

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Analýza tkání pomocí laserové ablace a ICP-MS

Autor práce:

Bc. Martina Kornelová

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

Ing. David Milde, Ph.D.

Konzultant:

RNDr. Tomáš Pluháček

Olomouc 2016

SOUHRN

Tato diplomová práce se zabývá kvantitativním stanovením 4 vybraných kovů (Mn, Fe, Cu a Zn) v biologických tkáních (myším mozku a ledvinách) pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem ve spojení s laserovou ablací. V teoretické části jsou popsány základní principy a instrumentace LA-ICP-MS, včetně přípravy vzorků. Součástí práce je literární rešerše, která se zabývá kvantifikačními postupy a aplikacemi laserové ablace ve spojení s ICP-MS se zaměřením na biologické vzorky, hlavně tedy mozkovou tkáň.

Experimentální část se zabývá vývojem metody LA-ICP-MS a její optimalizací pro účely hmotnostně spektrometrického zobrazování 4 biogenních prvků v živočišných tkáních. Experimentálně zjištěné optimální podmínky byly použity pro měření prostorové distribuce Mn, Fe, Cu a Zn tří tkáňových řezů dvou odlišných biologických tkání pomocí LA-ICP-MS. Jednalo se o neonatální myší mozkovou tkáň a tkáň myších ledvin. Pro kvantitativní analýzu prostorové distribuce byly použity tři různé kalibrační postupy – kalibrace pomocí agarózových gelů jednobodové kalibrace pomocí tablet z CRM a „matrix-matched“ kalibraci standardním přídatkem.

SUMMARY

This thesis deals with the quantitative determination of the four selected metals (Mn, Fe, Cu and Zn) in biological tissues (mouse brain and kidney) by using inductively coupled plasma mass spectrometry combined with laser ablation. The basic principles and instrumentation of inductively coupled plasma mass spectrometry with laser ablation and preparation of samples are described in theoretical part. The thesis includes a literature review that deals with the quantification procedures and applications of LA-ICP-MS focused on biological samples, mainly brain tissue.

Experimental part focuses on the development of method LA-ICP-MS and its optimisation for mass spectrometric imaging of 4 biogenic elements in biological tissues. Experimentally determined optimal conditions were used to measure the spatial distribution of Mn, Fe, Cu and Zn in three section of tissues from two biological tissues by LA-ICP-MS. Following tissues were used: a neonatal mouse brain tissue and mouse kidney tissue. Three calibration methods were used for quantitative analyses of spatial distribution – calibration with agarose gels, calibration with CRM and „matrix-matched“ calibration.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným dohledem Ing. Davida Mildeho, Ph.D. a RNDr. Tomáše Pluháčka. Veškeré literární zdroje, které jsem při vypracování použila, jsem uvedla v seznamu literatury.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne 22. dubna 2016

.....

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu mé diplomové práce Ing. Davidu Mildemu, Ph.D. a především RNDr. Tomáši Pluháčkovi za jejich cenné rady, užitečné připomínky, ochotu, čas a hlavně trpělivost při zpracování mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Ivu Juránkovi DrSc. a Mgr. Dominice Luptákové za poskytnutí tkáňových řezů neonatální mozkové tkáně pocházejících z hypoxicko-ischemického myšího modelu, ale i Katedře analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci za poskytnutí přístrojů a chemikálií pro vypracování mé diplomové práce.

A v neposlední řadě také mé rodině, která mě podporovala po celou dobu mého studia.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE S INDUKČNĚ VÁZANÝM PLAZMATEM	2
2.1.1. ZAVÁDĚNÍ VZORKŮ DO PLAZMATU.....	3
2.1.1.1. ZAVÁDĚNÍ KAPALNÝCH VZORKŮ DO PLAZMATU	3
2.1.1.2. ZAVÁDĚNÍ PEVNÝCH VZORKŮ DO PLAZMATU	6
2.1.2. PLAZMA	7
2.1.2.1. MIKROVLNNĚ INDUKOVANÉ PLAZMA	7
2.1.2.2. STEJNOSMĚRNĚ VÁZANÉ PLAZMA	7
2.1.2.3. INDUKČNĚ VÁZANÉ PLAZMA.....	8
2.1.3. INTERFACE	11
2.1.4. IONTOVÁ OPTIKA.....	12
2.1.5. HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTORY	13
2.1.5.1. KVADRUPÓLOVÝ ANALYZÁTOR.....	14
2.1.5.2. PRŮLETOVÝ ANALYZÁTOR	14
2.1.5.3. SEKTOROVÝ ANALYZÁTOR.....	16
2.1.6. DETEKTORY	18
2.1.6.1. FARADAYOVA KLEC	18
2.1.6.2. ELEKTRONOVÝ NÁSOBIČ S ODDĚLENÝMI DYNODAMI	19
2.1.7 INTERFERENCE.....	20
2.1.7.1. SPEKTRÁLNÍ INTERFERENCE.....	20
2.1.7.2. NESPEKTRÁLNÍ INTERFERENCE	21
2.1.7.3. ELIMINACE INTERFERENCÍ	21
2.2. LASEROVÁ ABLACE	24
2.2.1. PRINCIP	25
2.2.2. LASERY	26
2.2.2.1. DRUHY LASERŮ.....	26

2.2.2.2. PARAMETRY LASERŮ OVLIVŇUJÍCÍ ABLAČNÍ PROCES	28
2.2.3. PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO LASEROVOU ABLACI	29
2.2.4. VÝHODY A NEVÝHODY LA	30
2.3. KVANTITATIVNÍ ANALÝZA	32
2.4. APLIKACE	36
2.4.1. BIOLOGICKÉ VZORKY	38
2.4.1.1. ŽIVOČIŠNÁ TKÁŇ	39
2.4.1.2. MOZKOVÁ TKÁŇ	41
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	46
3.1. CHEMIKÁLIE, POMŮCKY A PŘÍSTROJE	46
3.1.1. CHEMIKÁLIE	46
3.1.2. POMŮCKY	47
3.1.3. PŘÍSTROJE	47
3.1.4. ANALYZOVANÉ VZORKY	48
3.2. PRACOVNÍ POSTUPY	48
3.2.1. PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍCH AGARÓZOVÝCH GELŮ	48
3.2.2. CRM LISOVANÉ TABLETKY - KALIBRAČNÍ STANDARDY	52
3.2.3. KALIBRACE STANDARDNÍM PŘÍDAVKEM	52
3.3. POUŽITÉ INSTRUMENTÁLNÍ TECHNIKY	53
3.4. OPTIMALIZACE	53
3.4.1. OPTIMALIZACE ENERGIE LASERU	53
3.4.2. OPTIMALIZACE PRŮTOKU HÉLIA KOLIZNÍ CELOU	54
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	55
4.1. OVĚŘENÍ KONCENTRACE KALIBRAČNÍCH STANDARDŮ	55
4.1.1. ANALÝZA KALIBRAČNÍ ŘADY STANDARDNÍCH ROZTOKŮ	56
4.1.2. ANALÝZA REFERENČNÍCH MATERIÁLŮ	58
4.2. OPTIMALIZACE	60
4.2.1. OPTIMALIZACE ENERGIE LASERU	60
4.2.2. OPTIMALIZACE PRŮTOKU HÉLIA KOLIZNÍ CELOU	64
4.3. KALIBRACE	67
4.3.1. KALIBRACE AGARÓZOVÝMI GELY	67
4.3.2. JEDNOBODOVÁ KALIBRACE (TABLETY Z CRM)	69

4.3.3. KALIBRACE STANDARDNÍM PŘÍDAVKEM	70
4.4. IMAGING ŽIVOČIŠNÝCH TKÁNÍ	73
5. ZÁVĚR	80
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	82
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	84

1. ÚVOD

Předkládaná diplomová se je zaměřena na hmotnostně spektrometrické zobrazování prostorové distribuce biogenních prvků (Mn, Fe, Cu a Zn) v živočišných tkáních, a to v kontrolním a hypoxicko-ischemicky poškozeném neonatálním myším mozku a myší ledvině pomocí spojení laserové ablace s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (LA-ICP-MS). V současné době patří technika LA-ICP-MS mezi nejrozšířenější mikroanalytické techniky umožňující multi-prvkovou kvantitativní analýzu či analýzu izotopických poměrů na stopové až ultra-stopové koncentrační úrovni. Mezi stěžejní a nezastupitelné části hmotnostně spektrometrického zobrazování patří vhodná volba a následná analýza kalibračních standardů v odpovídajícím koncentračním rozsahu sloužící ke kvantifikaci distribuce prvků napříč analyzovaného biologického řezu. Bez ohledu na pokrok a zlepšení kvantifikačních postupů zůstává stále největším problémem kvantitativní analýzy samotná kalibrace, respektive nedostatek komerčně dostupných kalibračních standardů¹.

Experimentální část diplomové práce je zaměřena jednak na vývoj a optimalizaci podmínek spojení laserové ablace s ICP-MS pro hmotnostně spektrometrické zobrazování (Mn, Fe, Cu, a Zn) v biologických vzorcích. Dále byla věnována pozornost přípravě kalibračních standardů a testování tří různých kalibračních postupů, a to agarózových gelů, jednobodových CRM kalibračních standardů a v neposlední řadě „matrix-matched“ kalibraci standardním přídatkem pro kvantitativní analýzu prvků v biologické tkáni. Optimalizované podmínky spojení LA-ICP-MS byly dále použity ke kvantitativnímu hmotnostně spektrometrickému zobrazování prostorové distribuce Mn, Fe, Cu a Zn ve vzorcích myšího mozku a ledvin. Každá z tkání byla analyzována proměnlivou velikostí laserového svazku (85, 110 a 150 μm) a tomu odpovídající rychlostí posunu laseru v závislosti na požadovaném laterálním (prostorovém) rozlišení. Všechny aplikované kalibrační postupy poskytují velice podobné výsledky o obsahu biogenních kovů v biologických tkáních. Obecně lze říci, že nejnižších hodnot koncentrací pro všechny vybrané izotopy bylo dosaženo aplikováním jednobodové kalibrační závislosti z CRM 1566b. Naopak nejvyšších hodnot koncentrací bylo dosaženo dosazením naměřených hodnot intenzit do rovnic kalibračních závislostí získaných proměřením agarózových gelů a „matrix-matched“ standardů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE S INDUKČNĚ VÁZANÝM PLAZMATEM

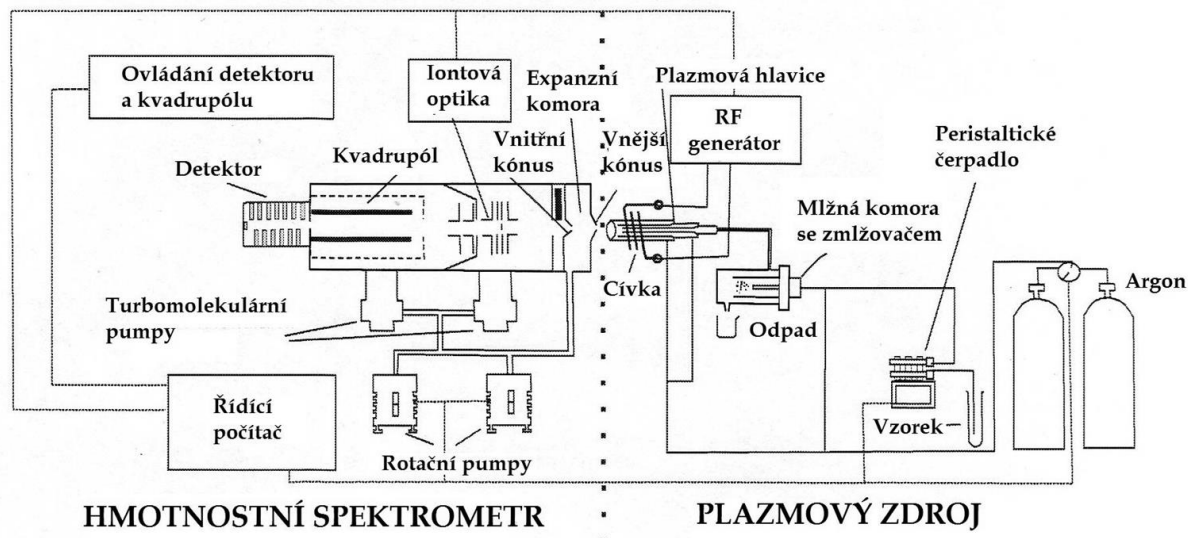
Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) je analytická technika, jež našla uplatnění zejména pro multielementární analýzu stopových a ultrastopových koncentrací prvků. ICP-MS patří k nejuniverzálnějším metodám prvkové analýzy umožňující stanovení většiny kovových prvků periodické soustavy prvků v širokém koncentračním rozsahu (jednotky $\mu\text{g.kg}^{-1}$ až po stovky mg.kg^{-1}). Charakteristickými vlastnostmi ICP-MS jsou již zmíněná použitelnost pro většinu prvků periodické soustavy prvků, nízké meze detekce ($\mu\text{g.l}^{-1}$ až pg.l^{-1}), rychlost a selektivita analýzy, široký lineární dynamický rozsah, minimum nespektrálních interferencí, schopnost analýzy kapalných, pevných i plyných vzorků, a v neposlední řadě informace o izotopovém složení látky^{2,3}.

Metoda ICP-MS našla uplatnění v řadě aplikací, obecně při analýze stopových až ultrastopových koncentrací kovových prvků v životním prostředí, potravinářském průmyslu, geologii a klinických vzorcích. Významnou aplikací ICP-MS je spojení s chromatografickými (HPLC, GC) a elektroforetickými (CZE, ITP) separačními metodami, čehož se využívá ve speciální analýze, kde ICP-MS plní funkci detektoru^{2,3}.

Hlavními součástmi přístroje ICP-MS jsou systém zavádění vzorků do plazmatu, plazmová hlavice, iontová optika, hmotnostní analyzátor a detektor. Tyto součásti přístroje lze rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou součásti pracující za atmosférického tlaku, kterými jsou systém zavádění vzorků (u kapalných vzorků je to zmlžovač a mlžná komora, pro zavádění pevných vzorků například laserová ablace či elektrotermické vypařování) a plazmová hlavice. Druhou skupinou jsou součásti pracující za vysokého vakua. Jedná se o iontovou optiku, hmotnostní analyzátor a detektor. Nezbytnou součástí celého přístroje je interface, který zajišťuje přechod iontů z atmosférické části přístroje do hmotnostního analyzátoru pracujícího za vakua^{2,3,4}.

Vzorek je veden skrze systém zavádění vzorku do plazmové hlavice, kde dochází k ionizaci a tedy ke vzniku iontů. Kladně nabitě ionty jsou vedeny skrz interface a iontovou

optiku do hmotnostního analyzátoru, kde dochází k separaci iontů podle poměru m/z . Následně proud rozseparovaných iontů dopadá na detektor a je převáděn na měřitelný elektrický signál^{2,3,4}.



Obrázek 1: Obecné schéma hmotnostního spektrometru s indukčně vázaným plazmatem²

2.1.1. ZAVÁDĚNÍ VZORKŮ DO PLAZMATU

ICP-MS se využívá nejčastěji k analýze kapalných vzorků, které jsou převáděny na jemný aerosol zmlžováním. Méně často se analyzují pevné vzorky, kde se ke generování aerosolu využívá laserová ablace nebo elektrotermické vypařování. Systémy zavádění obou těchto typů vzorků se od sebe významně liší. Speciální technikou, kdy jsou do plazmatu zaváděny plynné vzorky, je generování těkavých hydridů (HG-ICP-MS), kdy je vzorek přímo zaváděn proudem plynu do indukčně vázaného plazmatu².

2.1.1.1. ZAVÁDĚNÍ KAPALNÝCH VZORKŮ DO PLAZMATU

Systém zavádění kapalného vzorku do plazmatu se skládá ze dvou částí, zmlžovače a mlžné komory. Kapalným vzorkem je do zmlžovače přiváděn peristaltickým čerpadlem. Ve zmlžovači je kapalina následně pneumatickým působením plynu (argonu) převedena na jemný aerosol. Jemný aerosol je dále veden do mlžné komory, kde dochází k oddělení velkých kapek, u kterých by v ICP nedošlo k úplnému vypaření a tudíž by mohly vést k nestabilitě plazmatu^{2,3,5}.

Peristaltické čerpadlo

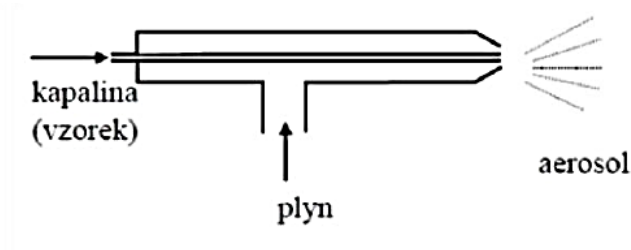
Peristaltické čerpadlo se skládá ze soustavy malých otočných válečků v kruhovém uspořádání, na něž jsou přitisknuty celkem 3 hadičky, a to hadička s analyzovanou kapalinou, interním standardem a v neposlední řadě hadička odvádějící nezmlžený roztok z mlžné komory přímo do odpadu. Neměnným pohybem peristaltické pumpy a tlakem válečků je způsoben plynulý pohyb kapalného roztoku uvnitř hadičky. Hlavní funkcí peristaltického čerpadla je zajištění konstantního toku kapalného roztoku bez ohledu na vlastnostech roztoku. Další již zmíněnou funkcí je odvod nezmlženého roztoku do odpadu^{2,5}.

Zmlžovač

V pneumatickém zmlžovači dochází k převodu kapaliny na jemný aerosol, který putuje dále do mlžné komory, a to nejčastěji pneumatickým působením průtoku plynu (nejčastěji argonu). Mezi nejpoužívanější pneumatické zmlžovače patří zmlžovač koncentrický, mikrokoncentrický a úhlový^{3,5}.

Koncentrický zmlžovač

Principem koncentrického zmlžovače je rozprášení kapalného vzorku proudícího tenkou kapilárou, který na konci kapiláry přichází do kontaktu s rychle proudícím plynem, argonem. Spojení rychle proudícího plynu a pomalu proudící kapaliny způsobí rozprášení kapaliny v plynu. Jako konstrukční materiál se nejčastěji používá křemen, borosilikátové sklo nebo polymerní materiály, které jsou navíc odolné proti koroziivním roztokům. Průtok vzorku se pohybuje okolo 1 až 3 ml/min. Koncentrické zmlžovače jsou vhodné pro analýzy čistých roztoků. Při analýzách vzorků se složitou maticí, nebo zasolených vzorků může dojít k ucpání tenké kapiláry zmlžovače^{2,3,5}.



Obrázek 2: Schéma koncentrického zmlžovače (cit.⁶)

Mikrokoncentrický zmlžovač

Mikrokoncentrický zmlžovač pracuje na principu koncentrického zmlžovače, kdy je na proud vzorku proudícího velmi tenkou kapilárou aplikován vyšší průtok (tlak) nosného plynu, argonu. Rychlost nasávání vzorku je pod hodnotou 0,1 ml/min. Na výrobu těchto zmlžovačů se nejčastěji používají polymerní materiály (polyvinylfluorid nebo polytetrafluorethylen), ale také borosilikátové sklo a křemen. Použitím velmi malého průměru kapiláry vzniká velmi jemný aerosol, a proto je mikrokoncentrický zmlžovač účinnější než zmlžovač koncentrický. Nevýhodou tohoto zmlžovače je vysoká náchylnost kapilár k ucpaní. Proto tento zmlžovač není vhodný pro vzorky obsahující vysoké procento rozpuštěných látek a suspenze. Mikrokoncentrické zmlžovače jsou vhodné pro analýzy vzorků s malým obsahem rozpuštěných látek a při analýzách, kdy máme k dispozici jen malé množství vzorku^{2,3,5}.

U úhlového zmlžovače je proud argonu veden v kolmém směru ke kapiláře vedoucí vzorek. K tvorbě aerosolu dochází opět v důsledku kontaktu rychle proudícího plynu s proudem vzorku. Existuje i několik dalších typů zmlžovačů. Například ultrazvukový zmlžovač, kde je jemný aerosol generován vibracemi piezoelektrického krystalu, nebo V-groove a Babingtonův zmlžovač, které jsou modifikací úhlového zmlžovače a nejčastěji se používají pro zmlžování suspenzních vzorků v ICP-OES. Zmlžování je možné i pomocí termospreje, respektive pomocí termosprejového zmlžovače. U tohoto typu zmlžovače je aerosol vytvářen na konci vyhřívané kapiláry jako směs částečně odpařeného rozpouštědla a jemných kapiček vzorku^{3,5,7}.

Mlžná komora

Hlavní úkolem mlžné komory je odstranění větších kapek z aerosolu produkovaného zmlžovačem, dále pak vykompenzovat zmlžovací pulzy vyvolané pulzacemi peristaltického čerpadla. V dnešní době jsou mlžné komory vybaveny externím chlazením, které redukuje množství rozpouštědel vstupujících do ICP a zároveň zajišťuje tepelnou stabilitu vzorku. Samotné chlazení mlžné komory sebou přináší řadu výhod, zvyšuje stabilitu signálu, redukuje tvorbu specií oxidů a omezuje zatížení plazmatu například při použití těkavých organických rozpouštědel. V dnešní době se používají v podstatě jen dva základní typy mlžných komor, Scottova a cyklonická mlžná komora^{2,3,5}.

Scottova mlžná komora

Mlžná komora dle Scotta se skládá ze dvou soustředných trubic, kdy vnitřní trubicí se přivádí aerosol ze zmlžovače a vnější trubicí se velmi jemný aerosol odvádí do plazmatu a z kondenzované kapky jsou pomocí peristaltického čerpadla odváděny do odpadu. Na konci vnitřní trubice je přiváděný aerosol nucen změnit směr o 180° a dostává se do vnější trubice, kde se nachází vstup do plazmové hlavice. Při tvorbě jemného aerosolu se kromě interakcí polydisperzního aerosolu se stěnou mlžné komory také uplatňují gravitační síla a vzájemná koagulace kapek^{2,5,8}.

Cyklonická mlžná komora

Cyklonická mlžná komora pracuje na principu odstředivých sil. Tangenciálně zaváděný aerosol vzorku a argonu způsobuje uvnitř mlžné komory vír, díky kterému dochází k separaci/diskriminaci zaváděných kapiček dle jejich velikosti. Jemný aerosol je spolu s argonem veden do plazmové hlavice, naopak velké kapky jsou po kontaktu s povrchem mlžné komory odváděny do odpadu. Nejčastějšími konstrukčními materiály jsou sklo a křemen, používají se také polymerní materiály. Cyklonická mlžná komora vykazuje obecně vyšší účinnost pro čisté vzorky^{2,5,8}.

2.1.1.2. ZAVÁDĚNÍ PEVNÝCH VZORKŮ DO PLAZMATU

Pevné vzorky lze zavádět do plazmatu přímo, aniž by musely být předem převedeny do roztoku pomocí různých druhů mineralizačních procesů. Analýzy pevných vzorků se nejčastěji provádí pomocí laserové ablace, nebo elektrotermického vypařování. Podrobnému popisu principu a zejména instrumentace používané v laserové ablacii bude věnována samostatná kapitola (kapitola 2.2.). Dále je možné využít obloukového a jiskrového výboje, které se využívají ve spojení s ICP-MS jen zřídka, protože jsou vhodné jen pro homogenní nebo homogenizované vzorky.

Elektrotermické vypařování (ETV)

Elektrotermické vypařování se používá k analýzám pevných suspenzí, ale i kapalných vzorků. Tato technika využívá elektrotermicky vyhřívanou grafitovou kyvetu. Po nadávkování velmi malého množství vzorku (10 – 50 µl) do kyvety, dochází postupně ke zvyšování teploty a tudíž k sušení (80 °C), žhání (300 – 450 °C) a nakonec k odpařování

vzorku (2800 °C). Odpařený vzorek je pomocí nosného plynu (argonu) transportován do plazmové hlavice. Mezi výhody této techniky patří eliminace složek matrice, které dosáhneme postupným zvyšováním teploty, dále pak velmi malá spotřeba vzorku. Nevýhodou elektrotermického vypařování oproti klasickým zmlžovačům je vznik přechodných signálů s velmi malou dobou trvání, jen několik sekund, to umožňuje analýzu pouze malého počtu prvků^{2,3,4}.

2.1.2. PLAZMA

Plazma je definováno jako ionizovaný plyn, který je tvořen neutrálními atomy inertního plynu, nejčastěji argonu, ale i jeho kladně nabitými ionty a elektrony. Plazma je elektricky vodivé, ale jako celek je kvazineutrální. Vznik plazmatu a jeho udržení je podmíněno dodáváním vnější energie ve formě elektrického pole, jenž musí být vyšší než ionizační energie atomů plynu. Podle použitého elektrického pole rozlišujeme mikrovlnně indukované plazma (MIP – microwave induced plasma), stejnosměrně vázané plazma (DCP – direct current plasma) a indukčně vázané plazma (ICP – inductively coupled plasma)^{2,3,4}.

2.1.2.1. MIKROVLNNĚ INDUKOVANÉ PLAZMA

U mikrovlnně indukovaného plazmatu se na plazmový plyn (argon nebo hélium) aplikuje mikrovlnná energie (100 – 200 W), následkem toho vzniká uvnitř skleněné výbojové trubice plazmový výboj ve tvaru prstence. Výbojová trubice je vyrobena ze skla nebo křemene. Mikrovlnně indukované plazma je náchylné k matričním vlivům, které způsobují nestabilitu a zhášení plazmatu. Ke zhášení dochází i při analýze kapalných vzorků, proto není MIP vhodné pro analýzu reálných kapalných vzorků. Héliové mikrovlnně indukované plazma se používá v plynové chromatografii jako detektor nekovových prvků (např. O, S, P, Cl a I)^{2,3,4}.

2.1.2.2. STEJNOSMĚRNĚ VÁZANÉ PLAZMA

Stejnosemálně vázané plazma vzniká ionizací plynu (argonu) zaváděného mezi 2 – 3 elektrody, mezi kterými protéká vysoký elektrický proud. Ionizací plynu vzniká plazma ve tvaru písmene Y. V analytické chemii se stejnosměrně vázané plazma používá jen výjimečně, protože nevýhodou tohoto uspořádání je nestabilita plazmatu a tvorba interferencí.

Obrovskou výhodou DCP je možnost analýzy vzorků s velkým obsahem rozpuštěných i nerozpuštěných pevných látek a suspenzí^{2,3,4}.

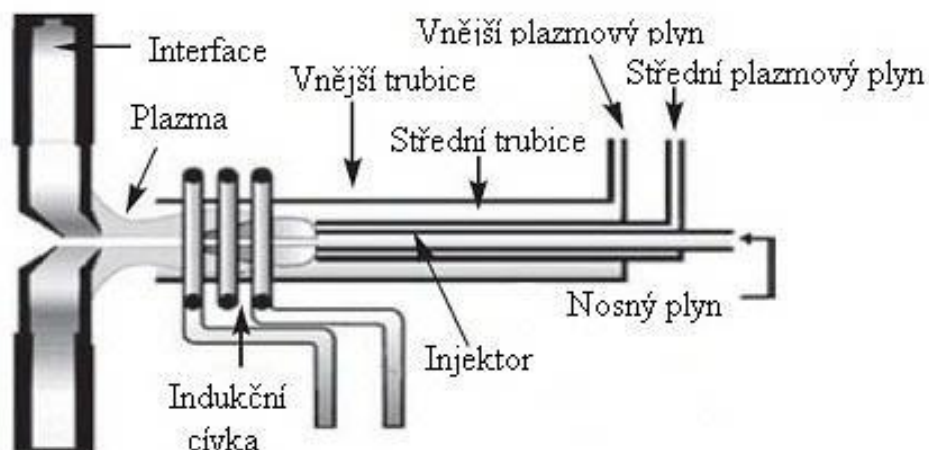
2.1.2.3. INDUKČNĚ VÁZANÉ PLAZMA

Vzhledem k omezeným aplikacím stejnosměrně vázaného plazmatu a mikrovlnně indukovaného plazmatu se v ICP-MS a v ICP-OES používá jako výhradní zdroj indukčně vázané plazma. Systém pro vznik a udržení indukčně vázaného plazmatu je složen ze tří částí: plazmová hlavice, radiofrekvenční cívka a napájecí zdroj (vysokofrekvenční generátor)^{2,3,9}.

Plazmová hlavice

Plazmová hlavice je složena ze tří soustředných křemenných trubic (vnější, střední a vnitřní), kterými je veden plazmový plyn, nejčastěji argon. Každá trubice má vlastní tok plazmového plynu plnící svou vlastní charakteristickou funkci. Vnější plazmový plyn proudící vnější trubicí s průtokem okolo 12 – 20 l.min⁻¹ slouží pro chlazení plazmové hlavice. Plyn je zaváděn tangenciálně a odděluje plazma od trubice, čímž zabraňuje jejímu roztavení a přispívá k charakteristickému vzhledu plazmatu ve tvaru kapky. Střední trubicí prochází střední plazmový plyn s rychlostí průtoku v rozmezí 1 – 2 l.min⁻¹. Tomuto plynu se říká pomocný. Stabilizuje výboj a odděluje plazma od vnitřní trubice, čímž ji chrání před roztavením. Průtok plynu vnitřní trubicí bývá nejnižší, okolo 1 l.min⁻¹. Jeho funkcí je transportovat aerosol vzorku a zároveň vytvářet analytický kanál uprostřed plazmatu^{2,3,9}.

Plazmové hlavice jsou vyráběny ve dvou možných uspořádáních, jako kompaktní, kdy jsou všechny tři trubice spojeny v jeden pevný celek, nebo může být vnitřní trubice odnímatelná. Tohle uspořádání se nazývá kombinované. Pro analýzu vysoce korozivních vzorků bývají vnitřní trubice, neboli injektory, vyráběny z jiných materiálů, například oxidu hlinitého, platiny nebo safíru^{2,9}.



Obrázek 3: Schéma plazmové hlavice (cit.²)

Plazmová hlavice je umístěna v horizontální poloze ve vzdálenosti asi 10 – 20 mm od interface a je obklopena indukční cívkou, na kterou je z vysokofrekvenčního generátoru dodávána energie. Tato cívka musí být, na rozdíl od cívek využívaných v ICP-OES, uzemněna. Uzemněním cívky zamezíme vzniku možného sekundárního výboje mezi indukční cívkou a interface. Sekundární výboj by mohl negativně ovlivnit plazma, jeho stabilitu a chování^{2,9}.

Vysokofrekvenční generátory pro ICP pracují při dvou frekvencích, a to 27,1 a 40,7 MHz. Tyto frekvence neinterferují s žádnými jinými frekvencemi. Existují dva typy generátorů, volně kmitající a krystalově řízený generátor. Nevýhodou krystalově řízeného generátoru oproti volně kmitajícímu, jenž neobsahuje žádné pohyblivé části, je, že nedokáže okamžitě vykompenzovat změnu impedance. Moderní vysokofrekvenční generátory pracují obecně s účinností 70 – 75 %, a tudíž 70 – 75 % dodávané energie se využívá k tvorbě plazmatu^{2,3,9}.

Princip výboje

Do vnější trubice plazmové hlavice je tangenciálně veden proud argonu. Jakmile začne argon procházet vnější trubicí, je na cívku vložena radiofrekvenční energie (v závislosti na vzorku 750 – 1500 W), čímž v cívce začne procházet střídavý proud se stejnou frekvencí jakou má radiofrekvenční generátor. Oscilující proud vyvolá v horní části plazmové hlavice

vznik silného elektromagnetického pole. Vzniklé elektromagnetické pole je zdrojem energie pro udržení plazmatu, nicméně k zažehnutí plazmatu je potřeba impuls. Tímto impulsem je vysokonapěťový pulz z Teslova generátoru, který je aplikován na proud argonu v elektromagnetickém poli. Tento výboj způsobí odtržení elektronů z některých atomů argonového plynu, které jsou poté v magnetickém poli urychleny a při srážce s neutrálními atomy plynu jim předávají svou energii a následně dojde k uvolnění nových elektronů. Tato kolizí indukovaná ionizace argonu způsobí řetězovou reakci, a tvorbu prstencového plazmatu složeného z neutrálních a kladně nabitých iontů argonu a elektronů. Plazma je udržováno indukovaným vysokofrekvenčním proudem. Nakonec je do plazmatu vnitřní trubici plazmové hlavice zaveden aerosol vzorku^{2,8,9}.

Princip ionizace vzorku

Výboj indukčně vázaného plazmatu se dělí na dvě oblasti, na indukční zónu a analytický kanál. Obě oblasti se od sebe liší. V indukční zóně je energie cívky převáděna na plazma a v analytickém kanále se hromadí vzorek přiváděný proudem argonu. V obou oblastech se liší i teplota, pohybuje se v rozmezí 6000 – 10000 K (cit.^{3,4}).

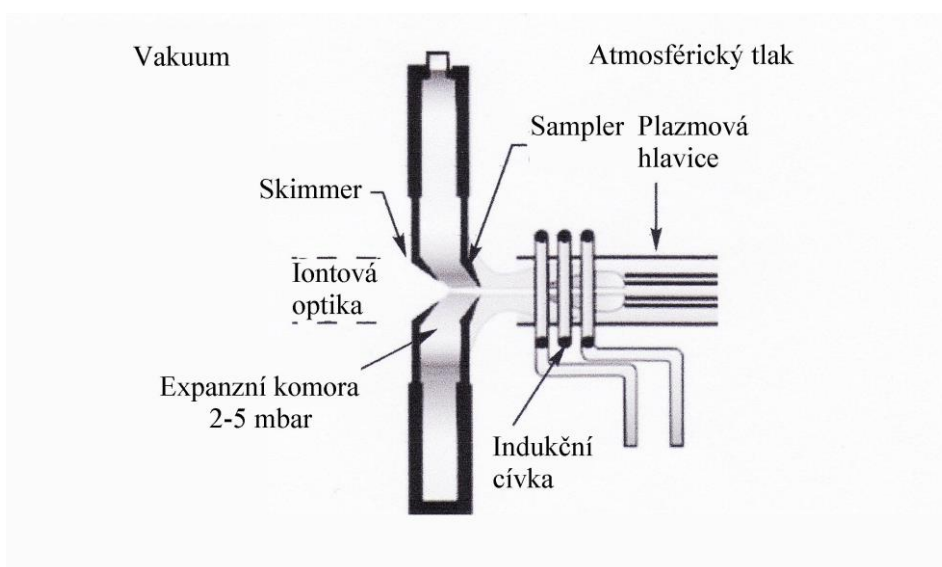
Po zavedení jemného aerosolu do plazmatu dochází k jeho ionizaci. Vlivem vysoké teploty v plazmatu je aerosol nejprve desolvatován a vypařen (kapalný vzorek), pevné částičky jsou poté atomizovány na volné atomy v plynném stavu, které jsou ionizovány srážkami s vysokoenergetickými elektrony. Vzniklé ionty jsou následně vedeny přes interface do hmotnostního analyzátoru^{3,4,5}.

V plazmatu jsou přítomny nejen ionty argonu Ar^+ a elektrony, ale i metastabilní forma argonu Ar^* , která může předat svou energii vzorku a ionizovat ho, případně ho excitovat. Argonový plyn se používá nejen kvůli své chemické inertnosti, ale i pro jeho vysokou ionizační energii (15,76 eV). Díky vysoké hodnotě 1. ionizačního potenciálu argonu lze ionizovat a excitovat většina prvků periodické tabulky do prvního stupně (kromě F, He, Ne). Prvky s nízkou hodnotou 2. ionizačního potenciálu tvoří v plazmatu dvojnásobně nabitě ionty (Ba a Ce)^{3,4,5}.

2.1.3. INTERFACE

Další důležitou a velmi namáhanou částí ICP-MS je interface. Hlavním úkolem interface je zajistit stabilní a účinný transport iontů z ICP do hmotnostního analyzátoru, tedy zajistit přenos iontů z ICP pracujícího za atmosférického tlaku a vysokých teplot do hmotnostního analyzátoru pracujícího za vysokého vakua a pokojové teplotě (300 K). Interface se skládá ze dvou kovových kónusů, v jejichž vrcholech jsou otvory s velmi malými průměry, a mechanické pumpy vytvářející vakuum. Jako konstrukční materiál kónusů bývá nejčastěji použitý nikl, méně často pak platina, měď nebo hliník^{2,3}.

Ionty vznikající v plazmatu nejprve procházejí velmi malým otvorem (0,8 – 1,2 mm) ve vrcholu prvního kónusu, sampleru (vzorkovacího kónusu), kde jsou odděleny od hlavního toku argonu a zároveň pokračují do prostředí mezi kónusy (expanzní komory). V expanzní komoře je tlak pomocí mechanické pumpy snížen na 2 - 5 mbar a vznikající podtlak umožňuje snadný a rychlejší transport iontů z ICP. Z expanzní komory jsou ionty vedeny skrze druhý kónus (tzv. skimmer) do hmotnostního analyzátoru. Druhý kónus je menší a má i menší průměr otvoru, obvykle 0,4 – 0,8 mm. Ionty jsou díky tlakovému spádu a vloženému napětí urychleny a skrze iontovou optiku směřují do hmotnostního analyzátoru^{2,3}.



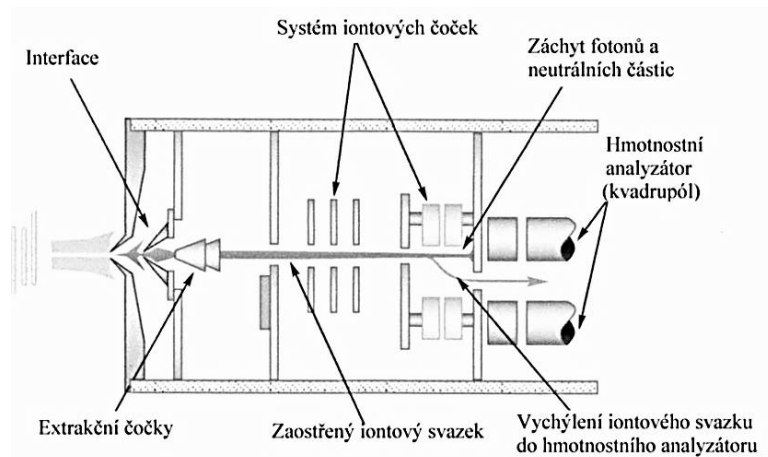
Obrázek 4: Schéma interface (cit.²)

Ionty jsou skrze interface transportovány z plazmatu s velmi vysokou teplotou, proto jsou kónusy chlazeny prostřednictvím vodou chlazeného bloku, který je chrání před roztavením. Nevýhodou interface jsou velmi malé otvory ve vrcholech kónusů, na kterých může při analýzách vzorků s vyšším obsahem rozpuštěných pevných částic docházet k depozici méně těkavých látek, což následně vede až k úplnému ucpání otvorů^{2,3}.

2.1.4. IONTOVÁ OPTIKA

Iontová optika umožňuje transport a vedení iontů z interface do hmotnostního analyzátoru. Iontová optika je složena z jedné nebo několika elektrostaticky ovládaných čoček pracujících za vakua, které vytváří turbomolekulární pumpa. Tyto čočky jsou složeny z kovových válečků nebo destiček, na něž se vkládá různé napětí. Iontová optika dále zabraňuje průchodu složek matrice, neutrálních částic a fotonů do hmotnostního analyzátoru. Tyto částice musí být odstraněny, protože způsobují nestabilitu signálu a zvyšují signál pozadí². Principem iontové optiky je fakt, že neutrální částice a fotony nejsou ovlivňovány elektromagnetickým polem.

První možností odstranění je umístění kovové překážky hned za skimmer přímo do dráhy iontů. Neutrální částice a fotony se na této překážce zastaví, ale ionty jsou vychýleny elektrickým polem čoček a pokračují dále do hmotnostního analyzátoru. Druhou možností je tzv. uspořádání „off-axis“, kdy je hmotnostní analyzátor umístěn mimo osu iontového paprsku o úhel přibližně 45°. Ionty jsou řízeny opět pomocí elektromagnetického pole, kdežto fotony a neutrální částice jsou zadrženy na kovové bariéře umístěné v ose iontového paprsku (obrázek 5). Třetí a poslední možností je tzv. 90° ion optics design, kdy jsou ionty vychýleny „dutým“ iontovým zrcadlem do hmotnostního analyzátoru umístěného v úhlu 90° vůči interface^{2,3}.



Obrázek 5: Nákres iontové optiky s uspořádáním „off-axis“ (cit.²)

U některých iontových optik můžeme za posledním kónusem interface najít extrakční čočky, které podporují extrakci iontů z interface a tím zlepšují meze detekce lehčích prvků. Ionty lehčích prvků jsou z iontového paprsku vytlačovány ionty prvků s vyšší hmotností (tzv. efekt „prostorového náboje“)^{2,3}.

2.1.5. HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTORY

V ICP-MS se k separaci iontů používají hmotnostní analyzátoři. Mezi nejpoužívanější patří kvadrupólový analyzátor, dále pak analyzátor průletový a sektorový. Jejich funkcí je separovat ionty vytvořené v plazmatu dle rozdílné hodnoty poměru hmotnosti ku náboji (m/z). Hmotnostní analyzátor je umístěn mezi iontovou optiku a detektor. Pracuje za velmi nízkého tlaku (10^{-7} mbar), který je udržován turbomolekulární pumpou^{2,3}.

Schopnost analyzátoru separovat analytický signál od signálu interferujícího je charakterizována rozlišovací schopností R . Rozlišovací schopnost je definována jako podíl nominální hmotnosti analyzovaného signálu m a šířky píku Δm , která se měří v 10 % nebo v 50 % výšky maxima píku^{2,3}.

$$R = \frac{m}{\Delta m} \quad (1)$$

2.1.5.1. KVADRUPÓLOVÝ ANALYZÁTOR

Kvadrupólový analyzátor je nejpoužívanější analyzátor pro ICP-MS. Kvadrupólový analyzátor neboli kvadrupól se skládá ze čtveřice stejně dlouhých paralelních kovových tyčí válcového, ideálně však hyperbolického průřezu (průměr asi 1 cm, délka 15 – 25 cm). Konstrukčním materiálem bývá nerezová ocel nebo molybden. Tyče mohou být také potaženy keramickou vrstvou, která zvyšuje jejich odolnost proti korozi^{2,3}.

Základním principem je vkládání stejnosměrného napětí a časově závislého střídavého proudu na dvojice tyčí tak, aby vždy protilehlé tyče měly shodnou polaritu. Vhodnou kombinací střídavé a stejnosměrné složky proudu na protilehlých tyčích dosáhneme toho, že ionty o zvolené hodnotě poměru m/z prochází skrz kvadrupól až k detektoru, kde je proud iontů převeden na měřitelný elektrický signál. Ostatní ionty budou v kvadrupólu oscilovat, vychýlí se z přímé dráhy letu a po nárazu se na tyčích vybijí. Celý tento proces je opakován pro další hodnoty m/z , dokud se neproměří všechny prvky v daném vzorku. Separace iontů je kromě aplikované stejnosměrné a střídavé složky ovlivněna vakuem, tvarem, průměrem a délkou tyčí a také kinetickou energií vstupujících iontů^{2,3,10}.

2.1.5.2. PRŮLETOVÝ ANALYZÁTOR

Dalším příkladem hmotnostního analyzátoru je analyzátor průletový (TOF = time of flight). Princip průletového analyzátoru je poměrně jednoduchý. Vychází z předpokladu, že iontům o různé hmotnosti dodáme pomocí urychlovacího napětí stejnou kinetickou energii v řádu jednotek keV. Z rovnice (2) pro výpočet kinetické energie vyplývá, že se ionty budou pohybovat různou rychlostí v závislosti na jejich hmotnosti.

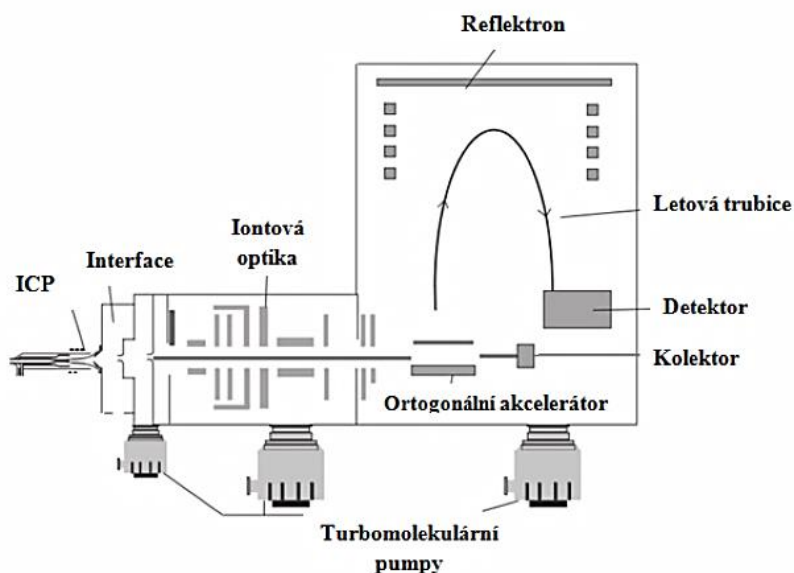
$$E_{kin} = \frac{1}{2}mv^2 \quad (2)$$

Na tomto principu je založena separace iontů v čase t s konstantní dráhou letu d o různých hodnotách m/z . Separace je popsána následující rovnicí (3), kde V je vkládané urychlovací napětí.

$$\frac{m}{z} = \frac{2Vt^2}{d^2} \quad (3)$$

Z uvedené rovnice vyplývá, že ionty s různou hmotností dopadnou na detektor v různých časech. Na detektor budou nejprve dopadat nejlehčí ionty, následovány ionty se střední hmotností a nakonec dopadnou ty nejtěžší^{2,3,5}.

Dnešní komerční průletové analyzátoři jsou výhradně ortogonálního uspořádání akcelerace. To znamená, že letová trubice je umístěna kolmo k přiváděnému paprsku iontů, který přichází z iontové optiky. U ortogonálního uspořádání je akcelerační napětí aplikováno kolmo na paprsek iontů přicházející z iontové optiky. Svazek iontů je elektrostaticky vypuzen do letové trubice a poté je nasměrován na tzv. blanker, který z iontového svazku odstraní pomocí vychylovací elektrody nežádoucí ionty matrice a nosného plynu. Průletové analyzátoři jsou dostupné ve dvou konstrukčních provedeních, lineární průletový analyzátoř, nebo průletový analyzátoř s reflektorem (obrázek 6). U lineárního průletového analyzátoři pokračují ionty z letové trubice přímo na detektor. U průletového analyzátoři s reflektorem jsou ionty vedeny na reflektor, kde se otočí o 180° a letí na detektor. Reflektor je vlastně iontové zrcadlo, které způsobuje, že ionty o stejné hodnotě m/z dopadnou na detektor ve stejný čas (korekce rozptylu kinetické energie iontů). Použitím reflektoru se zvýší rozlišení přístroje^{2,3,11}.

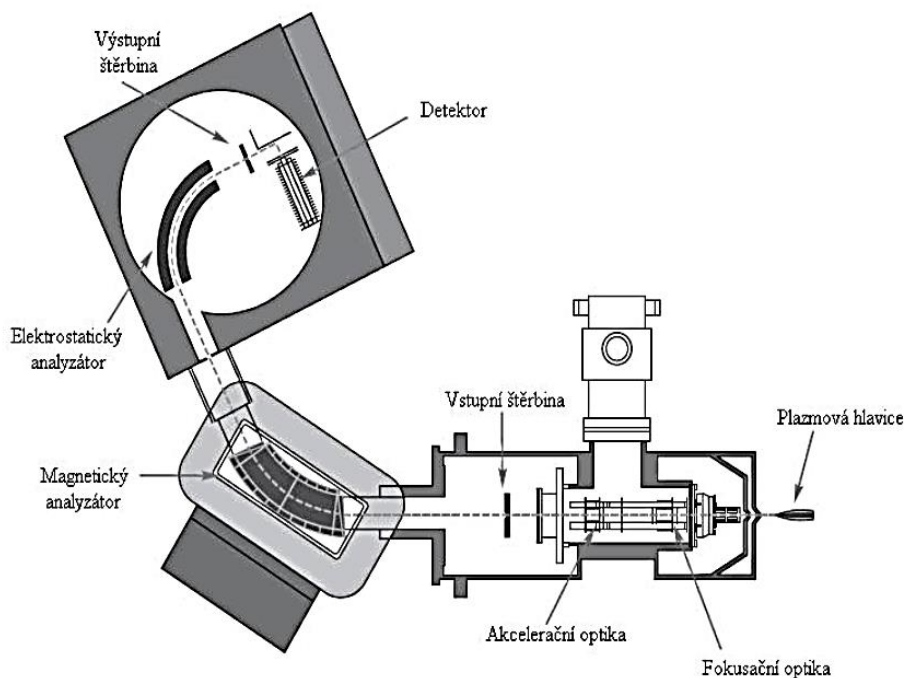


Obrázek 6: Schéma ortogonálního uspořádání akcelerace průletového analyzátoři s reflektorem (cit.¹¹)

Hlavní výhodou průletového analyzátoru je v podstatě neomezený rozsah m/z , který je přístroj schopen analyzovat. Všechny ionty jsou změřeny prakticky v jednom okamžiku a nedochází k jejich ztrátám, protože teoreticky všechny ionty dopadají na detektor².

2.1.5.3. SEKTOROVÝ ANALYZÁTOR

V dnešní době se používají spektrometry s analyzátory s dvojitou fokusací iontů, analyzátory s tzv. Nier-Johnsonovým uspořádáním. Analyzátor s dvojitou fokusací iontů je složen z magnetického a elektrostatického sektoru. Tyto analyzátory mohou být dvojitě uspořádání, standardní Nier-Johnsonovo uspořádání, kdy je elektrostatický sektor před sektorem magnetickým, a reverzní uspořádání, kdy je magnetický sektor před elektrostatickým sektorem (obrázek 7)^{2,3}.



Obrázek 7: Nier-Johnsonovo uspořádání hmotnostního spektrometru (cit.²)

Urychlené ionty vstupují přes vstupní štěrbinu do hmotnostního analyzátoru, kde jsou ovlivněny magnetickým polem, jenž způsobuje charakteristické kruhové zakřivení jejich letové dráhy. Ionty s různou hodnotou m/z budou při konstantní hodnotě magnetické indukce B a urychlovacím napětí V opisovat dráhu o různém poloměru r , což ukazuje následující rovnice (4) pro magnetický sektor:

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2V} \quad (4)$$

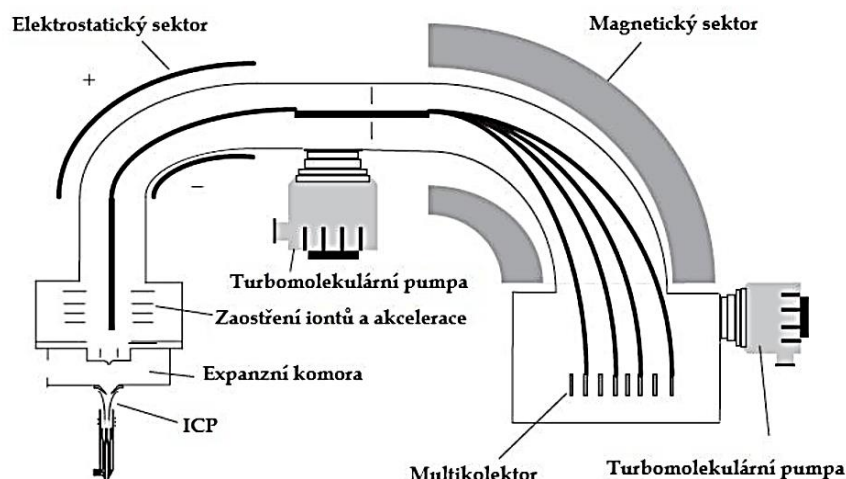
kde m je hmotnost iontu, z náboj iontu, B magnetická indukce, r poloměr dráhy a V urychlovací napětí. Ke skenování iontů dle m/z dochází buď změnou magnetické indukce, nebo urychlovacího napětí. Rozseparované ionty jsou dále vedeny do elektrostatického sektoru analyzátoru, kde dojde k fokusaci iontů dle jejich kinetické energie a zafokusané ionty jsou vedeny dále přes výstupní štěrbinu na detektor. Na detektor se výstupní štěrbinou dostanou jen ionty dané hodnoty m/z . Pro fokusaci iontů v elektrostatickém sektoru pak platí vztah (5):

$$\frac{mv^2}{r} = zE \quad (5)$$

kde v je rychlost letu iontu a E intenzita elektrického pole. Poloměr trajektorie iontu v elektrostatickém sektoru analyzátoru nezávisí na hmotnosti, nýbrž na jeho energii^{2,3,10}.

Výhodou sektorového analyzátoru je vysoká rozlišovací schopnost ($R = 10\,000$), která umožňuje eliminovat většinu spektrálních interferencí, jenž jsou velkým problémem především u kvadrupólu. Velikost rozlišení se nastavuje šířkou vstupní a výstupní štěrbin. Nastavením malých šířek štěrbin dosáhneme vysokého rozlišení, ale zároveň dojde k poklesu průchodu iontů, což může vést ke snížení citlivosti stanovení a zhoršení mezí detekce. Nevýhodou je však pomalá skenovací rychlost oproti kvadrupólovému analyzátoru^{2,3,10}.

Sektorové analyzátory s vysokým rozlišením našly uplatnění zejména ve stopové analýze, kde jsou kladeny vysoké nároky na rozlišení, nízké meze detekce a hlavně přesnost stanovení. Dále se uplatňují ve spojení s laserovou ablací nebo vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií k multielementárnímu stanovení. Naopak sektorové analyzátory s nízkým rozlišením ($R = 400$) se používají k přesnému měření izotopových poměrů. Přístroje MC-ICP-MS využívají Nier-Johnsonovo uspořádání. Ke korekci širokého rozložení kinetické energie iontů produkovaných ICP je nutné předřadit elektrostatický sektor nebo hexapólovou kolizní celu naplněnou kolizním plynem, argonem, héliem nebo vodíkem. V elektrostatickém sektoru jsou ionty fokusovány podle jejich kinetické energie a následně převedeny do magnetického sektoru, kde jsou rozseparovány podle m/z . Rozseparované ionty dopadají na detektor, který se skládá ze soustavy elektronásobičů a Faradayových klecí (obrázek 8)^{2,10,11}.



Obrázek 8: Multikolektorové ICP-MS (cit.¹¹)

2.1.6. DETEKTORY

Posledním krokem analýzy je detekce rozseparovaných iontů. Na detektor umístěný za hmotnostním analyzátozem dopadá svazek iontů a jeho jediným úkolem je převést proud iontů na měřitelný elektrický signál. Pro kvantifikaci se používá srovnání signálu iontů se signálem referenčního standardu^{2,3}.

V dnešní době se používají především dva typy detektorů, Faradayova klec a elektronový násobič s oddělenými dynodami. Dalším příkladem je elektronový násobič s jednou elektrodou, neboli channeltron, který funguje na stejném principu jako fotonásobič používaný v ICP-OES. Tento typ detektoru se dnes již nepoužívá^{2,3,10}.

2.1.6.1. FARADAYOVA KLEC

Principem Faradayovy klece je dopad iontů na sběrnou elektrodu. Sběrná elektroda je obklopena „klecí“ ve tvaru kužele, na které jsou následně zachyceny konvertované elektrony. Měří se vybíjecí proud. Vznikající proud je nezávislý na energii, rychlosti a hmotnosti dopadajícího iontu. Faradayova klec se používá k analýzám, kde není potřeba nízká mez detekce. Používá se pro vysoké signály iontů. Nevýhodou tohoto detektoru je již zmíněná nižší citlivost a pomalejší odezva. Spodní hranice rozsahu Faradayovy klece je řádově 10^4 cps. Použije-li se jako jediný detektor, dojde k výraznému snížení citlivosti ICP-MS. Proto se obvykle používá ve spojení s elektronovým násobičem, čímž dojde ke zvýšení

dynamického rozsahu. Výhodou Faradayovy klece je konstrukční jednoduchost a robustnost. Společně s elektronásobičem se využívají u multikolektoru pro velmi přesné měření izotopových poměrů^{2,10}.

2.1.6.2. ELEKTRONOVÝ NÁSOBIČ S ODDĚLENÝMI DYNODAMI

Elektronový násobič s oddělenými dynodami, zkráceně elektronový násobič, je v současné době nerozšířenějším detektorem. Jedná se o sérii dynod, obvykle 15-20 dynod, potažených oxidem kovu, který má schopnost emitovat sekundární elektrony. Ionty z hmotnostního analyzátoru dopadají na první dynodu, kde z ní každý vyrazí 1- 2 elektrony. Vzniklé sekundární elektrony jsou urychleny a přitahovány potenciálovým gradientem k další dynodě, kde po dopadu vzniká velké množství dalších sekundárních elektronů. Tento proces je na dalších dynodách opakován. Na konci násobiče je mnohonásobně zesílený elektronový pulz, který je zachycen na anodě, detekován a zpracován^{2,10}.

Elektronový násobič je umístěn mimo osu a to z důvodu minimalizace šumu, který pochází z rozptýleného světla a neutrálních částic vznikající v iontovém zdroji. Jeho citlivost je o 50 – 100 % vyšší než citlivost channeltronu. Elektronový násobič může pracovat ve dvou měřicích módech, analogovém a pulzním. Analogový mód se používá ke stanovení vysokých koncentrací (vysoké cps), pracuje za sníženého potenciálu vkládaného na detektor. Přechod z analogového do pulzního módu spočívá ve zvýšení napětí na elektronovém násobiči, který vede ke zvýšení zesílení elektronového pulzu. Pulzní mód poskytuje zesílení elektronového pulzu, proto se využívá ke stanovení nízkých koncentrací (nízké cps).

U moderních přístrojů se využívá dvoustupňového elektronového násobiče, kdy jsou v jednom skenu sbírány signály jak z analogového, tak i z pulzního módu. Principem těchto přístrojů je měření signálu iontu na prostřední dynodě v analogovém módu. Pokud je hodnota signálu iontu vyšší než prahová hodnota, tak je zpracován přes analogový obvod. Naopak pokud je signál iontu nižší než prahová hodnota, tak je signál na zbývajících dynodách zesílen a je zpracován jako pulzní signál klasickým způsobem. Použitím obou módů docílíme rozšíření dynamického rozsahu detektoru^{2,3,10}.

2.1.7 INTERFERENCE

Interference v hmotnostní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem můžeme rozdělit do dvou základních skupin. První skupinou jsou interference spektrální, které jsou nejzávažnějším typem interferencí v ICP-MS, projevující se u spektrometrů s nízkým rozlišením. Druhou skupinou jsou interference nespektrální^{2,3}.

2.1.7.1. SPEKTRÁLNÍ INTERFERENCE

Spektrální interference závisí na rozlišovací schopnosti použitého hmotnostního analyzátoru, silně se projevují u hmotnostních analyzátorů s malým rozlišením. Do skupiny spektrálních interferencí patří interference polyatomické (molekulární) a izobarické.

Izobarické interference

Izobarické interference jsou způsobeny přítomností izotopů jiných prvků ve vzorku, které interferují s analytem při stejné hodnotě atomové hmotnosti. Příkladem je nikl s izotopy ^{58}Ni a ^{60}Ni , relativní zastoupení izotopu ^{58}Ni je 67,9 %, avšak s tímto izotopem interferuje železo ^{58}Fe (relativní zastoupení izotopu železa 0,31 %). K eliminaci izobarických interferencí se používají matematické korekční rovnice, nebo se volí jiný izotop, který není zatížen interferencí jiného prvku, v tomto případě izotop ^{60}Ni (cit.^{2,8,12}).

Polyatomické interference

Polyatomické interference vznikají spojením iontů plazmového plynu s matricí vzorku, ostatními prvky obsaženými ve vzorku, ale i s plyny z okolního vzduchu (kyslíkem nebo dusíkem). Výsledná hodnota m/z sloučené molekuly je stejná jako hodnota m/z analyzovaného prvku. Použitím argonového plazmatu jsou spektrální interference způsobeny argonovými ionty a jejich kombinací s jinými atomy. Například u analýzy vodných roztoků vzniká polyatomický ion $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ interferující s izotopem železa ^{56}Fe . Dalším příkladem jsou polyatomické interference vznikající kombinací iontů argonu s atomy z minerálních kyselin, které se používají k rozpouštění vzorku. V kyselině chlorovodíkové vzniká polyatomický ion $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ interferující stanovení jediného izotopu arsenu ^{75}As . Použitím kyseliny sírové může vznikat polyatomický molekulární ion síry se dvěma ionty kyslíku $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$, který interferuje s hlavním izotopem zinku ^{64}Zn (cit.^{2,8}).

Dalším typem spektrálních interferencí vznikajících v chladnějších zónách plazmatu je kombinace prvků s H^+ (+1 m/z), O^+ (+16 m/z) a OH^+ (+17 m/z) ze vzduchu nebo z vody. Dochází tedy ke vzniku molekulárních hydridů, oxidů a hydroxidů. Společně s těmito interferencemi mohou v plazmovém výboji vznikat i dvojnásobně nabitě ionty (nesoucí dvojnásobný náboj oproti klasickým iontům). Množství vznikajících oxidů a dvojnásobně nabitých iontů závisí na ionizačních podmínkách v plazmatu a lze je minimalizovat optimalizací průtoku zmlžovacího plynu^{2,8}.

2.1.7.2. NESPEKTRÁLNÍ INTERFERENCE

Nespektrální interference nebo také matricový efekt lze rozdělit podle různých vlivů na tři skupiny. První skupinou jsou interference ovlivňující transport a zmlžování vzorku, druhou skupinou interference ovlivňující ionizaci vzorku v plazmatu a poslední blokování interface usazenými solemi. Nespektrální interference jsou způsobeny vyšším obsahem rozpuštěných kyselin, pevných látek a snadno ionizovatelných prvků vyskytujících se v analyzovaném vzorku. Tyto látky ovlivňují transport, tvorbu a následnou separaci jemného aerosolu, jeho ionizaci a mohou se usazovat na kónusech interface^{2,8}.

2.1.7.3. ELIMINACE INTERFERENCÍ

Nespektrální interference se nejčastěji eliminují použitím vhodného vnitřního standardu, který je v nízkých koncentracích (zpravidla ppb) přidáván do kalibračních standardů, slepých i reálných vzorků. Prvky vnitřního standardu nesmí být přítomny v analyzovaném vzorku, musí mít podobný ionizační potenciál a hmotnost jako prvky analytu. Dále by neměly interferovat se složkami matrice vzorku a neměly by být kontaminanty životního prostředí. Při změně intenzity signálů vnitřních standardů se aktualizují odezvy analyzovaných prvků a vzorek je analyzován. Mezi nejčastěji používané vnitřní standardy patří ^{45}Sc , ^{89}Y , ^{103}Rh , ^{115}In a ^{232}Th (cit.^{2,8,12}).

K eliminaci spektrálních interferencí existuje celá řada různých přístupů. V první řadě volbou vhodného izotopu a odstraněním rozpouštědla z aerosolu analyzovaného vzorku snížíme pravděpodobnost tvorby polyatomických interferencí. Dalšími používanými přístupy jsou použití matematických korekčních rovnic, aplikace metody tzv. studeného plazmatu, využití kolizně-reakčních cel a měření na spektrometru s vysokým rozlišením. Použitím hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením je nejlepším a nejspíš i nejefektivnějším

přístupem k eliminaci spektrálních interferencí, avšak vysoká rozlišovací schopnost vede ke snížení citlivosti stanovení^{2,8,12}.

Matematické korekční rovnice

Matematické korekční rovnice se používají k eliminaci hlavně izobarických interferencí, ale lze je využít i k eliminaci méně závažných polyatomických interferencí. Principem je měření intenzity interferujícího izotopu nebo interferující specie na jiné hmotě, která není zatížena interferencemi. Následné korekce se docílí znalostí poměrů relativního zastoupení interferujícího iontu na alternativní a analytické hmotnosti. Matematické korekční rovnice nejsou vhodné, pokud intenzita signálu interferujícího iontu je vysoká a intenzita signálu analytu nízká. V tomto případě se používá metoda tzv. studeného plazmatu².

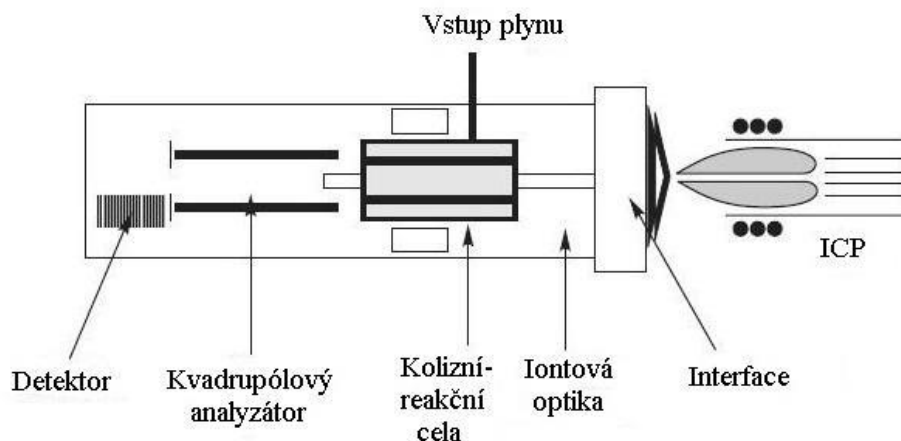
Metoda tzv. studeného plazmatu

Metoda tzv. studeného plazmatu neboli cold plasma využívá nízkoteplotního plazmatu ke snížení vzniku určitých polyatomických interferencí iontů s argonem ($^{38}\text{ArH}^+$, $^{40}\text{Ar}^+$, $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ a další) ovlivňující stanovení K, Ca, Fe. U této metody se využívá sníženého výkonu RF generátoru a zvýšeného průtoku nosného plynu, oproti klasickým podmínkám, a to má za následek potlačení tvorby polyatomických interferencí, tedy zlepšení mezi detekce analyzovaných prvků. Tato metoda je vhodná pouze pro některé interference a není vhodná pro multielementární stanovení kovů. Důvodem je nízká energie v plazmatu, která má vliv na ionizaci prvků s vysokým ionizačním potenciálem. Omezení této metody vedlo k vývoji kolizně-reakčních cel^{2,12}.

Kolizně-reakční cely

Kolizně-reakční cely se využívají ve spojení s kvadrupólovými analyzátory k eliminaci polyatomických interferencí. Pracují na principu ion-molekulových srážek a reakcí, které odstraňují polyatomické a molekulární interference z iontového svazku před samotným vstupem do hmotnostního analyzátoru. Kolizně-reakční cely je umístěna mezi iontovou optikou a hmotnostním analyzátorem, tudíž ionty vzniklé v plazmatu jsou vedeny z interface přímo do cely (obrázek 9). Cely je naplněna kolizně-reakčním plynem (hélium, vodík, kyslík nebo amoniak). Cely se skládá z multipólu (kvadrupólu, hexapólu nebo oktapólu) a na tyto póly je vkládáno RF napětí. RF pole neseperuje ionty jako klasický

kvadrupól, nýbrž slouží k transportu a k zafokusování iontů. Ionty se v cele srážejí a reagují s molekulami kolizně-reakčního plynu. Polyatomické interferující ionty jsou řadou těchto reakčních mechanismů převedeny na neinterferující částice, nebo jiné ionty, které s příslušným analytem neinterferují^{2,14}.



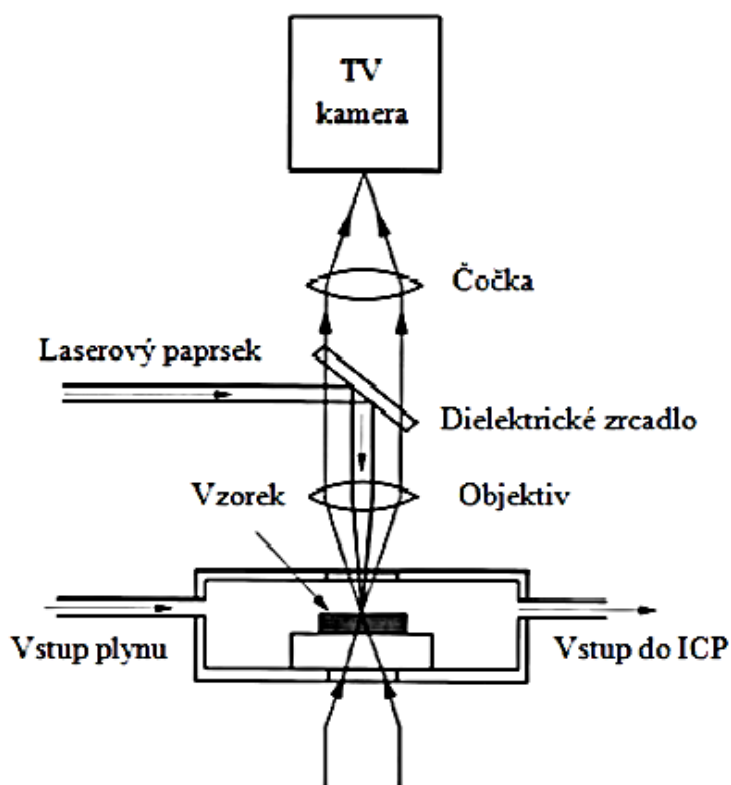
Obrázek 9: Schéma uspořádání hmotnostního spektrometru s kolizně-reakční celou

Kolizně-reakční cely se dělí podle typu použitého kolizního plynu, mechanismu eliminace polyatomických interferencí a typu multipólu na cely kolizní a reakční. **Kolizní celou** je nejčastěji hexapól nebo oktapól, který je vyplněn inertním plynem – héliem, neonem, argonem nebo xenonem. K eliminaci interferencí využívá mechanismus diskriminace iontů kinetickou energií, který funguje na principu srážek analytu a interferentu s nereaktivním kolizním plynem, kdy ion předá při každé srážce část své kinetické energie koliznímu plynem. U interferujících iontů dojde k většímu počtu ion-molekulových srážek, což znamená výraznější snížení kinetické energie vůči iontům analytu. Tyto ionty nejsou schopny překonat potenciálovou bariéru na výstupu z cely a zůstávají uvnitř. Naopak ionty analytu mají vyšší kinetickou energii, překonají potenciálovou bariéru a jsou vedeny do hmotnostního analyzátoru. **Reakční cela** využívá kvadrupól, který je vyplněn vysoce reaktivním plynem, vodíkem, kyslíkem, nebo například amoniakem. Principem eliminace polyatomických interferencí jsou chemické reakce interferentů s reakčním plynem za vzniku neinterferujících iontů s jiným poměrem m/z nebo neutrálních částic. Kvadrupól plní funkci hmotnostního filtru a je charakterizován pásmem propustnosti pro hodnotu m/z analyzovaného prvku. Ionty analytu prochází reakční celou a vstupují do hmotnostního analyzátoru bez interferujících

částic. Interferující ionty se vybíjejí na tyčích a stěnách reakční cely, čímž se zamezí vzniku nových interferujících iontů^{2,12,14}.

2.2. LASEROVÁ ABLACE

Laserová ablace (LA) je jednou z technik umožňující přímou analýzu pevných vzorků. Systém laserové ablace se skládá z laseru, ablační komory a transportního systému. Do ablační komory je umístěn vzorek. Ablací komora je vyplněna nosným plynem, který je inertní a slouží pro odvod ablatovaného materiálu do ICP-MS spektrometru. Jako nosný plyn se nejčastěji používá hélium nebo argon. Pomocí CCD kamery lze přes okno ablační komory sledovat povrch vzorku, zaměřit laser snadno na vybrané místo a provést jeho vzorkování. Okno ablační komory je vyrobeno z taveného křemene. Na vzorek je namířen pulzní laserový paprsek vhodné energie^{11,15,16}.



Obrázek 10: Schéma laserové ablace (cit.¹⁷)

2.2.1. PRINCIP

Po dopadu laserového paprsku na vzorek dojde k uvolnění materiálu ve formě částic, elektronů, atomů a iontů, které společně vytváří nad ablatovaným místem plazmový oblak. Plazmový oblak vzniká jako důsledek interakce fotonů, povrchu materiálu a héliového (argonového) plazmatu vznikajícího interakcí laseru a nosného plynu. Dopadající fotony jsou vzorkem absorbovány, jejich energie je převedena na teplo, čímž dochází k rychlému zahřátí vzorku. Zahřátí vede k roztavení a odpaření částic vzorku a na povrchu materiálu se vytvoří malý kráter. Celý proces probíhá za atmosférického tlaku^{11,18,19}.

Při interakci laserové paprsku se vzorkem nastávají v podstatě dva mechanismy, a to termické (odpařování) a netermické (ablace). Který z mechanismů bude dominantním, závisí na hustotě zářivého toku a délce jednotlivých laserových pulzů²⁰.

Termické procesy nastávají, pokud se doba trvání pulzu pohybuje řádově v mikrosenkudách a déle. Dále když mají lasery nižší hustotu zářivého toku než 10^6 W.cm^{-2} . U těchto procesů je dopadající záření přímo absorbováno vzorkem, energie je dodána atomové mřížce, dochází k zahřátí vzorku, následné difúzi tepla materiálem, což vede k roztavení a odpaření částic a vytvoří se na povrchu kráter. U netermických procesů dochází k přímému narušení atomové mřížky a k vytržení atomů, případně iontů, bez pozorování doprovodných termických procesů. Nedochozí v podstatě k difúzi tepla materiálem, vzorek nepodléhá termodynamickým změnám a veškerá energie je využita k ablaci. Vzhledem k velmi krátkému trvání laserového pulzu, řádově ve femtosekundách, dochází k samotné ablaci až po jeho odeznění, tudíž nedochází k interakci ablatovaných částic s laserovým paprskem. Netermické procesy nastávají pokud je hustota zářivého toku laseru vyšší, okolo 10^9 W.cm^{-2} . Netermické procesy jsou preferovanější, než procesy termické^{3,15,20}.

Interakce mezi fotony a materiálem je složitý proces, který je ovlivňován mnoha faktory, především použitým laserem, jeho vlnovou délkou a energií pulzu, dále pak vodivostí, tepelnou kapacitou a teplotou vypařování ablatovaného materiálu. Dále je nutno uvažovat fakt, že různé prvky se odpařují při různých teplotách.

Vedlejším a nechtěným efektem je odraz laserového paprsku na povrchu analyzovaného vzorku. Tento efekt klesá se zvyšující se teplotou povrchu. Při použití laserů s krátkou dobou pulzu je tento efekt téměř potlačen. Další výhodou použití laserů s krátkou

dobou pulzu je, že nedochází k tak silné interakci mezi paprskem a vzniklým plazmovým oblakem^{3,16,19}.

2.2.2. LASERY

Slovo laser je zkratka pocházející z anglického Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation. Laser je optické zařízení, které produkuje světelné záření o velmi vysoké intenzitě. Produkované světelné záření je koherentní, monochromatické, trvá velmi krátkou dobu a je soustředěno do velmi malého bodu. Samotný laser je složen ze tří základních částí, ze zdroje buzení, aktivního prostředí a optického rezonátoru^{3,17}.

Optický rezonátor se skládá ze soustavy dvou zrcadel, polopropustného a totálně reflexního, a celý prostor je vyplněn aktivním prostředím. Elektrony aktivního prostředí přejdou do excitovaného stavu na metastabilní hladinu, dostatečnou energii k přechodu jim dodá budící zdroj. Dojde k tomu, že počet elektronů na metastabilní hladině je vyšší, než na základní energetické hladině. Tomuto jevu se říká inverze populace. Následně dojde ke stimulované emisi. Foton vyzářený spontánní emisí při přechodu jednoho elektronu z metastabilní na základní energetickou hladinu dopadá na excitovaný elektron, čímž dojde ke stimulaci daného elektronu a emisi dalšího fotonu o stejné vlnové délce. Tento proces se opakuje, vzniká lavinový efekt emise fotonů. Na stěnách optického rezonátoru dochází k odrazům a dalším průchodům záření aktivním prostředím a tím je podporována stimulovaná emise. Vzniklé záření nakonec prostupuje polopropustným zrcadlem ven z laseru^{3,21}.

2.2.2.1. DRUHY LASERŮ

V závislosti na typu laseru je produkováno záření o různých vlnových délkách v rozsahu od ultrafialové oblasti (UV), přes oblast viditelnou (VIS), až po infračervenou (IR). Dále se dají lasery dělit podle délky pulzu na mikrosekundové (μs), nanosekundové (ns), pikosekundové (ps), femtosekundové (fs) atd. Obecně je výhodnější používat lasery s co nejkratší délkou pulzu, protože díky kratšímu působení pulzů nedochází k velkému přenosu tepla skrz atomovou mřížku, ablace je dána netermálním mechanismem. Femtosekundové lasery neinteragují s ablatovanými parami vzorku, zajišťují lepší účinnost ablace, dochází k menšímu plazmovému stínění, menší frakcionaci a laserové krátery mají lépe definovaný profil a tvar^{15,22}.

Dalším typem dělení laserů je dělení na základě materiálu aktivního prostředí. Tohle kritérium dělí lasery na pevnolátkové, polovodičové, plynové a barvivové. Ve spojení laserové ablace s ICP-MS se používají v podstatě pouze pevnolátkové a plynové lasery, které budou dále stručně popsány³.

Pevnolátkové lasery

Aktivní prostředí pevnolátkových laserů je tvořeno pevnou látkou, která je opticky propustná, v níž jsou umístěny atomy nebo ionty aktivátoru. Tyto ionty se chovají jako luminiscenční centra. Existuje velké množství těchto laserů, ve spojení laserové ablace s ICP-MS spektrometrií se používají v podstatě jen dva druhy – rubínový a neodymový laser.

První zmíněný, **rubínový laser**, byl použit jako první laser pro ablaci pevných látek. Rubín je krystalický materiál, jeho matrice je tvořena oxidem hlinitým a aktivátorem jsou chromité ionty. Produkované záření má vlnovou délku 694 nm. Díky pulzům o vysoké energii se dnes používá například v průmyslu k vrtání tvrdých materiálů^{3,21}.

V současné době jsou laserové ablační systémy vybaveny **neodymovým laserem**, který nahradil dříve používaný laser rubínový. Aktivním prostředím neodymového laseru je krystal yttrium-aluminiového granátu dopovaný neodymem – Nd: YAG laser. Výhodou tohoto typu laseru je jeho cena, nenáročnost na údržbu a fakt, že se dají snadno začlenit do malých komerčních systémů LA. Nd: YAG laser je schopen produkovat záření o různých vlnových délkách. Základní vlnovou délkou je 1064 nm. Pomocí optických součástek lze získat a využít laserové paprsky s poloviční, třetinovou, čtvrtinovou a až pětinou vlnovou délkou (tzn. 532, 355, 266 a 213 nm). Pro účely laserové ablace se pracuje při vlnových délkách 266 a 213 nm^{16,21}.

Plynové lasery

Aktivní prostředí plynových laserů je tvořeno plynnou fází. Plyn je mnohem homogennější než pevná látka, proto u plynových laserů nedochází při průchodu záření aktivním prostředím k tak velké deformaci a rozbíhavosti výstupního paprsku. Výstupní paprsek se vyznačuje velmi stabilní vlnovou délkou. Naopak nevýhodou je nižší výstupní výkon, který je daný nižší objemovou hustotou počtu částic. U plynových laserů se k buzení nejčastěji využívá elektrický výboj. Plynové lasery se dělí na lasery atomární, iontové a

molekulární. Zvláštním a nejvíce používaným typem plynového laseru jsou excimerové lasery³.

Pojmenování **excimerový laser** vychází z označení molekul, které jsou vytvořeny, jejich vznik je podmíněn vzájemnou interakcí excitované částice s částicí v základním energetickém stavu a mohou existovat jen v excitovaném stavu. Těmto molekulám se říká excimery. Označení excimerový laser však není zcela přesné, správně by se měli nazývat exciplexový laser. Tyto lasery jsou běžně založeny na použití sloučenin vzácných plynů, konkrétně halogenidů nebo oxidů (ArO, XeCl, KrF nebo ArF). Existují však i lasery, které využívají excitované dimery vzácných plynů (argonu, kryptonu, xenonu), u kterých je tohle označení správné. Aktivní prostředí excimerových laserů je tvořeno směsí inertních a reaktivních plynů (Ar, Kr, Xe, Cl₂ a F₂). K buzení se používá elektrický výboj. Výhodou těchto laserů je jejich vysoký výkon a široký výběr vlnových délek (558, 308, 248, 193 a 157 nm). Hodnota vlnové délky závisí na použitém aktivním prostředí. Excimerové lasery pracují s plyny o vysoké čistotě, které je nutno pravidelně vyměňovat a s tím souvisí vyšší provozní náklady^{3,16,21}.

2.2.2.2. PARAMETRY LASERŮ OVLIVŇUJÍCÍ ABLAČNÍ PROCES

Již výše bylo zmíněno několik parametrů, které mají vliv na ablační proces. Hlavním parametrem je **vlnová délka laseru**, která ovlivňuje tvorbu aerosolu. Záření o vlnové délce z infračervené oblasti je absorbováno plazmovým oblakem a tím dochází ke značnému stínění a vzorek je odpařován vlivem plazmového oblaku, naopak záření z ultrafialové oblasti vyvolává přímou ablaci vzorku. Použitím laseru s vlnovou délkou z UV oblasti získáme vyšší účinnost ablace^{3,21}.

Dalším parametrem, který se podílí na tvorbě plazmového oblaku, množství tepla přeneseného na vzorek a geometrii kráteru je **délka laserového pulzu**. Velikost kráteru a od toho se odvíjející množství ablatovaného vzorku ovlivňuje **energie laserového pulzu**. Energie laserového pulzu je nastavována pomocí optických filtrů a zrcadel v závislosti na tvrdosti vzorku. **Frekvence laseru** je dalším důležitým parametrem udávajícím míru ablaci vzorku, která ovlivňuje poměr intenzit signál/pozadí. Určuje nezbytně nutnou dobu pro tvorbu kráteru specifické velikosti. Jedná se vlastně o pauzu mezi jednotlivými pulzy.

Při vysoké laserové frekvenci může docházet k plazmovému stínění a tím je ovlivněna ablace^{3,21,23}.

Parametrem podílejícím se na ablačním ději je také **energetický profil laserového paprsku**, který závisí na použitém typu laseru. Většina používaných laserů mají paprsek s Gaussovským profilem rozdělení energie, výjimkou jsou excimerové lasery, které mají rovný profil paprsku. To znamená, že intenzita dopadajícího záření je nejvyšší uprostřed paprsku a čím dál od středu, tím se intenzita snižuje. Při studiu hloubkových profilů materiálu je to považováno za nevýhodu a je lepší použít laser excimerový. Stejně jako výkon laseru má i **průměr laserového paprsku** vliv na množství ablatovaného vzorku, ale hlavně na množství částic, které se dostanou z ablační cely až do indukčně vázaného plazmatu. Průměr paprsku je důležitý i z hlediska rozlišení v ploše, čím menší je, tím přesnější informaci o rozložení prvků získáme^{3,21}.

V neposlední řadě je ablační proces ovlivněn **transportem ablatovaného materiálu a nosným plynem**. Transport částic je ovlivňován především geometrií a velikostí ablační cely. Celkové množství ablatovaného materiálu, které doputuje až do plazmatu, se pohybuje v rozmezí 10 – 20 %. Účinnost transportu je závislá na velikosti ablací vzniklých částic a použitým nosným plynem. Nejběžněji používaným nosným plynem je dnes hélium, ale někdy se ještě používá argon^{3,15,23}.

Posledním zmíněným parametrem je **matrice vzorku**, která ovlivňuje velikost ablatovaných částic, množství ablatovaného vzorku a geometrii kráteru³.

2.2.3. PŘÍPRAVA VZORKŮ PRO LASEROVOU ABLACI

Velkou výhodou laserové ablace je možnost přímé analýzy pevných vzorků bez předchozích dalších operací. Před samotnou analýzou je vhodné zajistit, aby měl vzorek hladký povrch. Hladkého povrchu docílíme tak, že povrch vzorku vyleštíme. Pokud máme k dispozici vzorek v práškové podobě, je nezbytné z něj vylisovat tabletku, která musí velikostně odpovídat velikosti držáku vzorku uvnitř ablační cely. Tabletky mohou být lisovány z čistého materiálu, nebo se k němu mohou přidávat různá pojiva na bázi pryskyřic nebo třeba alkoholy o vysoké molekulové hmotnosti. K lisování tabletky se používají vysoké tlaky. Takto se mohou zpracovávat rozdrcené horniny, ale i různé biologické vzorky.

Dalším možným způsobem zpracování vzorku je jeho tavení. Tavením zkoumaného materiálu zvýšíme jeho homogenitu. Vzorek se může tavit sám, nebo s přídavkem tavidla (například borax), které většinou snižuje teplotu tavení a tím snižuje riziko případných ztrát těkavých analytů. Na druhou stranu použitím tavidla vzorek kontaminujeme a naředíme.

Křehké materiály jako jsou například biologické tkáně, se před samotným měřením mohou upravit hned několika způsoby. Mohou se zalít do epoxidové pryskyřice, nebo parafínu či polymeru, tím dojde k zachování 3D struktury vzorku, ale i jeho zpevnění, což umožní snadnější manipulaci. Zalité vzorky mohou být analyzovány přímo, nebo mohou být nařezány na tenké plátky a připevněny na skleněný substrát. Dalším možným způsobem je zmrazení vzorku na velmi nízkou teplotu (-80 °C) a jejich následné nařezání pomocí kryotomu na velmi tenké plátky (cca 20 μm) při teplotě -20 °C, které jsou následně připevněny na mikroskopické sklíčko. Zmrazením vzorku zachováme jeho přirozený stav, snížíme riziko kontaminace vzorku a zamezíme difúzi iontů. Nařezáním vzorku na tenké řezy získáme navíc informace o vnitřní struktuře. Přímá analýza zmrazených vzorků může být provedena i pomocí cryocely. Cryocela je ablační cela vybavena ve spodní části Peltierovými články, které pomocí teplotního čidla, jenž je v kontaktu se vzorkem, udržují stejnou teplotu vzorku po celou dobu analýzy, čímž je vyloučena tepelná degradace vzorku. Vzorky jsou před samotnou analýzou zmrazeny a nařezány na tenké plátky pomocí kryotomu. Měkké biologické tkáně mohou být také homogenizovány, tedy rozmixovány, a následně upraveny jedním z předchozích způsobů. Homogenizací vzorku ztrácíme informace o rozložení prvků v přirozeném stavu vzorku. Homogenizace se využívá hlavně při přípravě laboratorních standardů pro kvantitativní analýzu²⁴.

2.2.4. VÝHODY A NEVÝHODY LA

Jednou z největších výhod laserové ablace je fakt, že lze analyzovat pevné vzorky přímo, aniž by musely být převedeny do roztoku, nebo jinak předpřipraveny. Právě převedením vzorku do roztoku, nebo jeho homogenizací dochází ke ztrátám informací o rozložení analytů ve vzorku. Při laserové ablaci nedochází k možným ztrátám těkavých analytů, nebo k případné kontaminaci vzorku. Velkou výhodou je i ušetřený čas, který bychom potřebovali k převedení vzorku do roztoku a homogenizací².

Pomocí laserové ablace můžeme analyzovat v podstatě jakýkoliv materiál včetně minerálů a hornin, keramiky, rostlinných a biologických vzorků, polymerních i práškových materiálů. Laserová ablace nevyžaduje, aby měl vzorek nějaké speciální vlastnosti.

Navzdory všem těmto výhodám, má laserová ablace i své nevýhody. Jedná se především o problematičtější kalibraci a elementární frakcionaci vznikající při vzorkování.

Elementární frakcionace

Elementární frakcionace je dynamický proces, při kterém dochází k tomu, že změřené intenzity jednotlivých prvků, případně izotopů, neodpovídají skutečnému složení daného vzorku. Tento problém je obecně problémem spojení LA-ICP-MS. Může nastat během samotné ablace, během transportu částic z ablační cely do plazmatu, ale i při vypařování, atomizaci a ionizaci částic v plazmatu. Dále během termických procesů, kdy nastává tavení a odpařování materiálu^{3,18,19}.

Do jaké míry se bude během ablace frakcionace vyskytovat, vyjadřuje stupeň frakcionace. Stupeň frakcionace je závislý na velikosti a tvaru kráteru, na složení vzorku, dále na distribuci velikosti částic a samotném transportu částic vzorku do plazmatu. Frakcionace je ovlivňována použitou vlnovou délkou laserového pulzu, jeho energií a dobou trvání^{17,18}.

Frakcionace zhoršuje přesnost a správnost analýzy. K potlačení vlivu frakcionace je nutno pečlivě nastavit experimentální podmínky v závislosti na typu vzorku a sledovaných analytech. Vhodné je použít vnitřní standard^{1,3,17}.

Kalibrace

Kalibrace vyžaduje vztažení signálu vzorku na pozadí a na standardní materiál. Komplikací samotné kalibrace je nedostatek vhodných, homogenních a charakterizovaných referenčních materiálů na stopové úrovni prvků. V praxi se používají tři kalibrační postupy¹⁷:

- Externí kalibrace za použití pevného referenčního materiálu, jehož složení je velmi podobné, shodné, se složením matrice vzorku
- Externí kalibrace na pevný referenční standard ve spojení s vnitřní standardizací – pro analýzu pevných přírodních látek je třeba použít přirozeně se vyskytující vnitřní standardy

- Kalibrace pomocí roztoků – standardní roztoky jsou zmlžovány, vzniká aerosol, který je mísen s nosným plynem před samotným vstupem do plazmové hlavice

2.3. KVANTITATIVNÍ ANALÝZA

Laserová ablace v kombinaci s ICP-MS poskytuje informace o zastoupení kovových i nekovových prvků v jednotlivých buňkách. Touto metodou navíc získáme velmi užitečný prostorový model koncentrací a stopových prvků v tkáních. Použití LA-ICP-MS pro kvantitativní vyhodnocení biologických a lékařských vzorků vyžaduje vhodné kvantifikační postupy³.

Existují tři hlavní kritéria, která musí být splněna pro absolutní kvantifikaci stopových prvků v pevných vzorcích:

- Musíme znát přesné množství vzorku transportovaného do ICP
- Složení laserem indukovaného aerosolu musí reprezentovat stechiometrii původního vzorku
- Částice transportované do ICP musí být uvnitř plazmatu plně atomizovány a ionizovány

Tato kritéria jsou splněna jen zřídka, proto bylo nutné vytvořit relativní kalibrační techniky k dosažení těch nejlepších možných výsledků.

Certifikované referenční materiály (CRM) jsou nejlepší volbou pro kvantifikaci vzorku, jako například vepřová (CRM LGC 7112) a hovězí játra (NIST SRM 1577b). Pokud složení certifikovaného referenčního materiálu odpovídá, co nejvíce složením vzorku, tak je možné považovat ablaci, transport, atomizaci a i ionizaci vzorku a standardu za téměř stejné. To umožňuje spolehlivou a velmi přesnou kvantifikaci. Pro každý CRM je k dispozici certifikát obsahující informace o koncentracích jednotlivých složek, a kromě toho se dají v literatuře dohledat hodnoty koncentrací necertifikovaných složek. Použití těchto komerčních referenčních standardů je však velmi omezené a pro laserovou ablaci nepraktické. Biologické matrice reálných vzorků jsou velmi složité a jen velmi zřídka se podobají referenčním materiálům, kterých je velmi málo. Další nevýhodou těchto materiálů je dostupnost v práškové formě a v neposlední řadě jejich cena^{1,24,25}.

Na základě toho byly stanoveny alternativní kalibrační postupy použitím různých kalibračních přístupů. Vyvinuté kvantifikační postupy zahrnují: přípravu matrix-matched standardů, roztokovou kalibraci, kalibraci certifikovanými referenčními materiály (CRM) a filmového povlaku vzorku. Nicméně, každý z těchto způsobů má své výhody a nevýhody, které jsou shrnuty v tabulce 1^{1,3,24}.

Kalibrace certifikovanými referenčními materiály

Certifikované referenční materiály jsou dostupné v lyofilizované práškové formě. CRM je před použitím vysušen podle doporučeného postupu uvedeného v příloženém certifikátu. Následně je CRM rozetřen v třecí misce s tloučkem a poté je z něj pomocí hydraulického lisu vylisovaná tabletká/peletka, která je připevněna na mikroskopické sklíčko. Referenční materiál může být smíchán s pojivem (například polyethylenem), pro zlepšení stability a hlavně pevnosti peletky. Mísením referenčního materiálu s pojivem, dochází k ředění, které je třeba započítat. Referenční materiál může být také modifikován pro zlepšení jeho vlastností. Lisovací krok je optimalizován lisovací silou a časem. Jedná se o velmi jednoduchou a nenáročnou kalibrační metodu. Problémem této kalibrace je nedostatek vhodných referenčních materiálů, rozhodující je typ tkáně, stopové prvky a jejich koncentrační rozsah. Koncentrační rozsah analytu může být snadno upraven vhodným přidavkem analytu a následnou homogenizací obohaceného CRM^{1,25}.

Vnitřní standard (IS = internal standard)

Jako vnitřní standardy se používají prvky, přirozeně se vyskytující v celé tkáni a jejich zastoupení musí být přirozeně homogenní. V ideálním případě je známa jeho koncentrace ve vzorku. IS musí interagovat s laserovým paprskem podobně jako analyt, dále musí dosahovat obdobných ionizačních potenciálů a mít podobné frakcionační účinky. Vnitřní standard kompenzuje výkyvy ve výkonu laseru, rozdíly v tloušťce vzorku a hmotnosti ablatovaného a přepravovaného vzorku, stejně jako nestabilitu v ICP. V biologických vzorcích se jako vnitřní standard používal izotop ¹³C, který kompenzuje změny ve vzorku způsobené dlouhým sušením, ale jeho ionizační potenciál je výrazně vyšší, než běžně měřených prvků. Až 80 % uhlíku může být propuštěno jako CO₂, což způsobuje jiné chování uhlíku při ablaci, transportu a v ICP hlavici. Běžně se používají například izotopy ⁴⁵Sc, ⁸⁹Y, ¹¹⁵In, ²³²Th a nebo ²³⁸U (cit. ^{1,24,25}).

Vnitřní standard jako takový se nemusí v tkáni vyskytovat přirozeně. Mohou se připravit uměle. Vzorek biologické tkáně se ponoří do epoxidové pryskyřice, která obsahuje vnitřní standard. Tento standard se nazývá pseudovnitřním standardem. Epoxidová pryskyřice společně s pseudovnitřním standardem postupně proniká do tkáně. Materiál vzorku je ablatován současně se standardem. Pseudovnitřní standardy mohou být nanášeny i jako tenká vrstva, například zlata, na povrch tkáně. Nanášení zlata bylo prováděno pomocí zlaté rozprašovací elektrody²⁵.

Matrix-matched standardy

Za matricové kalibrační standardy, neboli matrix-matched standardy, považujeme homogenizované biologické tkáně obohacené o analyzované prvky, které jsou homogenně rozprostřeny ve vhodném koncentračním rozsahu. Tyto standardy mají tedy úplně stejnou matici jako vzorek. Biologické tkáně jsou homogenizovány pomocí mixéru, ke zhomogenizované tkáni se přidá standardní roztok kovu, respektive kovů o známé koncentraci a směs se opětovně homogenizuje. Zhomogenizovaná a obohacená tkáň je zmrazena, kryotomem nařezána na velmi tenké plátky (20 – 30 μm) a nakonec přiložena na mikroskopické sklíčko. Koncentrace analytu v připraveném matrix-matched standardu musí být však ověřena, například roztokovou analýzou. Výhodou těchto standardů je, že umožňují přidání jednoho nebo více vnitřních standardů, známého množství měřeného analytu/analytů, nebo izotopicky obohaceného přídavku (izotopové ředění)^{1,24,25}.

Roztoková kalibrace

Do indukčně vázaného plazmatu je přidán rozprašovač, kterým se přidává aerosol standardního roztoku, dojde k mísení aerosolu standardního roztoku a aerosolu měřeného vzorku. Při mísení se používá dvojí tok nosného plynu, nosný plyn nesoucí aerosol z ablační komory a nosný plyn nesoucí aerosol z pneumatického zmlžovače. Oba aerosoly jsou vedeny zvlášť a jsou následně smíchány. Postupně jsou rozprašovány standardní roztoky s rostoucí koncentrací analytu, čímž je v podstatě provedena kalibrace metodou standardního přídavku^{1,24,25}.

Izotopové ředění (ID = isotope dilution)

Vzorek je obohacen izotopem o známém množství tak, aby nově vzniklý izotopický poměr ve vzorku byl ideálně v rozmezí 1 až 10. Z naměřeného poměru izotopů je následně vypočtena koncentrace izotopů ve vzorku. Pro tuto metodu potřebujeme dva stabilní izotopy prvku nepodléhající interferencím. Izotopy se dají buď homogenně vmístit dovnitř vzorku, nebo postačí jejich rovnoměrné nanesení na povrch pevného vzorku. Takovým to příkladem jsou připravené pelety z práškového vzorku obohaceny izotopy, a pro výpočet koncentrací analytů, byly změřeny poměry izotopů roztokovou analýzou^{1,24,25}.

Tabulka 1: Shrnutí omezení a možností kvantifikačních postupů, převzato²⁴

Omezení kvantifikace	Způsob kvantifikace	Možnosti kvantifikace
Dostupnost CRM Omezený koncentrační rozsah Různý obsah vody	Certifikované referenční materiály	Dobrá homogenita a stabilita Flexibilita Možnost odpovídající matrice
Odborné znalosti pro přípravu Vysoká selektivita	Matrix-matched standardy	Široký lineární dynamický rozsah Přesnost Ekvivalence v obsahu vody
Rozdílná citlivost pro roztoky zaváděné zmlžováním a pomocí laserové ablace Nepotlačí vliv frakcionace	Roztoková kalibrace	Metoda standardního přídávku Snadnost provedení Použití vodných standardů
Obtížné míchání a ekvibrace Nepoužitelné pro monoizotopické prvky	Izotopové ředění	Použitelnost v tzv. „tracer“ experimentech Eliminace matričních vlivů
Musí být homogenně zastoupen v celém ablatovaném povrchu Jeho koncentrace by měla být významně odlišná než koncentrace analytu	Vnitřní standard	Korekce v rozdílech během ablačního procesu, transportu aerosolu a stabilitě ICP

Standardní přídavek

Na tkáň připevněnou na mikroskopickém sklíčku se nadávkuje známé množství standardního roztoku kovu, případně kovů, o známých koncentracích a nechá se zaschnout. Z přidávaných koncentrací je následně vypočtena koncentrace v tkáni. Obohacené tkáně mohou být také uloženy do silikagelu, tzv. sol-gel metoda, kdy se používá tetraethylorthosilikát (TEOS). Získáme velmi stabilní standardy s dlouhou trvanlivostí¹.

Agarózové gely

Agaróza se nechá rozpustit v roztoku pufru triacetátu-EDTA (TAE) v ultrazvukové lázni vyhřáté na 80 – 90 °C. Do takto připraveného agarózového gelu se nadávkuje přesné množství standardního roztoku, směs se důkladně zhomogenizuje na vortexu. Připravený agarózový gel se nakápne na mikroskopické sklíčko a nechá se vysušit do konstantní hmotnosti. Před samotným sušením je velmi důležité odstranit z gelu všechny vzduchové bublinky, které mohou způsobit prasknutí gelu během sušení. Agarózové gely se mohou sušit ve vakuu, v digestoři, nebo za zvýšené teploty (60 °C). Takto připravené a vysušené agarózové gely jsou připraveny k měření. Obdobným způsobem se připravují kalibrační standardy z epoxidové pryskyřice. Tyto standardy mají velmi dlouhou dobu trvanlivosti.

Referenční skla

Referenční skla jsou považována za téměř ideální referenční materiál pro kalibraci LA-ICP-MS. Dají se relativně snadno připravit ve vhodném koncentračním rozsahu analytů. Výhodou těchto referenčních skel je zajištění homogenní distribuce potřebných prvků. Referenční skla jsou i komerčně dostupná a jsou hojně využívána pro externí kalibraci. Příkladem jsou CRM 610 – 617 (NIST). Největší uplatnění našla při měření geologických a archeologických vzorků, proto nebudou dále více diskutovány¹.

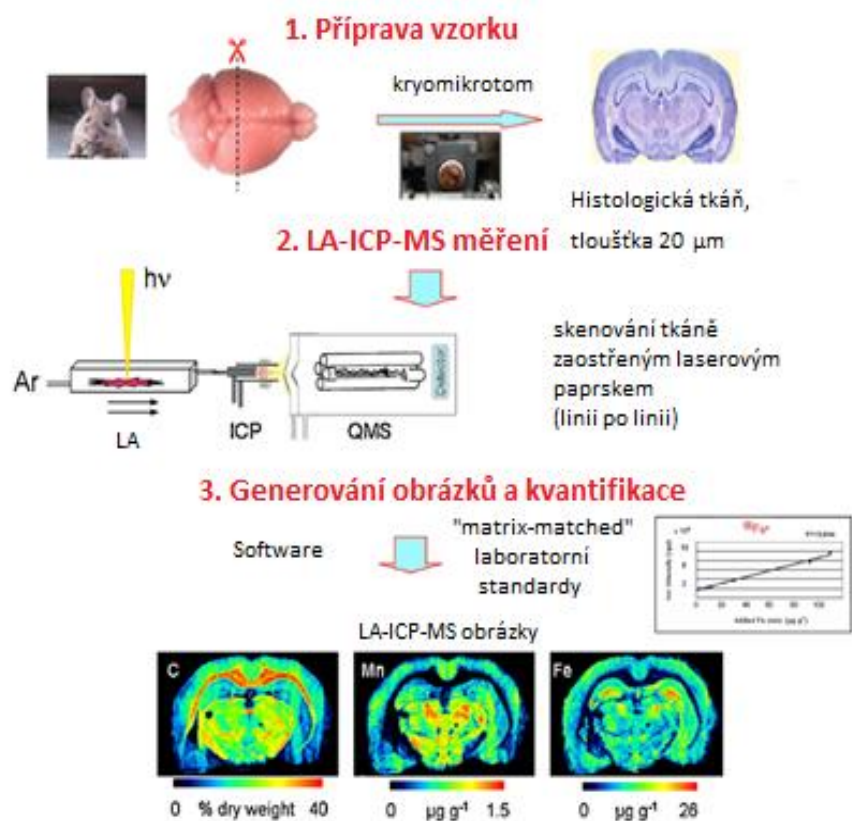
2.4. APLIKACE

Laserová ablace ve spojení s ICP-MS se používá, jak již bylo zmíněno, ke stanovení stopových až ultrastopových koncentrací kovových prvků v biologických vzorcích, vzorcích životního prostředí (sledování vývoje znečištění prostředí analýzou dřeva stromů, mořských mušlí), u geologických a archeologických vzorků (využívající se k datování stáří různých nálezů – zvířecí a lidské zuby a kosti, úlomky keramiky), v neposlední řadě také v průmyslu.

Biologické vzorky jsou velmi rozšířené, provádí se na nich lékařské studie, studuje se anatomie orgánů, růst nádorů, různá patologická onemocnění a testují se farmakologické účinky léků. Dále se provádí studie na modelových tkáních zvířat, kde se identifikují prvky v uměle vytvořených metaloproteinech, nebo působení léku na uměle vytvořené nemoci.

Další možností využití LA-ICP-MS je zobrazování prvků ve vzorku, tzv. bioimaging, který našel uplatnění v mnoha oblastech. První studie zabývající se zobrazováním prvků v biologických vzorcích pomocí LA-ICP-MS publikoval Wang v roce 1994. Od té doby se LA-ICP-MS stala nejpoužívanější metodou pro analýzy distribuce kovů, polokovů a nekovů v tenkých tkáňových řezech různých biologických tkání²⁶. LA-ICP-MS umožňuje stanovit rozložení prvků stopových až ultrastopových koncentrací. Některé prvky stopových koncentrací jsou považovány za velmi důležité, nezbytné pro život mnoha organismů (Fe, Cu, Zn, Mn, Mg, Ca a další). Nicméně, nedostatek nebo nadbytek těchto prvků může být u patologických stavů pouze orientační, zatímco vysoké koncentrace toxických prvků (například Cd, As, Cr, Pb, Hg) mohou vyvolat i závažná onemocnění, nebo dokonce smrt.

Na obrázku 11 je zobrazen celý postup od přípravy vzorku, přes postupné skenování povrchu až po vznik 2D obrázků. Vzorky jsou zamrazeny (-80 °C) a následně nařezány kryotomem při teplotě -20 °C na velmi tenké plátky (20 μm), které jsou připevněny na mikroskopické sklíčko. U takto připravených vzorků postupným skenováním celého povrchu vzorku, řádek po řádku, získáme intenzity iontů daných prvků. Získaná data závislosti intenzity iontů v čase jsou pomocí vhodného softwaru zpracovány do 2D obrázků, kde je intenzita iontů nebo odpovídající koncentrace daného prvku zobrazena přímo na analyzované tkáni pomocí barevné škály^{26,27}.



Obrázek 11: Postup zobrazování LA-ICP-MS (převzato a přeloženo²⁷)

2.4.1. BIOLOGICKÉ VZORKY

Rostlinné vzorky

V rostlinných tkáních jako takových se nejčastěji stanovují biologicky důležité prvky, ale i prvky toxické, a to nejen pro rostliny, ale i pro člověka. Vysoká koncentrace některých prvků může vést až k jejich úmrtí. Například v listech slunečnic byla stanovena síra a selen²⁸, nebo bylo stanoveno 13 vybraných prvků (P, S, Ca, K, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd, La, Ce), které byly následně rozděleny do čtyř skupin podle místa jejich hromadění. Nejnižší koncentraci vykazoval lanthan a naopak nejvyšší síra²⁹. Bylo provedeno kvantitativní zobrazení toxických (Cd a Pb) a esenciálních (Cu a Zn) prvků v tenkých průřezích kořenů a stonků hrachu. Důvodem bylo zkoumání příjmu, přepravy a hromadění vybraných kovů do nadzemních částí rostlin³⁰.

Živočišné vzorky

Analyzované biologické vzorky živočišného původu by se daly rozdělit do dvou pomyslných skupin, na biologické vzorky měkké a tvrdé. Do skupiny „měkkých“ biologických vzorků patří tkáň. Tkáním jsou věnovány následující dvě podkapitoly (2.4.1.1 a 2.4.1.2). Do druhé skupiny, skupiny tzv. „tvrdých“ biologických vzorků patří močové kameny, kosti, zuby, vlasy, nehty atd.

Například u léčených lidských **zubů** bylo stanoveno zastoupení vybraných prvků (Al, Ba, La a Sr). Tyto prvky jsou součástí zubních náplní. Získané hodnoty byly porovnány s hodnotami zdravých zubů. Bylo zjištěno, že tyto prvky migrují ze zubních náplní do zdravých částí zubů³¹.

V pramenech **vlasů** zdravých jedinců byly stanoveny základní (Zn, Fe a Cu) a toxické prvky (Cr, Pb a U). Vlasy jako takové mají jedinečnou schopnost odrážet celkový příjem těla, dají se na nich sledovat změny v čase v závislosti na délce vlasů³².

2.4.1.1. ŽIVOČIŠNÁ TKÁŇ

V živočišných tkáních se stanovují těžké kovy, které jsou pozůstatkem léčby rakoviny klinickými léčivými, které ve své struktuře obsahují daný těžký kov. Příkladem takového to kovu může být platina, ruthenium nebo vanad. Cisplatinu, jak napovídá sám název, obsahuje ve své struktuře platinu. Obecně u klinických léčiv obsahující platinu je znám mechanismus interakce s buňkou, nikoliv však vychytání a distribuce platiny v nádorových buňkách, stejně jako není znám vedlejší účinek na zdravé jedincovy tkáň. Právě zjištění rozmístění platiny, nejen v nádorových tkáních jedinců léčených cisplatinou nebo jinými cytostatiky, může vést k lepšímu pochopení jejich terapeutického účinku. Dále je uvedeno několik příkladů stanovování platiny v tkáních, v těchto tkáních se však nemusí stanovovat jenom platina, nýbrž i jiné prvky.

- Zkoumání příčin nefrotoxicity **v ledvinách** myší léčených cisplatinou ukázalo heterogenní rozmístění platiny a její hromadění v kůře ledvin, kde poškozuje proximální kanálky³³.
- Kvantitativní stanovení platiny **ve varlatech, ledvinách a hlemýždi** myší léčených cisplatinou prokázalo, že platina se hromadí ve všech třech zmíněných orgánech,

nejvyšší koncentrace byla v oblastech dobře zásobených krví a kostní částí hlemýžďe³⁴.

- Platina byla také stanovována v **tenké vazivové bláně pokrývající hrudní stěnu pohrudnice**. Koncentrace platiny v tenké vazivové bláně byla vyšší v oblastech, kde nebyly žádné nádorové buňky, naopak v místech nádorových buněk byla nižší³⁵.
- Ve vnitřnostech myši léčených cisplatinou a KP-1339 (**ledviny, játra, slezina a svaly**) bylo kvantitativně stanoveno vedle platiny i ruthenium. Nejvyšší koncentrace Ru byla stanovena v ledvinách a játrech, koncentrace ve slezině byla podstatně nižší a koncentrace ve svalu nejnižší. Koncentrace platiny v ledvinách byla vyšší než v játrech, a ve slezině a svalu nebyla stanovována³⁶.

LA-ICP-MS našla také uplatnění v generování kvantitativních snímků kontrastních činidel na bázi gadolinia, které se používají pro zobrazování magnetickou rezonancí (MRI), v tenkých tkáňových řezech, nebo samostatných buňkách. LA-ICP-MSI je doplňkovou technikou k magnetické rezonanci, oproti ní vykazuje vyšší citlivost, prostorový signál i kvantitativní signál, ale navíc podává informace o osudu podávaných kontrastních činidel³⁷. Mezi vybrané příklady patří:

- Prostorové rozložení nanočástic oxidu železa obohaceného o gadolinium bylo získáno v **nádorovém řezu**, který byl podroben magnetické fluidní hypertemii. Tato studie ukázala, že distribuce Gd velmi koreluje s atomy železa. Kromě Gd a Fe byly měřeny také Cu, Ni, P, S a Zn³⁸.
- Prostorové rozložení v **národu** a v **ledvinách** myši po podání liposomálních nanočástic gadolinia potvrdilo přítomnost gadolinia v nádorové tkáni a jeho hromadění se v oblastech vyššího prokrvení tkáně, a potvrdila i přítomnost gadolinia v ledvinách. Vedle gadolinia byl stanovován i zinek³⁹.

LA-ICP-MS v kombinaci s MALDI-MS nebo DESI-MS našlo uplatnění v analýze metaloproteinů, případně polokovů vázaných na proteiny k objasnění jejich struktury, dynamiky a funkce komplexů proteinů s kovem, polokovem. Jedna z možných strategií stanovení spočívá v separaci proteinů ze vzorku. Separace může být provedena pomocí kapilární elektroforézy (CE), kapalinové chromatografie (HPLC) nebo polyakrylamidovou

gelovou elektroforézou (PAGE). Odseparované proteiny jsou následně detekovány hmotnostní spektrometrií pro objasnění struktury a molekulové hmotnosti těchto komplexů³⁷.

- Byla stanovena koncentrace platiny vázané na proteiny, mědi a zinku **v ledvinách** krysléčených *in vivo* cisplatinou. Proteiny byly nejprve separovány PAGE, a ty, na které byla navázána platina, byly následně detekovány LA-ICP-MS. Platina se hromadí v kůře ledvin, kde poškozuje proximální kanálky, naopak koncentrace mědi a zinku zde byla nižší⁴⁰.

V oční čočce jsou přítomny antioxidantní enzymy, které vychytávají volné radikály, a ke správné funkci potřebují daný kov. Bylo provedeno kvantitativní stanovení Fe, Cu a Zn **v čočce lidského oka** a hloubkové profilování **u čoček hovězích**. Byl studován i možný vliv nedostatku Fe a Zn na oční onemocnění, jako je například šedý zákal nebo věkem podmíněná degenerace⁴¹. Ve zmrazené nativní myší tkáni **krční míchy** bylo stanoveno několik vybraných kovů (Fe, Cu a Zn) a nekovů (C, P a S). Koncentrace vybraných prvků byla vždy v šedé hmotě vyšší, než v hmotě bílé⁴².

2.4.1.2. MOZKOVÁ TKÁŇ

Kovy jako Cu, Zn, Fe, Na, Ca, K, Mn, Mg jsou velmi důležité pro zdravý vývoj a život buněk obecně. Co, Mn, Cu, Fe a Zn jsou nezbytné jako kofaktory pro enzymy základních buněčných metabolismů jako je dýchání, nebo přenos kyslíku. Mozek je energeticky nejnáročnější orgán a zároveň vykazuje nejmenší schopnost bránit se vůči poškození. Kovy jsou určitým způsobem orientovány směrem k mozku. Nedostatek některých základních zmíněných kovů, ať už způsobený geneticky nebo výživou, může mít za následek opožděný vývoj jedince, nebo některé onemocnění²⁷.

V mozkových tkáních zdravých jedinců bývají nejčastěji stanovovány tyto prvky - Fe, Zn, Cu, P, C, Mg a K, Na, Pb, Cl. Zjištěné koncentrace těchto prvků u zdravého jedince, jsou následně porovnávány s výsledky jedince s nádorovým onemocněním (glioblastomové nádory), jedince po mrtvičce, jedince trpícího Parkinsonovou, Alzheimerovou případně Wilsonovou chorobou. Dále se zjišťuje, zda mohou tyto prvky narušit růst a vývoj nádoru, nebo modifikovat DNA⁴³⁻⁴⁶.

Studium neurodegenerativních onemocnění

Do skupiny neurodegenerativních onemocnění patří například Parkinsonova, Alzheimerova nebo Wilsonova choroba. Všechny uvedené nemoci jsou úzce spjaty s nerovnováznou bilancí kovů v mozku. Na základě toho bylo provedeno několik kvantitativních stanovení prvků v mozkové tkáni, které jsou shrnuty v tabulce číslo 2. V tabulce jsou uvedeny i jiné druhy analýz, které byly provedeny na mozkové tkáni³⁷.

Parkinsonova choroba je vyvolána jednostrannou poruchou 6-hydroxydopaminu (6-OHDA). Studium se provádí na mozcích nemocných myší a myší léčených L-3,4-dihydroxyfenylalaninem (L-DOPA). Byly stanoveny tyto prvky – Cu, Fe, Mn a Zn⁴⁷. V jiném případě nebyly studovány léčené mozkové tkáně, ale jen mozkové tkáně s Parkinsonovou chorobou vyvolanou 6-OHDA. Důvodem této studie bylo porovnání nemocných hemisfér, u kterých byla zjištěna zvýšená koncentrace Fe, Mn a Cu v poškozené oblasti (substantia nigra), naopak hladina mononenasycených lipidů byla v této oblasti snížena⁴⁸. Jako model Parkinsonovy choroby slouží i mozky myší infikované 1-methyl-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridinem (MTMP). Na těchto vzorcích byla provedena kvantitativní analýza Cu, Fe, Zn a Mn. V okolí mozkové komory byla koncentrace mědi výrazně nižší, naopak v mozkové kůře byla snížena jen mírně. Tato studie potvrdila, jak významnou roli má měď v Parkinsonově chorobě⁴⁹.

Wilsonova choroba je způsobena závažnou genetickou poruchou metabolismu mědi způsobenou nedostatkem měď transportující ATPázou (ATP7B)³⁷. Studie byla provedena na geneticky upravených mozcích myší s vadou ATPázy ve věkovém rozmezí (11 – 24 měsíců). Koncentrace zinku byla zvýšena v oblastech s vysokou koncentrací mědi, a to konkrétně v parenchymu, ale ne v oblastech pro zinek typických. Dalo by se říct, že zinek je do určité míry substrátem Cu-ATPáz. Koncentrace železa a manganu zůstala po celou dobu ve všech oblastech konstantní. Tato studie potvrdila akumulaci mozkové mědi v parenchymu a zjistilo se snížení koncentrace mědi v mozkomíšním moku⁵⁰.

Alzheimerova choroba narušuje část mozku a způsobuje pokles kognitivních funkcí (myšlení, paměť a úsudek), bývá nejčastější příčinou demence⁵¹. Metaloproteomická studie byla provedena i na vzorku mozku s Alzheimerovou chorobou. K oddělení poškozených buněk mozku byla použita 2-D polyakrylamidová gelová elektroforéza. Vybrané separované

proteiny byly identifikovány MALDI-FTICR-MS, následně byly proteinové skvrny obohaceny o izotopově značené prvky kovů a analyzovány pomocí LA-ICP-MS. Zjištěný poměr izotopů $^{54}\text{Fe} / ^{56}\text{Fe}$, $^{65}\text{Cu} / ^{63}\text{Cu}$ a $^{67}\text{Zn} / ^{64}\text{Zn}$ ukázal, že určité bílkoviny mají přirozené zastoupení izotopů. Tyto proteiny obsahovaly kov již před samotným obohacením, jednalo se převážně o skvrny obsahující měď. Na druhé straně jsou zde skvrny, které mají jiné izotopické zastoupení prvků. U těchto proteinů došlo k akumulaci izotopově značeným prvků uvnitř struktury proteinu. Většinou se jednalo o proteiny obsahující ve své struktuře železo. Nakonec byly tyto proteiny identifikovány⁵².

Tabulka 2: Přehled kvantitativních stanovení prvků v mozkové tkáni

Důvod studie:	Vzorek:	Měřené izotopy:	Přístroj:	Shrnutí:	Cit.:
Léčba karboplatinou	kryší mozek	^{88}Sr , ^{157}Gd , ^{195}Pt	LA (New Wave UP 266, California, USA), ICP-QMS (HP 4500, Agilent Technologies, Cheshire, UK) - 266 nm	Byl popsán a ověřen nový kvantifikační postup biologických tenkých řezů, založen na přidavcích obohacené krve nebo krevního séra.	[53]
Alzheimerova choroba	lidský mozek	^{54}Fe , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{65}Cu , ^{67}Zn , ^{64}Zn	LA Ablascop (Bioptic, Berlin, Germany), ICP-SFMS (ELEMENT, Thermo Electron Corporation, Bremen, Germany) – 213 nm	Byly detekovány proteiny obsahující kov metodou LA-ICP-MS a pomocí MALDI-FTICR-MS byl proveden pokus o jejich identifikaci.	[52]
Nanočástice oxidu železa obohacené o gadolinium	myší nádor	^{31}P , ^{34}S , ^{56}Fe , ^{60}Ni , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{158}Gd	LA (New Wave UP 213, California, USA), ICP-QMS (Agilent 7500a, USA) – 213 nm	Byla zjištěna vysoká korelace mezi koncentrací Fe a Gd v tkáni, pravděpodobně odráží vstříknutí magnetické kapaliny.	[38]
Liposomální nanočástice gadolinia	myší nádor, ledviny	^{157}Gd , ^{66}Zn	LA (New Wave Research UP 266, Cambridgeshire, UK), ICP-QMS (Agilent 4500, USA) – 266 nm	Po podání liposomálních nanočástic Gd byla prokázána přítomnost gadolinia v nádorové tkáni, převážně v oblastech s vyšším prokrvením, a také v ledvinách.	[39]
Parkinsonova choroba (model 6-OHDA)	myší mozek	^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{66}Zn	LA (New Wave UP 213, California, USA), ICP-QMS (XSeries II, Thermo Fischer Scientific, Bremen, Germany) – 213 nm	Byly porovnány koncentrace čtyř prvků v mozcích nemocných Parkinsonovou chorobou a mozcích léčených L-DOPA. V mozkové kůře byli koncentrace prvků přibližně stejné, v jiných částech se však lišili.	[47]
Parkinsonova choroba (model 6-OHDA)	myší mozek	^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{66}Zn	LA (New Wave UP 266, Fremont, CA, USA), ICP-QMS (X Series II, Thermo Fisher Scientific, Germany) – 266 nm	Byly studovány myší mozky a bylo zjištěno, že v poškozených oblastech je vyšší koncentrace Fe, Mn a Cu, naopak hladina mononenasycených lipidů je nižší, než ve zdravých tkáních.	[48]

Parkinsonova choroba (MPTP model)	myší mozek	^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{66}Zn	LA (New Wave UP 266, Fremont, USA), ICP-QMS (Agilent 7500, Tokyo, Japan) – 266 nm	Na vzorcích byla provedena kvantitativní analýza vybraných prvků. Koncentrace mědi byla v okolí mozkové komory výrazně snížena, naopak v mozkové kůře byla snížena jen mírně. Byla potvrzena důležitá role mědi v Parkinsonově chorobě.	[49]
Wilsonova choroba	kryší mozek	^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{66}Zn	LA (NWR 213, New Wave Research, Fremont, CA, USA) ICP-QMS (X Series II, Thermo Scientific, Bremen, Germany) – 213 nm	Koncentrace zinku byla zvýšena v oblastech s vysokou koncentrací mědi – v parenchymu, kde je měď akumulována. Snížení koncentrace Cu bylo pozorováno v mozkomíšním moku. Naopak koncentrace Fe a Mn zůstala ve všech oblastech konstantní.	[50]
Alzheimerova a Parkinsonova choroba	lidský a kryší mozek	^{63}Cu , ^{66}Zn	LA (CETAC LSX 200, Cetac Technologies, Omaha, NE, USA), ICP-SFMS (Element, Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) – 266 nm	Bylo studováno a kvantifikováno prostorové rozložení vybraných prvků v tkáních zdravých jedinců, získané hodnoty byly porovnány s hodnotami jedinců trpících neurodegenerativním onemocněním. Koncentrace prvků se lišily.	[54]
Parkinsonova choroba (model 6-OHDA)	myší mozek	^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu , ^{66}Zn	LA (New Wave UP213, Kenelec Technologies, Mitcham, Victoria, Australia), ICP-QMS (Agilent Technologies 7500, Victoria, Australia) – 213 nm	Kvantitativní analýzou konsekutivních tkáňových řezů myšího mozku (substantia nigra) bylo zkonstruováno do trojrozměrného modelu prvků. Tato metoda může být použito u široké škály různých tkání.	[55]
Stárnutí	myší mozek	^{63}Cu	LA (New Wave, UP 266, Fremont, USA), ICP-QMS (Agilent 7500ce, USA) – 266 nm	Měď hraje důležitou roli v procesu stárnutí. Byly vybrány a analyzovány mozkové tkáně myší různého stáří v rozmezí 2 až 14 měsíců. Se stárnutím myší je měď v mozkové tkáni distribuována homogenněji čím dál méně. Měď se hromadí v šedé hmotě koncového mozku, u mozkové kůry je tomu opačně.	[56]

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. CHEMIKÁLIE, POMŮCKY A PŘÍSTROJE

3.1.1. CHEMIKÁLIE

- disodná sůl ethylendiaminotetraoctové kyseliny (EDTA, > 99 %), Sigma Aldrich
- hydroxid sodný, p.a., Penta
- tris(hydroxymethyl)aminomethan, Merck, spol s.r.o.
- agarózový standard, Roth (DNA/RNA elektroforéza)
- kyselina octová (ROTIPURAN Supra 100 %), Roth
- kyselina dusičná (67 %), Analpure, pro stopovou analýzu, Analytika, spol. s.r.o., Praha
- peroxid vodíku (30 %) PA+, Analytika, spol. s.r.o., Praha
- CRM víceprvkový vodný kalibrační roztok o hmotnostní koncentraci $100 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ (každý) MIX 015 (Al, Be, Bi, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Si, Sr, V, W, Zn, Zr v 5 % HNO_3 (v/v)), Analytika spol. s.r.o., Praha
- víceprvkový kalibrační roztok INT – MIX 1 $10 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ (Bi, In, Sc, Tb, Y v 5 % HNO_3 (v/v)), Analytika spol. s.r.o., Praha
- certifikovaný referenční materiál TM-15.2 (LOT 0313), Environment Canada
- certifikovaný referenční materiál TMDA-64.2 (LOT 1010), Environment Canada
- certifikovaný referenční materiál ústřice (SRM 1566b, NIST Analysts), USA
- certifikovaný referenční materiál humr (CRM TORT-2, NRC-CNRC), Ottawa, Kanada
- certifikovaný referenční materiál žraločí játra (CRM DOLT-4, NRC-CNRC), Ottawa, Kanada
- certifikovaný referenční materiál vepřová játra, (CRM GBW09551, Food Detection Science Institute Ministry of Commerce), Beijing, Čína
- ladící roztok pro ICP-MS (7500 Series PA Tuning 1); As, Be, Cd, Zn; $c = 20 \text{ mg.l}^{-1}$, Mg, Ni, Pb; $c = 10 \text{ mg.l}^{-1}$, Al, Ba, Bi, Co, Cr, Cu, In, Li, Lu, Mn, Na, Sc, Sr, Th, Tl, U, V; $c = 5 \text{ mg.l}^{-1}$, Y, Yb; $c = 2,5 \text{ mg.l}^{-1}$, Agilent Technologies

- ladící roztok pro ICP-MS (7500 Series PA Tuning 2); Ge, Mo, Pd, Ru, Sb, Sn; c = 10 mg.l⁻¹, Ir, Ti; c = 5 mg.l⁻¹, Agilent Technologies
- deionizovaná voda

3.1.2. POMŮCKY

- skleněné laboratorní nádobí (odměrné baňky 25 ml, 50 ml, mikroskopická sklíčka a ITO sklíčka od firmy Bruker Daltonics)
- plastové laboratorní nádobí (jednorázové zkumavky, váženky, misky, Pasteurovy pipety, nálevky, špičky na automatické pipety)
- teflonové kelímky na mikrovlnný rozklad
- sada automatických pipet
- třecí miska s tloučkem
- sada na lisování tablet
- keramický nůž
- pH papírky

Veškeré laboratorní nádobí, skleněné i plastové, které bylo použito k přípravě kalibračních vzorků, bylo ponořeno do 10 % roztoku kyseliny dusičné na 24 hodin. Následně bylo několikrát opláchnuto deionizovanou vodou a vysušeno v sušárně a skladováno v uzavíratelných plastových sáčkách.

3.1.3. PŘÍSTROJE

- ICP-MS spektrometr ORS-ICP-MS 7700x, Agilent, Japan
- excimerový laserový ablační systém Analyte G2, Photon Machines Inc., USA
- kryomikrotom Leica CM1950, Leica, Německo
- mikrovlnný rozkladný systém MLS 1200 mega, Milestone
- elektronické váhy ABJ 220-4M, KERN & SOHN GmbH
- vortex mixér MS 3 basic, IKA
- ultrazvuková lázeň Laboratory 3, Ultrazvuk, s.r.o., Česká republika
- hydraulický lis do 15 tun, GRASEBY SPECAC
- přístroj na demineralizovanou vodu, Milli-Q Reference System
- sušárna UFE 400, Memmert

3.1.4. ANALYZOVANÉ VZORKY

K LA-ICP-MS zobrazování byly použity dvě živočišné tkáně, a to myší ledvina, která byla poskytnuta Laboratoří charakterizace molekulární struktury, Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. sídlící v Praze a neonatální myší mozková tkáň. Vzorky kontrolní a hypoxicko-ischemicky poškozené neonatální mozkové tkáně pocházejících z hypoxicko-ischemického myšího modelu byly získány od RNDr. Iva Juránka, DrCs. a Mgr. Dominiky Luptákové z Ústavu experimentální farmakologie a toxikologie, Slovenské akademie věd sídlící v Bratislavě.

Příprava tenkých řezů pomocí kryomicrotomu

Vzorky živočišných tkání byly nejprve zmrazeny na velmi nízkou teplotu (-80 °C). Po vytažení z mrazáku byly vloženy do kryomicrotomu nastaveného na teplotu -13 °C a nechaly se asi 45 minut temperovat na danou teplotu. Po uplynulé době byly pomocí kryomicrotomu nařezány na velmi tenké řezy (30 µm), které byly přiloženy na ITO sklíčko (sklíčko potažené vrstvou oxidu india a cínu), které bylo stejně jako živočišná tkáň temperováno na teplotu -12 °C. Přiložený tkáňový řez byl pomocí prstu zahřát ze spodní strany sklíčka a tím došlo k jeho natavení a následnému přilepení k ITO sklíčku. Připevněné řezy tkání byly uloženy do exsikátory a vysušeny ve vakuu po dobu 45 minut. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí LA-ICP-MS.

3.2. PRACOVNÍ POSTUPY

3.2.1. PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍCH AGARÓZOVÝCH GELŮ

Příprava zásobního roztoku 0,5 mol.l⁻¹ EDTA

4,7 g disodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA) bylo naváženo do 25 ml odměrné baňky a rozpuštěno ve 20 ml deionizované vody. Po rozpuštění bylo upraveno pH na hodnotu pH=8 roztokem hydroxidu sodného o koncentraci 0,55 mol.l⁻¹. Nakonec byl roztok doplněn deionizovanou vodou po rysku a několikanásobně promíchán.

Příprava zásobního roztoku pufru triacetát-EDTA (TAE)

12,1 g tris báze ((trishydroxymethyl)aminomethanu) bylo naváženo do 50 ml odměrné baňky a rozpuštěno ve 25 ml deionizované vody. Po rozpuštění byla k tomuto roztoku opatrně přidána ledová kyselina octová (2,855 ml) a následně 5 ml $0,5 \text{ mol.l}^{-1}$ zásobního roztoku EDTA. Nakonec byla 50 ml odměrná baňka doplněna po rysku deionizovanou vodou. Připravený roztok TAE byl uchováván při pokojové teplotě a hodnota pH se pohybovala okolo 8,5.

Příprava pracovního pufru TAE

Do 50 ml odměrné baňky byl odpipetován 1 ml zásobního roztoku pufru TAE a doplněn po rysku deionizovanou vodou. Pracovní roztok byl připravován pro každý experiment nový. Výsledná koncentrace roztoku byla 40 mmol.l^{-1} roztok TAE a 1 mmol.l^{-1} roztok EDTA.

Příprava kalibračních agarózových gelů

Do jednorázových plastových zkumavek byla navážena agaróza, ke které bylo přidáno x ml pracovního pufru TAE o koncentraci 40 mmol.l^{-1} . Přesný objem pufru je pro každý kalibrační bod uveden v tabulce 3. Jednorázové zkumavky byly umístěny do ultrazvukové lázně nastavené na teplotu $80 \text{ }^\circ\text{C}$ pro homogenní rozpuštění agarózy. Po kvantitativním rozpuštění agarózy, byl připipetován vhodný přírůstek víceprvkového kalibračního vodného roztoku (MIX 015, $c = 100 \text{ mg.l}^{-1}$), uvedené v tabulce 3. Agarózové gely byly zhomogenizovány pomocí vortex mixéru (1200/min, 2 minuty) a poté ponořeny zpět do vyhřáté ultrazvukové lázně, aby nedošlo k ochlazení gelů a tím k jejich ztuhnutí. Pasteurovou pipetou byly odebrány části gelů a nanášeny na mikroskopická sklíčka, tak aby neobsahovaly vzduchové bubliny, které by mohly způsobit prasknutí gelů v průběhu sušení. Zbytky gelů byly nadávkovány do plastových misek. Mikroskopická sklíčka i plastové misky s gely byly vakuově sušeny do konstantní hmotnosti v exsikátoru.

Vysušené agarózové gely v plastových miskách byly rozloženy v mikrovlnném mineralizátoru a koncentrace vybraných kovů byly následně analyzovány pomocí ICP-MS. Agarózové gely nanášené na mikroskopických sklíčkách byly dále analyzovány pomocí LA-ICP-MS a jejich výsledky byly použity ke kvantifikaci kovů v živočišných tkáních.

Tabulka 3: Popis složení agarózových gelů společně s vypočtenými přídávky CRM

Koncentrace [ppm]	Navážka agarózy [mg]	Pufrovací roztok TAE [μ l]	Kalibrační vodný roztok [μ l]
0	50,1	5000	0
25	50,1	4987,5	12,5
50	50,2	4974,5	25,5
75	50,0	4962,5	37,5
100	49,9	4950	50



Obrázek 12: Agarózový gel na mikroskopickém sklíčku po vysušení

Mikrovlnný rozklad kalibračních agarózových gelů

Vysušené agarózové gely byly rozděleny na dvě poloviny a následně naváženy do teflonových mineralizačních kelímků ($m = 25 - 40$ mg), do kterých byly přidány 2 ml 67 % kyseliny dusičné a 1 ml 30 % peroxidu vodíku. Rozklad byl proveden řízeným vícekrokovým rozkladným programem (tabulka 4) v mikrovlnném rozkladném systému MLS 1200 mega. Po skončení rozkladu byly kelímky nechány vychladnout zhruba na laboratorní teplotu a poté byly obsahy kvantitativně převedeny do skleněných 25 ml odměrných baněk a doplněny deionizovanou vodou po rysku. Takto připravené a důkladně promíchané roztoky byly před analýzou převedeny do 16 ml plastových zkumavek, které byly kompatibilní se sloty autosampleru.

Tabulka 4: Mikrovlnný rozkladný program

Číslo kroku	Čas trvání [min]	Výkon [W]
1	2	250
2	2	0
3	5	400
4	2	0
5	2	500
6	2	0
7	6	600

Po převedení vzorků do odměrných baněk byly mineralizační kelímky několikrát promyty deionizovanou vodou a byl proveden čistící rozklad se 3 ml 67 % kyseliny dusičné pro vyčištění kelímků. Tento čistící krok následuje po každém rozkladném kroku v mineralizačních nádobkách. Po čistícím kroku byly kelímky několikanásobně promyty deionizovanou vodou a vysušeny při laboratorní teplotě v digestoři.

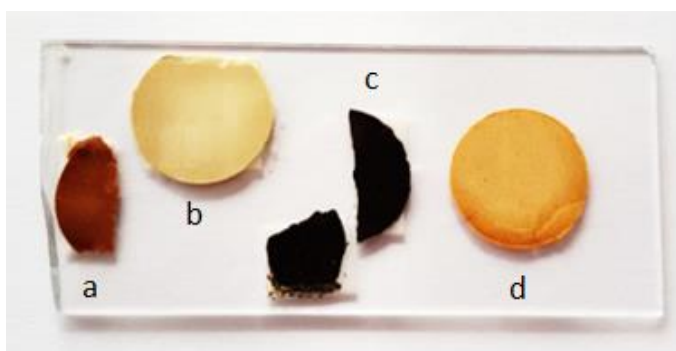
Příprava kalibračních roztoků a interního standardu

Z víceprvkového vodného kalibračního standardu MIX 015 o hmotnostní koncentraci prvků 100 mg.l^{-1} byl připraven zásobní roztok o koncentraci 10 mg.l^{-1} , který obsahoval Al, Be, Bi, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Si, Sr, V, W, Zn a Zr. Ze zásobního roztoku byly připraveny do 25 ml odměrných baněk kalibrační standardy tak, aby bylo použito maximálně stonásobné ředění v jednom ředícím kroku. Kalibrační řada obsahovala kromě slepého pokusu celkem 6 kalibračních roztoků o koncentraci 1; 10; 50; 100; 250 a $500 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$. Ke každému připravenému kalibračnímu standardu byla přidána koncentrovaná kyselina dusičná (2 ml), tak aby přídavek kyseliny odpovídal obsahu kyseliny v analyzovaných vzorcích.

Pro potlačení nespektrálních interferencí byl použit roztok interního směšného standardu Bi, In, Sc, Tb a Y o koncentraci $100 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$. Roztok byl připraven ředěním zásobního roztoku interního standardu pro ICP-MS o koncentraci 100 mg.l^{-1} (INT MIX 1).

3.2.2. CRM LISOVANÉ TABLETKY - KALIBRAČNÍ STANDARDY

Certifikované referenční materiály byly vysušeny dle návodu uvedeného výrobcem na příslušných certifikátech. Vysušené referenční materiály byly homogenizovány v achátové třecí misce s tloučkem a následně lisovány pomocí hydraulického lisu do formy kruhových tabletek s tloušťkou cca. 1-2 mm (použitý tlak 10 tun / 5 min). Vzniklé kalibrační standardy byly upevněny oboustrannou lepicí páskou na mikroskopické sklíčko (obr. 13). Takto připravené standardy byly dále analyzovány pomocí LA-ICP-MS a získané výsledky byly využity ke kvantifikaci kovů v živočišné tkáni.



Obrázek 13: Vylisované tabletky z CRM upevněné na mikroskopickém sklíčku

(a – CRM pork liver, b – CRM 1566b, c – CRM DOLT-4, d – CRM TORT-2)

3.2.3. KALIBRACE STANDARDNÍM PŘÍDAVKEM

Na tenký řez (20 – 30 μm) mozkové tkáně upevněné na mikroskopickém sklíčku bylo nadávkováno 0,2 μl kalibračního roztoků s rostoucí koncentrací analyzovaných prvků a vzniklé kalibrační body byly ponechány schnout do druhého dne. Připravená kalibrační řada obsahovala celkem 5 kalibračních bodů obsahujících 0; 25; 50; 75 a 100 mg.l^{-1} . Kalibrační roztoky byly připraveny ředěním CRM víceprvkového vodného kalibračního roztoku (MIX 015) o hmotnostní koncentraci $100 \pm 0,2 \text{ mg.l}^{-1}$ (Al, Be, Bi, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Si, Sr, V, W, Zn a Zr). Takto připravená kalibrační řada byla opět analyzována pomocí LA-ICP-MS a získané hodnoty byly následně použity ke kvantifikaci kovů v živočišné tkáni.

3.3. POUŽITÉ INSTRUMENTÁLNÍ TECHNIKY

Veškeré experimenty byly provedeny na hmotnostním spektrometru s indukčně vázaným plazmatem vybavený kvadrupólovým analyzátozem a oktapólovou kolizně-reakční celou pracující v heliovém módu pro potlačení možných spektrálních interferencí (ORS-ICP-MS 7700x, Agilent Technologies). Pro zavedení vzorku během roztokové analýzy agarózových gelů bylo využito peristaltické pumpy, koncentrického zmlžovače (MicroMist 0,4 ml.min⁻¹) a Scottovy mlžné komory.

Laserový ablační systém (Analyte G2 laserová ablace, Photon Machines) vybavený excimerovým ArF laserem s vlnovou délkou 193 nm slouží k zavádění pevných vzorků do ICP-MS. Pro transport ablatovaného vzorku z ablační komory do ICP bylo využito PTFE hadičky (1,2 m x 4 mm) a průtoku He jako nosného plynu. Optimalizační měření i kvantitativní analýzy byly měřeny v heliovém módu.

3.4. OPTIMALIZACE

Před samotným měřením byly optimalizovány vybrané parametry LA-ICP-MS, a to výkon laseru, průtok hélia kolizní celou pro každý typ kalibračního materiálu. Nejprve byl optimalizován výkon laseru, a po získání optimální hodnoty pro jednotlivé matrice, bylo přistoupeno k optimalizaci průtok kolizního plynu, hélia, skrze kolizní celou ICP-MS spektrometru.

3.4.1. OPTIMALIZACE ENERGIE LASERU

Pro každý typ matrice kalibračních standardů (agarózový gel, tableta z CRM (CRM 1566b) a mozkovou tkáň) byl testován optimální výkon laseru v rozmezí 10 – 100 %, po 10 % intervalech. Použité hodnoty laserového toku (laser energy density) odpovídaly hodnotám 1,06; 2,12; 3,18; 2,24; 5,29; 6,35; 7,41; 8,47; 9,53 a 10,59 J.cm⁻². Optimalizační měření byla provedena s velikostí laserového svazku 110 μm, rychlostí posunu 110 μm.s⁻¹, frekvencí 10 Hz a průtokem hélia kolizní celou 2 ml.min⁻¹. Intenzitní data byla sbírána po dobu 1,5 minuty, kdy prvních 10 a posledních 30 sekund byla sbírána data pro signál pozadí. Pro všechny tři typy kalibračních standardů byly pro daný výkon laseru naměřeny intenzitní data ve třech replikách. Průměrné hodnoty signálu izotopů ⁵⁵Mn, ⁵⁶Fe, ⁶³Cu a ⁶⁶Zn pro jednotlivé linie byly korigovány na signál pozadí a z takto korigovaných dat byl vypočten

aritmetický průměr a příslušná relativní směrodatná odchylka (rovnice 6). Hodnoty intenzit signálů [cps], nebo hodnoty relativních směrodatných odchylek [%] byly vyneseny do grafu jako závislost na energii laseru [%].

$$RSD = \frac{\text{směrodatná odchylka}}{\text{aritmetický průměr}} \cdot 100 \% \quad (6)$$

3.4.2. OPTIMALIZACE PRŮTOKU HÉLIA KOLIZNÍ CELOU

Pro každý typ matrice kalibračních standardů (agarózový gel, tableta z CRM (CRM 1566b) a mozkovou tkáň) byl testován optimální průtok hélia kolizní celou v rozmezí 0,0 až 3,0 ml.min⁻¹, vždy s nárůstem o 0,5 ml.min⁻¹. Optimalizační měření byla provedena s velikostí laserového svazku 110 μm, rychlostí posunu 110 μm.s⁻¹, frekvencí 10 Hz a výkonu laseru v rozmezí 20 – 40 % v závislosti na typu matrice. Intenzitní data byla sbírána po dobu 1,5 minuty, kdy prvních 10 a posledních 30 sekund byla sbírána data pro signál pozadí.

Pro všechny tři typy kalibračních standardů byly pro daný průtok plynu naměřeny intenzitní data ve třech replikách. Z průměrných hodnot intenzit signálů a pozadí izotopů ⁵⁵Mn, ⁵⁶Fe, ⁶³Cu a ⁶⁶Zn pro jednotlivé linie byly vypočteny aritmetické průměry pro každou hodnotu průtoku hélia. Vypočtené aritmetické průměry pro intenzitu signálu a intenzitu pozadí byly použity pro výpočet poměru signálu k šumu (SNR = signal to noise ratio), který se počítá podle následující rovnice:

$$SNR = \frac{y_c + x_c}{y_0} \quad (7)$$

kde y_c je průměr intenzity signálu standardu, y_0 průměr intenzity signálu pozadí a x_c je ověřená koncentrace analytu standardu. Získané hodnoty SNR byly vyneseny do grafu jako závislost na průtoku nosného plynu [ml.min⁻¹].

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. OVĚŘENÍ KONCENTRACE KALIBRAČNÍCH STANDARDŮ

Kalibrační řada agarózových gelů zahrnovala celkem 5 kalibračních bodů – 0, 25, 50, 75 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Koncentraci kalibračních gelů bylo nutné ověřit pomocí roztokové ICP-MS, kterému předcházela mikrovlnný rozklad v prostředí kyseliny dusičné a peroxidu vodíku v poměru 2:1. Pro každý kalibrační bod byl rozklad prováděn ve dvou replikách, jejichž výsledky byly následně zprůměrovány.

Do naměřených hodnot bylo nutné započítat zředovací faktor a výsledná koncentrace byla následně ještě přepočtena na hmotnost čisté agarózy. Výsledné hodnoty koncentrací kalibrační řady pro ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn jsou uvedeny v tabulce 5 a jsou vyjádřeny jako naměřená koncentrace \pm směrodatná odchylka [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]. Pro všechny ostatní prvky ^{27}Al , ^{51}V , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{95}Mo , ^{111}Cd a ^{208}Pb vyšly hodnoty velmi podobně, ale pro přehlednost jsou v tabulce uvedeny jen prvky, které byly vybrány pro kvantitativní analýzu LA-ICP-MS. Přesně určená koncentrace je velmi důležitá pro vyhodnocování dat naměřených pomocí LA-ICP-MS, nedochází ke zkreslení výsledků.

Tabulka 5: Koncentrace připravených kalibračních standardů

Kalibrační řada [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	Ověřená koncentrace agarózových gelů [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]			
	^{55}Mn	^{56}Fe	^{63}Cu	^{66}Zn
25	21,0 \pm 0,8	23,7 \pm 0,8	23,8 \pm 1,0	24,6 \pm 4,1
50	50,2 \pm 2,3	57,1 \pm 4,4	52,7 \pm 3,1	51,8 \pm 6,2
75	70,2 \pm 0,2	72,3 \pm 6,1	71,0 \pm 3,2	72,0 \pm 14,1
100	97,6 \pm 11,8	100,5 \pm 11,2	101,1 \pm 11,0	94,5 \pm 11,3

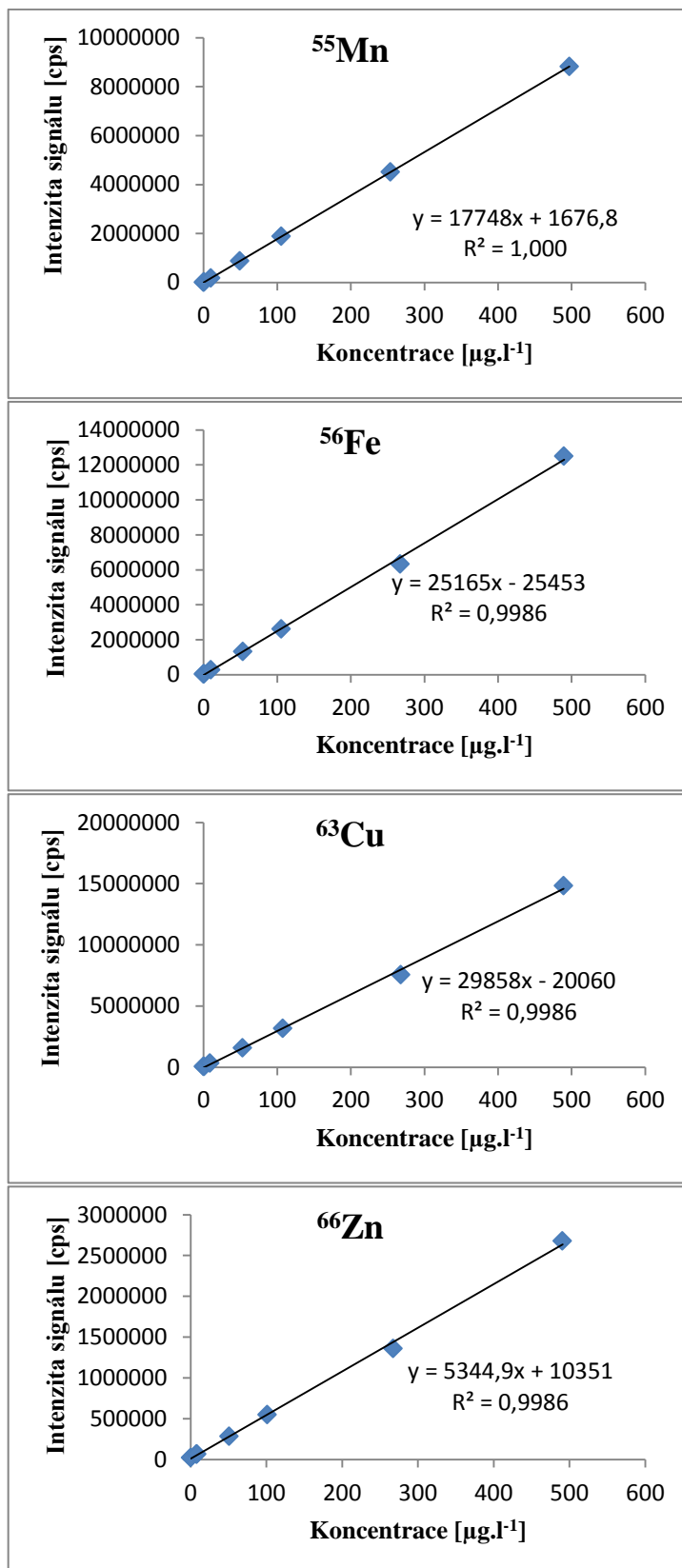
4.1.1. ANALÝZA KALIBRAČNÍ ŘADY STANDARDNÍCH ROZTOKŮ

Kalibrační řada obsahovala celkem 6 kalibračních roztoků o koncentracích 1; 10; 50; 100; 250 a 500 $\mu\text{g.l}^{-1}$, připravených z víceprvkového vodného kalibračního standardu MIX 015 o hmotnostní koncentraci 100 mg.l^{-1} tak, aby bylo použito maximálně stonásobné ředění v jednom ředícím kroku. Analyzováno bylo těchto 11 vybraných prvků: Al, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo, Cd a Pb.

Tabulka 6: Přehled rovnic lineárních kalibračních závislostí měřených izotopů prvků včetně jejich korelačních koeficientů

Izotop prvku	Rovnice lineární kalibrační závislosti	Hodnota korelačního koeficientu R^2
^{27}Al	$y = 966,52x + 4487,4$	1,0000
^{51}V	$y = 24074x + 3090,4$	1,0000
^{55}Mn	$y = 17748x + 1676,8$	1,0000
^{56}Fe	$y = 25165x - 25453$	0,9986
^{59}Co	$y = 43973x - 102220$	0,9986
^{60}Ni	$y = 11519x - 19114$	0,9985
^{63}Cu	$y = 29858x - 20060$	0,9986
^{66}Zn	$y = 5344,9x + 10351$	0,9986
^{95}Mo	$y = 15998x + 36860$	0,9986
^{111}Cd	$y = 7747,6x - 16684$	0,9983
^{208}Pb	$y = 59124x - 121151$	0,9983

Pro všechny měřené izotopy bylo dosaženo lineární kalibrační závislosti s korelačním koeficientem v rozsahu od 0,9983 do 1,0000. Rovnice kalibračních závislostí jsou uvedeny v tabulce 6 včetně jejich korelačních koeficientů. Nejnižší hodnoty korelačního koeficientu byly naměřeny u ^{111}Cd a ^{208}Pb , naopak nejvyšších bylo dosaženo u ^{27}Al , ^{51}V a ^{55}Mn . Pro vybrané prvky ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn jsou lineární kalibrační závislosti vyobrazeny na obrázku 14, včetně rovnice přímky a korelačního koeficientu.



Obrázek 14: Grafy závislostí intenzity signálu izotopů ⁵⁵Mn, ⁵⁶Fe, ⁶³Cu a ⁶⁶Zn [cps] na koncentraci [µg.l⁻¹], včetně rovnice lineární kalibrační závislosti a korelačního koeficientu

4.1.2. ANALÝZA REFERENČNÍCH MATERIÁLŮ

Při ověřování koncentrací analyzovaných prvků v připravených agarózových gelech pomocí roztokové ICP-MS byly analyzovány také certifikované referenční materiály TM-15.2 (LOT 0313) a TMDA-64.2 (LOT 1010) pro zajištění kontroly kvality výsledků v průběhu jednotlivých měření. V obou případech se jedná o vody z Ontarijského jezera, které byly zfiltrovány, zředěny a uchovávány v chladu v prostředí 0,2 % kyseliny dusičné.

V tabulce 7 jsou prezentovány výsledky jednotlivých měření [$\mu\text{g.l}^{-1}$] a zároveň jejich porovnání s uvedenými certifikovanými hodnotami referenčních materiálů. Z porovnání naměřených hodnot koncentrací a certifikovaných hodnot lze říct, že izotopy ^{51}V , ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{95}Mo , ^{111}Cd a ^{208}Pb vykazují v průběhu každého měření stabilní koncentrace, které jsou v rozmezí daném certifikovanými hodnotami. U izotopu ^{27}Al lze pozorovat mírně zvýšené koncentrace u CRM TM-15.2, avšak u CRM TMDA-64.2 jsou jeho koncentrace v rozmezí daném certifikovanými hodnotami. Hliník patří mezi běžné kontaminanty, a to je zřejmě důvod jeho zvýšených koncentrací.

Tabulka 7: Přehled hodnot certifikovaných koncentrací vybraných izotopů a jejich stanovená koncentrace v daných certifikovaných referenčních materiálech v různých dnech měření, všechny uvedené koncentrace jsou v jednotkách [$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]

Izotop prvku	CRM TM-15.2						
	$c \pm 2\sigma$	Před měřením 25.11.	Po měření 25.11.	Před měřením 3.12.	Po měření 3.12.	Před měřením 19.1.	Po měření 19.1.
²⁷ Al	33,9 ± 4,6	38,8	37,9	37,8	38,6	38,9	39,5
⁵¹ V	13,2 ± 1,4	13,1	13,4	13,6	14,4	13,5	13,9
⁵⁵ Mn	18,1 ± 1,4	17,5	18,6	18,4	19,0	18,1	18,7
⁵⁶ Fe	26,0 ± 4,7	24,5	25,3	27,4	28,1	26,6	27,5
⁵⁹ Co	15,1 ± 1,4	15,7	16,0	15,7	16,1	15,7	15,6
⁶⁰ Ni	17,6 ± 1,6	17,3	17,9	17,8	18,3	17,0	17,4
⁶³ Cu	17,3 ± 1,6	17,3	17,4	18,5	18,9	15,9	17,0
⁶⁶ Zn	35,4 ± 4,2	34,6	37,2	36,4	36,8	37,0	38,2
⁹⁵ Mo	14,3 ± 1,8	14,6	15,0	12,8	15,5	13,6	14,9
¹¹¹ Cd	12,9 ± 1,1	13,4	12,8	13,5	14,0	13,8	13,2
²⁰⁸ Pb	11,7 ± 1,1	11,8	12,2	11,6	11,9	12,1	11,8
	CRM TMDA-64.2						
²⁷ Al	290 ± 25,0	277,2	285,4	277,8	288,9	276,4	287,9
⁵¹ V	290 ± 20,5	287,8	301,8	293,6	301,1	290,3	298,5
⁵⁵ Mn	295 ± 22,3	289,9	287,6	291,3	299,1	288,4	296,2
⁵⁶ Fe	306 ± 27,1	303,3	310,1	302,8	309,3	304,9	303,4
⁵⁹ Co	254 ± 18,4	257,2	260,7	257,2	259,7	260,3	259,4
⁶⁰ Ni	263 ± 18,9	259,8	271,8	269,8	273,2	272,0	269,5
⁶³ Cu	274 ± 24,1	275,0	279,3	276,5	280,1	277,3	278,8
⁶⁶ Zn	310 ± 26,5	321,2	330,7	334,0	324,1	334,2	334,1
⁹⁵ Mo	290 ± 24,6	270,6	279,6	268,8	278,0	258,9	280,3
¹¹¹ Cd	266 ± 22,1	277,8	276,3	283,6	286,7	251,6	251,6
²⁰⁸ Pb	288 ± 26,4	283,1	279,8	287,7	290,5	265,0	271,9

4.2. OPTIMALIZACE

4.2.1. OPTIMALIZACE ENERGIE LASERU

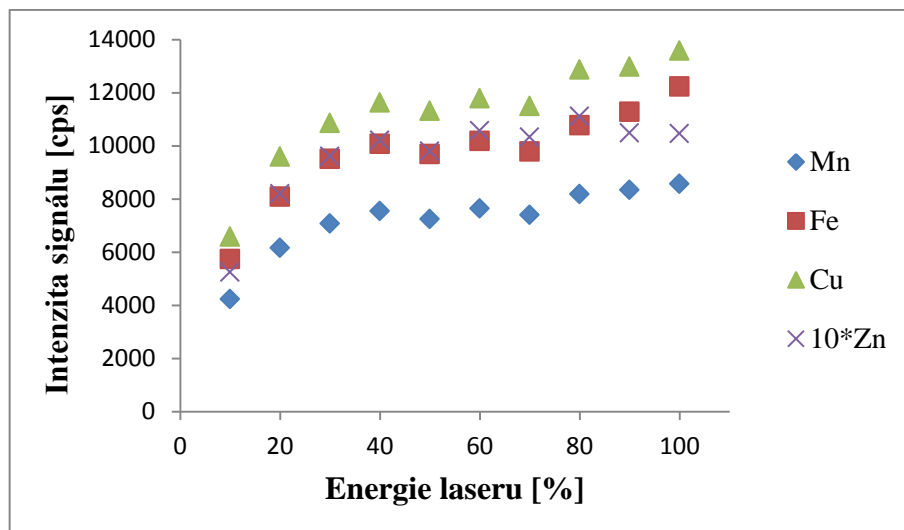
Před samotným měřením reálných vzorků byl testován optimální výkon laseru v rozmezí 10 – 100 %, po 10 %. Použité hodnoty laserového toku (laser energy density) odpovídaly hodnotám 1,06; 2,12; 3,18; 4,24; 5,29; 6,35; 7,41; 8,47; 9,53 a 10,59 J.cm⁻². Optimalizační měření byla provedena s velikostí laserového svazku 110 μm, rychlostí posunu 110 μm.s⁻¹, frekvencí 10 Hz a průtokem hélia kolizní celou 2 ml.min⁻¹.

Průměrné hodnoty intenzity signálu [cps] korigované na pozadí jsou uvedeny v tabulce 8 včetně vypočtené relativní směrodatné odchylky pro každý prvek a matici. Obecně by se dalo říci, že s rostoucí energií laseru pozvolně roste intenzita signálu izotopu prvku, až do bodu, kde dosáhne prvního maxima a následně signál mírně poklesne a dále roste, než dosáhne dalšího maxima. Optimální energií laseru pro danou matici odpovídá právě první maximum. Výjimkou jsou Mn a Fe u mozkové tkáně, kdy intenzita signálu neustále roste a v žádném bodě nedochází k jeho poklesu. Nárůstu intenzit pro ⁵⁵Mn a ⁵⁶Fe byl způsoben příliš vysokou energií laseru, kdy došlo k úplné ablaci živočišné tkáně a následné ablaci podkladového mikroskopického sklíčka, které svým chemickým složením přispívalo ke vzniku spektrálních interferencí ⁴⁰Ar¹⁶O⁺ a ³⁹K¹⁶O⁺ zatěžující stanovení ⁵⁵Mn a ⁵⁶Fe.

Relativní směrodatné odchylky se pohybovaly v rozmezí od 3,5 do 19,3 %. Nejnižší relativní směrodatná odchylka 3,5 % byla vypočtena pro Cu v tabletě z CRM pro energii laseru 80 %. Nejvyšší relativní směrodatná odchylka 19,3 % byla vypočtena pro Fe v mozkové tkáni pro energii laseru 10 %. Optimální energie laseru by měla mít i nejnižší hodnotu RSD. Pro agarózový gel jsou nejnižší relativní směrodatné odchylky pro energii laseru 30 a 40 %, pro tablety z CRM 80 a 90 %, mezitím však intenzita signálu několikrát klesla. Pro mozkovou tkáň jsou to energie laseru 90 a 20 %, a právě 20 % byla vybrána jako optimální, při vyšších energiích laseru dochází k již zmíněnému propálení mozkové tkáně a následné ablaci podkladového mikroskopického sklíčka.

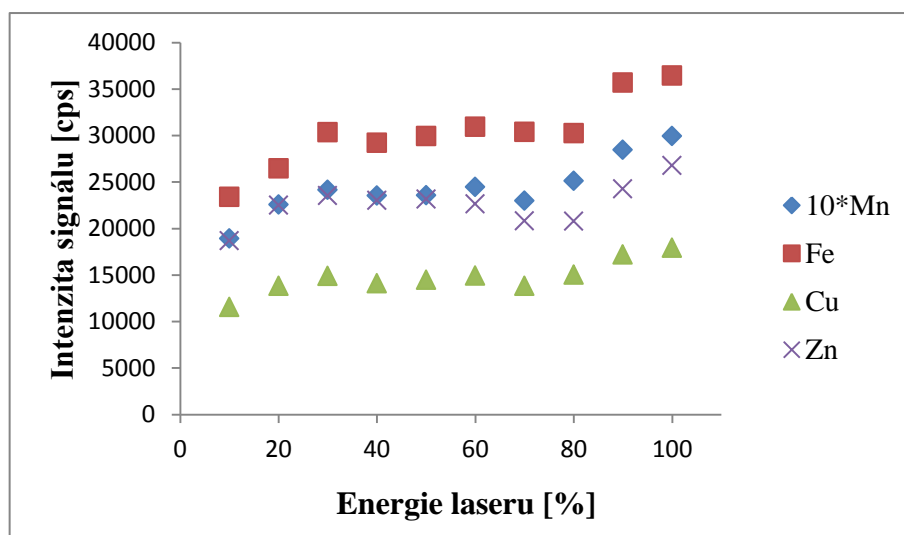
Tabulka 8: Přehled hodnot intenzit signálu a RSD pro vybrané prvky a všechny druhy matrice

Matrice	Energie laseru	Analyzované prvky							
		⁶³ Cu		⁵⁶ Fe		⁵⁵ Mn		⁶⁶ Zn	
		Intenzita signálu [cps]	RSD [%]	Intenzita signálu [cps]	RSD [%]	Intenzita signálu [cps]	RSD [%]	Intenzita signálu [cps]	RSD [%]
Agarózový gel	10 %	6574,4	10,3	5733,1	8,0	4225,6	9,3	524,6	8,3
	20 %	9593,4	7,4	8088,3	6,5	6163,1	7,4	819,5	10,1
	30 %	10856,4	7,4	9510,6	7,8	7068,8	7,2	960,6	7,3
	40 %	11627,5	7,1	10072,4	6,2	7543,1	7,4	1020,9	7,9
	50 %	11310,8	10,4	9686,8	9,8	7245,5	9,8	979,5	11,4
	60 %	11781,4	9,2	10183,4	8,1	7641,0	8,9	1056,3	10,5
	70 %	11493,5	8,8	9778,8	8,2	7398,6	8,3	1032,7	8,6
	80 %	12872,8	10,9	10770,9	10,5	8177,3	11,3	1110,7	9,1
	90 %	12971,7	13,0	11275,5	10,4	8340,8	10,9	1047,8	12,1
	100%	13583,6	10,9	12230,7	10,3	8564,5	10,3	1046,0	10,6
Tableta	10 %	11582,8	5,7	23404,2	8,3	1891,8	7,3	18687,8	6,4
	20 %	13824,4	5,6	26469,7	5,7	2256,8	6,6	22504,3	4,7
	30 %	14903,8	6,9	30368,6	8,6	2418,3	6,5	23564,0	4,6
	40 %	14122,2	5,8	29235,7	6,7	2356,2	6,6	23019,6	6,7
	50 %	14501,4	6,8	29935,4	7,6	2359,7	7,2	23179,0	5,9
	60 %	14944,4	7,6	30933,3	8,2	2447,6	8,0	22650,1	5,5
	70 %	13852,8	7,7	30383,0	10,1	2298,8	5,6	20813,9	7,7
	80 %	15042,0	3,5	30268,4	5,4	2513,7	5,5	20797,8	6,0
	90 %	17218,3	5,6	35687,2	6,8	2846,8	6,0	24264,0	4,4
	100%	17952,5	7,1	36471,5	8,2	2995,9	7,2	26793,0	8,0
Mozková tkáň	10 %	886,0	7,2	4681,1	19,3	174,9	9,0	499,3	8,1
	20 %	1024,0	8,4	6754,2	11,5	391,0	6,5	510,6	6,7
	30 %	986,0	8,3	7421,7	6,8	510,6	7,6	472,5	9,5
	40 %	1038,3	7,0	8390,8	8,3	616,8	6,5	428,8	7,8
	50 %	1020,3	6,7	9642,4	10,2	712,5	6,4	436,7	9,2
	60 %	1015,3	7,7	9990,5	7,8	823,1	7,4	441,4	8,2
	70 %	980,7	5,3	10976,2	6,8	938,1	7,2	421,3	7,7
	80 %	1020,1	7,2	12073,4	7,3	1082,4	6,0	489,9	11,7
	90 %	1006,5	5,0	14767,8	8,1	1397,7	5,4	504,8	7,5
	100%	1046,5	5,9	15768,1	4,5	1537,3	4,7	498,1	7,9



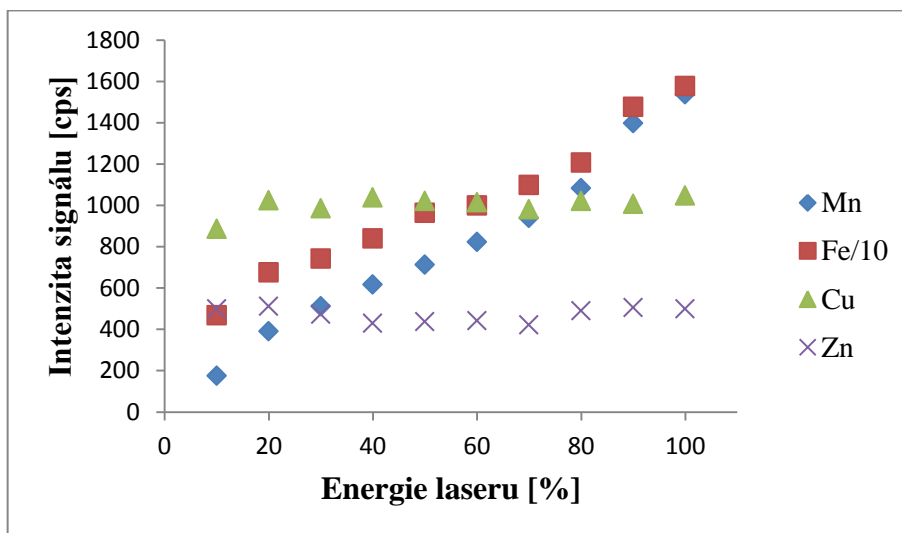
Obrázek 15: Graf závislost intenzity signálu ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn na použité energii laseru pro agarózový gel ($c = 50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

V grafu (obrázek 15) je vidět, že s rostoucí energií laseru dochází k nárůstu intenzity signálu pro všechny čtyři vybrané prvky. První pokles hodnoty intenzity signálu je při 50 % energii laseru. S ohledem i na hodnotu intenzity signálu a hodnotu RSD byl pro kalibrační agarózové gely zvolen jako optimální výkon laseru 40 %, a to odpovídá laserovému toku $4,24 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$.



Obrázek 16: Graf závislosti intenzity signálu ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn na použité energii laseru pro tabletu z CRM (CRM 1566b)

V grafu (obrázek 16) je vidět, že s rostoucí energií laseru dochází k nárůstu intenzity signálu pro všechny čtyři vybrané prvky. První pokles hodnoty intenzity signálu je při 40 % energii laseru. S ohledem i na hodnotu intenzity signálu a hodnotu RSD byl pro tabletky z CRM zvolen jako optimální výkon laseru 30 %, a to odpovídá laserovému toku $3,18 \text{ J.cm}^{-2}$.



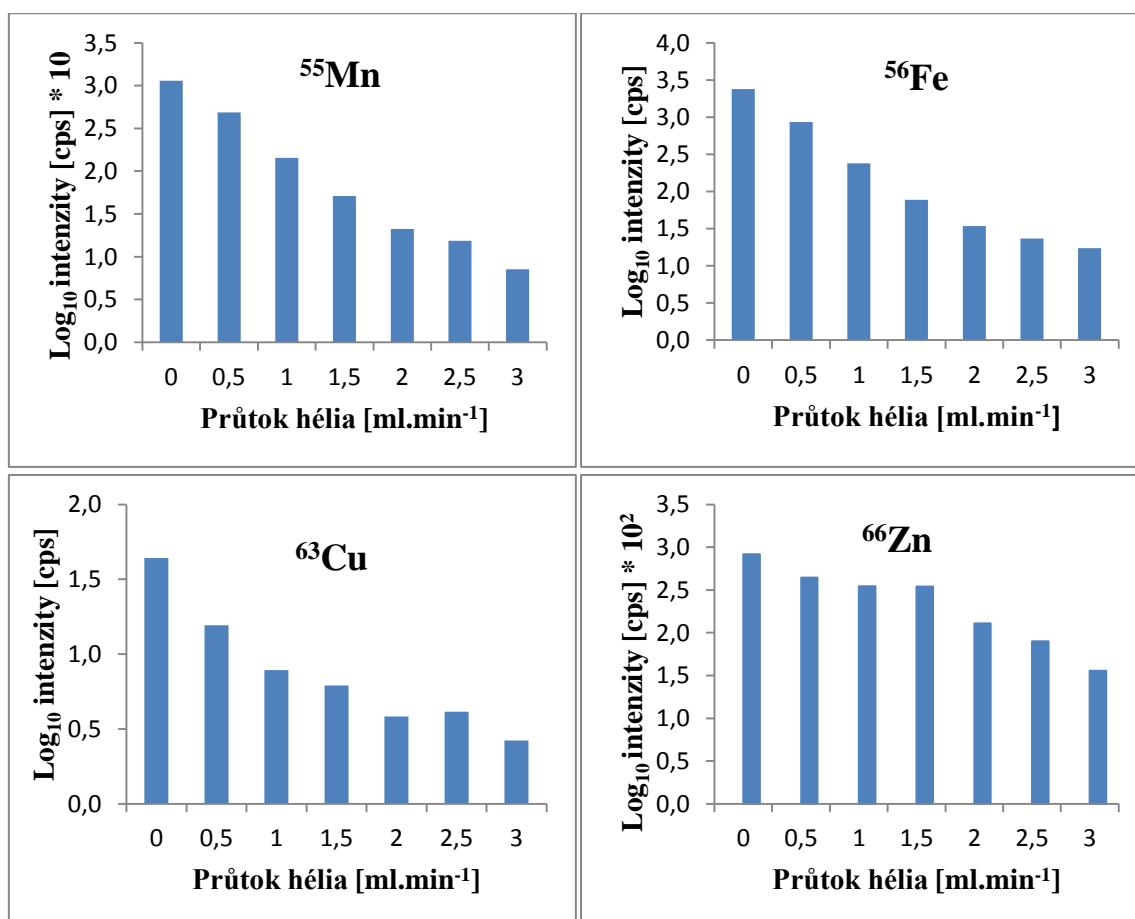
Obrázek 17: Graf závislosti intenzity signálu ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn na použité energii laseru pro mozkovou tkáň

V grafu (obrázek 17) je vidět, že pro Cu a Zn hodnota intenzity signálu po 20 % energii laseru roste, dále dochází k propadu a následné stagnaci intenzity signálu. Naopak u Mn a Fe hodnota intenzity signálu s rostoucí energií laseru prudce stoupá. Při použití laseru s energií vyšší než 20 % dochází ke kvantitativní ablaci mozkové tkáně až na podkladové sklíčko, které je poté rovněž ablatováno. Nárůst intenzit pro ^{55}Mn a ^{56}Fe je způsoben spektrálními interferencemi $^{39}\text{K}^{16}\text{O}^+$ a $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ vznikající kombinací prvků podkladního materiálu (mikroskopického sklíčka) a nosného plynu. S ohledem na tyto faktory, hodnoty intenzity signálu a hodnoty RSD byla pro mozkové tkáně zvolena jako optimální energie laseru 20 %, a to odpovídá laserovému toku $2,12 \text{ J.cm}^{-2}$.

4.2.2. OPTIMALIZACE PRŮTOKU HÉLIA KOLIZNÍ CELOU

Před samotným měřením byl testován optimální průtok hélia kolizní celou v rozmezí 0,0 až 3,0 ml.min⁻¹, po 0,5 ml.min⁻¹. Optimalizační měření byla provedena s velikostí laserového svazku 110 μm, rychlostí posunu 110 μm.s⁻¹, frekvencí 10 Hz a výkonu laseru v rozmezí 20 – 40 % v závislosti na typu matrice. Pro agarózový gel byla použita energie laseru 40 % (4,24 J.cm⁻²), pro tabletu z CRM 30 % (3,18 J.cm⁻²) a pro živočišnou tkáň 20 % (2,12 J.cm⁻²). Intenzitní data byla sbírána po dobu 1,5 minuty, kdy prvních 10 a posledních 30 sekund byly sbírány data pro signál pozadí.

Průměrné hodnoty signálů pozadí izotopů ⁵⁵Mn, ⁵⁶Fe, ⁶³Cu a ⁶⁶Zn byly vyneseny do grafu jako závislost logaritmu intenzity pozadí [cps] na průtoku hélia kolizní celou [ml.min⁻¹] (obrázek 18).



Obrázek 18: Grafy závislosti log₁₀ intenzit signálu pozadí ⁵⁵Mn, ⁵⁶Fe, ⁶³Cu a ⁶⁶Zn [cps] na rostoucím průtoku hélia kolizní celou [ml.min⁻¹]

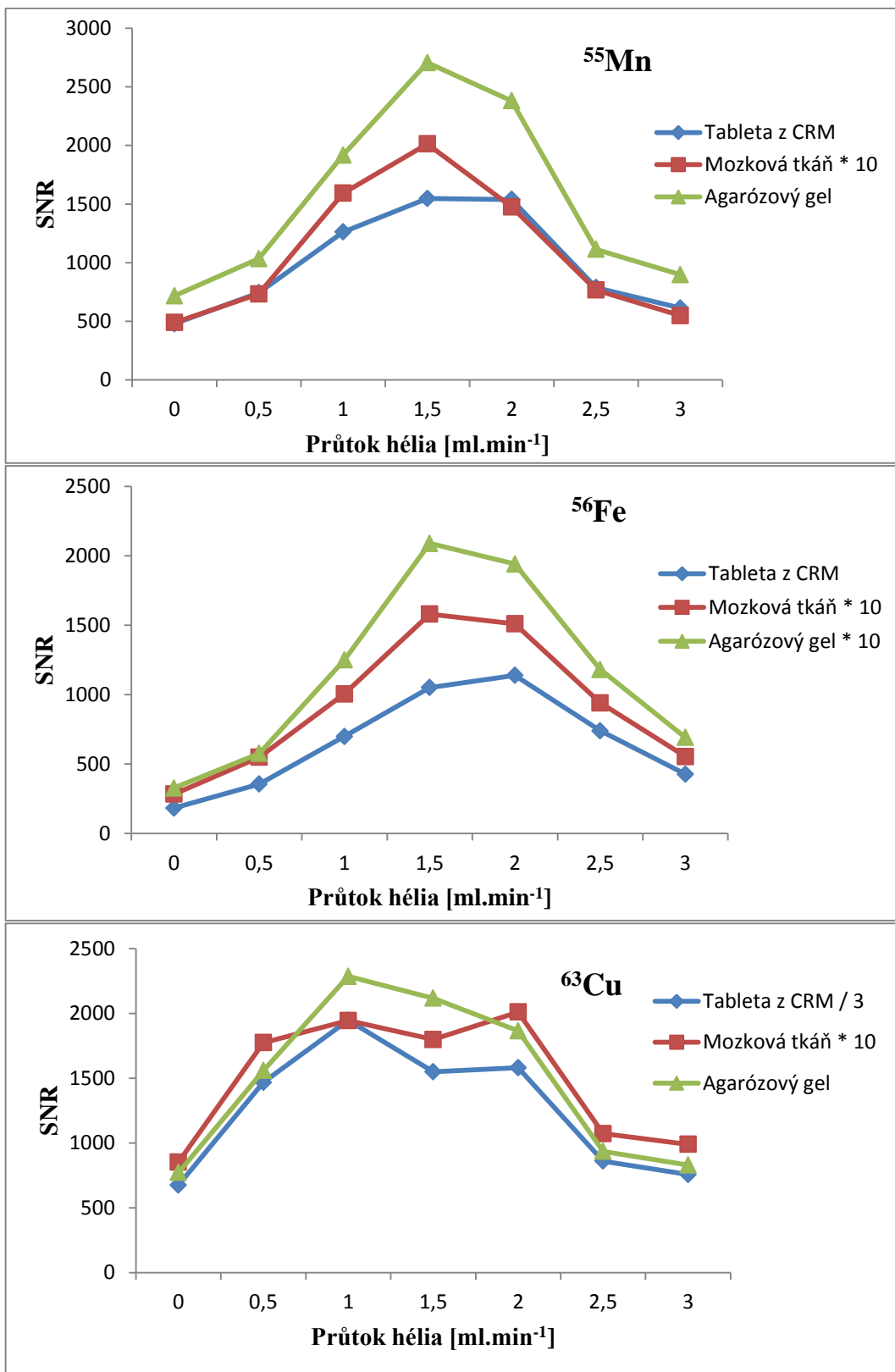
V grafech pro izotopy ^{55}Mn , ^{56}Fe a ^{63}Cu je pozorován trend, že s rostoucím průtokem hélia kolizní celou od 0,0 do 3,0 ml.min⁻¹ klesá signál pozadí. Rostoucí průtok hélia kolizní celou zvyšuje tlak uvnitř kolizní cely, a tím roste počet ion-molekulových kolizních reakcí, což vede k účinnější eliminaci polyatomických interferencí $^{40}\text{Ar}^{14}\text{N}^1\text{H}^+$ pro $^{55}\text{Mn}^+$, $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ pro $^{56}\text{Fe}^+$ a $^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$ pro $^{63}\text{Cu}^+$. Závislost intenzity signálu izotopu ^{66}Zn na průtoku hélia nevykazuje tento trend. Pokles signálu pozadí je velmi pozvolný, jelikož izotop ^{66}Zn není významně zatížen polyatomickými interferencemi pocházejících z argonu.

Z vypočtených průměrných hodnot intenzity signálů a intenzit pozadí byly vypočteny poměry signálu k šumu (SNR) pro každý prvek a každou matici zvlášť (rovnice 7). Dosazené hodnoty koncentrací jsou uvedeny v tabulce 9. Koncentrace prvků v agarózovém gelu byly zjištěny pomocí roztokové ICP-MS, pro tabletu byly opsány z příloženého certifikátu a pro mozkovou tkáň byly čerpány z literatury⁵⁷.

Tabulka 9: Přehled koncentrací prvků v optimalizovaných maticích

Matrice	Koncentrace izotopů prvků [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]			
	^{55}Mn	^{56}Fe	^{63}Cu	^{66}Zn
Agarózový gel	54,85	57,67	59,19	66,13
Tableta z CRM	18,5	205,8	71,6	1424
Mozková tkáň	0,23	31,0	10,3	10,7

Klesající signál pozadí vede ke zvýšení poměru signál k šumu pro izotopy ^{55}Mn , ^{56}Fe a ^{63}Cu (obrázek 19). Izotop zinku ^{66}Zn nemá polyatomické interference, nedochází k poklesu signálu pozadí a tím nedochází ke zlepšení poměru signálu k šumu. Z tohoto důvodu nejsou vloženy grafy závislosti SNR zinku na průtoku hélia kolizní celou [ml.min⁻¹]. V grafech lze pozorovat trend, hodnota SNR narůstá až do bodu, kde dosáhne maximální hodnoty a následně pozvolna klesá. Právě hodnota maximálního bodu je optimální hodnota průtoku pro daný prvek, poskytl nejvyšší hodnotu signálu. U některých prvků se jevil průtok 1,5 ml.min⁻¹ lepší, ale s ohledem na fakt, že se jedná o multielementární analýzu, tak s ohledem na ostatní prvky byl zvolen jako optimální průtok 2 ml.min⁻¹. Kalibrační měření stejně jako hmotnostně zobrazovací experimenty byly měřeny při průtoku hélia kolizní celou 2 ml.min⁻¹.

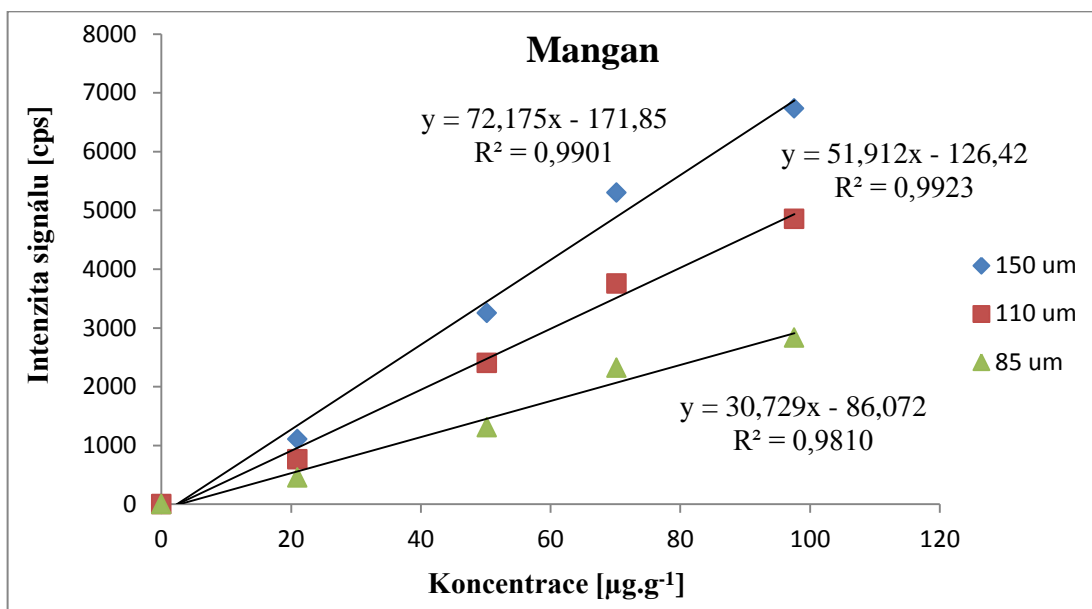


Obrázek 19: Závislost SNR [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$] ^{55}Mn , ^{56}Fe a ^{63}Cu na rostoucím průtoku hélia kolizní celou

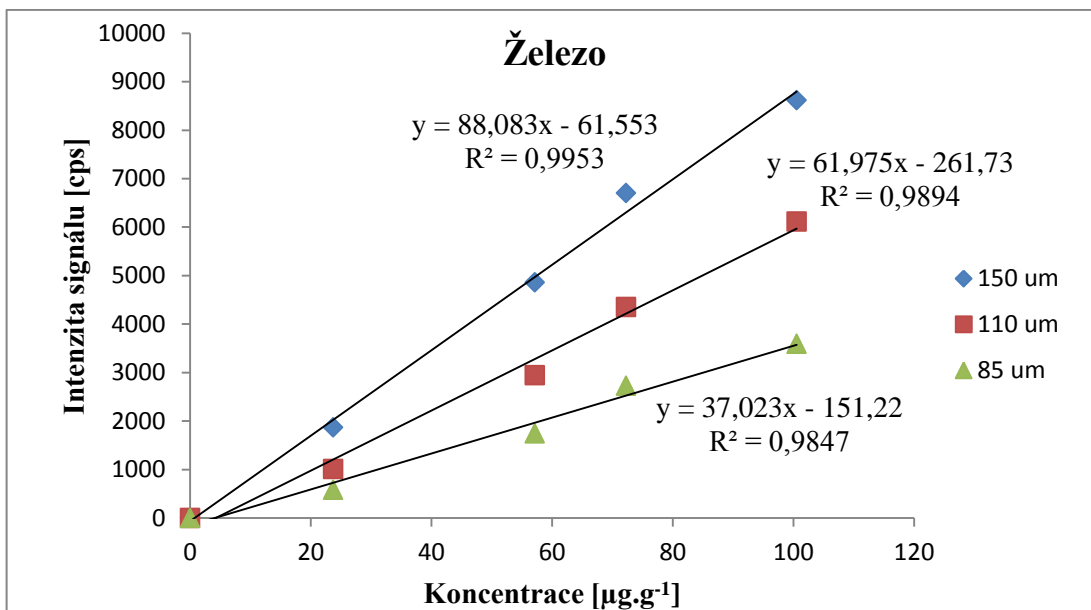
4.3. KALIBRACE

4.3.1. KALIBRACE AGARÓZOVÝMI GELY

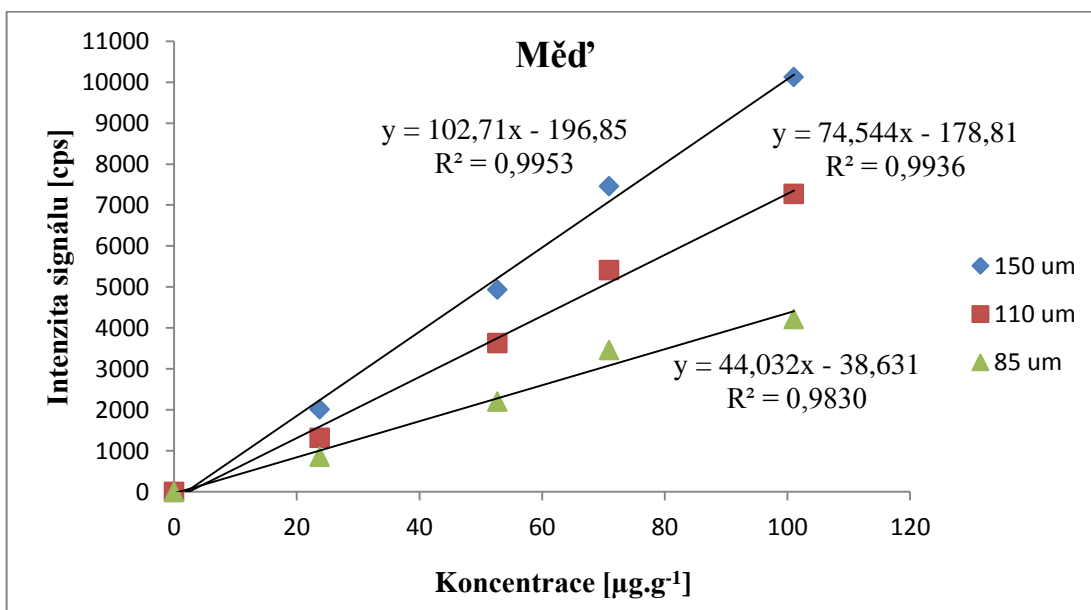
Kalibrační standardy byly měřeny pomocí LA-ICP-MS s frekvencí 10 Hz, výkonem laseru 40 %, průtokem hélia kolizní celou 2 ml.min⁻¹. Měření byla provedena vždy ve dvou replikách pro tři různé velikosti laserového svazku 85, 110 a 150 μm a tomu odpovídající rychlosti posunu 85, 110 a 150 μm.s⁻¹. Intenzitní data byla sbírána po dobu 1,5 minuty, kdy prvních 10 a posledních 30 sekund byla sbírána data pro signál pozadí. Naměřená data byla zprůměrována a vynesena do grafu jako závislost intenzity signálu ⁵⁵Mn, ⁵⁶Fe, ⁶³Cu a ⁶⁶Zn [cps] na jejich koncentraci [μg.g⁻¹] získané z roztokové analýzy (kapitola 4.1.).



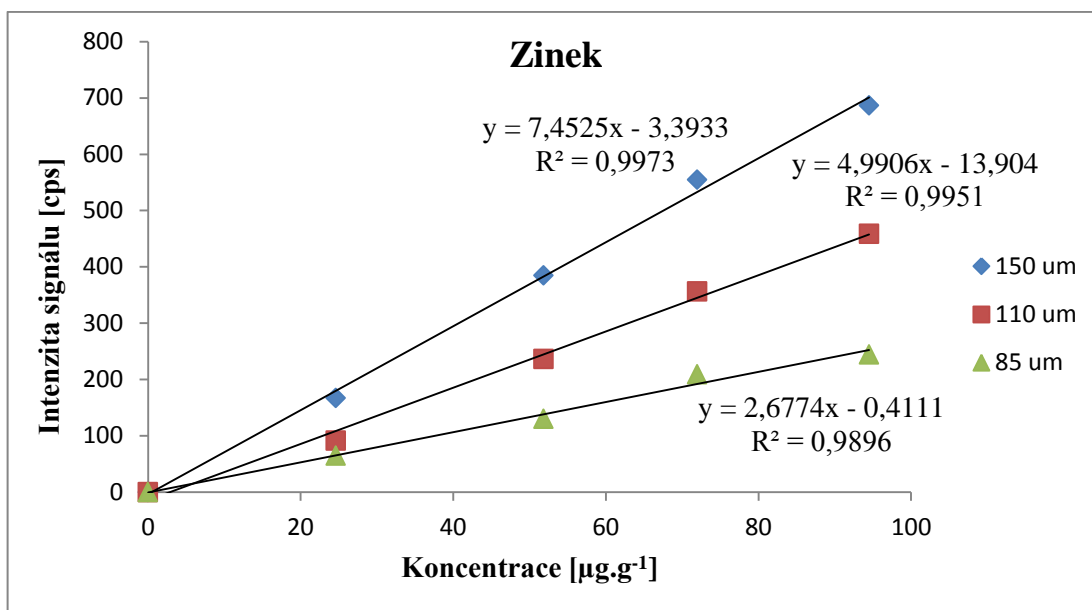
Obrázek 20: Kalibrační křivky pro ⁵⁵Mn



Obrázek 21: Kalibrační křivky pro ^{56}Fe



Obrázek 22: Kalibrační křivky pro ^{63}Cu



Obrázek 23: Kalibrační křivky pro ^{66}Zn

Na obrázcích 20 – 23 jsou zobrazeny grafy závislosti intenzity signálu na koncentraci pro ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn . Pro každou lineární kalibrační závislost je uvedena její rovnice, včetně korelačního koeficientu, které byly použity pro výpočet koncentrace ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn v živočišných tkáních. Hodnoty korelačního koeficientu se pohybovaly v rozsahu 0,981 až 0,9973.

4.3.2. JEDNOBODOVÁ KALIBRACE (TABLETY Z CRM)

Vylisované tablety z CRM byly analyzovány pomocí LA-ICP-MS s frekvencí 10 Hz, výkonem laseru 30 %, průtokem hélia kolizní celou $2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a při třech různých velikostech laserového svazku 85, 110 a 150 μm a tomu odpovídající rychlosti posunu 85, 110 a 150 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$. Intenzitní data byla sbírána po dobu 1,5 minuty, kdy prvních 10 a posledních 30 sekund byla sbírána data pro signál pozadí. Naměřená data byla zprůměrována a jejich hodnoty jsou uvedeny v tabulce 10, včetně směrodatné odchylky. Získané hodnoty byly použity jako jednobodová kalibrace pro kvantitativní stanovení ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn v živočišných tkáních.

Tabulka 10: Koncentrace ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn v CRM a jím odpovídajících intenzity signálu pro tři různé velikosti laserového svazku 85, 110 a 150 μm

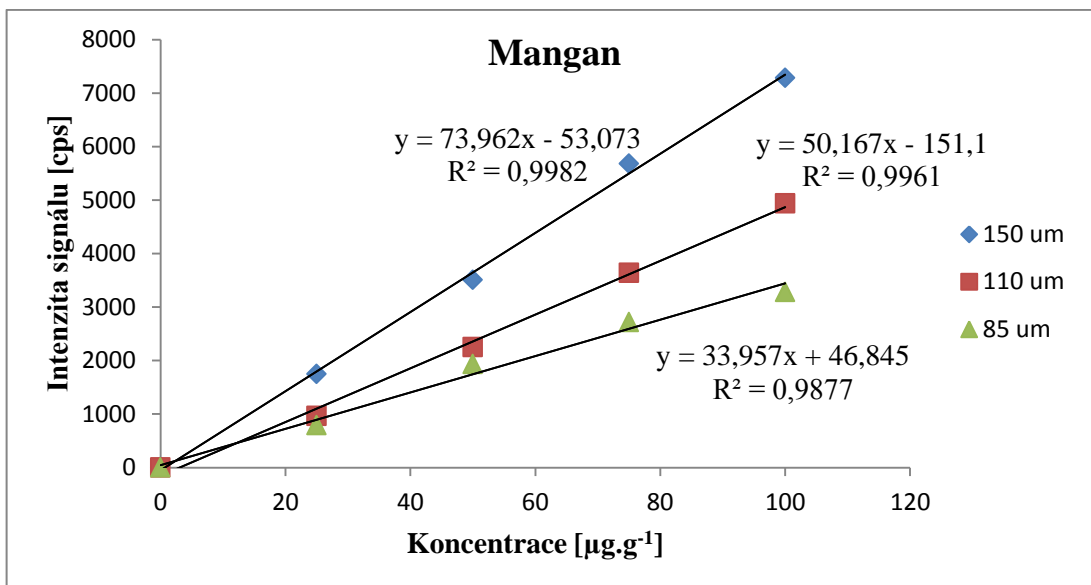
CRM			Intenzita signálu \pm směrodatná odchylka [cps]		
Název	Izotop prvku	Koncentrace prvku \pm jeho nejistota [$\mu\text{g g}^{-1}$]	85 μm	110 μm	150 μm
Pork liver	^{55}Mn	$8,3 \pm 0,4$	$310,7 \pm 31,8$	$464,4 \pm 48,0$	$833,1 \pm 57,1$
	^{56}Fe	1050 ± 80	$44221,7 \pm 3431,9$	$65564,2 \pm 5518,7$	$117584,6 \pm 6282,9$
	^{63}Cu	$17,2 \pm 1$	$894,1 \pm 98,4$	$1283,4 \pm 119,9$	$2309,5 \pm 134,8$
	^{66}Zn	172 ± 8	$381,6 \pm 45,8$	$648,6 \pm 56,0$	$1845,7 \pm 96,0$
1566b	^{55}Mn	$18,5 \pm 0,2$	$1355,2 \pm 68,0$	$1733,3 \pm 117,1$	$2245,9 \pm 122,6$
	^{56}Fe	$205,8 \pm 6,8$	$16428,3 \pm 1208,5$	$20787,5 \pm 1656,8$	$26779,2 \pm 1382,2$
	^{63}Cu	$71,6 \pm 1,6$	$7850,7 \pm 353,4$	$9914,5 \pm 592,2$	$13242,9 \pm 696,8$
	^{66}Zn	1424 ± 46	$11952,9 \pm 579,8$	$15560,5 \pm 793,1$	$22835,0 \pm 1034,1$
TORT-2	^{55}Mn	$13,6 \pm 1,2$	$600,0 \pm 44,5$	$804,4 \pm 64,4$	$1182,4 \pm 89,5$
	^{56}Fe	105 ± 13	$6047,1 \pm 443,7$	$8062,6 \pm 611,7$	$12293,5 \pm 799,4$
	^{63}Cu	106 ± 10	$7875,1 \pm 531,1$	$10415,0 \pm 667,2$	$15208,0 \pm 987,2$
	^{66}Zn	180 ± 6	$704,1 \pm 48,6$	$991,0 \pm 51,4$	$1994,2 \pm 98,3$

n = 3

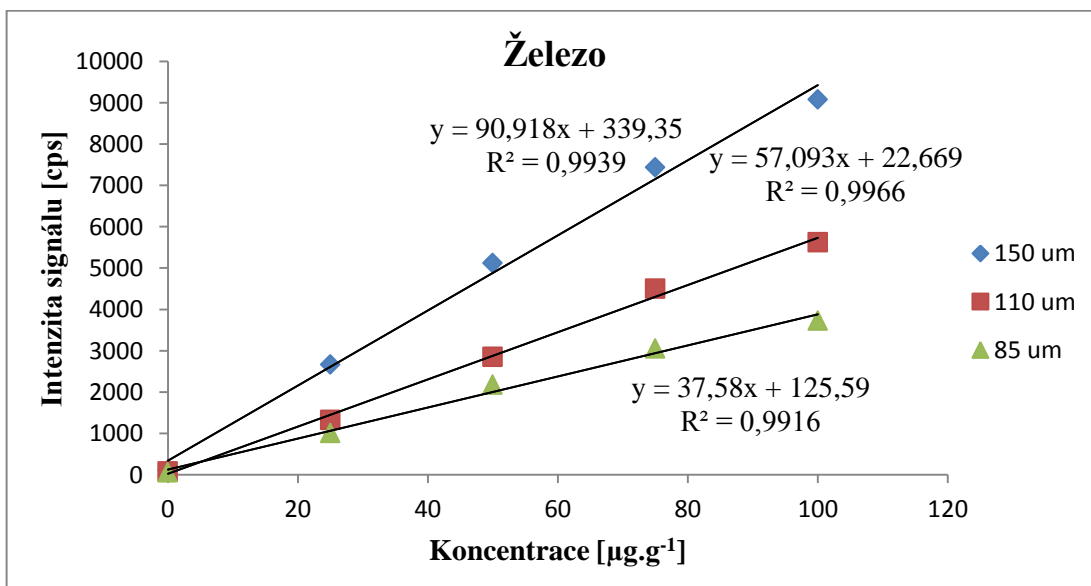
Naměřené hodnoty uvedené v tabulce byly pro zajímavost vyneseny do grafů jako závislost intenzity signálu [cps] na koncentraci [$\mu\text{g.g}^{-1}$]. Výsledkem byly lineární kalibrační závislosti popsány rovnicí s korelačním koeficientem v rozmezí od 0,8546 do 0,9998. Grafy a rovnice lineární regrese zde nejsou uvedeny, a ani nebyly použity pro výpočet koncentrace prvků v živočišných tkáních. Důvodem je fakt, že každý z CRM materiálů má jiné složení matrice.

4.3.3. KALIBRACE STANDARDNÍM PŘÍDAVKEM

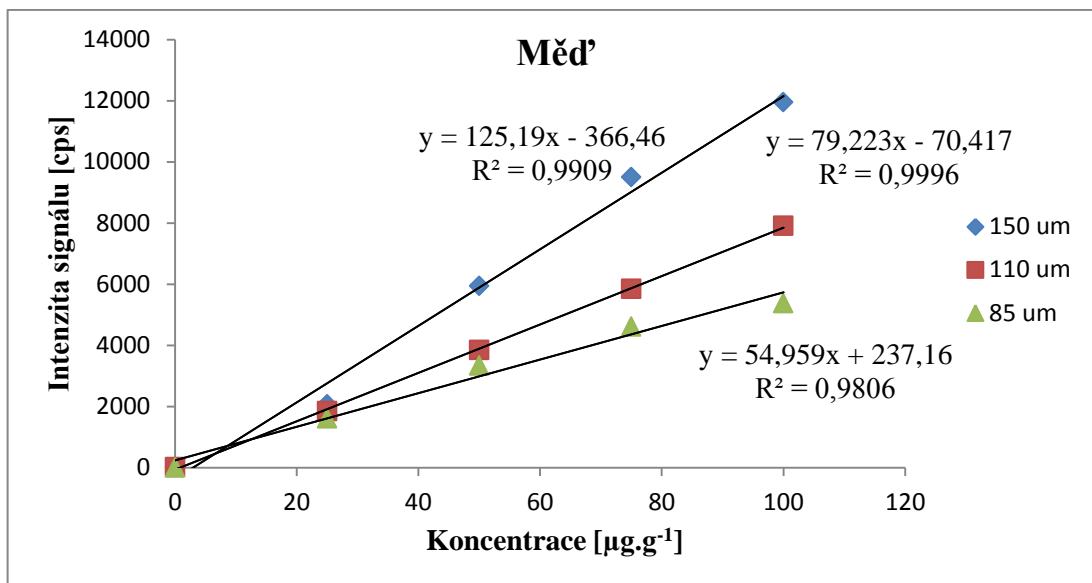
Obohacená mozková tkáň byla analyzována pomocí LA-ICP-MS s frekvencí 10 Hz, průtokem hélia kolizní celou 2 ml.min⁻¹, výkonem laseru 20 % a při třech různých velikostech laserového svazku 85, 110 a 150 μm a tomu odpovídajících rychlostech posunu 85, 110 a 150 $\mu\text{m.s}^{-1}$. Intenzitní data byla sbírána po dobu 1,5 minuty, z toho prvních 10 a posledních 30 sekund byla sbírána data pro signál pozadí. Naměřená data byla zprůměrována a vynesena do grafu jako závislost intenzity signálu ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn [cps] na jejich koncentraci [$\mu\text{g.g}^{-1}$].



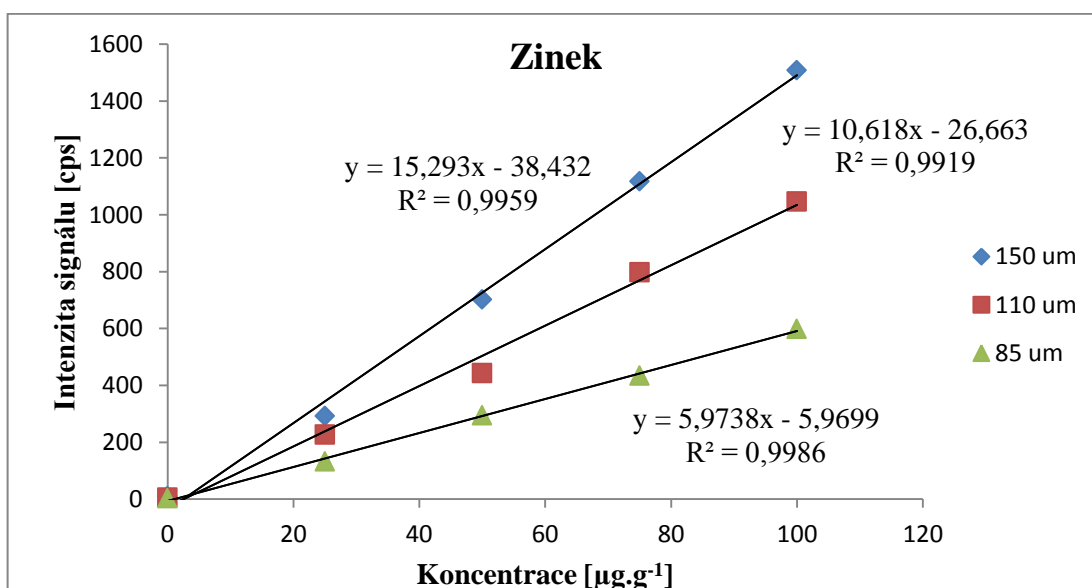
Obrázek 24: Kalibrační křivky pro ^{55}Mn



Obrázek 25: Kalibrační křivky pro ^{56}Fe



Obrázek 26: Kalibrační křivky pro ^{63}Cu



Obrázek 27: Kalibrační křivky pro ^{66}Zn

Na obrázcích 24 – 27 jsou zobrazeny grafy závislosti intenzity signálu na koncentraci pro ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn . Pro každou lineární kalibrační závislost je uvedena její rovnice, včetně korelačního koeficientu, které byly použity pro výpočet koncentrace ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn v živočišných tkáních. Hodnoty korelačního koeficientu se pohybovaly v rozsahu od 0,9806 do 0,9996.

4.4. IMAGING ŽIVOČIŠNÝCH TKÁNÍ

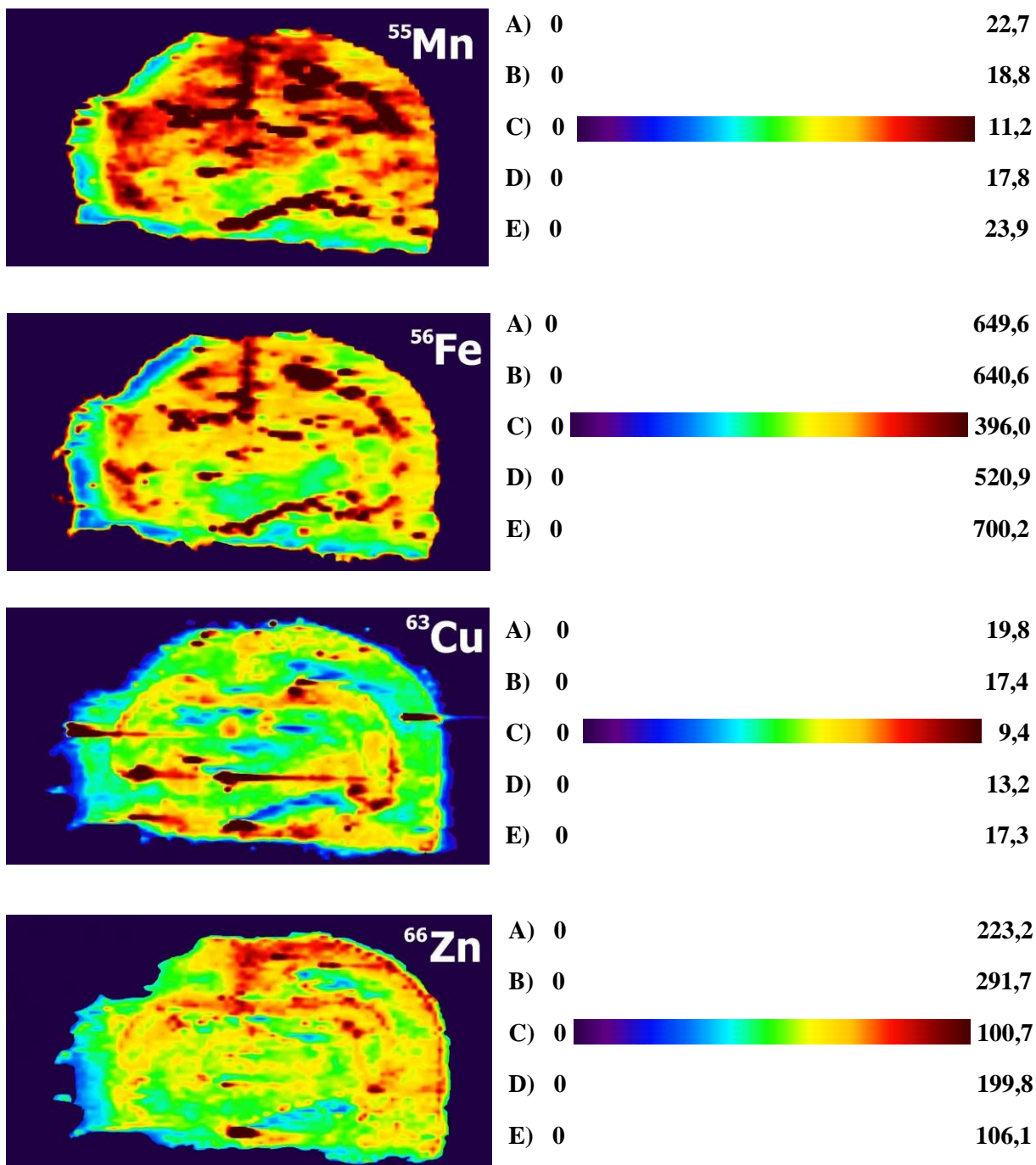
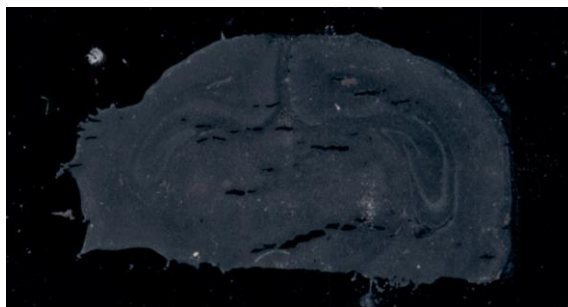
Živočišné tkáně upevněné na mikroskopickém sklíčku byly připravené dle výše uvedeného postupu (kapitola 3.1.4.) a analyzovány pomocí LA-ICP-MS s frekvencí 10 Hz, průtokem hélia kolizní celou 2 ml.min⁻¹ a výkonem laseru 20 %. Analyzovány byly tkáňové řezy dvou odlišných živočišných tkání, a to neonatálního myšního mozku a myši ledviny. Každá z tkání byla analyzována s jinou velikostí laserového svazku a tomu odpovídající rychlostí posunu laseru v závislosti na požadovaném laterálním (prostorovém) rozlišení. Data byla sbírána linie po linii napříč celou analyzovanou tkání.

Použitím různé velikosti laserového svazku jsem chtěla docílit lepšího prostorového rozlišení, respektive získat lepší informaci o distribuci kovů. S lepším rozlišením získáme i lepší obrázky, kde se odrazí i struktura analyzované tkáně.

1. Mozková tkáň

Neonatální myšící mozková tkáň byla analyzována pomocí LA-ICP-MS s rozlišením 110 μm a rychlostí posunu laseru 110 μm/s. Měřena byla prostorová distribuce celkem 4 izotopů a to: ⁵⁵Mn, ⁵⁶Fe, ⁶³Cu a ⁶⁶Zn. Pro kvantifikaci byly použity celkem 3 druhy kalibrací, pomocí agarózového gelu, tablet vylisovaných z CRM (celkem 3) a obohacené mozkové tkáně. Výsledky měření jsou shrnuty a porovnány na obrázku 28, společně s optickým obrázkem (skenem s rozlišením 4 800 dpi) analyzované tkáně.

Distribuce kovů silně závisí na struktuře dané tkáně, například v mozkové kůře je koncentrace prvků nižší, než je tomu v jiných částech. Distribuce ⁶³Cu a ⁶⁶Zn v mozkové tkáni je relativně homogenní a z jejich prostorové distribuce je zřejmá struktura mozkové tkáně. Naopak u ⁵⁵Mn a ⁵⁶Fe se vyskytuje více oblastí o vyšší koncentraci a není tak znatelná struktura mozku jako u mědi a zinku. Naměřené intenzity signálu pro ⁵⁵Mn a ⁶³Cu byly v měřeném kalibračním rozsahu (0 – 100 μg.g⁻¹), nejvyšší hodnoty se pohybovaly v rozmezí 11,2 – 23,9 μg.g⁻¹ pro mangan a 9,4 – 19,8 μg.g⁻¹ pro měď. Naopak naměřené intenzity signálu pro ⁵⁶Fe byly mimo rozsah, jeho nejvyšší hodnoty odpovídaly koncentracím 396,0 – 700,2 μg.g⁻¹. Několika násobně kalibrační rozsah přesahovaly. Nejvyšší získané hodnoty koncentrací pro ⁶⁶Zn byly nižší než pro ⁵⁶Fe a pohybovaly se v rozsahu 100,7 – 291,7 μg.g⁻¹.



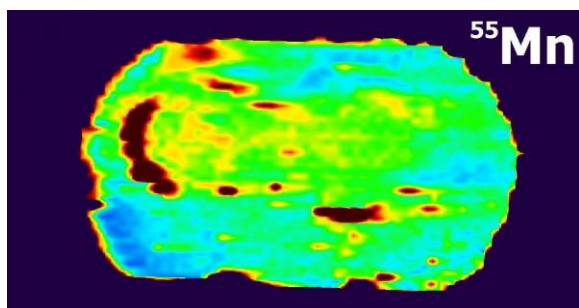
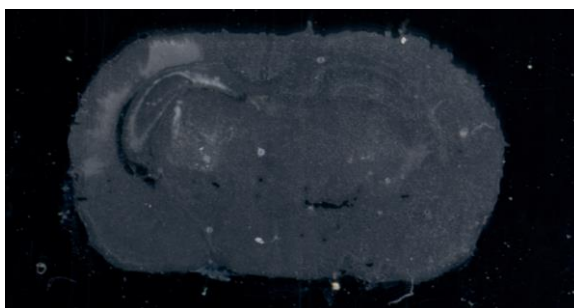
Obrázek 28: Prostorové distribuce izotopů ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn v mozkové tkáni, včetně koncentračních stupnic [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$] z různých druhů kalibračních postupů

(A – agarózový gel, B – CRM pork liver, C – CRM 15566b, D – CRM TORT-2, E – mozková tkáň se standardním přídatkem)

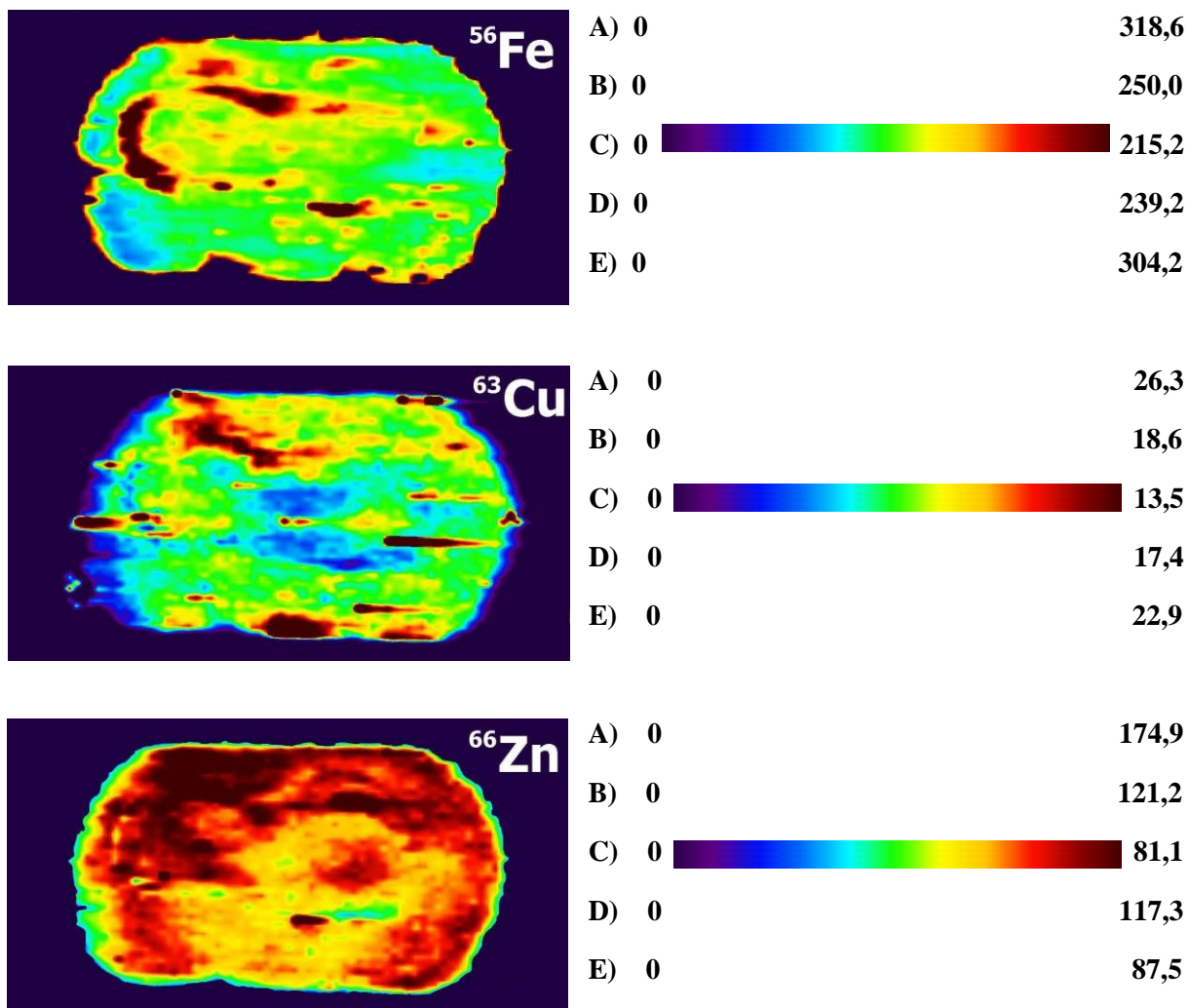
2. Mozková tkáň

Hypoxicko-ischemicky poškozená neonatální myši mozková tkáň byla analyzována pomocí LA-ICP-MS s rozlišením 150 μm a rychlostí posunu laseru 150 $\mu\text{m/s}$. Měřena byla prostorová distribuce celkem 4 izotopů a to: ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn . Pro kvantifikaci byly použity celkem 3 druhy kalibrací, pomocí agarózového gelu, tablet vylišovaných z CRM (celkem 3) a obohacené mozkové tkáně. Výsledky měření jsou shrnuty a porovnány na obrázku 29, společně s optickým obrázkem (skenem s rozlišením 4 800 dpi) analyzované tkáně.

Prostorová distribuce ^{66}Zn v poškozené mozkové tkáni je homogenní, nepodává žádné informace o struktuře. Prostorová distribuce ostatních měřených kovů ^{55}Mn , ^{56}Fe a ^{63}Cu v mozkové tkáni je relativně homogenní, až na několik oblastí, kde je koncentrace těchto izotopů kovů vyšší. Z prostorové distribuce těchto kovů je jasně zřetelná struktura mozkové tkáně. Získané hodnoty koncentrací pro ^{55}Mn a ^{63}Cu byly v měřeném kalibračním rozsahu ($0 - 100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), pro mangan $7,8 - 25,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a pro měď $13,5 - 26,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Naměřené intenzity signálu pro ^{56}Fe a ^{66}Zn byly mimo kalibrační rozsah, ale jejich hodnoty byly podstatně nižší, než u kontrolní mozkové tkáně. Hodnoty koncentrací pro ^{56}Fe byly v rozmezí $215,2 - 318,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a pro ^{66}Zn $81,1 - 174,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.



A) 0	25,5
B) 0	9,5
C) 0	7,8
D) 0	10,9
E) 0	13,6



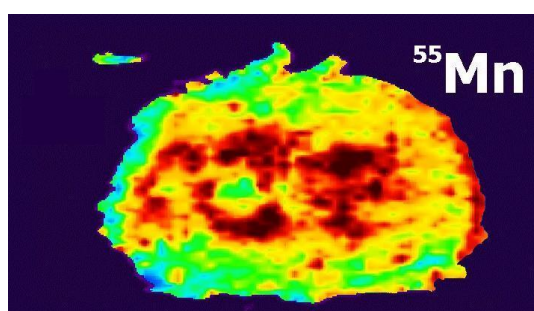
Obrázek 29: Prostorové distribuce izotopů ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn v mozkové tkáni, včetně koncentračních stupnic [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$] z různých druhů kalibračních postupů

(A – agarózový gel, B – CRM pork liver, C – CRM 15566b, D – CRM TORT-2, E – mozková tkáň se standardním přídatkem)

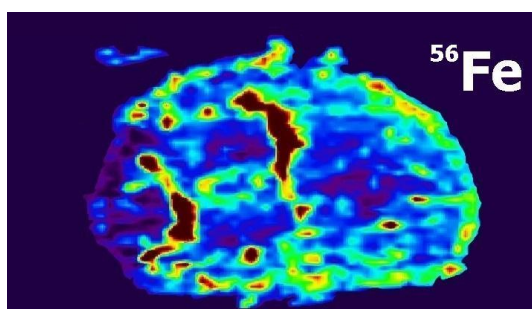
3. Ledvinová tkáň

Ledvinová tkáň byla analyzována pomocí LA-ICP-MS s rozlišením $85\ \mu\text{m}$ a rychlostí posunu laseru $85\ \mu\text{m/s}$. Měřena byla prostorová distribuce celkem 4 izotopů a to: ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn . Pro kvantifikaci byly použity celkem 3 druhy kalibrací, pomocí agarózového gelu, tablet vylisovaných z CRM (celkem 3) a obohacené mozkové tkáně. Výsledky měření jsou shrnuty a porovnány na obrázku 30, společně s optickým obrázkem (skenem s rozlišením $4\ 800\ \text{dpi}$) analyzované tkáně.

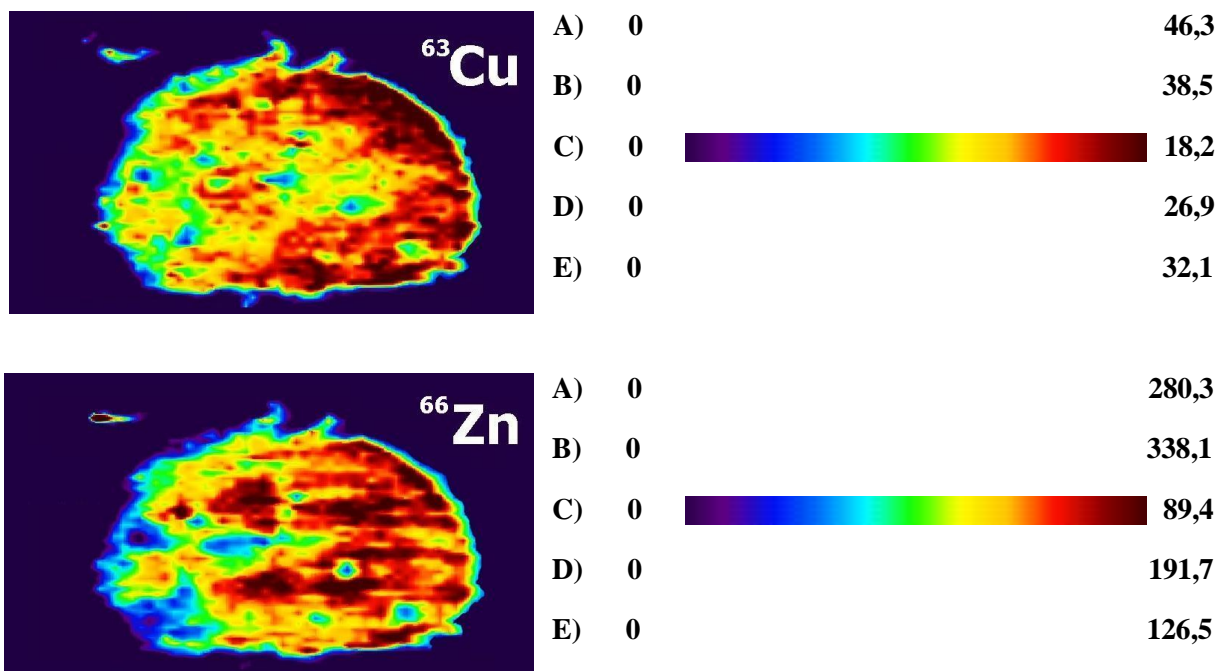
Prostorová distribuce kovů v ledvinové tkáni není tak homogenní, jako tomu bylo u tkáně mozkové. Z prostorové distribuce ^{56}Fe je jasně zřetelná struktura ledvinové tkáně. U ostatních kovů tyto informace o struktuře chybí. U ledvinové tkáně bylo pozorováno hromadění kovů v určitých oblastech. Pro ^{63}Cu a ^{66}Zn byly naměřeny podstatně vyšší koncentrace na pravé straně tkáňového řezu, a pro ^{55}Mn uprostřed. Získané hodnoty koncentrací pro ^{55}Mn , ^{56}Fe i ^{63}Cu byly v měřeném kalibračním rozsahu ($0 - 100 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), pro mangan byly získány hodnoty $8,2 - 22,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, pro železo $50,1 - 112,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a pro měď $18,2 - 46,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Hodnoty koncentrací pro ^{66}Zn byly podstatně vyšší, $89,4 - 338,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, značně přesahují kalibrační rozsah koncentrací.



A)	0	22,3
B)	0	16,0
C)	0	8,2
D)	0	13,6
E)	0	16,3



A)	0	112,1
B)	0	95,0
C)	0	50,1
D)	0	69,5
E)	0	103,1



Obrázek 30: Prostorové distribuce izotopů ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn v ledvinové tkáni, včetně koncentračních stupnic [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$] z různých druhů kalibračních postupů

(A – agarózový gel, B – CRM pork liver, C – CRM 15566b, D – CRM TORT-2, E – mozková tkáň se standardním přídatkem)

Získané kalibrační závislosti 4 izotopů ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn byly aplikovány na 3 tkáňové řezy ze dvou odlišných živočišných tkání (obrázky 28 – 30). Všechny získané koncentrační stupnice pro daný izotop jsou uvedeny na pravé straně obrázku zobrazující prostorovou distribuci daného izotopu v tkáni. Obecně vždy nejnižších hodnot koncentrací pro všechny vybrané izotopy bylo dosaženo aplikováním jednobodové kalibrační závislosti z CRM 1566b. Naopak nejvyšších hodnot koncentrací bylo dosaženo dosazením naměřených hodnot intenzit do rovnic kalibračních závislostí získaných proměřením agarózových gelů. Závěrem lze říci, že aplikované kalibrační postupy poskytují velice podobné výsledky o obsahu biogenních kovů v biologických tkáních.

Prostorová distribuce kovů silně závisí na struktuře živočišné tkáně, například v mozkové kůře je koncentrace kovů nižší, než je tomu v jiných částech mozku. Prostorové distribuce ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn jsou v mozkové tkáni relativně homogenní, naopak v ledvinové tkáni je viditelné hromadění manganu, mědi a zinku v určitých oblastech.

V kontrolní neonatální mozkové tkáni byl nejvíce zastoupen izotop ^{56}Fe , nejvyšší hodnoty koncentrací odpovídaly rozsahu $396,0 - 700,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a naopak nejméně zastoupen byl izotop ^{63}Cu . Nejvyšší dosažená koncentrace izotopu ^{63}Cu odpovídala rozsahu $9,4 - 19,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Stejně jako u kontrolní mozkové tkáně i v poškozené mozkové tkáni byl nejvíce zastoupen izotop ^{56}Fe , jeho nejvyšší koncentrace však byla podstatně nižší ($215,2 - 318,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Naopak koncentrace izotopu ^{66}Zn byla vyšší v poškozené neonatální mozkové tkáni. Nejvyšší hodnoty koncentrací pro ^{55}Mn a ^{63}Cu byly v obou mozkových řezech v podstatě stejné, a vzájemně se jejich hodnoty navzájem nelišily. V ledvinové tkáni byl nejhojněji zastoupen izotop ^{66}Zn ($89,4 - 338,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Jeho nejvyšší koncentrace byla podstatně vyšší, než koncentrace ostatních měřených izotopů kovů (^{56}Fe $50,1 - 112,1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, ^{63}Cu $18,2 - 46,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ a ^{55}Mn $8,2 - 22,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

5. ZÁVĚR

V teoretické části této diplomové práce je podrobně popsána instrumentace ICP-MS, interference s možnostmi jejich eliminace, ale i instrumentace a princip laserové ablace. Dále byly popsány a diskutovány různé kvantifikační postupy vhodné pro LA-ICP-MS. V poslední kapitole teoretické části jsou podrobněji diskutovány aplikace spojení LA-ICP-MS pro hmotnostně spektrometrické zobrazování prostorové distribuce vybraných kovů zejména se zaměřením na analýzu různých biologických vzorků (mozek, ledviny, játra, slezina, vazivová blána plic, varlata, krční mícha, oční čočka a nádory).

Cílem experimentální části bylo jednak vyvinutí a optimalizace spojení laserové ablace s ICP-MS pro účely hmotnostně spektrometrického zobrazování biogenních prvků v živočišných tkáních. K optimalizaci spojení laserové ablace (Analyte G2, Photon Machines Inc., USA) s ORS-ICP-MS (7700x, Agilent, Japonsko) byly použity agarózové gely se známou koncentrací analyzovaných prvků. Experimentálně zjištěné optimální podmínky pro LA-ICP-MS jsou energie laseru 20 % (tj. $2,12 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$) a průtok hélia kolizní celou $2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Optimální podmínky byly použity pro hmotnostně spektrometrické zobrazování prostorové distribuce ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn za použití celkem tří tkáňových řezů ze dvou odlišných živočišných tkání. Konkrétně se jednalo o neonatální myši mozkovou tkáň a tkáň myších ledvin. Každý z tkáňových řezů byl analyzován s jinou velikostí laserového svazku a tomu odpovídající rychlostí posunu laseru, v závislosti na požadovaném laterálním (prostorovém) rozlišení.

Pro kvantitativní analýzu prostorové distribuce vybraných 4 izotopů ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{63}Cu a ^{66}Zn byly aplikovány tři různé kalibrační postupy, a to kalibrace pomocí agarózových gelů, jednobodové kalibrace pomocí tabletek z CRM a v neposlední řadě „matrix-matched“ kalibrace standardním přídatkem. Obecně lze říci, že nejnižších hodnot koncentrací pro všechny vybrané izotopy bylo dosaženo aplikováním jednobodové kalibrační závislosti z CRM 1566b. Naopak nejvyšších hodnot koncentrací bylo dosaženo naměřených hodnot intenzit do rovnic kalibračních závislostí získaných proměřením agarózových gelů a „matrix-matched“ standardů. Všechny aplikované kalibrační postupy poskytují velice podobné výsledky o obsahu biogenních kovů v biologických tkáních.

Na závěr lze říci, že cíle kladené na tuto diplomovou práci byly splněny. Byla vypracována literární rešerše, dále bylo vyvinuto a optimalizováno spojení laserové ablace s ICP-MS pro účely hmotnostně spektrometrického zobrazování biogenních kovů v živočišných tkáních, které bylo aplikováno na tři tkáňové řezy dvou odlišných živočišných tkání.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

CE	kapilární elektroforéza
cps	counts per second (počet impulzů za sekundu)
CRM	certifikovaný referenční materiál
CZE	kapilární zónová elektroforéza
DCP	stejnoseměrně vázané plazma
DESI-MS	hmotnostní spektrometrie s desorpčním elektrosprejem
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ETV	electrothermal vaporization (elektrotermické odpařování)
FTICR	cyklotronová rezonance s využitím Fourierovy transformace
GC	plynová chromatografie
HG-ICP-MS	ICP-MS ve spojení s generováním těkavých hydridů
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie
ICP	indukčně vázané plazma
ICP-MS	hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-OES	optická emisní spektrometrie s buzením indukčně vázaným plazmatem
ID	isotope dilution (izotopové ředění)
IR	infrared (infračervené záření)
IS	internal standard (vnitřní standard)
ITP	izotachoforéza
LA	laser ablation (laserová ablace)
MALDI-MS	hmotnostní spektrometr s ionizací laserem za účasti matrice
MC	multi-collector (multikolektor)
MIP	mikrovlnně indukované plazma

MRI	zobrazování magnetickou rezonancí
MSI	zobrazovací hmotnostní spektrometrie
Nd: YAG	yttrium-aluminiový granát dopovaný neodymem
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
RF	radio frequency (radiofrekvenční)
SRM	standardní referenční materiál = CRM od firmy NIST
TAE	tris-acetát-ethylendiamintetraoctové kyseliny
TEOS	tetraethylorthosilikát
TOF	průletový analyzátor
UV	ultraviolet (ultrafialové záření)
VIS	visible (viditelné záření)

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. Miliszkiewicz N., Walas S., Tobiasz A.: *J. Anal. At. Spectrom.* **30**, 327 – 338 (2015).
2. Thomas R.: *Practical Guide to ICP-MS*. CRC Press, Boca Raton 2008.
3. Nelms, Simon M.: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*. Blackwell Publishing, Oxford 2005.
4. Černohorský T., Jandera P.: *Atomová spektroskopie*. Univerzita Pardubice, Pardubice 1997.
5. Kanický V.: *Zavádění vzorků do plazmatu*. 5. kurz ICP spektrometrie, Ed. Vítězslav Otruba – Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Brno 2009.
6. http://old.vscht.cz/anl/josef/LabAtom/Navod_ICP-MS_2010.pdf, staženo 8.října 2015.
7. Mihaljevič M., Strnad L., Šebek O.: *Chemické listy* **98**, 123 – 130 (2004).
8. Dean J. R.: *Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy*. John & Sons, Chichester 2005.
9. Kanický V.: *Fyzikální základy IPC*. 5. kurz ICP spektrometrie, Ed. Vítězslav Otruba – Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Brno 2009.
10. Hoffmann E., Stroobant V.: *Mass spectrometry: principles and applications*. John Wiley & Sons, Chichester 2002.
11. Hill S. J.: *Inductively Coupled Plasma Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Chichester 2005.
12. Pluháček T.: *Možnosti analýzy klinických materiálů pomocí ICP-MS*. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2013.
13. Kanický V.: *Analytické vlastnosti ICP-MS*. 5. kurz ICP spektrometrie, Ed. Vítězslav Otruba – Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Brno 2009.
14. Machát J.: *Kolizně-reakční cela pro eliminaci spektrálních interferencí v ICP-MS*. 5. kurz ICP spektrometrie, Ed. Vítězslav Otruba – Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Brno 2009.
15. Russo R. E., Mao X., Liu H.: *Talanta* **57**, 425 – 451 (2002).
16. Durrant S. F.: *J. Anal. At. Spectrom.* **14**, 1385 – 1403 (1999).
17. Gunther D., Jackson S. E., Longerich H. P.: *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* **54**, 381 – 409 (1999).
18. Becker J. S.: *Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications*. John Wiley & Sons, Chichester 2007.

19. Bohunská J.: *Možnosti analýzy archeologických materiálů pomocí ICP-MS*. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2013.
20. Holá M.: *Laserová ablace v ICP spektrometrii*. 5. kurz ICP spektrometrie, Ed. Vítězslav Otruba – Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Brno 2009.
21. Vrbová M., Jelínková H., Gavrilo P.: *Úvod do laserové techniky*. Vydavatelství ČVUT, Praha 1998.
22. Liu C., Mao X. L., Mao S. S.: *Anal. Chem.* **76**, 379 – 383 (2004).
23. Valas O.: *Analýza zubů pomocí laserové ablace a ICP-MS*. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2015.
24. Pozebon D., Scheffler G. L., Dressler V. L.: *J. Anal. At. Spectrom.* **29**, 2204 – 2228 (2014).
25. Limbeck A., Galler P., Bonta M.: *Anal Bioanal Chem.* **407**, 6593 – 6617 (2015).
26. Becker J. Sabine: *Journal of mass spectrometry* **48**, 255 – 268 (2013).
27. Becker J. S., Matusch A.; Wua B.: *Analytica Chimica Acta* **835**, 1 – 18 (2014).
28. Oseas da Silva M. A., Arruda M. A. Z.: *Metallomics* **5**, 62 – 67 (2013).
29. Kötschau A., Büchel G., Einax J. W.: *Microchemical Journal* **110**, 783 – 789 (2013).
30. Hanc A., Piechalak A., Tomaszewska B.: *International Journal of Mass Spectrometry* **363**, 16 – 22 (2014).
31. Hanc A., Olszewska A., Barańkiewicz D.: *Microchemical Journal* **110**, 61 – 69 (2013).
32. Sela H., Karpas Z., Zoriy M.: *International Journal of Mass Spectrometry* **261**, 199 – 207 (2007).
33. Herdering Ch., Wehe Ch. A., Reifschneider O.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **27**, 2588 – 2594 (2013).
34. Reifchneider O., Wehe Ch. A., Raj L.: *Metallomics* **5**, 1440 – 1447 (2013).
35. Bonta M., Lohninger H., Laszlo V.: *J. Anal. At. Spectrom.* **29**, 2159 – 2167 (2014).
36. Egger A. E., Theiner S., Kornauth Ch.: *Metallomics* **6**, 1616 – 1625 (2014).
37. Sussulini A., Becker J. S., Becker J. S.: *Mass Spectrometry Reviews* **9999**, 1 – 11 (2015).
38. Hsieh Y., Jiang P. S., Yang B. S.: *Anal Bioanal Chem* **401**, 909 – 915 (2011).
39. Kamaly N., Pugh J. A., Kalber T. L.: *Mol Imaging Biol.* **12**, 361 – 366 (2010).
40. Moreno-Gordaliza E., Esteban-Fernandez D., Giesen Ch.: *J. Anal. At. Spectrom.* **27**, 1474 – 1483 (2012).

41. Konz I., Fernández B., Fernández M. L.: *Anal Bioanal Chem* **406**, 2343-48 (2014).
42. Becker J. Sabine, Kumtabtim U., Wu B.: *Metallomics* **4**, 284 – 288 (2012).
43. Becker J. Sabine, Zoriy M., Matusch A.: *Mass Spectrometry Reviews* **29**, 156 – 175 (2010).
44. Becker J. Sabine, Matusch A., Palm Ch.: *Metallomics* **2**, 104 – 111 (2010).
45. Becker J. Susanne, Zoriy M., Przybylski M.: *International Journal of Mass Spectrometry* **261**, 68 – 73 (2007).
46. Pozebon D., Dressler V. L., Mesko M. F.: *J. Anal. At. Spectrom.* **25**, 1739 – 1744 (2010).
47. Sussulini A., Matusch A., Kliez M.: *Biomedical Spectroscopy and Imaging* **1**, 125 – 136 (2012).
48. Matusch A., Fenn L. S., Depboylu C.: *Anal. Chem.* **84**, 3170 – 3178 (2012).
49. Matusch A., Depboylu C., Palm Ch.: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **21**, 161 – 171 (2010).
50. Boaru S. G., Merla U., Uerlings R.: *Neuroscience* **15**, 98 – 110 (2014).
51. <http://www.alzheimer.cz/alzheimerova-choroba>, staženo 3. ledna 2016.
52. Becker J. Susanne, Zoriy M., Pickhardt C.: *International Journal of Mass Spectrometry* **242**, 135 – 144 (2005).
53. Pugh J. A. T., Cox A. G., McLeod C. W.: *J. Anal. At. Spectrom.* **26**, 1667 – 1673 (2011).
54. Becker J. Sabine, Zoriy M., Becker J. Susanne: *Phys. Stat. Sol.* **4**, 1775 – 1784 (2007).
55. Hare D. J., George J. L., Grimm R.: *Metallomics* **2**, 745 – 753 (2010).
56. Wang L. M., Becker J. Sabine, Wu Q.: *Metallomics* **2**, 348 – 353 (2010).
57. Hare D. J., Lear J., Bishop D.: *Anal. Methods* **5**, 1915 – 1921 (2013).