

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Fakulta p írodov decká**

**Katedra analytické chemie**

**VÝVOJ A VERIFIKACE METODY PRO  
STANOVENÍ VYBRANÝCH KOV  
V KLINICKÝCH MATERIÁLECH**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor práce:

Bc. Martin Kuba

Studijní obor:

N 1407 chemie

Vedoucí diplomové práce:

Ing. David Milde, Ph. D.

**Olomouc 2012**



## **SOUHRN**

Tato práce se zabývá vývojem a verifikací metody pro stanovení vybraných kovů v klinických materiálech. Uvádí základní principy a instrumentaci používaných spektrálních přístrojů, zejména hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. V práci jsou zpracovány dosud provedené aplikace analýzy kovů v klinických materiálech. Součástí práce je i experimentální část, která se zabývá vývojem a verifikací metody pro stanovení vybraných kovů (Al, Ti, V, Cr, Co, Ni, Nb a Pb) v kloubních výpotcích, odebraných pacienty v Ortopedické klinice Fakultní nemocnice Olomouc, pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem.



## **SUMMARY**

This work is focused on the development and verification of method for the determination of selected metals in clinical samples. It shows the basic principles and instrumentation of used spectral instruments, especially mass spectrometry with inductively coupled plasma. The performed applications of metal analysis in clinical samples conducted until now are discussed too. Experimental part of this work contains also the development and verification of method for the determination of selected metals (Al, Ti, V, Cr, Co, Ni, Nb a Pb) in joint effusion, which were taken from patients from Orthopedics Department of University Hospital in Olomouc, with mass spectrometry with inductively coupled plasma.



*Děkuji svému vedoucímu diplomové práce Ing. Davidu Mildemu, Ph. D. za zájem, cenné rady a čas, který vložil do mé práce a doc. MUDr. Jiřímu Gallovi, Ph.D. za spolupráci a odběr klinických vzorků.*

*Poděkování patří rovněž mé rodině za jejich podporu po celou dobu mého studia.*





Prohlá-uji, že jsem tuto práci vypracoval samostatn . Ve-keré literární prameny a informace, které jsem v práci vyuffil, jsou v seznamu pouffité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezen n zp ístupn na v knihovn Katedry analytické chemie, P írodov decké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne í í í í ..

í í í í í í í í í



# OBSAH

1. ÚVOD .....	1
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1 Atomová absorpční spektrometrie.....	2
2.2 Optická emisní spektrometrie.....	3
2.3 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem.....	4
2.3.1 Zavedení kapalných vzorků do plazmatu .....	5
2.3.1.1 Zmlfňovače .....	5
2.3.1.1.1 Koncentrický zmlfňovač .....	5
2.3.1.1.2 Úhlový zmlfňovač .....	6
2.3.1.1.3 Mikrokoncentrický zmlfňovač .....	6
2.3.1.1.4 Méně používané typy zmlfňovačů .....	7
2.3.1.2 Mlfné komory .....	7
2.3.1.2.1 Scottova mlfná komora .....	8
2.3.1.2.2 Cyklonická mlfná komora .....	8
2.3.1.3 Dávkování do proudu.....	9
2.3.2 Zavedení pevných vzorků .....	9
2.3.2.1 Laserová ablace .....	9
2.3.2.2 Elektrotermické vypařování .....	10
2.3.3 Plazmový zdroj .....	10
2.3.3.1. Stejnosemnně vázané plazma.....	10
2.3.3.2. Mikrovlákně vázané plazma .....	10
2.3.3.3 Indukčně vázané plazma .....	11
2.3.3.4 Plazmová hlavice .....	11
2.3.3.5 Vytvoření výboje .....	12
2.3.3.6 Ionizace vzorku.....	13
2.3.4 Interface .....	14
2.3.5 Iontová optika .....	15
2.3.6 Hmotnostní analyzátory.....	16
2.3.6.1. Kvadrupólový analyzátor.....	16
2.3.6.2 Sektorový analyzátor .....	17
2.3.6.3. Průletový analyzátor .....	19
2.3.7 Detektory .....	21
2.3.7.1. Elektronový násobič .....	21
2.3.7.2 Kanálový elektronový násobič .....	21
2.3.7.3 Faradayova klec .....	21
2.3.8 Interference v ICP-MS .....	22
2.3.8.1 Spektrální interference .....	22
2.3.8.1.1 Izobarické interference.....	22
2.3.8.1.2 Polyatomické interference.....	22

2.3.8.2 Nespektrální interference .....	24
2.3.8.3. Eliminace interferencí.....	25
2.3.8.4. Kolizní/reakční cely .....	25
2.3.8.4.1. Kolizní cely .....	26
2.3.8.4.2. Reakční cely .....	27
2.4 Srovnání spektrálních metod.....	28
2.5 Rozklady biologických matric .....	29
2.6 Vyuffití spektrálních metod v analýze klinických materiál .....	31
3. EXPERIMENÁLNÍ ÁST .....	36
3.1 Chemikálie, pístroje a pomcky.....	36
3.1.1 Chemikálie .....	36
3.1.2 Pístroje.....	37
3.1.3 Pomcky .....	37
3.1.4 Analyzované vzorky.....	38
3.2 Pouffité postupy .....	38
3.2.1 Píprava vzork .....	38
3.2.2 Píprava referenčního materiálu.....	38
3.2.3 Rozklad vzork a referenčních materiál .....	39
3.2.4 Píprava kalibračních roztok a interního standardu .....	39
3.3 Pouffité metody .....	40
3.3.1 Atomová absorpční spektrometrie .....	40
3.3.2 ICP-MS.....	41
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	43
4.1 Stanovení vybraných prvk .....	43
4.2 Verifikace.....	45
4.2.1 Detekční limity.....	45
4.2.2 Opakovatelnost .....	45
4.2.3 Mezilehlá preciznost .....	46
4.2.4 Pravdivost .....	47
4.2.5 Linearita kalibrační závislosti.....	47
4.3. Vyhodnocení výsledk .....	48
5. ZÁV R.....	55
6. LITERATURA .....	56
7. PÍLOHY.....	58

# 1. ÚVOD

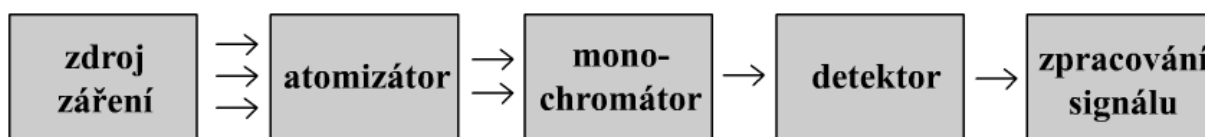
Ke stanovení kovových prvků se používají zejména spektrální metody: atomová absorpční spektrometrie, optická emisní a hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Nejčastěji analyzovanými klinickými materiály jsou krev, krevní sérum a moč. Jedná se o biologické matrice skládající se z velkého množství organických ale i anorganických látek<sup>1</sup> a stanovované analyty jsou zde přítomny ve stopových i ultrastopových koncentracích. Analýza kovů v klinických materiálech může být prováděna z různých důvodů. Akumulace toxických prvků jako například olova a rtuti v lidském organismu<sup>2</sup>, uvolňování kovů jako jsou titan, vanad, chrom a kobalt z kovových kloubních implantátů<sup>3</sup>. Stanovení koncentrace kovů účastnících se řady biologických procesů v lidském organismu a s tím související vliv těchto prvků na jejich fungování<sup>4</sup>. Nebo sledování hladin kovů u pacientů v souvislosti s probíhajícím onemocněním<sup>5</sup>. V Experimentální části této práce byla vyvinuta a verifikována metoda pro analýzu vybraných prvků v klinických vzorcích, kterými byly výpotky odebrané pacientům v Ortopedické klinice Fakultní nemocnice Olomouc, pomocí ICP-MS.

## 2. TEORETICKÁ ÁST

### 2.1 Atomová absorp ní spektrometrie

Atomová absorp ní spektrometrie je velmi rozší enou metodou prvkové analýzy, pomocí které lze stanovit asi 60 prvků periodické soustavy. Uplatnění nachází ve většině oblastí chemie, kde je potřebná analýza anorganických prvků. Lze využít k analýze stopových, nízkých i středně vysokých koncentrací. Metoda je specifická a ve většině případů není potřeba izolace stanovované složky od přímé. Je založena na měření absorpce záření prvků v základním elektronovém stavu<sup>6</sup>.

Atomový absorp ní spektrometr se skládá z těchto základních částí: zdroj záření, atomizátor, monochromátor a detektor (Obr. 1). Jako zdroj budícího záření se nejčastěji využívají výbojky s dutou katodou. V atomizátoru dochází k převodu iontů analytu na volné atomy v plynném stavu. V atomové absorp ní spektrometrii používají zejména atomizace plamenem nebo elektrotermická atomizace v grafitové kyvetě, která je vhodná pro stanovení velmi nízkých koncentrací. Vlnová délka záření, které je selektivně absorbováno volnými atomy v plynném stavu, je pro daný prvek charakteristická a hodnota absorpce je přímo úměrná koncentraci atomů. Nevýhoda této techniky je, že pro každý prvek potřebujeme vlastní výbojku. To při stanovení více prvků značně zpomaluje rychlost analýzy. Tato technika poskytuje detekční limity pohybující se v desítkách až jednotkách ppb<sup>6</sup>.



Obr. 1. Blokové schéma atomového absorp ního spektrometru

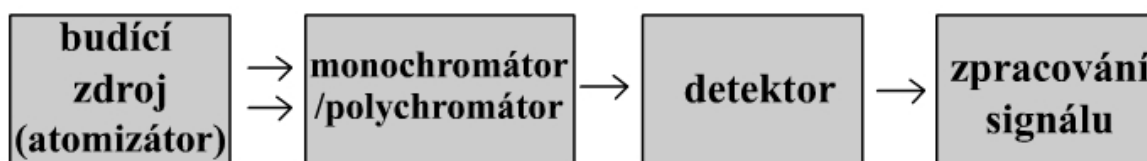
## 2.2 Optická emisní spektrometrie

Tato metoda je založena na měření fotonů, které vznikají přechodem valenčních elektronů z vyšších energetických stavů na nižší. Spektrum, vzniklé emisí fotonů ionty nebo atomy v excitovaném stavu při jejich deexcitaci, má čárový charakter. Pro každý prvek získáme spektrální čáry u různých vlnových délek, které odpovídají jednotlivým přechodům. Počet těchto spektrálních čar závisí na počtu elektronů ve valenčních hladinách. Poloha čar ve spektru (jejich vlnová délka) charakterizuje konkrétní prvky a jejich intenzita pak koncentraci těchto prvků ve vzorku. Pro zaznamenání spektra je nezbytné, aby prvky ve vzorku byly v atomární formě a excitovány do vyšších energetických stavů<sup>6</sup>.

Nejjednodušší variantou optické emisní spektrometrie je plamenová fotometrie, která se v praxi používá hlavně k analýze alkalických kovů a kovů alkalických zemin. K buzení se využívá různých typů plamenů o nízké teplotě. Oblast použití je široká a kromě zemědělství a potravinářství lze využít tyto přístroje i ve zdravotnictví při analýze Na, K a Li. Dalšími typy budících zdrojů jsou elektrický oblouk a jiskra, ty se využívají při analýze ocelí a slitin<sup>7</sup>.

Jako budící zdroj lze použít i plazma, naprostá většina těchto přístrojů je vybavena indukčně vázaným plazmatem. Ostatní druhy jako mikrovlnně a stejnosměrně vázané plazma se používají jen okrajově pro speciální aplikace<sup>7</sup>.

Spojení optické emisní spektrometrie s atomizační technikou indukčně vázaného plazmatu umožňuje provádět víceprvkovou analýzu v širokém rozmezí koncentrací a při relativně nízkých detekčních limitech. Spektrometry můžeme rozdělit podle jejich vnitřní stavby na sekvenční (využívá monochromátor, ale umožňuje stanovit jen prvek po prvku) a simultánní (využívá polychromátor a umožňuje stanovení až 60 prvků zároveň)<sup>6</sup>(Obr.2).

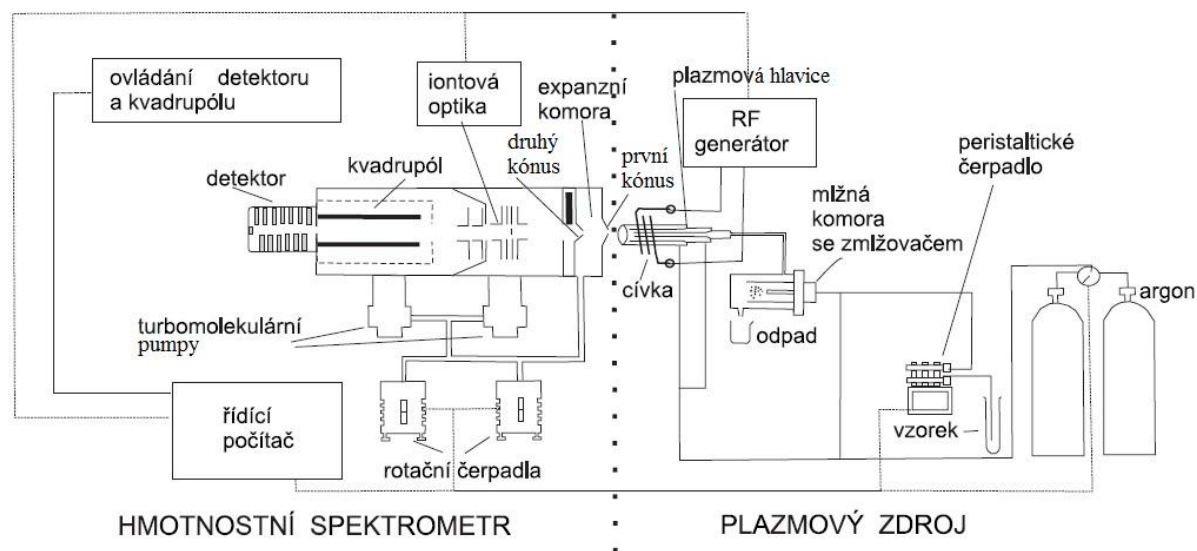


Obr. 2. Blokové schéma optického emisního spektrometru

## 2.3 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) je v současnosti velmi vyvíjenou a silnou technikou prvkové analýzy. Postupně nahrazuje dnes stále hojně používanou atomovou absorpci a optickou emisní spektrometrii, ovšem vyvíjí odlišných princip analýzy. Nedochozí zde k detekci záření, ale přímo iont prvku o určité hmotnosti a náboji. Oblast aplikací je velmi rozsáhlá, zahrnuje mimo jiné i potravinářství, lékařství nebo environmentální analýzu. Velice úspěšná je tato technika při analýzách stopových a ultrastopových koncentrací. Lze ji využít i při speciálních analýzách při spojení například s vysokou vlnovou kapalinovou chromatografií<sup>8,9</sup>.

Základními prvky instrumentace jsou zmlžovač s mlžnou komorou a plazmová hlavice, které se nachází v prostředí s atmosférickým tlakem a interface, iontová optika, hmotnostní analyzátor a detektor, které se nachází v evakuovaném prostředí (Obr. 3). Analyzovaný prvek prochází, v tání ve formě kapalného roztoku, přes zmlžovač a mlžnou komoru do plazmatu, kde dochází ke vzniku iontů, které jsou dále vedeny přes interface a iontovou optiku do hmotnostního analyzátoru a poté dopadají na detektor<sup>8,9</sup>.



Obr. 3. Schéma ICP-MS (převzato z cit.<sup>10</sup>)



### 2.3.1 Zavádění kapalných vzorků do plazmatu

Ve většině aplikací jsou vzorky zaváděny do ICP-MS v kapalném stavu. Základní princip spočívá v tom, že vzorek je nasáván hadičkou pomocí peristaltického čerpadla a přiváděn do zmlflovací, kde dochází ke vzniku aerosolu, který je potom určen pro účinnou ionizaci v plazmovém výboji<sup>8</sup>. Celý systém přívodu kapalného vzorku do plazmatu se skládá ze dvou hlavních částí. Zmlflovací, kde dochází k tvorbě aerosolu, a mlhnicí komory, která propouští do plazmatu jen kapky aerosolu o určitém maximálním průměru. Stavba a účinnost systému, použitého pro zavádění vzorku do plazmatu, je jednou z nejdůležitějších částí celého procesu analýzy a může velkou měrou ovlivnit kvalitu získaných výsledků<sup>9</sup>.

K přivádění vzorku do zmlflovací se používá peristaltická pumpa. Jedná se o soustavu malých otáčkových válečků uspořádaných do kruhu, na které je přitlačována hadička s analyzovanou kapalinou. Díky konstantnímu otáčení pumpy a tlaku válečků na hadičky dochází k plynulému peristaltickému pohybu kapalného vzorku. Výhodou peristaltického čerpadla je, že zajišťuje konstantní tok kapalného vzorku, bez ohledu na případné rozdíly ve viskozitě standardů a vzorků. Běžným průtokem je 1 ml/min (cit<sup>8</sup>).

#### 2.3.1.1 Zmlflovací

Pro účinnou ionizaci vzorku je potřeba do plazmatu zavádět kapalně vzorky ve formě aerosolu. Kapalina, která vstoupí do zmlflovací je rozprávena na aerosol pomocí mechanické síly přiváděného plynu, kterým je většinou argon. K tomu se nejčastěji využívá několik druhů zmlflovacích - koncentrický, úhlový a mikrokoncentrický. Jelikož při zmlflování dochází i k tvorbě větších kapek (větší než 10 μm v průměru), které nejsou v plazmatu účinně ionizovány, jsou bezprostředně za zmlflovací z pravidla azeny i mlhnicí komory. Zmlflovací jsou vyráběny obvykle ze skla, ale používat se mohou i polymerní materiály, které vykazují větší odolnost vůči více korozivním vzorkům<sup>8</sup>.

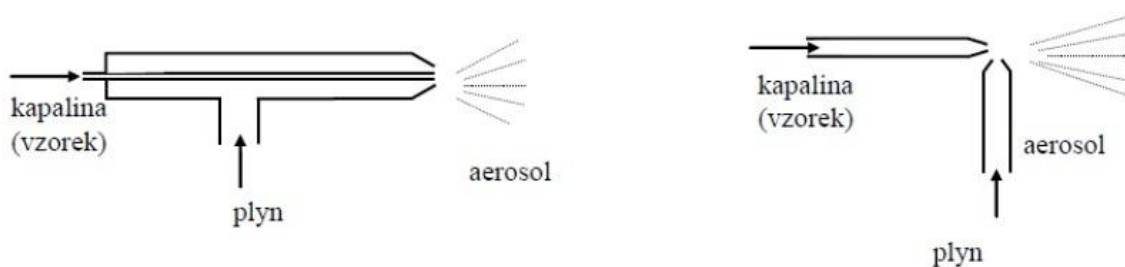
##### 2.3.1.1.1 Koncentrický zmlflovací

Kapalný roztok zde prochází kapilárou, na jejíž konci dochází ke kontaktu s rychle proudícím plynem (argonem). Kombinace proudícího plynu o vysoké rychlosti a kapalného roztoku o nízkém tlaku způsobuje, že roztok vtáhně přes konec kapiláry a rozpráven na drobný aerosol (Obr. 4). Koncentrické zmlflovací se vyrábějí z borosilikátového skla nebo

k emene, ale také z materiálů na bázi polymeru (PFA), díky jejich odolnosti vůči korozi. Běžná průtoková rychlost u těchto zmlflov se pohybuje kolem 1-3 ml/min. Koncentrické zmlflove poskytují dobrou stabilitu, ovšem především u šetrných vzorků. Při analýzách složitých matric nebo velmi zasolených vzorků může docházet k ucpání konce kapiláry<sup>8</sup>.

### 2.3.1.1.2 Úhlový zmlflove

Tento druh zmlflove bývá úspěšně používán při analýzách složitých matric a matric, které mohou obsahovat i část nerozpuštěnou část hmoty. Proud argonu je zde, oproti paralelnímu směru u koncentrických zmlflov, veden kolmo na konec kapiláry (Obr. 4). Při kontaktu rychle proudícího plynu a proudu kapaliny dochází ke tvorbě aerosolu. Tyto zmlflove nejsou při vytváření aerosolu tak účinné jako koncentrické. Ale díky většímu průměru kapiláry proudící kapalný roztok a větší vzdálenosti proud plynu, dochází méně často k ucpání<sup>8</sup>.



**Obr. 4.** Schéma koncentrického a úhlového zmlflove (převzato z cit.<sup>11</sup>)

### 2.3.1.1.3 Mikrokoncentrický zmlflove

Tyto zmlflove jsou optimalizovány pro nízké průtoky, oproti předělaným dvěma uvedeným typům zmlflov. Zatímco u koncentrického zmlflove se průtok pohybuje okolo 1ml/min, tak mikrokoncentrické pracují při průtoku 0,1 ml/min a méně. Vyplývají principu koncentrického zmlflove, ale používají vyšší tlak plynu při malém průtoku kapalného roztoku. Toto je velmi ideální pro případy, kdy je k dispozici jen malé množství vzorku. Další výhodou je produkce velmi malých kapek, menších než u koncentrického zmlflove. Jsou vyráběny z polymerních materiálů polytetrafluorethylen (PTFE), polyvinylfluorid (PVF), ale některé typy mohou být vyrobeny i z borsilikátového skla nebo keramiky. Nevýhodou mikrokoncentrických zmlflov je, že díky malému průměru kapiláry nejsou moc použitelné

p i vysokých koncentracích rozpu-t ných pevných látek nebo suspendovaných částic, protože může dojít k ucpání zmlfova e<sup>8</sup>.

#### **2.3.1.1.4 Mén poufřvané typy zmlfova**

Krom vý-e uvedených nej ast ji vyuffřvaných druh zmlfova se m fléme setkat i s dal-ími variantami. Ultrazvukový zmlfova vyuffřvá ke tvorb aerosolu ultrazvuku. Dochází k transformaci tém ve-kerého kapalného podílu na aerosol o pr m ru men-ím neff 10  $\mu\text{m}$ , tedy je nutné vyuffřt systému pro odstran ní části solventu p ed vstupem do plazmatu. Toho se dosahuje prost ednictvím mlfňých komor termostatovaných na níff-í teplotu nebo pomocí porézních membrán. Toto spojení poskytuje afl 30 % ú innost transportu analytu, což umofl uje pracovat p i velmi nízkých detek ních limitech. Tento druh zmlfova e je asto vyuffřván p i specia ních analýzách. Nevýhodou jsou pom rn dlouhé pam ové efekty a promývací asy. Eventualitou mohou být mirkoultrazvukové zmlfova e<sup>8</sup>.

Dal-í variantou zmlfova je termosprejový zmlfova . Vzorek zde prochází úzkou vyh ívanou kapilárou. část solventu se odpa uje a aerosol se vytvá í, když páry expandují na konci kapiláry. Tento druh zmlfova e má podobné analytické parametry jako ultrazvukový, s tím rozdílem, že díky úzké kapilá e m flé docházet k ucpání a tedy je mén vhodný pro vzorky s velkým podílem rozpu-t ných pevných látek<sup>9</sup>.

Dal-ími známými typy zmlfova jsou například Babbington v a V-groove. Tyto se poufřřvají zejména v optické emisní spektrometrii, ale nejsou vhodné pro spojení s ICP-MS, jelikoff generují velké množství rozpu-t ných pevných látek (afl 20%) oproti akceptovatelným hodnotám (0,2%) pro ICP-MS<sup>8</sup>.

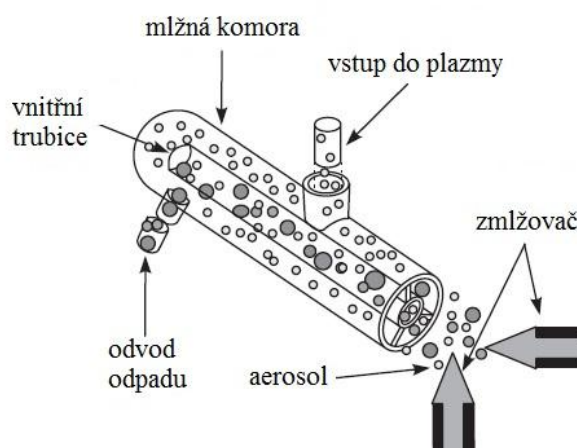
#### **2.3.1.2 Mlfňé komory**

Hlavním úkolem mlfňých komor je odstranit v t-í kapky aerosolu, vznikající také ve zmlfova i, a vyrovnat zmlfovací pulsy, které vznikají v d sledku pouffřtí peristaltických pump. N které komory mohou mít i externí chlazení, které zaji- uje termální stabilitu vzorku a má vliv na potla ení vzniku oxid a podporuje stabilizaci signálu. Chlazení zp sobuje, flé do plazmatu vstupuje mén solventu a tedy mén energie plazmatu je pot eba k odpa ování vzorku a více energie je dostupné pro excitaci a ionizaci analytu. Taktéff, pokud vstupuje do plazmatu mén vody, je také mén-í -ance pro tvorbu hydroxidických a oxidických iont ,

kteře mohou p řípadn ě interferovat s analytem. V dneš ní době jsou b ěžn ě pouřívány 2 typy mlfných komor: Scottova a cyklonická<sup>8,9</sup>.

### 2.3.1.2.1 Scottova mlfná komora

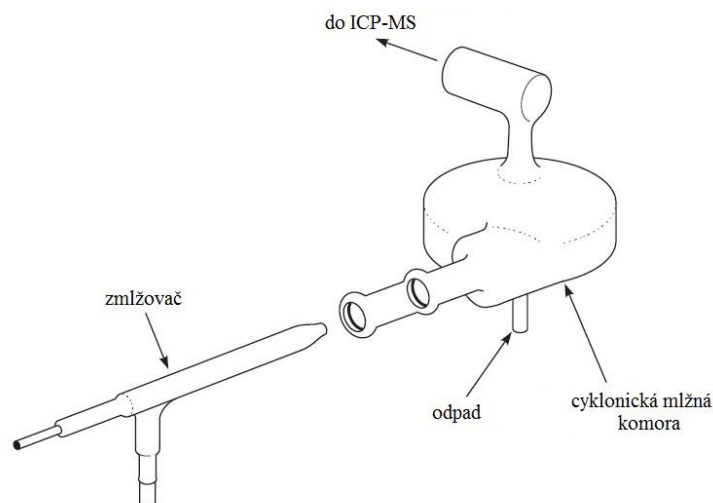
Je nejpoříván ějším typem mlfné komory. Skládá se z dvou koncentrických trubic (Obr. 5). Aerosol vchází do mlfné komory vnit řní trubicí a na jejím konci je donucen zm ěnit dráhu letu o 180° sm ěrem do vn ější trubice, na jejímž konci se nachází p řívod do plazmatu. Vlivem gravita ní síly, náraz ě kapek do st ěny a koagulaci mezi sebou dochází cestou k výstupu do plazmatu k eliminaci v t ěch kapek na st ěnách komory a do plazmatu vstupuje jen jemný aerosol. Tato mlfná komora je nej ěst ěji spojována s koncentrickým zmlřova ěm<sup>9</sup>.



Obr. 5. Sch ěma Scottovy mlfné komory (p řevzato z cit.<sup>8</sup>)

### 2.3.1.2.2 Cyklonická mlfná komora

Vyuřívá k odd ělení malých a velkých kapek aerosolu odst ědiv ě síly. Kapky jsou odd ěleny podle své velikosti pomocí proudu aerosolu vzorku a argonu, které vytvá ří v komo ě v ěr. Malé kapky jsou vedeny do plazmatu, zatímco velké jsou po nárazu na st ěny komory odvád ěny do odpadu. Cyklonická mlfná komora má pro ěisté vzorky vyří ť ú ěinnost a lze tedy dosáhnout v t ě citlivosti a niřší detek ní limitu, ale distribuce kapek je odlišná od Scottova uspo řádání a pro ur ěité materiály m ěžeme zaznamenat hor ěší preciznost. A koliv jsou Scottovy mlfné komory stále nej ěst ěji pouříván ěm druhem, cyklonické komory jsou stále více populární a postupn ě pouřívány ve více aplikacích. Jsou vyráb ěny ze skla, k emene i polymerních materiál ť (Obr. 6)<sup>8</sup>.



**Obr. 6.** Schéma cyklonické mlžné komory s koncentrickým zmlžovačem (převzato z cit.<sup>12</sup>)

### 2.3.1.3 Dávkování do proudu

Dávkování do proudu (Flow Injection nebo FI) vyvolává sledování signálu analytu, který je vnášen do nosného média, vase. Výhodou je odstranění matričních efektů, omezení kontaminace maticí nebo vzorkem i použití interních standardů. Tato metoda se uplatňuje především u složitějších maticí<sup>10</sup>.

## 2.3.2 Zavádění pevných vzorků

### 2.3.2.1. Laserová ablace

Pokud je třeba analyzovat vzorek, který z rozmanitých důvodů nemůžeme nebo nechceme převést na kapalný nebo pokud je potřeba analyzovat jen jednu či několik vrchních vrstev materiálu, lze využít laserové ablace (LA). Tato technika se používá pro přenos pevných vzorků do plazmatu. Pomocí laseru dochází k odstranění malých částic, atomů a iontů z vrchní vrstvy vzorku. Tím dochází ke vzniku laserově vázaného aerosolu nad povrchem vzorku, který je transportován inertním plynem přímo do ICP-MS<sup>9</sup>.

### 2.3.2.2 Elektrotermické vypařování

Tato metoda byla vyvíjena jako alternativa k nízkotlakým zvlhčovačům používaným u ICP-MS. Vyvíjí se pro zavádění pevných i kapalných vzorků grafitových kyvet, které jsou velmi podobné kyvetám používaných v ETA-AAS. Na vzorek umístěný v kyvetě působí teplotním programem, postupně dochází k vysušení, pyrolýze a vypaření vzorku, který je poté veden proudem argonu do ICP-MS. Největší výhodou tohoto postupu je velmi malá spotřeba vzorku. Lze nadávkovat 5-40 μl. Velkou nevýhodou pak je pouze periodický signál, který odpovídá procesu vypaření a odfouknutí vzorku argonem do ICP-MS oproti kontinuálnímu signálu, který vzniká při použití zvlhčovače<sup>9</sup>.

### 2.3.3 Plazmový zdroj

V současnosti nejpoužívanějším druhem plazmového buzení je indukčně vázané plazma (ICP). Jihl dříve bylo využíváno jako budící zdroj u optické emisní spektrometrie, ale největšího uplatnění dosáhlo právě ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Využití plazmatu jako budícího zdroje, eventuálně zdroje iontů pro MS, lze uskutečnit několika způsoby. Dnes jihl z čídky používanými postupy jsou stejnosměrně vázané plazma (direct current plasma - DCP) a mikrovlnně vázané plazma (microwave induced plasma - MIP). Plazma je ionizovaný plyn, který obsahuje volné ionty a elektrony, které byly odtrženy z jejich elektronového obalu<sup>8</sup>.

#### 2.3.3.1. Stejnosměrně vázané plazma

Ke vzniku stejnosměrně vázaného plazmatu dochází při zavádění a ionizaci plynu (argonu) mezi 2-3 elektrodami, při čemž vzniklé uspořádání a plazma má tvar písmene Y. Tato varianta plazmatu má oproti ICP sklony k tvorbě interferencí, nestabilitě a problémům se spolehlivostí. Z čemž jedinou výhodou tohoto uspořádání je, že do plazmatu může být zaváděn vzorek s velkým podílem rozpuštěných pevných látek. Tato technika se běžně v analytické praxi nepoužívá<sup>8</sup>.

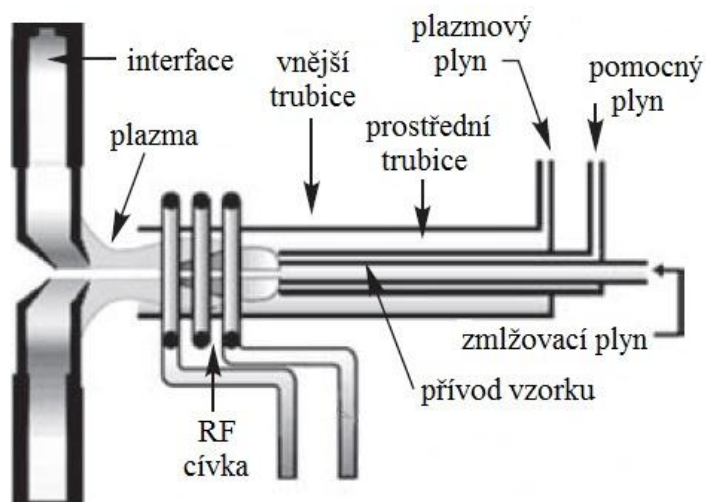
#### 2.3.3.2. Mikrovlnně vázané plazma

V tomto systému je plazma udržováno pomocí mikrovlnné energie (100-200 W). Jako plyn se používá argon nebo helium a celý systém pracuje za atmosférického tlaku. Plazma se generuje ve formě prstence uprostřed skleněné nebo keramické trubice. Může docházet

k zřazení plazmatu při analýze vodných vzorků. MIP se používá jako zdroj pro optickou emisní spektrometrii, ale jen s velmi omezenými možnostmi aplikace, jelikož není dostatečně robustní pro reálné vzorky. Uplatnění nalézá zejména jako emisní detektor pro plynovou chromatografii<sup>8</sup>.

### 2.3.3.3 Indukčně vázané plazma

Technika indukčně vázaného plazmatu byla použita již dříve u optické emisní spektrometrie jako účinný excitační zdroj. Výhody tohoto postupu se ale uplatní i při spojení této techniky jakožto iontového zdroje pro hmotnostní spektrometrii. Celý systém pracuje za atmosférického tlaku a skládá se z několika základních částí - plazmová hlavice, radiofrekvenční cívka a zdroj energie. Na obrázku máme vidět schéma plazmové hlavice s indukčně vázaným plazmatem (Obr. 7)<sup>8</sup>.



Obr. 7. Schéma plazmové hlavice (převzato z cit.<sup>8</sup>)

### 2.3.3.4 Plazmová hlavice

Hlavním stavebním prvkem plazmové hlavice jsou tři soustředné k emenné trubice. Ty mohou být vyráběny buď jako celistvý kus nebo s odnímatelnou vnitřní trubicí (přívod vzorku). Plazmový plyn (obvykle argon), potřebný pro vznik a udržení plazmatu, prochází mezi vnější a prostřední trubicí pr tokem 12-17 l/min. Pomocný plyn pak prochází mezi prostřední trubicí a vnitřní (1 l/min), pomocí něj je plazma oddělováno od trubice a zamezuje tak jejímu roztavení. Tento pomocný plyn také způsobuje charakteristický kapkový tvar

plazmatu. Vnitřní trubici prochází do hlavice při proudu obvykle 1 ml/min zmlflovací plyn, který nese částky aerosolu ze vzorku a zároveň proráží cestu centrem plazmatu. Pro všechny tyto druhy plynů se nejčastěji používá argon. Plazmová hlavice je umístěna ve vodorovné pozici a centrálně ve vzdálenosti 10-20 mm od interface. Plazmovou hlavici obklopuje radiofrekvenční cívka, která je nepatrně odlišná od cívek používaných u ICP-OES, zejména kvůli potřebě uzemnění celé cívky, protože může dojít k vytvoření sekundárního výboje mezi cívkou a interface. RF cívka je napojena na radiofrekvenční generátor. Tyto generátory pracují při frekvencích 27 a 40 MHz, které byly určeny přímo pro tyto přístroje, aby nedocházelo k interferencím s jinými frekvencemi. Velmi důležitou charakteristikou generátoru je jeho účinnost, moderní přístroje jsou vybaveny generátory s účinností 70-75 %, tedy 70-75 % dodané energie vytváří plazma. Důležité je také, aby se generátor vyrovnal se změnou odporu vytvářenými maticí vzorku nebo různou vodivostí rozpouštědel. To je dnes zajišťováno pomocí elektronického ladění (dříve mechanická serva), které umožňuje okamžitou reakci na změnu odporu<sup>8,9</sup>.

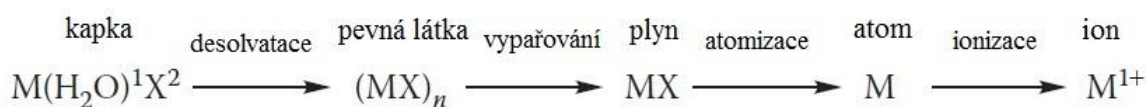
### 2.3.3.5 Vytvoření výboje

V prvním kroku dojde k vpuštění plynu (argonu) mezi prostřední a vnější trubici plazmové hlavice, která je na konci obklopena radiofrekvenční cívkou připojenou ke generátoru. RF energie (750-1500 W) je vložena na cívku a střídavý proud osciluje uvnitř cívky při hodnotě korespondující s frekvencí generátoru. Tato oscilace způsobí vznik silného elektromagnetického pole působícího na konec hlavice. Na proudící argon je poté aplikován vysokonapíňový výboj z Teslova generátoru, který způsobí odtržení n kterých elektronů z atomů argonu. Tyto elektrony jsou zachyceny a urychleny v magnetickém poli a srážejí se s dalšími atomy argonu, z nichž vyráží další elektrony. Tato zt zová reakce se neustále opakuje, z argonového plynu se postupně stávají atomy a ionty argonu a jejich elektrony. Tento jev se nazývá kolizí indukovaná ionizace. Takto indukovaná plazmový výboj je poté udržován uvnitř plazmové hlavice pomocí radiofrekvenční energie. Množství energie potřebné pro generaci argonových iontů je 15,8 eV (první ionizační potenciál), což postačuje pro ionizaci v t-iny prvky periodické tabulky<sup>8</sup>.



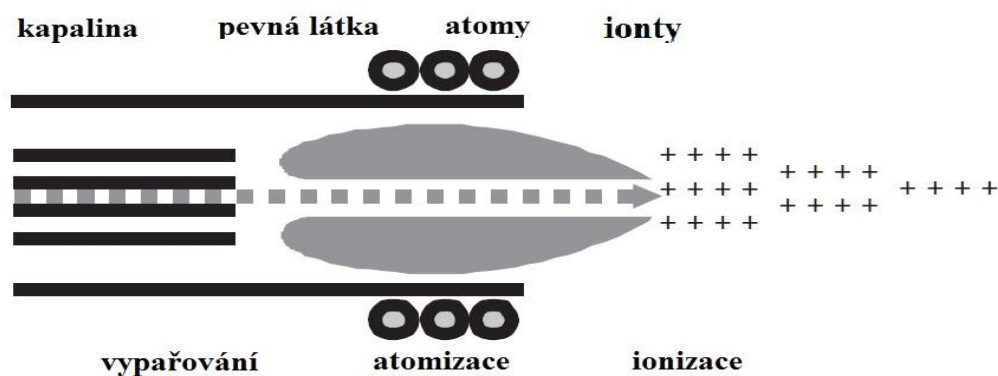
### 2.3.3.6. Ionizace vzorku

Hlavním úkolem plazmatu je převádět analyt na ionty, které můžeme analyzovat hmotnostním spektrometr. V plazmatu se nenachází ve všech místech stejná teplota. Teplotní rozdíl v plazmovém výboji můžeme popsat pomocí několika zón s rozmezím teplot 6 000 až 10 000 K. Jako první vstupuje vzorek do předehřívací zóny a poté pokračuje přes zářivou zónu do zóny analytické, kde se z něj stává v ideálním případě jednou nabitý pozitivní ion. Procesy, kterými se z analytu stane právě tento ion, můžeme popsat jako desolvatace, vypařování, atomizace a ionizace (Obr. 8)<sup>8</sup>.



**Obr. 8.** Schéma ionizace analytu (převzato z cit.<sup>8</sup>)

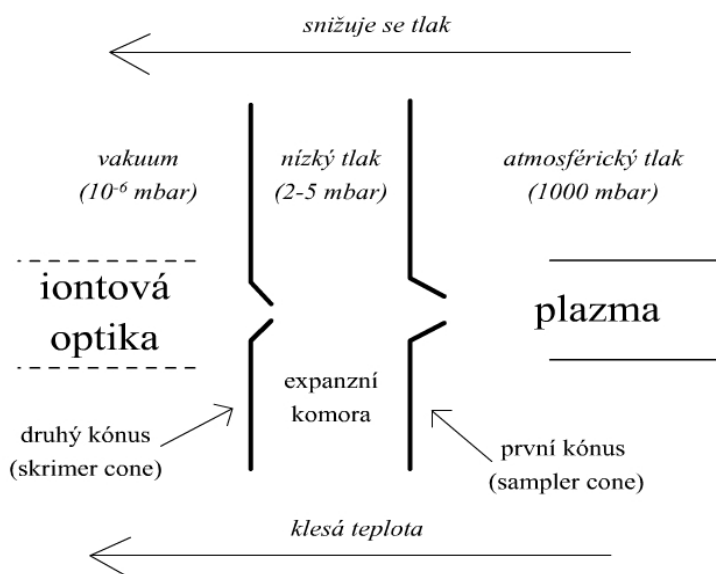
Nejdříve dochází k desolvataci a odstranění molekul vody, poté při průchodu další částí plazmatu dochází ke zplynění částic a atom vzorku se dostává do základního stavu. Následně dochází k interakci elektronů v plazmatu s atomem analytu a vzniku iontu, který je dále veden přes interface do hmotnostního analyzátoru (Obr. 9)<sup>8</sup>.



**Obr. 9.** Znáznornění ionizace analytu (převzato z cit.<sup>8</sup>)

## 2.3.4 Interface

Interface je jednou z nejdůležitějších částí ICP-MS přístroje. Jeho hlavním úkolem je účinný a stabilní převod iontů z prostředí atmosférického tlaku (1000 mbar) a vysokých teplot (7500 K) do hmotnostního analyzátoru, který pracuje za vysokého vakuu ( $10^{-5}$  -  $10^{-9}$  mbar) a teplot okolo 300 K. Tento převod je uskutečňován na velmi krátkou vzdálenost (méně než 10 cm). Celý systém je zpravidla ve vodorovné poloze. Interface se skládá z několika kónusů (obvykle 2) s velmi malými otvory, které oddělují prostředí o různých hodnotách tlaku. Poté, co dojde k vytvoření iontů v plazmatu, vstupují skrz první kónus (vzorkovací kónus - sampler cone) otvorem s průměrem 0,8 - 1,2 mm a dostávají se do prostředí o nižším než atmosférickém tlaku (2-5 mbar), který je zajištěn prouděním mechanické pumpy. Prostor mezi prvním a druhým kónusem se nazývá expanzní komora. Díky nízkému tlaku zde dochází k výraznému zrychlení a expanzi svazku atomů, molekul a iontů. Díky této adiabatické expanzi dojde k výraznému snížení teploty až na 100 - 200 K a to vše na velmi krátkou vzdálenost, která je mezi kónusy (cca 1 cm). Poté prostupují otvorem druhého kónusu (skrimer cone), který je méně než první kónus a má také méně průměr otvoru 0,4 - 0,8 mm (Obr. 10). Nejčastějším materiálem, ze kterého jsou kónusy vyrobeny je nikl. Mnohem odolnější a trvalejší jsou pak kónusy platinové. Jak již bylo řečeno, kónusy zajišťují i převod z prostředí plazmatu o velmi vysokých teplotách. Jsou tedy pokryty materiálem dobře vedoucím teplotu (molybden, hliník) a chlazeny vodou<sup>8,9</sup>.



Obr. 10. Schéma interface ICP-MS

### 2.3.5 Iontová optika

Další velmi důležitou částí ICP-MS je tzv. iontová optika. Ta se nachází mezi posledním kónusem interface a hmotnostním analyzátozem a obsahuje jednu nebo více elektrostaticky řízených oken. Ty pracují, stejně jako hmotnostní analyzátoz, za hlubokého vakua, které je udržováno pomocí turbomolekulární pumpy. Tyto okna si nelze představit jako tradiční optické komponenty používané u ICP-OES, nýbrž se jedná o soustavu kovových plátů i válečků, na které je vloženo napětí. Funkcí iontové optiky je vést ionty, které proudí z plazmatu přes interface, do hmotnostního analyzátozu a zabránit vstupu neiontových, neutrálních částic a fotonů. Toto lze provádět několika způsoby. S využitím polohy mimo osu hmotnostního analyzátozu oproti proudu iontů z plazmatu, zde dochází k nárazu neiontových, neutrálních částic a fotonů do fyzické bariéry a nedochází tak již k jejich proniku do hmotnostního analyzátozu a dopadu na detektor. Další možností je využít kovové bariéry, umístěné přímo v ose proudu iontů, na kterou neiontové částice narazí, ale ionty je umožní tato bariéra pomocí elektrostatického napětí oblet. Nabité částice jsou pak pomocí elektrostatického pole směřovány do analyzátozu. Pokud by nenabité částice a fotony procházely až na detektor, způsobily by k nestabilitě a zvyšovaly by pozadí signálu, což by mělo negativní efekt na výkon celého systému. Poslední možností je umístit hmotnostní analyzátoz v úhlu 90° k proudu iontů a ty pak fokusovat pomocí švydutého iontového zrcadla. Ionty neutrálních částic a fotonů pak prochází skrz, kdežto ionty jsou odráženy iontovým zrcadlem do analyzátozu<sup>8,9</sup>.

Je nezbytné, aby plazmový výboj a interface byly nastaveny v součinnosti s iontovou optikou tak, aby iontový svazek udržel integritu a složení až po iontovou optiku. Některé iontové systémy obsahují i extrakční okna, které pomáhají vtahovat ionty z oblasti interface, což zlepšuje detekční limity především u lehkých prvků, které mohou být vytlačovány z iontového paprsku prvky těžšími<sup>8</sup>.

## 2.3.6 Hmotnostní analyzátory

V hmotnostní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem se vyvíjejí tři druhy hmotnostních analyzátorů. Jsou to kvadrupól, pruhový analyzátor (Time of flight nebo TOF) a spektrometry s vysokým rozlišením (HR-ICP-MS), které používají kombinaci magnetického a elektrického sektoru. Hmotnostní analyzátor se v ICP-MS sestavě nachází mezi iontovou optikou a detektorem. Jeho hlavním úkolem je separovat ionty analytu. Hmotnostní analyzátory pracují za hlubokého vakuu, které zajišťuje samostatná turbomolekulární pumpa<sup>8</sup>.

### 2.3.6.1. Kvadrupólový analyzátor

Je v současnosti nejpoužívanějším druhem hmotnostních analyzátorů používaných technikou ICP-MS. Je jím vybaveno přibližně 85% používaných přístrojů. Kvadrupólový analyzátor se skládá ze čtyř válcovitých nebo hyperbolického tvaru stejně dlouhých a pruhových tyčí. Ty jsou obvykle vyrobeny z nerezové nebo molybdenové oceli a mohou být někdy pokryty i keramickou anti-korozivní vrstvou. Kvadrupóly používané v ICP-MS jsou v průměru 15-25 cm dlouhé s průměrem 1 cm a pracují na frekvenci 2-3 MHz. Na dvě protilehlé tyče je vkládán stejnosměrný a střídavý proud. Výběrem vhodného poměru stejnosměrného a střídavého proudu na párech tyčí je umožněno iontům o určité hodnotě  $m/z$  (hmotnost ku náboji) projít až k detektoru přičemž vyhnání ostatních nestabilních iontů mimo kvadrupól a tedy i mimo detektor nebo jejich vybití na tyčích kvadrupólu.

Schopnost separovat ionty s odlišnou hmotností je u kvadrupólu dána řadou faktorů, kterými jsou: délka, tvar a průměr tyčí, frekvence, použité napětí a vakuum, a také kinetická energie vstupujících iontů.

Schopnost hmotnostního analyzátoru odlišit signál analytu od interferujících částic je dána dvěma základními parametry. Prvním je rozlišovací schopnost  $R$ , která je v ICP-MS vyjádřena jako podíl (1)

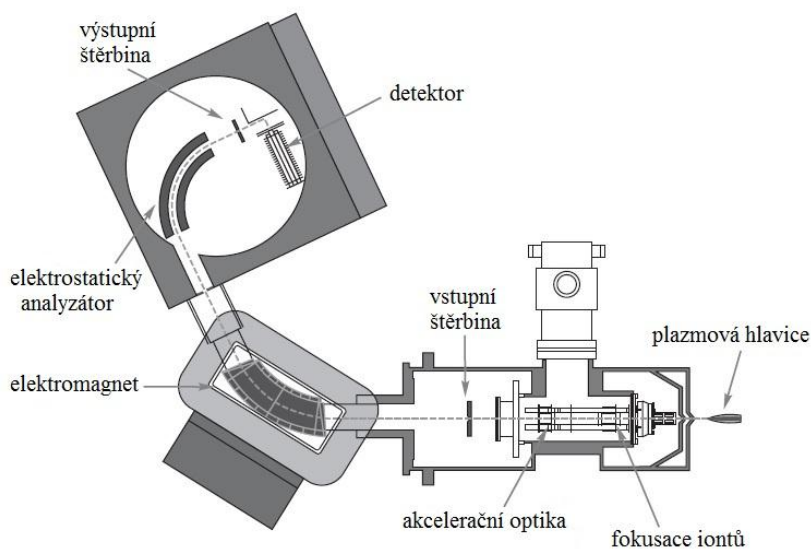
$$R = m / \Delta m, \quad (1)$$

kde  $m$  je nominální hodnota hmotnosti, na které se nachází pík a  $\Delta m$  je šířka píku, v ICP-MS měřená obvykle v 10 % nebo 50 % maximální intenzity píku.

Druhým parametrem je šabundance sensitivity, která určuje p ísp vek signálu na ur ité hmotnosti od sousedního píku, který je o jednu hmotnostní jednotku nífl-í nebo vy—í nefl pík analytu<sup>8</sup>.

### 2.3.6.2 Sektorový analyzátor<sup>8</sup>

Jednoduchý magnetický sektor se využíval jifl p i analýzách v první polovin 20. století. V sou asnosti se u p ístroj s vysokým rozli-ením pouffívají analyzátory s dvojitou fokusací. Před nebo za magnetickým sektorem je umíst n je-t elektrostatický sektor, jenfl má za úkol fokusovat ionty, ímfl dochází k výraznému zvý-ení rozli-ovací schopnosti. Moderní p ístroje využívalí 2 varianty geometrického uspo ádání magnetického a elektrostatického analyzátoru. šReversní a šstandardní Nier ó Johnsonovo uspo ádání. Ob tyto uspo ádání se skládají z elektromagnetického a elektrostatického analyzátoru. Ve šstandardním uspo ádání je elektrostatický analyzátor umíst ný před magnetickým, v šreverzním je tomu naopak (Obr. 11).



**Obr. 11.** Schéma HR-ICP-MS (p evzato z cit.<sup>13</sup>)

Před vstupem iont do analyzátoru jsou urychleny pomocí iontové optiky. Magnetické pole, které rozptyluje ionty s ohledem na jejich hmotnost a energii, fokusuje ionty s odli-nými dráhami pohybu p ícházejícími ze vstupní -t rbiny. Elektrostatický analyzátor poté fokusuje ionty pouze s ohledem na jejich kinetickou energii do výstupní -t rbiny, za kterou je umíst n detektor.

V magnetickém analyzátoru působí na ionty, urychlené záporným potenciálem, magnetické pole. Dochází k zakřivení dráhy letu iontů. Vliv magnetické indukce a záporného potenciálu na ionty o hodnotě  $m/z$  vyplývá z rovnice (2) pro magnetický sektor:

$$m/z = B^2 r^2 / 2V, \quad (2)$$

kde  $B$  je magnetická indukce,  $V$  záporný potenciál,  $m$  hmotnost,  $z$  náboj a  $r$  poloměr trajektorie. Elektrostatický analyzátor fokusuje ionty bez ohledu na jejich hodnotu  $m/z$ , pouze podle jejich kinetické energie. Fokusaci iontů můžeme tedy vyjádřit (3) jako:

$$z \cdot E = m \cdot v^2 / r, \quad (3)$$

kde  $E$  je síla elektrostatického pole. Velkou výhodou sektorových přístrojů je, že umožňují provádět analýzy při velmi vysoké rozlišovací schopnosti (až nad  $R = 10\,000$ ). Takto velká rozlišovací schopnost umožňuje eliminaci vlnových spektrálních interferencí, se kterými se potýkáme například u kvadrupolových analyzátorů. K dosažení vysokého rozlišení tedy napomáhají mechanické tržebiny, umístěné před vstupem do analyzátoru a na jeho konci, před detektorem. Úhlu tohoto otvoru lze regulovat a tedy i ovlivňovat rozlišovací sílu přístroje. Pokud zmenšíme velikost tržebiny, dohází kromě zvýšení rozlišení i ke snížení průchodu iontů. Vyúžití velmi vysokého rozlišení tedy může znamenat snížení citlivosti a zhoršení mezí detekce. Velkou výhodou těchto analyzátorů je velmi vysoká citlivost. Při nastavení nízké rozlišovací síly lze dosáhnout u analytů až bilion countů za sekundu, kdežto u pozadí 0,1-0,2 cps (counts per second) odpovídá dopadům na detektor za sekundu). Nevýhodou těchto analyzátorů spoívá, ve srovnání s kvadrupólem, v pomalé skenovací rychlosti.

### 2.3.6.3. Pr letový analyzátor<sup>8</sup>

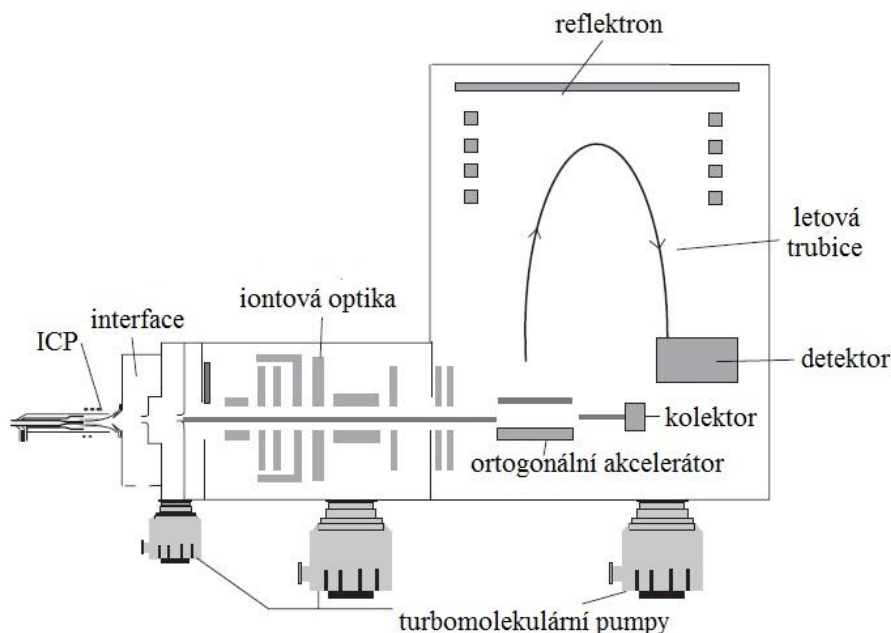
Je nejnovější z komerčně dostupných analyzátorů. Základním principem funkce těchto zařízení je, že kinetická energie  $E_K$  iontu je přímo úměrná jeho hmotnosti  $m$  a rychlosti  $v$  (4)

$$E_K = 1/2mv^2 \quad (4)$$

Uvažujme skupinu iontů s rozdílnou hmotností. Tímto je udržena prostřednictvím urychlovacího napětí  $U$  (1 keV) stejná kinetická energie, ale jejich rychlost bude rozdílná, závislejší na jejich hmotnosti. Ionty jsou separovány podle jejich poměru hmotnost k náboji  $m/z$  v časové doméně přes stálou letovou dráhu  $d$ . Tento vztah vyjadřuje následující rovnice(5):

$$m/z = 2Ut^2/d^2 \quad (5)$$

Z toho plyne, že po průletu analyzátozem dopadají na detektor nejdříve lehké, poté střední a nakonec ionty nejvyšší hmotnosti. Pro představu lze uvést, že nejlehčí ionty dopadají na detektor za 50  $\mu$ s, což umožňuje nasbírat 20 000 spekter za sekundu. Jedná se tedy bezesporu o nejrychlejší skenovací systém používaný v ICP-MS (Obr. 12).



Obr. 12. Schéma pr letového analyzátoru (převzato z cit.<sup>14</sup>)

Z komerčního hlediska se vyvíjely 2 varianty uspořádání pr letových analyzátorů. V ortogonálním uspořádání je letová trubice umístěna kolmo na iontový paprsek vycházející z plazmatu. V axiálním je pak paprsek iontů celou dobu veden přímo v ose do letové trubice. V současné době se vyvíjí uhl jen ortogonální uspořádání. Přetím nefl jsou ionty poslány do analyzátoru, jsou nejdříve elektrostaticky injektovány do letové trubice. U ortogonálního uspořádání je akcelerační potenciál aplikován v pravém úhlu k iontovému paprsku vycházejícímu z plazmatu. Výhodou TOF analyzátorů je simultánní podstata jejich separačního mechanismu, která ve výsledku vede ve vysokou rychlost analýzy, která je vyší nefl u kvadrupólu a sektorových přístrojů. Rozlišení se pohybuje v rozmezí 2000 ó 3000, v závislosti na vnitřním uspořádání a hmotnosti prvku, je tedy nižší nefl u sektorových analyzátorů.



## 2.3.7 Detektory

### 2.3.7.1. Elektronový násobi

Jde o analogii k fotonásobi i používanému v atomové absorpční spektrometrii. Namísto fotonů jsou zde detekovány dopadající ionty analytu. Elektronový násobi je tvořen systémem elektrod, na které je vložen rostoucí negativní potenciál. Ion přicházející do detektoru dopadá na první elektrodu a při dopadu dochází k vyrašení velkého množství sekundárních elektronů, ty jsou potenciálovým gradientem fokusovány na další elektrody a celý proces se opakuje. Elektronové násobičky mají 10 - 20 takovýchto dynod. Na konci násobičky tedy dochází k mnohonásobnému zesílení proudového signálu. Detektor bývá v tubice umístěn v poloze *off-axis*, aby bylo minimalizováno pozadí, vzniklé zářením a neutrálními částicemi přicházejícími ze zdroje<sup>8</sup>.

### 2.3.7.2 Kanálový elektronový násobi

Je konstrukční variantou elektronového násobičky. Jedná se o trubici (kufel) potaženou polovodičovým materiálem, na kterou je vložen rostoucí vysoký negativní potenciál a která nahrazuje systém elektrod. Ion analytu, přitahován negativním potenciálem, dopadá na stěnu trubice. Po vyrašení sekundárních elektronů, jsou tyto vedeny dále do trubice, kde opět dopadají na její stěny a dochází k dalšímu zesílení signálu<sup>8</sup>.

### 2.3.7.3 Faradayova klec

Samostatná Faradayova klec se používá jen u analýz, kde nejsou vyžadovány nízké detekční limity. Její pracovní rozsah začíná na  $10^4$  CPS, tedy při jejím použití, jako samostatného detektoru je citlivost značně snížena. Obvykle se Faradayova klec řadí za elektronové násobičky. Faradayova klec je však stále využívána v některých přístrojích s magnetickým sektorem<sup>8</sup>.

## 2.3.8 Interference v ICP-MS

### 2.3.8.1 Spektrální interference

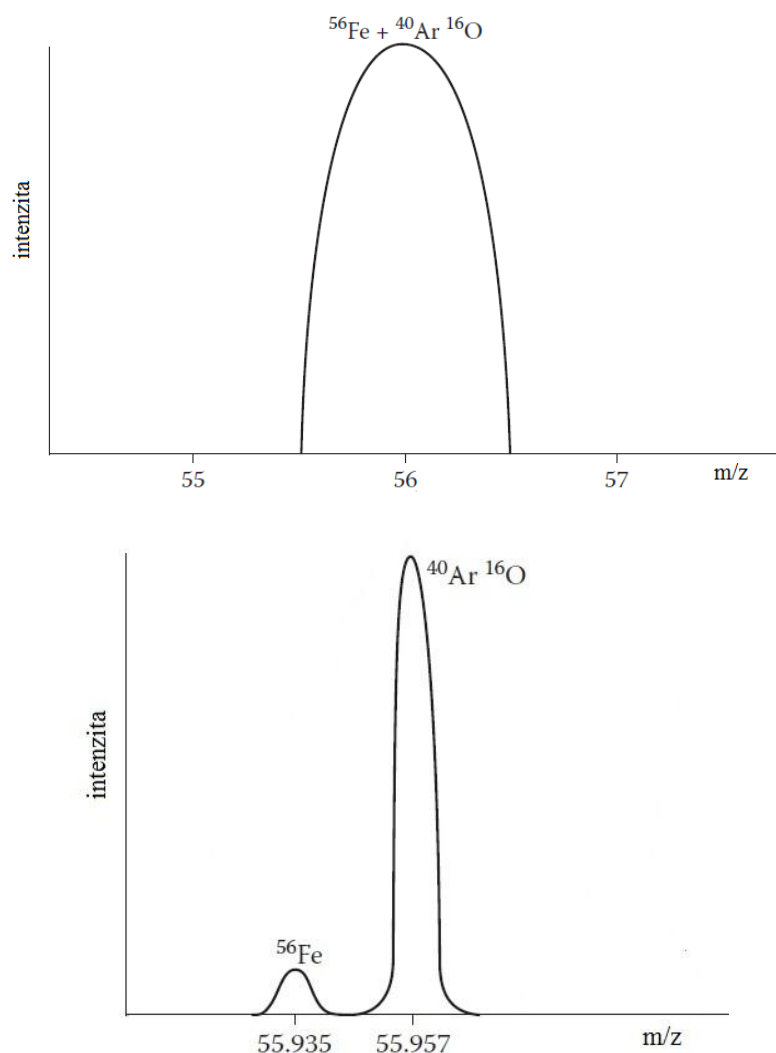
Jsou nejproblematictjím druhem interferencí, se kterými se i ICP-MS setkáváme. Existují 2 hlavní skupiny a to izobarické a polyatomické (molekulární) interference.

#### 2.3.8.1.1 Izobarické interference

Izobarickými interferencemi rozumíme situaci, kdy izotop některého prvku pítomného ve vzorku vytváří interferenci na stejné hodnotě hmotnosti jako sledovaný analyt. Příkladem může být vanad, který má dva izotopy na hmotnosti 50 a 51, ovšem na hmotnosti 50 poskytují signál i izotopy chromu a titanu. Tyto interference jsou řešeny pomocí korekčních matematických rovnic<sup>8</sup>.

#### 2.3.8.1.2 Polyatomické interference

Jedná se o nejastjím a nejproblematictjím druh interferencí. Tyto interference vznikají spojením dvou a více různých atomů, jejich výsledná hmotnost je poté stejná jako hmotnost sledovaného analytu. K tomu může docházet díky asociaci molekul rozpouštědla, vzorku, matrice, zmlfovacího plynu nebo také molekul kyslíku a dusíku ze vzduchu (Tab. I). Typickým a velmi běžným příkladem jsou interference, které vznikají kombinací argonu, pomocí kterého je udržováno plazma a který se používá jako zmlfovací plyn, s jinými atomy. Například při analýze vodných vzorků dochází k tvorbě polyatomického iontu  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ , který interferuje s izotopem železa  $^{56}\text{Fe}^+$  (Obr. 13). Argon může vytvářet interference i s atomy rozpouštědla, což jsou v tčinou minerální kyseliny. Problematickou interferencí může být ion  $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ , vznikající při použití kyseliny chlorovodíkové jako rozpouštědla, pokud chceme stanovit arzen, jehož jediný izotop se nachází právě na hmotnosti 75. Při použití kyseliny sírové jako rozpouštědla může docházet k tvorbě molekulárního iontu  $^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$ , který interferuje s nejintenzivnějším izotopem zinku  $^{64}\text{Zn}$  (cit.<sup>8</sup>).



**Obr. 13.** Srovnání polyatomické interference  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$  a  $^{56}\text{Fe}^+$  u p ístroje s kvadrupólem(naho e) a sektorovým analyzátozem(dole) (p evzato z cit.<sup>8</sup>)

Další typ spektrálních interferencí vznikají kombinací  $\text{H}^+$ ,  $^{16}\text{O}^+$ ,  $^{16}\text{OH}^+$  s atomy vzorku. Dochází ke vzniku hydrid , oxid a hydroxid p vodního prvku, což způsobuje zvýšení jeho hmotnosti o odpovídající hodnotu. Tyto interference vznikají v chladnějších zónách plazmy, před vstupem iont do interface. Nejastěji vznikají u prvk vzácných zemin, jelikož ty velmi ochotně tvoří molekulární částice, zejména pak oxidické ionty, které pak interferují s prvky téže skupiny. V podmínkách plazmového výboje mohou vznikat i dvojnásobně nabití ionty. Ty nesou, oproti standardně se tvořícím jednou nabitým iontům, dvojnásobný kladný náboj. A jejich izotopický pík je tedy posunut do oblasti poloviny hmotnosti. Množství tvořených dvojnásobně nabitých iontů závisí, podobně jako u oxidických iontů, na ionizačních podmínkách v plazmatu<sup>8</sup>.

izotop	matrice/rozpuštědlo	interference
$^{39}\text{K}^+$	$\text{H}_2\text{O}$	$^{38}\text{ArH}^+$
$^{40}\text{Ca}^+$	$\text{H}_2\text{O}$	$^{40}\text{Ar}^+$
$^{56}\text{Fe}^+$	$\text{H}_2\text{O}$	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$
$^{80}\text{Se}^+$	$\text{H}_2\text{O}$	$^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$
$^{51}\text{V}^+$	$\text{HCl}$	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$
$^{75}\text{As}^+$	$\text{HCl}$	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$
$^{28}\text{Si}^+$	$\text{HNO}_3$	$^{14}\text{N}^{14}\text{N}^+$
$^{44}\text{Ca}^+$	$\text{HNO}_3$	$^{14}\text{N}^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$
$^{55}\text{Mn}^+$	$\text{HNO}_3$	$^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^+$
$^{48}\text{Ti}^+$	$\text{H}_2\text{SO}_4$	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$
$^{52}\text{Cr}^+$	$\text{H}_2\text{SO}_4$	$^{34}\text{S}^{18}\text{O}^+$
$^{64}\text{Zn}^+$	$\text{H}_2\text{SO}_4$	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$
$^{63}\text{Cu}^+$	$\text{H}_3\text{PO}_4$	$^{31}\text{P}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$
$^{24}\text{Mg}^+$	Organics	$^{12}\text{C}^{12}\text{C}^+$
$^{52}\text{Cr}^+$	Organics	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$
$^{65}\text{Cu}^+$	Minerals	$^{48}\text{Ca}^{16}\text{OH}^+$
$^{64}\text{Zn}^+$	Minerals	$^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$
$^{63}\text{Cu}^+$	Seawater	$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$

**Tabulka I:** *Přehled vybraných izotopů a vlivu matrice a rozpouštědla na vznik polyatomických interferencí (převzato z cit. 8)*

### 2.3.8.2 Nespektrální interference

Jsou též nazývány matricový efekt. Vliv, jakým matrice působí při analýze vzorku, lze popsat třemi typy interferencí. Nejjednodušším je efekt transportu vzorku, jedná se o fyzikální potlačení signálu analytu, závisící na množství rozpuštěných pevných látek nebo koncentraci kyselin ve vzorku, což ovlivňuje velikost kapek aerosolu, formujících se ve zmlžovači. Další možností interference, je ovlivnění ionizačního procesu pomocí různých komponent matrice. Signál analytu mohou potlačit i vysoké koncentrace kyselin v roztoku vzorku. Nejobvyklejším způsobem potlačování těchto interferencí je využití interních standardů. Interní standard je třeba zvolit tak, aby odpovídal vlastnostem analytu, zejména

pak jeho hmotnosti. Při multielementární analýze se bývá používán kolik interních standardů. Které však nesmí být obsaženy ve vzorku<sup>15</sup>.

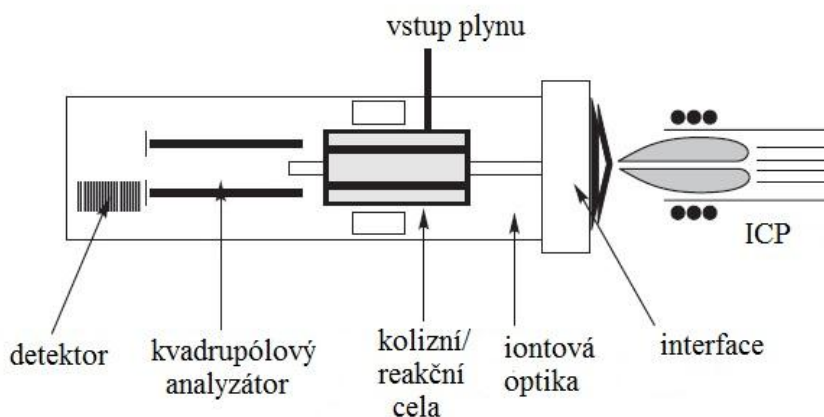
### 2.3.8.3. Eliminace interferencí

Moderní ICP-MS přístroje nabízí širokou škálu možností pro odstranění spektrálních interferencí. Velmi účinným je využití přístroje s vysokým rozlišením, díky němu je možné v přítomnosti interferencí dobře rozpoznat a eliminovat. U přístroje s kvadrupólovým analyzátozem je účinným nástrojem zajištění kolizních/reakčních celů. Další možností eliminace polyatomických interferencí je volba vhodného izotopu. Pro analýzu volíme takový izotop, který je co nejméně zatížen polyatomickou interferencí<sup>8,16</sup>. K odstranění izobarických interferencí se využívá korekčních matematických rovnic. Pokud na jedné hmotnosti mají izotopy dva prvky, počítá se celkový počet countů jako součet countů těchto jednotlivých izotopů prvků, od kterých se potom odečtou county z jiného izotopu jednoho z prvků, s přihlédnutím k procentuálnímu zastoupení jeho izotopů. Tyto rovnice lze použít i pro odstranění některých jednodušších polyatomických interferencí. Některé spektrální interference, lze odstranit i metodou tzv. studeného plazmatu. Používá se zejména v případech, kdy je vysoká intenzita interferencí a naopak velmi nízká koncentrace analytu. Tato metoda využívá plazmatu o nižší teplotě, které má odlišné ionizační podmínky, k eliminaci některých argonových polyatomických interferencí jako například  $^{38}\text{ArH}^+$ ,  $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ ,  $^{40}\text{Ar}^+$ , které ovlivňují stanovení prvků jako jsou: K, Ca a Fe. Dochází tedy i ke zlepšení detekčních limitů právě u těchto prvků, ale zároveň dochází i ke zhoršení parametrů pro ostatní prvky, tedy tato metoda se nehodí pro multielementární analýzu složitých matric<sup>8</sup>.

### 2.3.8.4. Kolizní/reakční cely

Hlavním účelem kolizní/reakční cely je eliminovat v plazmě vznikající polyatomické interference. Používá se v přítomnosti v kombinaci s kvadrupólovým analyzátozem. Je umístěna mezi interface (iontovou optikou) a kvadrupólovým analyzátozem (Obr. 14). Komerčně dostupných je celá řada variant kolizních/reakčních celů, které podle své konstrukce používají pro eliminaci interferencí různé plyny (helium, vodík, amoniak, metan) a mechanismy eliminace. Ionty, přicházející do cely, jsou do ní vtahovány pomocí RF pole multipólu (kvadrupól, hexapól, oktapól). Toto pole je nastaveno tak, aby nemá na ionty separační účinek, nefunguje tedy jako klasický kvadrupól, ale fokusuje ionty, které následně kolidují nebo

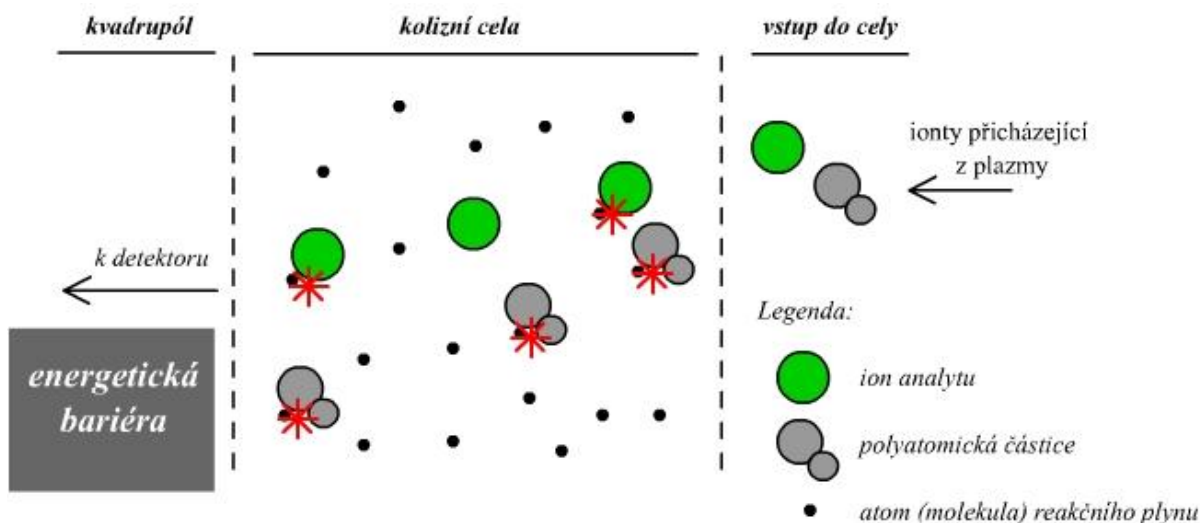
reagují s molekulami kolizního, reakčního plynu. Prostednictvím ady reakčních a kolizních mechanismů dochází pak ke konverzi polyatomických interferentů na neinterferující ionty nebo na jiné, které s daným analytem neinterferují<sup>8</sup>.



**Obr. 14.** Umístění kolizní/reakční cely v ICP-MS (převzato z cit.<sup>8</sup>)

#### 2.3.8.4.1. Kolizní cely

Jsou vybaveny vnitřinou hexapólem nebo oktapólem. Pro eliminaci polyatomických interferencí vyufflívají nereaktivní plyny a mechanismus diskriminace podle kinetické energie. Základním principem je vyufflití inertního plynu (obvykle helium) v kolizní cele k vytvoření iontů molekulových kolizí. Ionty vystupující z interface mají určitou kinetickou energii, záviselící na ionizačních procesech v plazmatu a jejich  $m/z$ . Pokud do kolizní cely vstoupí interferující ion, podstoupí adu srážek s kolizním plynem. Protože prostorový objem takového interferujícího iontu je obvykle větší než iontu analytu, podstoupí i větší množství srážek a tedy se více sníží i jeho kinetická energie. Pokud je vyrovnávací potenciál na vnitřním multipólu dobře nastaven dochází k nárazu interferujících iontů do energetické bariéry, ale ionty analytu, jejichž kinetická energie nebyla tak moc snížena, jsou umožněny přechod do detektoru (Obr. 15)<sup>8</sup>.



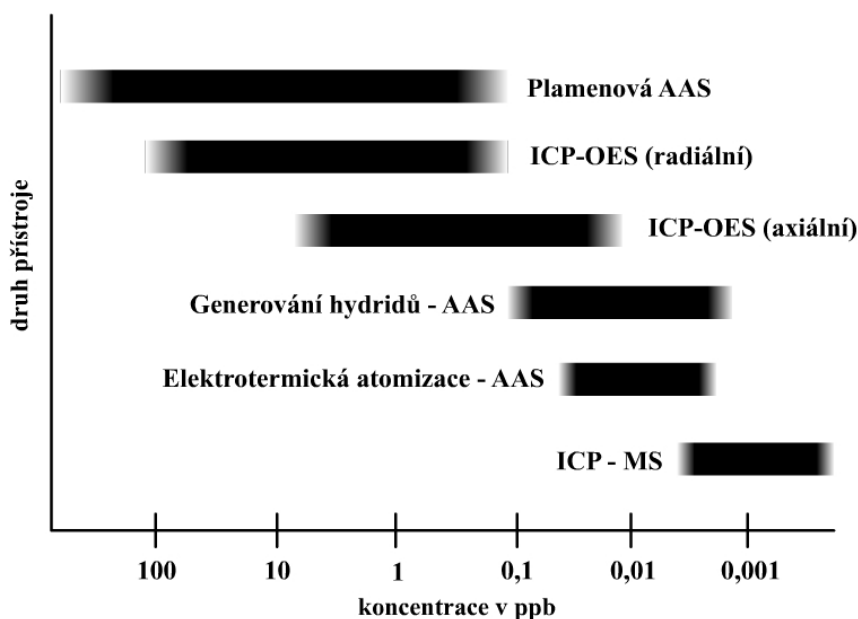
Obr. 15. Kolizí indukovaná disociace

#### 2.3.8.4.2. Reak ní cely

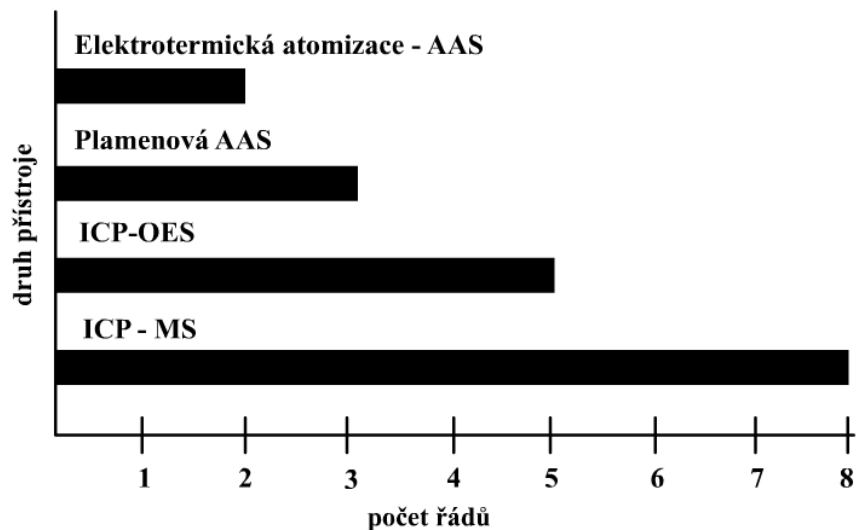
Jsou dal-í alternativou p i potla ování polyatomických interferencí. Podobn jako kolizní cely je umíst na p ed kvadrupólovým analyzátoem. Oproti kolizním celám v-ak vyuffívá jako multipól kvadrupól a vyuffívá ho jako selektivní hmotnostní filtr. Pouffívají se zde vysoce reak ní plyny jako amoniak, kyslík, metan. Molekuly plynu reagují s interferujícími ionty a p em ují je na neinterferující ástice, odli-né od analytu nebo na neutrální ástice. Analyzované ionty pak mohou vstoupit do hmotnostního analyzátoem bez p ítomnosti interferujících ástic. Dynamické reak ní cely vyuffívají kvadrupólu, protože má díky své symetrii lépe definované oblasti stability iont nefl hexapól a oktapól, a jelikož s kvadrupólem se jako s hmotnostním filtrem lépe manipuluje. Díky optimalizaci tohoto kvadrupólu je zamezeno reakcím vedoucím ke vzniku necht ných interferencí. Výhodou pouffítí vysoce reaktivních plyn je zvý-ení po tu ion-molekulových reakcí uvni t cely, což vede k rychlejšímu a efektivn j-ímu odstran ní interferen ních ástic<sup>8, 11, 17</sup>.

## 2.4 Srovnání spektrálních metod

Detekční limity (Obr. 15.), pracovní rozsah (Obr. 16.) a rychlost analýzy (Tab. II) závisí na konkrétních experimentálních podmínkách, nastavení, druhu a uspořádání použitého přístroje a atomizačních technik a na konkrétním prvku<sup>8</sup>.



Obr. 15. Srovnání detekčních limitů (převzato z cit.<sup>8</sup>)



Obr. 16. Srovnání pracovních rozsahů (převzato z cit.<sup>8</sup>)



použitá technika	počet analyzovaných prvků	trvání analýzy (min)	vzorky analyzované za hodinu (1 prvek)	vzorky analyzované za hodinu (5 prvků)	vzorky analyzované za hodinu (20 prvků)
Plamenová AAS	1	0,3	180	36	9
ETA-AAS (jednoprvková)	1	5	12	2-3	1
ETA-AAS (víceprvková)	2-6	5	12	12	3
ICP-OES	afl 70	3	20	20	20
ICP-MS	afl 70	3	20	20	20

**Tabulka II:** Srovnání rychlosti analýz (převzato z cit. 8)

## 2.5 Rozklady biologických matric<sup>18</sup>

Při rozkladu biologických látek dochází k nevratné destrukci. Rozklady, předcházející stanovení anorganických iontů ve vzorku, můžeme rozdělit do několika základních skupin, podle charakteru použitého postupu na:

- Rozklad na suché cestě (využívá se spalování, zpopelování)
- Rozklad na mokré cestě (zejména rozklady kyselinami s využitím ohřevu a zvýšeného i vysokého tlaku)
- Jiné typy rozkladů (např. fotolytický, enzymatický, atd.)

### Rozklad na suché cestě

Suchý rozklad se skládá z několika základních kroků: sušení, spalování, zpopelování a rozkladu popela. Klasická forma suchého rozkladu probíhá za atmosférického tlaku a v otevřeném systému, což může mít za následek ztrátu některých letkých analytů (např. Cd, Hg, Pb, Se, As atd.), ale i netěkavých (Cr, Fe). Tento druh rozkladu je jednoduchý, finančně nenáročný a umožňuje rozkládat v krátkém množství vzorků současně. Výhodou je také možnost rozkladu v krátkých naválcích, což napomáhá k eliminaci případného vlivu nehomogenity vzorku. Nevýhodou je možnost kontaminace z okolního prostředí, ale i vzájemné kontaminace současně rozkládaných vzorků, časová náročnost a možnost ztráty letkých i netěkavých analytů. Dalšími variantami jsou suchý rozklad v polo uzavřeném a uzavřeném systému, kde se využívá zvýšených nebo vysokých tlaků.

## Rozklad na mokré cest

Mokrý rozklad je velmi rozšířeným druhem rozkladu biologických látek. Vyuffívá oxidačních vlastností koncentrovaných kyselin, které lze umocnit přidáním dalších oxidačních inidel (např.  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). K tomuto účelu se nejčastěji vyuffívá koncentrovaná kyselina dusičná, sírová, chloristá a různé jejich kombinace. Kromě charakteru rozkládané látky a rozkladných inidel, má majoritní vliv teplota, při níž rozklad probíhá. Používané kyseliny v tání nemají dostatečně vysoký bod varu, často se tedy vyuffívá zvýšeného i vysokého tlaku. Rozklady na mokré cest lze rozdělit podle toho, zda probíhají v otevřeném nebo uzavřeném systému a podle charakteru dodávaného tepla na ohřev konvenční a mikrovlnný i ve smíšených systémech.

Pro stopovou a ultrastopovou anorganickou analýzu biologických látek je nejpraktičtější mokrý rozklad v uzavřeném systému, podporovaný mikrovlnným zářením. Oproti ostatním postupům je minimalizována možnost kontaminace z okolního prostředí. Nevýhodou jsou poměrně nízké hmotnosti navážky a nemožnost postupného přidávání inidel.

## 2.6 Vyuffití spektrálních metod v analýze klinických materiálů

Ke stanovení Ti, V, Cr, Co, Ni a Mo v referenčních materiálech krve a moči vyuffil Alejandro Sarmiento-González a kol. HR-ICP-MS (MAT Element) a ORS-ICP-MS (ORS - oktapólový reakční systém) (Agilent 7500c) s kolizní/reakční celou. Bylo testováno, jak si tyto přístroje poradí s eliminací polyatomických interferencí, zejména u titanu a vanadu. Certifikované referenční materiály krve (Seronom™ Trace Elements Whole Blood Level 2) a moči (Seronom™ Trace Elements Urine Level 2) byly podrobeny mikrovlnnému rozkladu za pouflití 2 ml kyseliny dusičné a 1 ml peroxidu vodíku v teflonových nádobách a poté desetkrát zedny ultra istou vodou. Vzorky moče byly pouze desetkrát zedny. Do všech vzorků byly přidány interní standardy Ga a Y. Při pouflití HR-ICP-MS byla vyuffita střední rozliovací schopnost  $R = 3000$ , která postačuje k rozlišení v t-iny polyatomických interferencí. Paralelně probíhající analýzy u ORS-ICP-MS bylo vyuffito v kolizní/reakční cele plyn helia a vodíku a jejich rzných prtok k dosažení nejlepších možných detekčních limitů. Výsledky analýz referenčních materiálů byly srovnány s certifikovanými hodnotami. Ve všech případech byly získány přijatelné hodnoty, ovšem u ORS-ICP-MS nedošlo k úplnému potlačení polyatomických interferencí. Výsledky této práce ukazují, že vyuffití kolizní/reakční cely je pro analýzu těchto kovů ve složitě matrici jako je krev a moč nezbytné. Stejně tak, že střední rozliovací síla je při pouflití HR-ICP-MS postačující pro eliminaci v t-iny spektrálních interferencí. Tato práce poskytuje přehledné srovnání hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením a přístroje s kolizní/reakční celou vyuffívající kvadrupólového analyzátoru (Tab.III, Tab.IV)<sup>19</sup>.

izotop	ORS-ICP-MS		HR-ICP-MS
	vypnutá kolizní cela	zapnutá kolizní cela	(R = 3000)
<sup>47</sup> Ti	100	70	120
<sup>51</sup> V	350	3	30
<sup>52</sup> Cr	450	6	70
<sup>59</sup> Co	7	10	40
<sup>60</sup> Ni	30	50	130
<sup>95</sup> Mo	250	260	215

**Tabulka III:** Srovnání detekčních limitů (ng/l)

izotop	certifikovaná hodnota (U)	ORS-ICP-MS		HR-ICP-MS
		vypnutá kolizní cela	zapnutá kolizní cela	(R = 3000)
<sup>47</sup> Ti	2,5 (0,1)	400,7	338,7	2,3
<sup>51</sup> V	3,7 (0,6)	6,1	4,0	3,3
<sup>52</sup> Cr	5,7 (0,6)	40,0	7,3	6,1
<sup>59</sup> Co	5,2 (0,6)	5,7	5,5	5,3
<sup>60</sup> Ni	6,8 (1,7)	5,2	5,9	4,8
<sup>95</sup> Mo	6,0 (0,7)	7,4	6,0	7,3

**Tabulka IV:** Srovnání analýzy referenčního materiálu krve (ng/l)

Ivo Iavicoli a kol. sledovali koncentrace kobaltu, chromu, manganu, molybdenu a niklu u pacientů, kteří podstoupili implantaci endoprotézy s párováním kov-kov. K získání výsledků bylo použito HR-ICP-MS. Byla použita kalibrace s použitím standardního přídatku. Sérum, získané z krve, bylo zředěno 1:5 a spikováno standardními roztoky. Ke každému vzorku byl přidán interní standard indium. Molybden byl stanoven v módu nízkého rozlišení na hmotnosti 100 namísto 98 k omezení interference z <sup>40</sup>Ar<sup>58</sup>Fe. Kobalt, chrom, mangan a nikl byly stanoveny při rozlišení R=3000, pro eliminaci dvojité nabitých a polyatomických interferentů. Získané detekční limity jsou uvedeny níže (Tab. V)<sup>20</sup>.

prvek	detekční limit	
	serum	mo
Co	0,02	0,01
Cr	0,02	0,02
Mn	0,03	0,01
Mo	0,05	0,40
Ni	0,01	0,03

**Tabulka V:** detekční limity (μg/l)

Peter Heitland a Helmut D. Köster monitorovali 37 stopových prvků ve vzorcích krve u obyvatel severního Německa. Stanovení bylo prováděno hmotnostním spektrometrem s oktapólovou kolizní/reakční celou. Pro každý prvek bylo použito 7 kalibračních roztoků o koncentraci 0 a 0,2 μg/l, pro Cs, Ba, Mn 5 kalibračních roztoků 0 a 2 μg/l, pro Cu, Zn, Rb 0 a 100 μg/l, pro Se, Sr a B 0 a 10 μg/l. Při měření byl použit interní standard terbium, s výslednou koncentrací 2,5 μg/l v každém roztoku. Pro ověření metody bylo použito několik druhů referenčních materiálů. Vzorky krve byly desetkrát zředěny 0,1% Tritonem-X-100 a 0,5% roztokem hydroxidu amonného. Aby nedocházelo k ucpání zmlflovací, byl použit zmlflovací Babingtonova typu a plazmová hlavice s průměrem vnitřní trubice 2,5 mm

a pr tokem vzorku 0,4 ml/m. Limity kvantifikace se pohybovaly v rozmezí 0,003  $\mu\text{g/l}$  pro  $^{238}\text{U}$  do 0,1  $\mu\text{g/l}$  pro  $^{69}\text{Ga}$ . Pro odstranění spektrálních interferencí byla pouflita kolizní/reakční celá s pouflitím helia a vodíku jako kolizního/reakčního plynu<sup>21</sup>.

Beatrice Bocca a kol. se v novaly stanovení referenčních hodnot Cu, Mn, Se a Zn v krvi u dospělé populace na Sardinii v Itálii. Ke stanovení byl vyuffit hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením. Ke vzorku krve o objemu 1ml byly přidány 2ml superisté koncentrované kyseliny dusičné a poté zpracovány pomocí mikrovlnného rozkladu. Při každém kroku byl rozlofen i jeden referenční materiál a jeden blank. Pro analýzu Cu, Mn a Zn bylo pouflito st ední rozlišení ( $R = 4000$ ) a pro analýzu Se vysoké ( $R = 10000$ ). Při analýze byly pouflity interní standardy Ga a In. Získané limity kvantifikace byly 15  $\mu\text{g/l}$  pro Cu, 0,15  $\mu\text{g/l}$  pro Mn, 2,80  $\mu\text{g/l}$  pro Se a 30  $\mu\text{g/l}$  pro Zn (cit.<sup>22</sup>).

Hung-Yi Chuang a kol. se zabývali stanovením olova, manganu, selenu a arsenu v lidské krvi v souvislosti s poruchami sluchu. K měření byl pouflit hmotnostní spektrometr s kvadrupólovým analyzátozem. Vzorky krve byly bez předchozího rozkladu kyselinami pouze p tkrát z ed ny Tritonem-X-100 (cit.<sup>23</sup>).

C. Patrick Case a kol. se zabývali stanovením Mo, Co, Cr a Ni v krvi v souvislosti s pacienty s úplnou ky elní nebo kolenní náhradou. Ke stanovení byl pouflit hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením. Vzorky krve byly desetkrát z ed ny roztokem 10 mol/l Tritonu-X-100, 0,0002 mol/l EDTA, a 0,01 mol/l hydroxidu amonného. Ke vzork m bylo online přidáváno rhodium jako interní standard. K eliminaci polyatomických interferencí bylo pro stanovení pouflito st ední rozlišení ( $R = 3400$ ). Byly zjiřeny detekční limity 0,06  $\mu\text{g/l}$  pro chrom, kobalt, a molybden a 0,30  $\mu\text{g/l}$  pro nikl. Pouflité kalibrační roztoky m ly koncentraci 0,1 - 1  $\mu\text{g/l}$  (cit.<sup>3</sup>).

Ying Wang a kol. se zabývaly stanovením stopových prvků (Cd, Pb, Zn, Cu, Fe, Mn, Se, I) ve strav , krvi, moči a výkalech ěnských mufl . K 0,5ml krve bylo v teflonových kelímcích přidáno 1,5 ml kyseliny dusičné a bylo ponecháno po 12 hodin při laboratorní teplotě a poté bylo přidáno 0,5 ml peroxidu vodíku. Poté byl proveden mikrovlnný rozklad a k takto rozloženým vzork m bylo přidáno 7 ml deionizované vody. Stanovení bylo provedeno pomocí ICP-MS s dynamickou reakční celou. Ke vřem roztok m byl přidán vnitní standard rhodium tak, aby jeho konečná koncentrace byla 1  $\mu\text{g/l}$ . Získané detekční limity byly 0,003

$\mu\text{g/l}$  pro  $^{111}\text{Cd}$ ,  $0,01 \mu\text{g/l}$  pro  $^{208}\text{Pb}$ ,  $0,06 \mu\text{g/l}$  pro  $^{66}\text{Zn}$ ,  $0,011 \mu\text{g/l}$  pro  $^{63}\text{Cu}$ ,  $0,9 \mu\text{g/l}$  pro  $^{56}\text{Fe}$ ,  $0,008 \mu\text{g/l}$  pro  $^{55}\text{Mn}$ ,  $0,261 \mu\text{g/l}$  pro  $^{78}\text{Se}$  a  $0,021 \mu\text{g/l}$  pro  $^{127}\text{I}$  (cit.<sup>24</sup>).

Stephen J. Genuis a kol. monitorovali toxické prvky (As, Al, Bi, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, Th, U, Zn) pomocí ICP-MS v krvi, moči a potu. K 1 ml krve byl přidán 1 ml kyseliny dusičné a byl proveden mikrovlnný rozklad po dobu 60 minut a výkonu 600 W. Takto upravený vzorek byl zředěn na 10 ml deionizovanou vodou a byly přidány interní standardy luthetium a indium. Ke stanovení byl použit hmotnostní spektrometr s vysokým rozlišením. Detekční limity se u většiny prvků pohybovaly mezi  $0,02$  a  $0,5 \mu\text{g/l}$ , ovšem u Al, Cu, Se, Zn od  $1 - 2 \mu\text{g/l}$  (cit.<sup>25</sup>).

Ilija Rodushkin a kol. stanovovali některé málo zastoupené kovy (Y, Zr, Nb, Ru, Rh, Pd, Ag, Sb, Te, Hf, Ta, W, Re, Os, Ir, Pt, Au, Tl, Bi, U) v ultrastopových koncentracích v moči a krevním séru. Vzorky séra byly desetkrát naředěny 2 % kyselinou chlorovodíkovou. Do vzorku a standardu bylo přidáno jako interní standard indium o koncentraci  $50 \mu\text{g/l}$ . Ke stanovení byl použit spektrometr s vysokým rozlišením v módu nízkého ( $R=350$ ) a vysokého ( $R=10\,000$ ) rozlišení. Díky použití velmi čistých rozpouštědel a vody bylo dosaženo kvantifikačních limitů pod koncentrační hladinou  $\text{ng/l}$  (cit.<sup>26</sup>).

Bruno Lemos Batista a kol. použili hmotnostní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem s kvadrupólovým analyzátelem a dynamickou reakcí celou ke stanovení As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Pb, Se, Tl, V a Zn v krvi. Použitá metoda vyžadovala pouze  $100 \mu\text{l}$  krve, která byla zředěna 1:50 roztokem 0,01% (v/v) Tritonu-X-100 a 0,5% (v/v) kyselinou dusičnou a  $10 \mu\text{g/l}$  jako interní standard vyuffitého rhodia a iridia. Dynamické reakční cely byly vyuffity pro stanovení Cr, Cu, V a Zn a jako reakční plyn byl použit amoniak. Dosažené detekční limity byly  $14 \text{ ng/l}$  pro As;  $3 \text{ ng/l}$  pro Cd;  $11 \text{ ng/l}$  pro Co,  $7 \text{ ng/l}$  pro Cr,  $280 \text{ ng/l}$  pro Cu;  $9 \text{ ng/l}$  pro Mn,  $3 \text{ ng/l}$  pro Pb,  $264 \text{ ng/l}$  pro Se,  $0,7 \text{ ng/l}$  pro Tl,  $6 \text{ ng/l}$  pro V, a  $800 \text{ ng/l}$  pro Zn (cit.<sup>27</sup>).

Claudia Gundacker a kol. použili atomovou absorpční spektrometrii s Zeemanovou korekcí pro stanovení selenu a rtuti v krvi. Selen byl stanoven s vyuffitím generování hydridů a rtu metodou studených par. Ke 2 ml vzorku krve bylo přidáno 2 ml 65% kyseliny dusičné a 0,75 ml peroxidu 30% vodíku podrobeny mikrovlnnému rozkladu. Dosažené detekční limity byly  $0,27 \mu\text{g/l}$  pro rtu a  $0,1 \mu\text{g/l}$  pro selen<sup>2</sup>.

Mehwish Saghir, Nazia Shaheen, Munir H. Shah využili atomové absorpční spektrometrie k analýze Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, Pb a Zn v krvi. K rozkladu vzorků byla použita směs kyseliny dusičné a chlorovodíkové v poměru 1:1 (v/v). Dosahené detekční limity pro tyto prvky byly od 1 do 10 µg/l (cit.<sup>28</sup>).

Adnan Massadeh a kol. stanovovali Cd, Pb, Cu, Zn a Se v lidské krvi pomocí optické emisní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem. Ke 3 ml vzorků krve byly přidány 3 ml kyseliny dusičné a 1 ml kyseliny chloristé. Tato směs byla vysušena při 105°C. Poté bylo přidáno 5 ml 1% kyseliny dusičné a směs byla zfiltrována. Filtrát byl zředěn na 25 ml. Limity detekce byly pro Cd; Pb; Cu; Zn a Se 0,2; 1,5; 0,9; 0,2 a 4 µg/l (cit.<sup>29</sup>).

A. Han a kol. aplikovali optickou emisní spektrometrii s indukčně vázaným plazmatem a ICP-MS ve spojení s laserovou ablací na analýzu vybraných prvků u klinických vzorků u pacientů s arterosklerózou. Analýza byla prováděna přímo na odebraných stěnách pokozené artérie a v krevním séru. Pro analýzu distribuce prvků pomocí LA-ICP-MS byla použita cévní stěna o rozměrech přibližně 5x5 mm a na té byl proveden sken v jedné linii na tucet různých místech. Vzorky (200 - 1000 mg) pro kvantitativní prvkovou analýzu pomocí ICP-OES byly nejdříve vysušeny a poté se podrobily mikrovlnnému rozkladu pomocí kyseliny dusičné. Nakonec byly zředěny vodou na objem 10ml. Bylo zjištěno, že arteroskleróza zejména způsobuje změnu distribuce prvků na stěně artérie<sup>30</sup>.

### 3. EXPERIMENÁLNÍ ÁST

#### 3.1 Chemikálie, p ístroje a pom cky

##### 3.1.1 Chemikálie

- certifikované referen ní materiály jednoprvkových vodných roztok kalibra ních standard o koncentraci  $1,000 \pm 0,002$  g/l (Ni, Pb, Al) v 2 % HNO<sub>3</sub> (v/v) o istot 99,999 %, Analytika, spol. s.r.o., Praha
- certifikovaný referen ní materiál vodného roztoku kalibra ního standardu o koncentraci  $1,000 \pm 0,002$  g/l (Ti) v 5 % HNO<sub>3</sub> + 1 % HF (v/v) o istot 99,98 %, Analytika, spol. s.r.o., Praha
- certifikovaný referen ní materiál vodného roztoku kalibra ního standardu o koncentraci  $1,000 \pm 0,002$  g/l (Nb) v 5 % HNO<sub>3</sub> + 1 % HF (v/v) o istot 99,9+ %, Analytika, spol. s.r.o., Praha
- certifikovaný referen ní materiál vodného roztoku kalibra ního standardu o koncentraci  $1,000 \pm 0,002$  g/l (Co) v 2 % HNO<sub>3</sub> (v/v) o istot 99,995 %, Analytika, spol. s.r.o., Praha
- certifikovaný referen ní materiál vodného roztoku kalibra ního standardu o koncentraci  $1,000 \pm 0,002$  g/l (Cr) v 2 % HCl (v/v) o istot 99,995 %, Analytika, spol. s.r.o., Praha
- certifikovaný referen ní materiál smí-eného roztoku interních standard o koncentraci  $10 \pm 0,1$  mg/l (Bi, In, Tb, Y) v 5 % HNO<sub>3</sub> (v/v) Analytika, spol. s.r.o., Praha
- peroxid vodíku (30 %) pro stopovou analýzu, Analytika, spol. s.r.o., Praha
- kyselina dusi ná (67 %), Analpure, pro stopovou analýzu, Analytika, spol. s.r.o., Praha
- Tuning Solution for ICP-MS 7500cs, Agilent Technologies, USA
- matricový certifikovaný referen ní materiál Seronom<sup>TM</sup> Trace Elemnts Whole Blood L-3, (REF 210305, LOT 1003193), SERO AS, Norsko
- matricový certifikovaný referen ní materiál Seronom<sup>TM</sup> Trace Elemnts Whole Blood L-1 (REF 210105, LOT 1003191), SERO AS, Norsko



- matricový certifikovaný referenční materiál Seronom<sup>TM</sup> Trace Elements Urine (REF 210205, LOT NO2525), SERO AS, Norsko

- Deionizovaná voda

### 3.1.2 Pístroje

- ICP-MS 7700x Series, Agilent Technologies, USA

- atomový absorpční spektrometr Avanta, GBC, Austrálie

- elektronické váhy ABJ 220-4M, KERN & Sohn GmbH, Německo

- mikrovlnný laboratorní systém mls 1200 mega, Milestone, Itálie

- přístroj pro přípravu deionizované vody, Direct Q VV Millipore, Francie

Součástí dvoupaprskového atomového absorpčního spektrometru Avanta byl elektrotermický atomizátor GF 3000 s automatickým dávkováním vzorků PAL 3000. Zdrojem záření byly výbojky s dutou katodou pro analýzu Cr, Ni. Korekce pozadí byla zajištěna prostřednictvím deuteriové výbojky.

ICP-MS bylo vybaveno mikrokoncentrickým zvlhčováním GE Micromist, chlazenou Scottovou mlhovou komorou, niklovými kónusy a kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem. Byl použit autosampler ASX-500 Series. Pro stanovení Ti, V, Co, Cr, Ni, Nb byla použita ORS3 reakční kolizní cela s kolizním plynem He (čistota 5,5; SIAD). Při analýzách byl použit Argon (čistota nejméně 4,6; zásobník Euro-Cyl 230; SIAD).

### 3.1.3 Pomůcky

- automatické pipety Finnpipe (1 - 5 ml, 100 - 1000 µl, Thermo SCIENTIFIC)

- mineralizační teflonové kelímky s víčky

- skleněné laboratorní nádoby (odměrné bačky 10, 25 ml, nálevky)

- plastové laboratorní nádoby (kelímky, zkumavky, pipetovací pičky)

Plastové i skleněné nádoby, používané k přípravě standardních roztoků a vzorků, bylo před použitím ponecháno 24h v 10 % roztoku kyseliny dusičné. Poté bylo několikrát omyto

deionizovanou vodou a vysušeno v sušárně. Skladováno bylo v platových sáčkích pro zamezení kontaminace z okolního prostředí.

### **3.1.4 Analyzované vzorky**

Vzorky byly odebrány doc. MUDr. Jiřím Gallem, Ph.D, p ednostou Ortopedické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc, p i operacích pacient ů s kloubní náhradou. Byla odebírána kloubní tekutina - výpotek. K odb ru byly pouffity plastové injek ní st íka ky s jehlou, po odb ru byly uzav eny plastovou zátkou. Po p evozu do laborato e byly uchovávány v mrazni ce p i teplot - 20 •C.

Prvky ur ené k analýze (Al, Ti, V, Cr, Co, Ni, Nb, Pb) byly vybrány po konzultaci s doc. MUDr. Jiřím Gallem, Ph.D. Jedná se o prvky, ze kterých se skládají nej ast ji pouffované kloubní náhrady, a které se v pr b hu pouffování t chto náhrad mohou uvol ovat.

## **3.2 Pouffité postupy**

### **3.2.1 P íprava vzork**

Každý vzorek byl p ed zpracováním ponechán cca 60 minut p i laboratorní teplot (do rozmrznutí). Z plastové st íka ky byla odejmuta zátk a množství vzorku o objemu cca 2 ml bylo p evedeno do plastového kelímku. Odtud byl pipetou odebrán 1 ml vzorku, p eveden do p edem zváffleného mineraliza ního teflonového kelímku, jenfl byl znovu zváfflen, aby bylo zamezeno chybám p i pipetování pom rn viskózního materiálu. Do kelímku se zváffleným vzorkem byly p idány 2 ml koncentrované kyseliny dusi né a 1 ml peroxidu vodíku. Kelímek byl ponechán 5 minut p i laboratorní teplot a takto p ípravené vzorky byly podrobeny mikrovlnnému rozkladu. Slepý pokus byl p ípraven stejným postupem jako vzorky.

### **3.2.2 P íprava referen ního materiálu**

P i p íprav referen ního materiálu bylo postupováno podle návodu dodaného výrobcem. Po vyjmutí z mrazni ky byl ponechán p i laboratorní teplot . Po odstran ní -roubovacího uzáv ru byla gumová zátk a mírn povytaffena tak, aby bylo umoffn no p ístupu vzduchu. Poté byla odejmuta a pipetou byly p idány 3ml deionizované vody. Poté byla lahvi ka uzav ena a ponechána v klidu po dobu 30 minut. Nakonec byl roztok promíchán mírným otá ením.

Pipetou byl odebrán 1 ml referenčního materiálu a dále bylo postupováno jako při přípravě vzorku.

### 3.2.3 Rozklad vzorku a referenčního materiálu

K rozkladu vzorku a referenčního materiálu byl použit mikrovlnný rozkladný systém Milestone, který umožňuje rozkládat v –esti teflonových kelímcích soubřím. K ádnému rozkladu analyzovaného materiálu byl použit následující rozkladný program (Tab. VI).

íslo kroku	as (min)	výkon (W)
1	2	250
2	2	0
3	5	400
4	2	0
5	2	400
6	1	0
7	7	600

**Tabulka VI:** Rozkladný program

Po ukonění rozkladu bylo vykáno cca 60 minut, než kelímky dostatečně vychladly (přibližně na laboratorní teplotu). Poté byl rozložený roztok kvantitativně převeden z kelímku do sklených 10 ml odměrných baněk a doplněn deionizovanou vodou po rysku. Následně byl převeden pro potřeby analýzy do 10 ml plastových zkumavek, kompatibilních se sloty v autosampleru u ICP-MS. Pro potřeby analýzy pomocí AAS byl vzorek převeden do malých plastových kelímek, kompatibilních s autosamplerm PAL 3000. Mineralizaci plastové kelímky byly po použití důkladně promyty destilovanou vodou a celý proces mineralizace byl opakován se 3 ml koncentrované kyseliny dusičné (čistící krok).

### 3.2.4 Příprava kalibračních roztoků a interního standardu

K přípravě jednotlivých kalibračních roztoků byly použity zásobní jednoprvkové roztoky kalibračních standardů o výchozí koncentraci 1 g/l. K ední byly používány 25 ml sklené bačky, plastové kelímky a –pičky, předem připravené pro stopovou analýzu. V jednom kroku bylo použito maximálně 100 násobné ední. Ze všech jednoprvkových standardů byla nejprve vytvořena směs stanovovaných prvků o koncentraci 10 mg/l a tak pak byla dále

ed na na pot ebné koncentrace. Výsledný kalibra ní roztok byl okyselen pomocí kyseliny dusi né na kone nou koncentraci odpovídající p ídavku kyseliny dusi né v analyzovaných vzorcích a referen ních materiálech. Pro stanovení vybraných prvk byly pouflity kalibra ní roztoky o výsledné koncentraci 0,1; 1; 10 a 100 µg/l. Interní standard, obsahující prvky Bi, In, Tb a Y, byl z ed n na koncentraci 100 µg/l a p eveden do plastové zásobní láhve.

### 3.3 Pouflité metody

#### 3.3.1 Atomová absorp ní spektrometrie

Ke stanovení Cr a Ni v certifikovaných referen ních materiálech Seronom™ Trace Elements Whole Blood L-1 a Seronom™ Trace Elements Whole Blood Urine, byla pouflita atomová absorp ní spektrometrie s elektrotermickou atomizací (ETA-AAS). Pro dávkování slepých pokus , referen ních materiál a kalibra ních standard byl pouflit automatický podava . Každý roztok byl prom en t ikrát. Ke kvantitativnímu vyhodnocení byla pouflita metoda kalibra ní k ivky (Tab. VII). Byly pouflity následující parametry (Tab. VII, Tab. VIII, Tab. IX).

prvek	kalibra ní roztoky (µg/l)	vlnová délka (nm)	í ka -t rbiny (nm)	řhavící proud (mA)
Cr	2,5 - 10	357,9	0,2	6,0
Ni	2,5 - 10	232,0	0,2	4,0

**Tabulka VII:** Základní parametry a kalibra ní roztoky pro ETA-AAS

fáze teplotního programu	teplota (°C)	doba nárustu teploty (s)	doba drfění teploty (s)	typ plynu
1. su-ení	100	10,0	5,0	Ar
2. su-ení	120	5,0	10,0	Ar
3. rozklad	800	10,0	10,0	Ar
4. rozklad	800	0,0	1,0	-
5. atomizace	2200	0,7	3,0	-
6. í-t ní	2600	1,0	2,0	Ar

**Tabulka VIII:** Parametry teplotního programu pro chrom

<b>fáze teplotního programu</b>	<b>teplota (°C)</b>	<b>doba nárůstu teploty (s)</b>	<b>doba drfění teploty (s)</b>	<b>typ plynu</b>
1. sušení	90	5,0	5,0	Ar
2. sušení	130	5,0	10,0	Ar
3. rozklad	900	10,0	10,0	Ar
4. rozklad	900	0,0	1,0	-
5. atomizace	2400	1,0	2,0	-
6. i-t ní	2600	1,0	2,0	Ar

**Tabulka IX:** Parametry teplotního programu pro nikl

### 3.3.2 ICP-MS

Hmotnostní spektrometrie s induk n vázaným plazmatem byla použita pro stanovení Al, Ti, V, Cr, Co, Ni, Nb, Pb v kloubních tekutinách (výpotcích) a certifikovaném referenčním materiálu Seronom<sup>TM</sup> Trace Elements Whole Blood L-3 a Seronom<sup>TM</sup> Trace Elements Whole Blood L-1. Ke stanovení vybraných prvků bylo použito dvou m ících módů. Ke stanovení Al a Pb nebylo využito kolizní cely a ke stanovení Ti, V, Cr, Co, Ni a Nb byla použita oktapólová kolizní cely, kterou procházelo jako kolizní plyn helium. Základní podmínky měření jsou shrnuty v následujících tabulkách (Tab. X, Tab. XI).

Plazma	P íkon generátoru	1550 W
Pr toky Argonu	Vn j-í plazmový kanál	14,95 l/min
	St ední plazmový kanál	0,9 l/min
	Vnit ní plazmový kanál	1,09 l/min
Vstup vzorku	Rychlost erpání	0,1 rps
Pozice plazmové hlavice	Hloubka	8 mm
	Vertikální pozice	0,1 mm
	Horizontální pozice	-0,3 mm
Iontová optika	varianta	x-Lens
Nastavení o ek(bez plynu)	Extract 1	0 V
	Extract 2	-195 V
	Vstup	-30 V
	výstup	-50 V
Nastavení o ek(He)	Extract 1	0 V
	Extract 2	-195 V
	Vstup	-40 V
	výstup	-60 V
Nastavení cely (He)	Pr tok helia	4,3 ml/min
	Energetická diskriminace	5 V
Nastavení sb ru dat	Akvizi ní mód	Spektrum
	Peak pattern	1 bod
	Integra ní as/hmota	(viz. Tab.XI)
	Po et replik na m ení	3

**Tabulka X: Podmínky m ení ICP-MS**

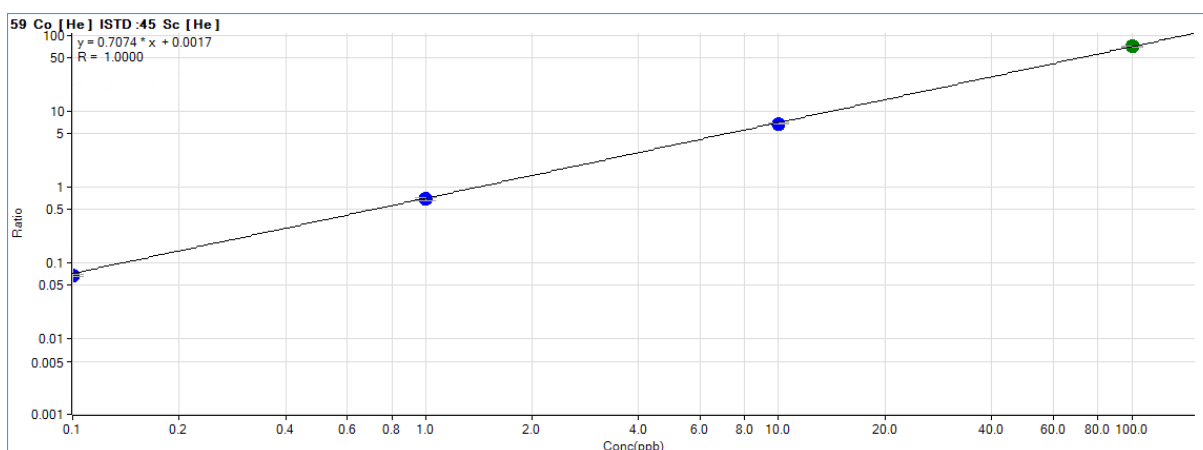
izotop	m ící mód	integra ní as/hmota (s)
<sup>27</sup> Al	Bez plynu	0,1
<sup>47</sup> Ti	He	0,1
<sup>51</sup> V	He	0,1
<sup>52</sup> Cr	He	0,3
<sup>59</sup> Co	He	0,3
<sup>60</sup> Ni	He	0,3
<sup>93</sup> Nb	He	0,3
<sup>208</sup> Pb	Bez plynu	0,3

**Tabulka XI: Integra ní as/hmota ICP-MS**

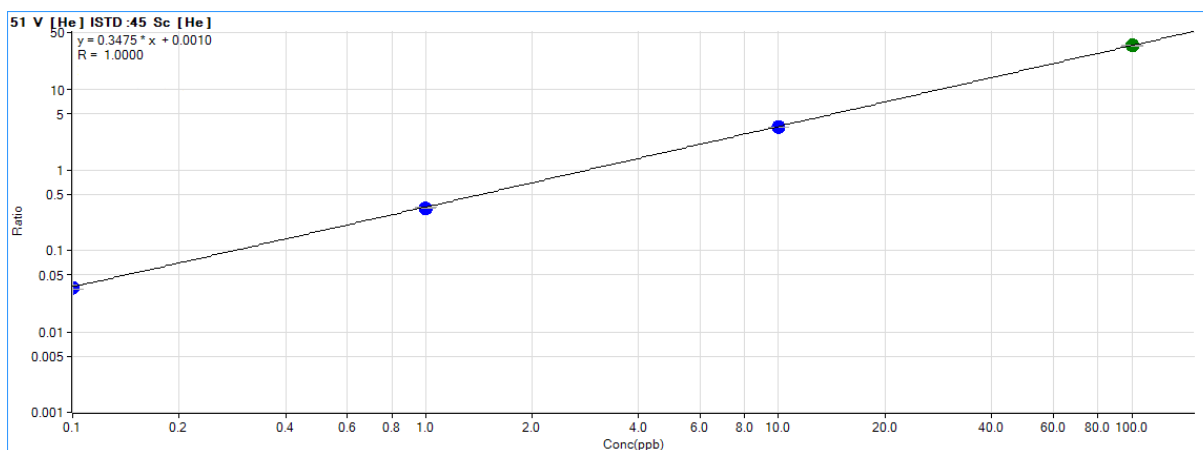
## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Stanovení vybraných prvků

Vybrané prvky (Al, Ti, V, Cr, Co, Ni, Nb, Pb) byly stanoveny metodou ICP-MS. Podmínky stanovení jsou uvedeny v experimentální části. Kvantifikace byla provedena metodou kalibrační křivky s využitím kalibračních standardů v rozmezí 0,1 - 100 µg/l. U prvků, jejichž detekční limit byl vyšší než první hodnota kalibračního standardu, byl využit jako nejnižší kalibrační standard roztok o koncentraci 1 µg/l. Na obrázcích (Obr. 17 a Obr. 18) jsou zobrazeny kalibrační závislosti kobaltu (interní standard Sc) a vanadu (interní standard Sc) po zlogarování obou os (za účelem přehledného zobrazení všech bodů kalibrace).



Obr. 17. Kalibrační závislost pro kobalt



Obr. 18. Kalibrační závislost pro vanad

Všechny studované prvky byly přímo navázány pomocí software na interní standard za účelem potlačení nespektrálních interferencí. Interní standard byl přiváděn pomocí peristaltické pumpy kontinuálně po celou dobu analýzy spolu se všemi stanovovanými roztoky kalibračních standardů, slepých pokusů, certifikovaných referenčních materiálů a vzorků. Následující tabulka ukazuje provázanost jednotlivých prvků na konkrétní interní standardy (Tab. XII).

<b>izotop</b>	<b>interní standard</b>
<sup>27</sup> Al	<sup>45</sup> Sc
<sup>47</sup> Ti	<sup>45</sup> Sc
<sup>51</sup> V	<sup>45</sup> Sc
<sup>52</sup> Cr	<sup>45</sup> Sc
<sup>59</sup> Co	<sup>45</sup> Sc
<sup>60</sup> Ni	<sup>45</sup> Sc
<sup>93</sup> Nb	<sup>89</sup> Y
<sup>208</sup> Pb	<sup>209</sup> Bi

**Tabulka XII:** *Provázanost interních standardů*



## 4.2 Verifikace

### 4.2.1 Detekční limity

Detekční limity byly vypočteny pomocí následující rovnice:

$$LOD = \frac{3\sigma * \text{koncentrace standardního roztoku}}{S - B}$$

kde 3 v čitateli je trojnásobek směrodatné odchylky count z deseti měření slepého pokusu. Písmeno S ve jmenovateli odpovídá počet count standardního roztoku a B je počet count pozadí. Získané detekční limity (Tab. XIII) jsou srovnatelné s daty, získanými Sarimento-González a kol., kteří využívali ICP-MS Agilent 7500c, také vybavený oktapólovou kolizní celou<sup>19</sup>.

izotop	limit detekce (µg/l)
<sup>27</sup> Al	0,280
<sup>47</sup> Ti	0,180
<sup>51</sup> V	0,005
<sup>52</sup> Cr	0,026
<sup>59</sup> Co	0,002
<sup>60</sup> Ni	0,078
<sup>93</sup> Nb	0,003
<sup>208</sup> Pb	0,006

**Tabulka XIII:** Detekční limity

### 4.2.2 Opakovatelnost

Stanovení preciznosti vyjadřuje těsnost shody mezi nezávislými naměřenými výsledky zkoušek za předem specifikovaných podmínek<sup>31</sup>. Preciznost byla stanovena za podmínek opakovatelnosti a to z 6 nezávislých měření certifikovaného referenčního materiálu Seronom<sup>TM</sup> Trace Elements Whole Blood L-3. Preciznost za podmínek opakovatelnosti je vyjádřena v % jako relativní směrodatná odchylka RSD (Tab. XIV). Niob se nepodařilo detekovat a tedy hodnota RSD není v tabulce uváděna.

izotop	(%) RSD
<sup>27</sup> Al	17,69
<sup>47</sup> Ti	6,79
<sup>51</sup> V	7,11
<sup>52</sup> Cr	7,02
<sup>59</sup> Co	3,52
<sup>60</sup> Ni	7,80
<sup>93</sup> Nb	-
<sup>208</sup> Pb	4,48

**Tabulka XIV:** *Opakovatelnost*

### 4.2.3 Mezilehlá preciznost

Mezilehlá preciznost měření zahrnuje následující podmínky: stejný analytický postup měření, stejné místo, opakování měření na stejném nebo podobných objektech v rozdílném časovém úseku, ale měření musí obsahovat další podmínky zahrnující změny<sup>31</sup>. Mezilehlá preciznost byla určena z 6 měření certifikovaného referenčního materiálu Seronom<sup>TM</sup> Trace Elements Whole Blood L-3 po dobu dvou měsíců od února 2012 do konce března 2012 (Tab. XV).

izotop	(%) RSD
<sup>27</sup> Al	18,44
<sup>47</sup> Ti	23,19
<sup>51</sup> V	8,46
<sup>52</sup> Cr	8,95
<sup>59</sup> Co	4,55
<sup>60</sup> Ni	9,05
<sup>93</sup> Nb	-
<sup>208</sup> Pb	5,13

**Tabulka XV:** *Mezilehlá preciznost*

## 4.2.4 Pravdivost

Je vyjádřena jako t snost shody mezi dohodnutou referen ní (skute nou) a nam enou hodnotou získanou z v t-ího po tu m ení<sup>31</sup>. Pravdivost techniky byla ur ena z 6-ti nezávislých m ení certifikovaného referen nímu materiálu Seronom<sup>TM</sup> Trace Elements Whole Blood L-3 (Tab. XVI).

izotop	nam ené hodnoty $x \pm s$ ( $\mu\text{g/l}$ )	hodnoty CRM $x \pm U$ ( $\mu\text{g/l}$ )	akceptovatelné rozmezí ( $\mu\text{g/l}$ )
<sup>27</sup> Al	10,52 $\pm$ 1,86	11,2 $\pm$ 0,7	9,8 - 12,6
<sup>47</sup> Ti	4,58 $\pm$ 0,31	2,4 $\pm$ 0,4*	-
<sup>51</sup> V	1,10 $\pm$ 0,07	1,3 $\pm$ 0,12	1,06 - 1,54
<sup>52</sup> Cr	3,22 $\pm$ 0,23	3,73 $\pm$ 0,19	3,35 - 4,11
<sup>59</sup> Co	0,94 $\pm$ 0,03	1,13 $\pm$ 0,1	0,93 - 1,33
<sup>60</sup> Ni	2,55 $\pm$ 0,19	3,06 $\pm$ 0,26	2,54 - 3,58
<sup>93</sup> Nb	-	0,009 $\pm$ 0,001*	-
<sup>208</sup> Pb	60,59 $\pm$ 2,72	63,8 $\pm$	59,4 - 68,2

**Tabulka XVI:** Pravdivost (\*doporu ená necertifikovaná hodnota, uvedena jako  $x \pm s$ ),  
 $U$  - roz-í ená nejistota s koeficientem roz-í ení ( $k=2$ )

## 4.2.5 Linearita kalibra ní závislosti

Linearita byla prokázána na základ hodnoty korela ního koeficientu R, vypo teným pomocí software MassHunter Workstation. Hodnoty korela ního koeficientu, které mají na pátém desetinném míst ě, jsou zaokrouhleny jako 1,0000 (Tab. XVII).

izotop	R
<sup>27</sup> Al	1,0000
<sup>47</sup> Ti	1,0000
<sup>51</sup> V	1,0000
<sup>52</sup> Cr	1,0000
<sup>59</sup> Co	1,0000
<sup>60</sup> Ni	1,0000
<sup>93</sup> Nb	1,0000
<sup>208</sup> Pb	0,9999

**Tabulka XVII:** Linearita kalibra ní závislosti

### 4.3. Vyhodnocení výsledk

Bylo studováno 8 vybraných prvků (Al, Ti, V, Cr, Co, Ni, Nb, Pb), k jejichž stanovení byla využita a verifikována metoda ICP-MS. Vybrané prvky byly stanoveny v klinických vzorcích kloubních výpotků, dodanými z Ortopedické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc.

V první fázi experimentální práce bylo ověřeno, zda lze techniku ETA-AAS využít pro analýzu nízkých koncentrací vybraných prvků v klinických materiálech. Pro tento účel byl vybrán chrom a nikl. Byl analyzován certifikovaný referenční materiál pomocí Seronom<sup>TM</sup> Trace Elements Urine a krve Seronom<sup>TM</sup> Trace Elements Whole Blood L-1. Kvantifikace byla provedena metodou kalibrační křivky s využitím kalibračních roztoků koncentrací 2,5; 5; 7,5; 10 µg/l. Certifikovaná hodnota prvku v referenčním materiálu podle byla pro chrom 2,1 µg/l a pro nikl 4,15 µg/l. Naměřené hodnoty dvou rozložených referenčních materiálů byly u chromu 1,578 a 2,585 µg/l a u niklu 130 a 150 µg/l. Detekční limity byly stanoveny pro chrom na 2,30 µg/l (přímá metoda analytu) a 1,24 µg/l (Kaiserův postup)<sup>32</sup>. Detekční limity pro nikl byly 2,34 µg/l (přímá metoda analytu) a 1,33 µg/l (přímá metodou analytu)<sup>32</sup>. Při stanovení Seronom<sup>TM</sup> Trace Elements Whole Blood L-1 byly všechny naměřené hodnoty pod mezí detekce. Metoda nebyla pro tento typ matrice dostatečně optimalizována a nepodařilo se dosáhnout dostatečně nízkých detekčních limitů a shody naměřených hodnot s certifikovanými.

Při stanovení kovů v klinických materiálech pomocí ICP-MS mohou výsledné hodnoty velmi ovlivnit spektrální, zejména polyatomické interference. Velmi důležitá je volba takového izotopu, který je co nejméně interferencemi zatížen. ICP-MS 7700x Series (Agilent Technologies) použitý k analýzám je vybaven oktapólovou kolizní celou, která v průběhu měření (Ti, V, Cr, Co, Ni, Nb) pracovala v heliovém módu. Využití kolizní cely a volba vhodného izotopu se ukázaly jako účinný nástroj pro eliminaci interferencí.

Stanovení titanu, resp. jeho izotop, je zatíženo velkým množstvím polyatomických interferencí. V průběhu analýz certifikovaných referenčních materiálů Seronom<sup>TM</sup> Trace Elements Whole Blood L-3 se ukázalo, že u něj jsou polyatomické interference (zejména adukty síry, kyslíku a dusíku) odstraněny u méně zastoupeného izotopu <sup>47</sup>Ti (7,44 %), který je také doporučeným izotopem při analýzách za pomoci kolizní cely. Oproti izotopu <sup>48</sup>Ti (73,72 %), u kterého zcela nedochází k eliminaci všech interferencí (Tab. XVIII).

izotop	zastoupení (%)	naměřené hodnoty (µg/l)	hodnota CRM $x \pm s$ (µg/l)
<sup>47</sup> Ti	7,44	4,58	2,4 ± 0,4
<sup>48</sup> Ti	73,72	8,53	

**Tabulka XVIII:** Srovnání stanovení koncentrace titanu u různých izotopů

Je třeba být v této věci opatrní, protože rozdíl mezi jednotlivými izotopy nám umožňuje sledovat při stanovení niklu. Na nejvíce zastoupeném izotopu <sup>58</sup>Ni (68,08 %) byla naměřená koncentrace 71,22 µg/l, což je 23,3x více než referenční hodnota 3,06 µg/l. Při stanovení izotopu <sup>60</sup>Ni (26,22 %), jenž je zároveň doporučeným pro měření s kolizní celou, byla stanovena koncentrace 2,55 µg/l (Tab. XIX).

izotop	zastoupení (%)	naměřené hodnoty (µg/l)	hodnota CRM $x \pm U$ (µg/l)	akceptovatelné rozmezí (µg/l)
<sup>58</sup> Ni	68,08	71,22	3,06 ± 0,26	2,54 - 3,58
<sup>60</sup> Ni	26,22	2,55		

**Tabulka XIX:** Srovnání stanovení koncentrace Niklu u různých izotopů,  $U$  - rozšířená nejistota s koeficientem rozšíření ( $k=2$ )

Na účinném odstranění interferencí se zejména podílí kolizní cely. Vhodným příkladem je v tomto případě opět stanovení titanu a niklu. Pro ověření funkce a potěby využít kolizní cely byl při analýzách referenčních materiálů stanoven titan a nikl i s neaktivní kolizní celou. V tabulce jsou uvedeny výsledky stanovení se zapnutou/vypnutou kolizní celou, u niklu je uveden zejména izotop <sup>58</sup>Ni, jenž má prezentovat, jak velkým rozdílu mezi certifikovanou referenční a naměřenou hodnotou lze dospět, při nevhodně zvoleném izotopu a zároveň při neaktivní kolizní cele (Tab. XX).

izotop	vypnutá kolizní cely (µg/l)	zapnutá kolizní cely (µg/l)	hodnota CRM $x \pm U$ (µg/l)	akceptovatelné rozmezí (µg/l)
<sup>47</sup> Ti	13,43	4,58	2,4 ± 0,4*	-
<sup>58</sup> Ni	166,77	71,22	3,06 ± 0,26	2,54 - 3,58
<sup>60</sup> Ni	5,28	2,55		

**Tabulka XX:** Srovnání stanovení koncentrace Niklu  $p$  i vypnuté/zapnuté kolizní cely,  $U$  - rozšířená nejistota s koeficientem rozšíření ( $k=2$ )

I přes použití kolizní cely a volby vhodného izotopu se nepodařilo při stanovení titanu zcela eliminovat všechny interference, což je vidět i z hodnoty certifikovaných referenčních materiálů získané za podmínek mezilehlé preciznosti a opakovatelnosti. Ty se pohybují kolem hodnoty 4 µg/l, při certifikované referenční hodnotě je 2,4 ± 0,4 µg/l.

Niob je v certifikovaném referenčním materiálu přítomen ve velice nízké koncentraci 0,009 ± 0,001 µg/l. Jedná se o monoizotopický prvek, jehož jediný izotop je <sup>93</sup>Nb. A koliv uváděný detekční limit pro tento prvek je 0,003 µg/l, nepodařilo se při opakovaných analýzách potvrdit přítomnost tohoto prvku a je tedy uváděn pod mezí detekce.

Hliník byl stanoven bez použití kolizní cely, jelikož prvky o takto nízké hmotnosti nejsou nijak výrazně zatíženy polyatomickými interferencemi. Jedná se o poměrně běžný kontaminant, což má zejména vliv i na vysokou hodnotu RSD, která za podmínek opakovatelnosti činí u hliníku 17,69 %.

Ke stanovení vanadu byl využit jeho izotop <sup>51</sup>V (99,76 %). Pro tento izotop uvádí literatura množství interferencí pocházejících zejména kyslíkatých aduktů chloru a síry (<sup>34</sup>S<sup>16</sup>O<sup>1</sup>H<sup>+</sup>, <sup>35</sup>Cl<sup>16</sup>O<sup>+</sup>, <sup>33</sup>S<sup>18</sup>O<sup>+</sup>, <sup>34</sup>S<sup>17</sup>O<sup>+</sup> cit.<sup>33</sup>). Tyto prvky se nenacházejí v použitých rozpouštědlech.

Chrom je prvkem, jehož nejvíce zastoupený izotop <sup>52</sup>Cr (intenzita 83,76 %) je zároveň vhodný pro analýzu s použitím kolizní cely. Tento izotop je zatížen poměrně velkým množstvím interferencí, pocházející zejména od chloru, síry, ale i argonu (<sup>35</sup>Cl<sup>16</sup>O<sup>1</sup>H<sup>+</sup>, <sup>40</sup>Ar<sup>12</sup>C<sup>+</sup>, <sup>36</sup>Ar<sup>16</sup>O<sup>+</sup>, <sup>34</sup>S<sup>18</sup>O<sup>+</sup>, <sup>36</sup>S<sup>16</sup>O<sup>+</sup> cit.<sup>33</sup>). Tyto byly potlačeny s použitím kolizní cely.

Kobalt je monoizotopický prvek. K jeho stanovení byl použit jeho jediný izotop <sup>59</sup>Co. Mnohé polyatomické interference (<sup>43</sup>Ca<sup>16</sup>O<sup>+</sup>, <sup>42</sup>Ca<sup>16</sup>O<sup>1</sup>H<sup>+</sup>, <sup>24</sup>Mg<sup>35</sup>Cl<sup>+</sup>, <sup>36</sup>Ar<sup>23</sup>Na<sup>+</sup>, <sup>40</sup>Ar<sup>18</sup>O<sup>1</sup>H<sup>+</sup> cit.<sup>33</sup>) se projeví při analýze jen minimálně, což bylo potlačeno kolizní celou.

Při stanovení olova byly využity 3 izotopy  $^{206}\text{Pb}$  (24,1 %),  $^{207}\text{Pb}$  (22,1 %),  $^{208}\text{Pb}$  (52,4 %). Za použití korekční rovnice byla výsledná koncentrace olova započítána do výsledku pro  $^{208}\text{Pb}$ . Olovo, vzhledem ke své vysoké hmotnosti, interferuje pouze s kyslíkatými adukty platiny nebo iridia ( $^{190}\text{Pt}^{16}\text{O}^+$ ,  $^{191}\text{Ir}^{16}\text{O}^+$ ,  $^{192}\text{Pt}^{16}\text{O}^+$  cit.<sup>33</sup>). Tyto prvky se však nenacházejí v použitých rozpouštědlech. Proto bylo olovo stanoveno bez použití kolizní cely.

Pomocí ICP-MS byl analyzován i certifikovaný referenční materiál na nízké koncentrační hladině Seronom<sup>TM</sup> Trace Elements Whole Blood L-1. Certifikované hodnoty jsou v tabulce (Tab. XXI) uvedeny jako  $x \pm U$ , kde  $U$  je rozšířená nejistota s koeficientem rozšíření ( $k=2$ ). Při stanovení hliníku na takto nízké koncentrační hladině došlo zejména ke kontaminaci během přípravy vzorku. Podobně jako při analýze Seronom<sup>TM</sup> Trace Elements Whole Blood L-3, nedošlo zcela k odstranění interferencí u titanu a mírně nad akceptovatelným rozmezím byla stanovena i hodnota niklu. Koncentrace ostatních prvků koresponduje s certifikovanými hodnotami referenčního materiálu.

izotop	naměřené hodnoty (µg/l)	hodnoty CRM $x \pm U$ (µg/l)	akceptovatelné rozmezí (µg/l)
$^{27}\text{Al}$	5,67	$1,2 \pm 0,2$	0,7 - 1,54
$^{47}\text{Ti}$	2,44	$1,6 \pm 0,3^*$	-
$^{51}\text{V}$	0,12	$0,11 \pm 0,02$	0,07 - 0,15
$^{52}\text{Cr}$	0,09	$0,082 \pm 0,012$	0,058 - 0,106
$^{59}\text{Co}$	0,01	$0,023 \pm 0,0074$	0,012 - 0,034
$^{60}\text{Ni}$	0,23	$0,141 \pm 0,024$	0,093 - 0,189
$^{93}\text{Nb}$	-	$0,0057 \pm 0,0005^*$	-
$^{208}\text{Pb}$	1,51	$1,48 \pm 0,05$	1,38 - 1,58

**Tabulka XXI:** Výsledky naměřených hodnot pro Seronom<sup>TM</sup> Trace Elements Whole Blood L-1 (\*doporučená necertifikovaná hodnota, uvedena jako  $x \pm s$ )

V rámci experimentální části práce byly analyzovány i klinické vzorky kloubních výpotků (průhledná žlutá tekutina). Od pacientů Ortopedické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc bylo odebráno 18 vzorků. Z předložených klinických vzorků bylo 7 výpotků odebráno přímo od implantovaného kloubu a ostatních 11 bylo odebráno od pacientů, kteří mají kloubní náhradu neměli nebo ji mají na jiném kloubu, nebyl prováděn odběr.

Klinické vzorky byly označeny A1 - A18, aby nemohlo dojít k záměně během zpracování nebo analýzy v laboratoři. Aby nedošlo k možným chybám při pipetování poměrně viskózního materiálu, kterým kloubní výpotek je, byl každý vzorek zvážen a koncentrace byla přepočítána na hmotnost 1g vzorku. Výsledky stanovení jsou uvedeny v tabulce níže (Tab. XXII). Vzorky pacientů, odebrané od implantovaného kloubu jsou označeny hvězdičkou.

označení vzorku	prvky (ng/g)							
	Al	Ti	V	Cr	Co	Ni	Nb	Pb
A1	19,17	16	<DL	1,3	0,05	4,3	<DL	<DL
A2	<DL	11,54	<DL	0,44	0,03	2,13	<DL	<DL
A3*	10,66	37,7	<DL	36,95	28,19	10,15	<DL	<DL
A4*	57,36	44,31	0,51	3,15	2,51	<DL	<DL	1,44
A5*	7,51	31,88	0,48	6,16	2,54	<DL	<DL	0,43
A6	23,77	14,18	<DL	0,28	0,08	14,56	<DL	3,2
A7*	2,62	14,21	0,25	0,75	0,63	1,39	<DL	5,23
A8*	56	238,75	7,57	45,97	53,6	7,78	<DL	1,7
A9*	32,46	58,43	1,91	44,64	77,6	10,2	<DL	0,73
A10	51,08	9,68	0,34	1,06	0,05	1,63	<DL	0,21
A11	5,33	11,47	<DL	1,56	3,19	<DL	<DL	0,97
A12	<DL	9,23	<DL	0,15	<DL	<DL	<DL	0,5
A13	<DL	6	<DL	0,42	0,08	3,04	<DL	0,44
A14	74,88	16,2	0,44	0,43	0,45	<DL	<DL	0,91
A15	142,9	18,62	0,55	1,33	0,13	1,29	<DL	0,41
A16	72,58	15,31	0,61	1,42	0,18	7,72	<DL	0,84
A17	<DL	9,31	0,07	0,39	1,03	3,04	<DL	<DL
A18*	<DL	26,83	0,06	2,49	3,94	<DL	<DL	<DL

**Tabulka XXII:** Výsledné koncentrace vybraných prvků v klinických vzorcích ( <DL – pod detekčním limitem, )



Pri analýzách bolo zistené široké rozmezí koncentrací jednotlivých kovov vo všetkých analyzovaných vzorkách (Tab. XXIII).

prvek	rozmezí koncentrací (ng/g)
Al	DL ó 142,92
Ti	6 ó 238,75
V	DL ó 7,57
Cr	0,15 ó 45,97
Co	DL ó 77,6
Ni	DL ó 14,56
Nb	DL
Pb	DL ó 5,23

**Tabulka XXIII:** Rozmezí stanovených koncentrací

Kloubní náhrady se vyrábí ze slitin biogenních kovů, především nerezové oceli, kobaltové a titanové slitiny (Ti-6Al-4V, Co-Cr-Mo). Prvkové složení implantátu se může lišit podle toho, jaký kloub se jedná a zda je nahrazena pouze část nebo celý kloub<sup>34</sup>.

Tabulka (Tab. XXIV) zobrazuje výsledky analýz u vybraných pacientů, na kterých lze nejlépe demonstrovat souvislost uvolňování kovů z materiálu kloubního implantátu s jejich koncentracemi hladinami v kloubních výpotcích. V tabulce ve sloupci materiál implantátu jsou vypsané prvky, ze kterých jsou složeny všechny použité části implantátu (jamka, dík, hlavička). Koncentrace hladiny závisí velmi na skutečnosti, zda byl implantát dobře usazen, zda nedochází k nadměrným otřem ploch a mnoha dalších aspektech.

U vzorků odebraných od kloubu s implantátem byly zjištěny u většiny prvků vyšší koncentrace než u vzorků odebraných od kloubů bez implantátu. Toto platí zejména pro chrom a kobalt, dále i titan. U tohoto prvku však byly zaznamenány zvýšené koncentrace i u vzorků, které byly odebrány ze zdravých kloubů, podobně jako u niklu i hliníku. Tyto koncentrační hladiny jsou vysoké i s přihlednutím k poměrně nízkým koncentracím některých kovů v krvi, jelikož některé výpotky mohou být krví kontaminovány. Může také dojít k uvolňování kovů při odběru vzorku injekční jehlou a v důsledku používání chirurgických nástrojů v průběhu samotné operace kloubu. Bohužel byl zatím analyzován jen malý soubor dat s velkým množstvím proměnných, na který nelze účinně uplatnit pokročilou statistickou analýzu.

p ítomný implantát	koncentrace kov (ng/g)					materiál implantátu	délka implantace (rok)	kloub
	Al	Ti	V	Cr	Co			
ano	10,66	37,7	DL	36,95	28,19	Ti, Al, V, Cr, Co	10	ky .
ano	56	238,75	7,57	45,97	53,6	Ti, Al, V, Cr, Co	15	ky .
ano	32,46	58,34	1,91	44,64	77,6	Ti, Al, V, Cr, Co	17	ky .
ne	23,	14,18	DL	0,28	0,08	-	-	kol.
ne	5,33	11,47	DL	1,56	3,19	-	-	kol.
ne	19,17	11,54	DL	1,30	0,05	-	-	kol.

**Tabulka XXIV:** Srovnání vybraných vzork (ky .- ky elní kloub, kol.- kolenní kloub)

## 5. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá vývojem a verifikací metody pro stanovení vybraných prvků (Al, Ti, V, Cr, Co, Ni, Nb) v klinických materiálech pomocí ICP-MS. Nejduležitě bylo ověřeno, zda lze tyto prvky stanovit pomocí ETA-AAS, která se ukázala jako nevhodná. Optimalizace a verifikace stanovení pomocí metody ICP-MS probíhala na certifikovaném referenčním materiálu krve. Vzorky kloubních výpotků i certifikované referenční materiály byly před analýzou rozloženy v mikrovlnném systému pomocí kyseliny dusičné a peroxidu vodíku.

Pro všechny stanovované prvky byly vypočítány limity detekce, určená opakovatelnost, mezilehlá preciznost, pravdivost a linearita.

Bylo analyzováno 18 vzorků kloubních výpotků od pacientů Ortopedické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc. Mezi těmito vzorky se nacházelo 7, kterým byla tato tekutina odebrána přímo od implantovaného kloubu. Zbývajících 11 vzorků bylo odebráno pacientům, kteří nepodstoupili implantaci v břiše anebo podstoupili implantaci, ale na jiném kloubu, nebyl proveden odběr. Analýzou vybraných prvků byla u nich některých pacientů zjištěna významná diference v koncentracích hladinách kovů, ze kterých byla náhrada složena. Ovšem poměrně vysoké hodnoty některých kovů se projevovali také u nich kolika pacientů bez implantátu.

Závěrem lze konstatovat, že cíle práce byly splněny. Byla zpracována literární rešerše. Byla provedena verifikace metody, zahrnující určení limitů detekce, opakovatelnosti, pravdivosti a linearity. Takto verifikovaná metoda byla aplikována při stanovení reálných klinických vzorků kloubních výpotků.

## 6. LITERATURA

- [1] Silbernagl S., Despopoulos A.: *Atlas Fyziologie člověka*, GRADA, Praha 2004.
- [2] Gundacker C., Komarnický G., Zödl B., Forster Ch., Shuster E., Wittman K.: *Sci. Total Environ.* **372**, 76-86 (2006).
- [3] Case C.P., Ellis L., Turner J.C., Fairman B.: *Clin. Chem.* **47**, 275-280 (2001).
- [4] Bohrer D., Nascimento P.C., Mendonca J.K.A., Pollo V.G., Carvalho L.M.: *Amino Acids.* **27**, 75-83(2004).
- [5] Pasha Q., Malik S.A., Shaheen N., Shah M.H.: *Clin. Chim. Acta.*, **411**, 531-539 (2010).
- [6] Garaj J., Bustin D., Hladký Z.: *Analytická Chémia*. ALFA, SNTL, Bratislava 1987.
- [7] Černohorský T., Jandera P.: *Atomová Spektroskopie*. Univerzita pardubice, Pardubice 1997.
- [8] Thomas R.: *Practical guide to ICP-MS*. CRC Press, Boca Raton 2007.
- [9] Nelms, Simon M.: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*. Blackwell Publishing, Oxford 2005.
- [10] Mihaljević M., Strnad L., Mestek O.: *Chem. Listy.* **98**, 123-130 (2004).
- [11] [http://www.vscht.cz/anl/josef/LabAtom/Navod\\_ICP-MS\\_2010.pdf](http://www.vscht.cz/anl/josef/LabAtom/Navod_ICP-MS_2010.pdf); stařeno 21.4.2012.
- [12] Beres S. A., Bruckner P. H., Denoyer E. R.: *At. Spectrosc* **15.**, 96-99 (1994).
- [13] Geismann U., Greb U.: *Fresenius' J. Anal. Chem* **360**, 186 - 193 (1994).
- [14] Hill S.J.: *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications*. Blackwell Publishing, Oxford 2007.
- [15] Beauchemin D.: *Anal. Chem.* **82**, 4786-4810 (2010).
- [16] Hsiung Ch., Andrade J.D., Costa R., Ash K.O.: *Clin. Chem.* **43**, 2303-2311 (1997).
- [17] Kaňka A., Mestek O.: *Chem. Listy* **105**, 930-937 (2011).
- [18] Krakovská E., Kuss H.-M.: *Rozklady v analytickéj chémii*. Vienaľa Košice, Košice 2001.
- [19] Sarmiento-González A., Marchante-Gayón J.M., Tejerina-Lobo J.M., Paz-Jiménez J., Sanz-Medel A.: *Anal. Bioanal. Chem.* **382**, 1001-1009 (2005).
- [20] Iavicoli I., Falcone G., Alessandrelli M., Cresti R., Santiz V., Salvatori S., Alimonti A., Carelli G.: *J. Trace Elem. Med. Biol.* **20**, 25-31 (2006).

- [21] Heitland P., Köster D.: J. Trace Elem. Med. Biol. **20**, 253-262 (2006).
- [22] Bocca B., Madeddu R., Asara Y., Tolu P., Marchal J.A., Forte G.: J. Trace Elem. Med. Biol. **25**, 19-26 (2011).
- [23] Hung-Yi Ch., Ching-Hsia K., Yu-Wen Ch., Chi-Kung H., Chiu.Jung Ch., Trong-Neng W.: Sci. Total Environ. **387**, 79-85 (2007).
- [24] Ying W., Yang-Li O., Ya-Qiong L., Qing X., Qing-Fen L., Quan W., Ti-Quiang F., Lai-Lai Y., Jing-Yu W.: Biol. Trace Elem. Res. **145**, 127-135 (2012).
- [25] Genius S.J., Birkholz D., Rodushkin I., Beeson S.: Arch. Environ. Contam. Toxicol. **61**, 344-357 (2011).
- [26] Rodushkin I., Engström E., Stenberg A., Baxter D.C. : Anal. Bioanal. Chem. **380**, 247-257 (2004).
- [27] Batista L.B., Rodrigues J.L., Nunes J.A., Oliviera Souza V.C., Barbosa F.Jr.: Anal. Chim. Acta. **639**, 13-18 (2009).
- [28] Saghir M., Shaheen N., Shah M.H.: Biol. Trace Elem. Res. **143**, 751-763 (2010).
- [29] Massadeh A., Gharibeh A., Omari K., Al-Momani I., Alomari A., Tumah H., Hayaejne W.: Biol. Trace Elem. Res. **133**, 1-11 (2010).
- [30] Han A., Komorowicz I., Iskra M., Majewski W., Baralkiewicz D.: Anal. Bioanal. Chem. **399** 3221-3231 (2011).
- [31] Plzák Z., Milde D.: Chem. Listy **106**, 41-44 (2012).
- [32] Jaro-ová M.: *Analýza kávy pomocí atomové absorpční spektrometrie*. Diplomová práce, Univerzita Palackého, 2011.
- [33] May T.W., Wiedermeyer R.H.: At. Spectrosc. **19(5)**, 150-155 (1998).
- [34] Nedoma J.: *Biomechanika lidského skeletu a umělých náhrad jeho částí*, Karolinum, Praha 2006.

## 7. P ÍLOHY

<sup>27</sup> Al	<sup>47</sup> Ti	<sup>51</sup> V	<sup>52</sup> Cr	<sup>59</sup> Co	<sup>60</sup> Ni	<sup>93</sup> Nb	<sup>208</sup> Pb
9,277158	4,866342	1,01239	3,362211	0,904323	2,823503	-	58,57496
10,03662	4,771925	1,124696	2,947454	0,935461	2,662353	-	61,01465
9,21842	4,522541	1,188479	3,071615	0,968155	2,478716	-	59,96801
13,49881	4,366217	0,998439	3,228644	0,980913	2,463959	-	59,25468
8,970236	4,103128	1,157748	3,122529	0,927287	2,623579	-	58,92155
12,12504	4,879536	1,132017	3,598656	0,900153	2,245652	-	65,85966

**Tabulka XXV:** Experimentální data - Stanovení opakovatelnosti a pravdivosti

<sup>27</sup> Al	<sup>47</sup> Ti	<sup>51</sup> V	<sup>52</sup> Cr	<sup>59</sup> Co	<sup>60</sup> Ni	<sup>93</sup> Nb	<sup>208</sup> Pb
9,837816	3,849542	1,348755	3,626975	0,948325	2,445244	-	65,76552
10,09757	3,571932	1,166373	2,933073	1,037865	2,372456	-	60,01689
11,94643	6,32375	1,213468	3,424673	0,984667	2,443464	-	59,44647
13,13438	5,634676	1,144273	3,184274	1,026697	2,776437	-	58,85467
8,094276	4,917982	1,374376	3,631434	1,064978	2,934435	-	64,44672
10,03662	4,771925	1,124696	2,947454	0,935461	2,6623	-	61,01465

**Tabulka XXVI:** Experimentální data - Stanovení mezilehlé preciznosti