

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

**Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie**

**VYUŽITÍ ICP-MS V PRVKOVÉ ANALÝZE KLINICKÝCH
MATERIÁLŮ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2015

Iva Vaňková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká
Katedra analytické chemie

VYUŽITÍ ICP-MS V PRVKOVÉ ANALÝZE KLINICKÝCH MATERIÁLŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Iva Vaňková

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

Ing. David Milde, Ph. D.

Konzultant:

Mgr. Martin Kuba

Olomouc 2015

SOUHRN

Tato diplomová práce je zaměřena na možnosti využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v analýze klinických materiálů. Popisuje základní principy instrumentace ICP-MS a způsoby rozkladů klinických vzorků. V práci jsou popsány současné poznatky o uvolňování částic z kloubních implantátů do okolní tkáně a krevního séra. Dále jsou popsány možnosti prvkové analýzy kostí a nehtů pomocí ICP-MS. Experimentální část se zabývá stanovením kovů v nehtech a kostech pacientů s implantovanou kloubní náhradou.

SUMMARY

This thesis is focused on the possibility of mass spectrometry with inductively coupled plasma in analysis of clinical materials. It describes the basic principles and instrumentation of ICP-MS and methods of degradation of clinical samples. This thesis describes current knowledge about release of metal particles from joint replacement into the surrounding tissue and serum. The opportunities elemental analysis of samples nails and bones by inductively coupled plasma mass spectrometry is discussed too.

The experimental part of this work presents the determination of metals in samples of nails and bones from patient with joint replacement.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Děkuji svému vedoucímu diplomové práce Ing. Davidu Mildemu, Ph. D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost, čas a projevenou podporu v přípravách této práce.

Dále děkuji Mgr. Martinu Kubovi za věnovaný čas a trpělivost při práci v laboratoři.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. TEORETICKÁ ČÁST	2
2.1. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem	2
2.1.1 Zavádění vzorku	3
2.1.1.1 Zavádění kapalných vzorků do plazmatu.....	3
2.1.1.1.1. Zmlžovače	4
2.1.1.1.2 Mlžné komory	5
2.1.1.2 Zavádění pevných vzorků	7
2.1.1.2.1 Laserová ablace	7
2.1.1.2.2 Elektrotermické vypařování	7
2.1.2 Plazma.....	8
2.1.2.1 Stejněsměrně vázané plazma (DCP).....	8
2.1.2.2 Mikrovlnně indukované plazma (MIP).....	9
2.1.2.3 Indukčně vázané plazma (ICP)	9
2.1.2.3.1 Plazmová hlavice ICP	9
2.1.2.3.2 Princip výboje	10
2.1.2.3.3 Princip ionizace vzorku v ICP.....	11
2.1.3 Interface	12
2.1.4 Iontová optika	13
2.1.5 Hmotnostní analyzátory.....	14
2.1.5.1 Kvadrupólový analyzátor	14
2.1.5.2 Průletový analyzátor	16
2.1.5.3 Sektorový analyzátor	17
2.1.6 Detektor	19
2.1.6.1 Faradayova klec	19
2.1.6.2 Elektronový násobič s kontinuální dynodou.....	20
2.1.6.3 Elektronový násobič s diskrétními dynodami.....	20
2.1.7 Interference v ICP - MS.....	21
2.1.7.1 Nespektrální interference	21
2.1.7.2 Spektrální interference	21
2.1.7.2.1. Izobarické interference.....	22
2.1.7.2.2. Polyatomické interference	22
2.1.7.2.3. Tvorba oxidových a hydroxidových iontů.....	23
2.1.7.2.4. Tvorba dvojnásobně nabitých iontů.....	23
2.1.7.3.1. Matematické korekční rovnice.....	24

2.2. Rozklady biologických materiálů	26
2.2.1 Suchý rozklad	26
2.2.2 Mokrý rozklad.....	27
2.3. Aplikace ICP-MS v analýze klinických vzorků	28
2.3.1. Příprava klinických vzorků	28
2.3.1 Stanovení kovů v nehtech	28
2.3.2 Stanovení kovů v kostech	29
2.4. Kovové materiály pro kloubní implantáty.....	30
2.5. Analýza klinických vzorků v souvislosti s kloubními implantáty.....	32
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	33
3.1 Chemikálie, přístroje a pomůcky.....	33
3.1.1 Chemikálie	33
3.1.2 Přístroje.....	34
3.1.3 Pomůcky	35
3.1.4 Analyzované vzorky	35
3.2. Pracovní postupy	36
3.2.1 Příprava vzorků.....	36
3.2.2 Příprava referenčního materiálu.....	36
3.2.3 Rozklad vzorků a referenčních materiálů	36
3.2.4 Příprava kalibračních roztoků a interního standardu	37
3.3. Použité instrumentální techniky	38
3.3.1 ICP-MS	38
4. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	40
4.1. Zabezpečení kvality výsledků	40
4.1.1 Detekční meze.....	41
4.1.2 Analýza referenčních materiálů	41
4.2. Vyhodnocení výsledků	44
4.2.1 Analýza nehtů	44
4.2.2 Analýza kostí	48
5. ZÁVĚR.....	51
6. LITERATURA	52

1. ÚVOD

Předkládaná práce se zabývá využitím hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v prvkové analýze klinických materiálů. Specifickými vlastnostmi klinických vzorků jsou složitá matrice a stopové koncentrace analyzovaných prvků. Nejčastěji jsou analyzovány vzorky krve, krevního séra, moči a různých tkání. Technika hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem je při stanovení stopových koncentrací prvků velmi rozšířená a oblíbená především díky své univerzálnosti, nízkým mezím detekce a schopnosti simultánní analýzy.

Práce, na které tato diplomová práce navazuje, vyvíjely metodu pro stanovení vybraných kovů v klinických vzorcích, které pocházely od pacientů s implantovanou kloubní náhradou z Ortopedické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc. Záměrem stanovení kovů v těchto vzorcích je posouzení, zda jsou z implantovaných kloubních náhrad uvolňovány kovy, které mohou být toxické, karcinogenní, cytotoxické, či mít jiné nepříznivé biologické účinky. V předchozích pracích byly již zanalyzovány vzorky tkání kolem implantátu a vzorky kloubních výpotků. Experimentální část této práce se snaží prohloubit znalosti o tuto problematiku analýzou kostí, které byly s implantátem v přímém kontaktu. Dále byly analyzovány vzorky nehtů a byla zkoumána možnost, zda by tyto vzorky nemohly být využity k posouzení expozice kovů z implantovaných kloubních náhrad.

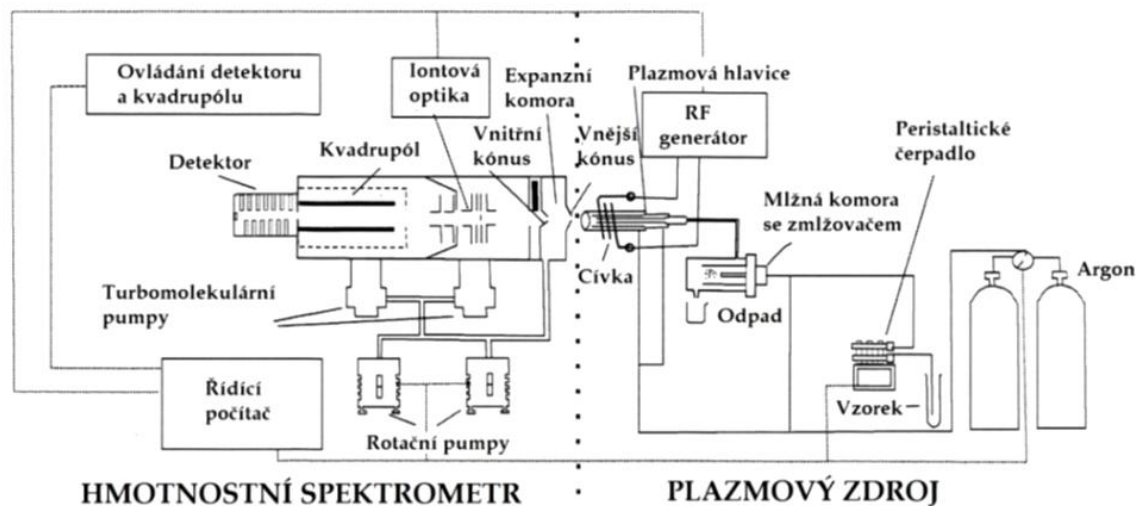
2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Indukčně vázané plazma (ICP) je v chemické prvkové analýze využíváno už několik desítek let. Nejprve bylo použito v optické emisní spektrometrii jako zdroj iontů s téměř stoprocentně účinnou excitací u většiny prvků. Později jako rezervoár atomů pro atomovou fluorescenční spektrometrii a od roku 1980 se využívá jako zdroj iontů pro hmotnostní spektrometrii. První komerční přístroj ICP-MS byl uveden na trh v roce 1983.⁽¹⁾

Technika hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) umožňuje víceprvkovou analýzu. Hlavními přednostmi jsou velmi nízké meze detekce, velký koncentrační rozsah, simultánní charakter, vysoká univerzálnost, citlivost a rychlost. K negativním stránkám lze zařadit vyšší pořizovací cenu a vyšší náklady na provoz.

ICP-MS má velmi široké praktické uplatnění, například v potravinářství, v medicíně, v environmentální analýze při rozbořech vod nebo u geologických vzorků. Vedle stanovení celkového obsahu kovů, lze ICP-MS využít ve spojení se separačními nebo elektromigračními metodami jako citlivý a selektivní detektor pro prvkovou speciální analýzu.⁽²⁾⁽³⁾



Obr. 1 Schematický náčrt ICP MS⁽⁴⁾

V současnosti je k dispozici mnoho různých konstrukcí. Obr. 1 ukazuje základní prvky instrumentace. Vzorek, obvykle převedený do kapalné formy, je pomocí peristaltické pumpy čerpán do zmlžovače, který z něj vytvoří jemný aerosol. Ten dále směřuje do mlzné komory,

ve kterém jsou z něj odstraněny nežádoucí větší kapky. Vzorek ve formě jemného aerosolu vstupuje do plazmového výboje, kde je převeden na ionty. Následující části přístroje jsou evakuovány pomocí systému rotačních a turbomolekulárních pump. Přejít iontů mezi atmosférickým tlakem a vysokým vakuem zajišťuje interface. Ionty přes něj dále přes iontovou optiku vstupují do hmotnostního analyzátoru, kde jsou separovány podle jejich poměru m/z a nakonec dopadají na detektor. ⁽²⁾

2.1.1 Zavádění vzorku

Účinné zavedení vzorku do plazmatu je zcela rozhodující pro detekci prvků různých koncentrací. Přestože oblasti zavádění vzorku byla v historii věnována maximální péče, stále má svá omezení. Nejčastější problémy vznikají ovlivněním stability výboje po zavedení vzorku do plazmatu, a při neúplném vypaření vzorku, které vede ke vzniku interferencí a následně ke zhoršení přesnosti a správnosti měření.

Ve většině případů se do plazmatu zavádí kapalně vzorky. Tato technika našla rozsáhlé uplatnění v rutinních analýzách i v normovaných postupech. Zavádění vzorku v pevném stavu je oproti širokému uplatnění kapalných vzorků spíše jen okrajovou záležitostí. Ke generování aerosolu z pevných materiálů se využívá laserové ablace nebo elektrotermické vypařování. Praktické využití mají tyto techniky zejména v geologických a archeologických analýzách. ⁽²⁾⁽⁵⁾

2.1.1.1 Zavádění kapalných vzorků do plazmatu

Vzorky jsou pro analýzu téměř vždy převáděny do roztoku. Nejčastějším přístupem pro kapalně vzorky je systém zmlžovače s mlžnou komorou. Roztok je pomocí peristaltického čerpadla a systémem hadiček dopraven do zmlžovače, v němž dojde k vygenerování aerosolu. Na zmlžovač přímo navazuje mlžná komora, v níž se eliminují příliš velké částice, které by v plazmatu nebyly zcela vypařeny. Složení aerosolu má významný vliv na stabilitu plazmového výboje a na spektrální interference, snižuje tedy přesnost a správnost měření. Vývoji zmlžovačů a mlžných komor je tedy právem věnována zvláštní pozornost, důraz je přikládán zvyšování jejich účinnosti, snižování spotřeby vzorku a minimalizaci spektrálních interferencí. Aerosol je dále vnášen proudem plynu do plazmového výboje. Hlavní nevýhodou tohoto systému je, že se jen malá část vzorku (často méně než 2 %) dostane až do plazmové hlavičky. ⁽²⁾⁽⁵⁾

Transport vzorku je zajištěn peristaltickým čerpadlem. Jedná se o systém válečků uspořádaných do kruhu, na které jsou pomocí přitlačných ramínek napnuty hadičky. Otáčením konstantní rychlostí dochází k plynulému pohybu kapaliny v hadičkách. Výhodou tohoto systému je zajištění konstantního průtoku bez ohledu na případnou rozdílnou viskozitu kapalin. Díky možnosti regulovat zvlášť průtoky argonu a vzorku, lze výrazně snížit dobu promývání.

Peristaltické čerpadlo slouží mimo jiné i k odčerpání přebytečného roztoku z mlžné komory, a proto je využíváno pro všechny typy zmlžovačů – pro zmlžovače bez sacího účinku i pro zmlžovače s Venturiho efektem.⁽⁵⁾

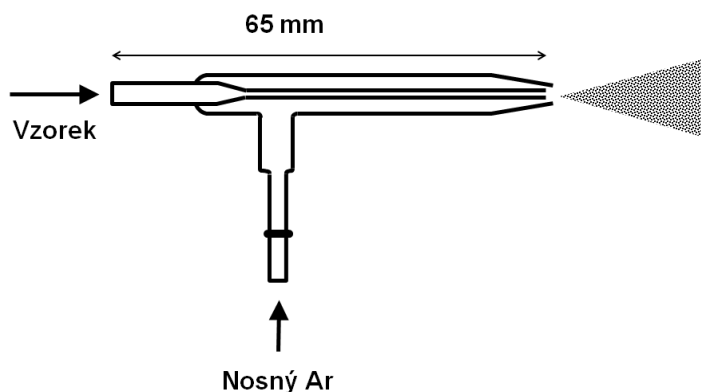
2.1.1.1.1. Zmlžovače

Konstrukce dnešních zmlžovačů je založena na práci L.G. Gouye, ale poprvé byl vyroben v roce 1977 Meinhardem. V principu se jedná o fyzikální interakci argonu s kapalinou, při níž je produkován hrubý aerosol.

Zmlžovače jsou vyrobeny obvykle z křemenného skla nebo polymerů. K nejčastěji využívaným typům patří koncentrický, mikrokoncentrický a úhlový zmlžovač.⁽⁵⁾

Koncentrický zmlžovač

V tradičním koncentrickém zmlžovači je roztok zaveden do tenké kapiláry, kudy prochází rychlý proud argonu (Obr. 2). Spojení kapalného vzorku s nižším tlakem a rychle proudícího plynu má za následek Venturiho efekt, díky němuž je roztok nasán až na konec kapiláry a následně je rozprášen v podobě drobného aerosolu. Typický průtok vzorku koncentrickým zmlžovačem je v řádu $1 - 3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Tato konstrukce vykazuje dobrou citlivost a stabilitu měření. Největším úskalím je ucpávání úzké kapiláry.^{(2) (5)}



Obr. 2 Koncentrický zmlžovač⁽⁵⁾

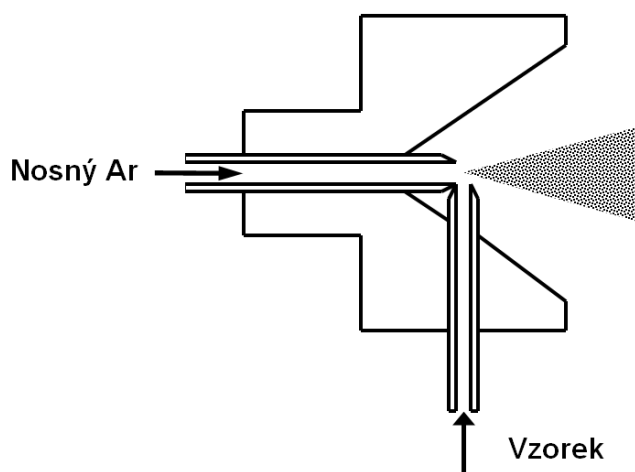
Mikrokoncentrický zmlžovač

Tento druh vysoce účinného zmlžovače byl zkonstruován pro velmi nízké průtoky. Mohou nasávat rychlostí méně než $0,1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. Pracují na stejném principu jako koncentrické zmlžovače, ovšem za vyššího tlaku proudu argonu a menších průměrů kapilár. Důsledkem toho jsou velmi náchylné k ucpání úzkých kapilár.

Tyto zmlžovače jsou obvykle vyrobeny z polymeru, jako jsou například polytetrafluorethylen nebo polyvinylfluorid. Praktické využití má mikrokoncentrický zmlžovač v analýzách, kde je omezen objem vzorku, nebo je analyt náchylný na paměťové efekty.⁽⁶⁾

Úhlový zmlžovač

Úhlový zmlžovač je konstruován tak, že proud argonu je směřován kolmo k ústí kapiláry (Obr. 3). Roztok je z kapiláry nasáván tlakem rychle proudícího plynu, nebo je přiváděn peristaltickým čerpadlem. Při kontaktu je generován aerosol. Je vhodný pro analýzy vzorků, které obsahují složitější matrice případně matrice s malým podílem nerozpuštěných částic. Tyto zmlžovače jsou sice méně efektivní v tvorbě jemného aerosolu, ale díky většímu průměru kapiláry u nich nedochází tak často k ucpání.⁽⁵⁾



Obr. 3 Úhlový zmlžovač⁽⁵⁾

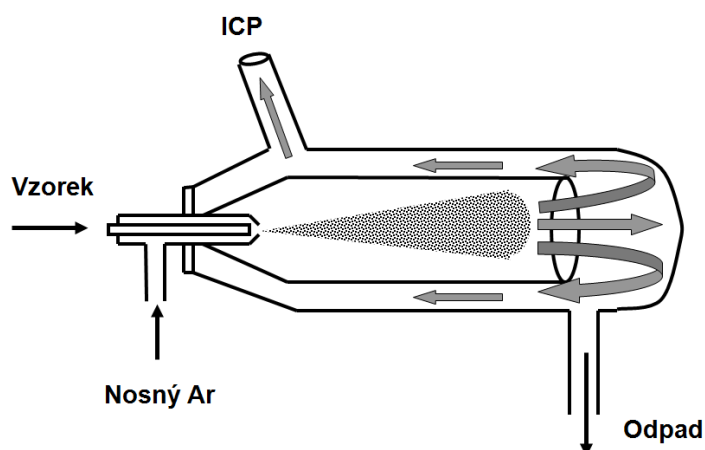
2.1.1.1.2 Mlžné komory

Funkcí mlžné komory je tvorba vhodného aerosolu pro plazma. Odstraňuje tedy z aerosolu velké částice, které by se v plazmatu nevypařily a způsobily by matricové interference. Dále komora tlumí pulsy tvorby aerosolu, které jsou způsobeny peristaltickým čerpadlem. Každá mlžná komora má určující hodnotou mezního průměru částic (cut-off

diameter), který udává maximální průměr částic, jež komora pustí dále do plazmového výboje. Materiál mlžné komory musí být odolný proti používaným roztokům, obvykle jsou použity sklo nebo plast. Daný materiál má vliv i na dobu promývání, např. nejkratší promývací čas má celoskleněná mlžná komora. Slabým místem mlžných komor jsou paměťové efekty a tedy možná kontaminace mezi jednotlivými vzorky. V současnosti se běžně využívají Scottova a cyklonická mlžná komora. ⁽⁵⁾⁽⁶⁾

Scottova mlžná komora

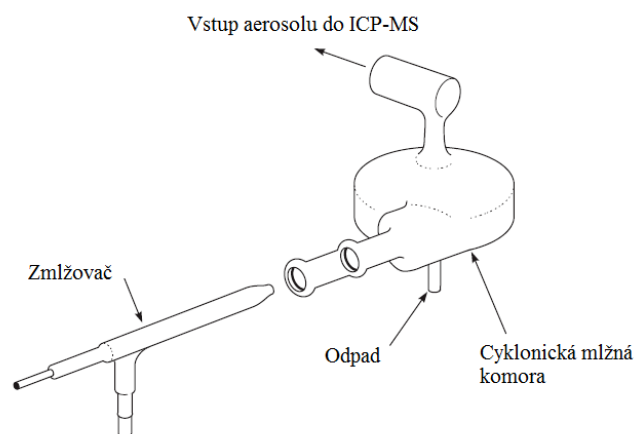
Schéma této dvouplášťové mlžné komory je patrné z obrázku 4. Aerosol generovaný ve zmlžovači je pomocí argonu zaváděn do vnitřní trubice. Ovšem na konci komory jsou částice nuceny změnit dráhu letu o 180° směrem do trubice vnější. Díky gravitační síle zvládnou tuto dráhu letu pouze jemné částice aerosolu, větší částice jsou eliminovány na stěnách komory. Scottova mlžná komora nejčastěji navazuje na koncentrický zmlžovač. ⁽⁶⁾



Obr. 4 Scottova mlžná komora ⁽⁵⁾

Cyklonická mlžná komora

Cyklonická mlžná komora (Obr. 5) eliminuje příliš velké částice aerosolu pomocí odstředivé síly. Částice jsou unášeny proudem argonu do víru uvnitř mlžné komory, který tam vzniká vlivem tangenciálního toku aerosolu. Jemné částice aerosolu jsou dále vedeny do plazmové hlavice, větší částice vlivem své hmotnosti a odstředivé síly narazí na stěnu komory. Cyklonická mlžná komora má vyšší účinnost a větší citlivost i nižší detekční limity při analýzách čistých vzorků. ⁽⁶⁾



Obr. 5 *Cyklonická mlžná komora* ⁽⁵⁾

2.1.1.2 Zavádění pevných vzorků

Ke generování aerosolu z pevných materiálů se využívá laserové ablace nebo elektrotermické vypařování.

2.1.1.2.1 Laserová ablace

Laserová ablace umožňuje analyzovat svrchní vrstvy vzorku bez nutnosti destrukce materiálu. Na povrch vzorku je vyslán laserový paprsek o vhodné vlnové délce. Interakcí paprsku s povrchem je uvolněn oblak částic. Atomy, elektrony i ionty jsou následně pomocí nosného plynu transportovány přímo do plazmatu.

Hlavní výhody laserové ablace jsou: použitelnost na všechny pevné vzorky, téměř žádná omezení velikosti vzorku, snadná příprava vzorků, bez rozpouštědel nebo odpadu. Ablace se v praxi využívá k analýzám povrchů. ^{(7) (8)}

2.1.1.2.2 Elektrotermické vypařování

Elektrotermické vypařování lze využít ke stanovení pevných i kapalných vzorků. Malé množství vzorku je napipetováno do elektricky vyhřívané grafitové kyvety. Kyveta má teplotně řízený program, během něhož dochází k sušení, pyrolýze a nakonec k odpaření vzorku. Vzorek je dále proudem plynu odváděn do plazmového zdroje.

Zásadní výhodou tohoto systému je velmi malá spotřeba vzorku a možnost odpařit matici bez vzorku, čímž jsou eliminovány matriční efekty a související interference.

Nevýhodou elektrotermického vypařování je vznik pouze přechodných signálů, které trvají jen několik sekund, než je vzorek odpařen a transportován o plazmatu.⁽⁷⁾⁽⁸⁾

2.1.2 Plazma

Plazma je často považováno za čtvrté skupenství hmoty, protože přirozeně doplňuje řadu pevná látka – kapalina – plyn. Dodáním další tepelné energie, dojde v plynu k částečné a později k úplné ionizaci. Látka se stane plazmatem, v kterém jsou volné nosiče náboje, čímž získá toto skupenství zcela nové vlastnosti. Plazma kolektivně reaguje na elektrická a magnetická pole, a je schopno je samo i vytvářet. Význam kolektivního chování se projevuje tak, že nabitě částice ovlivňují pohyb dalších nabitých částic na poměrně velkou vzdálenost. Vlastnosti plazmatu jsou velmi odlišné od vlastností ostatních skupenství látek. Plazma je složeno z elektronů, iontů a neutrálních částic v základním stavu, excitovaných částic a z fotonů. Jako celek se plazma jeví neutrálně, což je dáno vyrovnaným poměrem kladně a záporně nabitých částic.⁽⁹⁾⁽¹⁾

Pojem plazma byl pro ionizovaný plyn poprvé použit Irwingem Langmuirem (1881-1957), kterému tento stav látky připomínal svým chováním krevní plazmu. Objev plazmatu předcházely elektrické výboje v plynu. V roce 1802 uskutečnil první elektrický obloukový výboj anglický fyzik Davy, dále se systematicky zabýval elektrickými výboji v plynech od roku 1830 M. Faraday. W. Crookes (1879) označil výboj za čtvrtý stav hmoty. Bezelektrodové plazma jako první studoval Hittorf (1884) a po objevení elektronu J. J. Thomsonem, popsal J. W. Strutt lord Rayleigh v roce 1906 tzv. kolektivní chování elektronů, které je základem definice plazmatu. První obloukový výboj, který splňoval podmínky definice plazmatu, vytvořili v roce 1922 Gerdien a Lotz.⁽¹⁾

Podle provedení výboje rozlišujeme: stejnosměrně vázané plazma (DCP – Direct Current Plasma), mikrovlnně indukované plazma (MIP – Microwave Induced Plasma) a indukčně vázané plazma (ICP – Inductively Coupled Plasma).⁽¹⁾

2.1.2.1 Stejnosměrně vázané plazma (DCP)

Stejnosměrně vázané plazma se vytváří po zavedení plynu (obvykle argonu) mezi dvě nebo tři elektrody s vysokým proudem, čímž dojde k ionizaci plynu. Plazmový výboj má charakteristický tvar Y. Vzorek je přiváděn do chladnější zóny plazmatu, čímž dochází k nežádoucí tvorbě interferencí. Dalším negativním vlastností tohoto výboje je jeho značná nestabilita. Stejnosměrně vázané plazma má využití při analýzách vzorků s vysokým obsahem

rozpuštěných nebo suspendujících pevných látek. V běžné praxi se však tento druh plazmového výboje nevyužívá.⁽⁶⁾

2.1.2.2 Mikrovlnně indukované plazma (MIP)

Výboj mikrovlnně indukovaného plazmatu ve tvaru prstence je generován za atmosférického tlaku uvnitř dutiny křemenné nebo skleněné trubice. Jako plazmový plyn se obvykle používá argon nebo helium. Výboj je udržován pomocí mikrovlnné energie (100 – 200 W). K hlavním nevýhodám MIP patří snadné zhášení při zavádění kapalných vzorků a projev matričních efektů, které jsou způsobeny nedostatečnou teplotou plazmatu.

Mikrovlnně indukované plazma nenašlo příliš uplatnění jako emisní zdroj pro optickou spektrometrii, pro praktické aplikace reálných vzorků není dostatečně robustní. Je však využitelné jako zdroj iontů v hmotnostní spektrometrii a uplatnění také našlo jako emisní detektor pro plynovou chromatografii.⁽⁶⁾

2.1.2.3 Indukčně vázané plazma (ICP)

Jedná se o nejrozšířenější ionizační zdroj v anorganické hmotnostní spektrometrii.⁽⁷⁾ Indukčně vázané plazma má, kromě zdroje iontů pro hmotnostní spektrometrii, široké využití také jako účinný zdroj pro optickou emisní spektrometrii. ICP pracuje za atmosférického tlaku, k hlavním součástem patří plazmová hlavice, indukční cívka a radiofrekvenční zdroj energie.⁽⁶⁾

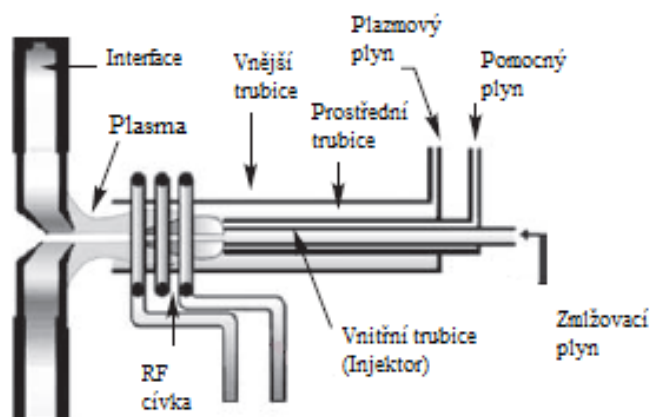
Při vhodném nastavení podmínek jako jsou rozměry plazmové hlavice, frekvence vysokofrekvenčního pole a rychlost proudění nosného plynu, lze do plazmového výboje zavést aerosol se vzorkem, bez porušení stability výboje.⁽¹⁰⁾

2.1.2.3.1 Plazmová hlavice ICP

Plazmová hlavice ICP se skládá ze tří koncentricky uspořádaných trubic, pomocí kterých se přivádí plazmové plyny (Obr. 6). Trubice jsou obvykle křemenné, a lze je označit jako vnější, prostřední a vnitřní trubici (injektor). Pro analýzu žíravých látek lze injektor vyrobit z oxidu hlinitého, platiny nebo safíru. Plazmové hlavice se vyrábějí kompaktní, které tvoří pevný celek 3 trubic s fixní symetrií. Případně mohou být zcela rozebíratelné nebo kombinované, u kterých vnější a prostřední trubice tvoří celek a injektor lze vyměnit.⁽¹⁰⁾⁽⁶⁾

Pro ICP se obvykle využívá argon, plazmovou hlavici proudí ve třech tocích. Vnější plazmový plyn protéká rychlostí $12\text{--}17\text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ prostorem mezi vnější a střední trubicí a používá se pro vytvoření plazmového výboje. Pomocný plazmový plyn o průtoku asi $1\text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ prochází mezi střední trubicí a injektorem. Jeho hlavním úkolem je izolovat plazma, aby nedošlo k roztavení trubic. Díky pomocnému plynu získává plazmový výboj ICP stabilitu a svůj charakteristický tvar. Třetí proud plynu prochází injektorem, přičemž proráží středem výboje analytický kanál, kterým je do plazmatu přiváděn vzorek ve formě aerosolu.⁽⁶⁾

Horní konec plazmové hlavice obtáčí radiofrekvenční cívka, která je uzemněna, čímž se lehce liší od běžně používaných cívek u optické spektrometrie. Uzemnění je potřebné kvůli interface, které je umístěno 10-20 mm od plazmového výboje. Bez něj by mohl mezi cívkou a interface vzniknout sekundární výboj, který by negativně ovlivnil výkon přístroje. Radiofrekvenční generátor, na který je cívka napojena, pracuje při frekvencích 27 a 40 MHz. Současné moderní přístroje produkují plazma ze 70 – 75 % z dodané energie.



Obr. 6 Plazmová hlavice⁽⁶⁾

2.1.2.3.2 Princip výboje

Nejprve je do plazmové hlavice mezi vnější a střední trubicí zaveden proud plazmového plynu. Následně je na cívku, která obklopuje hlavici, vložena radiofrekvenční energie (750 – 1500 W). Dochází tak ke vzniku střídavého proudu, který osciluje ve stejné frekvenci (27 nebo 40 MHz) jako použitý RF generátor. Radiofrekvenční oscilace způsobí intenzivní elektromagnetické pole v horní části plazmové hlavice.

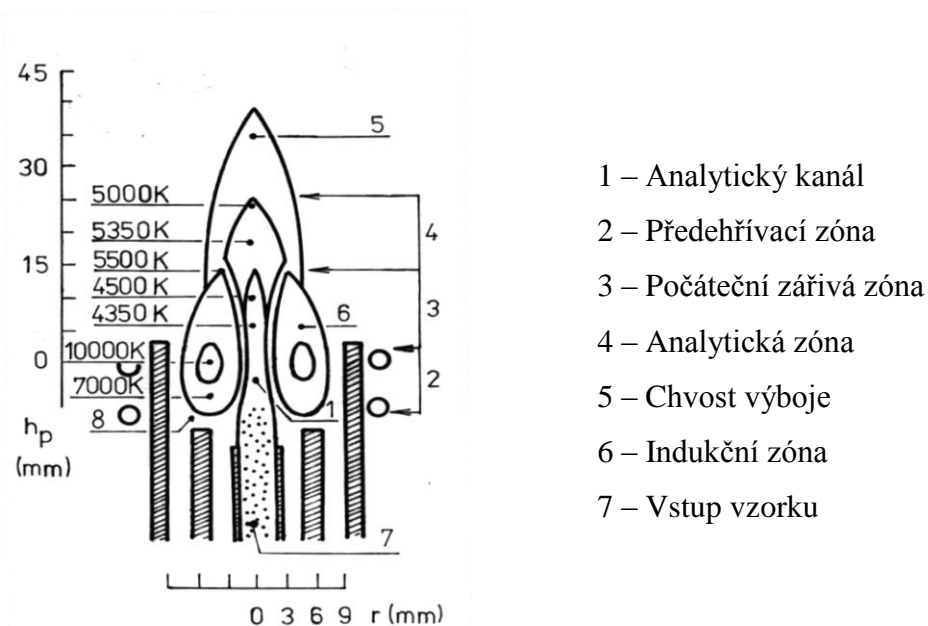
Plazma je pak iniciováno jiskrovým výbojem z Teslova generátoru, který vytrhne některé elektrony z atomů argonu. Elektrony jsou poté urychleny magnetickým polem a

srážkami ionizují další atomy argonu. Jedná se o kolizí indukovanou ionizaci, která pokračuje dále v řetězové reakci. Dále je plazma udržováno radiofrekvenční energií v cívce. Posléze může být do plazmatu zaveden vzorek ve formě aerosolu. První ionizační potenciál argonu je 15,8 eV, což poskytuje dostatečnou energii pro ionizaci většiny prvků. ⁽⁶⁾

2.1.2.3.3 Princip ionizace vzorku v ICP

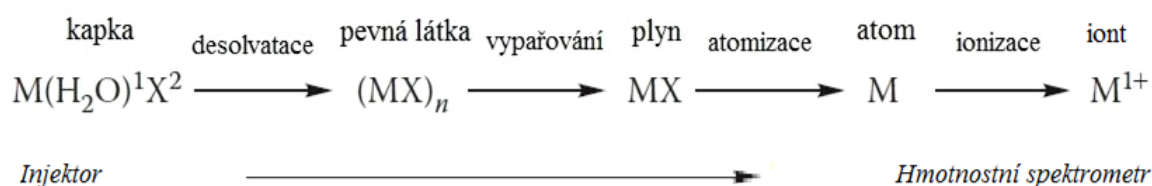
Teplota plazmatu závisí na určité oblasti výboje. Rozdělení teplot závisí na kinetické energii částic. Plazma v indukční zóně dosahuje teplot až 10000 K. V analytickém kanále se teploty pohybují zpravidla kolem 5000 K. Velmi rozdílná kinetická teplota indukční a analytické zóny zajišťuje, že chladnější nosný plyn se vzorkem je soustředěn pouze v analytickém kanále. Viskóznější plazmový plyn s mnohem vyšší teplotou, který jej obklopuje, omezuje jeho expanzi a mísení s okolím. Díky tomu mají kalibrační závislosti ICP lineární dynamický rozsah až 9 řádů. ⁽³⁾

Základní úlohou plazmového zdroje iontů v ICP-MS je ionizace analyzovaného vzorku. Na obrázku 7 jsou znázorněny jednotlivé zóny plazmového výboje a jejich teploty.



Obr. 7.: Topografie výboje ICP

Vzorek nejprve vstupuje z injektoru analytickým kanálem do předehřívací zóny a dále do počáteční zářivé zóny. Pokračuje do zóny analytické, kde teprve dochází k tvorbě kladně nabitého iontu. Průběh dějů při průchodu vzorku plazmovým výboje je popsán na obr. 8. ⁽⁶⁾



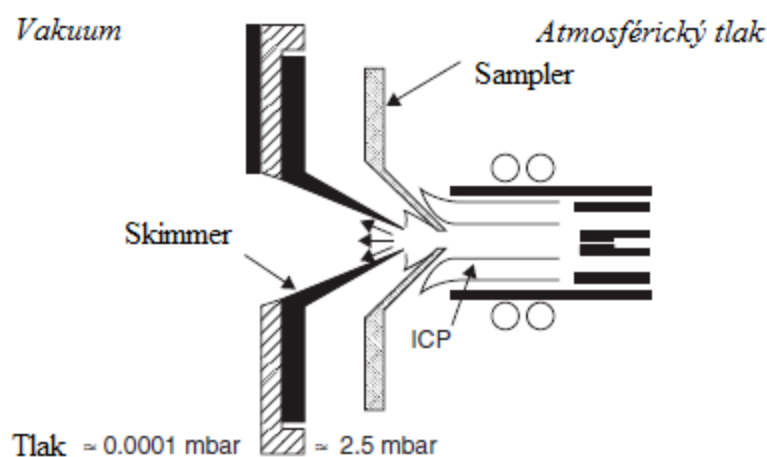
Obr. 8.: *Procesy v plazmovém výboji* ⁽⁶⁾

2.1.3 Interface

Pro techniku ICP-MS je zcela zásadní konstrukce vhodného rozhraní, které patří k nejvíce namáhanému a nejzranitelnějšímu úseku celého přístroje. ⁽²⁾

Interface zajišťuje spojení mezi plazmovým zdrojem, prostředím o vysoké teplotě (7500 K) s atmosférickým tlakem (1000 mbar) a hmotnostním spektrometrem, který pracuje za vysokého vakua ($10^{-5} - 10^{-9}$ mbar) a při pokojové teplotě (300 K). Propojení těchto dvou rozdílných prostředí obvykle umožňuje dvojice kovových kónusů, jejichž malými otvory ve vrcholech prochází proud iontů (Obr. 9). Kónusy jsou zpravidla vyrobeny z niklu, který má vysokou tepelnou vodivost a je relativně odolný proti korozi. Pro vysoce korozivní roztoky a organická rozpouštědla se kónusy vyrábějí také z platiny. ⁽²⁾⁽⁶⁾

Vnější vzorkovací kónus (tzv. sampler) je umístěn v bezprostřední blízkosti plazmového zdroje. Oba kónusy musí tedy být chlazeny, aby nedošlo k jejich roztavení. Otvor ve vrcholu sampleru má průměr 0,8 – 1,2 mm, a zajišťuje účinné oddělení hlavního proudu argonu od středního toku a iontů analyzovaného vzorku. ⁽⁶⁾



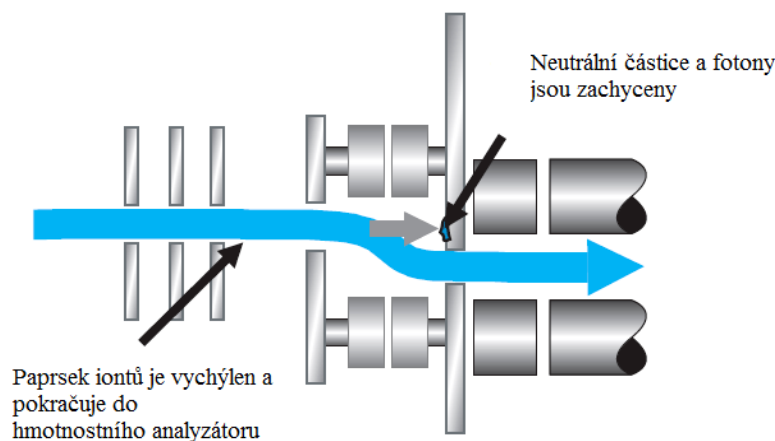
Obr. 9 *Interface ICP-MS* ⁽²⁾

V prostoru mezi kónusy je udržován tlak asi 5 mbar pomocí vakuové pumpy. Rozdíl tlaků vtáhne ionty do oblasti s nižším tlakem za samplerem i velmi malým otvorem v kónusu. Rychlost expandujícího plynu tu přesahuje rychlost zvuku.⁽¹¹⁾

Druhý kónus (tzv. skimmer) musí být za samplerem správně umístěn (ve vzdálenosti 6-7 mm), aby v prostoru mezi nimi nedocházelo k nežádoucím turbulencím iontů s okolním plynem. Průměr otvoru ve skimmeru má 0,4 - 0,8 mm.⁽¹¹⁾ V průběhu měření jsou kónusy zanášeny (matricí, rozpouštědly a dalšími částicemi), otvory v kónusech se tak usazováním částic zmenšují nebo naopak vlivem koroze zvětšují. Pro reprodukovatelné měření je třeba kónusy pravidelně čistit, například ponořením do slabé kyseliny. Jejich životnost závisí především na matrici vzorků.⁽⁶⁾

2.1.4 Iontová optika

K další klíčové části ICP-MS patří tzv. iontová optika, která je umístěna v blízkosti skimmeru v prostoru s vysokým vakuem. Proud plynu po průchodu druhým kónusem rozhraní obsahuje kromě iontů i elektricky nenabitě atomy (Ar, O, H aj.) a fotony, které by mohly zvyšovat pozadí detektoru iontů. Je proto nutné je před vstupem do hmotnostního analyzátoru odstranit. Protože elektricky neutrální částice neovlivňuje elektromagnetické pole, je jedním z řešení k jejich odstranění umístění fyzické bariéry do jejich dráhy, na které se zastaví. Na analyzované ionty však působí elektrostatické pole, tvořené jednou až několika iontovými čočkami. Díky nim se ionty vyhnou překážkám, a zároveň vytvoří kolineární proud pro vstup do analyzátoru.



Obr. 10 Princip iontové optiky⁽¹²⁾

Další možností je pootočit osu hmotnostního analyzátoru o úhel 45° vůči ose interface. Proud iontů se opět působením elektrostatického pole stočí, avšak neutrální částice a fotony narazí na bariéru v přímé ose (Obr. 10).⁽²⁾

Třetí možností je umístění analyzátoru v úhlu 90° k proudu iontů. Neutrální částice a fotony proudí přímo, ovšem ionty jsou pomocí „dutého“ iontového zrcadla odraženy v pravém úhlu do analyzátoru. Díky tomuto systému dosahuje ICP-MS nízké úrovně pozadí, dobrých mezí detekce a stabilních signálů i v reálných matricích.

Iontovou optiku lze doplnit o tzv. extrakční čočku, která pomáhá vytahovat ionty z interface. To podporuje detekční meze lehčích prvků, jejichž ionty jsou za normálních podmínek ze svazku iontů vytlačovány ionty těžších prvků.⁽⁶⁾⁽²⁾

2.1.5 Hmotnostní analyzátor

K separaci jednotlivých iontů dle jejich relativní atomové hmotnosti (amu) resp. dle poměru m/z (hmotnost ku náboji) slouží tzv. analyzátor iontů. Pro techniku ICP-MS jsou nejpoužívanější analyzátor: kvadrupólový (Q-MS), průletový (time of flight – TOF) nebo statické sektorové (SF-MS, HR-MS). Případně lze jako analyzátor využít i iontovou past (IT-MS). Analyzátor jsou umístěny mezi iontovou optikou a detektorem, pomocí samostatné turbomolekulární pumpy pracují za vysokého vakua.⁽⁶⁾

2.1.5.1 Kvadrupólový analyzátor

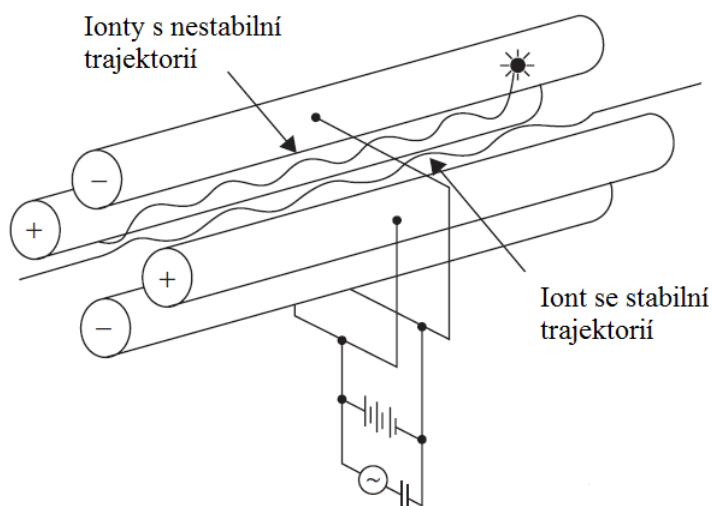
Kvadrupólový analyzátor má v současnosti zabudováno přes 85 % všech hmotnostních spektrometrů s ICP zdrojem.

Kvadrupól se skládá ze čtyř tyčí hyperbolického průřezu o stejné délce (u ICP-MS typicky 15-25 cm) a průměru (cca 1 cm), které jsou umístěny rovnoběžně ve stejné vzdálenosti od osy analyzátoru. Tyče jsou vyrobeny zpravidla z nerezové oceli nebo molybdenu, případně mohou být potaženy keramickým povlakem pro vyšší odolnost proti korozi.⁽⁶⁾

Na dvojici protilehlých tyčí je přiváděna stejnosměrná složka napětí, a zároveň složka radiofrekvenčního pole. Nastavení hodnot veličin (stejnosměrné napětí, amplitudy a frekvence radiofrekvenčního pole) předurčuje trajektorii drah (Obr. 11), po kterých se mezi tyčemi budou pohybovat ionty s určitou m/z . Při daném nastavení mají stabilní trajektorii vedoucí

k detektoru ionty právě určené hodnoty m/z . Ostatní ionty k detektoru neprojdou, střetnou se s některou z tyčí a vybijí se. Nastavení veličin kvadrupólu se postupně mění a detektor zachycuje ionty o různých hodnotách m/z .

Skenovací rychlost kvadrupólu je obvykle v řádu 2500 amu za sekundu a pokrývá celý hmotnostní rozsah. Při měření reálných vzorků se však doba analýzy značně prodlužuje, lze stanovit 25 prvků za 1-2 minuty.



Obr. 11 *Nákres pohybu iontů kvadrupólovým analyzátozem*⁽²⁾

Schopnost hmotnostního analyzátoru oddělit signál analyzovaného iontu od signálu interferujících částic je závislá na dvou parametrech. Prvním je rozlišovací schopnost R , kterou popisuje rovnice (1):

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

kde m představuje nominální hodnotu hmotnosti, na které se nachází pík a Δm je šířka píku, u kvadrupólového analyzátoru je obvykle měřena v 10 % maximální intenzity píku.

Druhým parametrem je tzv. abundance sensitivity. Charakterizuje příspěvek signálu hlavního izotopu (s určitou hodnotou m/z) k sousední hodnotě m/z . Vzniká v důsledku rozšíření analyzovaného signálu, může způsobit falešně pozitivní výsledky a má závažné dopady především při měření stopových koncentrací. Přímý dopad na stabilitu a pohyb iontů, a tedy i na schopnost kvadrupólu separovat ionty s různými hodnotami m/z , mají následující

faktory: tvar, průměr a délka tyčí, vakuum, přiváděné stejnosměrné i střídavé napětí a kinetická energie iontů vstupujících do kvadrupólu. ^{(6) (11)}

2.1.5.2 Průletový analyzátor

Princip separace iontů v průletovém analyzátoru byl objeven v roce 1946. K separaci iontů využívá jejich rozdílné rychlosti po vložení urychlovacího napětí. Ionty jsou po výstupu z iontové optiky vedeny do akcelérátoru, kde jsou urychleny elektrostatickým polem. Urychlení iontů lze provést dvěma způsoby – v původním směru (on axis), nebo ortogonálně (Obr. 12), kdy je letová trubice umístěna kolmo k výstupu z iontové optiky.

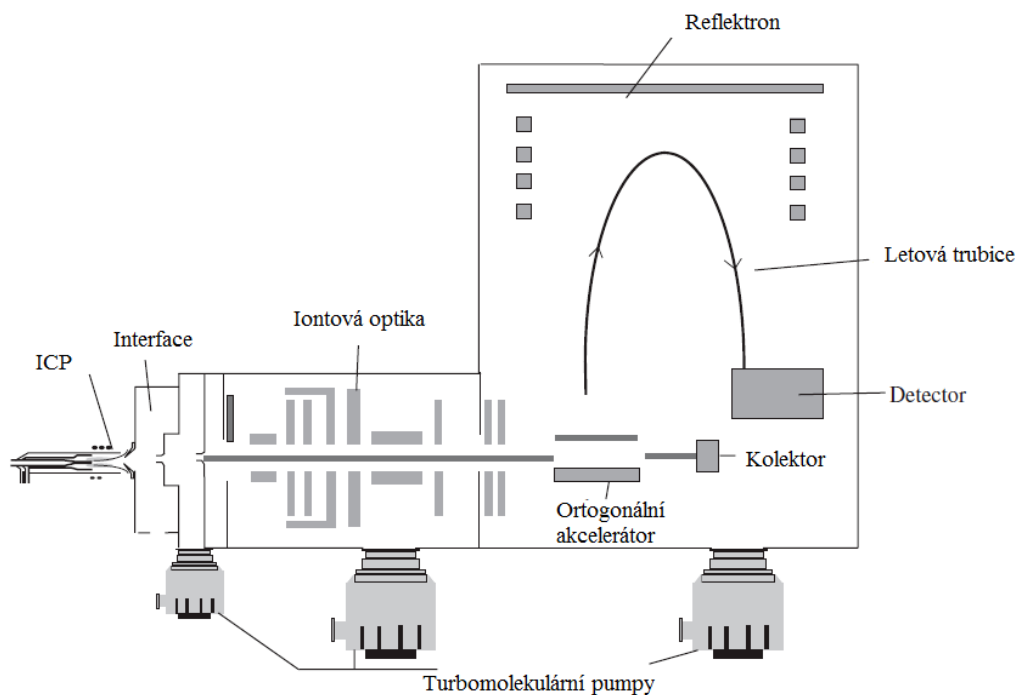
Všechny ionty s nábojem z po opuštění elektrostatického pole mají stejnou kinetickou energii (E_{kin}), ale dle rovnice (2) je jejich rychlost (v) nepřímo úměrná hmotnosti (m). V důsledku toho lze jednotlivé ionty separovat. U je potenciální rozdíl

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

Čas (t), za který ionty prolétnou trubicí o délce L je charakterizován rovnicí (3).

$$t = L \sqrt{\frac{m}{2zU}} \quad (3)$$

Ionty projdou evakuovanou letovou trubicí (obvykle 1 – 2 m dlouhou) a dopadají na detektor. Z rovnice (3) je patrné, že ionty s různou hmotností dopadnou na detektor v odlišnou dobu. Lehčí ionty dosáhnou detektoru dříve než těžší ionty.



Obr. 12 Schéma ICP-MS s průletovým analyzátozem⁽⁸⁾

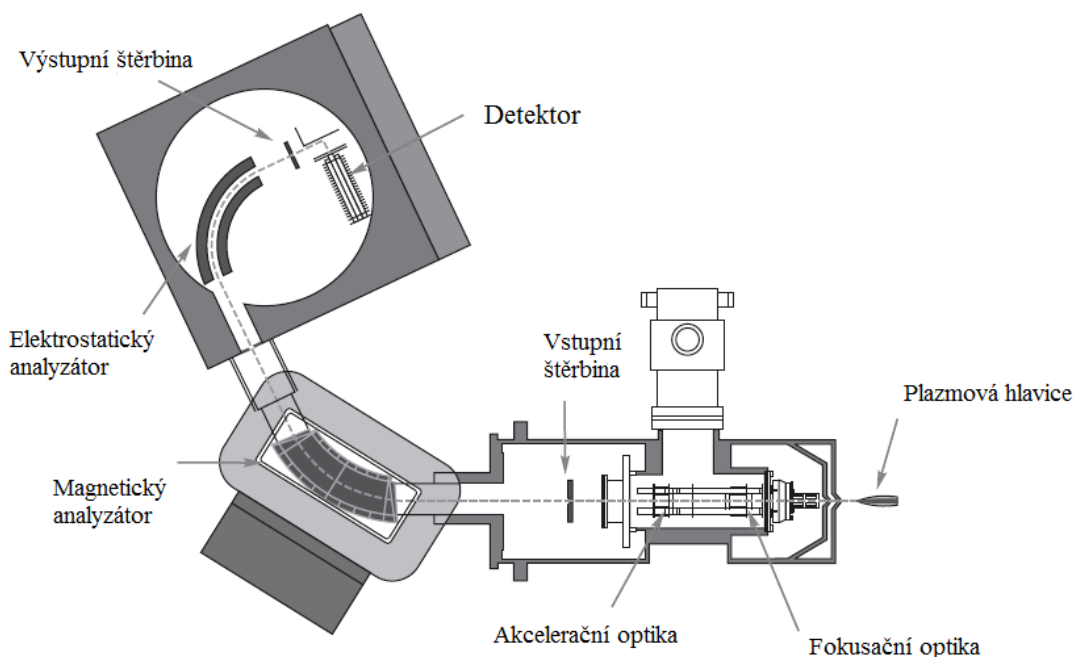
Rozlišovací schopnost analyzátoru lze zvýšit snížením rozptylu počáteční kinetické energie pomocí vysokého urychlovacího napětí v lineárním (on axis) uspořádání nebo pomocí reflektoru. Jedná se o skupinu elektrod, které prostorově i energeticky fokusují ionty o stejném poměru m/z , odkloní je zpět do letové trubice, čímž dvojnásobně prodlouží dráhu letu.

Největším přínosem průletového analyzátoru je jeho rychlost, díky jeho simultánnímu charakteru. Celé hmotnostní spektrum je schopen změřit za 10 – 100 μs .⁽²⁾⁽⁶⁾⁽¹¹⁾

2.1.5.3 Sektorový analyzátor

Jednoduché magnetické sektorové analyzátozem s nízkým rozlišením byly použity už v roce 1930. Ovšem pro dnešní aplikace s mnohem vyššími nároky na rozlišení a meze detekce se využívají sektorové analyzátozem s dvojitou fokusací. Tyto systémy obsahují magnetické a elektrostatické sektorové pole.

Podle uspořádání jsou rozlišovány dva typy přístrojů. “standardní“ Nier-Johnsonovo uspořádání obsahuje nejprve elektrostatický analyzátor (ESA), na který navazuje analyzátor magnetický. V “reverzním“ uspořádání je elektrostatická část umístěna až za část magnetickou (Obr. 13).



Obr. 13 Schéma ICP-MS se sektorovým analyzátozem s dvojitou fokusací, reverzní Nier-Johnsonovo uspořádání. ⁽⁶⁾

Do hmotnostního analyzátoru vstupují ionty urychleny v iontové optice vloženým napětím několika kV.

Elektrostatický analyzátor se skládá ze dvou desek zakřivených o 40°, na které je vloženo stejnosměrné napětí. Vnitřní deska, s negativní polaritou, přitahuje kladně nabitě ionty, zatímco vnější deska, s kladnou polaritou, ionty odpuzuje. Ionový svazek procházející mezi nimi se tím ohýbá a fokusuje v závislosti na své kinetické energii:

$$zE = \frac{mv^2}{r} \quad , \quad (4)$$

kde z představuje náboj iontu, E je síla elektrostatického pole, m hmotnost iontu, v rychlost a r poloměr zakřivení.

K samotné separaci iontů podle jejich poměru m/z dochází v magnetickém sektoru. Na ionty působí magnetické pole, které ovlivňuje jejich trajektorii v závislosti na hmotnosti a

energii iontů. Dochází k zakřivení jejich dráhy letu o daný poloměr r . Z rovnice (5) je patrné, že při konstantní magnetické indukci B a urychlovacím napětím V je poloměr dráhy letu r daný poměrem m/z .

$$\frac{m}{z} = \frac{B^2 r^2}{2V} \quad (5)$$

Nastavením síly magnetického pole jsou tak vybírány ionty s vymezeným poměrem m/z .

Rozlišovací schopnost sektorových analyzátorů je až o dva řády vyšší, a meze detekce až o čtyři řády nižší než u kvadrupólu. Umožňuje i potlačení spektrálních interferencí, které velmi omezují kvadrupólový analyzátor. Pro vysoké rozlišení jsou – vedle analyzátorů – důležité i dostatečně úzké vstupní a výstupní štěrbiny, které řídí počet iontů procházejících do detektoru. Snížení počtu průchozích iontů však může vést ke snížení citlivosti.

Bohužel jejich složitá výroba a konstrukce má za následek vysokou cenu, která zatím brání jejich rozšíření do každodenní praxe. Další nevýhodou ve srovnání s kvadrupólem je relativně pomalá skenovací rychlost. Tento hmotnostní analyzátor našel své uplatnění v aplikacích, které vyžadují vynikající schopnost detekce, výjimečnou rozlišovací schopnost a velmi vysokou přesnost. ⁽²⁾⁽⁶⁾⁽¹¹⁾

2.1.6 Detektor

Tato oblast hmotnostního spektrometru má úkol detekovat a kvantifikovat ionty prošlé hmotnostním analyzátozem a převádí jejich signál na elektrický impuls. V hmotnostních spektrometrech se používají tyto typy detektorů: Faradayova klec, elektronový fotonásobič s kontinuální dynodou (channeltron) a elektronový fotonásobič s diskrétními dynodami. V současnosti se vzhledem k analýze stopových množství používá zejména elektronový fotonásobič s diskrétními dynodami. ⁽²⁾⁽⁶⁾⁽¹¹⁾

2.1.6.1 Faradayova klec

Detektor má nízké detekční limity a jeho samostatné použití je tím velmi limitováno. Častěji se Faradayova klec používá ve spojení s elektronovým násobičem. Tento jednoduchý detektor tvoří konverzní elektroda miskovitého tvaru. Dopad iontu způsobí vyrazení elektronu z povrchu elektrody, který je pak zachycen obklopující sběrnou elektrodou. Vzniklý

elektrický proud je zesilován pomocí zesilovače, jehož šum má negativní vliv na citlivost detektoru. Pracovní rozsah Faradayovy klece začíná v řádu 10^4 cps. Tento detektor má i v současnosti využití ve spojení se magnetickým sektorovým analyzátozem, zejména jako multikolektor pro stanovení přesných izotopových poměrů. ⁽²⁾⁽⁶⁾

2.1.6.2. Elektronový násobič s kontinuální dynodou

Konstrukci elektronového násobiče tvoří zužující se trubice, do jejíž širší části dopadají ionty. Skleněná trubice je pokryta vrstvou z polovodičového materiálu. Pro detekci kladně nabitých iontů je na začátek trubice vkládán vysoký negativní potenciál, zatímco vzdálený konec je uzemněn. Ionty prošlé hmotnostním analyzátozem jsou přitahovány negativním potenciálem, dopadají na stěnu trubice, odkud jsou vyraženy sekundární elektrony, které jsou vedeny dále do trubice. Opakovanými dopady na stěnu trubice dochází k uvolňování dalších elektronů. Výsledkem je až milionkrát zesílený elektronový proud. Elektronový násobič s kontinuální dynodou má vysokou citlivost, avšak relativně krátkou životnost. ⁽⁶⁾

2.1.6.3 Elektronový násobič s diskrétními dynodami

Tyto detektory pracují podobným způsobem jako násobič s kontinuální dynodou. Násobení elektronů ovšem provádějí oddělené dynody, na které je vložen rostoucí negativní potenciál. Detektor je umístěn mimo osu, aby byl minimalizován šum pozadí z iontového zdroje způsobený zářením a neutrálními částicemi. Ionty prošlé hmotnostním analyzátozem narazí na první dynodu, ze které uvolní sekundární elektrony. Elektron-optická konstrukce dynod zrychluje tyto sekundární elektrony na další dynody, kde generují více elektronů. Tento proces se opakuje, dokud není proud elektronů nakonec zachycen anodou. Násobič obsahuje 10 – 20 dynod. Detektor s diskrétními dynodami je oproti detektoru s kontinuální dynodou až o 50-100% citlivější. ⁽⁶⁾

Pro zvýšení dynamického rozsahu detektoru se využívá měření v analogovém a pulzním režimu. Přepínáním mezi nimi mohou být stanoveny nízké i vysoké koncentrace ve stejném vzorku. Pro nízké koncentrace je využíván pulzní režim, který poskytuje větší zesílení elektronového pulzu. Pro stanovení vysokých koncentrací se používá režim analogový. Dynamický rozsah detektoru s přepínatelnými režimy je osm až devět řádů. ⁽⁶⁾⁽¹³⁾

2.1.7 Interference v ICP - MS

Přestože v ICP-MS nejsou interference tak rozšířené jako v optické spektrometrii s nižším rozlišením, zaslouží si pečlivou pozornost.

Podle jejich původu rozlišujeme interference spektrální a nespektrální. Spektrální interference nastávají v důsledku překrytí atomových hmotností různých prvků, tedy izobarickým rušením a molekulární procesy. Nespektrální interference jsou spojené s maticí vzorku.⁽¹³⁾

2.1.7.1 Nespektrální interference

Nespektrální interference způsobuje celkový obsah rozpuštěných tuhých látek ve vzorku. Vysoké množství těchto látek ovlivňuje transport vzorku a zmlžování, přičemž může docházet k zanášení hadiček a zamlžovací trysky. Dále ovlivňují ionizaci v plazmatu a v nespolední řadě mohou blokovat interface usazenými částicemi. Výsledkem je vždy snížení citlivosti.

Nespektrální interference lze eliminovat ředěním vzorku, použitím vhodného vnitřního standardu, využitím metody standardního přídavku, nebo spojením ICP-MS s chromatografickou separační technikou. Nejobvyklejším způsobem eliminace nespektrálních interferencí je použití vhodného interního standardu. Standard nesmí být přítomen v analyzovaném vzorku, ale musí mít podobné vlastnosti, jako analyzované prvky, zejména podobnou hmotnost a blízký ionizační potenciál. Pro multielementární analýzy se používají směsi několika standardů. Často využívanými prvky pro přípravu standardů jsou: ^{45}Sc , ^{89}Y , ^{103}Rh a ^{115}In .^{(2) (6) (13)}

2.1.7.2 Spektrální interference

Spektrální interference představují v analýzách ICP-MS závažný problém. Mohou být způsobeny celou řadou faktorů v závislosti na použitém plazmovém plynu a na maticí rozpouštědla. Například při použití argonu jako plazmového plynu jsou spektrální interference, způsobené překrytím iontů argonu a iontů jiného prvku, velmi časté.

Lze je rozdělit do několika typů: izobarické, polyatomické, tvorba oxidových a hydroxidových iontů a tvorba dvojnásobně nabitých iontů.

Spektrální interference se projevují v závislosti na rozlišovací schopnosti hmotnostního analyzátoru.^{(2) (6) (13)}

2.1.7.2.1. Izobarické interference

Tyto interference nastávají v situaci, kdy se v analytu vyskytují dva izotopy odlišných prvků s velmi podobnou hmotností. Téměř 70 % prvků se přirozeně vyskytuje v několika izotopech. Dva různé izotopy nemohou mít zcela stejnou hmotnost, rozdíly však mohou být velmi malé (v řádu 0,005 m/z), a analyzátor s nedostatečným rozlišením je jednoduše nedokáže od sebe rozlišit.

Eliminaci izobarických interferencí lze provést několika způsoby. Pokud je to možné, zvolí se takový izotop prvku, který interferencí není zatížen. Například nikl se vyskytuje ve dvou izotopech: ^{58}Ni a ^{60}Ni . Ovšem pro měření bývá využíván jen ^{60}Ni , protože ^{58}Ni bývá často zatížen interferencí izotopu ^{58}Fe . V druhém případě, se provede matematická korekce. Kromě prvků z analyzovaného vzorku je třeba vzít v potaz také prvky z plazmového plynu. Například s ohledem na obvyklé použití argonu a tedy přítomností iontu $^{40}\text{Ar}^+$, nelze stanovit vápník pomocí iontu ^{40}Ca .

Izobarické překryvy patří do skupiny méně závažných interferencí. ^{(2) (6) (13)}

2.1.7.2.2. Polyatomické interference

Tento druh interferencí je způsoben krátkodobými adukty, které vznikají reakcí dvou až několika druhů atomů. Tyto adukty mají stejnou hodnotu m/z, jako analyzované ionty. Mezi hlavní interferenty patří sloučeniny argonu, kyslíku a vodíku. Složení aduktů závisí na použitém plazmovém plynu a na chemikáliích, využitých k přípravě vzorku. Tab. I. ukazuje běžné interference při použití vody, kyseliny dusičné, sírové a chlorovodíkové.

Polyatomické interference vznikají v závislosti na kombinaci faktorů jako je nastavení parametrů (příkon plazmatu, průtok argonu) a geometrie interface. Polyatomické ionty jsou pravděpodobně tvořeny na rozhraní ICP zdroje a hmotnostního spektrometru. Nejvíce se vyskytují oblasti do 82 m/z. Polyatomické interference představují nejčastější a nejproblematičtější skupinu. ^{(2) (6) (13)}

Tab. I. Polyatomické interference ICP-MS, s běžně používanými rozpouštědly⁽⁶⁾

Izotop	Matrice	Interference
$^{39}\text{K}^+$	H_2O	$^{38}\text{ArH}^+$
$^{40}\text{Ca}^+$	H_2O	$^{40}\text{Ar}^+$
$^{56}\text{Fe}^+$	H_2O	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$
$^{80}\text{Se}^+$	H_2O	$^{40}\text{Ar}^{40}\text{Ar}^+$
$^{51}\text{V}^+$	HCl	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$
$^{75}\text{As}^+$	HCl	$^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$
$^{28}\text{Si}^+$	HNO_3	$^{14}\text{N}^{14}\text{N}^+$
$^{44}\text{Ca}^+$	HNO_3	$^{14}\text{N}^{14}\text{N}^{16}\text{O}^+$
$^{55}\text{Mn}^+$	HNO_3	$^{40}\text{Ar}^{15}\text{N}^+$
$^{48}\text{Ti}^+$	H_2SO_4	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}^+$
$^{52}\text{Cr}^+$	H_2SO_4	$^{34}\text{S}^{16}\text{O}^+$
$^{64}\text{Zn}^+$	H_2SO_4	$^{32}\text{S}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$
$^{63}\text{Cu}^+$	H_2SO_4	$^{31}\text{P}^{16}\text{O}^{16}\text{O}^+$
$^{24}\text{Mg}^+$	Organická matrice	$^{12}\text{C}^{12}\text{C}^+$
$^{52}\text{Cr}^+$	Organická matrice	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$
$^{65}\text{Cu}^+$	Horniny	$^{48}\text{Ca}^{16}\text{OH}^+$
$^{64}\text{Zn}^+$	Horniny	$^{48}\text{Ca}^{16}\text{O}^+$
$^{63}\text{Cu}^+$	Mořská voda	$^{40}\text{Ar}^{23}\text{Na}^+$

2.1.7.2.3. Tvorba oxidových a hydroxidových iontů

Oxidy MeO^+ a hydroxidy MeOH^+ mohou vznikat nedokonalou atomizací, reakcí atomů kovů s kyslíkem pocházejícím z rozpouštědla nebo ze vzduchu. Těmito interferencemi jsou zatíženy především prvky vzácných zemin.

V současnosti je test stupně tvorby oxidových iontů jedním ze základních parametrů pro správnou funkci ICP-MS. Redukce tvorby oxidů a hydroxidů lze dosáhnout pomocí účinné desolvatace aerosolu, snížením průtoků argonu zmlžovačem, nebo přidáním dusíku do plazmového plynu, který odstraňuje kyslík.⁽¹³⁾

2.1.7.2.4 Tvorba dvojnásobně nabitých iontů

Dvojnásobně nabitě ionty vznikají ionizací do druhého stupně, která nastává u prvků s nízkým druhým ionizačním potenciálem (do 14 eV). Toho dosahují kovy alkalických zemin, kovy vzácných zemin a některé přechodné kovy.

Vzhledem k faktu, že hmotnostní analyzátoři separují ionty dle poměru m/z , stanovují dvojnásobně nabitě ionty nepravdivě jako ionty s poloviční hmotností. Například $^{138}\text{Ba}^+$ interferuje na hmotnosti 69, kde překrývá iont $^{69}\text{Ge}^+$.

Test podílu dvojnásobně nabitých iontů patří také do základních parametrů správné funkce ICP-MS. ^{(6) (13)}

2.1.7.3 Metody eliminace spektrálních interferencí

K eliminování spektrálních interferencí je v současnosti k dispozici celá řada účinných postupů. Jsou to například vhodná úprava přístrojových parametrů, desolvatace rozpouštědla a další prekoncentrační techniky, volba jiného izotopu, nebo použití přístroje s lepším rozlišením. Dále je možné uplatnit matematické korekční rovnice, využít kolizní či reakční cely. ⁽¹³⁾

2.1.7.3.1 Matematické korekční rovnice

Korekční rovnice lze použít pro kompenzaci izobarických a některých polyatomických interferencí. Kromě sledovaného izotopu je proměřena také intenzita signálu jiného izotopu interferujícího iontu. Tím získáme poměr relativního zastoupení.

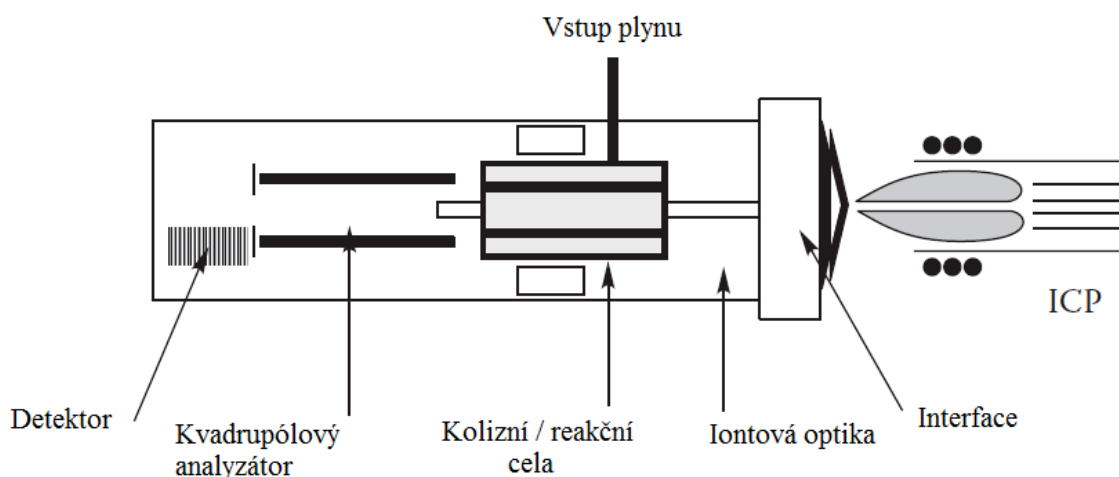
Například, pokud je signál izotopu ^{114}Cd překrýván signálem izotopu ^{114}Sn (který má relativní zastoupení 0,65 %), proměří se kromě linie $m/z = 114$ také signál izotopu ^{118}Sn (24,23 %) intenzita signálu pouze pro ^{114}Cd se vypočítá z rovnice (6): ⁽⁶⁾

$$^{114}\text{Cd} = \text{hmota } 114 - \left(\frac{0,65\%}{24,23\%} \right) \times ^{118}\text{Sn} \quad (6)$$

2.1.7.3.2 Kolizně-reakční cely

Moderním způsobem eliminace polyatomických a oxidových interferencí je použití tzv. kolizní nebo reakční cely. Cella je umístěna za iontovou optikou, před kvadrupólovým analyzátořem (obr. 14). Obsahuje multipól (kvadrupól, hexapól či oktapól) s RF polem, které ionty neseperuje, ale pouze fokusuje. Ionty následně interagují s kolizním nebo reakčním plynem, který je do cely přiváděn vstupním ventilem.

Pro univerzálnější aplikace je vhodnější kolizní cela, k eliminaci všech interferencí využívá maximálně 2 plyny. Naproti tomu reakční cela potřebuje zvláštní plyn pro každý typ interference. ^{(2) (6) (13)}



Obr. 14 Schéma instrumenta ICP-MS s kolizní / reakční celou ⁽⁶⁾

Kolizní cely

Kolizní cela je promývána inertním plynem (He, Ar, aj.). Procházející interferenty jsou eliminovány pomocí mechanismu diskriminace kinetické energie. Nežádoucí ionty po vstupu do cely podstoupí řadu srážek s inertním plynem, čímž postupně ztrácí svoji kinetickou energii.

Vložení vhodného napětí je iontům s příliš nízkou kinetickou energií znemožněn postup dále do analyzátoru. Velké polyatomické ionty mají mnohem větší pravděpodobnost srážek a možnost jejich průchodu celou je tak významně snížena. Oproti tomu analyzovaným iontům nebyla energie dle pravděpodobnosti výrazně snížena a postupují dále. ^{(2) (6) (13)}

Reakční cely

Reakční cela obsahuje kvadrupól a je naplněna reakčním plynem (NH_3 , CH_4 , CO_2 , O_2). Polyatomické ionty jsou eliminovány chemickou reakcí s molekulami reakčního plynu, reakcí vznikají neinterferující nebo neutrální částice. Ionty analytu díky tomu procházejí dále do hmotnostního analyzátoru už bez interferujících částic.

Použití reakčního plynu zvyšuje ion-molekulové reakce, díky čemuž je eliminace interferencí velmi rychlá a účinná.⁽²⁾⁽⁶⁾⁽¹³⁾

2.2. Rozklady biologických materiálů⁽¹⁴⁾

Rozklady vzorků jsou významnou součástí analytických operací, obecně nazývaných příprava vzorku k měření. Mnoho současných moderních analytických technik vyžaduje vzorek v kapalném skupenství, nejlépe i s dokonale odstraněnou organickou osnovou.

Účelem rozkladu jsou jednak fyzikální hlediska jako snížení viskozity a zvýšení homogenity, ale především hlediska chemická – uvolnění chemických vazeb či odstranění interferujících složek. Pro rozklady organické hmoty je nutno překonat vysokou aktivační energii při její destrukci. Jedná se o zcela destruktivní techniku, při které dochází k nevratnému poškození původní látky.

Metody rozkladu biologických vzorků pro stanovení stopových prvků lze podle použitého postupu rozdělit na tři hlavní oblasti: rozklady na suché cestě, rozklady na mokré cestě a ostatní metody rozkladů.

Volba konkrétní techniky je závislá na celé řadě faktorů, jako jsou: analyzované látky, účel stanovení, matrice, velikost navážky apod.

2.2.1 Suchý rozklad

Jedná se o nejstarší používaný způsob rozkladu využívaný minimálně už od středověku. Tradiční suchý rozklad probíhá za atmosférického tlaku v otevřeném systému. Obsahuje čtyři základní kroky: sušení, zuhelnatění, zpopelnění a loužení popela. Tyto kroky lze ještě doplnit o přídavek pomocného činidla a opakované zpopelnění.

Sušení se provádí pomocí laboratorní horkovzdušné sušárny, lyofilizátoru nebo použitím topné desky. Zuhelnatění je nejrizikovější část rozkladu kvůli svému exotermnímu charakteru. Provádí se při teplotách 200 – 400 °C. Biologické materiály jsou zpopelňovány při teplotách 450 – 550 °C. Teplota je postupně zvyšována obvykle v průběhu 10 – 16 hodin. Loužení popela se provádí zpravidla v ředěných minerálních kyselinách (HCl, HNO₃) v ultrazvukové lázni.

Často se k postupu zařazuje tzv. pomocné činidlo, které zvyšuje účinnost rozkladu (např. HNO_3 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$), převádí analyty do méně těkavých forem (např. H_2SO_4 , K_2SO_4) nebo eliminuje interakce se stěnami reakční nádoby.

Moderní podoba suchého rozkladu je prováděna v uzavřeném nebo polouzavřeném systému. Příkladem může být tzv. nízkoteplotní zpopelnění (LTA), které probíhá za nízkého tlaku v atmosféře kyslíku. Za tlaku 100 – 1000 Pa je v kyslíku vytvořeno nízkoteplotní vysokofrekvenční plazma, ve kterém dosahují elektrony teploty až 20 000 K. Excitované atomy a ionty kyslíku reagují přímo s uhlíkem na povrchu rozkládaného vzorku, touto reakcí vzniká CO_2 . Stejná reakce probíhá i s dalšími atomy (S, P, H) na povrchu vzorku. Díky tomuto systému, kdy mineralizace probíhá na povrchu a v dutinách porézních látek, dochází k dokonalému spálení biologických vzorků.

2.2.2 Mokrý rozklad

Tradiční metoda mokrého rozkladu probíhá při atmosférickém tlaku, za zvýšené teploty a s použitím směsi koncentrovaných minerálních kyselin, které analyzovaný vzorek oxidují. V prvním kroku je struktura vzorku narušena kyselou hydrolýzou, jejíž produkty jsou v druhém kroku zoxidovány. Rychlost reakce určuje reakční teplota, jejíž maximální hodnota je imitována bodem varu oxidačních činidel. Nejčastěji je používána samotná HNO_3 a oxidační směsi: HNO_3 s H_2O_2 , HNO_3 s H_2SO_4 , HNO_3 s HClO_4 , nebo směs HNO_3 , HClO_4 a H_2SO_4 .

Současné metody mokrého rozkladu lze dělit podle toho, zda probíhají v otevřeném nebo v uzavřeném systému, a také zda je použit konvenční nebo mikrovlnný ohřev.

Rozklad v uzavřeném systému je výrazně výhodnější, protože brání ztrátám těkavých prvků, zamezuje vnější kontaminaci a snižuje spotřebu reakčních činidel. Pro stopovou analýzu je nejrozšířenější rozklad v uzavřeném systému s mikrovlnným ohřevem.

Mikrovlnné záření je generováno magnetronem. V molekulách, pomocí pohybu iontů a rotací dipólů, vyvolává záření vibraci molekul beze změny struktury. Absorpcí mikrovlnného záření látkou tak dochází k velmi rychlému a účinnému nárůstu teploty.

V praxi se využívají dva typy konstrukcí - systémy s rozptýleným nebo fokusovaným mikrovlnným polem. Mikrovlnná pec systému s rozptýleným polem obsahuje rotor s reakčními nádobkami, jehož otáčení během rozkladu zajišťuje rovnoměrný přísun energie do všech reakčních nádobek. U systémů s fokusovaným mikrovlnným zářením je energie

přiváděna přímo do místa rozkladu vzorku. Nádobky pro mikrovlnné rozklady jsou obvykle vyrobeny z teflonu, který je dostatečně chemicky i tepelně rezistentní, a zároveň je pro mikrovlnné záření propustný.

K zásadním výhodám těchto rozkladů patří úspora kyselin a energie potřebné k rozkladu a výrazně menší časová náročnost.

2.3. Aplikace ICP-MS v analýze klinických vzorků

Možnosti klinických aplikací za použití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem se za posledních deset let výrazně rozšířily. Zejména díky vlastnostem ICP-MS, jako jsou nízké meze detekce limity, stopová analýza s použitím malého objemu vzorku, nebo rychlá multielementární analýza umožňující rychlou diagnózu.

V současné době lze analyzovat tyto biologické vzorky: krev, plazmu, sérum, moč, intersticiální tekutiny, vnitřní orgány, zuby, kosti, vlasy, nehty i různé typy lidských a zvířecích buněk.

Problémem při analýze klinických vzorků zůstávají interference, které jsou způsobeny vysokým obsahem organických látek a anorganických solí v biologických tekutinách.⁽⁷⁾

2.3.1. Příprava klinických vzorků

Po odběru by měly být klinické vzorky zmrazeny, nebo alespoň chlazeny v ledničce. Před samotnou analýzou by vzorky měly samovolně dosáhnout pokojové teploty a poté jsou homogenizovány. Biologické vzorky je obvykle nutno zředit, aby vysoký obsah proteinů a soli nezpůsobil ucpání zmlžovače nebo otvory v interface. Rozklad vzorků není prováděn jen u pevných klinických materiálů, ale i kapalných vzorků moči a krve aj.⁽⁷⁾

2.3.1 Stanovení kovů v nehtech

J.P. Goullé a kol. stanovovali pomocí hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem koncentraci kovů v nehtech z rukou a nohou. Vzorky nehtů byly získány od 130 zdravých dobrovolníků. Vzorky byly dekontaminovány v teplé vodě a v acetonu a navážky 20 mg byly mineralizovány kyselinou dusičnou. Ve vzorcích byly stanoveny tyto prvky: Li, Be, B, Al, V, Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Rb, Sr, Mo, Pd, Ag, Cd, Sn, Sb, Te, Ba, La, Gd, W, Pt, Hg, Tl, Pb, Bi, a U. Meze detekce byly rozmezí od 0,04 ng.g⁻¹ do 0,1 µg.g⁻¹.

Vzhledem k nedostatku dostupných certifikovaných referenčních materiálů pro nehty, vzorky byly změřeny i v jiné laboratoři, aby byla zajištěna kvalita výsledků.

Analýza nehtů pomocí ICP-MS umožňuje neinvazivní řešení k posouzení průmyslových a domácích expozicí.⁽¹⁵⁾

A. Przybylowicz a kol. se zabývali validací metody pro stanovením stopových prvků ve vlasech a nehtech zdravých dobrovolníků. Vyvinutá metoda obsahuje promývání, mineralizaci a stanovení ICP-MS 10 prvků (Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Ni, Pb a Zn) ve vlasech a nehtech. Koncentrace vybraných prvků ve vlasech, a nehtech byly naměřeny u 24 žen a 18 mužů.

Vzorky nehtů byly odebrány keramickými nůžkami. Ústřižky byly promyty a protřepány na vortexu s deionizovanou vodou a následně ultrazvukovány v methanolu. Po promytí byly vzorky sušeny přes noc při 80 °C a rozloženy s 5 ml HNO₃ v mikrovlnném systému. Meze detekce byly stanoveny z hodnot 10 slepých vzorků v rozmezí 0,002 μg.g⁻¹ u kobaltu po 0,016 mg.g⁻¹ u vápníku. K analýze chromu byla použita reakční cela.

Dále byly porovnány koncentrace prvků ve vzorcích nehtů odebraných mužům a ženám, byly vyhodnoceny jako shodné.

I. Rodushkin a M. D. Axelsson se věnovali multielementární analýze vlasů a nehtů pomocí ICP-MS se sektorovým analyzátořem s dvojitou fokusací. Vzorky nehtů byly získány od dobrovolníků ve věku 3 – 33 let. Byly několikrát promyty v neionizované vodě a acetonu za použití ultrazvukové lázně a třepačky. Vzorky o průměrné navážce 50 mg byly rozkládány v mikrovlnném systému s 0,5 ml HNO₃ a s 0,5 ml H₂O₂. Meze detekce byly stanoveny pod ng.g⁻¹. K potlačení interferencí byly využity vnitřní standardy a matematické korekční rovnice.⁽¹⁶⁾

V navazující práci autoři použili ICP-MS se sektorovým analyzátořem s dvojitou fokusací ke stanovení 71 prvků ve vzorcích nehtů a vlasů obyvatel Švédska. Využili statistickou analýzu pro objasnění rozdílů v závislosti na pohlaví, věku a kouření.⁽¹⁷⁾

2.3.2 Stanovení kovů v kostech

Okazaki a kolektiv sledovali koncentrace kovů v holenních kostech krys s kovovými implantáty v závislosti na použitém implantátu a délce expozice. Do krysí holenní kosti byly

implantovány různé kovové implantáty po dobu až 48 týdnů. Byly použity následující implantáty: SUS316L nerezová ocel, slitiny Co-Cr-Mo, Ti-6Al-4V a Ti-15Zr-4Nb-4Ta.

Po usmrcení krysy a odstranění kovové náhrady, byly kosti v okolí implantátu lyofilizovány a rozloženy s pomocí minerálních kyselin a mikrovlnného záření. Pro stanovení koncentrací kovů v kostech pomocí ICP-MS byly použity tyto izotopy: ^{59}Co , ^{52}Cr , ^{53}Cr , ^{58}Ni , ^{60}Ni , ^{98}Mo , ^{96}Mo , ^{49}Ti , ^{50}Ti , ^{27}Al , ^{51}V , ^{90}Zr , ^{91}Zr , ^{93}Nb a ^{181}Ta . Koncentrace kovů byly analyzovány v 6, 12, 24 a 48 týdnu po implantaci.

Měření prokázala zvýšení koncentrace kovů v kostech, které byly v přímém kontaktu s kovovým implantátem. U slitiny Ti-6Al-4V byl zaznamenán nárůst titanu, hliníku a v menší míře i vanadu. Kontaminace proběhla do 100 dnů od vložení implantátu a dále zůstávala konstantní. Implantáty se slitinou Co-Cr-Mo, vykazovali velmi podobné chování, s výjimkou chromu, jehož koncentrace nárůstu začala po 100 dnech pozvolna klesat. U nerezové oceli SUS316L koncentrace chromu po 6 týdnech začala také klesat, ovšem úroveň molybdenu zůstala po počátečním nárůstu konstantní. Nejnižší hodnoty koncentrací v průběhu celých 48 týdnů prokazovaly kosti kolem slitiny typu Ti-15Zr-4Nb-4Ta, což dokazuje, že tento materiál je vhodný pro dlouhodobé implantáty.⁽¹⁸⁾

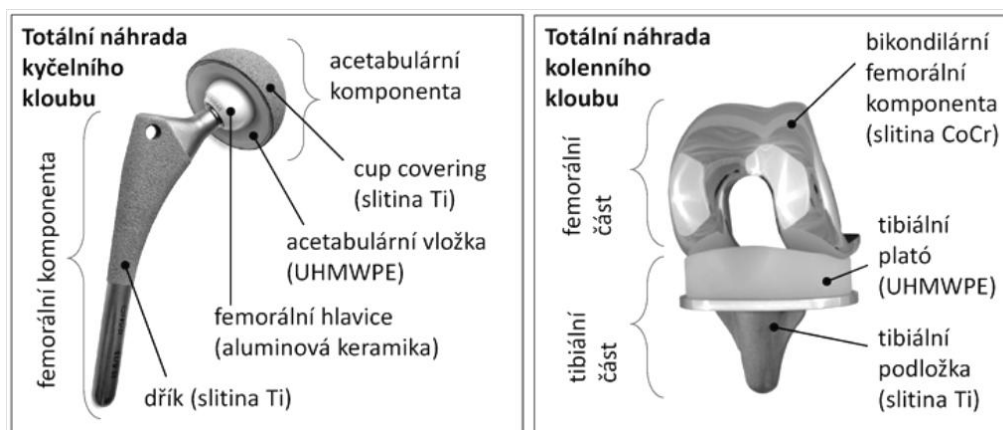
Vladimir Zaichick stanovil 69 chemických prvků v lidské kostní tkáni. Vzorky byly posmrtně (do 24 hodin od smrti) odebrány z žeber 84 zdánlivě zdravých osob v rozmezí 15 – 58 let, z toho bylo 38 žen a 46 mužů. Prvky stanovil za použití pěti analytických instrumentálních metod, včetně ICP-MS. Pro měření ICP-MS byly vzorky o váze 50 – 100 mg rozloženy v autoklávech s 1,5 ml přidané kyseliny dusičné a 0,3 ml peroxidu vodíku.⁽¹⁹⁾

2.4. Kovové materiály pro kloubní implantáty

Kovy a jejich slitiny byly pro různé kovové výztuhy kostí využívány již od šestnáctého století. Od roku 1829 jsou známy první vědecké práce o reakcích živé tkáně na kovy. V osmdesátých letech 19. století byly pro první antiseptickou operační techniku využity stříbrné dráty na šití kostí. Velký rozvoj umožnil objev rentgenu (1895), díky němuž je možné kostní tkáně a příp. implantáty zobrazovat. V dalších letech začal systematický výzkum materiálů. Byla využívána poniklovaná ocel, neúspěšně byly aplikovány kostní výztuhy z hliníku, hořčíku, mosazi a bronzu. První kobaltové slitiny byly použity v roce 1936. První endoprotéza z titanové slitiny Ti-6Al-4V byla voperována v roce 1958.⁽²⁰⁾

Aloplastika (částečná či úplná rekonstrukce kloubu s použitím cizího materiálu - kovu, umělé hmoty nebo keramiky) je velmi radikální a invazivní metoda. Implantované klouby musí být přizpůsobeny přirozenému pohybu. Materiály implantátů musí splňovat biochemická (korozivní odolnost, nedráždivost, biologická nezávadnost) a biomechanická kritéria (mechanické namáhání, únavová pevnost materiálu).⁽²⁰⁾

Nejčastěji je prováděna aloplastika kyčelního a kolenního kloubu. Důvodem je silná zátěž a opotřebení těchto kloubů. Kyčelní kloub je snadno napodobitelný a stal prvním vyměněným kloubem v lidském těle. Kloubní náhrada kyčelního kloubu je obvykle tvořena jamkou v pánevní kosti, hlavicí a dříkem, který je voperován do stehenní kosti. Kolenní kloub je složen z femorální a tibiální komponenty. Příklad implantátů kyčelního a kolenní kloubu je popsán na obr. 15.⁽²⁰⁾



Obr. 15 Popis implantátů kyčelního a kolenního kloubu⁽²¹⁾

Materiály kloubních náhrad musí splňovat mezinárodní standardy. Mezi nejčastěji používané skupiny kovových materiálů patří korozivní ocel typu Cr-Ni-Mo, slitiny typu Co-Cr-Mo a slitiny titanu. Samotný titan se však téměř nepoužívá pro svou malou pevnost a tvrdost, jsou do něj přidávány legury zvyšující pevnost, například: Al, V, Mo, Mn, Cr a C.⁽²⁰⁾

2.5. Stanovení kovů v klinických vzorcích v souvislosti s kloubními implantáty

Běžně jsou v souvislosti s uvolňováním kovů z implantovaných kloubních náhrad analyzovány vzorky krevního séra, moči, kloubní tekutiny a tkání, obklopující kloubní implantát.

T. Hanawa zkoumal uvolňování kovových iontů z kovových materiálů (např. nerezové oceli, slitin kobaltu, titanu apod.) implantovaných do lidského těla. Bylo zjištěno, že vrstva oxidů na povrchu kovových materiálů působí jako inhibitor. Uvolňování naopak může urychlit koncentrace rozpuštěného kyslíku a anorganických iontů v tělesných tekutinách. Velmi také záleží na použitých materiálech. Přednostně se uvolňují ionty při mechanickém tření kovových součástí implantátu. Bylo zjištěno, že uvolněné ionty nemusí mít vždy toxické účinky. Například iont titanu je velmi aktivní a téměř okamžitě reaguje s hydroxylovými radikály či anionty v tělesné tekutině a snižuje se tak možnost kombinace s biomolekulou. Oproti tomu neaktivní ionty (např. iont niklu nebo mědi) mohou zůstat relativně dlouhou dobu v iontovém stavu, mohou pravděpodobněji reagovat s biomolekulou a vyvolat toxické účinky.⁽²²⁾

A. Sarmiento-Gonzales a kolektiv se zabývali akumulací vybraných kovů (Ti, V, Cr, Co, Ni, Mo) ve vzorcích krve a moči pacientů s implantovanou kloubní náhradou pomocí ICP-MS a vysokým rozlišením. Skupina 65 pacientů byla rozdělena do tří skupin podle typu a materiálu kloubní náhrady. Do kontrolní skupiny bylo zařazeno 9 osob bez jakékoliv kovového implantátu v těle. Koncentrace V, Cr, Co, Ni, Mo v moči a krvi byly v obou skupinách velmi podobné. Byla ovšem prokázána zvýšená koncentrace titanu ve vzorcích krve i moči u pacientů s kloubním implantátem.⁽²³⁾

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie, přístroje a pomůcky

3.1.1 Chemikálie

- CRM vodného roztoku kalibračního standardu o koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g.l}^{-1}$ (Ti) v 5 % HNO₃ + 1 % HF (v/v) o čistotě 99,98 %, Analytika, spol. s.r.o., Praha
- CRM vodného roztoku kalibračního standardu o koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g.l}^{-1}$ (Nb) v 5 % HNO₃ + 1 % HF (v/v) o čistotě 99,98 %, Analytika, spol. s.r.o., Praha
- CRM vodného roztoku kalibračního standardu o koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g.l}^{-1}$ (Co) v 2 % HNO₃ (v/v) o čistotě 99,995 %, Analytika, spol. s.r.o., Praha
- CRM vodného roztoku kalibračního standardu o koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g.l}^{-1}$ (Cr) v 2 % HCl (v/v) o čistotě 99,995 %, Analytika, spol. s.r.o., Praha
- CRM vodného kalibračního roztoku o hmotnostní koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g.l}^{-1}$ (Mn) v 2 % HNO₃ (v/v) o čistotě 99,98 %, Analytika spol. s.r.o., Praha
- CRM vodného kalibračního roztoku o hmotnostní koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g.l}^{-1}$ (V) v 2 % HNO₃ (v/v) o čistotě 99,995 %, Analytika spol. s.r.o., Praha
- CRM vodného roztoku kalibračního standardu o koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g.l}^{-1}$ (Al), v 5 % HNO₃ (v/v) o čistotě 99,999 %, Analytika, spol. s.r.o., Praha
- CRM vodného roztoku kalibračního standardu o koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g.l}^{-1}$ (Mo), v 2 % NH₄OH (v/v) o čistotě 99,999 %, Analytika, spol. s.r.o., Praha
- CRM vodného roztoku kalibračního standardu o $1,000 \pm 0,002 \text{ g.l}^{-1}$ (Ni), v 2 % HNO₃ (v/v) o čistotě 99,999 %, Analytika, spol. s.r.o., Praha
- CRM vodného roztoku kalibračního standardu o koncentraci $1,000 \pm 0,002 \text{ g.l}^{-1}$ (Pb), v 2 % HNO₃ (v/v) o čistotě 99,999 %, Analytika, spol. s.r.o., Praha
- peroxid vodíku (30 %) pro stopovou analýzu, Analytika, spol. s.r.o., Praha
- kyselina dusičná (67 %), Analpure, pro stopovou analýzu, Analytika, spol. s.r.o., Praha
- kalibrační roztok interního koncentraci standardu pro ICP-MS INT MIX1 $10 \pm 0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ (Y, In, Bi, Tb v 5 % HNO₃ (v/v)) Analytika spol. s.r.o., Praha
- Tuning Solution for ICP-MS 7500cs $1 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ (Ce, Co, Li, Mg, Tl, Y v 2 % HNO₃ (v/v)), Agilent Technologies, USA

- Certifikovaný referenční materiál krve SeronormTM Trace Elements Whole Blood L-3, (LOT 1112691) SERO AS, Norsko
- Certifikovaný referenční materiál krve SeronormTM Trace Elements Urine (LOT 0211545) SERO AS, Norsko
- Certifikovaný referenční materiál TM-15.2 (LOT 0313), Environment Canada
- Deionizovaná voda

3.1.2 Přístroje

- ICP-MS 7700x Series, Agilent Technologies, USA
- elektronické váhy ABJ 220-4M, KERN & Sohn GmbH, Německo
- mikrovlnný laboratorní systém MLS 1200 mega, Milestone, Itálie
- přístroj pro přípravu deionizované vody, Direct – Q UV Millipore, Francie
- ultrazvuková lázeň D-78224, Elma, Německo

Pro rozklad vzorků byl použit mikrovlnný laboratorní systém MLS 1200 mega (Milestone). Systém využívá rozptýleného mikrovlnného záření, které proniká do komory, kde je umístěno šest teflonových kelímků. V nich je uzavřen vzorek s mineralizační směsí. Kelímky jsou pevně upevněny v rotoru, jehož konstantním otáčením působí mikrovlnné záření rovnoměrně na všechny vzorky. Absorpci záření jsou vzorky efektivně zahřívány a následně rozkládány.

Pro zavádění vzorků k ICP-MS byl využit autosampler ASX-520 (Agilent Technologies, USA), peristaltická pumpa s deseti válečky, mikrokoncentrický zmlžovač GE Micromist a chlazená Scottova mlžná komora. Samotný ICP-MS 7700x Series (Agilent Technologies, USA) byl vybaven niklovými kónusy, oktapólovou reakčně-kolizní celou a kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem.

Pro analýzy byl použit argon s dostatečnou čistotou (nejméně 4,6; zásobník Euro-Cyl 230; SIAD). Reakčně-kolizní cela byla využita k potlačení spektrálních interferencí při stanovení Al, Ti, V, Cr, Mn, Co, Ni, Nb, Mo a Pb jako kolizní plyn využito helium (čistota 5,5; SIAD).

3.1.3 Pomůcky

- mineralizační teflonové kelímky s víčky
- automatické pipety Finnpipe (0,5 - 5 ml, 100 - 1000 µl, Thermo SCIENTIFIC)
- keramický nůž
- skleněné laboratorní nádobí (destičky, odměrné baňky 10, 25 ml, nálevky)
- plastové laboratorní nádobí (kelímky, zkumavky, pipetovací špičky)

Pro stanovení stopových množství kovů ve vzorcích je plastové i skleněné laboratorní nádobí, využívané k přípravě klinických vzorků, kalibračních roztoků a referenčních materiálů, nejprve řádně předpřipraveno ke stopové analýze. Nádobí je nejprve vloženo na 24 hodin do 10 % roztoku kyseliny dusičné, dále je několikrát opláchnuto deionizovanou vodou a vysušeno v sušárně. K zamezení kontaminace z okolního prostředí laboratoře byly ke skladování využity uzavíratelné plastové sáčky.

3.1.4 Analyzované vzorky

Vzorky kostí byly odebrány prof. MUDr. Jiřím Gallem, Ph.D, přednostou Ortopedické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc, při reoperacích pacientů s kloubní náhradou. Při těchto operacích byla z různých důvodů původní kloubní náhrada vyměněna za novou. Vzorky kostí byly odebírány z blízkosti původních kloubních implantátů a byly převedeny do plastových kelímků. Veškeré vzorky byly po převozu do laboratoře uchovávány v mrazničce při teplotě - 20 °C.

Stejným pacientům byly také odebrány vzorky nehtů. Dále byly odebrány kontrolní vzorky nehtů skupině osob různého pohlaví a věku, kteří žádnou kloubní náhradu nemají. Vzorky nehtů byly uchovány v uzavřených plastových sáčcích.

Pro analýzu byly vybrány kovy (Al, Ti, V, Cr, Mn, Co, Ni, Nb, Mo a Pb), ze kterých se obvykle vyrábějí kloubní implantáty a mohou se z nich tedy průběžně uvolňovat do organismu.

3.2. Pracovní postupy

3.2.1 Příprava vzorků

Nehtové ústřížky byly promyty deionizovanou vodou, ultrazvukovány v lázni po dobu 10 minut a sušeny při laboratorní teplotě cca 30 minut. Následně byly vzorky zváženy a převedeny do mineralizačních nádob. Navážky se pohybovali v rozmezí 0,0524 g – 0,1479 g. Ke vzorkům byla přidána směs 2 ml koncentrované kyseliny dusičné a 0,5 ml peroxidu vodíku.

Vzorky kostí byly po vyjmutí z mrazničky ponechány při laboratorní teplotě cca 30 minut do rozmrznutí. Následně byl každý vzorek mechanicky zbaven nadbytečné tkáně a případně rozseparován na menší části pomocí keramického nože. Dále byly vzorky ponořeny do ultrazvukové lázně a několikrát promyty deionizovanou vodou. Po vysušení byly vzorky zváženy a přeneseny do mineralizačních teflonových kelímků. Navážky jednotlivých vzorků byly v rozmezí od 0,0560 g do 1,1541 g. Do kelímků byla přidána mineralizační směs obsahující 3 ml koncentrované kyseliny dusičné a 1 ml peroxidu vodíku. Mineralizační nádoby poté byly uzavřeny a vloženy do mikrovlnného systému k rozkladu.

Slepé pokusy byly připraveny obdobným způsobem jako vzorky s totožnou mineralizační směsí.

3.2.2 Příprava referenčního materiálu

Lyofilizovaný vzorek certifikovaného referenčního materiálu byl k analýze upraven podle pokynů výrobce uvedených v návodu. Obvyklý postup začíná odstraněním šroubového uzávěru, dále je opatrně povytažena gumová zátka. Tím je lahvička zavzdušněna a po odstranění zátky je připipetována deionizovaná voda o daném objemu. Dále je lahvička uzavřena a obsah promíchán krouživými pohyby. Nakonec je referenční materiál ponechán k ustálení po definovanou dobu. K rozkladu a následné analýze je odpipetován a navážen 1 ml roztoku do mineralizační nádoby.

3.2.3 Rozklad vzorků a referenčních materiálů

Jak již bylo výše zmíněno, rozklad je realizován v mikrovlnném laboratorním systému MLS 1200 mega (Milestone). Rozkladný programu je podrobně popsán v Tab. II.

Po ukončení programu následuje pětiminutová ventilace, po které lze mineralizační nádobky vyjmout a nechat zchladnout až na laboratorní teplotu. Nakonec je obsah kelímků kvantitativně převeden do skleněných odměrných baněk o objemu 10 ml, které jsou doplněny deionizovanou vodou po rysku. Při použití autosampleru je nutné převést analyzované roztoky dále do plastových zkumavek, které jsou se sloty autosamplérem kompatibilní.

Po každém rozkladném kroku v mineralizačních nádobkách, následuje tzv, čistící krok. Do nádobek je nepipetováno po 3 ml HNO₃ a je na ně aplikován rozkladný program. Po čistícím kroku jsou kelímky promyty deionizovanou vodou a vysušeny v digestoři.

Tab. II: Rozkladný program

Krok	Čas (min)	Výkon (W)
1	2	250
2	2	0
3	5	400
4	2	0
5	2	500
6	2	0
7	6	600

3.2.4 Příprava kalibračních roztoků a interního standardu

Kalibrační roztoky byly připraveny z jednorvkových vodných kalibračních standardů o počáteční koncentraci 1 g.l⁻¹. Z těchto standardů byl nejprve připraven směsný kalibrační roztok o koncentraci 10 mg.l⁻¹, ze kterého pak byly dále připravovány ostatní kalibrační roztoky o požadované koncentraci. Bylo použito maximálně stonásobné ředění v jednom zřed'ovacím kroku. Připravené kalibrační roztoky byly okyseleny kyselinou dusičnou tak, aby její přídavek odpovídal obsahu kyseliny v analyzovaných vzorcích, které prošly mineralizací v mikrovlnném systému.

Při analýze kostí kalibrační řada obsahovala 6 kalibračních roztoků o koncentraci 1; 5; 10; 100; 500 a 1000 μg.l⁻¹. Pro stanovení obsahu kovů v nehtech obsahovala kalibrační řada 5 roztoků o koncentraci 0,1; 1; 5; 10 a 50 μg.l⁻¹. K ředění bylo použito pomůcky předpřipravené pro stopovou analýzu: skleněné baňky o objemu 25 ml, plastové kelímky, pipetovací špičky.

Pro potlačení nespektrálních interferencí byl použit roztok interního standardu o koncentraci 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Roztok byl připraven ředěním zásobního interního standardu pro ICP MS (INT MIX 1).

Dále byl pro kalibraci přístroje připraven ze zásobního roztoku tuning solution (koncentrace 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$) ladící roztok o koncentraci 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

3.3. Použité instrumentální techniky

3.3.1 ICP-MS

Pro stanovení koncentrací deseti vybraných prvků (^{27}Al , ^{47}Ti , ^{51}V , ^{52}Cr , ^{55}Mn , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{93}Nb , ^{95}Mo , ^{208}Pb) ve vzorcích nehtů, kostí a v referenčních materiálech byla využita technika ICP-MS s kvadrupólovým analyzátozem a s oktapólovou kolizní celou. Stanovení izotopů ^{27}Al a ^{208}Pb bylo provedeno bez použití kolizní cely. U ostatních prvků bylo využito helium, jako kolizní plyn k potlačení spektrálních interferencí. Tabulka III je ukázkou obvyklého nastavení základních parametrů přístroje. Nastavení čoček a kolizní cely je při každém měření optimalizováno na ladící roztok tuning solution. V tabulce IV jsou uvedeny měřicí módy, integrační časy a zvolené interní standardy pro jednotlivé izotopy. Interní standardy byly využity k potlačení nespektrálních interferencí.

Tab. III: *Typické podmínky měření*

Plazma		Kolizní cely	
Příkon generátoru	1550 W	Mód 1 (bez plynu)	
Průtoky Argonu		Cela vstup	-30 V
Vnější plazmový kanál	14,95 l.min ⁻¹	Cela výstup	-50 V
Střední plazmový kanál	0,9 l.min ⁻¹	Mód 2 (He)	
Vnitřní plazmový kanál	1,09 l.min ⁻¹	Cela vstup	-40 V
Vstup vzorku		Cela výstup	-60 V
Rychlost čerpání	0,1 rps	He průtok	4,3 ml.min ⁻¹
Iontová optika		Energetická diskriminace	5 V
Varianta	x-Lens	Sběr dat	
Nastavení čoček		Akviziční mód	Spektrum
Extract 1	0 V	Peak Pattern	1 bod
Extract 2	-195 V	Repliky měření	3

Tab. IV: *Integrační čas/hmota, měřicí mód a interní standard pro jednotlivé izotopy*

izotop	měřicí mód	integrační čas/hmota (s)	interní standard
²⁷ Al	bez plynu	0,1	⁴⁵ Sc
⁴⁷ Ti	He	0,3	⁴⁵ Sc
⁵¹ V	He	0,3	⁴⁵ Sc
⁵² Cr	He	0,3	⁴⁵ Sc
⁵⁵ Mn	He	0,3	⁴⁵ Sc
⁵⁹ Co	He	0,3	⁴⁵ Sc
⁶⁰ Ni	He	0,3	⁴⁵ Sc
⁹³ Nb	He	0,3	⁸⁹ Y
⁹⁵ Mo	He	0,3	⁸⁹ Y
²⁰⁸ Pb	bez plynu	0,3	¹⁵⁹ Tb

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

Vývojem a verifikací metody pro stanovení stopových koncentrací prvků v klinických materiálech se podrobně zabývaly diplomové práce M. Kuby a T. Pluháčka.^{(24) (25)} Pro analýzy byly zvoleny prvky, které se nejčastěji vyskytují v kloubních implantátech a dále byly stanoveny nejvhodnější izotopy. Protože při stanovení nízkých koncentrací pomocí ICP-MS ovlivňují výsledky především spektrální interference, bylo zkoumáno využití oktapólové kolizní cely, která se projevila, jako účinný nástroj k potlačení polyatomických interferencí u izotopů ⁴⁷Ti, ⁵¹V, ⁵²Cr, ⁵⁵Mn, ⁵⁹Co, ⁶⁰Ni, ⁹³Nb a ⁹⁵Mo. Pro stanovení olova byla použita korekční rovnice, která hodnoty jednotlivých izotopů ²⁰⁶Pb, ²⁰⁷Pb a ²⁰⁸Pb přepočítává na výslednou koncentraci olova.

4.1. Zabezpečení kvality výsledků

Kvalita výsledků měření byla zajištěna několika způsoby. První metodou je automatické vyladění přístroje na roztok tuning solution, který je proměřován po ustálení zdroje ICP a před vlastním měřením. Tato kontrola je prováděna při každém spuštění přístroje. Změřené hodnoty (např. intenzita, obsah dvojnásobně nabitých iontů aj.) jsou shrnuty v tzv. performance report. Výsledky musí splňovat předepsané limity. Pokud nejsou požadavky splněny, musí být odhalena a následně odstraněna příčina. Typickým příkladem může být ucpaný zmlžovací systém. Optimalizace na tuning solution je opakována, dokud nejsou splněny požadované limity.

Druhou nezávislou kontrolou kvality výsledků je ověření pomocí certifikovaného referenčního materiálu TM-15.2, který byl proměřován při každém z měření. Analýzou tohoto roztoku je provedena nezávislá kontrola kalibračních roztoků. Pro kontrolu stability systému byl roztok v případě potřeby proměřován i na konci měření, po analyzovaných vzorcích. Díky tomu byly ověřeny stabilní podmínky v průběhu měření (např. že nedochází k ucpávání zmlžovače, otvorů v kónusech apod.).

Dále byla kvalita výsledků zajištěna pomocí matričních certifikovaných referenčních materiálů (Trace Elements Whole Blood L-3, Seronorm Trace Elements Urine), které byly rozkládány a měřeny spolu s analyzovanými vzorky.

4.1.1 Meze detekce

Meze detekce stanoví koncentrační hodnotu, při které je analytický signál statisticky významně odlišný od pozadí. Detekční meze byly stanoveny za podmínek mezilehlé preciznosti pomocí statistického softwaru EffiValidation 3.0. (metoda “3s - IUPAC“) na základně měření slepých pokusů, které byly součástí jednotlivých rozkladů spolu s analyzovanými vzorky. Data pro meze detekce byly sbírány od května 2014 do března 2015.

Tab. V: *Meze detekce*

izotop	LOD ($\mu\text{g.l}^{-1}$)
²⁷ Al	6,79
⁴⁷ Ti	0,63
⁵¹ V	0,17
⁵² Cr	0,30
⁵⁵ Mn	0,16
⁵⁹ Co	0,07
⁶⁰ Ni	0,48
⁹³ Nb	0,21
⁹⁵ Mo	0,54
²⁰⁸ Pb	0,13

4.1.2 Analýza referenčních materiálů

Pro nezávislou kontrolu výsledků byl při každém z měření analyzován také certifikovaný referenční materiál TM-15.2 (LOT 3013). Jedná se o vodu z Ontarijského jezera, která byla zředěna, zfiltrována a uchovávána v chladu v prostředí 0,2 % kyseliny dusičné.

V tabulce VI můžeme sledovat výsledky jednotlivých měření od května 2014 do března 2015.

V následující tabulce VII jsou uvedeny certifikované hodnoty referenčního materiálu.

Z porovnání naměřených koncentrací a certifikovaných hodnot lze konstatovat, že izotopy ⁴⁷Ti, ⁵¹V, ⁵²Cr, ⁵⁵Mn, ⁵⁹Co, ⁶⁰Ni, ⁹⁵Mo, ²⁰⁸Pb vykazují stabilní koncentrace v průběhu celého roku, které jsou v rozmezí daném certifikovanými hodnotami.

U izotopu ²⁷Al lze pozorovat mírně zvýšené koncentrace. Hliník je běžný kontaminant, což je zřejmě důvodem jeho zvýšených hodnot. Dále byl změřen ⁹³Nb, ovšem veškeré jeho koncentrace byly vyhodnoceny po mezi detekce a v tabulce tedy není uveden.

Tab. VI: *Koncentrace stanovovaných izotopů v certifikovaném referenčním materiálu TM-15.2. v různých dnech měření.*

izotop	Měření 5.5.2014	Měření 1.10.2014	Měření 21.10.2014	Začátek měření 22.1.2015	Konec měření 22.1.2015	Začátek měření 13.2.2015	Konec měření 13.2.2015	Začátek měření 25.3.2015	Konec měření 25.3.2015
	$\mu\text{g.l}^{-1}$	$\mu\text{g.l}^{-1}$	$\mu\text{g.l}^{-1}$	$\mu\text{g.l}^{-1}$	$\mu\text{g.l}^{-1}$	$\mu\text{g.l}^{-1}$	$\mu\text{g.l}^{-1}$	$\mu\text{g.l}^{-1}$	$\mu\text{g.l}^{-1}$
²⁷ Al	33,7	36,0	38,4	37,5	36,0	35,3	34,4	37,8	36,8
⁴⁷ Ti	15,0	15,2	15,5	15,0	15,4	16,0	15,5	14,5	14,3
⁵¹ V	14,6	14,5	13,2	13,1	13,1	14,6	14,3	14,5	14,1
⁵² Cr	16,6	17,4	16,3	17,1	17,0	17,1	17,4	17,8	17,3
⁵⁵ Mn	14,4	16,0	16,2	15,5	15,7	14,8	13,9	15,6	15,1
⁵⁹ Co	18,0	18,3	17,7	18,4	18,5	19,1	18,5	18,3	18,3
⁶⁰ Ni	15,2	15,2	14,3	15,5	15,3	15,7	15,1	15,5	15,1
⁹⁵ Mo	15,7	14,0	14,2	13,9	13,9	14,4	14,7	14,4	14,6
²⁰⁸ Pb	12,1	12,78	11,3	11,7	11,6	12,5	12,6	12,6	11,3

Tab. VII: *Certifikované hodnoty certifikovaného retenčního materiálu TM-15.2.*

izotop	$\mu\text{g.l}^{-1}$	$\pm 2\sigma$
²⁷ Al	33,9	$\pm 4,6$
⁴⁷ Ti	14,7	$\pm 1,3$
⁵¹ V	13,2	$\pm 1,4$
⁵² Cr	16,4	$\pm 1,4$
⁵⁵ Mn	14,3	$\pm 1,8$
⁵⁹ Co	17,6	$\pm 1,6$
⁶⁰ Ni	15,1	$\pm 1,4$
⁹⁵ Mo	14,3	$\pm 1,8$
²⁰⁸ Pb	11,6	$\pm 1,1$

Lyofilizovaný vzorek certifikovaného referenčního materiálu Trace Elements Whole Blood L-3 (LOT 1112691) byl připraven podle návodu od výrobce. Referenční materiál o obsahu 3 ml, byl rozpipetován po 1 ml do tří nádobek pro mikrovlnný rozklad, následně byl rozložen a změřen spolu s analyzovanými vzorky. Naměřené hodnoty v tab. VIII jsou průměrem tří lahvíček s referenčním materiálem o stejné šarži, tedy průměrem z celkem 9 vzorků. Z tabulky je patrné, že naměřené koncentrace všech deseti stanovovaných izotopů vyhovují mezím certifikovaných hodnot.

Tabulka VIII: *Certifikovaný referenční materiál Trace Elements Whole Blood L-3, porovnání naměřených a certifikovaných hodnot koncentrací.*

izotop	Naměřená hodnota ($\bar{x} \pm s$)	Certifikovaná hodnota	
		$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	U
²⁷ Al	119,3 ± 12,8	105,0	21,0
⁴⁷ Ti	12,0 ± 0,9	12,8*	0,4*
⁵¹ V	5,2 ± 0,4	5,7	1,1
⁵² Cr	20,9 ± 2,0	23,2	4,7
⁵⁵ Mn	42,5 ± 4,7	47,3	9,5
⁵⁹ Co	11,0 ± 0,7	11,4	1,2
⁶⁰ Ni	12,5 ± 1,2	12,5	2,5
⁹³ Nb	< DL	0,07*	0,01*
⁹⁵ Mo	7,8 ± 1,1	7,5	1,5
²⁰⁸ Pb	432,6 ± 22,6	447,0	46,0

< DL - pod mezí detekce; * - doporučená (necertifikovaná) hodnota;

U - rozšířená nejistota s koeficientem rozšíření ($k=2$)

Lyofilizát certifikovaného referenčního materiálu Seronorm Trace Elements Urine (LOT 0511545) byl připraven podle návodu od výrobce. Do každého ze tří teflonových kelímků pro mikrovlnný rozklad bylo napipetováno 1,5 ml vzorku referenčního materiálu o původním objemu 5 ml. Vzorky byly dále rozloženy a změřeny spolu s analyzovanými vzorky.

Hodnoty v tab. IX jsou průměrem dvou lahviček referenčních materiálů o stejné šarži, tedy 6 vzorků. Tabulka IX ukazuje porovnání naměřených koncentrací s certifikovanými hodnotami. Obecně lze konstatovat, že koncentrace většiny izotopů vyhovují certifikovaným hodnotám. Výjimkou je opět ²⁷Al, který je velmi rozšířeným kontaminantem.

Tabulka IX: *Certifikovaný referenční materiál Seronorm Trace Elements Urine, porovnání naměřených a certifikovaných hodnot koncentrací.*

izotop	Naměřená hodnota ($\bar{x} \pm s$)	Certifikovaná hodnota	
		$\mu\text{g.l}^{-1}$	U
²⁷ Al	111,5 ± 21,2	100,0	6,0
⁴⁷ Ti	19,0 ± 3,9	17,8 ± 1,3*	
⁵¹ V	23,6 ± 3,5	25,2	1,4
⁵² Cr	18,3 ± 2,7	19,7	1,3
⁵⁵ Mn	11,0 ± 2,1	12,3	1,4
⁵⁹ Co	9,4 ± 1,4	10,0	0,6
⁶⁰ Ni	50,7 ± 7,7	50,4	3,2
⁹³ Nb	< DL	0,02 ± 0,001*	
⁹⁵ Mo	46,1 ± 5,1	49,3 ± 1,3*	
²⁰⁸ Pb	38,9 ± 5,0	40,3	2,6

< DL - pod mezí detekce; * - doporučená (necertifikovaná) hodnota, uvedena jako $\bar{x} \pm s$;

U - rozšířená nejistota s koeficientem rozšíření ($k=2$)

4.2. Vyhodnocení výsledků

4.2.1 Analýza nehtů

Záměrem stanovení kovů v nehtech bylo zjištění, zda by tento postup nemohl být využit jako neinvazivní metoda pro posouzení možné expozice uvolňovaných kovů z kloubních náhrad. Pro tyto účely byly vybrány izotopy deseti prvků (²⁷Al, ⁴⁷Ti, ⁵¹V, ⁵²Cr, ⁵⁵Mn, ⁵⁹Co, ⁶⁰Ni, ⁹³Nb, ⁹⁵Mo, ²⁰⁸Pb). Prvky byly stanoveny v jedenácti vzorcích pacientů s implantovanou kloubní náhradou a ve čtrnácti vzorcích kontrolní skupiny, která žádný kloubní implantát, ani jiný kov v těle neměla.

Následně byly koncentrace jednotlivých prvků mezi skupinami porovnány pomocí statistického softwaru QC Expert (porovnání dvou výběrů, hladina významnosti 0,05). K porovnání byli vybráni jen ti pacienti, jejichž implantovaný kloub, obsahoval daný prvek (tab. XIV).

Tab. X: Naměřené hodnoty vzorků nehtů kontrolní skupiny

izotop	počet vzorků	průměr $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	směrodatná odchylka $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	medián $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	nejnižší hodnota $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	nejvyšší hodnota $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	šířkost	špičatost
²⁷ Al	14	22,44	12,62	20,80	7,91	42,16	0,41	1,82
⁴⁷ Ti	14	3,06	1,49	2,62	1,53	7,23	1,92	6,39
⁵¹ V	14	0,01	0,01	0,00	0,00	0,04	2,30	7,13
⁵² Cr	14	0,40	0,34	0,29	0,05	1,26	1,31	3,91
⁵⁵ Mn	14	0,43	0,32	0,31	0,12	1,11	0,98	2,75
⁵⁹ Co	14	1,88	1,38	1,85	0,04	3,90	0,18	1,67
⁶⁰ Ni	14	0,02	0,02	0,01	0,01	0,08	2,46	8,18
⁹³ Nb	14	< DL						
⁹⁵ Mo	14	< DL						
²⁰⁸ Pb	14	0,31	0,20	0,20	0,13	0,69	0,87	2,22

< DL – pod mezí detekce

Přehled výsledků kontrolní skupiny je uveden v tab. X. Koncentrace nalezené ve vzorcích kontrolní skupiny jsou srovnatelné s výsledky, kterých dosáhli J.P.Goullé a kol. ve své práci (tab. XI).⁽¹⁵⁾ V kontrolní skupině bylo stanoveno osm prvků, koncentrace niobu a molybdenu byly příliš nízké, pod limity detekce. V tabulce XII jsou pak uvedeny výsledky jednotlivých vzorků pacientů.

Tab. XI: Srovnání naměřených koncentrací v nehtech kontrolní skupiny s hodnotami z literatury.

Kontrolní vzorky nehtů - měření		Hodnoty z literatury ⁽¹⁵⁾	
izotop	medián $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	medián $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	rozmezí $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
²⁷ Al	20,80	19,50	4,00 - 76,20
⁴⁷ Ti	2,62	-	-
⁵¹ V	0,02	0,05	0,05 - 0,11
⁵² Cr	0,29	0,38	0,03 - 1,89
⁵⁵ Mn	0,31	0,32	0,10 - 1,48
⁵⁹ Co	1,85	0,02	0,01 - 0,07
⁶⁰ Ni	0,01	0,94	0,22 - 8,34
⁹³ Nb	< DL	-	-
⁹⁵ Mo	< DL	0,01	0,01 - 0,03
²⁰⁸ Pb	0,20	0,52	0,10 - 3,71

- Neuvedeno, < DL – pod mezí detekce

Tab. XII: Naměřené hodnoty vzorků jednotlivých pacientů

pacient	doba implantace	²⁷ Al	⁴⁷ Ti	⁵¹ V	⁵² Cr	⁵⁵ Mn	⁵⁹ Co	⁶⁰ Ni	⁹³ Nb	⁹⁵ Mo	²⁰⁸ Pb
	(měsíce)	μg·g ⁻¹	μg·g ⁻¹	μg·g ⁻¹	μg·g ⁻¹	μg·g ⁻¹	μg·g ⁻¹	μg·g ⁻¹	μg·g ⁻¹	μg·g ⁻¹	μg·g ⁻¹
P 1	17	107,38	0,97	< DL	0,16	< DL	< DL	0,03	< DL	< DL	0,05
P 1	17	16,98	0,73	< DL	0,17	0,04	0,02	0,74	< DL	< DL	0,08
P 11	24	66,71	6,38	0,07	0,58	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	36,27
P 11	24	7,15	1,12	< DL	0,26	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	0,29
P 12	143	80,96	5,39	< DL	0,31	0,40	< DL	1,73	< DL	< DL	0,21
P 12	143	41,21	11,19	< DL	2,50	0,34	< DL	5,17	< DL	< DL	0,29
P 16	236	< DL	< DL	0,03	< DL	0,26	< DL	< DL	< DL	< DL	0,46
P 17	28	< DL	0,28	< DL	0,12	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL
P 17	28	< DL	< DL	< DL	0,12	< DL	< DL	5,22	< DL	< DL	< DL
P 18	213	19,41	< DL	0,01	0,57	0,30	< DL	6,90	< DL	< DL	0,18
P 18	213	< DL	1,95	0,01	0,97	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL	< DL

< DL – pod mezí detekce

Výsledky porovnání jednotlivých prvků mezi skupinami jsou uvedeny v tab. XIII. Ze stanovovaných deseti prvků bylo srovnáváno pouze pět. Koncentrace izotopů ⁵⁵Mn, ⁵⁹Co, ⁹³Nb, ⁹⁵Mo a ²⁰⁸Pb byly u pacientů, kteří měli daný kov implantován, pod limitem detekce. Z tab. XIII je patrné, že koncentrace ve vzorcích pacientů s implantovanou kloubní náhradou se neliší od koncentrací kontrolních vzorků.

Hliník je obsažen v obvykle používaných slitinách Ti-6Al-4V a Ti-6Al-17Nb. Slitinu s obsahem hliníku mělo implantováno devět z jedenácti pacientů. Skupina pacientů má vysokou odchylku, což je patrné z krabicového grafu na obr. 16.

Titan obsahovala implantovaná kloubní náhrada 9 pacientů. Graf jádrového odhadu hustoty titanu je uveden na obr. 17. Koncentrace obou skupin, byly vyhodnoceny jako shodné.

Z odebraných vzorků měl nikl v kloubním implantátu jen jeden pacient, od kterého byly odebrány dva vzorky nehtů. Velmi omezené množství vzorků vysvětluje velkou odchylku. Díky ní jsou hodnoty obou skupiny shodné.

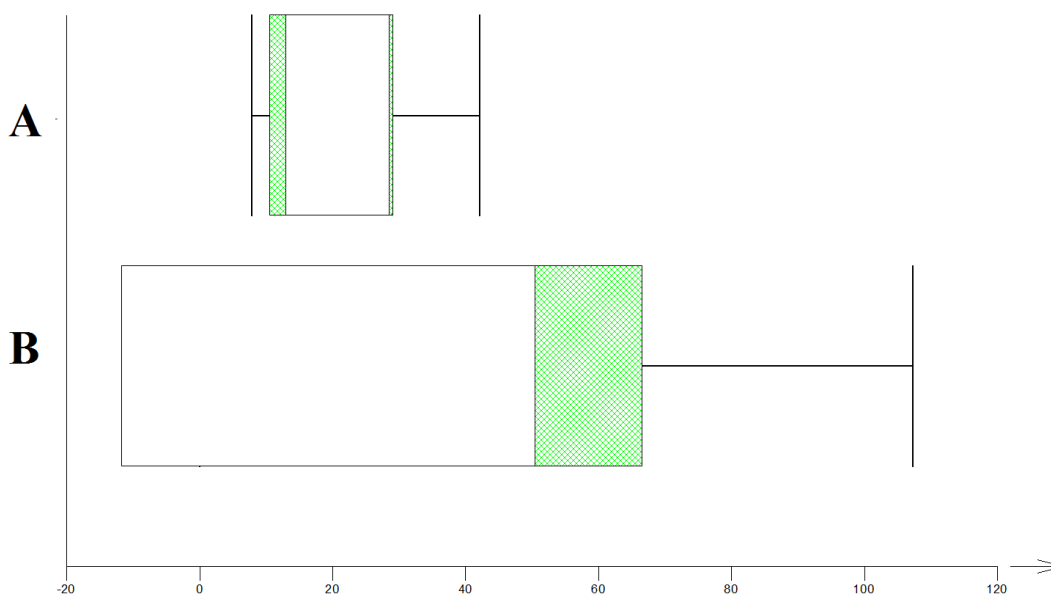
Chrom je obvyklým kovem v implantátech. Z původních 11 vzorků nehtů, pocházejících z pacientů jen 2 neměli v žádné z náhrad chrom. Srovnáním s kontrolní skupinou byla zjištěna shoda.

Vanad se využívá ve slitinách Ti-6Al-4V, jako legující prvek ke zvýšení pevnosti slitiny. Nacházel se ve slitinách použitých implantátů u pěti pacientů.

Tab. XIII: Porovnání koncentrací jednotlivých prvků kontrolních vzorků se vzorky pacientů s implantovanou kloubní náhradou

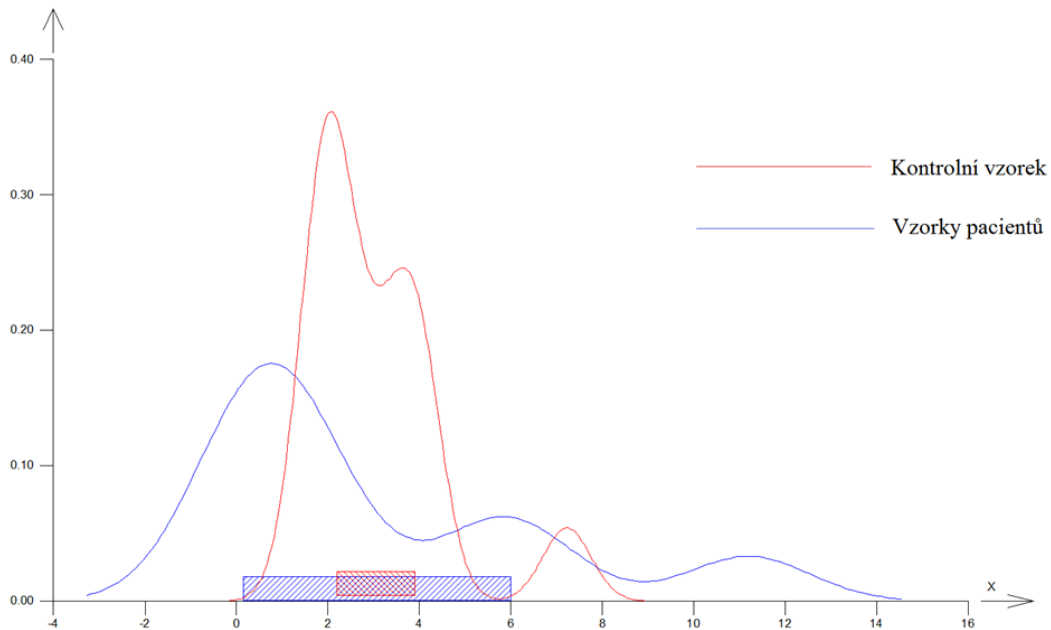
vzorky	²⁷ Al		⁴⁷ Ti		⁵¹ V	
	pacientů	kontrolní	pacientů	kontrolní	pacientů	kontrolní
počet dat	9	14	9	14	5	14
průměr (μg.g ⁻¹)	37,76	22,44	3,08	3,06	0,01	0,01
směrodatná odchylka	38,92	12,62	3,80	1,49	0,01	0,01
Výsledek	SHODNÉ		SHODNÉ		SHODNÉ	

	⁵² Cr		⁶⁰ Ni	
	pacientů	kontrolní	pacientů	kontrolní
počet dat	9	14	2	14
průměr (μg.g ⁻¹)	0,32	0,40	0,39	1,88
směrodatná odchylka	0,31	0,34	0,50	1,37
výsledek	SHODNÉ		SHODNÉ	



Obr. 16 Hliník – krabicový graf porovnání dvou výběrů

A – kontrolní skupina; B – vzorky pacientů



Obr. 17 Titan – jádrový odhad hustoty

Porovnáním koncentrací ve vzorcích pacientů s implantovanou kloubní náhradou se vzorky kontrolní skupiny bylo dokázáno, že obsah kovů ve vzorcích těchto dvou skupin není statisticky rozdílný. Případné uvolňování kovů z kloubních implantátů neprobíhá v takové míře, aby se to projevilo i v nehtech. Záměr využít nehty jako neinvazivní prostředek k posouzení možné expozice kovů z implantované kloubní náhrady se na základě provedených experimentů neukázal jako přínosný.

4.2.2 Analýza kostí

Dále byly v experimentální části analyzovány vzorky kostí, které byly odebrány pacientům s implantovanou kloubní náhradou při reoperacích. Pro tyto účely byly vybrány izotopy deseti prvků (^{27}Al , ^{47}Ti , ^{51}V , ^{52}Cr , ^{55}Mn , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{93}Nb , ^{95}Mo , ^{208}Pb).

Tabulka XIII. ukazuje jednotlivé pacienty, nahrazovaný kloub a dobu, po kterou měli kloubní implantát v těle, před reoperací. Dále je blíže charakterizován materiál jednotlivých implantátů. Při výměně kyčelního kloubu se do těla implantují hned tři kovové součásti, které vzájemným otěrem mohou do těla uvolňovat částice kovů. Je to dřík, který je voperován do stehenní kosti, hlavička kloubu a jamka, která je voperována do kosti pánevní. Při výměně kolenního kloubu se implantát skládá jen ze dvou komponent: femorální a tibiální. Pokud má

pacient v těle i jiné kloubní náhrady, jsou uvedeny na konci tabulky XIV. Tyto informace jsou důležité pro posouzení celkové expozice kovy, např. pro výše uvedenou analýzu nehtů.

Celkem bylo analyzováno 37 vzorků, které byly odebrány 12 pacientům. Hodnoty vzorků jednotlivých pacientů byly zprůměrovány. V tabulce XV jsou shrnuty koncentrace jednotlivých prvků ve vzorcích konkrétních pacientů.

Spolu s klinickými vzorky kostí byly rozkládány a měřeny slepé pokusy, které byly od naměřených hodnot ve vzorcích kostí odečítány.

Tabulka XIV: Specifikace kloubních implantátů jednotlivých pacientů

pacient	Kloub, z jehož blízkosti byly odebírány vzorky					Jiné klouby v těle s kloubní náhradou	
	vyměněný kloub	doba implantace (měsíce)	materiál jamka/femor. komponenta	dřík / tibiální komponenta	hlavička	vyměněný kloub	použité materiály
P 1	kyčel	17	Ti-6Al-4V	FeCrNiMoMnNb	Co-Cr-Mo		
P 2	kyčel	203	Ti-6Al-4V	Ti-6Al-4V	Co-Cr-Mo		
P 3	kyčel	243	Titan	Ti-6Al-7Nb	Keramika		
P 4	kyčel	201	Ti-6Al-4V	Ti-6Al-4V	Co-Cr-Mo		
P 6	kyčel	136	Ti-6Al-4V	Ti-6Al-4V	Keramika	kyčel	CoCrMo, Ti-6Al-17Nb, Co-Cr
P 7	kyčel	155	Titan	Titan	Co-Cr-Mo		
P 8	koleno	143	Co-Cr	Co-Cr		koleno	Co-Cr
P 9	koleno	13	Co-Cr	Co-Cr		koleno	Co-Cr
P 10	kyčel	204	Titan	Ti-6Al-17Nb	Keramika		
P 11	kyčel	24	CoCrMo	Ti-6Al-17Nb	Co-Cr-Mo		
P 12	kyčel	143	Titan	Ti-6Al-17Nb	Keramika		
P 13	kyčel	185	CoCrMo	CoCrMo	-		
P 14	koleno	129	CoCrMo	Ti-6Al-4V			
P 15	kyčel	154	Titan	Ti-6Al-17Nb	Keramika	kyčel	Titan, Ti-6Al-17Nb
P 16	kyčel	236	Ti-6Al-4V	Ti-6Al-4V	Co-Cr-Mo	kyčel	Titan, Ti-6Al-17Nb
P 17	koleno	28	Co-Cr	Co-Cr			
P 18	kyčel	213	Ti-6Al-4V	Ti-6Al-4V	Co-Cr-Mo	kyčel	CoCrMo, Ti-6Al-17Nb

- neznámý údaj

Tabulka XV: Koncentrace jednotlivých prvků ve vzorcích konkrétních pacientů

pacient	doba implantace	²⁷ Al	⁴⁷ Ti	⁵¹ V	⁵² Cr	⁵⁵ Mn	⁵⁹ Co	⁶⁰ Ni	⁹³ Nb	⁹⁵ Mo	²⁰⁸ Pb
	(měsíce)	μg.g ⁻¹	μg.g ⁻¹	μg.g ⁻¹	μg.g ⁻¹	μg.g ⁻¹	μg.g ⁻¹	μg.g ⁻¹	μg.g ⁻¹	μg.g ⁻¹	μg.g ⁻¹
P2	203	3,30	9,30	0,19	0,76	0,06	0,33	0,22	< DL	0,05	0,53
P3	243	1,52	0,33	0,01	1,20	0,09	0,67	0,73	0,02	0,18	0,01
P4	201	4,55	26,85	0,22	0,49	0,09	0,48	0,08	< DL	0,05	0,83
P6	136	0,11	0,64	0,02	0,17	0,02	< DL	< DL	< DL	< DL	0,01
P7	155	1,99	0,24	0,01	0,14	0,05	0,22	0,08	0,01	0,01	0,01
P8	143	18,60	1,60	0,01	3,68	0,15	6,58	0,29	< DL	0,52	0,24
P9	13	4,53	2,80	0,01	1,95	0,15	0,74	0,65	< DL	0,22	0,44
P13	185	16,70	46,14	1,42	3,35	0,07	1,05	0,14	0,01	0,67	0,30
P14	129	10,20	37,53	1,48	14,00	0,22	11,89	0,69	0,04	2,86	0,42
P15	154	0,10	0,05	< DL	0,02	< DL	< DL	0,01	< DL	< DL	< DL
P16	136	2,00	11,87	0,14	1,18	0,09	0,91	0,39	0,01	0,11	0,50
P18	213	0,77	6,92	0,03	0,13	0,06	0,02	0,31	< DL	0,01	0,69

< DL – pod mezí detekce

Vzhledem k obtížnému odběru vzorků, nebylo možné provést měření kontrolních vzorků. Hodnoty lze porovnat pouze s literaturou. V. Zaichick stanovoval pomocí ICP-MS 69 prvků v kostní tkáni žeber. ⁽¹⁹⁾

Tabulka XVI: Koncentrace jednotlivých prvků v kostech ⁽¹⁹⁾

izotop	μg.g ⁻¹
²⁷ Al	≤ 7,2
⁴⁷ Ti	≤ 2,8
⁵¹ V	< 0,03
⁵² Cr	≤ 0,22
⁵⁵ Mn	0,354 ± 0,353
⁵⁹ Co	< 0,1
⁶⁰ Ni	≤ 1,5
⁹³ Nb	< 0,01
⁹⁵ Mo	0,052 ± 0,042
²⁰⁸ Pb	2,24 ± 1,21

< DL – pod mezí detekce

5. ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá využitím hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v prvkové analýze klinických materiálů.

V teoretické části práce je podrobně popsána využívaná technika ICP-MS. Dále byly popsány způsoby rozkladů biologických materiálů, byly diskutovány možnosti analýzy nehtů a kostí, a možnosti stanovení kovů v klinických vzorcích v souvislosti s implantovanými kloubními náhradami.

V experimentální části bylo analyzováno deset prvků (Al, Ti, V, Cr, Mn, Co, Ni, Nb, Mo a Pb) ve vzorcích nehtů a kostí. Vzorky byly před analýzou rozloženy v mikrovlnném systému směsí kyseliny dusičné a peroxidu vodíku. Bylo analyzováno 25 vzorků nehtů, z toho 11 patřilo pacientům s implantovanou kloubní náhradou. Zbývajících 14 vzorků patřilo kontrolní skupině, tyto vzorky byly odebrány osobám bez jakéhokoliv kovového implantátu v těle. Statistickým porovnáním těchto dvou skupin nebyly zjištěny žádné rozdíly v koncentracích kovů. Původní záměr, využít tuto neinvazivní metodu k posouzení expozice kovů uvolňovaných z kloubních náhrad, se tak nezdařil.

Dále bylo analyzováno celkem 37 vzorků kostí od pacientů s implantovanou kloubní náhradou. Kontrolní vzorky nebylo po dobu vypracování práce možné odebrat. Srovnání s kontrolní skupinou může být předmětem dalších experimentů.

Bylo prokázáno zajištění kvality výsledků pomocí certifikovaného referenčního materiálu TM-15.2. a matričních referenčních materiálů krve a moči.

Závěrem lze říci, že cíle práce byly splněny. Byla vypracována literární rešerše a byly prozkoumány techniky pro přípravu klinických vzorků pro elementární analýzu. Bylo provedeno měření reálných vzorků a jejich výsledky byly statisticky vyhodnoceny. Také byly aplikovány postupy pro zajištění kvality výsledků.

6. LITERATURA

1. Otruba V.: *Spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem*. Masarykova univerzita v Brně 2001.
2. Dean J. R.: *Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Chichester 2005.
3. Kanický V.: *Analytické vlastnosti ICP-MS*. In: 5. kurz ICP spektrometrie, Ed. Vítězslav Otruba – Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Brno 2009.
4. Mihaljevič M., Strnad L., Šebek O.: Chem. Listy **98**, 123-130 (2004).
5. Kanický V.: *Zavádění vzorku do plazmatu*. In: 5. kurz ICP spektrometrie, Ed. Vítězslav Otruba – Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Brno 2009.
6. Thomas R.: *Practical guide to ICP-MS*. CRC Press, Boca Raton 2007.
7. Nelms, Simon M.: *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*. Blackwell Publishing, Oxford 2005.
8. Hill S. J.: *Inductively Coupled Plasma Spectrometry and its Applications*. Blackwell Publishing, Oxford 2007.
9. Kulhánek P.: *Úvod do teorie plazmatu*, AGA, Praha, 2011.
10. Kanický V.: *Fyzikální základy ICP*. In: 5. kurz ICP spektrometrie, Ed. Vítězslav Otruba – Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Brno 2009.
11. Otruba V.: *Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem*. In: 5. kurz ICP spektrometrie, Ed. Vítězslav Otruba – Spektroskopická společnost Jana Marka Marci, Brno 2009.
12. *ICP-MS: inductively coupled plasma mass spectrometry: a primer*, Agilent Technologies, 2005
13. http://old.vscht.cz/anl/josef/LabAtom/Navod_ICP-MS_2010.pdf. staženo 4. 3. 2015
14. Mader P., Čurdová E.: *Metody rozkladu biologických materiálů pro stanovení stopových prvků*. Chem. Listy 91, 227 - 236, (1997).
15. Goullé J.P., Saussereau E.: *Application of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Multielement Analysis in Fingernail and Toenail as a Biomarker of Metal Exposure*. Journal of Analytical Toxicology, Vol. 33, March (2009)

16. Rodushkina I., Axelsson M.D.: *Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part I. Analytical methodology.* The Science of the Total Environment 250, (2000)
17. Rodushkina I., Axelsson M.D.: *Application of double focusing sector field ICP-MS for multielemental characterization of human hair and nails. Part II. A study of the inhabitants of northern Sweden.* The Science of the Total Environment 262 (2000)
18. Okazaki Y., Gotho E.: *Comparison of metal concentrations in rat tibia tissues with various metallic implants.* Biomaterials 25 (2004)
19. Zaichick V.: *Chemical Elements of Human Bone Tissue Investigated by Nuclear Analytical and Related Methods.* Biol Trace Elem Res (2013)
20. <http://csdocz.com/doc/251946/materiály-pro-implantáty>, staženo 10.11.2014
21. Šlouf M., Vacková T.: *Ultravysokomolekulární polyethylen pro kloubní náhrady se zvýšenou životností.* Chem. Listy 107, 783–790 (2013).
22. Hanawa, T.: *Metal ion release from metal implants.* Materials Science and Engineering C 24, 745–752 (2004)
23. Sarmiento-González A., Marchante-Gayón J. M., Tejerina-Lobo J. M., Paz-Jiménez J., Sanz-Medel A.: *High-resolution ICP-MS determination of Ti, V, Cr, Co, Ni, and Mo in human blood and urine of patients implanted with a hip or knee prosthesis,* Anal. Bioanal. Chem. 391, 2583-2589 (2008).
24. Kuba M.: *Vývoj a verifikace metody pro stanovení vybraných kovů v klinických materiálech.* Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2012.
25. Pluháček T.: *Možnosti analýzy klinických materiálů pomocí ICP-MS.* Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2013.
26. Przybyłowicz A.: *Examination of distribution of trace elements in hair, fingernails and toenails as alternative biological materials. Application of chemometric methods.* Cent. Eur. J. Chem., 10(5), (2012)