



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

STANOVENÍ OLOVA VE VZORCÍCH PLIC A MOZKŮ POKUSNÝCH MYŠÍ PO INHALACI NANOČÁSTIC

DETERMINATION OF LEAD IN LUNG AND BRAIN SAMPLES OF EXPERIMENTAL MICE AFTER THE
INHALATION OF NANOPARTICLES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Yana Demydenko

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Mgr. Michaela Vašinová Galiová, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1628/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Yana Demydenko**
Studijní program: Chemie a chemické technologie
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Mgr. Michaela Vašinová Galiová, Ph.D.**

Název bakalářské práce:

Stanovení olova ve vzorcích plic a mozků pokusných myší po inhalaci nanočástic

Zadání bakalářské práce:

1. vývoj rozkladné metody pro mineralizaci biologických tkání
3. vývoj analytické metody pro stanovení olova pomocí ET–AAS
3. stanovení olova ve vzorcích orgánů experimentálních myší a vyhodnocení dat

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.7.2021:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

Yana Demydenko
student(ka)

doc. Mgr. Michaela Vašinová Galiová,
Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Olovo patří mezi těžké toxické kovy, jehož nanočástice jsou přítomny ve vzduchu kvůli spalovacím procesům. Údaje o bezpečné koncentraci nanočástic olova pro lidské zdraví nejsou dostatečně prozkoumány. Předchozí studie prováděné na experimentálních myších ukázaly, že při vdechování nanočástic olova se nejprve poškozují plíce a ledviny, poté játra, slezina a mozek. Při delší expozici se olovo hromadí v zubech a kostech.

Tato bakalářská práce je zaměřena na sledování obsahu olova ve vzorcích plic a mozků experimentálních myší po různých obdobích inhalace nanočástic. Cílem této bakalářské práce byl vývoj analytické metody pro stanovení olova v biologických vzorcích pomocí atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ET-AAS). V práci byla navržena rozkladná metoda pro mineralizaci biologické matrice v mikrovlnném mineralizátoru, a dále byl vyvinut postup pro stanovení olova pomocí ET-AAS. Stanovení olova při vlnové délce 217 nm za použití $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ modifikátoru matrice bylo ověřeno analýzou certifikovaných referenčních materiálů. Analýzou vzorků orgánů experimentálních myší byl potvrzen detoxikační mechanismus u exponovaných jedinců se závislostí na době od ukončení inhalace nanočástic olova.

KLÍČOVÁ SLOVA

Atomová absorpční spektrometrie, olovo, nanočástice, biologický materiál, mozek, plíce.

ABSTRACT

Lead is a heavy toxic metal whose nanoparticles are present in the air due to combustion processes. Data on the safe concentration of lead nanoparticles for human health have not been sufficiently investigated. Previous studies in experimental mice have shown that inhalation of lead nanoparticles first damages lungs and kidneys, then liver, spleen and brain. With prolonged exposure, lead accumulates in the teeth and bones.

This bachelor thesis is focused on monitoring of the lead content in lung and brain samples of experimental mice after different periods of nanoparticle inhalation. The aim of this bachelor thesis was to develop an analytical method for the determination of lead in biological samples using atomic absorption spectrometry with electrothermal atomization (ET-AAS). In this work, a decomposition method for mineralization of the biological matrix in a microwave mineralizer was proposed, and a procedure for the determination of lead using ET-AAS was further developed. The determination of lead at 217 nm using the $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ matrix modifier was verified by analysis of certified reference materials. Analysis of organ samples from experimental mice confirmed the detoxification mechanism in exposed individuals with a dependence on the time since the end of inhalation of lead nanoparticles.

KEYWORDS

Atomic absorption spectrometry, lead, nanoparticles, biological material, brain, lungs.

DEMYDENKO, Yana. *Stanovení olova ve vzorcích plic a mozků pokusných myší po inhalaci nanočástic*. Brno, 2021. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/131366>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Michaela Vašinová Galiová.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat vedoucí bakalářské práce doc. Mgr. Michaela Vašinové Galiové, Ph.D. za vedení mé práce, trpělivost, připomínky a materiály, které mi poskytla. Ráda bych poděkovala také konzultantu RNDr. Pavlu Coufalíkovi, Ph.D. za velkou ochotu, podporu, trpělivost, cenné rady a čas, který mi věnoval při zpracování experimentální části a psaní bakalářské práce. Nakonec chci poděkovat Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i. za poskytnutí prostor a přístrojů pro vykonání experimentální části práce.

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Nanočástice kovů v ovzduší	8
2.2 Toxicita olova a jeho sloučenin	9
2.3 Chemická analýza biologických vzorků.....	10
2.4 Přehled analytických technik pro stanovení olova	11
2.4.1 Atomová absorpční spektrometrie (AAS).....	12
2.4.2 Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ET-AAS)	14
2.5 Testování toxicity nanočástic olova na pokusných myších.....	15
3 CÍLE PRÁCE	17
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	18
4.1 Seznam použitých chemikálií a certifikovaných referenčních materiálů	18
4.1.1 Příprava roztoku modifikátorů	18
4.2 Seznam použitých pomůcek a přístrojů.....	18
4.3 Popis inhalačního experimentu.....	21
4.3.1 Seznam použitých vzorků	22
4.4 Pracovní postupy a metodika.....	22
4.4.1 Čistota práce.....	22
4.4.2 Mineralizace vzorků	23
4.4.3 Vývoj a testování parametrů analytické metody pro stanovení Pb ET-AAS.....	24
4.5 Stanovení Pb ve vzorcích orgánů	25
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	26
5.1 Optimalizace parametrů analytické metody	26
5.2 Stanovení Pb ve vzorcích	31
6 ZÁVĚR.....	36
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	37

1 ÚVOD

Jelikož olovo patří mezi těžké kovy, jehož sloučeniny jsou vysoce toxické, a je stále používáno v průmyslu, jsou definovány emisní limity vedoucí k postupnému snižování jeho použití. Tento kontaminant je kromě ovzduší přítomen také v půdě, vodě a akumuluje se v rostlinách, což znamená, že se dostává do potravinového řetězce. Zdrojem kontaminace olovem je doprava, spalování fosilních paliv, úpravy rud, chemický průmysl, dále průmyslové produkty jako jsou akumulátory, pájky, plechy, barevné pigmenty, olovnaté sklo, glazurové přípravky, hnojiva a agrochemikálie. Ačkoliv jsou na první pohled známy téměř všechny informace o Pb, předmětem vědeckého zájmu je jeho účinek na živé organismy za nízkých expozičních dávek, např. jeho toxicita v případě malého množství částic olova v ovzduší.

V ovzduší se olovo vyskytuje často ve formě nanočástic vzniklých při spalovacích procesech. Ve studiích, ve kterých experimentální myši inhalovaly nanočástice olova (akutní a subchronická expozice), byla zaznamenána vážná poškození orgánů, zejména plic a jater. Pro stanovení stopových koncentrací olova v environmentálních vzorcích se často využívá atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ET-AAS), a to zejména kvůli své efektivnosti, citlivosti a jednoduchosti. Tato analytická metoda byla také použita ke stanovení obsahu Pb v biologických vzorcích v rámci této bakalářské práce. V následujícím textu teoretické části práce budou shrnuty hlavní aspekty studované problematiky.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nanočástice kovů v ovzduší

V atmosféře jsou přítomny částice o různé velikosti, tvaru, koncentraci a hustotě. Pojem „aerosol“ je definován jako směs tuhých, kapalných nebo směsných částic rozptýlených v plynném prostředí po dobu dostatečnou pro detekci nebo měření. Existuje hodně druhů aerosolu, např. prach, dým, kouř, mlha, sprej, smog, bioaerosol. Pro částice atmosférického aerosolu (anglicky: „atmospheric aerosol“, „particulate matter (PM)“, „particle (P)“) se používají i alternativní názvy, např. prachové částice, prašný aerosol, pevný prach, poléťavý prach, tuhé znečišťující látky, suspendované částice. Zdroje aerosolu v atmosféře jsou přírodní (požáry, zdroje minerálních látek – půda a voda, produkty rostlin – pyl atd.) a antropogenní (spalovací procesy, dopravní, průmyslová, stavební a zemědělská činnost) [1].

Částice dělíme podle velikosti na hrubé částice (PM₁₀ – 2,5) ($D_a > 2,5 \mu\text{m}$), jemné částice (PM_{2,5}) ($D_a < 2,5 \mu\text{m}$), submikrometrové částice (PM₁) ($D_a < 1 \mu\text{m}$), ultrajemné částice ($D_a < 100 \text{nm}$) a nanočástice (minimálně jeden rozměr menší než 100 nm), a právě D_a odpovídá aerodynamickému průměru, který je definován jako průměr koule s hustotou 1g/cm^3 a se stejnou rychlostí sedimentace jako studovaná částice [2], [3].

Atmosférické aerosoly působí na životní prostředí a na zdraví populace často negativně. Vliv částic na zdraví živého organismu závisí na velikosti, tvaru, chemickém složení, rozpustnosti a schopnosti se zachycovat v dýchacích cestách. PM dělíme na tři velikostní frakce: vdechovatelná – která je vdechovaná nosem a ústy a nedostane se dál do dýchacího systému, thorakální (PM₁₀) – dorazí do dolních dýchacích cest a respirabilní – je schopna dostat se do bezřasinkové části dýchacích cest [2]. Čím menší je velikostní frakce, tím je nebezpečnější, protože se zvětšuje schopnost depozice v dýchacích cestách a také možnost dorazit do dalších orgánů – kostní dřevě, mozku, ledvin, sleziny, jater, srdce atd. Při zvýšeném obsahu částic v ovzduší se vyskytuje více respiračních, plicních, srdečních, cévních chorob a zvyšuje se úmrtnost [4].

Nanočástice (NPs) mají rozměr menší než 100 nm. Nebezpečné jsou zejména kvůli kardiovaskulárním, neurodegenerativním a karcinogenním účinkům. Mohou se dostat do organismu různými cestami – poškozenou kůží, požitím a hlavně vdechováním. Možný je i další průnik částic do jiných tkání pomocí rozmanitých mechanismů (např. endocytózou, transcytózou) a systémů (především lymfatický systém a krevní oběh). Během průchodu nanočástic organismem může docházet k modifikaci biologických funkcí, buněčným interakcím a dalším reakcím. Důležitým parametrem ovlivňujícím biologickou aktivitu nanočástic je plocha povrchu. Biologická aktivita NPs s větší plochou povrchu na hmotnost se zvyšuje ve srovnání s částicemi o stejném chemismu. Toxicita tohoto působení spočívá ve vyvolání zánětlivých a oxidačně-stresových reakcí [5].

Pro studium toxicity NPs se provádějí testy *in vitro* (testy s buňkami plicní tkáně) a *in vivo* (za účasti pokusných zvířat). Významné vlastnosti při stanovení toxicity nanočástic a jejich vlivu na živý organismus jsou velikost, tvar, distribuce velikostí, struktura, chemické složení, obsah nečistot, vlastnosti povrchu, stupeň agregace a dávka [5].

Emisní limity jsou důležité pro ochranu zdraví lidí a pro kontrolu znečištění ovzduší. Limity obsahu částic ve vzduchu jsou pro PM10 – 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ za kalendářní rok, pro PM2,5 – 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ za kalendářní rok. Roční imisní limity obsahu kovů v ovzduší jsou následující: olovo (Pb) – 0,5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, kadmium (Cd) – 0,005 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, arsen (As) – 0,006 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, nikl (Ni) – 0,02 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, rtuť (Hg) – 0,05 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ [6]. Tyto limity platí nejen v České republice, ale vztahují se na celou Evropskou Unii.

2.2 Toxicita olova a jeho sloučenin

Toxicita olova a jeho sloučenin je již dlouho známa. Nejsou však dostatečně prozkoumány účinky nízkých dávek na zdraví a nejsou definovány skutečně bezpečné limity. Pb se běžně vyskytuje ve formě aerosolu a jeho toxicita se může lišit v závislosti na fyzikálně-chemických vlastnostech. Hlavním zdrojem olova jsou antropogenní zdroje – spalovací procesy, dopravní, průmyslová a zemědělská činnost, během kterých dochází k akumulaci Pb v půdě, vodě a rostlinách. K největšímu znečištění životního prostředí olovem na celém světě došlo v důsledku jeho přidavku do benzínu pro zvýšení oktánového čísla [7]. Mezi další zdroje olova patří barvy, vodovody (ve státech se starým vodovodním potrubím), agrochemikálie, keramické nádoby glazované olověnými sloučeninami, tabák, bylinné léky (z Indie, Číny a dalších částí Asie). K expozici olovem dochází při výrobě střeliva, baterií, olověného plechu, pájky, některých mosazných a bronzových staveb, keramické glazury, těsnění, radiačních štítů, vojenského vybavení a při výrobě některých chirurgických zařízení [8]. Přírodním zdrojem Pb jsou některé rudy (např. galenit PbS , cerusit PbCO_3 a anglesit PbSO_4) [9].

Olovo nejčastěji vstupuje do těla dýchacím a trávicím systémem. Po vstupu do krevního řečiště je větší část vázána na erythrocyty a zůstává v krvi na krátkou dobu (čas na vyloučení poloviny olova z původního množství je 35 dní). Dále je Pb rozptýleno do měkkých tkání – jater, ledvin, mozku, plic, sleziny, slinivky břišní, vaječníku, varlat, prostaty, nadledvin, srdce, tukových a svalových tkání. Následujícím místem ukládání jsou v průběhu trvalého působení zuby a kosti (během dalších 4-6 týdnů). S věkem obsah olova v kosti výrazně stoupá [8].

Výsledkem expozice pro člověka může být hyperaktivita, neurokognitivní poruchy (snížení intelektuálních funkcí, poškození paměti, snížená pozornost a koncentrace), hypertenze, renální nedostatečnost, katarakta (šedý zákal) a rakovina. Otrava při akutní expozici se projevuje jako encefalopatie, křeče, omámení, bolestí břicha a nevolností. Chronická expozice se liší od akutní expozice v tom, že chronické příznaky se projevují jako celková malátnost, anorexie, zácpa, přítomnost krve v moči (hematurie) a anémie [10]. Expozice olova představuje největší riziko pro děti, protože jsou mnohem citlivější k toxickým účinkům a absorbují vyšší podíl biologicky dostupného olova než dospělí [8].

Toxicita jednotlivých sloučenin olova se liší v závislosti na rozpustnosti, mobilitě, velikosti, tvaru, chemickém složení, vlastnosti povrchu, koncentraci a době expozice. Olovo se vyskytuje ve dvoumocných (častěji) a čtyřmocných sloučeninách. Olovo a jeho anorganické sloučeniny jsou nebezpečné kvůli pravděpodobně karcinogenitě pro člověka – skupina 2A karcinogenního rizika dle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) [11]. Oxidy olova, olovnaté a olovičité soli, jsou vysoce toxické látky, většinou špatně rozpustné. Výjimku tvoří dusičnan,

chlореčnan a v mnohem menší míře chlorid olovnatý. Tetraethylolovo ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$) a tetramethylolovo ($\text{Pb}(\text{CH}_3)_4$) (přísady do benzínu) jsou organické sloučeniny olovnatých látek, které jsou dealkylovány v játrech na toxické trialkylové a tetraalkylové deriváty olova a vylučují se z organismu velmi pomalu [12]. Z hlediska posuzování toxického působení olova v organismu je tak důležité stanovit (vedle jeho celkového obsahu) i obsah jednotlivých specií.

Chemická specie prvku je definována podle Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry, zkráceně IUPAC) jako specifická forma prvku definovaná izotopovým složením, elektronovým nebo oxidačním stavem, resp. strukturou komplexu či molekulovou strukturou [13].

Speciální analýza se věnuje stanovení jednotlivých specií prvku. Pokud není možné úplně identifikovat chemické specie, používá se frakcionační analýza, při které se celkový obsah rozdělí na určité podíly, které charakterizují mobilitu, biodostupnost nebo toxicitu sledovaného polutantu ve vzorku [14]. Použitím vhodné separační techniky (např. chromatografie, elektroforéza) v kombinaci s citlivým detektorem pro konkrétní prvek lze dosáhnout vysoce efektivního výsledku [15].

2.3 Chemická analýza biologických vzorků

Na přesnost a správnost výsledku ve stopové analýze kovů má vliv každý krok, který je prováděn se vzorkem. Je nutné předem vědět, jakým způsobem bude vzorek zpracováván a analyzován, protože z toho vychází metoda a provedení odběru. Vliv na konečný výsledek také mají skladování, úprava vzorku, kontaminace a případné ztráty analytu. Vysoké požadavky jsou kladeny nejen na čistotu vzduchu v laboratoři, zvolené vybavení a nádobí, čistotu používané vody a chemikálií, ale i na zkušenost každého pracovníka, který se účastní přípravy analytického vzorku [14].

Při odběru vzorků je obecně vhodné dodržovat postupy a normy vydávané Úřadem pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví. Pro správnou interpretaci výsledku analýzy je důležitá podrobná dokumentace odběru se záznamem odchylek od vzorkovacího plánu.

Biologický vzorek je vhodné po odběru ihned zamrazit (např. v kapalném dusíku), aby nedošlo k degradaci odebraného materiálu. V případě stanovení obsahu kovů na vlhký vzorek je před zamrazením potřeba vzorek zvážit nebo znemožnit ztrátu vlhkosti do zmrazení a po rozmrazování. Při velkém obsahu vody v živočišných tkáních se používá lyofilizace (při vyhodnocení obsahu kovů na suchou hmotnost vzorku) [14].

Dalším krokem je příprava laboratorního vzorku, konkrétně homogenizace, zmenšení hmotnosti (nebo objemu) vzorku, zmenšení velikosti pevných částic. Pro dělení vzorku na části je lépe používat plastové nebo keramické instrumenty (aby byla zabráněno kontaminaci, např. otěrem kovů). Pokud povrch vzorku obsahuje nečistoty, které mohou zkreslovat obsah analytu, je nutné povrch omýt, někdy s dodržováním přesného postupu v závislosti na typu vzorku. Malé lyofilizované vzorky připravíme na laboratorní vzorek homogenizací v třecí misce s vysokou odolností proti otěru (např. korund, achát). Pro homogenizaci je také možné použití mlýnku

s titanovou výstelkou i mlecím břitem nebo kryogenní mlýn. V případě analýzy celého vzorku (např. malé části rostlin, živočišné orgány o malé hmotnosti atd.) se poté vyhneme potenciální ztrátě analytu či zkreslení výsledků [14].

Pro stanovení analytu je laboratorní vzorek nutné převést do roztoku nebo alespoň částečně rozložit matrici vzorku. Vysoká homogenita a jednotná matrice kapalného vzorku jsou hlavními výhodami pro přesné analytické stanovení. V průběhu mineralizace (rozkladu) vzorku může docházet ke ztrátám analytu a kontaminaci z nádobí i činidel, proto je žádoucí minimální počet operací. Při rozkladu organických vzorků se používá rozklad na suché cestě (spalování) nebo na mokré cestě (v kyselinách). Rozklad na mokré cestě je vhodnější pro stopovou analýzu kovů, protože riziko ztráty analytu není tak velké, jako při suchém rozkladu [14].

Otevřený rozklad v kyselinách s ohřevem (konvenčním nebo mikrovlnným) je vhodnější pro vzorky, které během rozkladu uvolňují velký objem oxidu uhličitého nebo reagují explozivně za zvýšeného tlaku. Rozklad probíhá ve směsi HNO_3 a H_2O_2 při teplotě jejich varu. Přídavkem H_2SO_4 lze odstranit zbytky uhlíku, jelikož rozklad ve směsi kyseliny dusičné a peroxidu vodíku nemusí být úplný. Použitím roztoku H_2O_2 (30 %) s přídavkem katalyzátoru (Fe^{2+}) lze rozložit organickou matrici. Rozklad probíhá za laboratorní teploty, ale častěji se směs zahřívá na 80 °C. Tato mineralizace není vhodná pro rozklad tuků a trvá několik hodin [14].

Při uzavřeném rozkladu za zvýšeného tlaku se využívají především mikrovlnné mineralizátory. Tato metoda je vhodná pro většinu typů organických vzorků. Maximální pracovní tlak mineralizátoru určuje maximální hmotnost vzorku, kterou je možné mineralizovat během jednoho rozkladného procesu. Výsledný tlak při rozkladu ovlivňuje celkový obsah uhlíku ve vzorku, plynné oxidy uvolňované z kyselin a tenze vodní páry. Na začátku rozkladu organické matrice lze zaznamenat prudký nárůst tlaku v důsledku exotermní reakce. Z tohoto důvodu musí na začátku teplotního programu teplota narůstat pomalu (na 100–120 °C). Potom následuje nárůst do rozkladné teploty a vlastní mineralizace (5–20 min). Poslední fází je chlazení [14].

Pro vysokotlaké rozklady se nejčastěji používá HNO_3 (koncentrovaná), směs HNO_3 a H_2O_2 (případně s přídavkem H_2SO_4). Lze také použít konc. HNO_3 a HClO_4 (70 %) (mineralizace pomocí HNO_3 s postupným přidáváním HClO_4). Tento způsob je nebezpečný při tlakových mikrovlnných rozkladech, protože v rozkladných nádobkách zůstává zvýšený tlak i po ochlazení. Pro rozklad explozivních nebo obtížně rozložitelných vzorků je proto vhodné použití doporučených postupů (uvedených výrobcem) pro určitý mineralizátor. Úpravy dle konkrétní matrice lze provádět podle publikovaných postupů v primární literatuře [14].

2.4 Přehled analytických technik pro stanovení olova

Nejběžnější spektrometrické metody pro stanovení olova v biologických vzorcích jsou F-AAS (plamenová atomová absorpční spektrometrie), ICP-OES (atomová emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem), ICP-MS (hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem) a ET-AAS (elektrotermická atomová absorpční spektrometrie) [16].

F-AAS je jednoduchá spektrometrická metoda vhodná pro rutinní měření vyšších obsahů prvků. Často se používá kvůli svojí jednoduchosti a relativně nízkým nákladům. Mezi nevýhody patří zejména nedostatečná citlivost pro většinu aplikací a rušivé účinky matrice [14].

ICP-OES je vhodná pro multiprvkovou analýzu. Relativně dobrá citlivost simultánního stanovením kovů na různých spektrálních čarách je pro analýzu výhodná. Kromě toho má tato metoda lepší meze detekce než F-AAS. Jejím hlavním problémem pro stanovení stopových kovů ve vzorcích jsou často nevyhovující limity detekce. ICP-MS poskytuje nejlepší detekční limity pro stanovení kovů mezi spektrometrickými technikami [14]. Je také vhodná pro multiprvkovou analýzu, navíc má široký dynamický rozsah. Metody pracující s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES a ICP-MS) mají společné nevýhody: časté zhasnutí plazmatu při přímé analýze vzorků s vysokým obsahem organické matrice a blokování injektoru kvůli ukládání uhlíku z neúplné oxidace organické matrice [16].

ET-AAS je efektivní a citlivá technika pro většinu vzorků ve stopové analýze kovů. Poskytuje relativně jednoduchou a rychlou analýzu vzorků. Velkou výhodou je malé množství vzorku potřebné k analýze. ET-AAS je však velmi citlivá na vliv matrice. Přítomnost matrice biologických vzorků může způsobit značné interference a působit rušivě na vlastní atomizaci analytu [16].

2.4.1 Atomová absorpční spektrometrie (AAS)

Atomová absorpční spektrometrie využívá schopnost elektronu přecházet z nižší do vyšší energetické hladiny (do excitovaného stavu) a vracet se zpátky do základního stavu. Atom v určitém stavu může energii pohlcovat (absorbovat) nebo emitovat ve formě fotonu. Přitom energie fotonu bude odpovídat rozdílu energie atomu (ΔE) mezi jednotlivými stavy, kterému odpovídá Planckův vztah [17]:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h \times \nu = h \times \frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

Kde E_2 – energie atomu ve vyšším energetickém stavu, E_1 – energie atomu v nižším energetickém stavu, h – Planckova konstanta ($6,626 \times 10^{-34}$ J×s), ν – frekvence záření, c – rychlost záření, λ – vlnová délka záření.

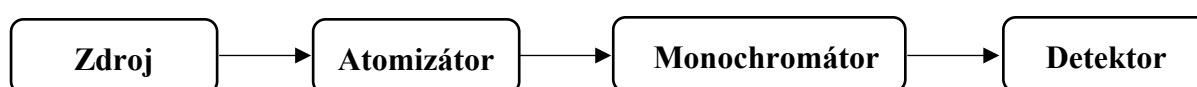
Základem stanovení měřeného prvku metodou AAS je absorpce energie atomu v základním stavu. Nejprve je potřebné daný prvek atomizovat, a to to buď plamenovým (F-AAS) nebo elektrotermickým atomizátorem (ET-AAS). Plamenová atomizace probíhá v následujících krocích: zmlžování roztoku analytu (tvorba aerosolu), vypařování rozpouštědla v plameni a vznik volných atomů. Při použití elektrotermického atomizátoru dochází k ohřevu vzorku na potřebnou teplotu atomizace pomocí elektrického proudu. Proces atomizace probíhá v grafitové (nebo kovové) trubici a sestává z fáze sušení vzorku, rozkladu (pyrolýzy) a následně vzniku volných atomů při atomizační teplotě. Při setkání volných atomů se zářením výbojky, atomy absorbují záření určité vlnové délky (dle druhu atomu). Změřenou hodnotu absorbance vzorku porovnáme s absorbancí standardu, např. pomocí kalibrační křivky [17].

Pro absorpční (A) platí následující vztah (Lambertův-Beerův zákon):

$$A = \log \frac{\Phi_0}{\Phi} = 0,434 \times \kappa \times N \times l \quad (2)$$

Kde Φ_0 – původní tok záření, Φ – tok záření, κ – atomový absorpční koeficient, N – počet atomů, l – délka absorpční vrstvy.

Atomový absorpční spektrometr se skládá z několika částí (Obrázek 1): zdroj primárního záření – čárový zdroj (výbojka s dutou katodou – HCL, bezelektrodová výbojka – EDL) nebo kontinuální zdroj (vysokotlaká xenonová výbojka); atomizátor (plamenový, elektrotermický) – transformuje vzorek na volné atomy; monochromátor – slouží k oddělení požadované atomové čáry (úzký spektrální interval); detektor – získává a vyhodnocuje signál, např. fotonásobič nebo CCD detektor.



Obrázek 1: Schéma AAS

Spektrální interference v AAS je nutné korigovat pomocí účinné korekce pozadí, která by měla být prováděna na stejné vlnové délce jako signál analytu, ve stejném místě a čase. Ke korekci se používá blízká čára, kontinuální zdroj záření, Zeemanův jev a metoda Smith-Hieftje. Korekce pozadí pomocí blízké čáry je sekvenční, při které se změří celková absorpce analytu na rezonanční čáře a poté na blízké čáře, kde absorpce analytu již není přítomna. (Je možné využít čáru jiného prvku, který nesmí být přítomen ve vzorku.) Tuto metodu nelze použít při dějích, které se mění s časem (např. při elektrotermické atomizaci). Při korekci pomocí kontinuálního zdroje záření se paprsky čárového a kontinuálního zdroje záření střídají v optické cestě spektrometru. Celková absorpce se měří pomocí čárového zdroje, absorpční pozadí se měří pomocí kontinuálního zdroje záření (např. deuteriová výbojka). Zeemanův jev využívá možnost štěpení energetických hladin atomu v silném magnetickém poli. Emisní a absorpční čáry se dělí na komponenty, které jsou potom symetricky uspořádány kolem čáry při nulovém magnetickém poli. Korekce s využitím Zeemanova jevu může být přímá – dochází ke štěpení emisních čar zdroje záření, a inverzní – ke štěpení absorpčních čar dochází po aplikaci magnetického pole na atomizátor. Metoda Smith-Hieftje je založena na rozšíření profilu a samozvratu analytické čáry při krátkodobém napájení primárního zdroje záření vysokým proudem. Pulsem nízkého proudu po dobu několika ms je emitována úzká čára, kterou absorbují atomy analytu a pozadí. Další velmi krátký vysokoproudový puls vyvolá emisi čáry, jejíž šířka profilu se zvětšuje od samoabsorpce až k samozvratu. Během vysokoproudového pulsu je primární záření více absorbováno pozadím [17].

Největší rozvoj instrumentace AAS pro stanovení stopových koncentrací kovů představuje atomová absorpční spektrometrie s kontinuálním zdrojem záření (HR-CS AAS). Používaným zdrojem záření je vysokotlaká xenonová výbojka. Používaný atomizátor bývá plamenový, elektrotermický nebo jejich kombinace (tj. jeden přístroj s oběma samostatnými atomizátory). Detektorem záření je CCD detektor s vysokým měřicím rozsahem. Atomový absorpční spektrometr s kontinuálním zdrojem záření umožňuje použití absorpčních čar s nízkou citlivostí, má vyšší spektrální rozlišení, poskytuje možnost záznamu spekter nekovových

diatomických molekul, i možnost současného stanovení prvků s blízkou absorpční čarou v úzkém intervalu vlnových délek [14].

2.4.2 Atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ET-AAS)

Nejlepší detekční limity (z metod AAS) pro stanovení stopových koncentrací olova dosahuje atomová absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ET-AAS) – 0,05–0,5 ng/ml. Limit detekce je velmi nízký i ve srovnání s atomovou emisní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) – 40 ng/ml [14].

Ve většině případů při stanovení stopových koncentrací kovů technikou ET-AAS je zapotřebí optimalizovat použití modifikátoru matrice, teplotu pyrolýzy a atomizace dle konkrétního prvku a matrice vzorku [14]. Chemické modifikátory např. stabilizují kov do atomizační teploty a zabraňují vzniku interferencí s maticí vzorku. Tímto způsobem jsou také různé formy analytu ve vzorku nebo formy vzniklé během analytického procesu převáděny na jednu formu se stejnými nebo podobnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Modifikátory matrice ovlivňují fázi sušení, termickou úpravu nebo i vlastní atomizační proces [18].

Maximální teplota pyrolýzy Pb bez modifikátoru je 600 °C [14]. Pro stanovení olova se nejčastěji používají modifikátory Pd-Mg a fosforečnan amonný. Pd-Mg umožňuje oddělení většiny rušivých prvků v důsledku možnosti použití teplot pyrolýzy od 1200 °C až 1400 °C. Tento modifikátor také stabilizuje olovo, což zvyšuje atomizační teplotu na 2000 °C; charakteristické množství se při tomto stanovení pohybuje okolo 16 pg. $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ zvyšuje atomizační teplotu na 1600 °C s charakteristickým množstvím 12 pg [19]. Pojem „charakteristické množství“ v AAS odpovídá citlivosti metody. Může být uváděn jako „characteristic mass“ v pg nebo koncentrace. Tento pojem znamená množství (nebo koncentraci) analytu, které vyvolá absorpenci $A = 0,0044$ [20].

Optimalizace teplotního programu grafitového atomizátoru v ET-AAS umožňuje odstranění interferentů z matrice vzorku, zachování maximálního množství analytu v atomizátoru a kvantitativní atomizaci analytu. Prvním krokem teplotního programu je sušení vzorku, které je nutné adaptovat podle složení a objemu vzorku tak, aby vypaření rozpouštědla bylo úplné. Druhý krok je pyrolýza, během které už nesmí docházet k žádnému vypařování rozpouštědla. Pro odvod par rozpouštědla vzniklých při sušení a produktů pyrolýzy prochází přes kyvetu průtok inertního plynu (argon). Následujícím krokem je atomizace při zastaveném průtoku inertního plynu, před kterou se automaticky nastaví nulový signál detektoru. V důsledku zastavení průtoku plynu je možné dosáhnout maximální hustoty atomů analytu v optické ose spektrometru. Teploty pyrolýzy a atomizace jsou optimalizovány sestavením pyrolýzní křivky (závislost integrované absorpce na teplotě pyrolýzy za konstantní atomizační teploty) a atomizační křivky (závislost integrované absorpce na atomizační teplotě). Výchozí teploty vybereme dle doručení výrobce spektrometru nebo z literatury. Na začátku měníme teplotu pyrolýzy po 100 °C ve zvoleném úseku, dále po 50 °C do poklesu absorpce. (Pokles absorpce značí nežádoucí vypařování analytu.) Výslednou teplotu pyrolýzy volíme standardně 100 °C před bodem zlomu na pyrolýzní křivce. Optimalizaci atomizační teploty provádíme za zjištěné konstantní teploty pyrolýzy. Finální atomizační teplotu volíme vyšší

o 100–200 °C, než je maximum atomizační křivky. Během atomizace, která trvá 3–5 s, je zaznamenávána absorbance. Posledním krokem teplotního programu je čištění zbytků vzorku z grafitové kyvety za vhodné teploty tak, aby nedocházelo ke zbytečnému opotřebení atomizátoru [14].

Při správném dávkování kapalného vzorku do atomizátoru lze dosáhnout vysoké reprodukovatelnosti měření. V současné době se dávkování kapalin provádí pomocí automatického dávkovače a jeho pracovní režim (způsob kalibrace, dávkované objemy, počet opakování, dávkování vzorku a modifikátoru) je řízen programem. Dávkovaný objem roztoku se běžně pohybuje od 10 μl do 50 μl (na základě objemu použitého modifikátoru a velikosti atomizátoru) [17]. Dávkování vzorku a modifikátoru je postupné nebo společné. Při stanovení vyšších koncentrací analytu je nutné vzorek zředit, protože rozsah kalibrace je poměrně úzký. Výhodou ředění vzorků je potlačení matricových efektů. Jako alternativa ředění vzorku je použití sekundární analytické čáry v HR-CS AAS. V případě nízké koncentrace analytu v relativně velkém objemu vzorku lze použít prekoncentraci opakovaným dávkováním vzorku přímo v kyvetě, po němž následuje krok sušení. Reprodukovatelnost stanovení se ovšem snižuje s narůstajícím počtem kroků dávkování a sušení [14].

Dávkování pevných vzorků je vhodné pro stanovení stopových a ultrastopových koncentrací analytu, pokud není možné převést vysoce odolné materiály do roztoku, a pro analyty s vysokou pravděpodobností ztráty nebo kontaminace. Před samotným dávkováním je nutné vzorek důsledně zhomogenizovat mletím na analytickou jemnost (do 63 μm), ideálně pod 25 μm . Dále se vzorek navažuje (v rozmezí 0,05–10 mg, nejlépe 0,3–3 mg) na grafitovou lodičku, která je následně vsunuta automatickým dávkovačem do atomizátoru [14]. Zbytky vzorku na povrchu lodičky je nutné mechanicky odstranit po každé analýze. Použitý spektrometr pro dávkování pevných vzorků musí být vybaven účinnou korekcí pozadí [17]. Výhodami metody jsou zkrácení doby analýzy, vysoká citlivost a snížení ztrát i kontaminací vzorku. Ale přesnost stanovení může být nižší než u dávkování kapalného vzorku. K dalším problémům dochází při kalibraci, v případě nízké homogenity vzorku. V neposlední řadě dochází ke zvýšení rizika interference [14].

2.5 Testování toxicity nanočástic olova na pokusných myších

Pro přípravu nanočástic PbO (PbO-NPs) se používá technologie zahrnující kroky odpařování-oxidace-kondenzace olova v trubicovém reaktoru. Olověný drát je umístěn v keramickém kelímku, který je poté vložen do vertikální keramické vyhřívané trubice. Ze vzniklé taveniny odpaříme olovo v peci při 830 °C a obdržíme páry kovu v inertním plynu (dusík) [21]. Posledním krokem je oxidace par vzduchem (během ředění) a jejich kondenzace na nanočástice PbO [22]. Před použitím pro inhalační experimenty se vzniklé NPs oxidu olovnatého dále zředí proudem vzduchu na požadovanou koncentraci [21].

Dosavadní experimenty stanovení obsahu olova v orgánech pokusných myší byly provedeny po různou dobu inhalace a pro různé koncentrace NPs. První experiment subchronické expozice nanočástic PbO [21] trval po dobu 6 týdnů (24 hodin denně, 7 dní/týden). Dospělé samice myší (o hmotnosti přibližně 24 g) byly rozděleny na dvě skupiny a byly umístěny do inhalačních

komor. První experimentální skupina byla vystavena nanočásticím oxidu olovnatého a obsahovala dvě nezávislé podskupiny. Průměrná koncentrace inhalačních NPs byla 23×10^6 částic/cm³, resp. $0,956 \times 10^6$ částic/cm³ (modus 25,9 nm, geometrický střední průměr 25,9 nm, medián 25,8 nm, geometrická směrodatná odchylka 1,66, průměrná hmotnostní koncentrace 121,7 µg PbO/m³; resp. 149,3 µg PbO/m³). Odhadovaná dávka v průběhu šestitýdenního inhalačního období byla 0,75 µg (resp. 0,92 µg pro druhou podskupinu) PbO na gram tělesné hmotnosti myši. Druhá kontrolní skupina byla vystavena stejnému vzduchu, jako první, ale bez přídatku nanočástic [21].

Druhý experiment [22] obsahoval celkem osm expozičních období: akutní expozice po dobu 4, 12, 24 a 72 hodin a subchronická expozice po dobu 1, 3, 7 a 11 týdnů. Šestitýdenní samice myši (o hmotnosti okolo 24 g) byly umístěny do inhalačních komor a byly vystaveny expozici nanočástic 24 hodin denně, 7 dní/týden. NPs oxidu olovnatého při akutní expozici měly koncentrace $4,05 \times 10^6$ PbO/cm³ (406,6 µg/m³; modus 7,64 nm, geometrický střední průměr 16,1 nm, geometrická směrodatná odchylka 1,73). U subchronické expozice byly myši rozděleny na tři podskupiny: s nižší koncentrací nanočástic PbO (skupina Pb1) – $3,83 \times 10^5$ PbO/cm³ (39,1 µg/m³; modus 25,8 nm, geometrický střední průměr 24,6 nm, geometrická směrodatná odchylka 1,72), s vyšší koncentrací (skupina Pb2) – $1,93 \times 10^6$ PbO/cm³ (192,5 µg/m³; modus 21,9 nm, geometrický střední průměr 23,2 nm, geometrická směrodatná odchylka 1,66) a kontrolní skupina s inhalačním vzduchem bez NPs. Odhadovaná dávka během experimentu s akutní intoxikací byla 0,01, 0,03, 0,06 a 0,18 µg PbO na gram tělesné hmotnosti myši pro dobu expozice 4, 12, 24 a 72 hodin. U experimentu se subchronickou intoxikací byla odhadovaná dávka 0,04, 0,12, 0,28 a 0,44 µg PbO na gram tělesné hmotnosti myši pro dobu expozice 1, 3, 7 a 11 týdnů pro nižší koncentrace NPs. Pro vyšší koncentrace nanočástic byla odhadovaná dávka 0,20, 0,59, 1,38 a 2,17 µg PbO na gram tělesné hmotnosti myši [22].

Po skončení doby expozice byly myši usmrceny. V prvním experimentu byly odebrány plíce, játra, ledviny, mozek a slezina pro chemické, histologické a imunofluorescenční analýzy [21]. Ve druhém experimentu byly odebrány plíce, játra, ledviny a mozek pro chemické, histologické, biochemické a toxikologické analýzy [22].

Z výsledků prvního experimentu vyplývá, že subchronická inhalace nanočástic oxidu olovnatého má negativní účinky na buňky a tkáně. Akumulace nanočástic byla závislá na typu orgánu; nejmenší množství bylo v slezině a mozku. Největší množství NPs bylo v plicích a játrech. Patologické změny byly spojeny s množstvím nanočástic v buňkách; největší poškození bylo pozorováno v plicích a játrech. Nejvyšší obsah olova byl v plicích, poté v ledvinách, játrech, slezině a nejnižší – v mozku. Olovo bylo také přítomno v krvi; po 6 týdnech inhalace byla koncentrace Pb 132 ng/g. V kontrolní skupině byla koncentrace Pb pod detekčním limitem (11 ng/g) [21].

Ve druhém experimentu se obsah olova v tkáních postupně zvyšoval v závislosti na dávce a době expozice. V plicích a ledvinách se obsah Pb prudce zvýšil po 4 hodinách expozice, v játrech po 12 hodinách a v mozku po 72 hodinách inhalace. Stejně jako v prvním experimentu byla největší koncentrace olova v plicích a ledvinách, v játrech a mozku byla nižší, ale

kontinuálně se zvyšovala s dobou expozice. Poškození tkáně a morfologické změny byly zaznamenány zejména v plicích a játrech. V ledvinách a mozku byly pozorovány mírné patologické změny [22].

3 CÍLE PRÁCE

Cílem bakalářské práce je analýza vzorků plic a mozku pokusných myší po inhalaci nanočástic olova. K dílčím cílům řešené práce patří:

- Vývoj rozkladné metody pro mineralizaci biologických tkání
- Vývoj analytické metody pro stanovení olova pomocí ET-AAS
- Stanovení olova ve vzorcích orgánů experimentálních myší a vyhodnocení dat

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Seznam použitých chemikálií a certifikovaných referenčních materiálů

HNO₃ (>65% Suprapur, Pb < 5 µg/kg, Merck, Německo)

Certifikovaný referenční materiál NIST 1577b Bovine Liver – hovězí játra (Pb = 0,129 ± 0,004 mg/kg)

Certifikovaný referenční materiál BCR-397 Human Hair – lidské vlasy (Pb = 33 ± 1,2 mg/kg)

Certifikovaný referenční materiál ERM-CE278k Mussel tissue – slávka jedlá (Pb = 2,18 ± 0,18 mg/kg)

Deionizovaná voda

Palladiový modifikátor (Pd(NO₃)₂/HNO₃ ca. 15%, Pb < 10 µg/l, Merck, Německo)

Mg(NO₃)₂·6H₂O (99%, Pb < 5 µg/kg, Merck, Německo)

NH₄H₂PO₄ (99,99%, Pb < 5 µg/kg, Suprapur, Merck, Německo)

Standard olova (Pb = 1000 ± 4 mg/l ve 2% HNO₃, Sigma-Aldrich, Švýcarsko)

4.1.1 Příprava roztoku modifikátorů

Modifikátor matrice A: směs dihydrogenfosforečnanu amonného a hexahydrátu dusičnanu hořečnatého. Do 50 ml baňky bylo naváženo 25,9 mg Mg(NO₃)₂·6H₂O a 250 mg NH₄H₂PO₄ a obsah odměrné banky byl doplněn deionizovanou vodou.

Modifikátor matrice B: směs palladia a hexahydrátu dusičnanu hořečnatého. Do 50 ml baňky bylo naváženo 25,9 mg Mg(NO₃)₂·6H₂O spolu s 2,5 ml palladiového modifikátoru (Pd(NO₃)₂/HNO₃) a obsah odměrné banky byl doplněn deionizovanou vodou.

4.2 Seznam použitých pomůcek a přístrojů

Atomový absorpční spektrometr AAnalyst 600 (PerkinElmer, USA)

Atomový absorpční spektrometr AAnalyst 600 (Obrázek 2) je vybaven grafitovou pecí s příčným ohřevem pro elektrotermickou atomizaci. Atomizátor je tvořen grafitovou kyvetou s platformou s uzavřenými konci pro těkavé prvky (PerkinElmer, USA). Korekci pozadí zajišťuje elektromagnet s inverzním podélným Zeemanovým jevem. Jako zdroj záření pro stanovení olova byla použita výbojka s dutou katodou – Pb HCL (Lumina, PerkinElmer); proud na výbojce – 10 mA (maximálně 12 mA). Další parametry: testovaný propouštěný spektrální interval (štěrbina) – 0,2 a 0,7 nm, použité vlnové délky – 283,3 a 217 nm, testované objemy dávkování vzorku – 20 a 50 µl, testovaná doba integrace signálu (integrovaná absorbance) – 3 a 4 sekundy.



Obrázek 2: Atomový absorpční spektrometr AAAnalyst 600

Mineralizátor UltraWAVE (Milestone, Itálie)

UltraWAVE (Obrázek 3) je mikrovlnný vysokotlaký mineralizátor umožňující rozklad vzorků pro stopovou a ultrastopovou analýzu. Hlavní výhodou mineralizátoru je kombinace mikrovlnného ohřevu s vysokotlakým reaktorem s tlakovou inertní (N_2) náplní, která zamezuje jakékoli křížové kontaminaci mezi vzorky, či ztrátám těkavých analytů. Během rozkladu je možné dosáhnout extrémních hodnot tlaku (až 160 bar při rozkladu), což umožňuje rozklad vzorků s vysokým obsahem uhlíku. Proces přípravy vzorků mikrovlnným rozkladem je řízen dle pracovního programu, který lze vyvíjet v závislosti na matici vzorku [23].



Obrázek 3: Mineralizátor UltraWAVE

Čistící systém traceCLEAN, (Milestone, Itálie)

TraceCLEAN (Obrázek 4) zajišťuje efektivní čištění nádobí parami kyseliny dusičné. Nečistoty hromadící se v čistící kyselině zůstávají v zásobníku a nepřicházejí znovu do styku s vyčištěným náčiním [24].



Obrázek 4: Čistící systém traceCLEAN

Analytické váhy PI-314 (Denver Instrument, USA)

Automatické pipety s různým rozsahem objemu (Thermo Fisher Scientific, USA)

4.3 Popis inhalačního experimentu

Inhalační experiment probíhal na Ústavu analytické chemie Akademie Věd ČR, v.v.i.. Inhalační komora (Obrázek 5) byla zkonstruována ke studiu chronické expozice malých zvířat nanočásticím kovů za přísně kontrolovaných podmínek a je vyrobena ze skla a nerezové oceli. Umožňuje dlouhodobou inhalaci (24 hodin denně) čtyř samostatných skupin myší (každá skupina až 60 jedinců) nebo potkanů (každá skupina až 20 jedinců). V inhalační komoře je možné kontrolovat osvětlení, teplotu, relativní vlhkost, hmotnostní i početní koncentraci nanočástic [25].



Obrázek 5: Inhalační komora

Metoda přípravy PbO-NPs byla stejná jako v předchozí studii [26]. Nanočástice PbO byly kontinuálně generovány v trubicovém reaktoru pomocí techniky odpařování-oxidace-kondenzace. Malé množství olovněného drátu bylo umístěno do keramického kelímku, který byl vložen do keramické pracovní trubice vertikálně orientované pece. Roztavené olovo bylo odpařeno ve středu pece při teplotě 830 °C. Kovové páry kondenzovaly za vzniku nanočástic olova, které byly odváděny z pece proudem inertního plynu (dusíku) a zředěny proudem vzduchu, během kterého bylo olovo oxidováno na oxid olovnatý. Obě rychlosti průtoku byly nastaveny na 3 l/min. Výsledné PbO-NPs byly zředěny ve druhém kroku proudem vzduchu (20 l/min) a použity pro inhalační experimenty. Průměrná početní koncentrace částic ve vzduchu v inhalační komoře činila $1,42 \times 10^6$ částic/cm³, distribuce částic měla nejvyšší relativní četnost 32,6 nm a průměrná hmotnostní koncentrace PbO byla 73 µg/m³.

4.3.1 Seznam použitých vzorků

Celkem bylo v experimentu použito 140 laboratorních myší (samic). Pro potřeby chemické analýzy bylo odebráno 67 jedinců, přehled všech odebraných vzorků je v tabulce (Tabulka 1).

Tabulka 1: Popis odebraných vzorků

	Datum odběru					
	16.06.2020 (6 týdnů inhalace)	17.06.2020 (6 týdnů inhalace + 1 den)	19.06.2020 (6 týdnů inhalace + 3 dny)	23.06.2020 (6 týdnů inhalace + 7 dnů)	07.07.2020 (6 týdnů inhalace + 21 den)	
Označení vzorků	41/K/6T	51/K/1D	61/K/3D	71/K/7D	81/K/21D	Kontrolní skupina (bez expozice)
	42/K/6T	52/K/1D	62/K/3D	72/K/7D	82/K/21D	
	43/K/6T	53/K/1D	63/K/3D	73/K/7D	83/K/21D	
	44/K/6T	54/K/1D	64/K/3D	74/K/7D	84/K/21D	
		55/K/1D	65/K/3D	75/K/7D	85/K/21D	
	41/PbO/6T	51/PbO/1D	61/PbO/3D	71/PbO/7D	81/PbO/21D	Skupina inhalující po celou dobu experimentu
	42/PbO/6T	52/PbO/1D	62/PbO/3D	72/PbO/7D	82/PbO/21D	
	43/PbO/6T	53/PbO/1D	63/PbO/3D	73/PbO/7D	83/PbO/21D	
	44/PbO/6T	54/PbO/1D	64/PbO/3D	74/PbO/7D	84/PbO/21D	
			65/PbO/3D	75/PbO/7D	85/PbO/21D	
		1/PbOC/1D	11/PbOC/3D	21/PbOC/7D	31/PbOC/21D	Skupina inhalující po dobu 6 týdnů, odběr jedinců byl prováděn po různých obdobích detoxikace (1, 3, 7 a 21 den)
		2/PbOC/1D	12/PbOC/3D	22/PbOC/7D	32/PbOC/21D	
		3/PbOC/1D	13/PbOC/3D	23/PbOC/7D	33/PbOC/21D	
		4/PbOC/1D	14/PbOC/3D	24/PbOC/7D	34/PbOC/21D	
		5/PbOC/1D	15/PbOC/3D	25/PbOC/7D	35/PbOC/21D	

V rámci experimentu se sledovaly koncentrace v plicích, mozku, játrech, slezině, ledvinách, tlustém a slepém střevě, krvi, čelisti a stehenní kosti. Pro bakalářskou práci byly použity vzorky plic a mozků.

4.4 Pracovní postupy a metodika

4.4.1 Čistota práce

Při práci v laboratoři byla velká pozornost věnována čistotě práce. Ve stopové analýze kovů může i malé množství nečistot významně ovlivnit konečný výsledek. Zpracování vzorků i vlastní analýza byla provedena v čisté laboratoři, která je vybavena účinnou filtrací vzduchu (HEPA filtry) i čistými boxy. Všechny použité chemikálie byly v čistotě pro stopovou analýzu; pro přípravu roztoků byla použita vysoce čistá deionizovaná voda. Dekontaminace mineralizačních zkumavek byla zajištěna vysoce účinným čisticím systémem traceCLEAN. Po umístění nádobí do přístroje a spuštění programu se v dolním zásobníku zahřeje kyselina

dusičná, její čisté páry proudí nahoru skleněnými trubicemi (na kterých je nasazeno čištěné nádobí). Kyselina poté kondenzuje na zkumavkách, což umožňuje odstranění stopových nečistot z povrchu. Veškeré kontaminanty zůstávají v spodním zásobníku [24]. Po ochlazení je povrch nádobí vždy důkladně opláchnut deionizovanou vodou a vysušen v čistém boxu pod laminárním proudem čistého vzduchu. Pro důkladné vyčištění je vhodné použít dekontaminaci v parách HNO₃ po dobu nejméně 5 hodin.

4.4.2 Mineralizace vzorků

Před vlastním rozkladem byly vzorky plic a mozků zváženy na analytických vahách, přeneseny do křemenných zkumavek a do každé bylo napipetováno 3 ml kyseliny dusičné. Roztoky byly mineralizovány v mikrovlnném mineralizátoru UltraWAVE. Rozklad byl proveden podle teplotního programu optimalizovaného pro biologické matrice, který je uveden v tabulce (Tabulka 2). Počáteční tlak inertní atmosféry reaktoru činil 40 bar.

Tabulka 2: Teplotní program mineralizace pro biologické matrice

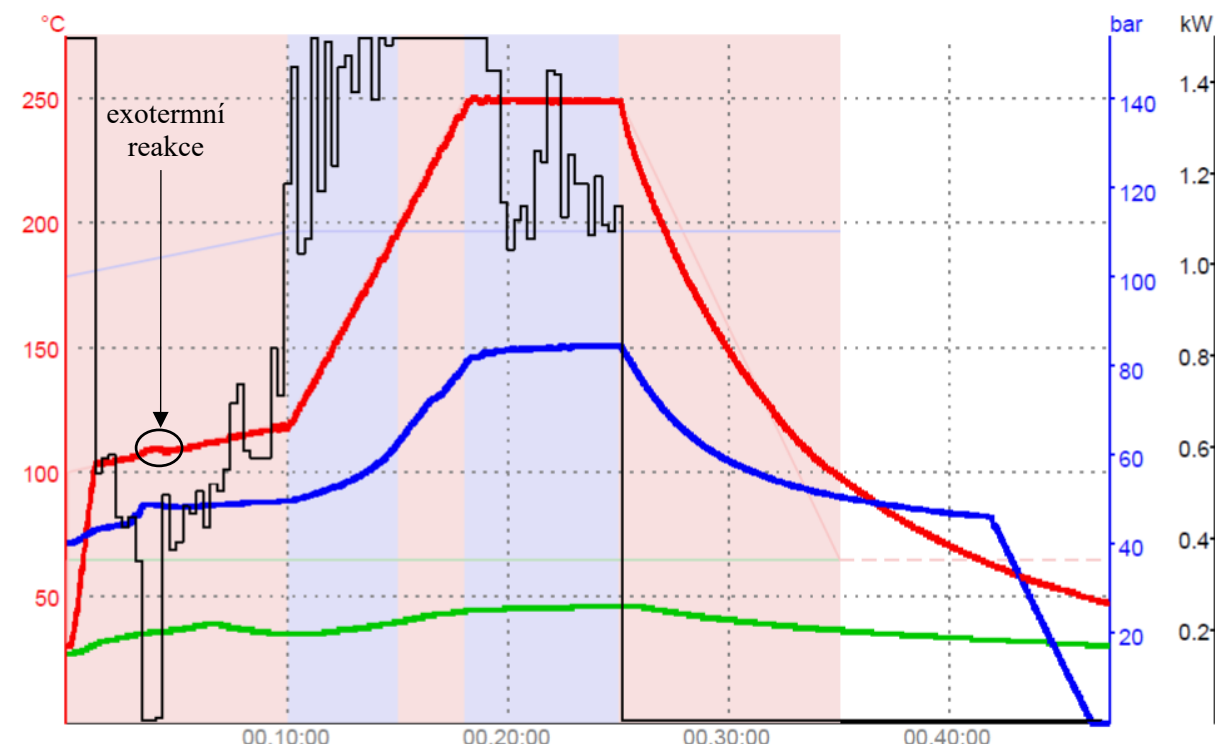
Krok	Čas [min]	Teplota mineralizace [°C]
1	0,03	100
2	10	120
3	15	200
4	18	250
5	25	250
6	35	65

Po dokončení rozkladu vzorků byl každý mineralizát kvantitativně převeden spolu se 7 ml deionizované vody do scintilačních vialek (HDPE). Spolu se vzorky orgánů byla připravena sada certifikovaných referenčních materiálů (9 vzorků) a blanků (13 vzorků). Navážky CRM jsou uvedené v tabulce (Tabulka 3):

Tabulka 3: Navážky certifikovaných referenčních materiálů

Název CRM	Průměrná navážka [mg]
NIST 1577b Bovine Liver	501,7
BCR-397 Human Hair	107,6
ERM-CE278k Mussel tissue	213,1

Průběh rozkladu CRM 1577b Bovine Liver, na kterém je patrná exotermní reakce rozkladu organické matrice, je uveden na obrázku (Obrázek 6). CRM 1577b Bovine Liver byl po expiraci (20 let), z toho důvodu neodpovídal stanovený obsah Pb certifikovanému obsahu a nadále byly používány ostatní certifikované referenční materiály.



Obrázek 6: Průběh rozkladu CRM 1577b Bovine Liver

4.4.3 Vývoj a testování parametrů analytické metody pro stanovení Pb ET-AAS

Před stanovením obsahu olova ve vzorcích plic a mozků atomovou absorpční spektrometrií s elektrotermickou atomizací (ET-AAS) byly provedeny optimalizační experimenty s různými modifikátory matrice – $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ a $\text{Pd}/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, pro optimalizaci vhodné pyrolýzní a atomizační teploty. Dále bylo testováno vhodné množství modifikátoru. Ke stanovení Pb byly v této práci použity dvě vlnové délky – 283,3 nm a 217 nm. Každý vzorek byl stanoven paralelně třikrát. Vyhodnocení signálu bylo prováděno podle plochy píku (integrované absorbance).

Pro vývoj analytické metody bylo do atomizátoru dávkováno 20 μl vzorku, objem modifikátoru byl 10 μl . Vývoj teplotního programu atomizátoru byl proveden při vlnové délce 283,3 nm. Měření pyrolýzní a atomizační křivky bylo provedeno pro vodný roztok standardu olova (ředěním zásobního roztoku olova o koncentraci 1 mg/l) za použití $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ modifikátoru matrice (modifikátor A). Pyrolýzní křivka byla měřena při teplotách 600–1000 °C a atomizační teplotě 1600 °C, která je doporučena výrobcem (Perkin Elmer) pro stanovení Pb. Následným měřením atomizační křivky (pro teploty 1100–1500 °C) při optimalizované pyrolýzní teplotě byla zjištěna vhodná atomizační teplota. Bylo testováno dávkování 1, 5 a 10 μl fosforečnanového modifikátoru matrice (modifikátor A) při teplotě pyrolýzy 800 °C, za teploty atomizace 1300 °C.

Obdobný postup optimalizace byl zvolen při použití palladiového modifikátoru matrice (modifikátor B). Základní teploty doporučené v literatuře byly 1200 °C (pyrolýza) a 2000 °C (atomizace) [27]. Měření křivek bylo provedeno s vodným roztokem standardu olova při

atomizační teplotě 2000 °C v rozsahu 700–1200 °C. Atomizační křivka byla měřená pro teploty od 1600 do 2100 °C. Bylo testováno dávkování 1, 5 a 10 µl palladiového modifikátoru (modifikátor B) při teplotě pyrolýzy 800 °C a teploty atomizace 1900 °C.

Pro další experimenty byl vždy použit výhradně fosforečnanový modifikátor matrice (modifikátor A). Doba atomizace a integrace signálu byla zvýšena z 3 s na 4 s. Dalším testovaným parametrem bylo dávkování různého množství vzorku: 20 a 50 µl. Při dalších měření bylo do grafitové květy vždy dávkováno 50 µl vzorku.

Pro ověření optimalizovaných parametrů analytické metody (teplotní program a modifikátor matrice) byla změřena kalibrace s vodným roztokem standardu olova pro koncentrace olova 0; 12,5; 25; 37,5 a 50 µg/l, s následnou analýzou mineralizátů certifikovaného referenčního materiálu BCR-397 Human Hair.

Následujícím krokem optimalizace byla změna vlnové délky na 217 nm (primární čára), protože citlivost sekundární čáry (283,3 nm) je nižší (42 % primární absorpční čáry). Měření při 217 nm ovšem může zvyšovat interference a šum [28]. Při vlnové délce 217 nm byla naměřena kalibrační přímka s vodným roztokem standardu olova pro koncentraci olova 0; 12,5; 25; 37,5 a 50 µg/l (byly testovány dvě šířky štěrbin – 0,2 a 0,7 nm). Pro ověření správnosti měření byl stanoven obsah v certifikovaném referenčním materiálu BCR 397.

Jelikož citlivost olova při vlnové délce 217 nm byla vyšší než při vlnové délce doporučené výrobcem (283,3 nm), měření certifikovaných referenčních materiálů bylo provedeno při obou vlnových délkách pro ověření shody výsledků. Pro kalibraci při 283,3 nm byly připraveny vodné roztoky standardu olova 0; 5; 10; 15 a 20 µg/l.

Pro kalibrace při 217 nm byly připraveny vodné roztoky standardu olova o koncentraci 0; 1,25; 2,5; 3,75 a 5 µg/l. Roztoky certifikovaných referenčních materiálů byly ředěny do rozsahu kalibrační přímky. Pro stanovení rozsahu linearitu měření byly připraveny a změřeny vodné roztoky standardu olova (6,25; 7,5; 8,75; 10; 11,25; 12,5; 13,75; 15; 16,25; 17,5; 18,75 a 20 µg/l).

4.5 Stanovení Pb ve vzorcích orgánů

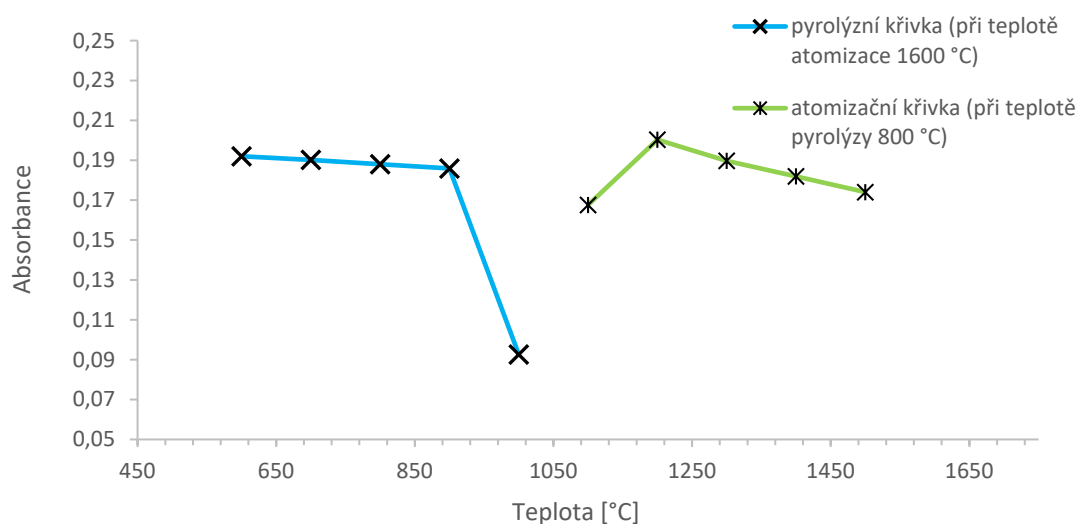
Pro analýzu orgánů byla zvolena vlnová délka 217 nm za použití optimalizovaného teplotního programu s fosforečnanovým modifikátorem matrice (modifikátor A). Analyzováno bylo celkem 134 vzorků orgánů, z toho 67 vzorků plic a 67 vzorků mozku, spolu s roztoky blanků (postup mineralizace je uvedený v kapitole 4.4.2).

Nejprve byly měřeny vzorky blanků a mozků, a to jako neředěné mineralizáty. Byla zvolena externí kalibrace s přizpůsobenou maticí. K mineralizátům kontrolních myší byl přidán standard Pb a výsledné koncentraci olova byly 0; 1,25; 2,5; 3,75 a 5 µg/l. Pro každý vzorek byly provedeny tři paralelní stanovení. Poté byla provedena analýza vzorků plic. Externí kalibrace byla provedena stejným způsobem přidáním standardu olova ke vzorkům plic kontrolních myší v rozsahu koncentrací 0; 2,5; 3,75 a 5 µg/l. Pro stanovení Pb v mineralizátech plic byly vzorky dvakrát zředěny deionizovanou vodou. Pro každý vzorek byly provedeny tři paralelní stanovení.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Optimalizace parametrů analytické metody

Pro měření pyrolýzních a atomizačních křivek byl použit postup uvedený v kapitole 4.4.3. Nejprve byla změřena pyrolýzní a atomizační křivka při 283,3 nm s fosforečnanovým modifikátorem (modifikátor A) a vodným roztokem standardu olova, které jsou zobrazeny v grafu (Obrázek 7). Zlom pyrolýzní křivky byl při 900 °C, pyrolýzní teplota byla zvolena o 100 °C níže – 800 °C. Dalším měřením atomizační křivky při stanovené pyrolýzní teplotě 800 °C bylo dosaženo maxima atomizační křivky při 1200 °C, výsledná atomizační teplota byla zvolena o 100 °C výše – 1300 °C. Změna množství modifikátoru matrice neměla významný vliv na hodnotu absorpance Pb, z toho důvodu bylo ponecháno množství modifikátoru matrice na 10 µl, podle doporučení výrobce. Optimalizovaný teplotní program pro fosforečnanový modifikátor (modifikátor A) je znázorněn v tabulce (Tabulka 4). Skládá se celkem z 5 kroků, během prvního a druhého proběhlo sušení vzorku, třetím krokem byla pyrolýza, čtvrtým byla atomizace a posledním čištění grafitové kyvety.

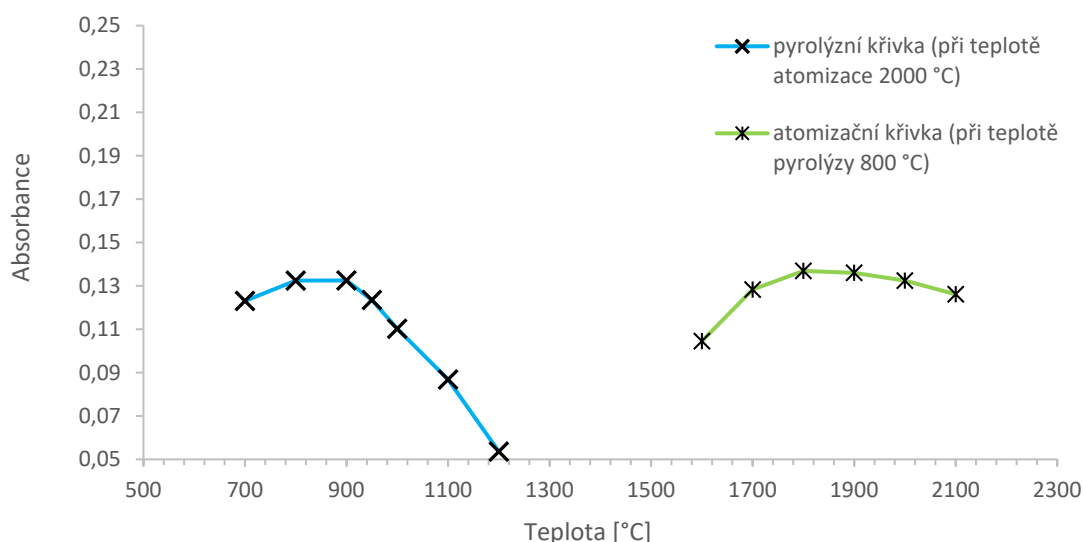


Obrázek 7: Pyrolýzní a atomizační křivka při 283,3 nm s fosforečnanovým modifikátorem A a vodným roztokem standardu olova

Tabulka 4: Teplotní program atomizátoru pro fosforečnanový modifikátor

Krok	Teplota [°C]	Nárůst [°C/s]	Trvání [s]	Vnitřní tok argonu [ml/min]
1	110	1	30	250
2	130	15	30	250
3	800	20	20	250
4	1300	0	3	0
5	2450	1	2	250

Měření pyrolýzní i atomizační křivky při 283,3 nm s palladiovým modifikátorem B (vodný roztok standardu olova) je zobrazeno v grafu (Obrázek 8). Pyrolýzní křivka byla měřena při atomizační teplotě 2000 °C a měla zlom na 900 °C. Teplota pyrolýzy byla zvolena na 800 °C. Na základě atomizační křivky s maximem při 1800 °C byla zvolena atomizační teplota 1900 °C. Za testovaného dávkování 1, 5 a 10 µl palladiového modifikátoru matrice se citlivost významně neměnila. Konečné dávkované množství modifikátoru matrice bylo 10 µl. Výsledný optimalizovaný teplotní program pro palladiový modifikátor je uveden v tabulce (Tabulka 5).

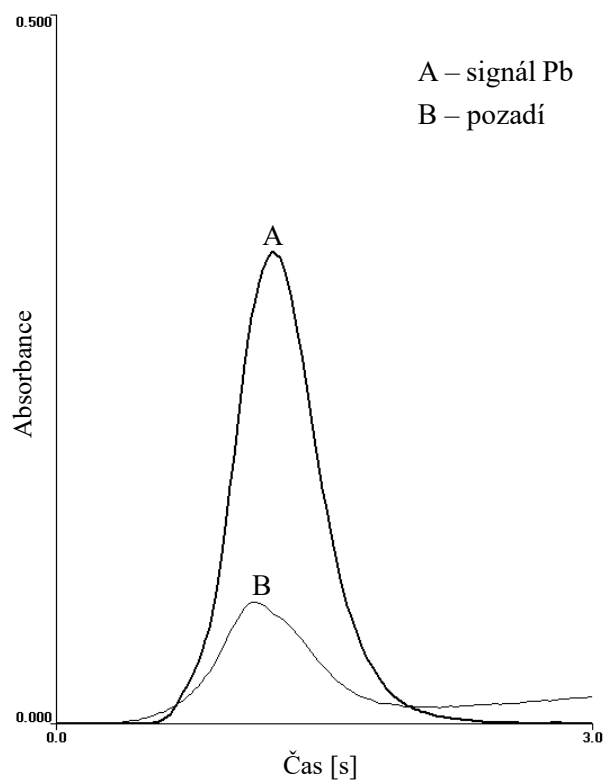


Obrázek 8: Pyrolýzní a atomizační křivka při 283,3 nm s palladiovým modifikátorem B a vodným roztokem standardu olova

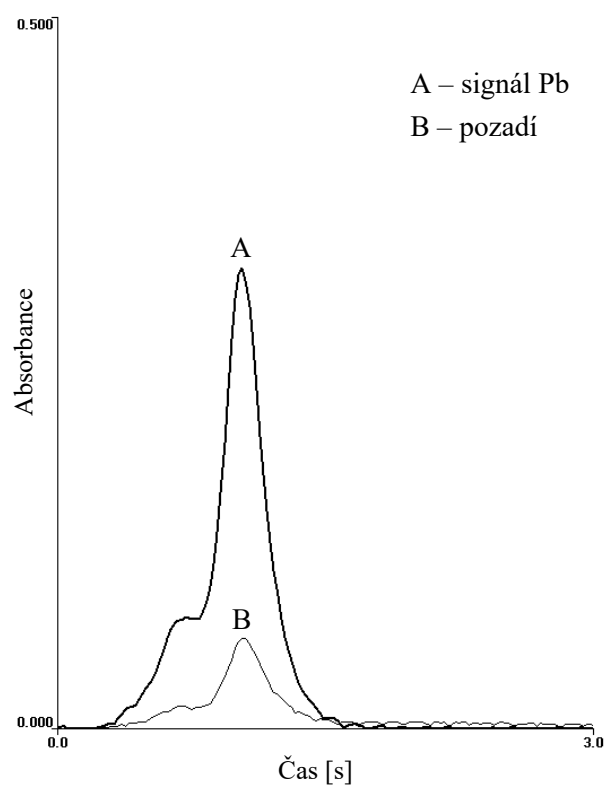
Tabulka 5: Teplotní program atomizátoru pro palladiový modifikátor

Krok	Teplota [°C]	Nárůst [°C/s]	Trvání [s]	Vnitřní tok argonu [ml/min]
1	110	1	30	250
2	130	15	30	250
3	800	20	20	250
4	1900	0	3	0
5	2450	1	2	250

Porovnáním průběhu signálu na čase při použití fosforečnanového (Obrázek 9) a palladiového modifikátoru (Obrázek 10) je zřejmé, že pík měřený za použití fosforečnanového modifikátoru má gaussovský tvar; za použití palladiového modifikátoru docházelo k nežádoucímu štěpení píku (každý z píku na Obrázek 9 a Obrázek 10 odpovídá 2 ng olova v absolutním množství).

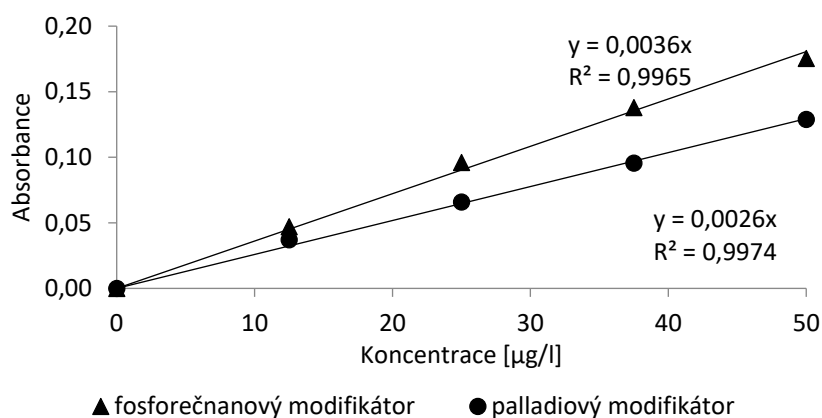


Obrázek 9: Závislost absorbance na čase při použití fosforečnanového modifikátoru A ($\lambda = 283,3 \text{ nm}$)



Obrázek 10: Závislost absorbance na čase při použití palladiového modifikátoru B ($\lambda = 283,3 \text{ nm}$)

Naměřené kalibrační přímky pro modifikátory matrice jsou v grafu (Obrázek 11). Při shodných koncentracích olova je vidět, že absorbance při měření s fosforečnanovým modifikátorem je vyšší než při přidavku palladiového modifikátoru.



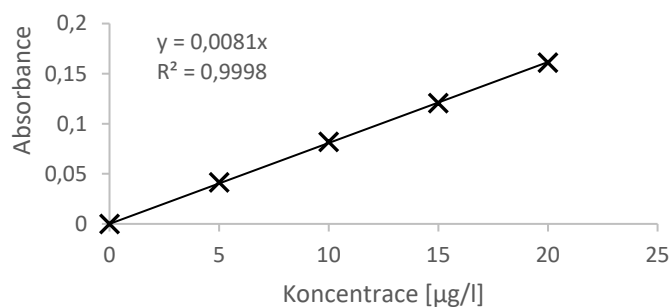
Obrázek 11: Kalibrační přímky modifikátorů matrice

Pro optimalizovaný teplotní program za použití fosforečnanového modifikátoru (modifikátor A) může dojít při vyšších hodnotách absorbancí k rozšíření píku, doba atomizace tak byla prodloužena na 4 s. Konečný teplotní program je znázorněn v tabulce (Tabulka 6).

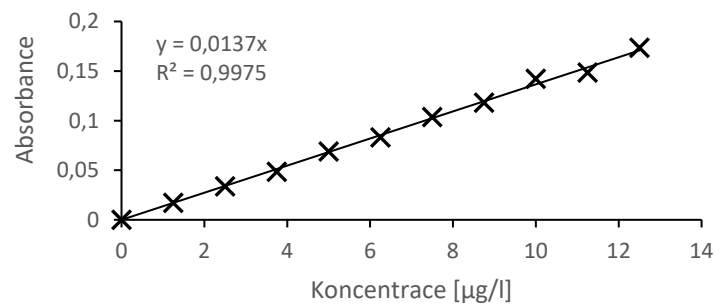
Tabulka 6: Konečný teplotní program pro fosforečnanový modifikátor A

Krok	Teplota [°C]	Nárůst [°C/s]	Trvání [s]	Vnitřní tok argonu [ml/min]
1	110	1	30	250
2	130	15	30	250
3	800	20	20	250
4	1300	0	4	0
5	2450	1	2	250

Vzhledem k vyšší citlivosti stanovení Pb při vlnové délce 217 nm (Obrázek 14) bylo provedeno stanovení olova v certifikovaných referenčních materiálech BCR-397 Human Hair a ERM-CE278k Mussel tissue při obou vlnových délkách (kalibrační přímky na Obrázek 12 a Obrázek 13, výsledky stanovení v Tabulka 7). Pík na obrázku (Obrázek 14) odpovídá 1 ng Pb.



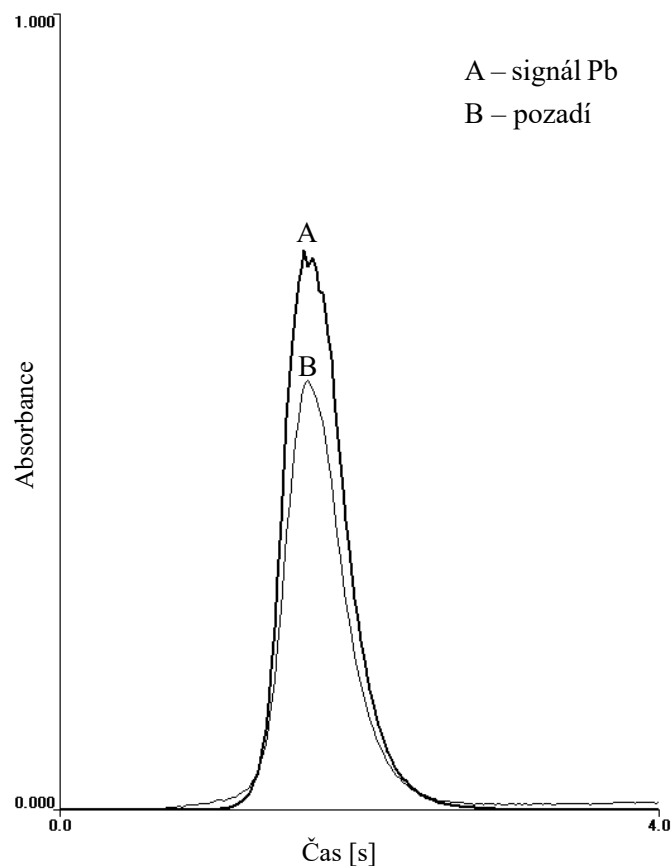
Obrázek 12: Kalibrační přímka při 283,3 nm



Obrázek 13: Kalibrační přímka při 217 nm

Tabulka 7: Stanovený obsah olova v certifikovaných referenčních materiálech

Název CRM	283,3 nm		217 nm	
	Obsah Pb [mg/kg]	SD [mg/kg]	Obsah Pb [mg/kg]	SD [mg/kg]
BCR-397 Human Hair	32	1,2	32	0,8
ERM-CE278k Mussel tissue	2,07	0,04	2,12	0,05



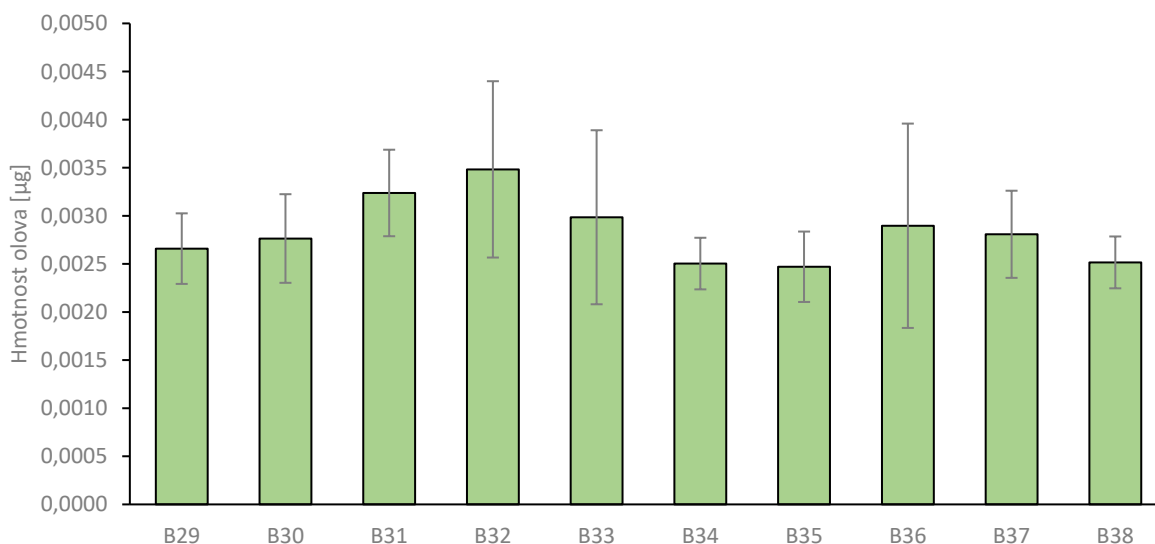
Obrázek 14: Závislost absorbance na čase při použití fosforečnanového modifikátoru A ($\lambda = 217$ nm)

Stanovení olova v certifikovaných materiálech BCR-397 Human Hair a ERM-CE278k Mussel tissue při obou vlnových délkách mělo dostatečnou shodu s certifikovanými obsahy (na základě jednovýběrového oboustranného t-testu, nebyl pozorován významný rozdíl mezi certifikovanými a naměřenými hodnotami na hladině významnosti $p = 0,05$). Stanovení olova vyvinutou analytickou metodou tedy umožňuje správné stanovení Pb při vlnové délce 217 nm pro stanovení stopových koncentrací ve vzorku.

Pro vyvinutý postup analýzy byl dále testován rozsah linearitu prodloužením kalibrační přímky při 217 nm. Kalibrační přímka měla lineární oblast do koncentrace 12,5 $\mu\text{g/l}$ (Obrázek 13); dalším zvyšováním koncentrace bylo pozorováno zakřivení přímky.

5.2 Stanovení Pb ve vzorcích

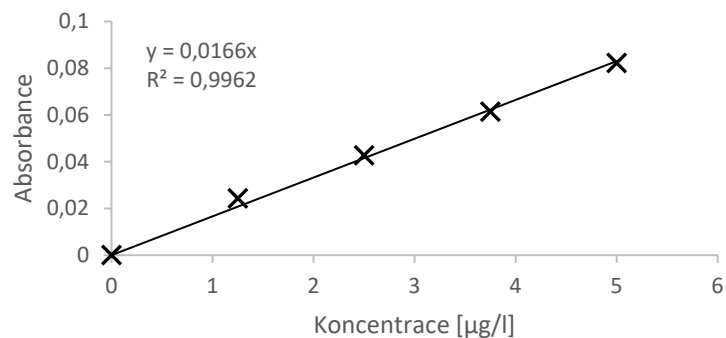
Před vlastním stanovením obsahu olova ve vzorcích orgánů byly měřeny slepé vzorky (blanky zahrnující všechny kroky analýzy); výsledky jsou znázorněny v grafu (Obrázek 15). Průměrná hodnota blanku činila 2,8 ng Pb.



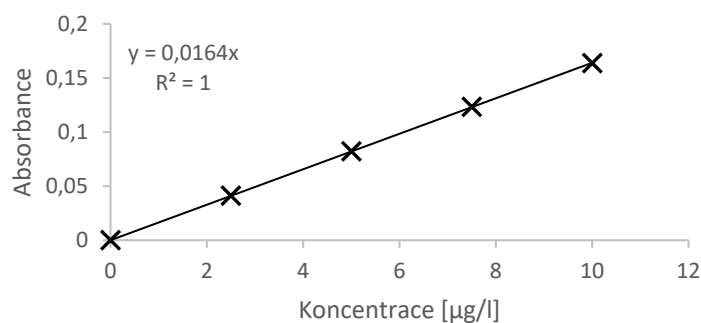
Obrázek 15: Hmotnost olova ve slepých vzorcích

Ze zjištěných hodnot směrodatné odchylky (SD) obsahu olova ve slepých vzorcích byly vypočteny limity detekce a stanovitelnosti pro vzorky mozků a plic. Limit detekce (LOD) a limit stanovitelnosti (LOQ) byl vypočítán jako trojnásobek, resp. desetinásobek, SD blanků. Limity byly vztaženy na průměrnou hmotnost všech vzorků mozků a plic. Výsledný LOD pro vzorky mozků činil 0,0038 mg/kg a LOQ byl 0,0125 mg/kg; pro vzorky plic byl výsledný LOD 0,0153 mg/kg a LOQ činil 0,0509 mg/kg.

Pro stanovení obsahu olova v orgánech byly měřeny kalibrační přímky (pro vzorky mozků Obrázek 16 a pro vzorky plic Obrázek 17). Stanovený obsah olova ve vzorcích mozků a plic je uveden ve grafech (Obrázek 18 a Obrázek 19). Grafy byly sestaveny bez kontrolních skupin myší, protože všechny vzorky kontrolních myší (skupina bez inhalace) měly obsah olova pod limitem detekce.



Obrázek 16: Kalibrační přímka pro vzorky mozků



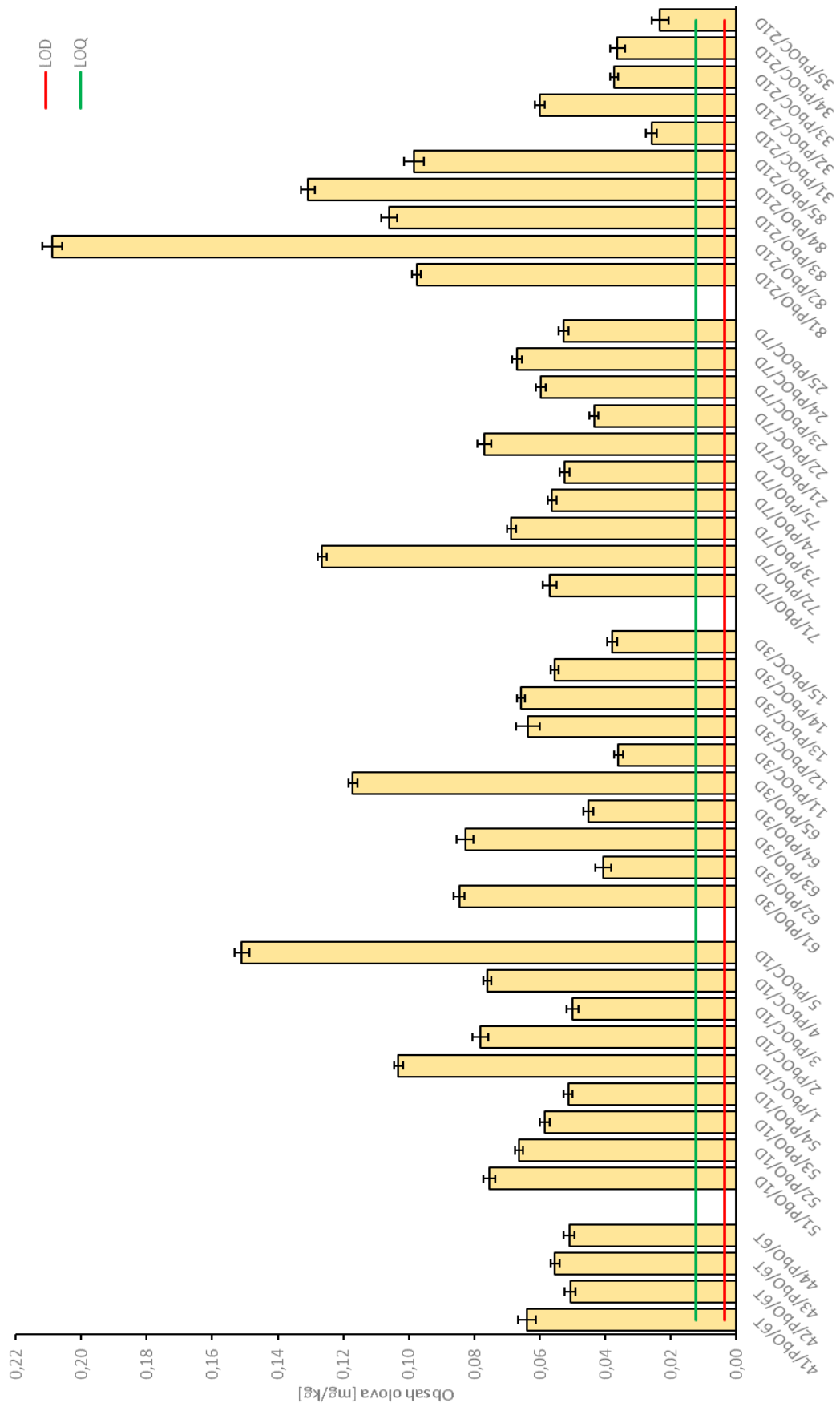
Obrázek 17: Kalibrační přímka pro vzorky plic

Ve vzorcích plic 31/PbOC/21D a 35/PbOC/21D skupiny z 21denní detoxikaci po 6 týdnech inhalace byl obsah olova také pod limitem detekce. Rozdíly v obsazích olova v rámci stejné skupiny inhalujících myší či stejné skupiny myší v detoxikačním režimu jsou pravděpodobně způsobeny biologickou variabilitou jedinců.

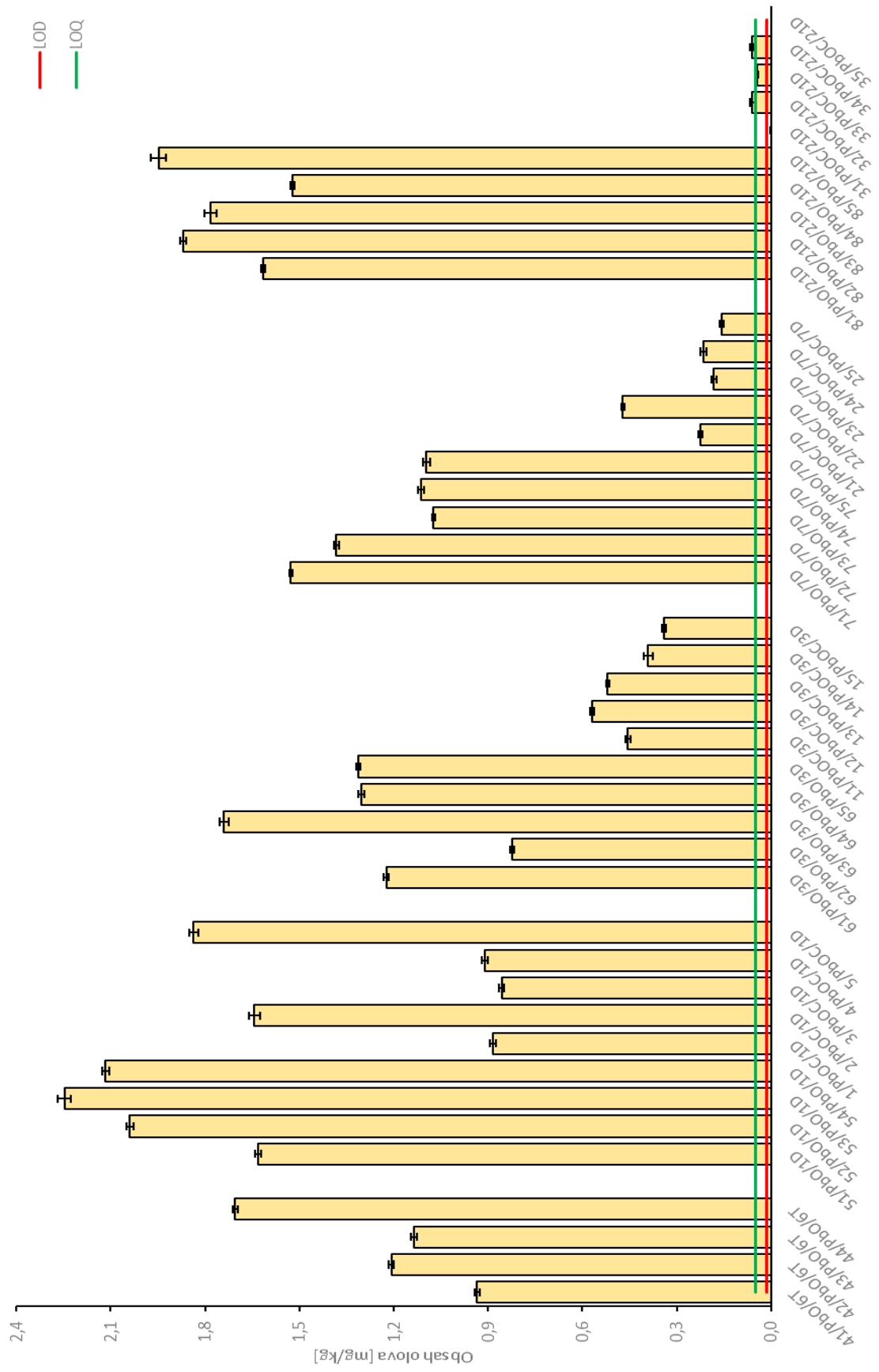
Průměrné obsahy Pb v mozcích i plicích jednotlivých skupin jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 8). Při výpočtu průměrných hodnot byly vyloučeny ty, které byly pod detekčním limitem. Ve vzorcích mozků se obsah Pb postupně zvyšoval od skupiny, která inhalovala nanočástice po dobu 6 týdnů, a byl nejvyšší ve skupině myší, která byla vystavena nanočásticím olova po dobu 6 týdnů a 21 dnů. V průběhu detoxikace byl nejnižší obsah olova ve skupině po 21denní detoxikaci po 6 týdnech inhalace, zatímco nejvyšší byl v jednodenní detoxikační skupině po 6 týdnech inhalace. Kontaminace olovem je evidentní ve vzorcích plic při pokračující době inhalace. U skupin podstupujících detoxikaci po 6 týdnech inhalace docházelo k postupnému snížení množství olova v plicích se zvyšující se detoxikační dobou.

Tabulka 8: Průměrné obsahy olova jednotlivých skupin

Orgán	Doba	Obsah olova [mg/kg]		
		Kontrolní skupina bez expozice Pb	Skupina inhalující po celou dobu	Skupina s různými obdobími detoxikace po 6 týdnech inhalace
Mozek	6 týdnů	< LOD	0,0553 ± 0,0053	–
	6 týdnů + 1 den		0,0629 ± 0,0091	0,0920 ± 0,0340
	6 týdnů + 3 dny		0,0740 ± 0,0280	0,0520 ± 0,0130
	6 týdnů + 7 dnů		0,0720 ± 0,0280	0,0600 ± 0,0120
	6 týdnů + 21 den		0,1280 ± 0,0420	0,0370 ± 0,0130
Plíce	6 týdnů	< LOD	1,2500 ± 0,2800	–
	6 týdnů + 1 den		2,0100 ± 0,2300	1,2300 ± 0,4200
	6 týdnů + 3 dny		1,2800 ± 0,2900	0,4560 ± 0,0830
	6 týdnů + 7 dnů		1,2400 ± 0,1800	0,2500 ± 0,1100
	6 týdnů + 21 den		1,7500 ± 0,1600	0,0553 ± 0,0069



Obrázek 18: Obsah olova ve vzorcích mozků



Obrázek 19: Obsah olova ve vzorcích plic

6 ZÁVĚR

Hlavním úkolem této bakalářské práce byl vývoj analytické metody pro stanovení obsahu olova ve vzorcích plic a mozků po inhalaci nanočástic. Pokusné myši byly rozděleny do 3 skupin: kontrolní bez expozice nanočásticím, skupina inhalující v průběhu celého experimentu a skupina s různou dobou detoxikace po 6 týdnech inhalace. Detoxikační období byly 1, 3, 7 a 21 dní. Pro chemickou analýzu byly odebrány orgány 67 jedinců. Průměrná hmotnostní koncentrace PbO v inhalační komoře činila $73 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

Navrženým teplotním programem mikrovlnného mineralizátoru byly mineralizovány vzorky plic, mozků, certifikovaných referenčních materiálů za současné kontroly obsahu analytu ve slepých vzorcích. Dále byl optimalizován teplotní program pro ET-AAS včetně hlavních parametrů analytické metody. Měření vzorků orgánů bylo provedeno vyvinutým postupem při vlnové délce 217 nm s fosforečnanovým modifikátorem matrice ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4/\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$). Stanovení olova vyvinutou metodou bylo ověřeno analýzou dvou certifikovaných referenčních materiálů – ERM-CE278k Mussel tissue a BCR-397 Human Hair. Výsledný limit detekce (LOD) a stanovitelnosti (LOQ) pro vzorky mozků činil $0,0038 \text{ mg}/\text{kg}$, respektive $0,0125 \text{ mg}/\text{kg}$; pro vzorky plic byl výsledný LOD $0,0153 \text{ mg}/\text{kg}$, LOQ činil $0,0509 \text{ mg}/\text{kg}$.

Výsledky analýzy vzorků ukázaly, že kontrolní skupiny myši měly obsah olova pod limitem detekce, což potvrzuje absenci kontaminace olovem během inhalačního experimentu i následné chemické analýzy. U exponovaných jedinců byla zaznamenána značná intoxikace olovem během inhalačního experimentu. Ve vzorcích mozků se průměrný obsah Pb během inhalace postupně zvyšoval od $0,0553 \text{ mg}/\text{kg}$ do $0,1280 \text{ mg}/\text{kg}$. V průběhu detoxikace docházelo k poklesu obsahu olova z $0,092 \text{ mg}/\text{kg}$ na $0,037 \text{ mg}/\text{kg}$. Průměrný obsah Pb ve vzorcích plic dosáhl nejvyšších hodnot po 6 týdňů a 1denní inhalaci – $2,01 \text{ mg}/\text{kg}$, nejnižších hodnot po 6 týdňů a 7denní inhalaci – $1,24 \text{ mg}/\text{kg}$. U detoxikačních skupin se průměrný obsah olova snížil z $1,2300 \text{ mg}/\text{kg}$ na $0,0553 \text{ mg}/\text{kg}$. V rámci provedeného experimentu byl tedy potvrzen efektivní detoxikační mechanismus u laboratorních myši, které byly vystaveny vysokým koncentracím nanočástic olova po dobu mnoha týdnů. Míra schopnosti detoxikace bude pravděpodobně také závislá na biologické variabilitě jedinců.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] COLBECK, Ian. *Environmental chemistry of aerosols*. Oxford: Blackwell Publishing, 2008. ISBN 978-1-4051-3919-9.
- [2] MIKUŠKA, Pavel. *Atmosférické aerosoly* [online]. Brno: Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i., 2015 [cit. 2020-5-26]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1431/podzim2015/C5150/um/Mikuska.pdf>
- [3] HINDS, William C. *Aerosol technology: properties, behavior, and measurement of airborne particles*. 2nd ed. New York: John Wiley, 1999. s.53. ISBN 0-471-19410-7.
- [4] FALCON-RODRIGUEZ, Carlos I, Alvaro ROSORNIO-VARGAS, Isabel SADA-OVALLE, Patricia SEGURA-MEDINA a Carlos I FALCON-RODRIGUEZ. *Aeroparticles, Composition, and Lung Diseases. Frontiers in immunology* [online]. 2016, 7, 3-3 [cit. 2020-5-26]. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00003. ISSN 1664-3224. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/1762343888/>
- [5] OBERDORSTER, Gunter, Eva OBERDORSTER a Jan OBERDORSTER. *Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. Environmental health perspectives* [online]. United States: National Institute of Environmental Health Sciences. National Institutes of Health. Department of Health, Education and Welfare, 2005, 113(7), 823-839 [cit. 2020-5-27]. ISSN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.7339
- [6] Český hydrometeorologický ústav. *Limity_CZ* [online]. [cit. 2020-5-28]. Dostupné z: http://portal.chmi.cz/files/portal/docs/uoco/isko/tab_roc/2015_enh/pdf/limity_CZ.pdf
- [7] GRANDJEAN, Philippe. *Even low-dose lead exposure is hazardous. The Lancet (British edition)* [online]. England: Elsevier, 2010, 376(9744), 855-856 [cit. 2020-5-28]. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60745-3. ISSN 0140-6736. Dostupné z: <https://www.sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0140673610607453>
- [8] PATRICK, Lyn. *Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. Alternative medicine review* [online]. United States, 2006, 11(1), 2-22 [cit. 2020-5-30]. ISSN 1089-5159. Dostupné z: <http://web.a.ebscohost.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/ehost/detail/detail?vid=0&sid=4666708a-d1fb-4599-8bb3-de0fb3fcc792%40sessionmgr4006&bdata=Jmxhbmc9Y3Mmc210ZT1laG9zdC1saXZl#AN=106462677&db=a9h>
- [9] BENCKO, Vladimír, Jaroslav LENER a Miroslav CIKRT. *Toxické kovy v životním a pracovním prostředí člověka*. 2. přepracované a doplněné vyd., v Grada Publishing 1. vyd. Praha: Grada, 1995. ISBN 80-7169-150-X.
- [10] KEIL, Deborah E, Jennifer BERGER-RITCHIE a Gwendolyn A MCMILLIN. *Testing for Toxic Elements: A Focus on Arsenic, Cadmium, Lead, and Mercury. Laboratory medicine* [online]. Chicago: Oxford University Press, 2011, 42(12), 735-742 [cit. 2020-5-30]. DOI: 10.1309/LMYKGU05BEPE7IAW. ISSN 00075027. Dostupné z: <http://search.proquest.com/docview/928084202/>

- [11] IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. Inorganic and organic lead compounds (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans). *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans* [online]. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2006, **87**, 1-471 [cit. 2020-5-30]. ISSN 1017-1606. ISBN 978-92-832-1587-5. Dostupné z: <https://publications.iarc.fr/105>
- [12] *Lead*. World Health Organization: obtainable from Q Corporation, [Albany, N.Y.: obtainable from Q Corporation], 1977. ISBN 924154063x.
- [13] MCNAUGHT, Alan D. a Andrew WILKINSON. *Compendium of chemical terminology: IUPAC recommendations*. 2nd ed. Malden, MA, USA: Blackwell Science, 1997. ISBN 0865426848.
- [14] COUFALÍK, Pavel. *Stopová analýza kovů*. Brno: Akademie věd České republiky, Ústav analytické chemie, v.v.i., 2019. ISBN 978-80-904959-8-2.
- [15] JELÍNEK, Emil. *Moderní a analytické metody v geologii* [online]. Praha, 2008 [cit. 2020-5-30]. Dostupné z: <https://old.vscht.cz/anl/paci/PAC/prezentace/Moderni%20analyticke%20metody%20v%20geologii.pdf>
- [16] LEMOS, Valfredo Azevedo a Anaildes Lago DE CARVALHO. Determination of cadmium and lead in human biological samples by spectrometric techniques: a review. In: *Environmental monitoring and assessment* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2010, **171**(1), 255-265 [cit. 2020-5-31]. ISSN 0167-6369. Dostupné z: <https://search.proquest.com/docview/807434434?OpenUrlRefId=info:xri/sid:primo&accountid=17115>
- [17] KOMÁREK, Josef. *Atomová absorpční spektrometrie*. Brno: Masarykova univerzita, 2000. ISBN 80-210-2500-x.
- [18] ČERNOHORSKÝ, Tomáš. *Modifikátory matrice* [online]. Pardubice: Univerzita Pardubice, Ústav ochrany životního prostředí [cit. 2020-5-30]. Dostupné z: <http://www.sparspec.cz/data/storage/files/aas-modifikatory/jak-funguji-modifikatory-matrice.pdf>
- [19] KORN, Maria das Graças A, Jailson B DE ANDRADE, Djane S DE JESUS, et al. Separation and preconcentration procedures for the determination of lead using spectrometric techniques: A review. *Talanta (Oxford)* [online]. Amsterdam: Elsevier B.V, 2006, **69**(1), 16-24 [cit. 2020-5-31]. DOI: 10.1016/j.talanta.2005.10.043. ISSN 0039-9140. Dostupné z: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0039914005007290>
- [20] BENCs, László, Nikolettá LACZAI a Zsolt AJTONY. Model calculation of the characteristic mass for convective and diffusive vapor transport in graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* [online]. Elsevier B.V, 2015, **109**, 52-59 [cit. 2020-5-31]. DOI: 10.1016/j.sab.2015.05.001. ISSN 0584-8547. Dostupné z: <https://www-sciencedirect-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/science/article/pii/S0584854715001238?via%3Dihub>

- [21] DUMKOVÁ, J, T SMUTNÁ, L VRLÍKOVÁ, et al. Sub-chronic inhalation of lead oxide nanoparticles revealed their broad distribution and tissue-specific subcellular localization in target organs. *Particle and Fibre Toxicology* [online]. BioMed Central, 2017, **14**(1) [cit. 2020-5-31]. DOI: 10.1186/s12989-017-0236-y. ISSN 1743-8977. Dostupné z: <https://link.springer.com/article/10.1186/s12989-017-0236-y>
- [22] LEBEDOVÁ, J., Z. NOVÁKOVÁ, Z. VEČEŘA, et al. Impact of acute and subchronic inhalation exposure to PbO nanoparticles on mice. *Nanotoxicology* [online]. England: Taylor & Francis, 2018, **12**(4), 290-304 [cit. 2020-5-31]. DOI: 10.1080/17435390.2018.1438679. ISSN 17435390. Dostupné z: [https://www-tandfonline-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/abs/10.1080/17435390.2018.1438679](https://www.tandfonline-com.ezproxy.lib.vutbr.cz/doi/abs/10.1080/17435390.2018.1438679)
- [23] Milestone Srl. *UltraWAVE: Microwave Preparation* [online]. [cit. 2021-5-30]. Dostupné z: <https://www.milestonesrl.com/products/microwave-digestion/ultrawave>
- [24] Milestone Srl. *traceCLEAN Cleaning System – Milestone* [online]. [cit. 2021-5-30]. Dostupné z: <https://www.milestonesrl.com/products/clean-chemistry/traceclean>
- [25] VEČEŘA, Z., P. MIKUŠKA, B. Dočekal, et al. Unique exposure system for the whole body inhalation experiments with small animals. *NANOCON 2011. Conference Proceedings*. Ostrava: Tanger Ltd, 2011, s. 1-3. ISBN 978-80-87294-23-9.
- [26] DUMKOVÁ, Jana, Tereza SMUTNÁ, Lucie VRLÍKOVÁ, et al. Variability in the Clearance of Lead Oxide Nanoparticles Is Associated with Alteration of Specific Membrane Transporters. *ACS nano* [online]. United States: American Chemical Society, 2020, **14**(3), 3096-3120 [cit. 2021-6-27]. ISSN 1936-0851. Dostupné z: doi:10.1021/acsnano.9b08143
- [27] WELZ, Bernhard. *Atomic absorption spectrometry*. 3rd, completely rev. ed. New York: Wiley-VCH, 1999, s. 941. ISBN 3-527-28571-7.