesu. Ponadto należy zwrócić uwagę na dwa zjawiska towarzyszące procesowi ablacji laserowej: frakcjonowanie oraz efekt „plasma-shielding”. Frakcjonowanie polega na niestabilności sygnału analitycznego, która wynika z wahań wydajności procesów ablacji, transportu aerozolu do plazmy oraz atomizacji i jonizacji w plazmie. Większe cząstki materiału poddawane ablacji mogą opadać na powierzchnię próbki lub osadzać

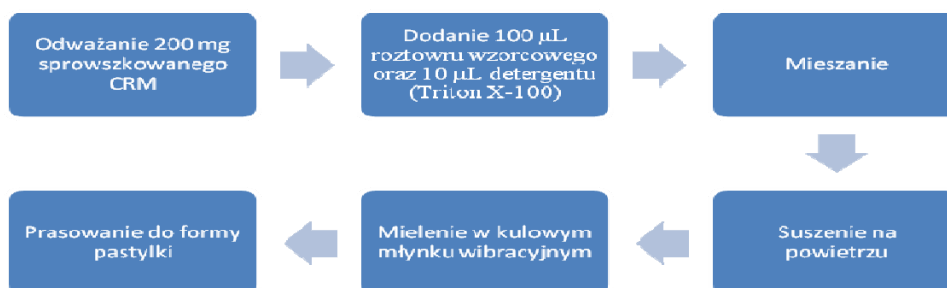
się na ściankach wężyków transportujących aerosol do spektrometru mas. W efekcie do spektrometru mas dociera materiał, który różni się ilościowo składem od badanej próbki, może on być wzbogacony w substancje bardziej lotne. Efekt „plasma-shielding” polega na zmniejszeniu energii promieniowania lasera, które dociera do powierzchni próbki. Obniżenie energii wynika z interakcji promieniowania lasera z aerozolem, unoszącym się nad próbką, powstałym podczas wcześniejszych oddziaływań promieniowania lasera z próbką [1, 3, 5, 6].



Rys. 1 Ilustracja procesu ablacji z wizualizacją procesów frakcjonowania oraz "plasma-shielding".

Ze względu na opisane powyżej procesy związane z ablacją laserową, optymalizację parametrów aparatury pomiarowej należy prowadzić z wykorzystaniem próbki modelowej, której właściwości fizykochemiczne oraz zachowanie pod wpływem promieniowania lasera będzie możliwie najbardziej zbliżone do próbek rzeczywistych. W idealnej sytuacji należałoby przeprowadzić proces z wykorzystaniem materiału próbek badanych jednak bardzo często ilość próbek, które analityk otrzymuje do analizy jest ograniczona i nie ma możliwości przeznaczenia części materiału na proces optymalizacji. Rozwiązaniem tego problemu jest przygotowanie próbki modelowej o składzie chemicznym matrycy oraz właściwościach fizykochemicznych zbliżonych do próbek rzeczywistych. Na podstawie przeglądu literatury wybrano metodę przygotowania próbki modelowej, która może posłużyć do optymalizacji parametrów aparatury pomiarowej w analizie pierwiastkowej tkanek miękkich [2, 4].

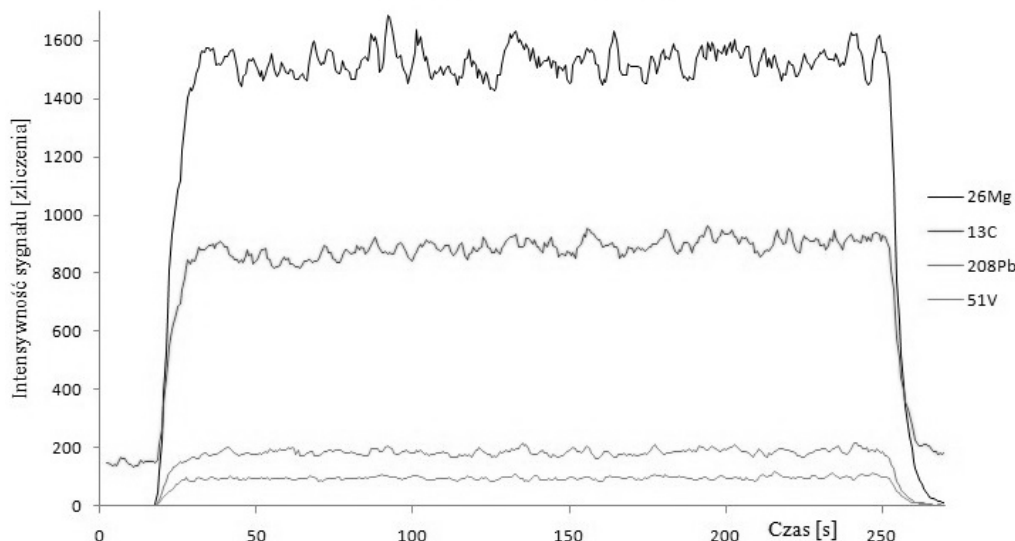
Próbkę modelową przygotowano z wykorzystaniem certyfikowanego materiału odniesienia (CRM, ang. certified reference material) jako próbki dopasowanej matrycowo do której dotowano wielopierwiastkowy roztwór wzorcowy "ICP Multi-element standard XVI" (Sigma Aldrich) o odpowiednim stężeniu. Po dokładnym wymieszaniu i wysuszeniu na powietrzu CRM, z dodatkiem roztworu wzorcowego, zmielono w moździerzu agatowym oraz młynku wibracyjnym (Pulverisette 23, Fritsch). Następnie próbkę sprasowano za pomocą prasy hydraulicznej pod ciśnieniem 10T. W celu usunięcia powietrza z prasowanego materiału zastosowano obniżone ciśnienie podczas prasowania. Ponieważ uzyskane tą metodą pastylki ulegały nadmiernemu kruszeniu podczas prowadzenia ablacji do sproszkowanego CRM, poza roztworem wzorcowym, dodano także detergent Triton X-100 jako lepiszcza. Na rys. 2 przedstawiono schemat przygotowania próbki modelowej.



Rys. 2. Schemat przygotowania próbki modelowej.

Próbka modelowa przeznaczona do przeprowadzenia etapu optymalizacji parametrów pracy aparatury pomiarowej musi charakteryzować się jednorodnym rozmieszczeniem analitów. Przygotowaną próbkę

poddano długiej liniowej ablacji w celu potwierdzenia homogenicznego rozmieszczenia obserwowanych analitów. Na rys. 3 przedstawiono wynik testu homogeniczności.

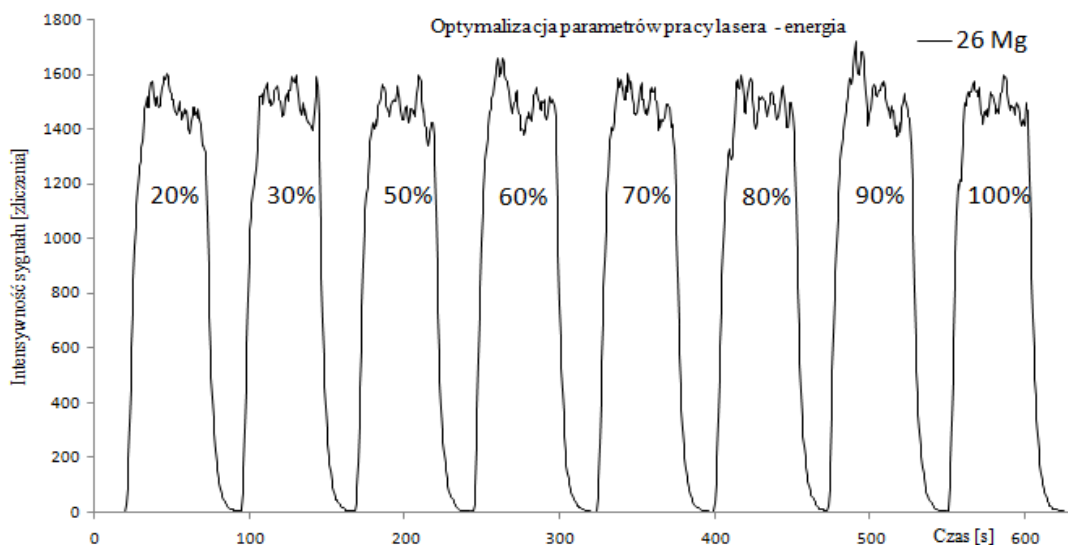


Rys. 3. Test homogeniczności próbki modelowej.

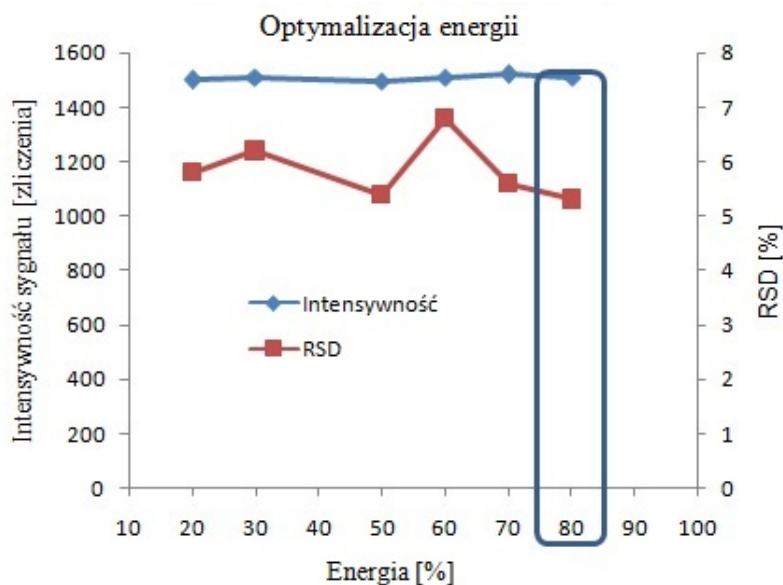
Optymalizację parametrów pracy lasera prowadzono metodą jednej zmiennej, jednocześnie obserwowano wartości sygnału analitycznego oraz RSD(%) dla szeregu izotopów w szerokim zakresie mas. W pracy przedstawiono wyniki dla izotopu ^{26}Mg , dla pozostałych analitów obserwowano analogiczne zależności wartości sygnału analitycznego oraz RSD(%) względem zmiany parametrów pracy aparatury. Optymalizacji podlegały takie parametry jak: energia lasera, częstotliwość pulsu, średnica wiązki oraz szybkość skanowania. W dalszej części artykułu przedstawiono wyniki optymalizacji parametrów pracy aparatury pomiarowej.

Optymalizacja energii lasera

Maksymalna energia lasera wynosi 9mJ tj. 100%. Wartości sygnału analitycznego oraz RSD nie podlegały znacznym zmianom podczas optymalizacji wartości energii. Energia była optymalizowana w zakresie od 20% do 100%. Na rys. 4 przedstawiono wykres przedstawiający sygnał analityczny podczas optymalizacji wartości energii a na rys. 5 wykres średnich wartości sygnału analitycznego i RSD(%)



Rys. 4. Wykres intensywności sygnału w funkcji czasu dla optymalizacji energii.



Rys. 5. Wykres wartości średnich sygnałów i RSD(%) dla optymalizacji energii.

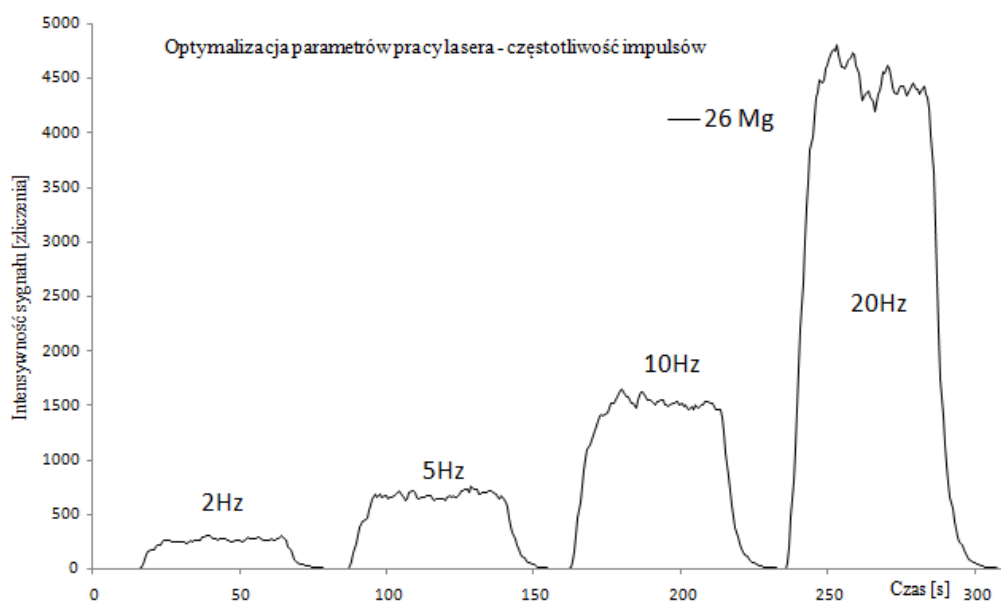
Optymalizacja częstotliwości pulsów

Częstotliwość pulsów wpływa w bardzo dużym stopniu na ilość materiału, który ulega ablacji oraz pogłębienie krateru poablacyjnego. Obserwowano częstotliwości pulsów o wartościach 2Hz, 5Hz, 10Hz oraz 20Hz. Na rys. 6 i 7 przedstawiono wykresy przedstawiające wyniki optymalizacji oraz zdjęcie obrazujące powierzchnię próbki modelowej.

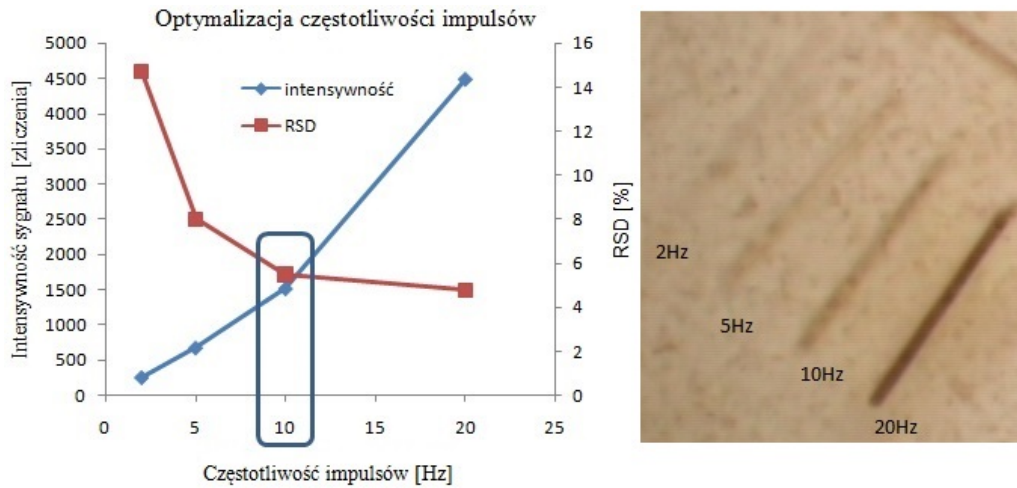
Jako wartość optymalną uznano 10Hz, mimo że częstotliwość 20Hz pozwala uzyskać wyższe intensywności sygnałów z zachowaniem niskiej wartości RSD jednak zbyt głębokie prowadzenie ablacji może powodować przebicie rzeczywistej próbki tkanki na wylot.

Optymalizacja prędkości skanowania

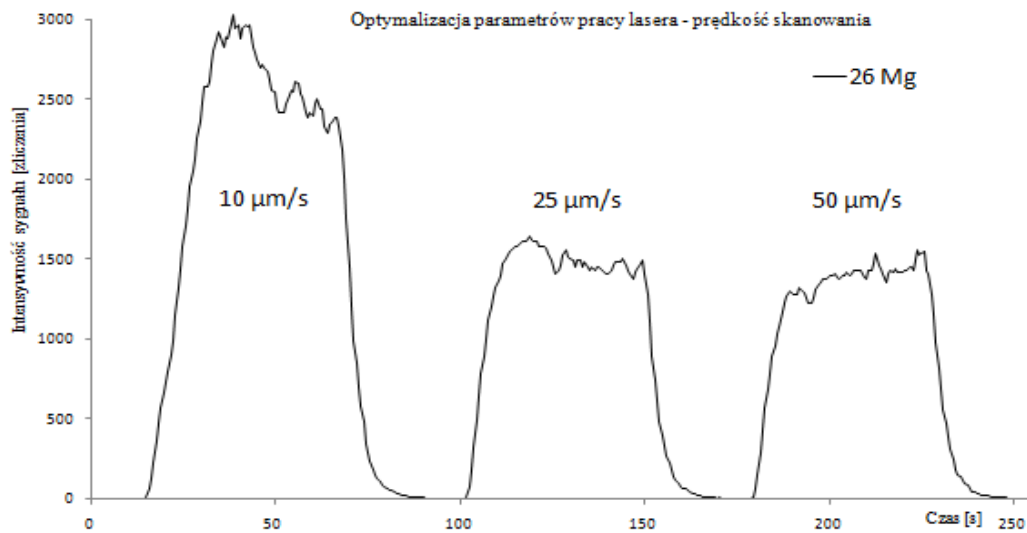
Prędkość skanowania determinuje prędkość z jaką wiązka lasera będzie przemieszczać się po powierzchni badanej próbki. Podobnie jak w przypadku częstotliwości pulsów prędkość skanowania wpływa zarówno na ilość pobieranego z powierzchni próbki materiału jak i głębokość krateru poablacyjnego. Na rys. 8 i 9 przedstawiono wykresy przedstawiające wyniki optymalizacji oraz zdjęcie obrazujące powierzchnię próbki modelowej.



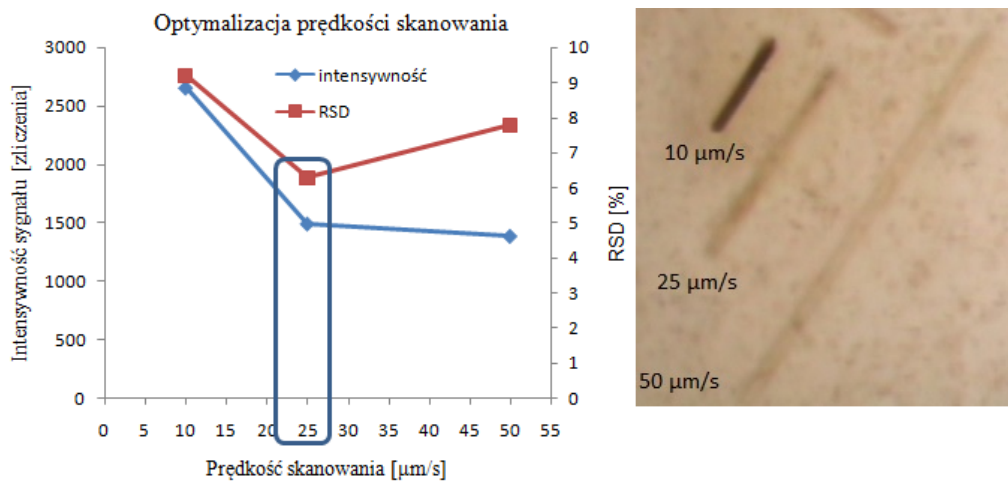
Rys. 6. Wykres intensywności sygnału w funkcji czasu dla optymalizacji częstotliwości impulsów.



Rys. 7. Wykres wartości średnich sygnałów i RSD(%) oraz ilustracja powierzchni próbki dla optymalizacji częstotliwości pulsów.



Rys. 8. Wykres intensywności sygnału w funkcji czasu dla optymalizacji prędkości skanowania.



Rys. 9. Wykres wartości średnich sygnałów i RSD(%) oraz ilustracja powierzchni próbki dla optymalizacji częstotliwości prędkości skanowania.

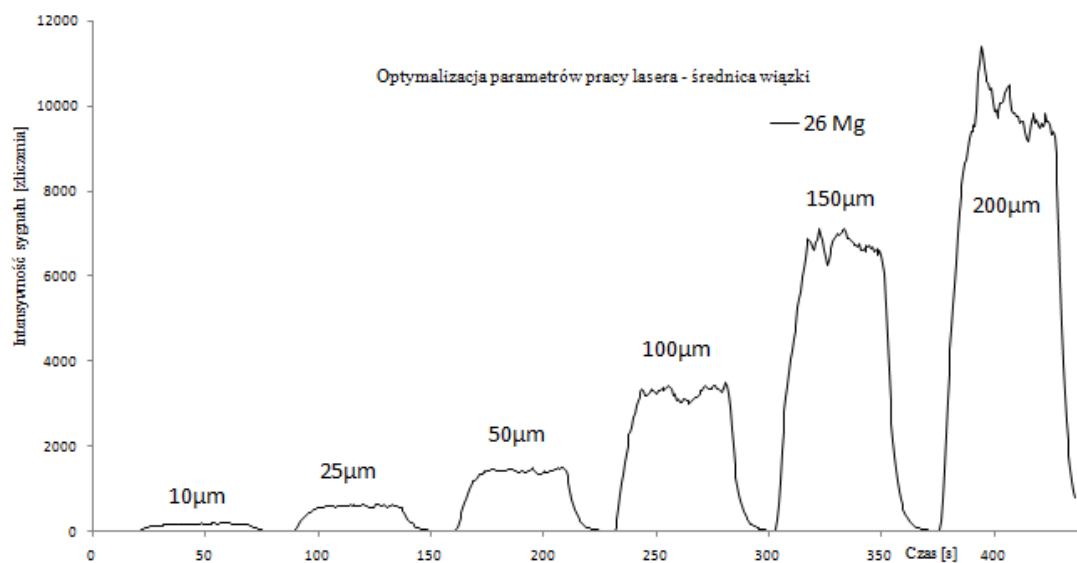
Fakt, że linie poablacyjne widoczne na rys. 9 nie mają równej długości wynika z zachowania stałego czasu prowadzenia ablacji. Wybrana, optymalna szybkość skanowania to 25 $\mu\text{m/s}$.

Optimalizacja średnicy wiązki

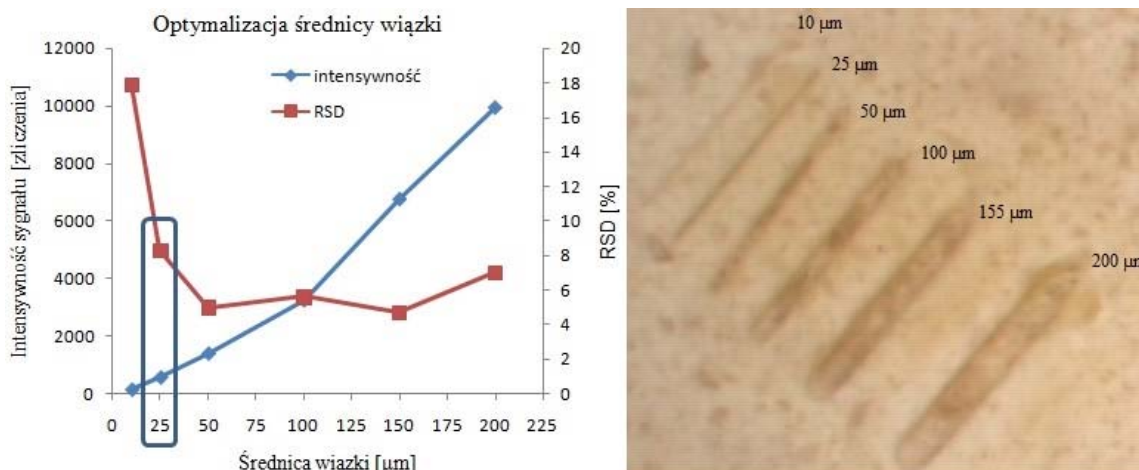
Zwiększenie średnicy wiązki w największym stopniu spośród wszystkich parametrów wpływa na ilość materiału, który ulega ablacji, a co za tym idzie na wartość intensywności sygnału. Nie mniej należy zaznaczyć, że zwiększenie średnicy wiązki może

prowadzić do nadmiernego kruszenia próbki. Na rys. 10 i 11 przedstawiono wykresy przedstawiające wyniki optymalizacji oraz zdjęcie obrazujące powierzchnię próbki modelowej.

Ponieważ tkanki miękkie wykazują dużą niehomogeniczność, jako optymalną średnicę wiązki wybrano wartość 25 μm pozwalającą na ablację mniejszych fragmentów próbki. Ponadto zastosowanie mniejszej średnicy wiązki lasera pozwoli na uzyskanie większej rozdzielczości podczas ilościowej wizualizacji rozmieszczenia pierwiastków.



Rys. 10. Wykres intensywności sygnału w funkcji czasu dla optymalizacji średnicy wiązki.



Rys. 11. Wykres wartości średnich sygnałów i RSD oraz ilustracja powierzchni próbki dla optymalizacji średnicy wiązki.

Podsumowanie

W procesie optymalizacji parametrów pracy aparatury analitycznej wybrano wartości następujących parametrów: energia lasera, częstotliwość pulsów, średnica wiązki oraz szybkość skanowania. Wyboru dokonywano

na podstawie wartości intensywności sygnałów analitycznych oraz RSD(%) z uwzględnieniem zachowania próbki pod wpływem wiązki lasera oraz aspektów istotnych w analizie próbek rzeczywistych takich jak ich rozmiary oraz rozmieszczenie analitów. Ustalone parametry pozwalają prowadzić ablację eliminując nadmierne

niszczenie próbki w trakcie procesu oraz zachowując wysokie intensywności sygnałów analitycznych i dobrą precyzję pomiarów. W tabeli 1 zebrano wartości

zoptymalizowanych parametrów pracy aparatury do ablacji laserowej.

Tab. 1. Optymalne wartości parametrów pracy aparatury pomiarowej.

Parametry optymalne	
Długość fali	266 nm
Energia	80%
Średnica wiązki	25 μm
Częstotliwość impulsów	10 Hz
Prędkość skanowania	25 $\mu\text{m/s}$

Literatura

1. Dean, R.J., 2005. Practical inductively coupled plasma spectrometry, Wiley, 2005.
2. Hare, D., Austin, Ch., Doble, P., Quantification strategies for elemental imaging of biological samples using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Analyst*, 2012, 137, pp. 1527–1537.
3. Hill, J.S., Inductively coupled plasma spectrometry and its applications, Wiley-Blackwell, 2007.
4. Jurowski, K., Buszewski, B., Piekoszewski, P., The analytical calibration in (bio) imaging/mapping of the metallic elements in biological samples – Definitions, nomenclature and strategies: State of the art., *Talanta*, 2015, Jan., 131, pp. 273–285.
5. Thomas, R., Practical guide to ICP-MS: A tutorial for beginners, CRC Press, 2013.
6. Żyrnicki, W., Borkowska-Burnecka, J., Bulska, E., Szmyd E., Metody analitycznej spektrometrii atomowej - teoria i praktyka, Wyd. Malamut, Warszawa 2010.