

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie



**Speciální analýza chromu v biologických
materiálech pomocí HPLC-ICP-MS**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Autor:	RNDr. Radka Pechancová
Studijní obor:	Analytická chemie
Vedoucí práce:	doc. Ing. David Milde, Ph.D.
Konzultant práce:	RNDr. Tomáš Pluháček, Ph.D.

2020 Olomouc

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	RNDr. Radka Pechancová
Název práce:	Speciační analýza chromu v biologických materiálech pomocí HPLC-ICP-MS
Typ práce:	Disertační
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	doc. Ing. David Milde, Ph.D.
Konzultant:	RNDr. Tomáš Pluháček, Ph.D.
Rok odevzdání práce:	2020
Klíčová slova:	biologické vzorky, chrom, HPLC-ICP-MS, speciační analýza
Počet stran:	152
Počet příloh:	4
Jazyk:	čeština

Anotace:

Předložená disertační práce se zabývá vývojem a validací analytických metod vhodných pro speciační analýzu chromu v biologických vzorcích. Vzhledem k tomu, že doposud nebyly v této oblasti detailně popsány aplikace on-line speciačních technik, byla speciační analýza realizována s využitím dvou módů vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS).

Teoretická část se detailně věnuje chromu a zejména jeho speciím Cr(III) a Cr(VI) (je zde uvedena jejich toxikokinetika, metabolismus a výskyt v biologických vzorcích). Další část popisuje přístupy ke speciační analýze chromu, součástí je i rešerše zaměřená na aplikace na různé biologické materiály. Poslední část zmiňuje instrumentaci ICP-MS, riziko možných polyatomických interferencí spojené s použitím tohoto detektoru a také komplikace s validací speciačních analýz. Experimentální část je rozdělena do dvou hlavních okruhů. První je zaměřen na vývoj a validaci speciační analýzy využívající iontově-párovou HPLC na reverzních fázích ve spojení s ICP-MS detekcí a její aplikaci na analýzu reálných vzorků krve a kloubních výpotků. Celý analytický postup byl optimalizován a validován v rozsahu linearity, meze detekce, meze stanovitelnosti, preciznosti a pravdivosti.

K analýzám byly vybrány vzorky krve a kloubních výpotků odebraných od pacientů s implantovanými kovovými kloubními náhradami obsahujícími chrom. Ze získaných výsledků vyplývá, že hlavní specií uvolňovanou do krve i kloubního výpotku je Cr(III). Naopak Cr(VI) byl stanoven ve všech vzorcích pouze ve stopových koncentracích. Dále byla potvrzena vysoká afinita Cr(III) k proteinům v matrici, což značně ztěžuje jeho stanovení pomocí HPLC-ICP-MS. Všechny výsledky byly navíc statisticky porovnány s kontrolní skupinou, významně vyšší koncentrace všech forem chromu byly nalezeny pouze ve vzorcích kloubních výpotků. Podstatnou součástí bylo i studium polyatomických interferencí negativně ovlivňujících stanovení chromu pomocí ICP-MS.

Druhá část práce se věnuje vývoji a validaci analytického postupu využívajícího technik iontově-výměnné HPLC-ICP-MS a ICP-MS sloužících pro stanovení všech forem chromu v biologických tkáních. Po optimalizaci několika parametrů (příprava vzorku, separace, detekce) byly obě metody validovány podle postupu uvedeného v pokynech pro validaci bioanalytických metod z Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Následně byly aplikovány na analýzu 2 certifikovaných referenčních materiálů a sady reálných vzorků periprostetických tkání odebraných od pacientů s kloubními náhradami. Stejně jako u předchozí studie byl ve vzorcích nalezen zejména Cr(III) ve volné formě nebo vázaný na pevný podíl. Naopak Cr(VI) nebyl detekován ani v jednom z vybraných vzorků. Avšak v tomto případě byla detailně studována i interkonverze obou specií za využití izotopicky obohacených standardů, kdy byla dokázána 30% redukce Cr(VI) způsobená charakterem matrice tkání. Vzhledem k vyššímu počtu vzorků bylo provedeno detailní statistické vyhodnocení všech dat. Významnou součástí byla i případová studie jednoho pacienta s kloubní náhradou obsahující Cr, jehož výsledky se zásadně lišily od ostatních. Kromě specií Cr(III) byly v jeho tkáních identifikovány i další formy chromu jako jsou částice a nanočástice nebo Cr vázaný na proteiny.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname:	RNDr. Radka Pechancová
Title:	Chromium speciation analysis in biological materials by HPLC-ICP-MS
Type of thesis:	Dissertation
Department:	Department of Analytical Chemistry
Supervisor:	doc. Ing. David Milde, Ph.D.
Consultant:	RNDr. Tomáš Pluháček, Ph.D.
The year of submission:	2020
Keywords:	biological samples, chromium, HPLC-ICP-MS, speciation analysis
Number of pages:	152
Number of appendices:	4
Language:	Czech

Annotation:

The presented dissertation thesis is focused on development and validation of analytical methods suitable for the chromium speciation analysis in biological samples. Since the application of on-line speciation techniques to biological samples has not been described in detail yet, speciation analyses were performed using two modes of high-performance liquid chromatography (HPLC) in connection with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

The theoretical part is dedicated to chromium and mainly its species Cr(III) and Cr(VI) (their toxicokinetics, metabolism and occurrence in biological samples are stated). The next part describes approaches to speciation analysis of chromium, the overview dealing with applications to various biological materials is mentioned as well. The last part deals with the ICP-MS instrumentation, the risk of possible polyatomic interferences associated with the use of this type of detector and with complications with speciation analyses validation. The experimental part is divided into two main areas. The first area is focused on development and validation of speciation analysis using ion-pair reverse phase HPLC in connection with ICP-MS detection and its application to analyses of real blood and joint effusion samples. The whole analytical approach was optimized and validated in terms of linearity, limit of detection, limit of quantification, precision, and trueness. Blood and joint effusion samples coming from patients with implanted chromium-based joint implants were

selected for analyses. The obtained results show that Cr(III) is the main specie released into blood as well as joint effusion. In contrast, Cr(VI) was determined in all samples only at trace concentrations. Besides that, the high affinity of Cr(III) to proteins in the sample matrix was confirmed which makes its determination by HPLC-ICP-MS more difficult. All results were statistically compared with control group and significantly higher concentrations of all analytes were found only in the case of joint effusion. Important part was the study of polyatomic interferences negatively affecting determination of chromium by ICP-MS.

The second part is devoted to the development and validation of analytical approach utilizing ion-exchange HPLC-ICP-MS and ICP-MS techniques serving for the determination of all chromium forms in biological tissues. After the optimization of several parameters (sample preparation, separation, detection), both methods were validated according to the procedure given in United States Food and Drug Administration (FDA) guideline on the validation of bioanalytical methods. Subsequently they were applied to the analyses of 2 certified reference materials and a set of real periprosthetic tissue samples collected from patients with joint implants. As well as in the previous study, mainly Cr(III) (as free or bound to solid residue) was found in all samples investigated. In contrast, Cr(VI) was not detected in any of selected tissues. However, the interconversion of both species was studied in detail using isotopically enriched standards and the 30% Cr(VI) reduction caused by the nature of sample matrix was proved. Due to the higher number of tissue samples, detailed statistical evaluation of all obtained data was performed. Significant part was the case study of one patient with Cr-based joint implant, whose results differed from the other patients. Besides Cr(III) species, another Cr forms as wear debris particles, nanoparticles, and Cr bound to proteins were identified in selected tissues

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla veškeré informační zdroje a použitou literaturu. Tato práce ani jiná její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

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

V Olomouci 17.7.2020

.....

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. Ing. Davidu Mildemu, Ph.D. a především pak RNDr. Tomáši Pluháčkovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, čas a podporu, které mi během mého studia věnoval.

Dále bych chtěla poděkovat prof. MUDr. Jiřímu Gallovi, Ph.D. za poskytnutí biologických vzorků a Mgr. Danielu Baronovi, Ph.D. za pomoc a rady v oblasti plošné elektroforézy. Mé poděkování patří také všem členům Katedry analytické chemie.

Disertační práce vznikla za finanční podpory projektů IGA UP IGA_PrF_2018_027, IGA-PrF_2019_028 a IGA-PrF_2020_030.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	1
1. ÚVOD.....	3
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	5
2.1 Chrom.....	5
2.2 Specie chromu.....	5
2.2.1 Toxicita a zdroje kontaminace.....	6
2.2.2 Metabolismus Cr(III) a Cr(VI).....	11
2.2.3 Cr(III) a Cr(VI) v biologických vzorcích.....	13
2.3 Speciační analýza.....	15
2.3.1 Trendy ve speciační analýze chromu v biologických vzorcích.....	17
2.3.2 Odběr vzorku.....	18
2.3.3 Příprava vzorků pro analýzu.....	19
2.3.4 Techniky speciační analýzy chromu.....	22
2.3.4.1 On-line techniky s ICP-MS detekcí.....	23
2.4 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem.....	27
2.4.1 Princip a instrumentace ICP-MS.....	27
2.4.2 Interference v ICP-MS.....	29
2.5 Zajištění kvality ve speciační analýze.....	34
3. CÍLE PRÁCE.....	37
4. SPECIAČNÍ ANALÝZA CHROMU VE VZORCÍCH KRVE A KLOUBNÍCH VÝPOTKŮ.....	38
4.1 Experimentální část.....	38
4.1.1 Chemikálie.....	38
4.1.2 Vzorky a referenční materiály.....	39
4.1.3 Instrumentace.....	39
4.1.4 Příprava mobilní fáze a standardních roztoků.....	40

4.1.5 Příprava reálných vzorků.....	41
4.1.6 Validace IP-RP-HPLC-ICP-MS	43
4.1.7 Statistická analýza	44
4.2 Výsledky a diskuze	45
4.2.1 Optimalizace separace pomocí IP-RP-HPLC.....	45
4.2.2 Optimalizace detekce pomocí ICP-MS a studium interferencí	46
4.2.3 Validace IP-RP-HPLC-ICP-MS metody	50
4.2.4 Speciační analýza chromu v reálných vzorcích krve a kloubních výpotků.....	55
4.3 Závěr	62
5. SPECIAČNÍ ANALÝZA CHROMU V BIOLOGICKÝCH TKÁNÍCH	64
5.1 Experimentální část.....	64
5.1.1 Chemikálie.....	64
5.1.2 Vzorky a certifikované referenční materiály	65
5.1.3 Instrumentace	67
5.1.4 Příprava roztoků.....	68
5.1.5 Příprava vzorků tkání	69
5.1.6 Kvantitativní analýza, statistika.....	73
5.2 Výsledky a diskuse.....	74
5.2.1 Vývoj IE-HPLC-ICP-MS metody	74
5.2.2 Optimalizace extrakce Cr(III) a Cr(VI)	78
5.2.3 Studium interkonverze.....	80
5.2.4 Validace metod	82
5.2.5 Speciační analýza Cr v biologických tkáních vrstvy 1.....	86
5.2.6 Statistická analýza	91
5.2.7 Případová studie	94
5.3 Závěr	99
6. ZÁVĚR.....	100

7. REFERENCE	103
8. Přílohy	114

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BN-PAGE	Modrá nativní polyakrylamidová elektroforéza
CoC	Kloubní náhrady typu ceramic-on-ceramic
CoP	Kloubní náhrady typu ceramic-on-polyethylene
CRM	Certifikovaný referenční materiál
EDTA	Ethylendiaminotetraoctová kyselina
ET-AAS	Atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou atomizací
F-AAS	Atomové absorpční spektrometrie s plamenovou atomizací
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-ICP-MS	Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem
IE-HPLC	Iontově-výměnná vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IP-RP-HPLC	Iontově-párová vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzních fázích
ICP-MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
ICP-QQQ	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem využívající trojitého kvadrupólu
LA-ICP-MS	Laserová ablace ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem
LOD	Mez detekce
LOQ	Mez stanovitelnosti
MoM	Kloubní náhrady typu metal-on-metal
MoP	Kloubní náhrady typu metal-on-polyethylene
PTFE	Polytetrafluorethylen

ROS	Reaktivní adukty kyslíku (reactive oxygen species)
SD	Směrodatná odchylka
SNR	Poměr signálu k šumu
TEM	Transmisní elektronová mikroskopie
TOF-LMMS	Hmotnostní spektrometrie s průletovým analyzátozem využívajícím pro ionizaci laserové mikrosondy
UV-VIS	Ultrafialovo-viditelná spektrometrie
XANES	Rentgenová absorpční spektrometrie v blízkosti absorpční hrany
XAS	Rentgenová absorpční spektrometrie
XPS	Rentgenová fotoelektronová spektrometrie
XRF	Rentgenová fluorescenční spektrometrie

1. ÚVOD

Chrom je kovový prvek přirozeně se vyskytující ve všech složkách životního prostředí (voda, půda, vzduch), ale také v rostlinných nebo živočišných tkáních. Jeho významným zdrojem je bezesporu také lidská činnost. Díky velmi zajímavým vlastnostem nalézá uplatnění v řadě průmyslových odvětví (metalurgický průmysl, výroba pigmentů, barviv, kožedělný průmysl atd.), odkud se může v různých podobách snadno dostat do životního prostředí, následně rostlin a přes potravní řetězec až do živočichů. Tato kontaminace představuje zásadní problém, protože chrom není biologicky odbouratelný, a dokonce negativně ovlivňuje lidské zdraví. Významné zdravotní riziko představují také kloubní náhrady vyrobené ze slitiny obsahující chrom. Je ale důležité si uvědomit, že toto nebezpečí se odvíjí od oxidačního stavu/formy chromu. Analyticky významné jsou především sloučeniny s oxidačním číslem +III a +VI, které jsou nejstabilnější a vyskytují se nejhojněji. Tyto formy (specie) se významně liší v toxicitě, mobilitě nebo biodostupnosti, tudíž je zásadní se v monitorování kontaminace chromem zabývat obsahem individuálních specií a nejenom celkového chromu. K takovým analýzám lze využít různých technik speciální analýzy založených na separaci/frakcionaci specií a jejich následném kvantitativním stanovení. V současné době je nejpopulárnější aplikace tzv. on-line speciálních technik spojujících vhodnou separační techniku a prvkově specifický detektor. U speciální analýzy chromu se většinou jedná o spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Tato kombinace výrazně zkracuje časovou náročnost celé speciální analýzy. Dalšími výhodami je vysoká selektivita a nízké meze detekce ICP-MS detektoru. Na základě dostupné literatury se toto spojení nejčastěji využívá na speciální analýzu chromu v potravinách a vzorcích životního prostředí. Významnou skupinou vzorků vhodnou pro monitorování zdravotních rizik chromu jsou ale biologické materiály, kde je aplikace HPLC-ICP-MS komplikovaná a doposud nebyla téměř popsána.

Z tohoto důvodu se předložená disertační práce zabývá spojením různých módů HPLC s ICP-MS detekcí pro účely speciální analýzy chromu v biologických materiálech. Experimenty byly rozděleny do dvou samostatných částí. První část je zaměřena na vývoj a validaci postupu využívajícího iontově-párovou HPLC na reverzních fázích s ICP-MS detekcí a následnou aplikaci na reálné vzorky krve a kloubního výpotku. Ve druhé části disertační práce je prezentována speciální analýza chromu ve složitější matrici, a to v periprostetických tkáních. Pro účely separace a identifikace Cr(III) a Cr(VI) byla vyvinuta

a validována metoda využívající spojení iontově-výměnné HPLC-ICP-MS současně s metodou ICP-MS stanovující celkový obsah Cr (frakcionace). Všechny analyzované vzorky v obou studiích byly odebírány pacientům se selhávající kloubní náhradou během revizních operací prováděných na Ortopedické klinice Fakultní nemocnice Olomouc. V obou pracích bylo studováno uvolňování specií chromu z náhrad do těchto biologických vzorků. Získané výsledky byly statisticky vyhodnoceny a porovnány s kontrolními skupinami. Významnou součástí obou studií byla identifikace polyatomických interferencí negativně ovlivňujících stanovení chromu pomocí ICP-MS. Pozornost byla věnována i studiu interkonverze Cr(III) a Cr(VI) v tkáních za využití izotopicky obohacených standardů. Výsledky shrnuté v disertační práci byly publikovány v několika impaktovaných časopisech (Příloha č.1, 2, 3).

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Chrom

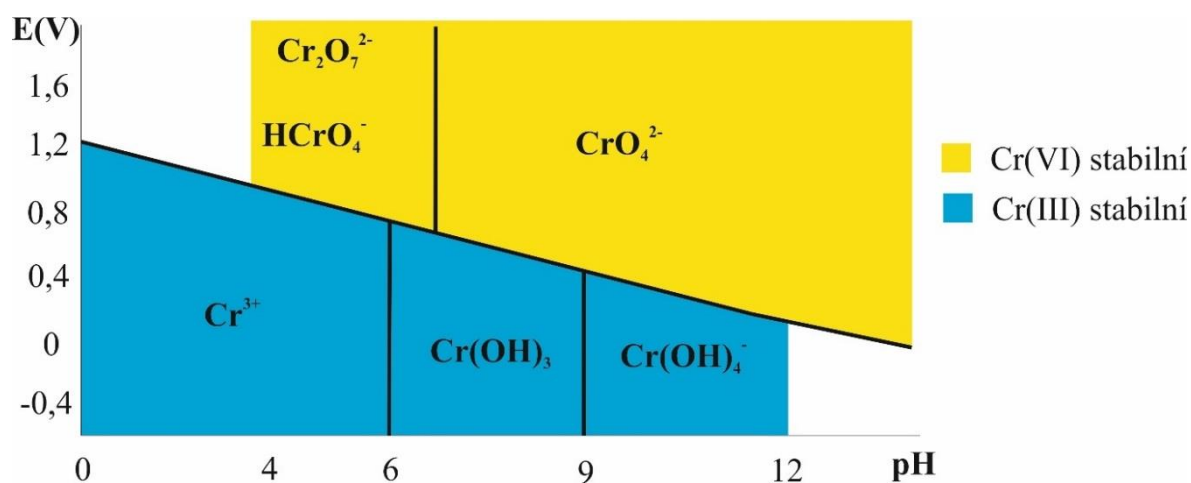
Chrom je netvrdějším kovovým prvkem, který lze běžně nalézt v zemské kůře, svým obsahem se řadí mezi 21. nejvíce zastoupený prvek [1]. V přírodě se pak nachází současně s rudami železa (chromit FeCr_2O_4) nebo jako součást drahokamů (smaragd, rubín), elementární chrom se přirozeně nevyskytuje. Poprvé byl tento prvek objeven až v 18. století na Sibiři v tzv. krokoitu jako součást PbCrO_4 , jeho název byl odvozen z výrazné barevnosti sloučenin (chroma = barva) [2]. Díky významným vlastnostem jako je například vysoká odolnost vůči korozi nebo značná chemická odolnost se v současné době asi 80 % chromu využívá v metalurgickém průmyslu, a to především na výrobu nerezové a legované oceli [1]. Dalších 15 % pak slouží na výrobu chemikálií, pesticidů a pigmentů. Poslední oblastí je zpracování kůží, kde použití jeho sloučenin (zejména $\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) značně urychluje proces činění. Avšak toto masivní používání vede k rozsáhlé kontaminaci průmyslových oblastí. Jelikož byly prokázány významné negativní účinky chromu na lidské zdraví [3], jeho obsah zde musí být kontrolován. Detailní studie navíc prokázaly, že biodostupnost, rozpustnost a toxicita chromu silně závisí na přítomné formě, a tak je nutné kontrolovat nejen množství celkového chromu, ale i zastoupení jeho různých forem (specií).

2.2 Specie chromu

Chrom se obecně může vyskytovat v různých oxidačních stavech od 0 až do +VI, avšak nejstabilnějšími a zároveň nejčastěji se vyskytujícími formami jsou pouze trojmocný (Cr(III)) a šestimocný (Cr(VI)) chrom [4]. Obě specie se liší v mnoha aspektech (reaktivita, mobilita, a hlavně toxicita), jejich správná identifikace je tedy při studiu vlivu chromu na lidské zdraví zásadní. Výskyt Cr(III) a Cr(VI) ve vzorcích je značně závislý na několika faktorech jako je například hodnota pH, obsah oxidujících/redukujících látek a komplexačních nebo chelatačních činidel v daném prostředí [1]. Tyto parametry totiž zásadně ovlivňují chemické rovnováhy obou specií a případně jejich interkonverzi. Závislost Cr(III) a Cr(VI) na hodnotě pH a redoxním potenciálu (E) detailně popisuje obrázek 1. Vzhledem k hodnotě pH a koncentraci se Cr(VI) může ve vzorku vyskytovat ve formě HCrO_4^- , CrO_4^{2-} nebo $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$. Forma HCrO_4^- převládá v roztocích při pH v rozmezí od 1 do 6,5 a koncentraci Cr(VI) kolem $0,01 \text{ mol l}^{-1}$, zatímco $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ převažuje v koncentrovanějších

roztocích [5]. CrO_4^{2-} lze najít ve vzorku pouze při $\text{pH} > 6,5$ nezávisle na koncentraci této specie. Avšak v přítomnosti redukčních činidel (například v organické matrici) a při velmi nízkých hodnotách pH vykazuje Cr(VI) vysoké hodnoty redoxního potenciálu. Díky tomu se stává silným oxidačním činidlem, jeho stabilita klesá, a tak často dochází k redukci až na Cr(III) .

Naopak Cr(III) je nejstabilnější formou chromu. Tato specie snadno tvoří komplexy se silnými ligandy obsahujícími kyslík nebo dusík, což ještě více posiluje její stabilitu. Nejčastěji se vyskytuje jako Cr(OH)_3 , který tvoří sraženinu při pH 6-9, u vyšších hodnot se mění v rozpustný komplex Cr(OH)_4^- . Nicméně i v tomto případě může docházet k interkonverzi, avšak pouze v silně alkalickém prostředí ($\text{pH} \sim 14$). Je tedy zřejmé, že závislost obou specií na hodnotě pH a složení analyzované matrice má velký vliv na přítomnost specií ve vzorku.



Obrázek 1 Výskyt trojmocného a šestimocného chromu v závislosti na hodnotě pH a E . Převzato z cit. [6].

2.2.1 Toxicita a zdroje kontaminace

Nejzajímavější specií z hlediska toxicity je bezpochyby Cr(VI) [7]. Díky své velikosti a rozpustnosti se jeho sloučeniny velice snadno dostávají přes biologické membrány až do buněk. I když má živý organismus efektivní detoxikační mechanismy, pomocí nichž je Cr(VI) redukován na Cr(III) , může během této přeměny docházet ke vzniku nestabilních meziproduktů (Cr(IV) , Cr(VI)), které reagují s H_2O_2 za vzniku reaktivních

forem kyslíku (*reactive oxygen species*, ROS) indukujících oxidativní stres a následné změny samotných buněk a DNA. Nejběžnější je tvorba genotoxických aduktů Cr-DNA nebo rozštěpení DNA. Intoxikace Cr(VI) se pak vyznačuje změnami na plicích, játrech a ledvinách. Může docházet k renálnímu selhání, nekróze jater a rakovině různých orgánů. Tyto karcinogenní a mutagenní vlastnosti přispěly k tomu, že je Cr(VI) označován jako karcinogen 1. typu [8]. V poslední době je poukazováno i na možnou teratogenitu solí Cr(VI) [9].

Naopak Cr(III) je esenciální formou hrající významnou roli v metabolismu tuků, bílkovin a hlavně cukrů (napomáhá působení inzulínu při eliminaci glukózy z krevního řečiště) [10]. Doporučenou denní dávkou Cr(III) pro dospělého člověka je 50 až 200 µg, avšak v některých případech onemocnění (obezita, inzulín-rezistentní pacienti) jsou dokonce předepisovány doplňky stravy obsahující Cr(III) (Cr(III)-pikolinát), které zlepšují zdravotní stav pacientů trpících cukrovkou druhého typu [8]. Nicméně ve vysokých koncentracích může být i tato specie toxická. Cr(III) se totiž ve velkém množství může akumulovat v buňkách, kde dochází k jeho oxidaci na toxický Cr(VI), místně pak může vyvolávat křeče, změny na kůži, žaludeční vředy atd. Za určitých podmínek lze tedy i tuto specii považovat za potenciální genotoxickou látku.

Aby bylo možné více zmapovat negativní vliv Cr(VI) a případně i Cr(III) na lidské zdraví, je nutné znát možné zdroje kontaminace. S rostoucím používáním chromu v různých oblastech lidské činnosti dochází ke kontaminaci životního prostředí, díky čemu se chrom dostává až do živých organismů, kde podléhá různým metabolickým přeměnám [11]. Veškerý chrom přírodního původu je ve stavu Cr(III). V nízké koncentraci je přítomen ve všech typech půd, v sopečném prachu i plynech. Díky jeho vysoké afinitě se obvykle váže k záporně nabitým částicím, ve volné formě se téměř nevyskytuje. Naopak Cr(VI) se v životním prostředí nachází zejména v důsledku lidské činnosti. Na rozdíl od Cr(III) má záporný náboj a je mnohem mobilnější. Díky tomu se dostává ze zdroje kontaminace velmi rychle do různých oblastí životního prostředí (voda, půda, vzduch atd.), avšak v přítomnosti jakékoliv organické hmoty dochází k jeho okamžité redukci až na Cr(III). Nebezpečí spojené s toxicitou Cr(VI) hrozí tedy hlavně v blízkosti zdroje kontaminace. Nicméně v určitých případech (vysoké pH, přítomnost oxidačních činidel, cukrovka druhého typu) může docházet k oxidaci Cr(III) na Cr(VI), čímž se i tato specie stává nebezpečnou pro lidské zdraví, jak bylo popsáno výše. Díky kontaminaci životního prostředí pak mohou být speciím chromu následně vystaveny rostliny, živočichové a v neposlední řadě i lidé. Tabulka I shrnuje nejvýznamnější činnosti spojené s kontaminací oběma speciem.

Tabulka I Zdroje kontaminace chromem (v podobě Cr(III) nebo Cr(VI)). Převzato z cit. [12].

Zdroj	Specie chromu
Svařování oceli	Cr(VI)
Výroba chemikálií	Cr(VI)
Chromování	Cr(VI)
Výroba barviv, pigmentů	Cr(III), Cr(VI)
Zpracování kůží	Cr(III)
Údržba a obsluha kopírovacích strojů, tonerů do tiskáren	Cr(VI)
Výroba baterií	Cr(VI)
Výroba svíček	Cr(III), Cr(VI)
Cementárny	Cr(III), Cr(VI)
Výroba gumy	Cr(III), Cr(VI)

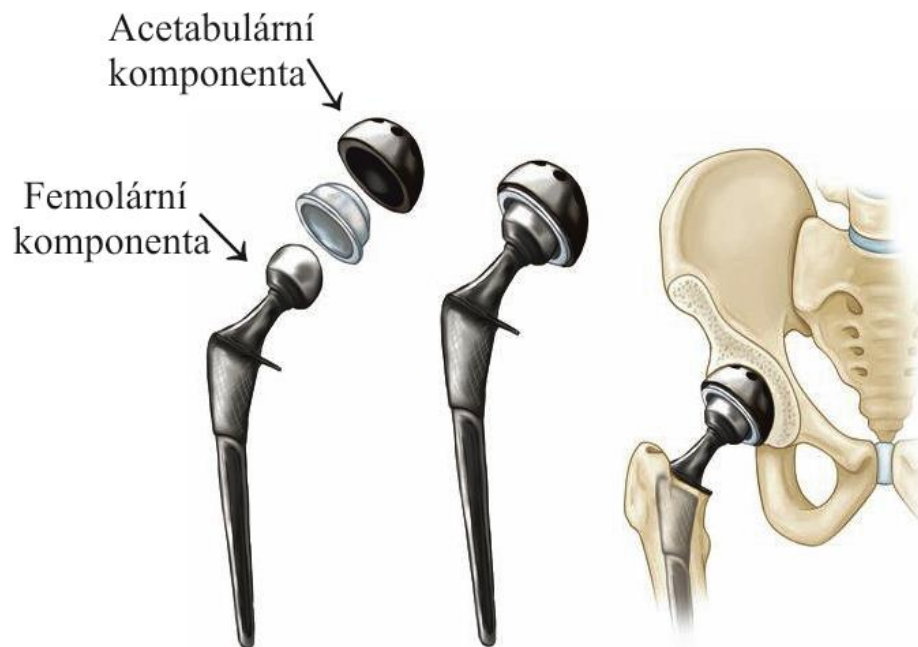
Kovové náhrady jako zdroj Cr(III) a Cr(VI)

Kromě výše zmíněných oblastí lidské činnosti se ale mohou specie chromu dostávat do lidského těla i jinou cestou. Jedná se zejména o používání slitin chromu na výrobu kloubních implantátů [13]. Tyto pomůcky prodlužují aktivní život mnoha pacientů, jejichž klouby již nejsou schopny plnit svou původní funkci. Výrazně ulevují od bolesti, obnovují funkci postiženého kloubu a zvyšují tak kvalitu života pacientů. Z těchto důvodů je jejich aplikace běžnou součástí ortopedických operací (v České republice se jich ročně provede kolem 40 000) [14]. Mezi nejvíce nahrazované klouby patří kyčelní a kolenní kloub, dále se můžeme setkat s náhradami i pro klouby ramenní, loketní a klouby prstů.

Zdravý kloub je obecně složen z kloubní hlavice a kloubní jamky tvořenými kostní tkání. Obě části jsou potaženy chrupavčitou vrstvou obsahující kolagen. Kloubní hlavice je navíc usazena do kloubní jamky vystlané synoviální membránou produkující synoviální tekutinu (kloubní výpotek). Tato čirá kapalina složená z plazmatických proteinů, kyseliny hyaluronové, fosfolipidů a krevních buněk snižuje tření kloubních ploch a zvyšuje přilnavost jednotlivých částí. Je také vhodným indikátorem zánětu kloubu a jeho poškození, které lze odhadnout jen z pouhé barvy a zákalu této tekutiny. Nejčastější příčinou onemocnění kloubů je degradace kloubní chrupavky způsobená stárnutím tzv. primární osteoartróza, která vzniká na geneticky nebo metabolicky změněném povrchu kloubu ve vyšším věku (nad 50 let). Naopak u tzv. sekundární osteoartrózy se jedná o poškození vlivem traumatu, revmatického či metabolického onemocnění v mladším věku (např. dna) způsobující poruchu kloubní homeostázy [15]. K léčbě obou typů osteoartrózy lze přistupovat dvěma

způsoby. Nejdříve se volí konzervativní léčba zahrnující režimová opatření a farmakoterapii, po jejím selhání následuje chirurgická léčba, kdy se provede výměna postiženého kloubu (tzv. totální endoprotéza). Jelikož jde o náhradu totální, je nahrazena hlavička i jamka kloubu, umělý kloub se tedy skládá ze dvou částí (obr. 2):

- femolární (fixační) komponenta zapadající do kosti nahrazuje krček a hlavičku kosti
- acetabulární (artikulační) komponenta nahrazuje kloubní jamku



Obrázek 2 Znárodnění kyčelního implantátu. Převzato z cit. [16].

Většina pacientů s kloubními náhradami má vysoké BMI (body mass index) a je ještě fyzicky aktivních. Tyto faktory tedy vyvolávají potřebu velmi odolných materiálů vhodných na výrobu kloubních implantátů. V současné době na trhu existují především implantáty typu *hard-on-hard* a *hard-on-soft* [13]. Typ *hard-on-hard* obsahuje obě komponenty vyrobené ze stejného materiálu, a to buď z kovu (*metal-on-metal*, MoM) nebo keramiky (*ceramic-on-ceramic*, CoC). Tato konstrukce implantátů je velice častá, avšak studie poukazují na otěr povrchové vrstvy obou částí během používání a následné uvolňování mikroskopických částic do těl pacientů. Naopak u *hard-on-soft* implantátů je femorální část vyrobena z kovu

nebo keramiky a acetabulární část z polymeru (speciálně upravený polyetylen nebo polymethylmethakrylát) (*metal-on-polyethylene*, MoP; *ceramic-on-polyethylene*, CoP). Hlavním problémem těchto implantátů je opotřebením polymerní části vyvolávající zánět. Všechny zmíněné komplikace obou typů implantátů po určité době indukují aseptické uvolnění implantátu s následnou periprotetickou osteolýzou (úbytek kostní tkáně), čímž se výrazně zkracuje jejich životnost (současné moderní implantáty vydrží v těle kolem 15 let).

V dnešní době se v praxi nejvíce využívají MoM implantáty, protože kovy patří k nejodolnějším materiálům z výše zmíněných [17]. Ideální kov by měl být odolný vůči mechanickému poškození, korozi a vysoce biokompatibilní (netoxický a nevyvolávající v těle obrannou imunitní reakci) [18]. V případě, že biologické vlastnosti materiálu nejsou vhodné na výrobu implantátu, avšak naopak vyniká mechanickými vlastnostmi, lze využít i povrchových úprav zaručujících biokompatibilitu. Biokompatibilita různých kovů ve srovnání s ostatními materiály je shrnuta v tabulce II.

Tabulka II Biokompatibilita materiálů používaných na výrobu kloubních implantátů. Převzato z cit. [18].

Biokompatibilita	Vlastnosti	Ostatní materiály	Kovy
Biotolerovaný	Tvorba tenké membrány mezi tkání a implantátem, riziko pohybu implantátu, koroze	Polyetylen	Nerezová ocel, Co-Cr-Mo
Bioinertní	Minimální nebo žádná interakce s tkání	-	Ti-Al-V, Ti
Bioaktivní	Kontrolovaná biologická aktivita, vzniká fyzikálně chemický spoj mezi tkání a implantátem	Biokeramika	-

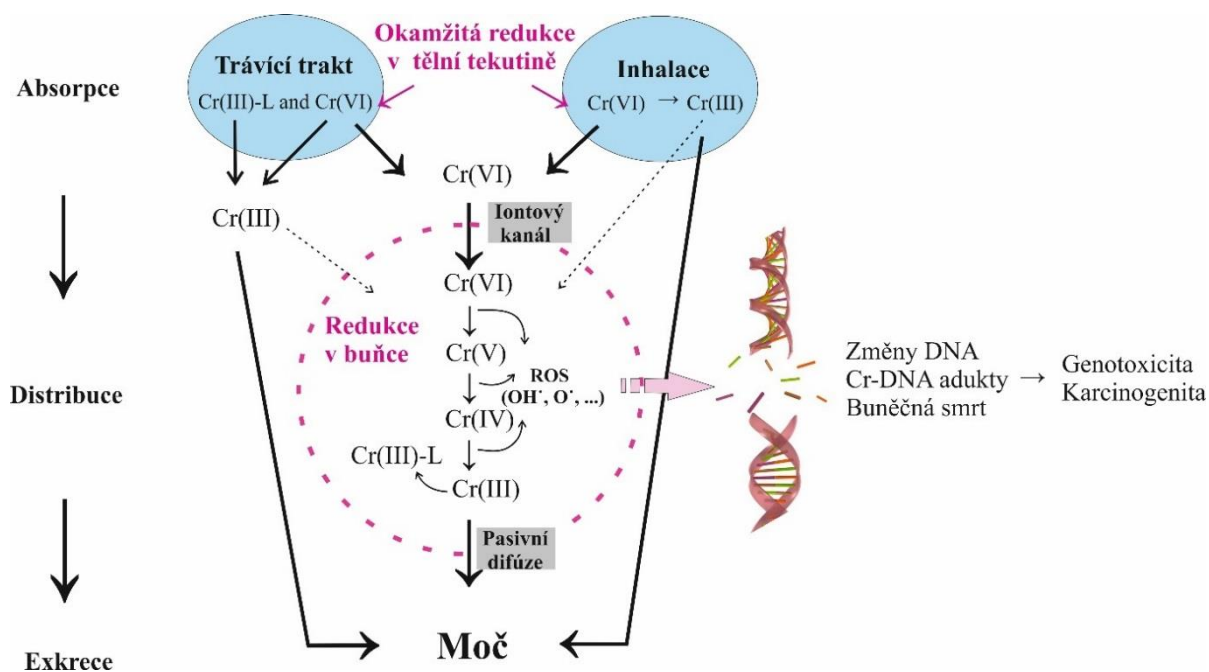
V minulosti se nejvíce používali slitiny železa, chromu, niklu a kobaltu (316L ASTM F138; Rex 734 apod.), které jsou sice vysoce odolné, ale při dlouhodobém použití náchylné ke korozi [13]. Nicméně díky rostoucím případům alergických reakcí na nikl se jako alternativa začala používat slitina Co-Cr-Mo (Co: 66-67 %, Cr: 26-30 %, Mo: 4-5 %) mající lepší vlastnosti než nerezová ocel. Její výroba je ale mnohem nákladnější. Další významnou skupinou jsou implantáty na bázi slitin titanu (Ti-6Al-4V, Ti-6Al-7Nb), případně vyrobené pouze z čistého titanu, které jsou ve srovnání s Co-Cr-Mo ještě více odolné vůči korozi. Na druhou stranu jsou ale dražší a snadno se opotřebují.

Zásadním problémem všech kovových implantátů obecně je ale koroze, která je jedním z hlavních důvodů jejich selhání. I když jsou všechny výše zmíněné kovy za normálních okolností vůči korozi odolné (implantáty na bázi Cr se pasivují tenkou vrstvičkou Cr_2O_3 , implantáty z Ti pak vrstvou TiO_2 zabraňující korozi), v lidském těle se tato odolnost snižuje a dochází k tzv. tribokorozi (poškození ochranné vrstvy vlivem mechanického opotřebení s následnou korozí způsobenou prostředím lidského těla – pH, oxidující/redukující komponenty) [19]. Následně dochází k nevratnému poškození implantátu, kdy je nutná jeho výměna. Nicméně uvolňování poškozeného materiálu, jeho transport a akumulace v lidském těle se pak stávají významným problémem. V případě Co-Cr-Mo implantátů je největší hrozbou právě chrom. Do okolních tkání a dále do celého těla (krev, moč, kloubní výpotek, vlasy atd.) se tento kov může uvolňovat ve formě nanočástic nebo iontů v různých oxidačních stavech (hlavně Cr(III) a Cr(VI)) [4]. Jelikož se ale jedná o biologickou matici, i v tomto případě je vysoce pravděpodobná okamžitá redukce toxického Cr(VI) až na Cr(III) ještě před tím, než je schopen dorazit do krve, moči atd. Tato hypotéza byla navíc potvrzena i několika studiemi zabývajícími se analýzou tkání získaných od pacientů s kovovou náhradou na bázi chromu, kde byly většinou detekovány hlavně částice Cr(III) ve formě nerozpustných Cr_2O_3 , CrPO_4 , komplexů s organickými ligandy, případně elementární chrom ve formě nanočástic [20-24]. Vzhledem k tomu, že publikovaných studií zabývajících se touto problematikou je ale velmi málo a žádná z nich nestudovala možnou interkonverzi mezi speciemi, lze tyto závěry považovat za diskutabilní. Je žádoucí vyvíjet další metody speciální analýzy chromu v biologických vzorcích a aplikovat je na analýzu vzorků krve, moči, kloubních výpotků či tkání od pacientů s kloubními náhradami. Zásadní je také neopomenout studium interkonverze, ke které jsou obě specie velmi náchylné. Získané výsledky by pak umožnily potvrdit či vyvrátit negativní vliv těchto náhrad na zdraví pacientů, což je v současné době velmi aktuální téma.

2.2.2 Metabolismus Cr(III) a Cr(VI)

Dalším významným krokem při identifikaci Cr(III) a Cr(VI) v biologických vzorcích je porozumění metabolismu chromu v živém organismu, kde může docházet k interkonverzi či tvorbě dalších forem chromu. Stručný popis metabolických drah Cr(III) a Cr(VI) společně s jejich toxikokinetikou shrnuje obrázek 3. Do živého organismu se může chrom dostat několika způsoby: vdechnutím (inhalace), kontaktem s kůží (transdermálně) anebo přes

trávicí trakt (kontaminovaná voda, potraviny, potravinové doplňky obsahující Cr atd.) [2]. Elementární chrom nemůže být absorbován ani jednou z těchto cest. Šestimocný chrom se nejnáze dostává do živých organismů inhalací, jeho absorpce je vzhledem k menší velikosti ve srovnání s Cr(III) efektivnější. Tímto způsobem může podráždit dýchací cesty, vyvolat astmatické potíže, vznik vředů či dokonce děr v nosní přepážce a následně rakoviny plic (tyto příznaky byly často pozorovány u dělníků v továrnách používajících sloučeniny Cr(VI) [25]). Naproti tomu Cr(III) je absorbován hlavně přes trávicí trakt [2]. Tato cesta je možná i pro Cr(VI), který po požití působí na počátku leptavě na gastrointestinální trakt a následovat může i šok a tvorba nádorů zažívacího traktu. Po jeho absorpci je ale okamžitě redukován na Cr(III) za vzniku nestabilních meziproductů (Cr(IV), Cr(V)) a reaktivních forem kyslíku (ROS) indukujících oxidativní stres a následné poškození DNA (viz. kapitola 2.2.1). Nově vzniklý Cr(III) se poté v buňce ochotně váže na organické ligandy (aminokyseliny, glutathion atd.) zvyšující jeho biodostupnost a mobilitu. Tyto komplexy se pak buď akumulují v buňkách, nebo opouští buňku pasivní difúzí. Proces pasivní difúze Cr(III) je tím rychlejší, čím je v organismu vyšší obsah aminokyselin, kyseliny askorbové nebo oxalátu. Naopak antacida a fytáty inhibují absorpci chromu. Následně je chrom transportován do krve a akumulován v orgánech jako jsou například játra, ledviny a plíce. Nakonec je vyloučen zejména močí, minimální množství lze detekovat i ve vlasech a žluči.



Obrázek 3 Shrnutí toxikokinetiky a metabolismu Cr(III) a Cr(VI) (ROS - reaktivní formy kyslíku, Cr(III)-L - komplexy Cr(III) s organickými ligandy). Převzato z cit. [4].

2.2.3 Cr(III) a Cr(VI) v biologických vzorcích

Do dnešního dne byla speciální analýza chromu realizována především v matricích jako jsou environmentální vzorky (voda, vzduch, půda) [5, 26, 27] a potraviny [28], speciace v biologických vzorcích nebyla doposud detailně popsána [4, 29]. Existuje jen několik prací zabývajících se touto problematikou, většina autorů dává stále přednost stanovení celkového chromu. Tyto výsledky ale nemají žádnou vypovídající hodnotu o možném negativním vlivu tohoto prvku na lidské zdraví. Správná identifikace a stanovení specií Cr(III) a Cr(VI) v krvi, moči, případně v tkáních by ale mohla být vhodným nástrojem pro monitoring Cr(VI) v kontaminovaných oblastech nebo pro problematiku kloubních náhrad. Z tohoto důvodu je žádoucí zaměřit se hlavně na speciální analýzu právě takových vzorků. Další tržlinou v této oblasti je i nedostatek informací o fyziologických hodnotách specií (hodnotách pro zdravou populaci). Dodnes sice bylo publikováno mnoho prací, které se zabývají stanovením celkového chromu v biologických vzorcích, relativně snadno tak lze dohledat jeho fyziologické hodnoty v krvi, moči, tkáních, ale informace o přítomných speciích a jejich zastoupení často úplně chybí. Vzhledem k tomuto nedostatku je pak složitá i samotná interpretace získaných výsledků speciální analýzy. Důvodem je právě komplexnost biologické matrice. Autoři se při speciální analýze takových vzorků často setkávají s mnoha

komplikacemi jako je například snadná interkonverze specií a náročná úprava vzorků. Další komplikací je unikátnost biologických vzorků, kdy se obsah kovů může odvíjet od fyzického stavu pacienta (věk, pohlaví, zdravotní stav) či prostředí, ve kterém žije (kontaminace, potraviny, implantáty) [29]. V neposlední řadě je důležité brát v potaz také složitost biologické matrice, díky které se může ve vzorku nacházet nejen volný Cr(III) a Cr(VI), ale například i Cr(III) vázaný v komplexech s organickými ligandy [30]. Zajímavou formou je například Cr(III)-pikolinát využívaný jako doplněk stravy při léčbě cukrovky druhého typu, který byl detekován v krvi [30]. Následující text shrnuje dostupné fyziologické hodnoty celkového chromu v různých biologických vzorcích společně s nejčastěji se vyskytujícími formami (pokud jsou známy).

Mezi nejjednodušší biologické vzorky se řadí sliny. Do slin se obvykle chrom dostává z potravy, vody, případně se může uvolňovat z dentálních náhrad na bázi chromu [31]. Vzhledem k tomu, že sliny obsahují vysoký obsah enzymů a bakterií, jakékoliv množství Cr(VI) ve slinách je okamžitě redukováno na Cr(III) a Cr(VI) se tedy v této matrici téměř nevyskytuje. Hodnoty celkového Cr se u zdravé populace obvykle pohybují mezi 0,8 a 3,6 $\mu\text{g l}^{-1}$, nicméně kouření, chrom v potravě a přítomnost dentální náhrad z chromu může tuto koncentraci značně ovlivnit [32].

Doposud nejvíce zmapovanou matricí je krev případně její sekundární složka krevní sérum/plasma. V literatuře se lze setkat s tvrzením, že obsah chromu v plné krvi je asi třikrát vyšší než v séru/plasmě [33, 34]. Sérum/plasma obvykle obsahuje méně chromu než 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ [35, 36], avšak v plné krvi se celkový chrom pohybuje v rozmezí 0,7-28 $\mu\text{g l}^{-1}$ [37]. Tento rozdíl je způsoben různou distribucí Cr(III) a Cr(VI) v krvi. Cr(III) lze nalézt hlavně v séru/plasmě, kde tato specie snadno tvoří komplexy a váže se na přítomné proteiny (β -globulin, transferin, albumin) [2, 29, 33, 38], naopak Cr(VI) se vyskytuje pouze ve volné formě a díky své mobilitě je schopen přejít do červených krvinek. Obsah celkového Cr v séru/plasmě tedy odpovídá pouze obsahu Cr(III), v plné krvi se ale mohou nacházet obě specie dohromady. Normální koncentrace chromu v krvi pak mohou být ovlivněny užíváním potravinových doplňků s Cr(III) nebo přítomností kloubního/dentálního implantátu z chromu [19]. Speciační analýza chromu v krvi je tedy vzhledem k vysoké afinitě Cr(III) k proteinům značně komplikovaná. Navíc díky rychlému přenosu Cr přes krevní oběh zde nedochází k jeho dlouhodobé akumulaci a tato matrice tedy není vhodným indikátorem intoxikace chromem [2, 39].

Mezi nejsložitější biologické vzorky patří bezpochyby tkáň. Celkový obsah Cr v lidském těle se pohybuje mezi 0,4 a 6 mg [2]. Jeho množství je vzhledem k hmotnosti

nejvyšší při narození a s přibývajícím věkem klesá. To samé platí pro jednotlivé orgány kromě plic. Obsah chromu v plicích sice také nejdříve klesá, ale od dospělosti zase roste. Tuto změnu způsobuje ukládání chromu z kontaminovaného ovzduší. Naopak Cr z potravin, vody atd. musí projít přes trávicí trakt, a tak se dostane i do jiných orgánů. V tkáních lze opět díky rychlé redukci na Cr(III) a vysoké afinitě Cr(III) k makromolekulám nalézt zejména tuto specii, která se následně ukládá v kostech, plicích, játrech, slezině, a ledvinách. Nejvyšší množství lze pak u zdravého člověka nalézt v plicích ($0,004-15 \mu\text{g g}^{-1}$), játrech ($0,008-0,16 \mu\text{g g}^{-1}$), ledvinách $0,04-0,09 \mu\text{g g}^{-1}$) a srdci ($0,04 \mu\text{g g}^{-1}$) [40, 41]. Zajímavou skupinu vzorků tvoří tkáň odebrané v blízkosti kloubních náhrad obsahujících chrom [19, 39]. Vlivem opotřebení materiálu s následným uvolňováním chromu v různých formách mohou takové vzorky vykazovat zvýšené hodnoty tohoto kovu (viz kapitola 2.2.1). Díky mobilitě uvolňovaných forem se chrom může transportovat dál do celého těla a akumulovat i ve vzdálenějších orgánech a tkáních [42].

Posledním často analyzovaným biologickým materiálem je moč. Jak bylo popsáno výše, je to hlavní cesta vylučování chromu z lidského těla. Obsah celkového chromu se u zdravých jedinců pohybuje v širokém rozmezí od $0,4$ až po $50 \mu\text{g l}^{-1}$, opět se vyskytuje převážně ve formě Cr(III) [43]. Tato hodnota může být ovlivněna kouřením (tabák obsahuje vysoký obsah chromu), stresem (cvičení, infekce), pitím piva, zdravotním stavem (cukrovka), případně opět přítomností náhrad na bázi slitin chromu [11, 44]. Množství chromu v moči je významné zejména z hlediska stanovení intoxikace chromem, protože umožňuje určit poměr mezi chromem přijatým a vyloučeným [2].

2.3 Speciační analýza

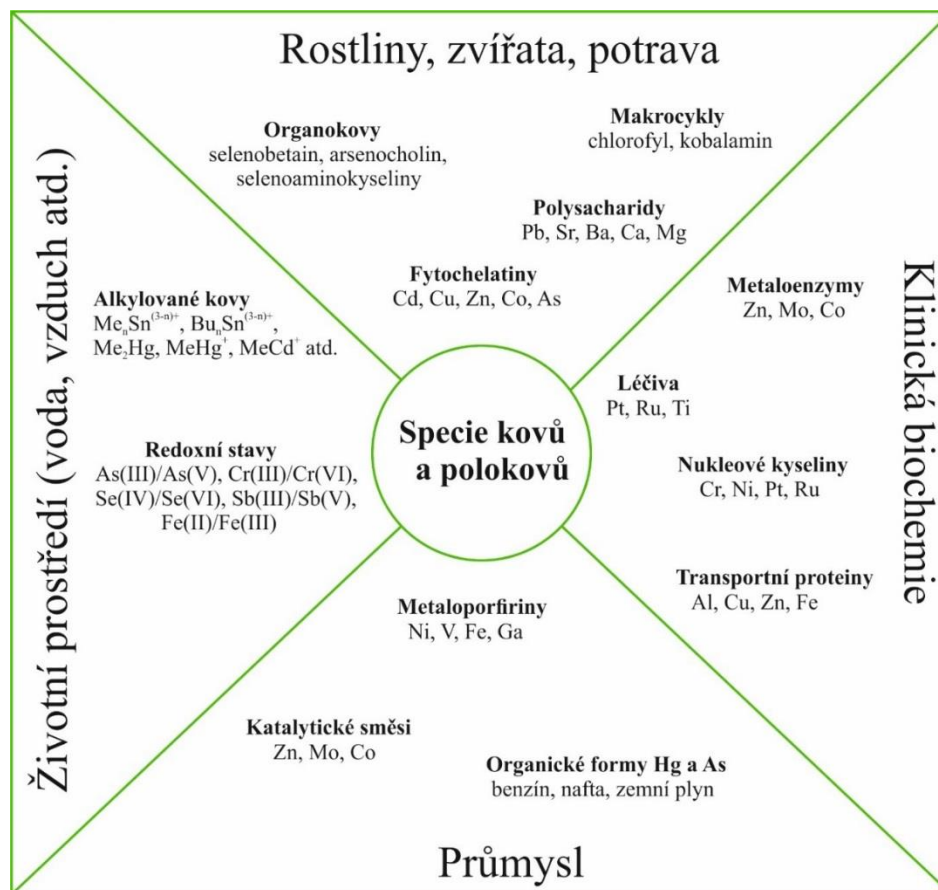
Vzhledem k tomu, že stanovení celkového obsahu prvků je v současné době nedostačující a neposkytuje úplnou informaci k hodnocení rizik životního prostředí, toxicity, nebo biodostupnosti různých forem téhož prvku, je nutné aplikovat metody schopné odlišit chemické formy stejného prvku [1]. Takovéto stanovení je označováno jako speciační analýza [45]. Tento přístup poskytuje možnost lépe porozumět chemickým a biochemickým procesům a může podat detailnější informace o toxicitě nebo naopak esencialitě jednotlivých specií. Významná je především speciační analýza prvků u vzorků, které by mohly mít dopad na zdraví člověka, jako jsou například potraviny, vzorky životního prostředí nebo pak samotné biologické materiály.

Celý proces speciální analýzy zahrnuje několik kroků od vzorkování, přes přípravu vzorku (filtrace, extrakce atd.), separaci a detekci jednotlivých specií až po identifikaci struktur analytů. Avšak často jsou speciální analýzou nazývány i postupy, které jsou založeny pouze na frakcionaci. Frakcionace obecně zahrnuje několik kroků, které nevedou k úplné identifikaci specií, ale charakterizují skupiny specií na základě jejich různých fyzikálních nebo chemických vlastností (rozpuštěnost, reaktivita). Typickým příkladem je například metoda využívající postupné extrakce. Frakcionace je tedy časově náročnější než speciální analýza, navíc využívá i mnoho různých chemických činidel. Všechny tyto aspekty ale zásadně ovlivňují také interkonverzi specií, a tak je nutné striktně dodržovat všechny parametry ovlivňující celý průběh frakcionace. Tento přístup tedy může jednoduše vést k chybným výsledkům. Výhodnější je tedy aplikovat speciální analýzu, která jako jediná může poskytnout komplexní informace o zastoupení jednotlivých specií ve vzorku.

Speciální analýza je založena na identifikaci různých specií, které se nejčastěji liší:

1. oxidačním stavem – typickým příkladem jsou právě specie chromu (Cr(III) a Cr(VI)), dále sem patří také specie As (As(III) a As(V)) nebo Mn (Mn(II) a Mn(VII))
2. strukturou organokovových sloučenin – selenoaminokyseliny, organosloučeniny arsenu
3. povahou komplexů kovů – například kovy vázané na proteiny, DNA fragmenty, polysacharidy

Na obrázku 4 je zobrazeno rozdělení nejzajímavějších specií v závislosti na jednotlivých oborech. V současné době jsou dobře popsány zejména specie arsenu, rtuti nebo selenu, avšak speciace chromu je stále neúplná, a to především v oblasti biologických vzorků významných pro monitoring intoxikace Cr(VI) [46]. Z tohoto důvodu bylo cílem práce tuto oblast detailně popsat a vyvinout metody speciální analýzy, které by byly vhodné pro současné stavení Cr(III) a Cr(VI) v různých biologických materiálech.



Obrázek 4 Oblasti výzkumu ve speciální analýze. Převzato z cit. [47].

2.3.1 Trendy ve speciální analýze chromu v biologických vzorcích

Zlatým standardem v oblasti speciální analýzy chromu je v současné době aplikace spojení separačních metod s vhodnou detekcí (tzv. spojené techniky). Tento přístup našel uplatnění hlavně v analýze jednoduchých matric, jako jsou například vzorky životního prostředí (voda, půda atd.) [5, 26, 27], aplikace na reálné biologické vzorky je ale značně komplikovaná. Z tohoto důvodu se pro speciaci chromu v biologických materiálech obvykle volí jednodušší metody.

Obecně se lze setkat se třemi přístupy:

- tzv. **solid-state techniky** analyzující přímo pevný vzorek bez žádné předchozí úpravy, mezi nejčastější techniky patří rentgenová fluorescenční spektrometrie (XRF), rentgenová absorpční spektrometrie (XAS), rentgenová absorpční spektrometrie v blízkosti absorpční hrany (XANES), rentgenová fotoelektronová spektrometrie (XPS)

- **off-line techniky** využívající izolaci specií ze vzorků s následnou detekcí celkového chromu (pomocí atomové absorpční spektrometrie s elektrotermickou (ET-AAS) nebo plamenovou (F-AAS) atomizací, ICP-MS)
- **on-line techniky** (tzv. spojené techniky) kombinující separaci specií s jejich následnou detekcí, nejčastěji se jedná o spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s ICP-MS (HPLC-ICP-MS)

Výběr techniky většinou závisí na časové náročnosti celé speciální analýzy, dostupném vybavení a v neposlední řadě také charakteru vzorku. Celková speciální analýza ale nezahrnuje pouze vlastní izolaci/separaci specií a jejich identifikaci, ale je důležité se zaměřit i na samotné vzorkování a přípravu vzorku. Všechny tyto kroky totiž mohou být zdrojem možných chyb způsobených kontaminací nebo ztrátou analytů a velmi často i interkonverzí Cr(III) a Cr(VI). Celá studie tak může vést k mylným závěrům (příkladem je redukce Cr(VI) během speciální analýzy chromu v rostlinných materiálech [48]).

2.3.2 Odběr vzorku

Velkým rizikem během analýzy specií ve stopových koncentracích může být kontaminace vzorku či ztráta analytů už při prvotním odběru. Tento problém je v případě biologických vzorků významný, neboť odběr ve většině případů nemůže provádět sám analytik. V medicíně se standardně používají nástroje vyrobené z materiálů obsahujících Cr (injekční jehly, skalpel z chirurgické oceli), kdy je důraz kladen především na jejich sterilitu. Další čištění předcházející případné kontaminaci kovy je tak téměř nemožné. Při odběru krve či kloubních výpotků je tedy zásadní používat injekční jehly neobsahující Cr, v nejlepším případě pak plastové jehly (většinou vyrobené z propylenu nebo teflonu) [29]. Na trhu jsou dostupné i posilikované jehly nebo kanyly, v tomto případě je důležité si dávat pozor na to, zda jsou posilikované z vnitřní nebo pouze z vnější strany, kdy by opět mohlo dojít ke kontaminaci vzorku [29, 46]. Pokud ale není možné použít takto upravené jehly, většinou se první část odebraného vzorku vyřadí (skartuje) a k analýze je použit až druhý alikvot (eliminace kontaminace). Jiným problémem mohou být i použité chemikálie, v případě krve to jsou zejména antikoagulanty jako heparin, ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA) nebo citrát [49]. Tyto látky ovlivňují distribuci Cr(III) a Cr(VI) mezi červené krvinky a plasmu a zejména afinitu Cr(III) k obsaženým makromolekulárním látkám. Vhodné je tedy

analyzovat krev bez úpravy těmito látkami. Podobně při odběru tkání je zásadní použití teflonových nebo polyethylenových nožů, aby se zamezilo kontaminaci z nerezové oceli [21, 50]. Naopak odběr moči už většinou neprobíhá za sterilních podmínek, a tak je doporučováno využít plastových odběrových nádobek, nejlépe předem připravených pro stopovou analýzu (loužením ve zředěné HNO_3 po dobu 24 h s následným oplachem deionizovanou vodou a vysušením) [29, 51, 52]. Pro odběr vzorků vlasů či nehtů je žádoucí používat nůžky vyrobené z plastu nebo jiného vhodného materiálu [53], kritickým bodem je i transport těchto vzorků do skladovacích nádob, kdy může dojít ke kontaminaci z oblečení nebo pokožky [29].

V neposlední řadě je důležité si dávat pozor i na skladování a rychlost odběru vzorku. Na rozdíl od jednodušších matric jako je voda nebo půda je kvůli možné kontaminaci nebo ztrátě analytů nutné odebrat biologické materiály co nejrychleji. Nejlepším postupem by byl rychlý odběr vzorku s okamžitou analýzou, avšak to ve většině případů není realizovatelné. Aby se zabránilo interkonverzi obou specií a vlivu působení přítomných mikroorganismů, je doporučeno takové vzorky ihned po odběru zamrazit na co nejnižší teplotu (obvykle na $-80\text{ }^\circ\text{C}$) [1]. Redukce Cr(VI) na Cr(III) vlivem vyšší teploty (nad $25\text{ }^\circ\text{C}$) byla potvrzena například ve vzorcích potravin [54]. I za dodržení všech výše popsaných pravidel speciální analýzy je zde ale stále určité riziko kontaminace nebo ztrát, tudíž je vhodné spolu s reálnými vzorky analyzovat také slepé pokusy nebo analytem obohacené vzorky umožňující jejich odhalení.

2.3.3 Příprava vzorků pro analýzu

Úprava vzorků před vlastní analýzou je dalším kritickým krokem celé speciální analýzy. Biologické vzorky obsahují komplexní matici zahrnující látky různého charakteru od iontů až po vysokomolekulární látky, a tak většinu z nich nelze analyzovat přímo [29]. Tyto složky mohou rušit analýzu nebo ji dokonce úplně znemožnit, tudíž musí být nejprve ze vzorku odstraněny. Další nezbytností je úprava vzorku vedoucí k přeměně analytů na měřitelné formy (příkladem je komplexace Cr(III) pomocí EDTA). Možným rizikem je zde opět interkonverze, ztráta analytů nebo kontaminace vzorku. Z těchto důvodů jsou zde kladeny vysoké nároky na čistotu použitých chemikálií a vody odpovídající kvality, vhodného laboratorního nádobí a pomůcek v laboratoři, jelikož i ty mohou být potenciálním zdrojem kontaminace.

Volba mezi různými úpravami vzorku se většinou odvíjí od typu biologické matrice, analyzovaných specií a zejména pak zvolené speciální techniky. Co se týče tzv. solid-state technik, příprava vzorků je velmi jednoduchá. Nejčastěji se jedná o fixaci odebrané tkáně (např. pomocí formalínu) s následnou přípravou tkáňových řezů pomocí mikrotomu [21, 23]. Tento proces je velmi rychlý, což výrazně zkracuje celou dobu speciální analýzy. Navíc se díky rychlosti a minimálnímu množství použitých chemikálií redukuje i riziko interkonverze. Na druhou stranu ale existuje studie potvrzující vliv použitého formalínu na distribuci Cr(III) a Cr(VI) ve vzorku [55]. Naopak tělní tekutiny je vhodné analyzovat buď za využití on-line nebo off-line technik. V současné době jsou ve speciální analýze nejpopulárnější on-line techniky, které se vyznačují vysokou rychlostí a selektivitou. Pro přípravu vzorků se obecně nejčastěji volí jednoduché ředění s následnou filtrací nebo centrifugací bránící ucpání separačního systému makromolekulárními látkami [56]. Tento postup je obvykle využíván na jednoduché vzorky z životního prostředí, v případě biologických vzorků byl aplikován pouze na analýzu vzorků moči [52]. U složitějších vzorků jako je krev může ale docházet ke ztrátě specií chromu (hlavně Cr(III) navázaného na proteiny). Vzhledem k tomuto problému se na speciaci chromu v tělních tekutinách nejčastěji využívají off-line techniky zahrnující extrakci jedné nebo více specií dohromady. Aplikace extrakčních metod má hned několik výhod jako například jednoduchost, nízká cena a analýza všech přítomných specií. Většinou se jedná o extrakci pouze jedné specie, kdy se obsah druhé obvykle dopočítá z rozdílu celkového obsahu Cr a naměřeného obsahu extrahované specie. Druhou možností je extrakce jedné specie, přičemž druhá specie je ze vzorku eluována nastavením jiných reakčních podmínek. Nejméně častou variantou je pak extrakce obou specií zároveň.

Vzhledem k prokázané toxicitě se většina studií zaměřuje zejména na Cr(VI). Z environmentálních vzorků lze tuto formu extrahovat pomocí vody, fosfátového tlumivého roztoku (pH 7), případně silně alkalických roztoků NaOH nebo NH₄OH (pH 12) [28, 30]. Efektivní alternativou je využití mikrovlnné extrakce alkalickým roztokem EDTA umožňující stanovení volných specií chromu (Cr(III) i Cr(VI)) bez rizika interkonverze. EDTA totiž váže Cr(III) do komplexu [Cr(III)-EDTA]⁻ a zamezuje tak jeho oxidaci. Nicméně v biologických vzorcích neexistují pouze volné formy obou specií, ale zejména v případě Cr(III) se jedná i o složité komplexy, jejichž extrakce je těmito způsoby velmi problematická. Z tohoto důvodu byly na biologické vzorky aplikovány jiné typy extrakcí, které jsou shrnuty v tabulce III.

Tabulka III Přehled použitých extrakčních postupů ve speciální analýze chromu v biologických vzorcích.

Biologický vzorek	Extrakce	Extrahovaná specie	Reference
Sérum, moč	Magnetická extrakce na pevné fázi	Cr(III)	[57, 58]
Sliny, moč	Extrakce na pevné fázi	Cr(III), Cr(VI)	[59, 60]
Krev, moč, sliny	Disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny využívající iontových kapalin	Cr(III), Cr(VI)	[61-64]
Krev, moč, sliny, sérum	Extrakce kapalnou fází s využitím teploty zákalu micelárních roztoků	Cr(III)	[31, 65, 66]
Moč, plasma	Extrakce na rozhraní iontové kapaliny a vodné fáze	Cr(III)	[67, 68]
Moč	Mikroextrakce s tuhnoucí organickou kapkou	Cr(III)	[69]
Moč	Extrakce využívající průtokového injekčního vysolování	Cr(III)	[70]
Sliny, moč, sérum, vlasy, nehty	Disperzní extrakce na pevné fázi	Cr(VI)	[53]
Moč	Adsorpce obou specií na nanočástice Au/TiO ₂ s následnou extrakcí využívající on-line fotokatalytické redukce UV zářením	Cr(III), Cr(VI)	[51]
Moč	Tepelně asistovaná mikroextrakce	Celkový Cr(III), celkový Cr(VI)	[71]
Tkáně (orgány)	Ultrazvukově asistovaná extrakce	Cr vázaný na proteiny	[72]

Zejména v případě extrakce Cr(III) mnoho autorů uvádí získané výsledky jako obsah celkového Cr(III) ve vzorku. Nicméně jak bylo popsáno výše, je velmi složité vyextrahovat i Cr(III) navázaný na proteiny. Ve většině studií se tak pravděpodobně podařilo vyextrahovat pouze jeho volnou/extrahovatelnou formu, vázaný Cr(III) zůstal v komplexu s přítomnými proteiny. Jediná studie zaměřená na různou distribuci Cr(III) mezi proteinovými frakcemi vzorků je práce popisující extrakci mezi dvě vodné fáze [68]. Jsou zde detailně popsány extrakce volného/extrahovatelného a vázaného Cr(III) a jejich dosažené koncentrace ve vzorcích plasmy. Naopak Döker a kol. se zase jako jediní zaměřili na extrakci pouze vázaného Cr z tkání (orgány myši) [72]. Ostatní studie tento fakt opomněly, a tak jejich výsledky mohly vést k mylným závěrům.

2.3.4 Techniky speciální analýzy chromu

Při volbě instrumentální metody pro stanovení specií chromu v biologických vzorcích je nutné zvážit hned několik faktorů, jako jsou například typ a velikost vzorku, předpokládaný koncentrační rozsah, rychlost analýz nebo dostupnou instrumentaci. Hlavními problémy při stanovení Cr(III) a Cr(VI) v biologických materiálech je jejich přítomnost ve velmi nízkých koncentracích (zejména v případě krve a moči), přítomnost neznámých forem specií a velmi snadné porušení rovnováhy během analýzy s následnou interkonverzí. Mezi nejvíce využívané patří bezesporu off-line techniky umožňující stanovení všech specií pomocí selektivních extrakčních metod s následnou detekcí celkové chromu v získaných frakcích (extraktech). Po vhodně zvolené přípravě vzorku je tedy nutné vybrat i detektor poskytující dostatečně nízké meze detekce. Jeho volba závisí na koncentraci chromu a samozřejmě vybavení laboratoře. Mezi nejčastěji využívané detektory patří atomová absorpční spektrometrie (buď s elektrotermickou atomizací (ET-AAS) [31, 59, 63-66, 68, 71, 73, 74] nebo s plamenovou atomizací (F-AAS) [51, 53, 57, 58, 61, 62, 67]) a zejména pak hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) [33, 70]. Porovnání těchto detektorů poskytuje tabulka IV. Detailní shrnutí literatury zaměřené na speciaci chromu v biologických vzorcích je uvedeno v přehledovém článku, který je součástí této disertační práce (Příloha č. 1) [4].

Tabulka IV Parametry použitých detektorů ve speciální analýze chromu v biologických vzorcích. Převzato z cit. [75].

Vlastnosti	ET-AAS	F-AAS	ICP-MS
Ovládání	Jednoduché	Jednoduché	Složitě
Provozní náklady a cena	Vyšší	Nízké	Vysoké
Spojení se separačními metodami	Ne	Ne	Ano
Meze detekce	> 50 ppt	> 10 ppb	< 1 ppt
Lineární dynamický rozsah (řád)	2	3	9
Preciznost	1-5 %	0,1-1 %	1-3 %
Multielementární analýza	Ne	Ne	Ano
Rychlost analýzy	Nízká	Střední	Vysoká

Pro pevné vzorky (například tkáň aj.) se obvykle volí tzv. solid-state speciální techniky. Nevyžadují žádnou složitou úpravu vzorku, jedná se pouze o analýzu prostorové distribuce Cr(III) a Cr(VI) ve vzorku. Mezi nejvíce využívané patří XPS, XAS nebo XANES

[20-24]. Méně častá je aplikace XPS v kombinaci s transmisí elektronovou mikroskopií (TEM) nebo energiově disperzní rentgenová fluorescenční analýza [22]. Zajímavou alternativou je studium distribuce specií chromu v tkáních pomocí hmotnostní spektrometrie s průletovým analyzátozem využívajícím pro ionizaci laserové mikrosondy (TOF-LMMS) [76]. Tyto techniky sice nenesou riziko ztráty analytů nebo kontaminace vzorku během jeho přípravy, avšak poskytují vysoké meze detekce (několik $\mu\text{g g}^{-1}$) nevhodné pro stanovení Cr(III) a Cr(VI) ve stopovém množství. Často tak jejich signál splývá se signálem pozadí. Jiným problémem může být podobnost signálů specií, díky čemuž je vybraná technika neodlišit.

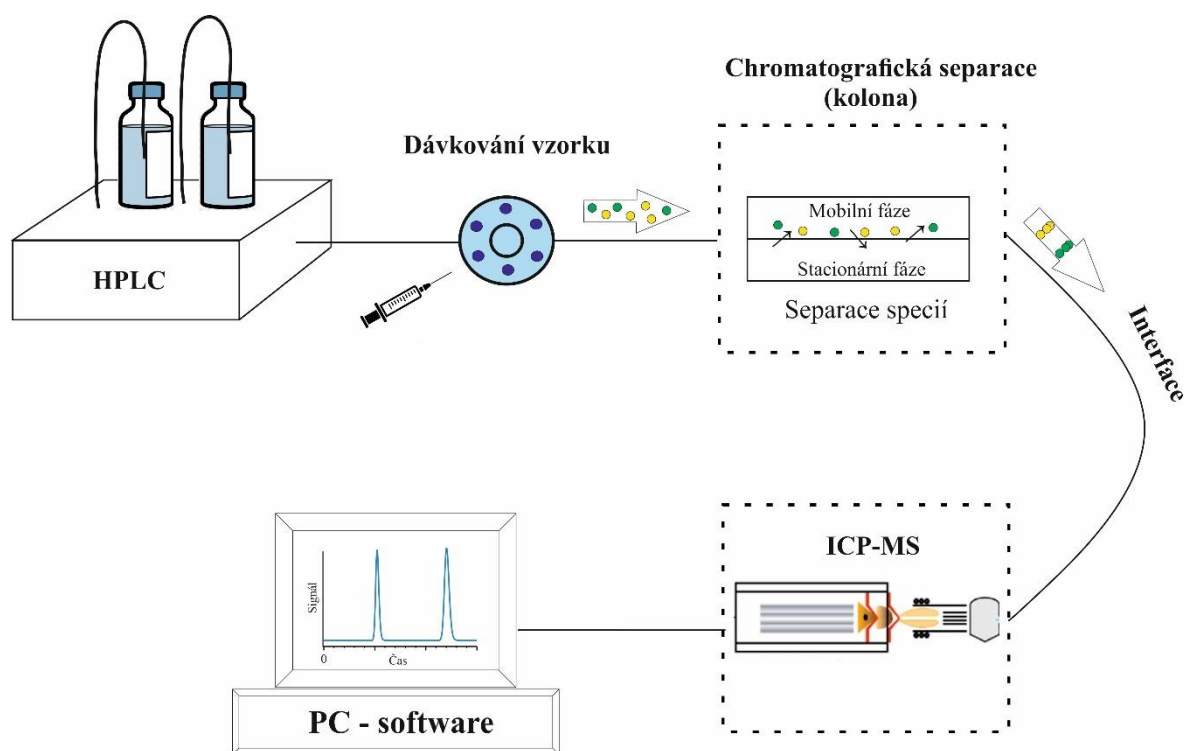
Většina autorů se tím pádem uchyluje ke speciaci za využití off-line technik. Jejich aplikace na biologické vzorky je jednodušší a následná detekce celkového Cr i rychlá. Jen zřídka je tedy nutná náročnější optimalizace celé speciální analýzy. Nicméně díky většímu počtu použitých chemikálií se zde zvyšuje riziko možné kontaminace vzorku a porušení stability Cr(III) a Cr(VI). Vzhledem k tomu je důležité kontrolovat interkonverzi mezi oběma speciemi. Dalším důvodem interkonverze může být i samotná matrice vzorku, která má redukční vlastnosti, jak už bylo popsáno v mnoha publikacích [4, 48]. Nezbytnou součástí každé speciální analýzy musí být tedy nastavení takových podmínek, které zajišťují stabilitu obou specií a případně i aplikace metody, která umožňuje kontrolu jejich oxidačního stavu před a po analýze. Bohužel to v případě solid-state technik a většiny off-line technik detekujících celkový Cr pomocí ET-AAS nebo F-AAS není realizovatelné. Z tohoto důvodu je současným trendem speciální analýzy aplikace spojených technik v on-line uspořádání využívajících ICP-MS.

2.3.4.1 On-line techniky s ICP-MS detekcí

Vzhledem k výše uvedeným nevýhodám off-line a solid-state technik se v posledních letech speciální analýza chromu zaměřuje spíše na aplikaci on-line technik. Tyto techniky umožňují simultánní analýzu specií ve velmi krátkém čase. Je zde využít výkonný separační systém s prvkově selektivním detektorem. Toto spojení je většinou realizováno buď přímým spojením výstupu separační techniky se vstupem detektoru, nebo je pro spojení použit vhodný spojovací článek tzv. interface [77].

Mezi separační techniky obecně vhodné pro speciální analýzu patří především kapilární elektroforéza, plynová nebo kapalinová chromatografie [46]. Jejich volba závisí na povaze studovaných specií a samotného vzorku. Jako prvkově selektivní detektor se pak

nejčastěji využívá atomový absorpční spektrometr (ET-AAS nebo F-AAS), atomový fluorescenční spektrometr, optický emisní spektrometr s indukčně vázaným plazmatem (ICP-OES) nebo ICP-MS. Nicméně pro potřeby speciální analýzy chromu je nejběžněji využívaným separačním systémem vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), jako detektor se přednostně používá ICP-MS (obr. 5). Toto spojení je zlatým standardem ve speciální analýze nabízející mnoho výhod jako je například široká škála separačních mechanismů (aplikace různých mobilních a stacionárních fází) umožňující separaci několika specií současně a jejich okamžitou detekci, což minimalizuje interkonverzi. Naopak určitou nevýhodou je zde omezená příprava vzorku, kdy zejména v případě biologických materiálů musí být z matrice odstraněny všechny makromolekulární látky (proteiny), které by mohly rušit analýzu nebo dokonce ucpat kolonu. V takových případech se často před vlastní separací využívá filtrace nebo centrifugace vzorků.



Obrázek 5 Schéma speciální analýzy využívající HPLC-ICP-MS.

Z módu kapalinové chromatografie se pro potřeby speciální analýzy chromu nejvíce využívá iontově-výměnná chromatografie (IE-HPLC) a iontově-párová chromatografie na reverzních fázích (IP-RP-HPLC) [4]. Z důvodu nekompatibility organických

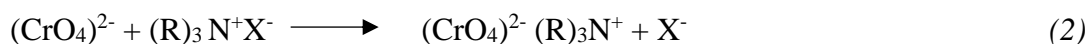
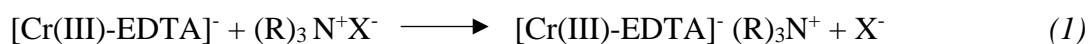
rozpouštědel s ICP-MS je známá pouze jedna studie využívající klasickou HPLC s obrácenými fázemi [60]. Významnou oblastí speciální analýzy chromu v biologických vzorcích je také identifikace neznámých specií. Vzhledem k afinitě Cr(III) k proteinům se tato specie vyskytuje v biologických vzorcích v různých formách. Vhodným nástrojem pro jejich identifikaci je gelová permeační chromatografie [72, 77-79]. Zajímavou alternativou je také spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií využívající měkké ionizační techniky (například elektrosprej nebo laserovou desorpci a ionizaci za účasti matrice) umožňující identifikaci složitých struktur neznámých specií [30, 56, 72, 80]. Speciální analýza využívající spojení prvkově selektivního ICP-MS detektoru s organickou hmotnostní spektrometrií by tak v budoucnu mohla být dokonalý nástroj pro identifikaci všech možných specií chromu nacházejících se ve vzorku. V následující části budou detailně popsány nejčastěji aplikované módy IE-HPLC a IP-RP-HPLC.

Iontově-výměnná chromatografie (IE-HPLC)

Iontově-výměnná chromatografie se obecně používá pro separaci iontů na základě jejich náboje [77]. Vlastní separace je založena na iontových interakcích analytu v mobilní fázi s opačně nabitými funkčními skupinami stacionární fáze. Stacionární fáze je tvořena buď organickými nosiči (například dextransy, celulóza, polymery) nebo anorganickými nosiči (zeolity, fosforečnany). Obsahuje buď záporně nabitě funkční skupiny vázající kationty (KATEX) nebo je případ opačný, kdy je stacionární fáze kladně nabitá a váže anionty (ANEX). Katexy mají nejčastěji na povrchu fenolické, karboxy, fosfátové nebo sulfátové skupiny, nicméně tento typ stacionární fáze se pro speciaci chromu téměř nevyužívá (aplikovatelný by byl pouze v případě analýzy kladně nabitého Cr(III)). Přednostně se k separaci obou specií chromu využívá anexů (nejčastější funkční skupiny jsou aminy). Vzhledem k tomu, že Cr(III) se ve vzorcích vyskytuje jako kladně nabitý, je nutné nejprve převést jeho náboj na záporný. K tomu se nejčastěji využívá komplexace s EDTA za tvorby $[\text{Cr(III)-EDTA}]^-$ (rovnice 1). Tato reakce může probíhat za laboratorní teploty, případně může být urychlena zvýšením teploty na 70 °C [4]. Bez této úpravy by došlo k separaci pouze záporně nabitého Cr(VI) (CrO_4^{2-}) (rovnice 2) a Cr(III) by se na stacionární fázi nezadržoval. Vzhledem k toxickým vlastnostem Cr(VI) se některé studie zabývají pouze touto specií a komplexace Cr(III) je popsána jen zřídka [38, 54, 81].

Separace iontů vyžaduje použití vodných mobilních fází s tlumivými roztoky s různými hodnotami pH (pH > 6 pro anexy, pH < 6 pro katexy). Pro eluci se nejčastěji

používá lineární gradient s dvěma mobilními fázemi o různém složení, díky tomu roste iontová síla a eluční síla mobilní fáze. Soutěžením ionexu o ionty v mobilní fázi a ve vzorku pak dochází k separaci. Kromě spojení s ICP-MS byl tento separační mód použit také pro stanovení Cr(III) vázaného na proteiny pomocí ultrafialovo-viditelné spektrometrie (HPLC-UV-VIS) [36, 38, 78].



Iontově-párová chromatografie na reverzních fázích (IP-RP-HPLC)

Při chromatografii iontových párů se využívá tvorby iontových asociátů mezi analyty iontové povahy a opačně nabitým protiiontem, jenž obsahuje nepolární část [77]. Tyto asociáty jsou neutrální (hydrofobní), a proto jsou na rozdíl od nabitých látek zadržovány na nepolární stacionární fázi (C8 nebo C18). Mobilní fáze je většinou vodná a obsahuje sloučeninu s opačně nabitým protiiontem (iont-párové činidlo). Nastavení optimálního pH pak podporuje disociaci analytů a tvorbu iontových párů. Jako iont-párová činidla se pro kladně nabitě analyty používají silné organické kyseliny (alkansulfonové), pH mobilní fáze se upravuje na hodnotu 3–4. Jako protiionty pro záporně nabitě analyty slouží kvartérní amoniové soli, pH by pak mělo být v rozmezí 7-8. V případě specií chromu jde opět o analýzu aniontů, a tak se jako iont-párová činidla nejčastěji využívají kvartérní amoniové soli (například tetraethylamonium hydroxid [52]). Stejně jako u IE-HPLC musí být Cr(III) nejprve převeden na $[\text{Cr(III)-EDTA}]^-$, aby získal záporný náboj a mohl pak vytvořit iontový asociát. Retence látek pak obecně závisí na koncentraci iont-párového činidla, velikosti alkylu analytu i iont-párového činidla, iontové síle a pH mobilní fáze. Tento mód má minimální požadavky na instrumentaci, další výhodou je i nízká pořizovací cena. Nicméně má i několik nevýhod. Soli v mobilní fázi mohou ucpat kapiláry nebo vstupní a výstupní ventily, což může vést k ovlivnění výsledných analýz. Použitá iont-párová činidla mohou interagovat s dalšími složkami matrice, což komplikuje interpretaci získaných výsledků. Navíc také snižují životnost kolon, tudíž se obvykle doporučuje pracovat s velmi nízkými koncentracemi. Ovlivňují stabilitu celé separace, a dokonce může dojít i k jejich precipitaci vlivem dalších složek mobilní fáze. Z těchto důvodů se častěji používá výše zmíněná IE-HPLC.

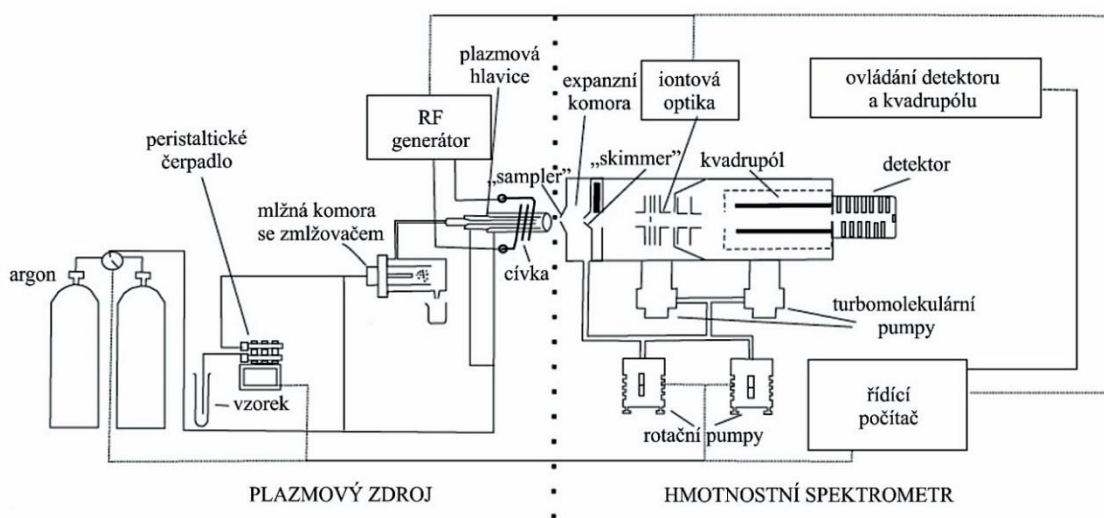
2.4 Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem

Hmotnostní spektrometry s indukčně vázaným plazmatem jsou v současné době nejpoužívanější prvkově-selektivní detektory [75]. Hlavními přednostmi je multielementární analýza kovů, polokovů i některých nekovů, nízké meze detekce (ppt), široký lineární dynamický rozsah (až 10 řádů), možnost zjištění izotopového zastoupení a analýza téměř jakýchkoliv vzorků (pevných, plyných i kapalných). Obecným problémem pak bývá menší tolerance vůči vyšším obsahům solí a organických činidel nebo spektrální interference. Nespornou nevýhodou jsou také vysoké pořizovací a provozní náklady. Od uvedení na trh prvního komerčního přístroje s kvadrupólovým analyzátozem v 80. letech minulého století našla tato technika uplatnění ve všech oblastech prvkové analýzy: od rozboru vod a analýzy vzorků životního prostředí přes metalurgii, geologii, archeologii, nanotechnologiích, až po biologické aplikace včetně medicíny [82]. Kromě stanovení celkových obsahů kovů se ICP-MS využívá také při studiu izotopových poměrů, prostorové distribuce prvků (spojení laserové ablace s ICP-MS) a v neposlední řadě právě ve speciální analýze, kdy dochází k on-line spojení se separačními technikami (plynová chromatografie, kapilární elektroforéza, HPLC).

2.4.1 Princip a instrumentace ICP-MS

ICP-MS je založeno na vnášení kapalného vzorku do zmlžovače pomocí peristaltické pumpy [75, 83]. Zde je vzorek působením kinetické energie nosného plynu (Ar) přeměněn na polydisperzní aerosol. Nejčastěji jsou používány pneumatické zmlžovače využívající působení mechanické síly nosného plynu na přiváděný vzorek, patří sem například koncentrický nebo úhlový zmlžovač. Vzniklý polydisperzní aerosol následně postupuje do mlžné komory sloužící k oddělení velkých kapek (větších než 10 μm) od jemného aerosolu a vyhlazení pulzů peristaltického čerpadla. Poté je aerosol transportován do plazmové hlavice, kde je pomocí vysokofrekvenčního magnetického pole udržováno indukčně vázané plazma o teplotě mezi 6 000 až 10 000 K v závislosti na oblasti plazmatu. Aerosol je zde vysušen, atomizován a ionizován. Z plazmatu jsou vzniklé kladně nabitě ionty převedeny do hmotnostního analyzátoru přes rozhraní tzv. interface. Tato část se skládá ze 2 kovových kónusů (větší sampler a menší skimmer) vyrobených většinou z niklu, případně z platiny s otvory o průměru přibližně 1 mm. Mezi kónusy je tzv. expanzní komora s nízkým tlakem (2-5 mbar) tvořeným rotační pumpou. Díky tomu jsou ionty urychleny ke druhému kónusu. Interface je kritickou částí ICP-MS, neboť zajišťuje přechod iontů z části s atmosférickým

tlakem k oblasti hmotnostního analyzátoru do vysokého vakua. Nicméně rozhraní je hodně náchylné k různým poškozením, často dochází například k zanášení až ucpání otvorů kónusů vlivem vysokého obsahu solí ve vzorcích nebo naopak zvětšování děr v případech, kdy jsou dlouhodobě analyzovány vzorky s vysokou koncentrací kyselin. Pomocí iontové optiky umístěné pod vakuem (10^{-3} mbar) složené ze série elektrostaticky ovládaných čoček jsou následně ionty z interface nasměrovány do hmotnostního analyzátoru. Dochází zde i k odstranění částic neiontové povahy (neutrální částice, fotony). V hmotnostním analyzátoru jsou zbylé ionty separovány podle hodnoty m/z , nejčastěji se využívá kvadrupólový analyzátor (85 % případů), případně pak sektorové analyzátorů nebo průletový analyzátor. Nakonec po průchodu analyzátozem dopadají rozdělené ionty na detektor, který převádí proud iontů na elektrický signál. V současné době se nejvíce používá elektronový násobič složený ze série dynod. Schéma instrumentace ICP-MS s kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem je uvedeno na obrázku 6.



Obrázek 6 Schéma ICP-MS spektrometru s kvadrupólovým analyzátozem. Převzato z cit. [84].

ICP-MS detektor byl ve speciální analýze chromu využit ve spojení s různými módy HPLC v on-line uspořádání nebo pouze pro detekci celkového Cr jako součást off-line technik. Tyto studie jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka V Přehled aplikací ICP-MS ve speciaci chromu v biologických vzorcích.

Analyt	Matrice	Příprava vzorku	Technika	Reference
Cr(III), Cr(VI), celkový Cr	Moč	Komplexace s 0,5 mmol l ⁻¹ EDTA a 3 mmol l ⁻¹ TEAOH za laboratorní teploty po dobu 40 min, následně 10 min při 40 °C	IP-RP-HPLC-ICP-MS	[52]
Cr(III), Cr(VI), celkový Cr	Moč	Stabilizace Cr(III) a Cr(VI) pomocí tlumivého roztoku (NH ₄ Cl, pH 8), oddělení kationtů (Cr(III)) průtokovým injekčním vysolováním	ICP-MS	[70]
Cr(III), Cr(VI)	Krev	Centrifugace (2 000 RCF, 10 min)	ICP-MS	[33]
Cr(III), celkový Cr	Krev, moč	Komplexace s acetyl cysteinem a disperzní mikroextrakce iontová kapalina/kapalina (1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorofosfát/aceton)	ICP-MS a ET-AAS	[64]
Celkový Cr vázaný na proteiny	Tkáně (orgány)	Centrifugace (105 000 g, 30 min, 4 °C)	GPC-ICP-MS	[72]

GPC-gelová permeační chromatografie

2.4.2 Interference v ICP-MS

Přestože jsou hmotnostní spektra obecně jednodušší než spektra atomová, v ICP-MS analýze se lze často setkat s nežádoucími vlivy ovlivňujícími stanovení prvků tzv. interferencemi [75]. Obvykle se dělí do dvou skupin, a to na spektrální vznikající překryvem izobarických/polyatomických iontů ve spektru a nespektrální způsobené složením matrice vzorku. Znalost interferencí je zásadní pro přípravu vzorku a výběr vhodné instrumentace.

Spektrální interference

Spektrální interference jsou považovány za nejproblematictější typ interferencí vznikající zejména v důsledku vzniku atomových či molekulových iontů, které mají stejnou hodnotu m/z jako stanovovaný izotop [75, 84]. Tím zasahují (interferují) do analýzy a způsobují navýšení měřeného signálu. Projevují se zejména u hmotnostních spektrometrů s nízkou rozlišovací schopností (typickým příkladem je kvadrupólový analyzátor). Spektrální interference pak můžeme dále dělit na polyatomické a izobarické.

Polyatomické interference vznikají v důsledku spojení dvou nebo více atomů, jejichž výsledná hodnota m/z je pak stejná jako hodnota analytu. Obvykle vznikají sloučením analytu s ostatními prvky matrice nebo použitých rozpouštědel/kyselin (O, C, N, H, Cl, S atd.), s prvky plazmového plynu (Ar) a prvky v atmosféře (O, N) [85]. Převážně jsou pozorovány v oblasti do hodnoty m/z 80. Nejznámějším příkladem je kombinace Ar a O ($^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$), která ovlivňuje stanovení $^{56}\text{Fe}^+$. Spojením Ar s chlorem z použitých kyselin zase vzniká $^{40}\text{Ar}^{35}\text{Cl}^+$ interferující stanovení $^{75}\text{As}^+$. Dalším příkladem je tvorba H^+ , $^{16}\text{O}^+$ nebo $^{16}\text{OH}^+$ spojujících se v molekulární hydridy, oxidy nebo hydroxidy nebo vznik dvojnásobně nabitých iontů (například $^{138}\text{Ba}^{2+}$ interferující $^{69}\text{Gd}^+$). Polyatomické interference výrazně komplikují i stanovení chromu, zejména pak v případě analýzy tak složité matrice jako jsou biologické vzorky obsahující vysoký podíl uhlíku a chloru [86, 87]. Příklady nejčastějších polyatomických interferencí ovlivňující stanovení ^{50}Cr , ^{52}Cr a ^{53}Cr jsou uvedeny v tabulce VI. Tučně zvýrazněné jsou nejfrekventovanější polyatomické interference typické pro analýzu biologických vzorků.

Tabulka VI Polyatomické interference ovlivňující stanovení chromu. Převzato z cit. [88].

Izotop	Relativní zastoupení izotopu (%)	Matrice	Interference	Relativní zastoupení (%)
$^{50}\text{Cr}^+$	4,35	H_2SO_4	$^{34}\text{S}^{16}\text{O}^+$	4,20
			$^{32}\text{S}^{18}\text{O}^+$	0,19
		$\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HNO}_3$	$^{36}\text{S}^{14}\text{N}^+$	0,02
		HNO_3	$^{36}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$	0,34
		Organická matrice	$^{38}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$	0,06
		$\text{HNO}_3 + \text{HCl}$	$^{35}\text{Cl}^{15}\text{N}^+$	0,28
$^{52}\text{Cr}^+$	83,76	H_2SO_4	$^{36}\text{S}^{16}\text{O}^+$	0,02
		HNO_3	$^{38}\text{Ar}^{14}\text{N}^+$	0,06
		Organická matrice	$^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$	98,50
		H_2O	$^{36}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$	0,34
		$\text{HNO}_3 + \text{HCl}$	$^{37}\text{Cl}^{15}\text{N}^+$	0,09
		HCl , organická matrice	$^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}^+$	0,03
		HCl , organická matrice	$^{35}\text{Cl}^{16}\text{OH}^+$	75,60
$^{53}\text{Cr}^+$	9,51	H_2SO_4	$^{36}\text{S}^{16}\text{OH}^+$	0,02
		HNO_3	$^{38}\text{Ar}^{14}\text{NH}^+$	0,34
		Organická matrice	$^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$	1,10
		H_2O	$^{36}\text{Ar}^{17}\text{O}^+$	0,06

		HCl, organická matrice	$^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$	24,17
			$^{35}\text{Cl}^{18}\text{O}^+$	0,15
			$^{35}\text{Cl}^{17}\text{OH}^+$	0,03

Naopak izobarické interference vznikají v přítomnosti izotopu s téměř stejnou hodnotou m/z jakou má izotop analytu. Ve skutečnosti neexistují dva izotopy s úplně stejnou hodnotou m/z , avšak rozdíly mezi hodnotami jsou tak malé, že je obvykle nelze rozlišit. Při stanovení Cr se s tímto typem lze setkat pouze při měření izotopu 50, který je zatížen interferencí s Ti (5,4 %) nebo V (0,25 %). Pro většinu prvků lze ale nalézt izotop nezatížený tímto typem interferencí, ne vždy se ale jedná o nejvíce zastoupený.

Identifikace a potlačení spektrálních interferencí

Vlastní identifikace spektrálních interferencí může být provedena dvěma způsoby. Nejčastěji se používá metoda kalibrace s přizpůsobenou maticí (matrix-matched) založena na analýze kalibračních standardů obsahujících matici a kalibračních standardů bez matrice [83]. Získané kalibrační křivky jsou následně porovnány (nejlépe některým vhodným statistickým testem [89]) a pokud se liší, jsou výsledky ovlivněny maticí efektem. Další možností je současné monitorování prvků způsobujících interference s měřenými analyty. Jak již bylo popsáno, stanovení izotopu ^{52}Cr v biologických vzorcích je nejčastěji zatíženo polyatomickými interferencemi $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ a $^{35}\text{Cl}^{16}\text{OH}^+$ [86, 87]. Je tedy vhodné současně monitorovat i signály izotopů ^{12}C a ^{35}Cl a porovnat získané výsledky s analýzou vzorků neobsahujících matici. U HPLC-ICP-MS analýzy se v získaných chromatogramech mohou objevovat neznámé píky odpovídající právě těmto interferencím. Porovnáním poměrů intenzit mezi jednotlivými izotopy stanovovaného prvku ve vzorku s maticí a srovnáním tohoto poměru s teoretickou hodnotou lze tyto interference snadno identifikovat. U speciální analýzy chromu se nejčastěji stanovuje poměr $^{52}\text{Cr}/^{53}\text{Cr}$, jehož teoretická hodnota je 8,77 [54]. Pokud se experimentálně získaná hodnota z analýzy reálného vzorku liší, nejedná se o signál chromu ale o interference. Poslední, nejméně častou možností pro odhalení interferencí je použití ICP-MS s vysokou rozlišovací schopností, který je schopen interferent a stanovovaný izotop od sebe odlišit.

I když je většina interferencí v současné době dobře popsána, zatím ještě nebyla vyvinuta univerzální metoda pro jejich odstranění. Pokud je prvek zatížen těmito interferencemi, nejjednodušším způsobem, jak eliminovat vliv interference, je sledovat jiný izotop, který ovlivněn není [75]. Další možností je odstranění všech rušivých elementů ze vzorku pomocí různých prekoncentračních nebo chromatografických metod, použití jiných

kyselin a rozpouštědel nebo optimalizace nastavení parametrů zmlžování a plazmatu. S výhodou lze použít různé extrakční techniky izolující Cr ze složité matrice, všechny použité chemikálie by samozřejmě měly obsahovat co nejmenší množství C a Cl (NH_4NO_3 , $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ atd.) [90, 91]. Náročnější metodou eliminace spektrálních interferencí je aplikace matematických korekčních rovnic [75]. Nárůst intenzity vlivem interference na dané hmotě je obvykle vypočítán pomocí přirozeného zastoupení a měření intenzity interferujícího prvku na jiné hodnotě m/z . Pro stanovení celkového chromu nebo jeho specií je ale nutné použít složitější korekce založené na korekčních faktorech pro polyatomické interference. Toto řešení bylo využito při stanovení specií chromu v kompostu pomocí HPLC-ICP-MS [92] i během stanovení celkového chromu v enviromentálních [93] a biologických [94] vzorcích. V tomto případě nebylo možné využít přirozeného poměru interferujících izotopů a jejich intenzit na jiné hmotě, protože oba izotopy C i Cl interferují na všech izotopech chromu. Z tohoto důvodu byly korekční faktory počítány z hodnot získaných analýzou C a Cl v roztocích neobsahujících chrom [92]. Pomocí těchto roztoků byl vypočítán poměr polyatomické interference a interferujícího izotopu a aplikován jako korekční faktor (*rovnice 3, rovnice 4*).

$$I(^{52}\text{Cr}^+) = I(52) - \frac{I(^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+)}{I(^{13}\text{C}^+)} \times I(13) \quad (3)$$

$$I(^{52}\text{Cr}^+) = I(52) - \frac{I(^{35}\text{Cl}^{16}\text{OH}^+)}{I(^{37}\text{Cl}^+)} \times I(37) \quad (4)$$

Správnost výsledků získaných aplikací matematických korekcí závisí na pravděpodobnosti výskytu (relativní zastoupení) interference a koncentraci analytu ve vzorku. Většinou se volí v takových případech, kdy se jedná o jednoduchou korekci, případně pokud ostatní metody řešení interference selhaly.

Poslední možností je úprava instrumentace, kdy je využito tzv. cool plazma, kolizně/reakční cely nebo hmotnostních spektrometrů s vysokou rozlišovací schopností [82]. Většina polyatomických interferencí vzniká přímo v plazmatu a z tohoto důvodu lze využít k jejich odstranění tzv. cool/cold (studené) plazma [75]. Tento typ plazmatu je tvořen snížením výkonu radiofrekvenčního generátoru se současným zvýšením průtoku nosného plynu, čímž se výrazně sníží jeho teplota a minimalizuje se tak vznik polyatomických interferencí odvozených z iontů Ar. Cool plazma se nejčastěji používá v případě nízké koncentrace analytu ve vzorku vzhledem k vysoké koncentraci interferentu. Jeho použití ale může zvyšovat tvorbu jiných polyatomických interferencí pocházejících z matrice, tudíž je

vhodné především pro analýzu čistých vzorků. U speciace chromu bylo cool plazma použito při studiu polyatomických interferencí v mořské vodě [95], nicméně ve srovnání s použitím hmotnostního spektrometru s vysokou rozlišovací schopností nepřinášelo mnoho výhod. Tyto spektrometry totiž dosahují oproti klasickým kvadrupólovým mnohonásobně lepší rozlišovací schopnosti a díky tomu lze charakterizovat i ionty způsobující polyatomické interference [85]. V určitých případech ale ani to není pro některé spektrální interference dostačující. V praxi se nejčastěji používají sektorové hmotnostní spektrometry s dvojitou fokusací dosahující rozlišovací schopnosti kolem 10 000, zatímco klasický kvadrupól má pouze 300. Značnou nevýhodou je ale vysoká pořizovací cena a zhoršení citlivosti vlivem snížení propustnosti iontů. Potřebná rozlišovací schopnost pro separaci polyatomických interferencí od signálu ^{52}Cr je 1 671 pro $^{35}\text{Cl}^{16}\text{OH}^+$ a 2 375 pro $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ [96].

Jinou variantou je použití kolizně/reakční cely. Vzhledem k tomu, že kvadrupólový hmotnostní analyzátor nemá dostatečnou rozlišovací schopnost pro odlišení mnoha interferencí, lze mezi iontovou optiku a hmotnostní analyzátor umístit ještě kolizně/reakční celu umožňující odstranění přítomných interferencí. Kolizně/reakční cely lze následně podle typu reakce dělit na kolizní a reakční. Kolizní cely se obvykle skládají z oktapólu nebo hexapólu s kolizním plynem, nejčastěji je to He, Ne nebo Ar. Díky kolizi mezi ionty a atomy kolizního plynu dochází ke snížení kinetické energie a zlepšení citlivosti. Reakční cely pak obsahuje reaktivní plyn (O_2 , H_2 , NH_3 , CH_4) reagující s polyatomickými ionty za vzniku jiných, neinterferujících iontů nebo neutrálních částic. Během eliminace spektrálních interferencí u stanovení chromu byly použity kolizní cely s He [90, 97, 98] i reakční cely s H_2 [98, 99], NH_3 [100, 101] nebo CH_4 [102, 103]. Tyto aplikace ale přináší i několik nevýhod jako je tvorba jiných polyatomických interferencí nebo ztráta analytu.

Inovativním přístupem k řešení spektrálních interferencí je využití tzv. tandemové hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS/MS), známé také jako hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem využívající trojitého kvadrupólu (TSQ 9000 (Thermo) a ICP-QQQ (Agilent)) [104]. Tato technologie je komerčně dostupná teprve od roku 2012. Hlavním rozdílem oproti klasické kolizně/reakční cele je zavedení dalšího kvadrupólu, který funguje jako filtr a umožňuje vstup pouze iontům o dané hodnotě m/z . To vede k lepší kontrole nad reakcemi probíhajícími v kolizně/reakční cele. Vzhledem k tomu, že je tato instrumentace relativně nová, její aplikace na stanovení Cr byla zatím popsána minimálně [105, 106]. Nicméně získané výsledky ukazují, že umožňuje rychlé řešení interferencí s mnoha výhodami, v budoucnu tak lze očekávat nárůst těchto aplikací.

Nespektrální interference

Během ICP-MS analýzy se vedle spektrálních interferencí mohou uplatňovat i nespektrální interference způsobené matričními vlivy. Oproti spektrálním interferencím, kdy dochází ke zvyšování analytického signálu, nespektrální interference jsou charakterizovány zvýšením, ale i snížením signálu analytu [85]. Hlavními faktory určujícími rozsah vlivu matrice na analýzu jsou transport a zmlžování vzorku, ionizace, extrakce a fokusace iontů [75]. Rozdílná hustota reálných vzorků oproti kalibračním standardům výrazně ovlivňuje jejich nasávání do zmlžovače. Vysoká koncentrace solí ve vzorku může vést k zanášení otvorů kónusů, naopak vysoká koncentrace kyselin k jejich zvětšování, čímž dochází k ovlivnění transportu a ionizace vzorku. Obecně by celkový obsah solí rozpuštěných ve vzorku neměl přesáhnout $2\ 000\ \text{mg l}^{-1}$. Ionizace v plazmatu je zase nejčastěji ovlivněna matričními snadno ionizovatelnými prvky (Na, K atd.). Způsoby eliminace těchto interferencí spočívají v ředění vzorku nebo použití vhodného vnitřního standardu. Ten se v nízkých koncentracích přidává do všech analyzovaných vzorků (kalibrační standardy, slepé pokusy, reálné vzorky), aby se vyrovnaly problémy způsobené maticí. Volba vnitřního standardu záleží na několika faktorech: nesmí být přítomen v původním vzorku a měl by mít podobný ionizační potenciál, chování v plazmatu a hodnotu m/z jako analyzovaný prvek (rozdíl nižší než 50 Da). Mezi nejčastěji používané interní standardy patří ^{45}Sc , ^{89}Y , ^{115}In , ^{159}Tb a ^{209}Bi .

2.5 Zajištění kvality ve speciální analýze

Metrologické posouzení každé analytické metody je zásadní pro zhodnocení její vhodnosti pro daný účel. V případě speciální analýzy chromu hrají získané výsledky zásadní roli při hodnocení negativního vlivu Cr(VI) na lidské zdraví a případně i zdravotního stavu pacientů. Z těchto důvodů je nezbytné věnovat pozornost kontrole kvality a ostatním metrologickým aspektům jako je validace vyvinuté metody, odhad nejistoty výsledků měření a stanovení jejich návaznosti [5]. Bez zohlednění těchto aspektů vyvinutá metoda nemůže zaručit spolehlivost získaných výsledků a může tak snadno vést k mylným závěrům. Nejčastěji se u diskutovaných studií setkáváme zejména s validací [4]. Je to důležitá součást každé nově vyvinuté metody, která by se měla týkat nejen vlastní analýzy ale také postupu odběru a zpracování vzorku. U metod sloužících pro speciální analýzu biologických vzorků by se validace měla nejlépe řídit pokyny uvedenými pro validaci bioanalytických metod z Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA) [107]. Nicméně

v doposud publikovaných studiích zabývajících se speciální analýzou chromu v biologických vzorcích byla validace provedena nejčastěji pouze na následujících parametrech: mez detekce, mez stanovitelnosti, linearita, rozsah, pravdivost a preciznost. Získané hodnoty byly výrazně ovlivněny zvolenou prekoncentrační metodou, případně separační a detekční technikou. Nejvyšších hodnot mezi detekce a stanovitelnosti bylo dosaženo pomocí tzv. solid-state technik ($\mu\text{g g}^{-1}$), naopak nejnižších pomocí ICP-MS (ng l^{-1}). Významným faktorem je i analyzovaný typ matrice, kdy u jednodušších vzorků lze získat nižší meze detekce i stanovitelnosti, jelikož jejich příprava nebývá tak složitá, jako je tomu například u tkání. Riziko kontaminace nebo ztrát je tedy velmi nízké. Detailně jsou všechny validační parametry shrnuty v publikovaném přehledovém článku (viz. Příloha č.1) [4]. Nicméně ve většině studií byla validace vynechána.

Stanovení metrologické návaznosti i nejistoty měření je možné pomocí analýzy certifikovaných referenčních materiálů (CRM) obsahujících certifikované koncentrace analytů ve stejné nebo alespoň podobné matrici jako analyzovaný vzorek. U speciální analýzy chromu to ale není vůbec jednoduché. Na trhu se sice vyskytuje pestrá škála referenčních materiálů různého složení včetně biologických matric, avšak pouze s certifikovanou celkovou koncentrací chromu. Z důvodu snadné interkonverze není v současné době dostupný žádný CRM obsahující certifikovanou koncentraci Cr(III) i Cr(VI) v jakékoliv biologické matrici. Jediným dostupným je ERM-BD213a kvasnice (LGC Ltd.) s certifikovanými hodnotami celkového Cr ($305,5 \pm 5 \text{ mg kg}^{-1}$ (průměr \pm rozšířená nejistota)) a Cr(III) ($302 \pm 47 \text{ mg kg}^{-1}$ (průměr \pm rozšířená nejistota)). Možnou alternativou je analýza různých CRM, z nichž každý obsahuje jinou specii. Na trhu je například SRM 2108 obsahující jen Cr(III) a SRM 2109 obsahující pouze Cr(VI) ve vodných roztocích (certifikované hmotnostní koncentrace $1 \pm 0,005 \text{ g l}^{-1}$ a $1 \pm 0,004 \text{ mg l}^{-1}$ (průměr \pm rozšířená nejistota), obě NIST). Nicméně vzhledem k matričním efektům nejsou tyto materiály vhodné pro speciální analýzu biologických vzorků. V doposud publikovaných studiích popisujících speciální analýzu chromu se lze setkat s použitím CRM obsahujících pouze certifikovanou celkovou koncentraci chromu [52, 57, 58, 63, 64, 66, 70, 108] (tab. VII). Pomocí vyvinuté metody speciální analýzy autoři stanovili obsah Cr(III) a Cr(VI), jejichž součet pak porovnali s certifikovanou celkovou koncentrací chromu v CRM. Tímto způsobem ale nelze odhalit možné interkonverze specií, které jsou v případě Cr velmi běžné. Jedinou možností je tedy analýza reálných vzorků obohacených o Cr(III) a Cr(VI), v nejlepší případě za použití izotopicky obohacených standardů Cr(III) a Cr(VI) [109]. Tento přístup zahrnuje spikování (obohacení) reálných vzorků pomocí izotopicky

obohacených standardů, nejčastěji ve formě $^{53}\text{Cr(III)}$ a $^{50}\text{Cr(VI)}$. Tyto standardy jsou komerčně dostupné [110], případně je možné si je připravit přímo v laboratoři z izotopicky čistých oxidů ^{53}Cr a ^{50}Cr ($^{53}\text{Cr}_2\text{O}_3$ a $^{50}\text{Cr}_2\text{O}_3$) [111, 112]. Následně je vzorek podroben celé speciální analýze a dané izotopy jsou nakonec detekovány pomocí izotopicky-citlivého detektoru (ICP-MS). Na základě získaných výsledků se porovnávají nejen koncentrace všech izotopů, ale zejména pak jejich forma, která je zásadní hlavně během speciální analýzy. S tímto přístupem se lze nejčastěji setkat u spojení HPLC-ICP-MS, kdy lze odlišit formu chromu na základě retenčních časů Cr(III) a Cr(VI) a tak i jejich případnou interkonverzi [28, 113, 114]. Použití izotopicky obohacených standardů během speciální analýzy chromu v biologických vzorcích ale zatím popsáno nebylo. Je tedy zřejmé, že zajištění kvality je významnou součástí každé nově vyvinuté analytické metody. Bohužel ve speciální analýze chromu v biologických vzorcích jí není věnována dostatečná pozornost, a to zejména kvůli chybějícím vhodným matricovým CRM a složitosti matrice.

Tabulka VII Matricové certifikované referenční materiály použité při validacích speciace chromu v biologických vzorcích.

Označení	Matrice	Certifikovaná hodnota celkového Cr (průměr ± rozšířená nejistota)	Výrobce	Reference
ICHTJ-cta-VLT-2	Tabákové listy	$1,87 \pm 0,16 \mu\text{g g}^{-1}$	ICHTJ, Polsko	[31, 61]
Seronorm TM Trace Elements Urine	Moč	$19,7 \pm 2,6 \mu\text{g l}^{-1}$	Sero AS, Norsko	[52]
SRM 1643c	Voda	$19,0 \pm 0,6 \mu\text{g l}^{-1}$	NIST, USA	[70]
SRM 2670E	Moč	$85,0 \pm 6,0 \mu\text{g l}^{-1}$	NIST, USA	[70]
BCR CRM 505	Estuární voda	$3,97 \text{ nmol kg}^{-1}$	JRC, Belgie	[74]
GBW(E) 90006	Hovězí sérum	$0,202 \pm 0,013 \mu\text{g l}^{-1}$	NRC-CRM, Čína	[64, 66]
CRM 2668	Moč	$1,03 \pm 0,056 \mu\text{g l}^{-1}$	NRC-CRM, Čína	[64]
Seronorm TM Trace Elements Whole Blood, Level 1	Krev	$0,88 \pm 0,051 \mu\text{g l}^{-1}$	Sero AS, Norsko	[64]
SRM 1598	Hovězí sérum	$0,140 \pm 0,012 \mu\text{g l}^{-1}$	NIST, USA	[63]
GBW07605	Čajové listy	$0,8 \pm 0,03 \mu\text{g g}^{-1}$	NRC-CRM, Čína	[57, 58]

ICHTJ - Institute of Nuclear Chemistry and Technology, NIST - National Institute of Standards and Technology, JRC - Joint Research Centre, NRC-CRM - National Research Center for Certified Reference Materials

3. CÍLE PRÁCE

Cíly disertační práce byly vývoj, validace a aplikace HPLC-ICP-MS metod pro speciální analýzu chromu v biologických vzorcích.

Konkrétní cíle lze shrnout do následujících bodů:

- Speciální analýza chromu v krvi a kloubních výpotcích. Vývoj a validace metody stanovující specíe Cr(III) a Cr(VI) pomocí IP-RP-HPLC-ICP-MS. Využití ICP-MS analýzy pro získání informace o celkové koncentraci Cr v krvi a kloubních výpotcích za účelem studia hmotnostní bilance mezi specíemi a celkovým Cr. Aplikace na analýzu reálných vzorků odebraných kontrolním pacientům a pacientům s kloubní náhradou vyrobenou ze slitiny Co-Cr-Mo. Statistické vyhodnocení získaných výsledků. Studium polyatomických interferencí.
- Speciální analýza chromu v biologických tkáních. Vývoj inovativní IE-HPLC-ICP-MS metody pro stanovení Cr(III), Cr(VI) a metody ICP-MS sloužící pro stanovení celkového Cr v tkáních. Validace obou metod dle pokynů pro validaci bioanalytických metod z Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv. Statistické vyhodnocení získaných výsledků. Detailní studium interkonverze Cr(III) a Cr(VI) během celé speciální analýzy využívající izotopicky obohacených standardů. Případová studie jednoho pacienta zabývající se identifikací a stanovením všech forem Cr uvolňujících se z kloubních náhrad do periprostetických tkání.

Nejvýznamnější výsledky této disertační práce byly publikovány v několika impaktovaných publikacích [4, 108, 115] (viz. Příloha č. 1, 2, 3), manuscript shrnující výsledky speciální analýzy chromu v periprostetických tkáních je v recenzním řízení.

4. SPECIAČNÍ ANALÝZA CHROMU VE VZORCÍCH KRVE A KLOUBNÍCH VÝPOTKŮ

Z odborné literatury zmíněné v teoretické části vyplývá, že on-line techniky byly ve speciální analýze chromu v biologických vzorcích doposud opomíjeny. Známa je pouze jedna studie zabývající se stanovením Cr(III) a Cr(VI) v moči, kde byl k separaci využit mód iontově-párové chromatografie na reverzních fázích ve spojení s ICP-MS detekcí (IP-RP-HPLC-ICP-MS) [52]. Spojení HPLC s ICP-MS ale přitom přináší klíčové výhody, jako je zkrácení doby analýzy, snížení mezí detekce a samozřejmě snížení rizika kontaminace nebo interkonverze. Nespornou výhodou je i možnost analýzy malých množství vzorků obsahujících stopové koncentrace Cr(III) a Cr(VI). Cílem první části disertační práce tedy bylo vyvinout metodu využívající spojení IP-RP-HPLC-ICP-MS a aplikovat ji na analýzu složitějších biologických vzorků jako jsou krev a kloubní výpotek. Významnou součástí byly i validace vyvinuté metody a studium polyatomických interferencí.

4.1 Experimentální část

4.1.1 Chemikálie

K přípravě všech vzorků a standardů byly použity výhradně chemikálie o vysoké čistotě, všechny roztoky byly připraveny pomocí deionizované vody (měrný odpor 18,2 M Ω .cm) získané z dvoustupňové deionizační stanice Milli-Q water systému (Millipore, Francie). Pro přípravu mobilní fáze byly použity EDTA a tetrabutylamonium iodid (TBAI) rozpuštěné v deionizované vodě, pH bylo upraveno pomocí roztoku koncentrovaného hydroxidu amonného (20-30 %) (vše Sigma Aldrich, USA). Na mikrovlnný rozklad reálných vzorků byla použita kyselina dusičná 65% Analpure® a peroxid vodíku 30% p.a.+ (Analytika, spol. s r.o. Česká republika). Standardní roztoky Cr(III) a Cr(VI) pro speciální analýzu byly připraveny z chromanu draselného (K₂CrO₄, $\geq 99,5$ %) a chloridu chromitého (CrCl₃ · 6 H₂O, ≥ 98 %) (Sigma Aldrich, USA), celkový Cr byl stanoven pomocí Certipur® Chromium ICP Standardu (Cr(NO₃)₃, 1 000 mg l⁻¹, 985 \pm 5 mg kg⁻¹) z Merck KGaA (Darmstadt, Německo). Pro přípravu roztoku vnitřního standardu sloužil víceprvkový

kalibrační roztok obsahující Sc, Y, In, Tb a Bi o koncentraci $10 \pm 0,1 \text{ mg l}^{-1}$ (Analytika, spol. s r.o. Česká republika).

Aby se předešlo nežádoucím kontaminacím, bylo všechno požívané laboratorní nádobí ze skla nebo plastu před každým použitím naloženo do 10% roztoku HNO_3 přes noc. Další den bylo několikrát opláchnuto deionizovanou vodou a vysušeno v sušárně.

4.1.2 Vzorky a referenční materiály

Vzorky krve i kloubních výpotků byly získány od pacientů Ortopedické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc majících v těle kloubní náhradu kyčelního nebo kolenního kloubu typu MoP. Ke studii bylo vybráno 5 vzorků krve a 9 vzorků kloubních výpotků pocházejících od pacientů s kloubní náhradou vyrobenou ze slitiny chromu (Co-Cr-Mo). Dále bylo navíc studováno 5 vzorků krve a 5 vzorků kloubních výpotků od pacientů s náhradou neobsahující chrom, tyto vzorky sloužily jako kontrolní. Vzorky krve byly odebrány do 10 ml plastových zkumavek, z důvodu eliminace potenciální kontaminace pocházející z injekční jehly byl vždy odebírán až druhý alikvot. Vzhledem k vlivu antikoagulantů na distribuci Cr(III) a Cr(VI) v krvi nebyly vzorky dál nijak upravovány [49]. Vzorky kloubních výpotků byly odebrány před revizí kloubní náhrady do 5 ml plastových zkumavek.

Kvůli nedostupnosti CRM obsahujícího specie Cr(III) a Cr(VI) ve vhodné matici byl pro validaci IP-RP-HPLC-ICP-MS metody vybrán CRM SeronormTM Trace Elements Whole Blood L-3 (certifikovaná koncentrace celkového Cr $23,2 \pm 4,7 \text{ } \mu\text{g l}^{-1}$ (průměr \pm rozšířená nejistota); číslo šarže: 1112691, SERO AS. Norsko). K přípravě obohacených vzorků pro testování pravdivosti a preciznosti metody byly použity vzorky krevního séra a kloubního výpotku získané od pacientů bez kloubních náhrad, tyto vzorky opět pocházely z Ortopedické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc. Všechny vzorky byly uchovávány při teplotě $-80 \text{ } ^\circ\text{C}$ v mrazáku z důvodu potlačení biochemických procesů a tedy i interkonverze specií [54].

4.1.3 Instrumentace

Ke speciální analýze bylo využito spojení HPLC-ICP-MS složené z HPLC systému Agilent 1200 (Agilent Technologies, Německo) a ICP-MS Agilent 7700x (Agilent Technologies, Japonsko). Součástí HPLC systému byla kvartérní pumpa, 1260 BIO-inertní

dávkovací ventil a dávkovací smyčka vyrobená z polyetheretherketonu (PEEK) o objemu 50 μ l. Z PEEKu byl dále vyroben i spojovací materiál (kapiláry, ferule, fittingy) z důvodu dosažení co nejnižšího pozadí pro chrom. Separace vzniklých komplexů/asociaátů Cr(III) a Cr(VI) byla realizována pomocí ZORBAX Eclipse XDB-C8 kolony (5 μ m, 2,1 \times 150 mm, Agilent Technologies, USA) za laboratorní teploty. ICP-MS byl vybaven autosamplrem (ASX-520), mikrokonzentrickým zmlžovačem, chlazenou mlžnou komorou dle Scotta (2 $^{\circ}$ C) a oktapólovou kolizně/reakční celou. Pro stanovení celkového Cr ve vzorcích byl použit stejný ICP-MS spektrometr. Zoptimalizované parametry nastavení IP-RP-HPLC-ICP-MS pro speciální analýzu Cr(III) a Cr(VI) a ICP-MS pro stanovení celkového Cr jsou uvedeny v tabulce VIII.

K přípravě vzorků byl použit IKATM MS 3 basic vortex mixér (IKA[®] - Werke GmbH & Co. KG, Německo), centrifuga typu Sigma Sartorius 6-16K (Sigma, Německo) a mikrovlnný rozkladný systém MLS 1200 Mega (Milestone, Itálie) vybavený šesti rozkladnými nádobami z teflonu.

Tabulka VIII Zoptimalizované parametry IP-RP-HPLC-ICP-MS a ICP-MS.

Parametr	IP-RP-HPLC-ICP-MS	ICP-MS
Mobilní fáze	5 mmol l ⁻¹ TBAI a 0,6 mmol l ⁻¹ EDTA, pH 7	-
Průtok mobilní fáze (ml min ⁻¹)	0,4	-
Akviziční mód	TRA	Spektrum
Příkon generátoru (W)	1 550	1 550
Vnější plazmový plyn (l min ⁻¹)	15,0	15,0
Střední plazmový plyn (l min ⁻¹)	0,9	0,9
Pomocný plazmový plyn (l min ⁻¹)	1,07	1,07
Kolizní plyn He (ml min ⁻¹)	3,5	4,3
Monitorované izotopy	¹² C*, ¹³ C*, ³⁵ Cl*, ³⁷ Cl* ⁴⁵ Sc#, ⁵⁰ Cr*, ⁵² Cr, ⁵³ Cr*	⁵² Cr, ⁴⁵ Sc#
Integrační čas (ms)	100	100

TRA-time resolved analysis

* izotopy monitorované při studiu polyatomických interferencí

vnitřní standard

4.1.4 Příprava mobilní fáze a standardních roztoků

Mobilní fáze byla připravena rozpuštěním EDTA a TBAI v deionizované vodě tak, aby jejich koncentrace odpovídala 5 mmol l⁻¹ TBAI a 0,6 mmol l⁻¹ EDTA. Vzhledem ke snadné interkonverzi obou specií bylo následně pH upraveno na hodnotu 7 pomocí zředěného

roztoku hydroxidu amonného (1:3). Zásobní standardní roztoky Cr(III) a Cr(VI) byly připraveny rozpuštěním příslušného množství K_2CrO_4 a $CrCl_3 \cdot 6 H_2O$ v deionizované vodě tak, aby výsledná koncentrace chromu odpovídala $1\ 000\ mg\ l^{-1}$. Tyto standardní roztoky pak byly postupně naředěny mobilní fází na požadované koncentrace v rozsahu $0,1-250\ \mu g\ l^{-1}$, maximální ředění v jednom kroku bylo 10krát. Následně se nechaly stát 30 minut při laboratorní teplotě, aby se vytvořil komplex Cr(III) s EDTA nutný pro separaci obou specií.

Kalibrační standardy sloužící pro stanovení celkového Cr ve vzorcích byly připraveny zředěním Certipur® ICP standardu Cr ($1\ 000\ mg\ l^{-1}$) deionizovanou vodou na koncentrace rovněž v rozsahu $0,1-250\ \mu g\ l^{-1}$. Ke každému standardu byla navíc přidána koncentrovaná HNO_3 z důvodu stabilizace Cr v roztocích. Jako vnitřní standard pro stanovení ^{52}Cr pomocí IP-RP-HPLC-ICP-MS i ICP-MS byl zvolen izotop ^{45}Sc . Jeho roztok o koncentraci $100\ \mu g\ l^{-1}$ byl připraven 100násobným zředěním víceprvkového kalibračního roztoku obsahujícího Sc, Y, In, Tb, Bi ($10 \pm 0,1\ mg\ l^{-1}$) pomocí deionizované vody.

4.1.5 Příprava reálných vzorků

Před vlastní přípravou byl každý vzorek krve nebo kloubního výpotku rozmražen při laboratorní teplotě a následně homogenizován pomocí vortex mixéru po dobu 5 minut. Z takto upraveného vzorku byly odebrány alikvoty pro IP-RP-HPLC-ICP-MS analýzu a stanovení celkového chromu pomocí ICP-MS.

Pro speciální analýzu byl vzorek připraven následovně: $250\ \mu l$ krve nebo kloubního výpotku bylo odpipetováno do polypropylenové eppendorfky a naředěno $250\ \mu l$ deionizované vody. Vzniklý roztok byl homogenizován pomocí vortex mixéru 5 min, kvantitativně převeden na membránu Amicon 30 kDa centrifugačního filtru (Millipore Sigma, Německo) a centrifugován při $16\ 000\ g$ a $10\ ^\circ C$ po dobu 10 min. Díky tomu došlo k oddělení proteinů od nízkomolekulární části (supernatant) [116]. Následně byl aplikován modifikovaný postup dle Lin a kol. [117], kdy byl supernatant zředěn mobilní fází v poměru 1:9, vzorek byl poté inkubován při laboratorní teplotě 30 min a nakonec třikrát zanalyzován pomocí IP-RP-HPLC-ICP-MS. Slepé pokusy neobsahující matici byly připraveny stejným způsobem.

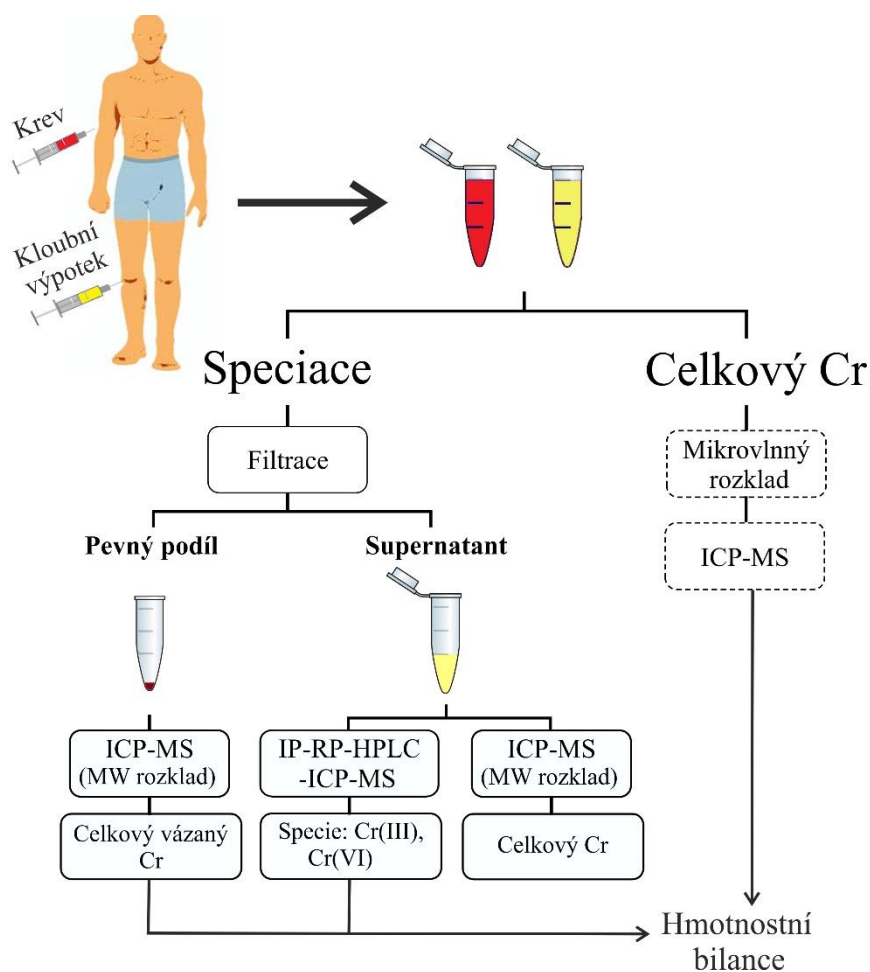
K získání informace o obsahu celkového Cr ve vzorcích byla využita validovaná ICP-MS metoda popsaná Kubou a kol. [39]. Vzorky krve nebo kloubních výpotků ($1\ ml$), celá proteinová část získaná centrifugací a zbytek supernatantu po IP-RP-HPLC-ICP-MS analýze byly odpipetovány do teflonových mineralizačních kelímků, kde k nim byla přidána

mineralizační směs složená z 2 ml HNO₃ a 1 ml H₂O₂. Takto připravené vzorky byly rozloženy pomocí mikrovlnného rozkladného systému MLS 1200 Mega. K rozkladu byl použit softwarově řízený program uvedený v tabulce IX. Po rozkladu se vzorky nechaly zchladnout na laboratorní teplotu, kvantitativně se převedly do 10 ml odměrných baněk (v případě vzorků supernatantu do 5 ml odměrných baněk z důvodu nízké koncentrace Cr ve vzorcích) a doplnily po rysku deionizovanou vodou. Slepé pokusy byly připraveny stejným způsobem, avšak rozkladem pouze mineralizační směsi bez matrice. Před vlastní analýzou pomocí ICP-MS se vzorky převedly do 10 ml polypropylenových zkumavek, každý vzorek byl analyzován šestkrát. Celý analytický postup je schematicky znázorněn na obrázku 7.

Tabulka IX Použitý rozkladný program.

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

Ventilace: 10 min



Obrázek 7 Schéma speciální analýzy chromu v krvi a kloubních výpotcích (MW-mikrovlnný).

4.1.6 Validace IP-RP-HPLC-ICP-MS

Vyvinutá IP-RP-HPLC-ICP-MS metoda sloužící pro stanovení Cr(III) a Cr(VI) byla validovaná v rozsahu linearity, meze detekce (LOD), meze stanovitelnosti (LOQ), pravdivosti, preciznosti, opakovatelnosti retenčního času a paměťového efektu („*carry-over*“ efektu) (detailně shrnuto v tabulce X). Pro stanovení hmotnostní bilance mezi speciem Cr(III), Cr(VI), vázaným Cr v proteinové části a celkovým Cr ve vzorcích byla použita validovaná ICP-MS metoda popsána Kubou a kol. [39]. Navíc pro zajištění řízení kvality výsledků stanovení celkové koncentrace Cr ve vzorcích byl na začátku, v průběhu (každý desátý vzorek) a na konci měření analyzován tzv. QC vzorek (o koncentraci $10 \mu\text{g l}^{-1}$). Výtěžnost naměřené koncentrace Cr v QC vzorku musela splňovat kritérium 80-120 %. Pro

účely kontroly stability plazmového výboje a eliminaci nespektrálních interferencí byl u obou metod nasáván do ICP-MS spektrometru roztok vnitřního standardu (^{45}Sc).

Tabulka X Validační parametry metody IP-RP-HPLC-ICP-MS.

Parametr	Akceptační kritérium	Postup
Linearita	Korelační koeficient $\geq 0,99$	Kalibrační křivka tvořená z 10 kalibračních standardů ($0,1-250 \mu\text{g l}^{-1}$)
LOD	-	Analýza 10 slepých pokusů
LOQ	-	Analýza 10 slepých pokusů
Pravdivost	Výtěžnost 70-150 %	Analýza CRM krve a séra/kloubního výpotku obohaceného o Cr(III) a Cr(VI) (n = 6)
Preciznost	RSD ≤ 20 %	Analýza CRM krve a séra/kloubního výpotku obohaceného o Cr(III) a Cr(VI) (n = 6)
Opakovatelnost retenčního času	-	Opakovaná analýza kalibračního standardu o stejné koncentraci
Paměťový („carry-over“) efekt	-	Analýza slepého pokusu po nejvyšším kalibračním standardu

RSD-relativní směrodatná odchylka

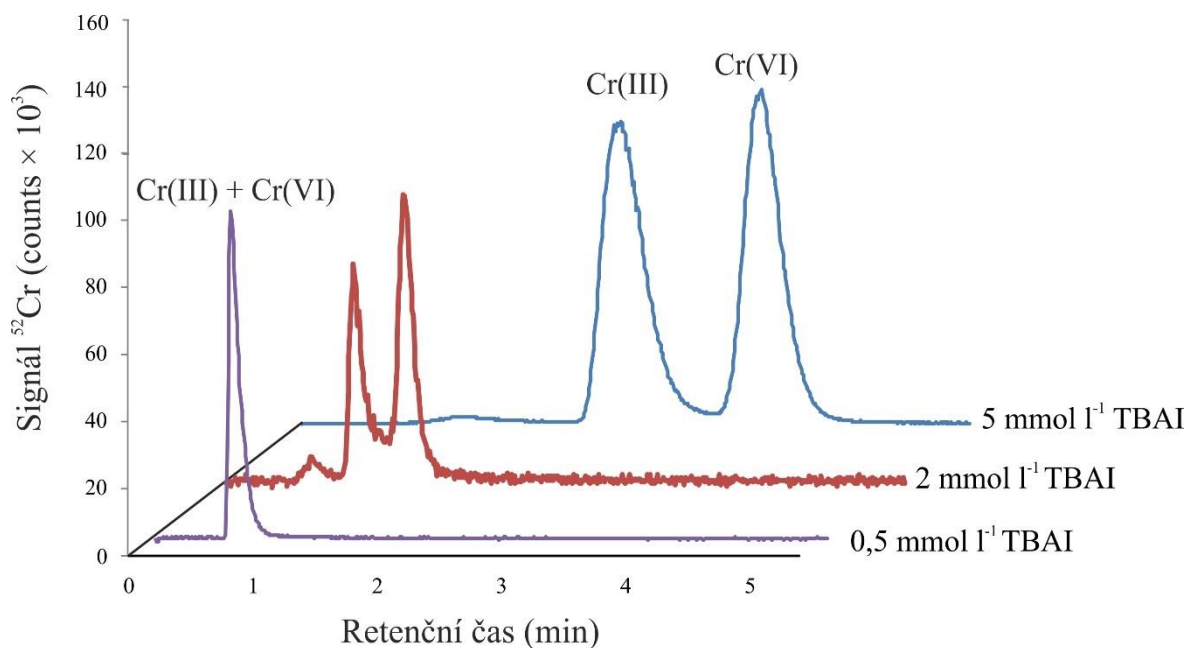
4.1.7 Statistická analýza

Výsledná data jsou vyjádřena jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD). Statistický program NCSS 2007 (NCSS, LLC, USA) byl použit k jednorozměrné analýze dat za využití neparametrického Mann-Whitney testu. Pro všechny statistické testy byla p-hodnota $\leq 0,05$ považována za statisticky významnou. Validační parametry LOD, LOQ byly vyhodnoceny pomocí matematického modelu „meze: 3s-IUPAC“ ve validovaném programu EffiValidation 3.0 (Effichem, s.r.o., Česká republika).

4.2 Výsledky a diskuze

4.2.1 Optimalizace separace pomocí IP-RP-HPLC

Cílem studie bylo vyvinout metodu pro kvalitativní i kvantitativní stanovení Cr(III) a Cr(VI) v reálných vzorcích krve a kloubního výpotku. Prvním krokem byla optimalizace chromatografické separace tak, aby bylo dosaženo úplného rozlišení (R) obou specií ($R \geq 1,5$). Důležitým parametrem HPLC je složení mobilní fáze, v tomto případě byla pro separaci Cr(III) a Cr(VI) zvolena mobilní fáze obsahující TBAI a EDTA. EDTA sloužila pouze ke komplexaci Cr(III), vlastní separaci obou specií neovlivňovala. Z tohoto důvodu byl během optimalizace testován pouze vliv koncentrace TBAI. Toto iont-párové činidlo hraje při separaci důležitou roli, protože tvoří neutrální (hydrofobní) komplexy s oběma speciemi. To zvyšuje jejich retenci na stacionární fázi a dochází k jejich vzájemné separaci. K experimentům byl použit vodný směsný standard Cr(III) a Cr(VI) o koncentraci 100 mg l^{-1} , k testování byly vybrány tři koncentrace TBAI: 0,5; 2 a 5 mmol l^{-1} , koncentrace EDTA zůstala konstantní ($0,6 \text{ mmol l}^{-1}$). Výsledky z experimentů ukazuje obrázek 8. Jak je vidět, úplné separace bylo dosaženo až při koncentraci 5 mmol l^{-1} , nižší koncentrace TBAI snižovaly retenci a tedy nedošlo k separaci Cr(III) a Cr(VI). Vyšší koncentrace testovány nebyly, protože bylo dosaženo dostatečného rozlišení ($R = 1,7$). Navíc by byl v takovém případě prodloužen čas analýzy, mohlo by se zvýšit pozadí chromu vlivem polyatomických interferencí způsobených vysokým obsahem uhlíku v mobilní fázi, případně by mohla vysoká koncentrace iont-párového činidla vést k depozitu sazí na kónusech a jejich ucpání.



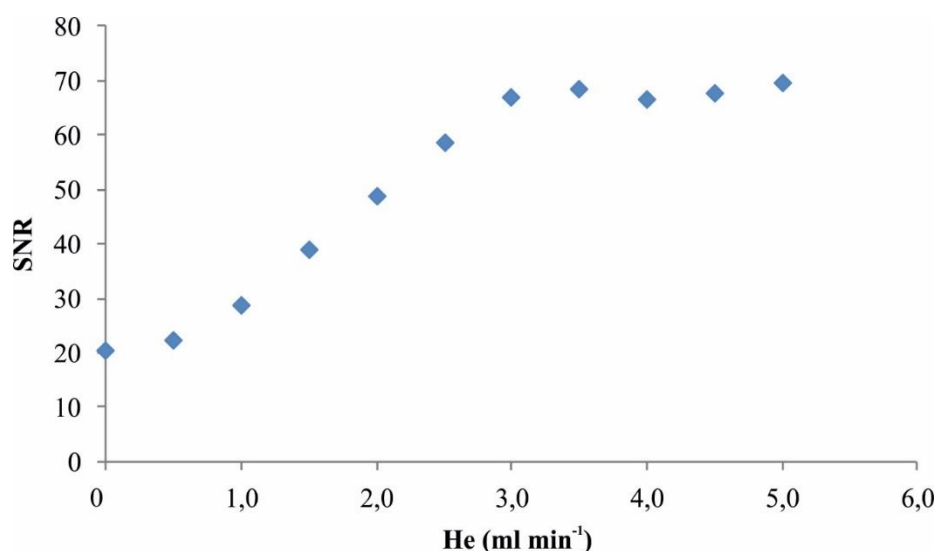
Parametr	0,5 mmol l ⁻¹		2,0 mmol l ⁻¹		5,0 mmol l ⁻¹	
	Cr(III)	Cr(VI)	Cr(III)	Cr(VI)	Cr(III)	Cr(VI)
Retenční čas (min)	0,7	0,7	1,1	1,7	2,7	3,8
Rozlišení	0		1,3		1,7	

Obrázek 8 Vliv koncentrace TBAI na retenční čas a chromatografické rozlišení Cr(III) a Cr(VI). Rozlišení bylo vypočítáno podle vztahu: $R = 2 (t_{Cr(VI)} - t_{Cr(III)}) / (w_{Cr(III)} + w_{Cr(VI)})$ kde $t_{Cr(III)}$ a $t_{Cr(VI)}$ jsou retenční časy Cr(III) a Cr(VI), $w_{Cr(III)}$ a $w_{Cr(VI)}$ odpovídající šířky píků při základní linii.

4.2.2 Optimalizace detekce pomocí ICP-MS a studium interferencí

Hlavním problémem speciální analýzy chromu v biologických vzorcích jsou stopové koncentrace specií ovlivněné přítomností polyatomických interferencí pocházejících z komplexní matrice vzorků či použité mobilní fáze. Pro jejich potlačení lze využít hmotnostních spektrometrů s vysokou rozlišovací schopností, kolizně/reakčních cel (čím je ale snížena citlivost ICP-MS detektoru) nebo studené plazma. Další možností je pak účinné odstranění interferencí pomocí optimalizace chromatografické separace tak, aby se retenční čas interferentů výrazně lišil od retenčních časů analytů. Z tohoto důvodu byla dalším krokem optimalizace nastavení ICP-MS, a to zejména průtoku He kolizní celou. Tento parametr má zásadní vliv na hodnotu pozadí chromu, a především poměru signálu k šumu (SNR). Pro experimenty byl opět zvolen vodný směsný standard Cr(III) a Cr(VI) o koncentraci 100 mg l⁻¹. Obohacené vzorky krve nebo kloubního výpotku i přes prokázanou přítomnost polyatomických interferencí pocházejících z vysokého obsahu uhlíku a chloru

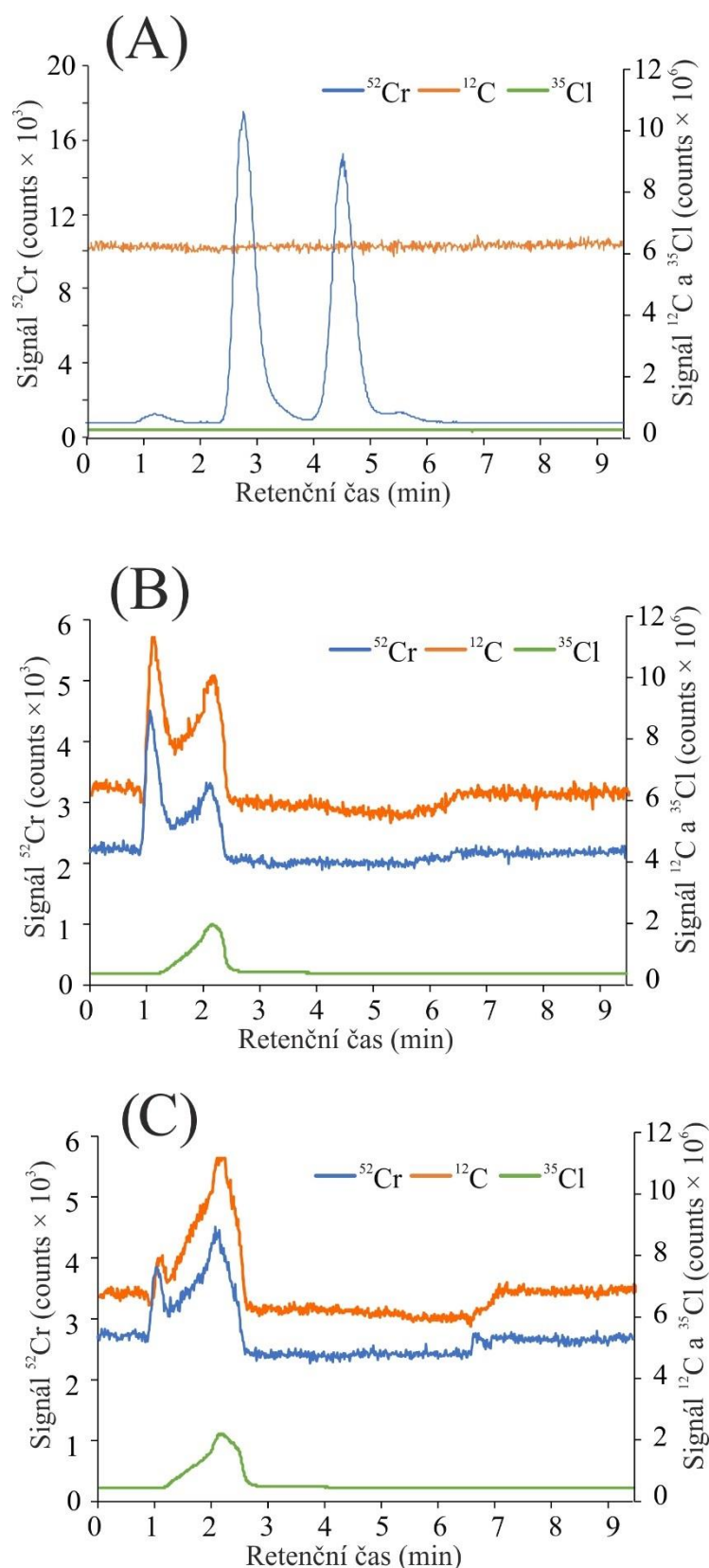
v matrici (viz následující odstavec) během této optimalizace analyzovány nebyly, a to hned z několika důvodů. Signály těchto interferencí byly úplně odseparovány od signálu Cr(III) i Cr(VI), tudíž nerušily stanovení obou specií. Dalším důvodem bylo navázání Cr(III) na proteinovou část vzorku, díky čemu pak nemohla být tato specie metodou IP-RP-HPLC-ICP-MS stanovena (detailně popsáno v kapitole 4.2.3). Aby bylo možné získat hodnotu SNR i pro Cr(III), bylo přínosnější k optimalizaci využít vodný standard. Během analýz byl monitorován signál všech tří izotopů chromu (^{50}Cr , ^{52}Cr , ^{53}Cr) v závislosti na nastavení různého průtoku He od 0,0 do 5 ml min^{-1} . Ze získaných výsledků vyplývá, že během postupného zvyšování průtoku He kolizní celou docházelo ke zvyšování hodnot SNR pro všechny izotopy chromu, od průtoku 3,5 ml min^{-1} se již tato hodnota neměnila (obr. 9). Pro všechny následující experimenty byl tudíž vybrán průtok 3,5 ml min^{-1} , kdy bylo dosaženo nejvyšších intenzit obou specií v porovnání se signálem pozadí.



Obrázek 9 Vliv průtoku He na hodnotu SNR $^{52}\text{Cr(III)}$ a $^{52}\text{Cr(VI)}$ (data pro ^{50}Cr a ^{53}Cr mající stejný trend nejsou zobrazena).

Následně byl studován také vliv případných polyatomických interferencí pocházejících z mobilní fáze nebo matrice vzorků na signály izotopů chromu. Je obecně známé, že biologické vzorky obsahují vysoký podíl uhlíku a chloru, tudíž se při použití ICP-MS lze setkat s polyatomickými interferencemi typu $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$, $^{35}\text{Cl}^{17}\text{O}^+$ a $^{35}\text{Cl}^{16}\text{OH}^+$ ovlivňující stanovení chromu na izotopu ^{52}Cr , případně $^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$, $^{37}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$ na izotopu ^{53}Cr .

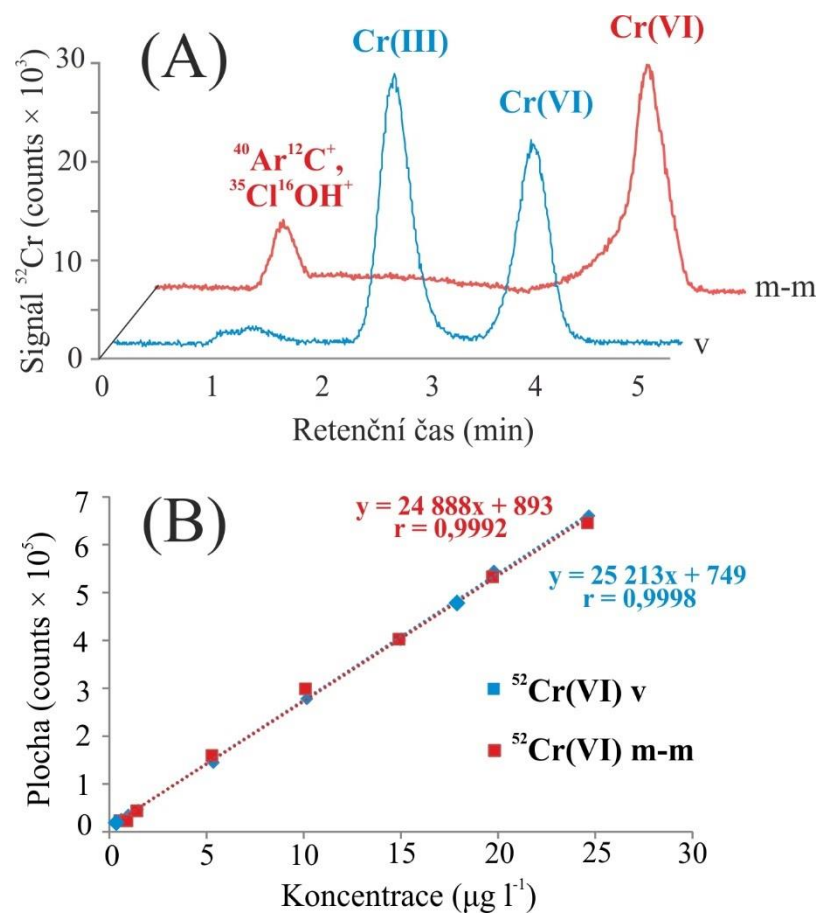
[86, 87]. Tyto adukty pak mohou ovlivňovat koncentrace celkového Cr i jeho specií. Jednou z možností, jak odhalit tyto interference, je současné monitorování izotopů způsobujících polyatomické interference společně s izotopy ^{50}Cr , ^{52}Cr a ^{53}Cr . K experimentům byl vybrán vodný směsný standard Cr(III) a Cr(VI) o koncentraci $10\ \mu\text{g l}^{-1}$ (obr. 10A), reálné vzorky krve (obr. 10B) a kloubního výpotku (obr. 10C). Během IP-RP-HPLC-ICP-MS analýz byly monitorovány izotopy chromu ^{50}Cr , ^{52}Cr , ^{53}Cr společně s ^{12}C , ^{13}C , ^{35}Cl a ^{37}Cl a to v No Gas i He módu (bez i s využitím kolizní cely). V porovnání s vodným standardem, byly během analýzy vzorků krve a kloubního výpotku pomocí obou módů pozorovány neznámé píky v retenčních časech okolo 1. min a 2. min. Retenční časy těchto píků se navíc shodovaly se signály ^{12}C , ^{13}C , ^{35}Cl i ^{37}Cl , kde měly ale mnohem vyšší intenzitu (10^5 - 10^6 countů). Na základě těchto výsledků byly tyto píky identifikovány jako polyatomické interference pocházející z vysokého obsahu uhlíku a chloru v matrici vzorků. Tento závěr byl navíc potvrzen porovnáním teoretických a experimentálně získaných izotopických poměrů ^{52}Cr a ^{53}Cr . Teoretická hodnota poměru $^{52}\text{Cr}/^{53}\text{Cr}$ vycházející z procentuálního zastoupení jednotlivých izotopů chromu (83,8 % ^{52}Cr a 9,5 % ^{53}Cr) je 8,77. Nicméně experimentálně získané hodnoty pro signály neznámých píků byly $5,97 \pm 0,34$ a $5,84 \pm 0,48$ v případě analýz vzorků krve ($n = 10$) a $7,21 \pm 0,32$ a $7,18 \pm 0,40$ pro analýzy kloubních výpotků ($n = 14$). Vzhledem k retenčním časům Cr(III) a Cr(VI) byly ale interferující píky od signálů obou specií chromu úplně odseparovány, a tak neovlivňovaly jejich stanovení. Další optimalizace, jako je například odstranění interferujících prvků z matrice, tudíž nebyla vyžadována.



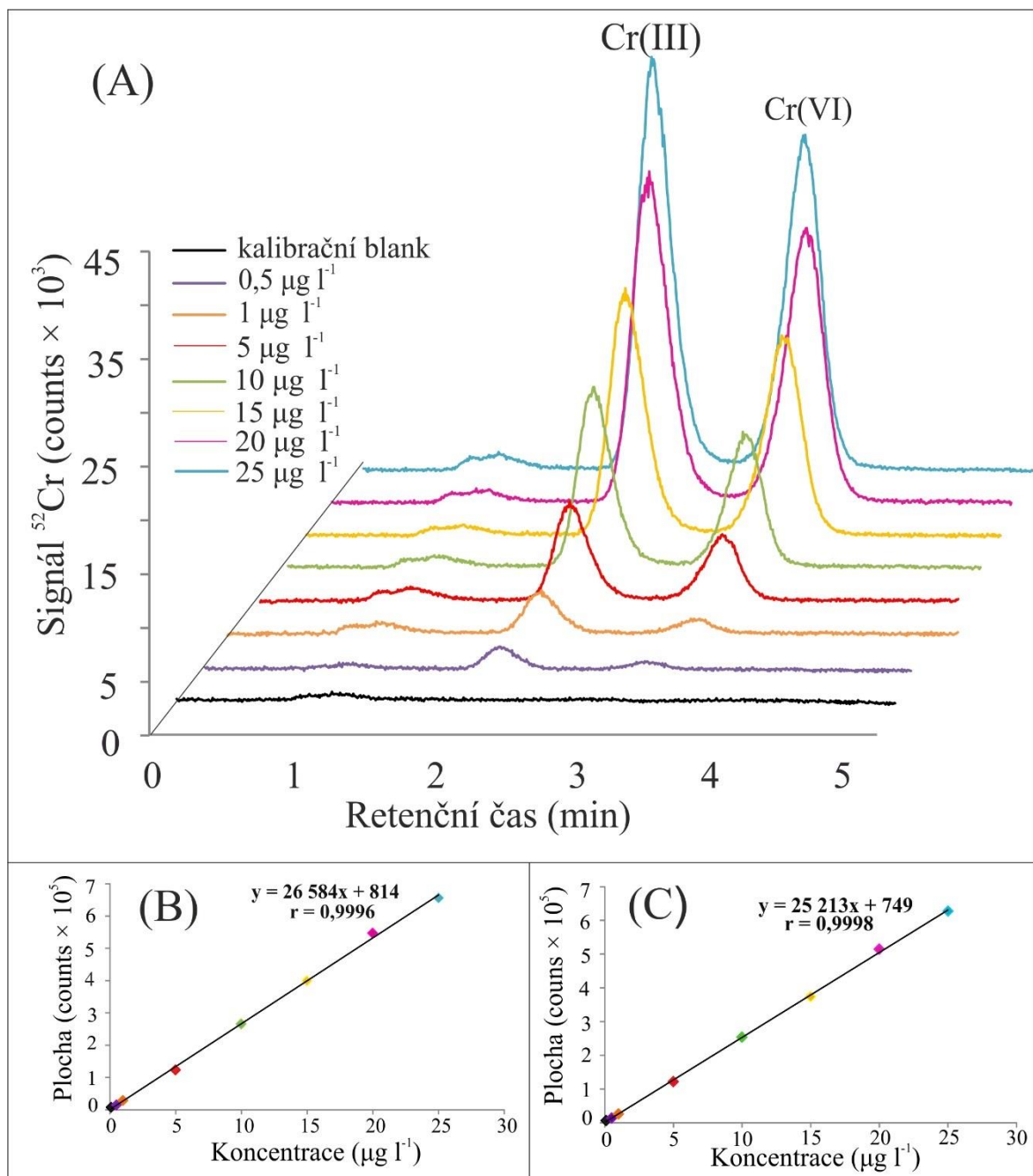
Obrázek 10 Polyatomické interference ovlivňující stanovení ^{52}Cr : chromatografické analýzy (A) vodného standardu o koncentraci $10 \mu\text{g l}^{-1}$, (B) vzorku krve a (C) kloubního výpotku měřené v He módu (signály ^{50}Cr a ^{53}Cr zatíženy stejnými interferencemi nejsou zobrazeny).

4.2.3 Validace IP-RP-HPLC-ICP-MS metody

Zoptimalizovaná IP-RP-HPLC-ICP-MS metoda byla následně validovaná v několika parametrech. Linearita Cr(III) i Cr(VI) byla ověřena analýzou 10 směsných kalibračních standardů v rozsahu 0,1-250 $\mu\text{g l}^{-1}$. Získané korelační koeficienty pro obě specie byly rovny 1,0000. Nicméně ke kvantitativní analýze reálných vzorků byla použita kalibrace s nižším rozsahem (0,1-25 $\mu\text{g l}^{-1}$), a to z důvodu nízké koncentrace analytů ve vzorcích. V tomto případě byly oba korelační koeficienty větší než 0,999 (Cr(III): $r = 0,9996$, Cr(VI): $r = 0,9998$). Vzhledem k tomu, že vzorky krve a kloubních výpotků obsahují komplexní matici, bylo žádoucí také otestovat vliv matrice na intenzitu a tvar signálů obou specií. Z tohoto důvodu byla analyzována i kalibrace s přizpůsobenou maticí obsahující kalibrační standardy připravené zředěním supernatantu kloubního výpotku mobilní fází s následným obohacením vodnými standardy Cr(III) a Cr(VI). Tyto vzorky byly získány od pacientů bez kloubních náhrad. Během tohoto experimentu bylo zjištěno, že Cr(III) se velmi ochotně váže na proteiny přítomné v maticí (tato specie zůstala navázaná na proteinové části a v supernatantu byl přítomen pouze Cr(VI), viz obr. 11A). Dalším rozdílem byl posun v retenčním čase Cr(VI) téměř o 1 min. Pomocí IP-RP-HPLC-ICP-MS tedy bylo možné kvantifikovat jen tuto specii. Na základě tohoto výsledku byla pro stanovení obou specií v reálných vzorcích vybrána kalibrace připravená z vodných standardů. Její vhodnost byla ještě navíc otestována pomocí Chowova testu shodnosti dvou lineárních modelů [89], kdy byla porovnána vodná kalibrace a kalibrace s přizpůsobenou maticí pro Cr(VI). Tento test prokázal shodnost směrnice i úseků kalibračních rovnic, a tak kromě vazby Cr(III) na proteiny byly oba kalibrační modely shodné (obr. 11B). Na obrázku 12 jsou zobrazeny chromatogramy vodných kalibračních standardů Cr(III) a Cr(VI) společně s kalibračními křivkami pro obě specie.



Obrázek 11 Porovnání vodné kalibrace a kalibrace s přizpůsobenou maticí (matrix-matched): (A) chromatogramy směšného standardu Cr(III) a Cr(VI) o koncentraci $10 \mu\text{g l}^{-1}$ připraveného ve vodě (v) a v kloubním výpotku (m-m), (B) odpovídající kalibrační křivky Cr(VI).



Obrázek 12 (A) Chromatogramy vodných kalibračních standardů o koncentraci 0,5-25 $\mu\text{g l}^{-1}$ a odpovídající kalibrační křivky pro (B) Cr(III) a (C) Cr(VI).

Hodnoty mezi detekce a stanovitelnosti byly počítány jako $\bar{x} + 3\text{SD}$ a $\bar{x} + 10\text{SD}$, kde \bar{x} je průměrná koncentrace získaná z analýz 10 slepých pokusů (mobilní fáze), SD pak směrodatná odchylka. LOD a LOQ pro vyvinutou IP-RP-HPLC-ICP-MS metodu byly 0,13 $\mu\text{g l}^{-1}$ a 0,17 $\mu\text{g l}^{-1}$ pro Cr(III) a 0,14 $\mu\text{g l}^{-1}$ a 0,19 $\mu\text{g l}^{-1}$ pro Cr(VI). Oba parametry byly až

100krát nižší, než bylo doposud publikováno v jiných studiích zabývajících se speciální analýzou chromu v krvi [33, 63-65].

Jak již bylo uvedeno v kapitole 2.5, hlavním problémem validace metod speciálních analýz jsou chybějící certifikované referenční materiály obsahující specie ve vhodné matici. Z tohoto důvodu byly pro stanovení pravdivosti a preciznosti vyvinuté metody využity vzorky séra a kloubního výpotku obohacené o $10 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III) i Cr(VI) společně s CRM SeronormTM Trace Elements Whole Blood L-3 obsahujícím pouze certifikovanou koncentraci celkového Cr. Obohacené vzorky krve a CRM byly připraveny v 6 replikách, obohacené vzorky kloubního výpotku ve 3 replikách (z důvodu malého množství vzorku). Každý vzorek byl analyzován třikrát pomocí IP-RP-HPLC-ICP-MS a šestkrát pomocí ICP-MS po předchozím mikrovlnném rozkladu. Suma obou specií pak byla porovnána s celkovým obsahem Cr ve vzorcích, v případě obohacených vzorků byly vyhodnoceny i výtěžnosti jednotlivých specií (výsledky jsou detailně shrnuty v tabulce XI). Relativní směrodatná odchylka (RSD) získaná ze tří IP-RP-HPLC-ICP-MS analýz a šesti ICP-MS analýz stejného vzorku (technický replikát) nebyla větší než 3 %. Průměrná výtěžnost Cr(III) a Cr(VI) obohacených vzorků (biologické replikáty) byla 86-104 %, preciznost stanovení vyjádřená pomocí relativní směrodatné odchylky se pohybovala v rozmezí 1-7 %. Průměrné hodnoty výtěžnosti celkového Cr vyjádřeného jako suma obou specií (v obohacených vzorcích i v CRM) se pohybovaly v rozmezí 87-108 % s RSD menší než 5 %. Tyto výsledky tedy potvrdily vhodnost vyvinuté metody pro analýzu vybraných biologických vzorků. Během těchto experimentů navíc nebyla pozorována žádná interkonverze mezi oběma speciemi (plocha Cr(VI) odpovídala přidané koncentraci a téměř všechny Cr(III) zůstal navázan na proteinové části). Metodou IP-RP-HPLC-ICP-MS byl opět stanoven hlavně Cr(VI), čímž byla potvrzena silná vazba Cr(III) na proteiny přítomné v matici.

Tabulka XI Naměřené koncentrace Cr(III), Cr(VI) a celkového vázaného Cr (Cr(III)) v obohacených vzorcích krve (n = 6), kloubního výpotku (n = 3), CRM Seronorm™ Whole Blood L-3 (n = 6) vyjádřené jako průměr ± SD a jejich odpovídající výtěžnosti.

Vzorek	IP-RP-HPLC-ICP-MS (supernatant)		ICP-MS	Výtěžnost (%)		
	Cr(III) (µg l ⁻¹)	Cr(VI) (µg l ⁻¹)	Celkový vázaný Cr (Cr(III) (pevný podíl) (µg l ⁻¹))	Cr(III)	Cr(VI)	Suma specií*
Obohacené sérum	0,4 ± 0,1	8,6 ± 0,2	8,2 ± 0,4	87	86	87
Obohacený kloubní výpotek	< LOD	10,4 ± 0,7	9,0 ± 0,5	90	104	97
CRM Seronorm™ Whole Blood L-3	0,3 ± 0,1	5,3 ± 2,8	19,5 ± 1,8	-	-	108

* suma specií z IP-RP-HPLC-ICP-MS analýzy a celkového vázaného Cr v pevném podílu

Opakovatelnost retenčního času byla stanovena na základě opakované analýzy kalibračního standardu o stejné koncentraci. Standard o koncentraci 10 µg l⁻¹ byl měřen postupně ve třech po sobě následujících nástřících. Následně byly srovnány retenční časy obou specií a vypočtena relativní směrodatná odchylka (RSD) v %. Získaná variabilita odpovídala 0,9 % pro Cr(III) a 0,7 % pro Cr(VI). Hodnota RSD by obecně neměla přesáhnou 10 % [118], obě specie tedy tuto podmínku splňovaly.

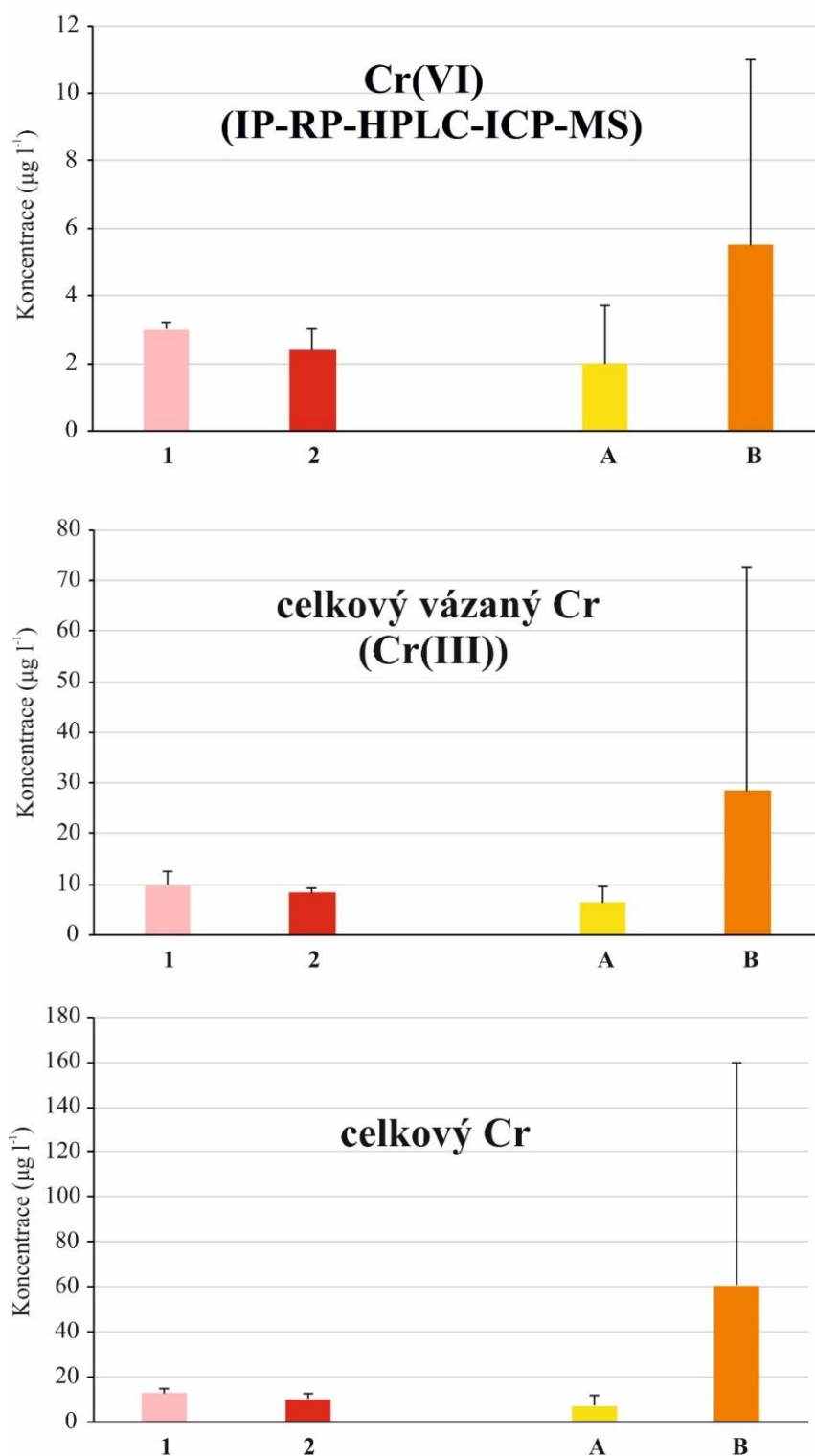
Posledním parametrem validace IP-RP-HPLC-ICP-MS metody byl paměťový efekt. Jedná se o studium přenosu analytů mezi nástřiky, který se obvykle zjišťuje analýzou slepého pokusu po nejvyšším kalibračním standardu. Koncentrace Cr(III) i Cr(VI) stanovená analýzou slepého pokusu po nástřiku směsného kalibračního standardu o koncentraci 250 µg l⁻¹ byla menší než získané LOQ pro obě specie, čímž byla vyloučena kontaminace analýz pocházející z nedostatečného vymývání vzorků z HPLC systému. Vyvinutá metoda tedy splňovala všechny vybrané validační parametry, čímž byla potvrzena její vhodnost pro daný účel.

4.2.4 Speciační analýza chromu v reálných vzorcích krve a kloubních výpotků

Validovaná IP-RP-HPLC-ICP-MS metoda byla následně použita pro stanovení Cr(III) a Cr(VI) ve vzorcích krve a kloubních výpotků odebraných od pacientů s kloubními náhradami, ICP-MS analýza pak sloužila k vyhodnocení hmotnostní bilance mezi Cr(III), Cr(VI), celkovým Cr vázaným na proteinovou část a celkovým Cr ve vzorcích. Získané výsledky jsou shrnuty na obrázku 13, detailně pak společně s nejdůležitějšími údaji o pacientech v tabulce XII (krev) a tabulce XIII (kloubní výpotek).

Ve vzorcích krve byl IP-RP-HPLC-ICP-MS analýzou nejčastěji stanoven pouze Cr(VI), jeho koncentrace se pohybovala v rozmezí 1,5-3,3 $\mu\text{g l}^{-1}$. Toto množství představovalo asi 20 % z celkového Cr ve vzorcích stanoveného pomocí ICP-MS. Stejně jako u analýz obohacených reálných vzorků nebo matricových kalibračních standardů nebyl volný Cr(III) detekován ani v jednom z vybraných vzorků. Naopak u jednoho vzorku krve (pacient P2) byla pomocí IP-RP-HPLC-ICP-MS nalezena ještě jedna specie v retenčním čase kolem 5,1 min. Poměr signálů $^{52}\text{Cr}/^{53}\text{Cr}$ tohoto píku přibližně odpovídal teoretické hodnotě 8,77 ($8,25 \pm 0,38$, $n = 3$) a současně se jeho retenční čas a tvar neshodoval se signály izotopů C a Cl (^{12}C , ^{13}C , ^{35}Cl a ^{37}Cl), tudíž se nejednalo o polyatomickou interferenci. Na základě těchto výsledků byl nakonec tento pík identifikován jako signál specie Cr navázané na ligandy nebo nízkomolekulární frakce přítomné v krvi [29, 33, 36, 38]. Chromatogram tohoto vzorku je společně s chromatogramy kalibračního blanku, kontrolního vzorku krve, vzorku séra obohaceného o 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III) a Cr(VI) zobrazen na obrázku 14. ICP-MS analýzou byl následně stanoven celkový Cr v supernatantu, pevném podílu i celých vzorcích krve. Analýzou supernatantu bylo stanoveno srovnatelné množství chromu jako metodou IP-RP-HPLC-ICP-MS. Nicméně největší podíl Cr ve vzorcích byl nalezen v pevném podílu/proteinové části, pravděpodobně ve formě Cr(III) vázané na proteiny [4]. Celkový obsah Cr byl ve vybraných vzorcích krve srovnatelný, jeho průměrná koncentrace odpovídala $8,3 \pm 1,0 \mu\text{g l}^{-1}$. Všechny výsledky byly následně statisticky porovnány s těmi, které byly získány analýzou kontrolních vzorků (vzorků od pacientů s kloubní náhradou neobsahující Cr). K porovnání výsledků byl využit neparametrický Mann-Whitney test, který prokázal, že mezi naměřenými obsahy specií i celkového Cr není statisticky významný rozdíl. Tento závěr potvrzuje hypotézu, že stanovení celkového chromu v krvi není vhodným markerem sloužícím pro kontrolu stavu kloubních implantátů v tělech pacientů [1].

Naopak výsledky získané analýzou kloubních výpotků byly významnější. Jako hlavní specie byl opět nalezen Cr(III) vázaný na proteinovou část, avšak jeho koncentrace byla mnohem vyšší (8,8-145 $\mu\text{g l}^{-1}$). Výrazně vyšší koncentrace byly nalezeny i u celkového Cr (9,3-295 $\mu\text{g l}^{-1}$) a Cr(VI) stanoveného pomocí IP-RP-HPLC-ICP-MS (1,1-19 $\mu\text{g l}^{-1}$). Volný Cr(III) v supernatantu nebyl pomocí IP-RP-HPLC-ICP-MS stanoven ani v jednom vzorku kloubního výpotku. Obrázek 15 ukazuje chromatogramy získané analýzou kloubních výpotků pacientů ve srovnání s chromatogramy vodného kalibračního standardu, matricového kalibračního standardu, kontrolního vzorku i obohaceného vzorku kloubního výpotku. Jak je vidět z tohoto porovnání, u této matrice byl pozorován významný posun retenčního času Cr(VI) ($0,86 \pm 0,06$ min) stejně jako u kalibrace s přizpůsobenou maticí nebo obohacených vzorků kloubního výpotku (viz předchozí kapitola). Identifikace této specie v kloubních výpotcích tedy byla provedena na základě porovnání retenčních časů vůči kalibraci s přizpůsobenou maticí. Stejně jako u krve byla i v této maticí u některých pacientů navíc pozorována neznámá specie (pacient P2, P7 a P9). Na základě porovnání se signály izotopů ^{12}C , ^{13}C , ^{35}Cl , ^{37}Cl a teoretickým poměrem $^{52}\text{Cr}/^{53}\text{Cr}$ byl pík v čase 5,3 min opět označen jako specie Cr navázaná na ligandy nebo nízkomolekulární frakce v maticí. Tito pacienti se od ostatních lišili vysokými koncentracemi všech forem Cr (Cr(VI), vázaný Cr(III) i celkový Cr), což mohlo mít vliv právě na přítomnost této specie ve vzorcích. Všechny naměřené koncentrace byly dále také srovnány s výsledky kontrolní skupiny, opět byl použit neparametrický Mann-Whitney test. V tomto případě ale byly potvrzeny statisticky vyšší koncentrace všech forem Cr ve skupině pacientů (obr. 13, tabulka XIII). Navíc na rozdíl od výsledků pro vzorky krve byl v kloubních výpotcích pozorován velký rozptyl v datech. Tento jev je typický pro biologické vzorky a je dán zejména unikátností každého vzorku, které se mohou lišit materiálem implantátu, dobou, po kterou byl implantát v těle pacienta, místem odebrání vzorku atd. [119]. V případě kloubních výpotků se některé vzorky navíc lišily i zabarvením (šedá barva) způsobeným přítomností kovových částic uvolněných z kloubních náhrad. Naměřené koncentrace celkového Cr v celých vzorcích krve a kloubních výpotků byly nakonec také srovnány se sumou specií z IP-RP-HPLC-ICP-MS analýzy (volný Cr(III) a Cr(VI)) a ICP-MS analýzy celkového vázaného Cr (vázaného Cr(III)) v pevném podílu. Hodnoty výtěžností se pohybovaly od 81 do 123 % (výsledky pro pacienta P2 nejsou zahrnuty). Relativní směrodatná odchylka vyjadřující preciznost stanovení pomocí obou metod byla v rozmezí 1-15 %. Použitý analytický postup kombinující validovanou IP-RP-HPLC-ICP-MS metodu s metodou využívající ICP-MS je tedy vhodný pro speciaci Cr v biologických vzorcích daného typu.



Obrázek 13 Sloupcové grafy porovnávající naměřené průměrné koncentrace Cr(VI) v supernatantu, celkového vázaného Cr (Cr(III)) v pevném podílu a celkového Cr ve vzorcích. Variabilita je zobrazena pomocí chybových úseček vyjadřujících SD (1 - kontrolní vzorky krve, 2 - vzorky krve od pacientů s náhradou ze slitiny Co-Cr-Mo, A - kontrolní kloubní výpotky, B - kloubní výpotky od pacientů s náhradou ze slitiny Co-Cr-Mo).

Tabulka XII Detailní shrnutí klinických údajů společně s naměřenými koncentracemi analytů v reálných vzorcích krve pacientů a kontrol (všechny výsledky jsou uvedeny jako průměr ± SD v $\mu\text{g l}^{-1}$, n = 6 (ICP-MS), n = 3 (IP-RP-HPLC-ICP-MS)).

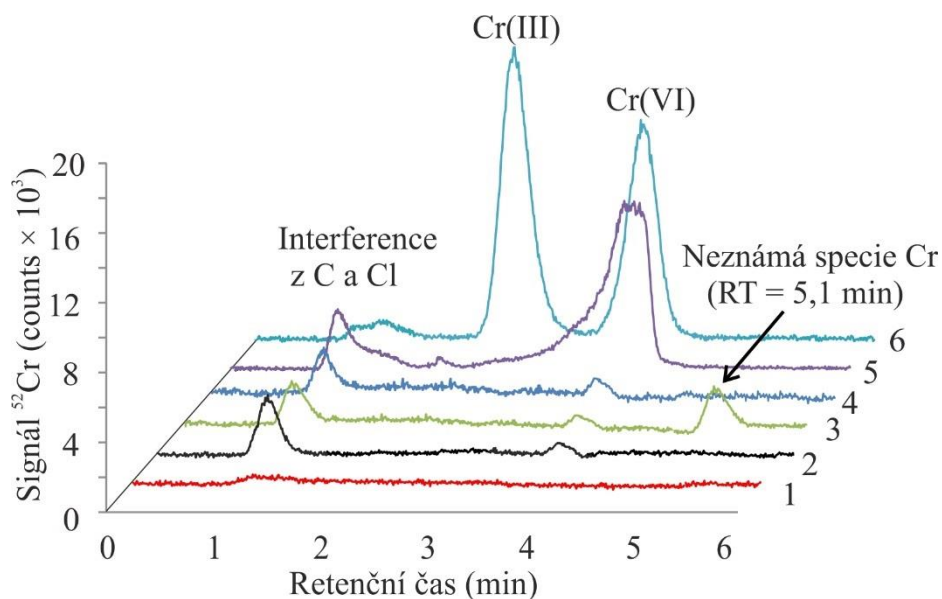
Číslo vzorku	Pohlaví	Věk	Body Mass Index	Materiál	Náhrada v těle (měsíce)	IP-RP-HPLC-ICP-MS		ICP-MS			Suma specií v supernatantu a celkového Cr v pevném podílu
						Cr(VI)	Neznámá specie	Celkový Cr v supernatantu	Celkový vázaný Cr v pevném podílu	Celkový Cr ve vzorku	
Pacienti											
P1	Ž	62	31,6	Ti-Al-V, Co-Cr-Mo	203	2,4 ± 0,02	n.d.	2,7 ± 0,1	9,5 ± 0,6	15 ± 0,4	12 ± 0,6
P2	Ž	85	25,7	Co-Cr-Mo	195	2,2 ± 0,04	3,20 ± 0,1	3,1 ± 0,2	8,0 ± 0,4	9,0 ± 0,5	13 ± 0,4
P3	Ž	85	25,0	Co-Cr-Mo	202	3,3 ± 0,04	n.d.	2,7 ± 0,2	7,3 ± 0,6	9,2 ± 0,4	11 ± 0,7
P4	Ž	75	25,4	Ti, Co-Cr-Mo	41	2,4 ± 0,01	n.d.	2,6 ± 0,2	7,3 ± 0,2	9,1 ± 0,8	9,7 ± 0,3
P5	M	69	25,2	Ti-Al-Nb, Co-Cr-Mo	176	1,5 ± 0,01	n.d.	0,80 ± 0,1	9,4 ± 0,4	9,4 ± 0,4	11 ± 0,5
Kontrolní skupina											
K1	Ž	62	25,7	Ti-Al-Nb	195	2,9 ± 0,2	n.d.	2,7 ± 0,1	13 ± 0,3	14 ± 0,9	16 ± 0,3
K2	Ž	67	25,6	Ti-Al-Nb	247	3,1 ± 0,2	n.d.	2,8 ± 0,4	8,7 ± 0,3	13 ± 0,6	12 ± 0,6
K3	M	49	28,4	Ti-Al-Nb	90	2,9 ± 0,3	n.d.	2,5 ± 0,4	13 ± 0,9	14 ± 0,7	15 ± 0,7
K4	M	74	30,3	Ti-Al-V	259	3,2 ± 0,2	n.d.	2,9 ± 0,3	8,3 ± 0,4	13 ± 0,3	12 ± 0,8
K5	Ž	56	27,8	Ti-Al-V	124	2,9 ± 0,1	n.d.	2,2 ± 0,2	6,4 ± 0,4	9,5 ± 0,9	9,3 ± 0,4

Ž - žena, M - muž, n.d. - nenalezen

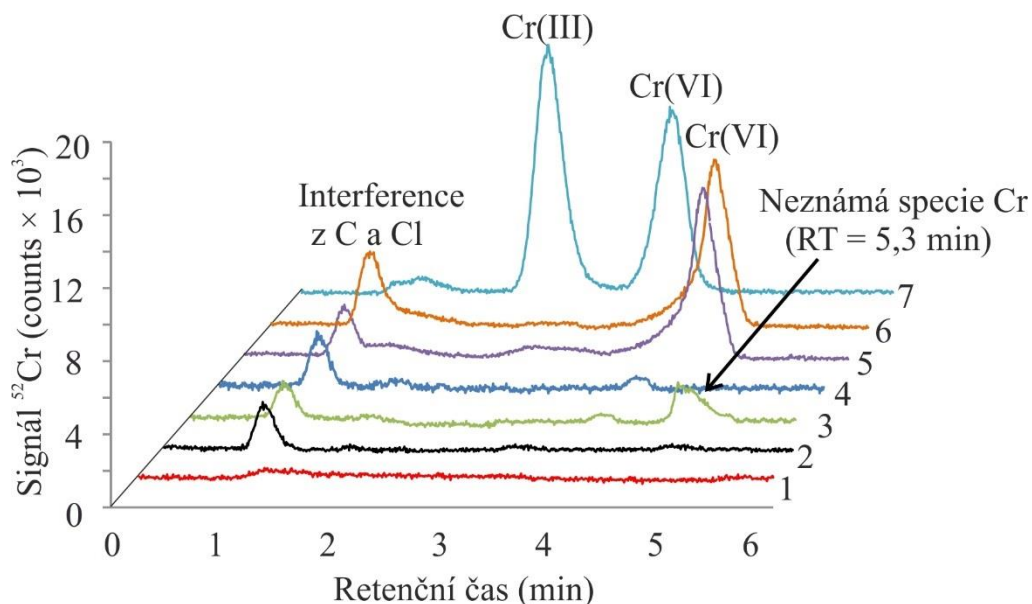
Tabulka XIII Detailní shrnutí klinických údajů společně s naměřenými koncentracemi analytů v reálných vzorcích kloubních výpotků a kontrolních vzorků (všechny výsledky jsou uvedeny jako průměr ± SD v $\mu\text{g l}^{-1}$, n = 6 (ICP-MS), n = 3 (IP-RP-HPLC-ICP-MS)).

Číslo vzorku	Pohlaví	Věk	Body Mass Index	Materiál	Náhrada v těle (měsíce)	IP-RP-HPLC-ICP-MS		ICP-MS			Suma specií v supernatantu a celkového Cr v pevném podílu
						Cr(VI)	Neznámá specie	Celkový Cr v supernatantu	Celkový vázaný Cr v pevném podílu	Celkový Cr ve vzorku	
Pacienti											
P1	Ž	62	31,6	Ti-Al-V, Co-Cr-Mo	203	1,8 ± 0,01	n.d.	1,6 ± 0,1	8,8 ± 0,2	9,3 ± 0,5	11 ± 0,2
P2	Ž	85	25,7	Co-Cr-Mo	195	19 ± 0,2	5,0 ± 0,1	19 ± 0,3	25 ± 1,3	295 ± 2,4	49 ± 1,3
P3	Ž	85	25,0	Co-Cr-Mo	202	4,0 ± 0,04	n.d.	4,4 ± 0,2	11 ± 0,3	16 ± 0,3	15 ± 0,3
P4	Ž	75	25,4	Ti, Co-Cr-Mo	41	1,1 ± 0,04	n.d.	1,2 ± 0,2	17 ± 0,3	15 ± 0,7	18 ± 0,3
P5	M	69	25,2	Ti-Al-Nb, Co-Cr-Mo	176	4,0 ± 0,02	n.d.	4,4 ± 0,5	12 ± 0,6	15 ± 0,9	16 ± 0,7
P6	Ž	66	24,2	Co-Cr-Mo	n.a.	2,9 ± 0,1	n.d.	2,2 ± 0,1	11 ± 0,3	12 ± 0,2	14 ± 0,3
P7	Ž	77	29,5	Ti, Co-Cr-Mo	67	8,9 ± 0,01	2,20 ± 0,08	9,9 ± 0,9	17 ± 0,6	25 ± 0,4	28 ± 1,2
P8	M	65	24,7	Co-Cr-Mo	23	3,1 ± 0,01	n.d.	2,7 ± 0,1	9,2 ± 0,2	10 ± 0,2	12 ± 0,2
P9	Ž	71	30,2	Co-Cr-Mo	117	5,1 ± 0,03	3,10 ± 0,06	4,6 ± 0,1	145 ± 2,1	151 ± 0,4	154 ± 1,8
Kontrolní skupina											
K1	Ž	62	25,7	Ti-Al-Nb	195	5,0 ± 0,4	n.d.	5,3 ± 0,1	12 ± 0,3	15 ± 0,9	17 ± 0,8
K2	Ž	67	25,6	Ti-Al-Nb	247	1,2 ± 0,2	n.d.	1,3 ± 0,2	5,7 ± 0,3	7,9 ± 0,9	7,0 ± 0,6
K3	M	49	28,4	Ti-Al-Nb	90	1,4 ± 0,2	n.d.	0,94 ± 0,13	4,5 ± 0,5	5,0 ± 0,8	6,0 ± 0,6
K4	M	74	30,3	Ti-Al-V	259	1,3 ± 0,2	n.d.	0,84 ± 0,13	4,9 ± 0,3	5,0 ± 0,8	6,3 ± 0,4
K5	Ž	56	27,8	Ti-Al-V	124	0,93 ± 0,05	n.d.	0,64 ± 0,09	4,2 ± 0,6	4,3 ± 0,5	5,1 ± 0,8

n.a. - informace není známá, Ž - žena, M - muž, n.d. - nenalezen



Obrázek 14 Speciační analýza chromu v krvi - srovnání chromatogramů pro Cr(III) a Cr(VI), 1 - kalibrační blank, 2 - kontrolní vzorek K3, 3 - pacient P2, 4 - pacient P1, 5 - sérum obohacené o $10 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III) a Cr(VI), 6 - vodný kalibrační standard Cr(III) a Cr(VI) o koncentraci $10 \mu\text{g l}^{-1}$.



Obrázek 15 Speciační analýza chromu v kloubním výpotku - srovnání chromatogramů pro Cr(III) a Cr(VI), 1 - kalibrační blank, 2 - kontrolní vzorek K2, 3 - pacient P2, 4 - pacient P7, 5 - kloubní výpotek obohacený o $10 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III) a Cr(VI), 6 - kalibrační standard s přizpůsobenou maticí Cr(III) a Cr(VI) o koncentraci $10 \mu\text{g l}^{-1}$, 7 - vodný kalibrační standard Cr(III) a Cr(VI) o koncentraci $10 \mu\text{g l}^{-1}$.

V porovnání s dostupnou literaturou zabývající se analýzou celkového chromu ve vzorcích krve byly koncentrace stanovené v této studii srovnatelné [19, 39]. Je ale důležité rozlišit celkový Cr v plné krvi, který může obsahovat Cr(III) i Cr(VI) a pak celkový Cr v séru/plasmě, kde se díky vysoké afinitě k proteinům vyskytuje převážně Cr(III). Tato afinita byla potvrzena i několika dalšími studiemi [2, 29, 33, 38]. Na základě získaných výsledků bylo dokázáno, že trojmocný chrom je hlavní specii uvolňovanou jak do krve, tak i kloubního výpotku. Stejného závěru dosáhl i Finley a kol. stanovující specie chromu v krvi pacientů s kloubními náhradami [33]. Pokud byl ve vzorcích nalezen i Cr(VI), tak pouze ve volné formě v červených krvinkách a ve stopových koncentracích. Díky tomu, že se neváže na proteiny, tak je jeho přítomnost v séru/plazmě téměř nemožná. Podobného závěru bylo dosaženo i v této studii, avšak Cr(VI) byl stanoven i v nízkomolekulární frakci po zcentrifugování s filtry. Naopak Ordonez a kol. popsali majoritní uvolňování Cr(VI) z kloubních náhrad do krve [38]. Jejich metoda využívala filtraci séra a stanovení Cr(III) a Cr(VI) pomocí IE-HPLC s UV-VIS detekcí. Díky přípravě vzorku a zejména vysokému pozadí Cr ale nemohl být Cr(III) tvořící komplex s proteiny detekován. Na základě toho pak zřejmě mylně označili Cr(VI) jako hlavní specii uvolňovanou z náhrad.

Bohužel není možné porovnat výsledky ze speciální analýzy kloubních výpotků, protože doposud není známá obdobná studie, která by se tímto tématem zabývala. Alternativou by mohlo být porovnání celkového obsahu Cr v kloubních výpotcích s prací Kuby a kol. [39], který studoval uvolňování kovů z kloubních náhrad do různých biologických matric. Nicméně vzhledem k velkému rozptylu výsledků a unikátnosti těchto vzorků by takové srovnání bylo problematické, protože jednotliví pacienti se významně lišili klinickými parametry jako je doba implantátu v těle, materiál implantátu, počet nebo důvod revizí, hodnota body mass indexu, počet implantátů ze slitiny Co-Cr-Mo v těle atd.

Závěrem lze tedy říci, že Cr se z kloubních náhrad uvolňuje do krve a kloubních výpotků zejména v podobě Cr(III), následně se pak ochotně váže na přítomné proteiny. Naopak uvolňování Cr(VI) je zanedbatelné. Jelikož se všechny biologické vzorky vyznačují silným redukčním prostředím, je jakékoliv množství potenciálně uvolněného Cr(VI) pravděpodobně okamžitě redukováno na Cr(III). Z tohoto důvodu se v mnoha případech tuto specii nepodařilo detekovat, případně byla nalezena pouze ve stopových koncentracích, jako tomu bylo i v této studii. Výjimku ale mohou představovat vzorky od pacientů s cukrovkou druhého typu užívajících doplňky stravy s Cr(III) [2, 25]. Vyšší obsah Cr(III) v těle totiž může následně iniciovat zpětnou oxidaci Cr(III) na Cr(VI), který se pak nachází v biologických vzorcích. Na základě dostupných informací o pacientech vybraných pro tuto

studii bylo zjištěno, že všichni pacienti, kteří vykazovali zvýšené koncentrace Cr(VI) tímto onemocněním trpěli, čímž byla tato hypotéza potvrzena. Nutné je ale také brát v potaz možnost existence záporně nabitých Cr(III) komplexů s organickými ligandy, které rovněž mohou tvořit komplex s TBAI, jehož retenční čas by mohl být blízko retenčního času Cr(VI) [120]. Vlivem přítomnosti různých oxidačních/redukčních látek v biologických vzorcích může tedy snadno docházet k interkonverzi a tvorbě dalších forem Cr [28, 48, 113]. Spojení IP-RP-HPLC-ICP-MS využívající tvorby iontových párů by v takovém případě nebylo pro speciaci chromu nejlepší volbou. Jako vhodnější alternativa se jeví aplikace iontově výměnné HPLC nevyžadující komplexaci obou specií. V kombinaci s využitím izotopicky obohacených standardů by navíc mohla být odhalena i případné interkonverze Cr(III) a Cr(VI) během celé speciační analýzy.

4.3 Závěr

Do této doby byla on-line speciační analýza chromu aplikována zejména na vzorky životního prostředí, případně potravin. Tyto vzorky jsou ve srovnání s biologickými vzorky považovány za méně komplexní, a tak se autoři většinou neseškávali s velkými potížemi při vývoji, optimalizaci analytických metod, ale i interpretaci získaných výsledků. Nicméně v případě biologických vzorků je situace opačná. Tyto vzorky obsahují širokou škálu chemických sloučenin, které mohou značně komplikovat vlastní speciační analýzu a negativně ovlivnit spolehlivost získaných výsledků. Tato inovativní studie jako první popisuje aplikaci on-line spojení IP-RP-HPLC-ICP-MS na speciační analýzu chromu v krvi, současně se dokonce jedná o první studii zabývající se speciační analýzou chromu v kloubních výpotcích. Podařilo se vyvinout efektivní a spolehlivý analytický postup pro stanovení volného Cr(III), vázaného Cr(III), celkového Cr(VI) i celkového Cr ve vzorcích krve a kloubních výpotků. On-line IP-RP-HPLC-ICP-MS metoda sloužící pro identifikaci a kvantitativní stanovení volných specií byla navíc validována v několika parametrech.

Na základě získaných výsledků lze za hlavní specii uvolňovanou z kloubních náhrad do krve i kloubních výpotků označit Cr(III), která se ihned váže do komplexu s přítomnými proteiny. Tento závěr je v souladu s dalšími studii zabývajícími se touto problematikou. Vzhledem k této silné vazbě mohl být vyvinutou IP-RP-HPLC-ICP-MS metodou v reálných vzorcích stanoven pouze Cr(VI), jeho koncentrace ale byly v obou maticích velmi nízké (kolem 20 % celkového Cr). Výsledky speciační analýzy se shodovaly s výsledky celkového Cr ve všech vzorcích. ICP-MS analýza je tedy vhodný nástroj pro stanovení hmotnostní

bilance mezi analyzovanými formami Cr a jeho celkovým obsahem ve vzorcích. V porovnání s kontrolní skupinou bylo pro kloubní výpotky pacientů s náhradou ze slitiny Co-Cr-Mo dosaženo statisticky významně vyšší koncentrace všech forem chromu. Uvolňování specií Cr z kloubních náhrad do krve je tedy zanedbatelné a stanovení celkového Cr v krvi se nejeví jako vhodný marker kontroly stavu implantátů v tělech pacientů. Vyvinutá metoda kombinující speciální analýzu Cr(III) a Cr(VI) pomocí IP-RP-HPLC-ICP-MS a ICP-MS analýzu pro stanovení celkového obsahu Cr se jeví jako vhodný nástroj pro detailní studium uvolňování Cr a jeho specií z kloubních náhrad do tělních tekutin pacientů a s ním spojený monitoring intoxikace Cr(VI).

5. SPECIAČNÍ ANALÝZA CHROMU V BIOLOGICKÝCH TKÁNÍCH

Biologické tkáně se obvykle vyznačují komplexní maticí obsahující mnoho složek různého charakteru, což výrazně komplikuje jejich zpracování a úpravu vzorku pro speciační analýzu. Z tohoto důvodu byly doposud tkáně analyzovány především solid-state speciačními technikami. Díky minimálním nárokům na přípravu vzorků jsou to relativně rychlé techniky, značnou nevýhodou jsou ale vysoké meze detekce. U analýzy specií chromu v reálných vzorcích to může představovat zásadní problém. Díky stopovým koncentracím analytů často není možné jejich signál odlišit od signálu pozadí. Další komplikaci představují samotné signály specií, které jsou většinou velmi podobné, a tak je jejich identifikace založena na aplikaci různých algoritmů. V současné době je hodně diskutované téma uvolňování specií chromu (zejména Cr(0), Cr(III), Cr(VI)) z kloubních náhrad do blízkých tkání a dále do celého těla. V této souvislosti bylo publikováno několik studií zabývajících se analýzou periprostetických tkání, tkání srdce, jater, sleziny odebraných pacientům se selhávající kloubní náhradou za využití XAS, XRF, XPS nebo XANES [20-24]. Vzhledem k výše popsanému problému s vysokými mezemi detekce by ale bylo vhodnější aplikovat techniky speciační analýzy odhalující i specie stopových koncentrací. Cílem další části disertační práce tak bylo vyvinout on-line HPLC-ICP-MS metodu vhodnou pro analýzu Cr(III) a Cr(VI) v biologických tkáních. Na základě výsledků z předchozí studie byl vybrán mód iontově výměnné chromatografie. Významnou součástí byla i validace vyvinuté metody a statistické vyhodnocení získaných výsledků. Značná pozornost byla věnována i studiu polyatomických interferencí a zejména interkonverze obou specií za využití izotopicky obohacených standardů.

5.1 Experimentální část

5.1.1 Chemikálie

K přípravě všech vzorků a standardů byly použity výhradně chemikálie o vysoké čistotě. Roztoky byly připraveny pomocí deionizované vody (měrný odpor 18,2 M Ω .cm) získané z dvoustupňové deionizační stanice Milli-Q water systému (Millipore, Francie). Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA), dusičnan amonný (NH₄NO₃), chroman

draselný (K_2CrO_4 , $\geq 99,5\%$) a chlorid chromitý ($\text{CrCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, $\geq 98\%$) pocházely od Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Izotopicky obohacené standardy $^{53}\text{Cr(III)}$ (v 2% HNO_3 ; $10,04 \pm 0,4 \mu\text{g g}^{-1}$) a $^{50}\text{Cr(VI)}$ (ve vodě; $10,20 \pm 0,2 \mu\text{g g}^{-1}$) byly zakoupeny u ISC-Science (Oviedo, Španělsko), zatímco Certipur[®] Chromium ICP Standard ($\text{Cr(NO}_3)_3$, $1\,000 \text{ mg l}^{-1}$, $985 \pm 5 \text{ mg kg}^{-1}$) pocházel od firmy Merck KGaA (Darmstadt, Německo). Víceprvkový kalibrační roztok obsahující Sc, Y, In, Tb, Bi ($10 \pm 0,1 \text{ mg l}^{-1}$), kyselina dusičná (69%, Analpure) a hydroxid amonný (28%, Analpure) byly zakoupeny od firmy Analytika, spol. s. r. o. (Praha, Česká republika).

Octan amonný (NH_4Ac), fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) a dimetyl sulfoxid ($\geq 99,9\%$, Bioreagents) byly získány od Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA). Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), glycin, peroxodisíran amonný, N, N, N', N'-tetramethylethylenediamin (TEMED), akrylamid, bisakrylamid, glycerol, 2-merkptoethanol, kyselina octová ($\geq 99\%$), tetramethylamonium hydroxid (TMAH), albumin (z hovězího séra, $M_w = 67 \text{ kDa}$) a trypsin inhibitor (ze sóji, $M_w = 20 \text{ kDa}$) byly zakoupeny u Sigma Aldrich Chemie (Steinheim, Německo). Barvivo Coomassie[®] Brilliant Blue R-250 bylo získáno od firmy Serva (Heidelberg, Německo) a bromfenolová modř od firmy Lachema (Brno, Česká republika). Methanol ($\geq 99,9\%$, LC-MS ChromasolvTM) pocházel od Honeywell Chemicals (Sleeze, Německo).

Laboratorní nádobí ze skla nebo plastu bylo před každým použitím upraveno pro stopovou analýzu (naloženo přes noc do 10% roztoku HNO_3 , několikrát opláchnuto deionizovanou vodou a vysušeno v sušárně).

5.1.2 Vzorky a certifikované referenční materiály

Vzorky periprostetických tkání byly získány od pacientů s totální endoprotézou kyčelního nebo kolenního kloubu. Všichni pacienti měli náhradu typu MoP, přičemž bylo odebráno 20 vzorků tkání od 13 pacientů s kloubní náhradou ze slitiny Co-Cr-Mo a 10 tkání od 10 pacientů, kteří v místě odběru měli náhradu z jiné slitiny (nejčastěji Ti-Al-V). Těchto 10 vzorků sloužilo jako kontrolní skupina. Všechny vzorky byly odebírány nerezovými chirurgickými nástroji během reoperací probíhajících na Ortopedické klinice Fakultní nemocnice Olomouc a uchovávány ve sterilních plastových nádobách při teplotě $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Klinické údaje o pacientech jsou shrnuty v tabulce XIV.

Odběr probíhal z oblasti kloubního pouzdra v několika vrstvách. Vrstva 1 tvořící synoviální membránu byla v nejbližším kontaktu s náhradou a případnými uvolňovanými

částicemi. Následně byly odebrány i další vrstvy tkání ze vzdálenějších vrstev (vrstva 2 a 3). Tloušťka odebraných tkání se pohybovala v rozmezí od 2 do 10 mm. Pacientům kontrolní skupiny byly odebrány pouze tkáně vrstvy 1, naopak od několika pacientů s náhradou ze slitiny Co-Cr-Mo (n = 6) byly z důvodu studia uvolňování specií chromu získány tkáně různých vrstev.

Pro přípravu reálných vzorků obohacených o $^{53}\text{Cr(III)}$ a $^{50}\text{Cr(VI)}$ bylo dále v experimentech využito kuřecí maso zakoupené v místním supermarketu (Olomouc, Česká republika). Vzhledem k nedostupnosti vhodného matricového certifikovaného referenčního materiálu byly obě metody ověřeny na analýze dvou CRM biologických tkání (LUTS-1, TORT-2). Oba materiály obsahovaly hepatopankreas humra s certifikovanou hodnotou celkového chromu (LUTS-1: $0,53 \pm 0,08 \mu\text{g g}^{-1}$ (průměr \pm rozšířená nejistota) a TORT-2: $0,77 \pm 0,15 \mu\text{g g}^{-1}$ (průměr \pm rozšířená nejistota)), zakoupeny byly u NRC-CNRC (Kanada).

Tabulka XIV Klinické údaje o pacientech.

Parametr	Pacienti (n = 13)	Kontrolní skupina (n = 10)
Věk	$\bar{x} = 69,6$ (53-85)	$\bar{x} = 62,9$ (49-74)
Pohlaví	Muži 6 Ženy 7	Muži 4 Ženy 6
Typ kloubu	Kyčel 8 Koleno 5	Kyčel 10 Koleno 0
Doba implantátu v těle (měsíce)	$\bar{x} = 160,8$ (24-219)	-
Výška (cm)	$\bar{x} = 165,2$ (145-185)	$\bar{x} = 162,7$ (145-178)
Váha (kg)	$\bar{x} = 78,4$ (54-112)	$\bar{x} = 77,8$ (57-97)
Body Mass Index (BMI)	$\bar{x} = 28,5$ (21,5-38,2)	$\bar{x} = 29,3$ (24,8-36,9)
Diagnóza	Primární OA 12 Sekundární OA 1	-
Počet revizí	1 (n = 7) 2 (n = 5) 3 (n = 1)	-
Důvod revize	ALS 5, INF 2, INS 1, OL 4, PJ 1	-
Počet implantátů ze slitiny Cr v těle	1 (n = 8) 2 (n = 5)	0 (n = 5) 1 (n = 5)

OA - osteoartróza, ALS - aseptické uvolnění implantátu, INF - infekce, INS - nestabilita, OL - osteolýza, PJ - bolest kloubu

5.1.3 Instrumentace

K lyofilizaci vzorků tkání byl použit ALPHA 1-2 LD plus lyofilizátor (CHRIST, Německo). Keramický mlýnek na kávu mini mill (HARIO, Japonsko) a achátová třecí miska sloužily pro rozemletí a homogenizaci vysušených tkání. K přípravě vzorků pro speciální analýzu byl použit BenchMixer vortex mixér (Benchmark Scientific Inc., USA), Sigma Sartorius 6-16K centrifuga (Sigma, Německo) a Memmert EFE 400 sušárna (Memmert, Německo). Rozklad všech vzorků probíhal pomocí mikrovlnného rozkladného systému UltraWAVE (Milestone, Itálie). Celkový chrom ve vzorcích byl opět stanoven pomocí ICP-MS Agilent 7700x (Agilent Technologies, Japonsko) vybaveným autosamplrem (ASX-520), mikrokoncentrickým zmlžovačem, chlazenou mlžnou komorou dle Scotta a oktapólovou kolizně/reakční celou. Stejný přístroj byl použit také pro speciální analýzu ve spojení s HPLC systémem Agilent 1200 (Agilent Technologies, Německo) vybaveným kvartérní pumpou, 1260 BIO-inertním dávkovací ventil s 20 µl dávkovací smyčkou. Spojovací materiál (kapiláry, ferule, fitinky), dávkovací smyčka i kolona byly vyrobeny z PEEKu kvůli snížení pozadí signálu pro chrom. K separaci Cr(III) a Cr(VI) byl vybrán mód iontově-výměnné vysokoúčinné kapalinové chromatografie (IE-HPLC) s kolonou PRP-X100 PEEK (150 × 2,1 mm, stacionární fáze – silný anex, 5 µm, Hamilton, USA). Podmínky IE-HPLC-ICP-MS a roztokové ICP-MS analýzy jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka XV Parametry IE-HPLC-ICP-MS a ICP-MS.

Parametr	IE-HPLC-ICP-MS	ICP-MS
Mobilní fáze	30 mmol l ⁻¹ NH ₄ NO ₃ , pH 6	-
Průtok mobilní fáze (ml min ⁻¹)	0,45	-
Akviziční mód	TRA	Spectrum
Příkon generátoru (W)	1 550	1 550
Vnější plazmový plyn (l min ⁻¹)	15,0	15,0
Střední plazmový plyn (l min ⁻¹)	0,9	0,9
Pomocný plazmový plyn (l min ⁻¹)	1,07	1,07
Kolizní plyn He (ml min ⁻¹)	3,5	4,3
Monitorované izotopy	¹² C*, ¹³ C*, ³⁵ Cl*, ³⁷ Cl*, ⁵⁰ Cr, ⁵² Cr, ⁵³ Cr, ⁴⁵ Sc#	⁵⁰ Cr, ⁵² Cr, ⁵³ Cr, ⁴⁵ Sc#
Integrační čas (ms)	100	100

TRA-time resolved analysis

* izotopy monitorované při studiu polyatomických interferencí

vnitřní standard

Cr navázaný na proteiny byl stanoven pomocí modré nativní polyakrylamidové elektroforézy (BN-PAGE) vybavené Mini-Protean[®] 3 Cell a připojené ke zdroji napětí PowerPac[™] basic (Bio-Rad, Philadelphia, USA).

5.1.4 Příprava roztoků

Extrakční činidlo pro extrakci volného/rozpuštěného Cr(III) a celkového Cr(VI) bylo připraveno rozpuštěním EDTA v deionizované vodě tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 10 mmol l⁻¹. Hodnota pH byla následně upravena pomocí zředěného roztoku NH₄OH (1:3) na 10,5. Mobilní fáze byla připravena rozpuštěním NH₄NO₃ v deionizované vodě (c = 30 mmol l⁻¹), pH bylo opět upraveno pomocí zředěného roztoku NH₄OH (1:3) na hodnotu 6. 20% (w/w) roztok TMAH pro extrakci volných/rozpuštěných specií byl připraven rozpuštěním TMAH v deionizované vodě. Pro extrakci proteinů s navázaným Cr bylo připraveno extrakční činidlo obsahující 50 mmol l⁻¹ octanu amonného v deionizované vodě. Následně bylo pH celého roztoku upraveno na hodnotu 7,3 pomocí zředěného roztoku NH₄OH (1:3). Roztok 100 μmol l⁻¹ PMSF byl připraven postupným ředěním deionizovanou vodou ze zásobního roztoku o koncentraci 100 mmol l⁻¹, který byl připraven rozpuštěním odpovídajícího množství PMSF v dimethyl sulfoxidu. Maximální ředění v jednom kroku bylo 100krát.

Zásobní standardní roztoky ⁵²Cr(III) a ⁵²Cr(VI) o hmotnostní koncentraci 1 000 mg l⁻¹ byly připraveny stejným způsobem, jak je uvedeno v kap. 4.1.4. Standardní roztoky ⁵³Cr(III) byly připraveny z izotopicky obohaceného standardu ⁵³Cr(III) ve 2% HNO₃. Vzhledem ke snadné interkonverzi Cr(VI) při nízkém pH musel být tento standard nejdříve odfoukán pod proudem dusíku dosucha a následně rekonstituován v deionizované vodě. Bez této úpravy by došlo ve směsných standardních roztocích k redukci Cr(VI) na Cr(III). Izotopicky obohacený standard ⁵⁰Cr(VI) nebylo nutné upravovat. Všechny zásobní standardní roztoky byly následně zředěny na požadované koncentrace směsí extrakčního činidla (10 mmol l⁻¹ EDTA v deionizované vodě, pH 10,5) a 1 mol l⁻¹ NH₄NO₃, aby bylo dosaženo stejného složení jako při přípravě reálných vzorků. Před speciační analýzou byly kalibrační roztoky inkubovány v sušárně při teplotě 70 °C po dobu 90 minut, aby se zvýšila rychlost tvorby komplexu [Cr(III)-EDTA]⁻. Standardní roztoky všech izotopů chromu (⁵⁰Cr, ⁵²Cr, ⁵³Cr) pro stanovení jejich celkového obsahu pomocí ICP-MS byly připraveny zředěním zásobních standardních roztoků (Certipur[®] Chromium ICP Standard (Cr(NO₃)₃), izotopicky obohacené standardy ⁵³Cr(III) a ⁵⁰Cr(VI)) deionizovanou vodou a okyselením pomocí koncentrované

HNO₃ kvůli stabilizaci. Jako vnitřní standard pro stanovení specií Cr(III), Cr(VI) i celkového obsahu ⁵⁰Cr, ⁵²Cr, ⁵³Cr byl zvolen izotop ⁴⁵Sc. Roztok vnitřního standardu byl připraven 100násobným zředěním víceprvkového kalibračního roztoku obsahujícího Sc, Y, In, Tb, Bi (10 ± 0,1 mg l⁻¹).

Elektrodotový pufr (pH 8,3) pro separaci proteinů pomocí BN-PAGE byl připraven rozpuštěním 14,4 g glycinu a 3 g Tris v 1 l deionizované vody. Vzorový pufr obsahoval 1 mol l⁻¹ Tris pH 6,8; 20% (v/v) glycerol a 0,01% (w/v) bromfenolovou modř. Separační gel (12 %) byl připraven smícháním 30% roztoku akrylamidu/bisakrylamidu (6 ml), Tris (1,5 mol l⁻¹ pH 8,8; 3,8 ml), deionizované vody (4,9 ml), TEMED (6 µl) a peroxodisíranu amonného (10 %, 0,15 ml). Směs se rychle zamíchala a následně nalila mezi spodní a krycí sklo. Po dobu polymerizace bylo nutné gel převrstvit methanolem, který zabraňuje přístupu vzduchu a vysušení gelu. Poté se methanol odstranil a na separační gel se nalil zaostřovací gel (5 %) připravený smícháním 1,3 ml 30% roztoku akrylamidu/bisakrylamidu; 0,63 ml 1 mol l⁻¹ Tris pH 6,8; 3,4 ml deionizované vody; 5 µL TEMED a 50 µl 10% peroxodisíranu amonného. Následně se mezi skla vložil hřeben. Po polymerizaci byl gel přemístěn do nádoby s elektrodotovým pufrem.

5.1.5 Příprava vzorků tkání

Před vlastním analýzou byly vzorky periprostetických tkání a tkání kuřecího masa vysušeny v lyofilizátoru dosucha (48 h), rozemlety a homogenizovány pomocí keramického mlýnku a achátové třecí misky. CRM LUTS-1 byl připraven podle návodu uvedeného v certifikátu o analýze (vysušení při 105 °C po dobu 2 h do konstantní hmotnosti v sušárně). CRM TORT-2 nevyžadoval žádnou speciální přípravu. Ve všech získaných periprostetických tkáních a CRM byly stanoveny specie Cr(III), Cr(VI) a celkový Cr dle postupu zobrazeného na obrázku 16. Kromě toho byla provedena případová studie zaměřená i na další formy Cr v tkáních (komplexy proteinů s navázaným Cr, částice a nanočástice Cr atd.). V následující části jsou shrnuty všechny použité postupy pro přípravy vzorků.

A. Speciační analýza

Extrakce rozpustného/volného Cr(III) a celkového Cr(VI)

Zhomogenizované vzorky tkání (80 mg) byly naváženy do 10 ml polypropylenových zkumavek, kde k nim bylo přidáno 1,8 ml extrakčního roztoku (10 mmol l⁻¹ EDTA, pH 10,5)

a 40 μl standardního roztoku $^{53}\text{Cr(III)}$ o koncentraci $1\,000\ \mu\text{g l}^{-1}$ sloužícího jako vnitřní standard pro monitorování případné interkonverze Cr(III) . Zkumavka byla následně uzavřena a třepána pomocí vortex mixéru za laboratorní teploty 60 minut. Poté bylo ke vzorku připipetováno 200 μl $1\ \text{mol l}^{-1}\ \text{NH}_4\text{NO}_3$, aby se zabránilo porušení rovnováhy mezi speciemi vlivem vyšší teploty při inkubaci [114, 121]. Roztok byl promíchán a zcentrifugován (13 500 rpm, 4 °C, 30 min). Výsledný supernatant (1 ml) byl odebrán a inkubován při teplotě 70 °C v sušárně po dobu 90 minut. Nakonec byl vzorek přefiltrován přes 0,20 μm Millex Simplicity PTFE filtr a zanalyzován třikrát pomocí IE-HPLC-ICP-MS. Slepé pokusy neobsahující matrici byly připraveny stejným způsobem.

Extrakce proteinů s navázaným Cr a stanovení pomocí BN-PAGE elektroforézy

Komplexy Cr s proteiny byly z tkání extrahovány podle modifikovaného postupu, který popsal Döker a kol. [72]. 80 mg vzorku bylo smícháno s 0,8 ml $50\ \text{mmol l}^{-1}$ octanu amonného (pH 7,4). K roztoku bylo přidáno takové množství $100\ \mu\text{mol l}^{-1}$ PMSF, aby jeho koncentrace ve výsledném roztoku byla $1\ \mu\text{mol l}^{-1}$. Ultrazvukově-asistovaná extrakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 1 h. Poté byl vzorek zcentrifugován (16 000 rpm, 30 min, 4 °C) a získaný supernatant byl smíchán se vzorkovým pufrem v poměru 2:1. Nakonec bylo na připravený gel nadávkováno 5 μl vzorku, přičemž každý vzorek byl nadávkován dvakrát, avšak na různou polovinu gelu. Následně byla spuštěna BN-PAGE analýza. Pro zakoncentrování vzorků bylo aplikováno napětí 30 V po dobu asi 1 h. Vlastní separace pak probíhala 2 h při 150 V. Každý gel byl poté rozpůlen, kdy jedna polovina gelu byla inkubována s barvivem Coomassie Brilliant Blue R-250 kvůli vizualizaci zón („bandů“) a z druhé poloviny gelu byly odebrány zóny, ve kterých byl stanoven celkový obsah Cr pomocí vyvinuté a validované ICP-MS metody. Použitý vybarvovací roztok obsahoval 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 ve 40% methanolu a 10% kyselině octové. Po 30 minutách loužení gelu s barvicím roztokem se gel několikrát opláchl deionizovanou vodou a přebytečné barvivo bylo odstraněno loužením gelu s roztokem 40% methanolu a 10% kyseliny octové. Odbarvování trvalo asi 2 h, dokud nebyly zóny proteinů viditelné ve srovnání s pozadím gelu.

Druhá polovina nebyla nikterak upravena (barvení, oplach, tónování atd.), aby se předešlo případné kontaminaci gelu z použitých chemikálií a/nebo uvolnění Cr z komplexů s organickými ligandy vlivem chemické reakce. Na základě pozic zón v první polovině gelu byly tyto zóny z druhé poloviny vyříznuty pomocí keramického nože, rozloženy

v mikrovlnném mineralizátoru stejným způsobem jako v případě mineralizace tkání a v získaných vzorcích byl stanoven celkový obsah Cr pomocí vyvinuté ICP-MS metody.

B. Frakcionace

Stanovení celkového Cr pomocí ICP-MS

Z důvodu porovnání obsahu sumy specií s celkovým obsahem Cr byl ve všech vzorcích tkání i jednotlivých frakcích získaných extrakcí stanoven celkový obsah Cr pomocí ICP-MS. Jednotlivé frakce (zbytek supernatantu a pevný podíl z IE-HPLC-ICP-MS, gely z BN-PAGE elektroforézy, extrakty s rozpustnými a nerozpustnými formami Cr) nebo 80 mg každého vzorku tkáně byly převedeny/naváženy do křemenných mineralizačních zkumavek, kde k nim bylo přidáno 5 ml mineralizační směsi obsahující zředěnou HNO₃ v poměru 3:2 v/v. Mineralizační zkumavky byly uzavřeny teflonovými víčky a podrobeny dvou krokovému rozkladnému programu uvedenému v tabulce XVI. Po rozkladu se vzorky převedly do 10 ml skleněných odměrných baněk, doplnily po rysku deionizovanou vodou a promíchaly. Nakonec byl každý vzorek pomocí ICP-MS změřen šestkrát. Vzorky slepých pokusů byly připraveny za stejných podmínek stejným způsobem ale bez matrice. Schéma celé přípravy vzorků tkání s následnou speciální analýzou a stanovením celkového Cr je uvedeno na obrázku 16.

Tabulka XVI Rozkladný program pro přípravu vzorků tkání

Krok	Čas (min)	T1 (°C)	T2 (°C)	Tlak (bar)	Příkon (W)
1	15	220	60	110	1500
2	10	220	60	110	1500

T1-vnitřní teplota reaktoru

T2-teplota ocelové nádoby se vzorky

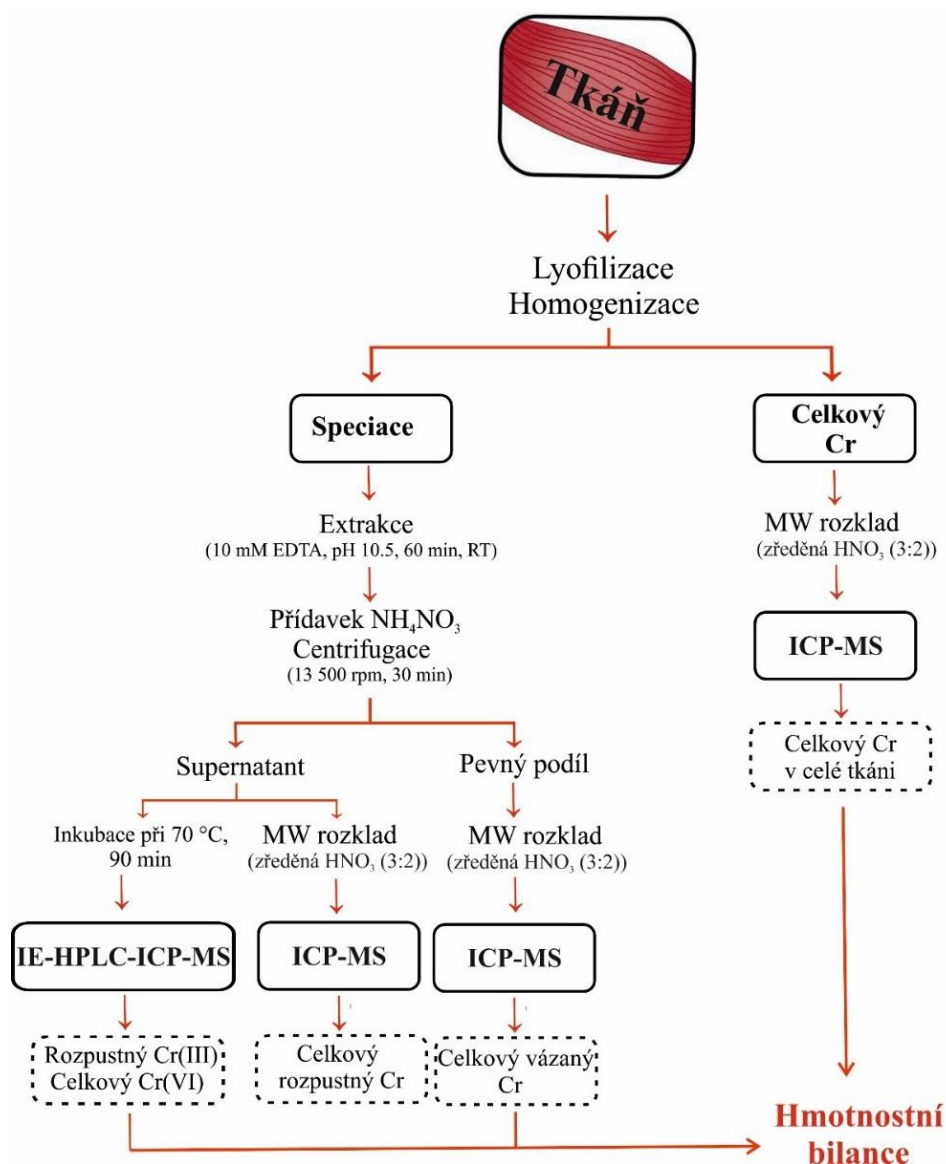
Extrakce rozpustných forem Cr

Na extrakci všech rozpustných/volných forem Cr (nejen Cr(III) a Cr(VI), ale i částic a nanočástic Cr) byl použit stejný extrakční roztok jako u speciální analýzy. Nicméně po filtraci pomocí 0,20 µm Milex Smplicity PTFE filtrů byly získané filtráty ještě zcentrifugovány při 16 000 rpm po dobu 10 min za využití Amicon 3 kDa ultra

centrifugačních filtrů, které odpovídají velikosti pórů mezi 1,5-3 nm (Millipore Sigma, Německo). Obrácením filtru a zopakováním centrifugace (16 000 rpm, 5 min) byl pak získán pevný podíl zachycený na membráně filtru. Všechny tyto frakce (filtráty z ultrafiltrace přes Amicon 3 kDa ultra centrifugační filtry, pevné podíly zachycené na filtrech) byly následně rozloženy podle postupu popsaného pro stanovení celkového Cr v tkáních. Nakonec byl v získaných vzorcích stanoven celkový obsah Cr pomocí vyvinuté ICP-MS metody.

Stanovení nerozpustných forem Cr v pevném podílu

Za účelem získání pevného podílu obsahujícího pouze nerozpustné formy Cr byl na přípravu vzorku použit analytický postup využívající alkalického rozkladu biologické tkáně publikovaný Grayem a kol. [122]. Tímto způsobem lze ze vzorku vyextrahovat všechny rozpustné formy, a dokonce i Cr navázaný na tkáních. Do polypropylenové zkumavky bylo opět naváženo 80 mg vzorku a následně bylo přidáno 0,8 ml 20% TMAH (w/w). Zkumavka byla uzavřena a třepána pomocí vortex mixéru za laboratorní teploty po dobu 24 h, přičemž první hodina extrakce probíhala v ultrazvuku. Poté byl vzorek zcentrifugován (16 000 rpm, 30 min, 4 °C), aby došlo k oddělení pevného podílu a supernatantu. Obě frakce byly nakonec rozloženy ve zředěné HNO₃ a analyzovány pomocí vyvinuté ICP-MS metody.



Obrázek 16 Schéma analytického postupu pro stanovení specií Cr(III), Cr(VI) a celkového Cr v tkáních (RT-pokořová teplota, MW-mikrovlnný).

5.1.6 Kvantitativní analýza, statistika

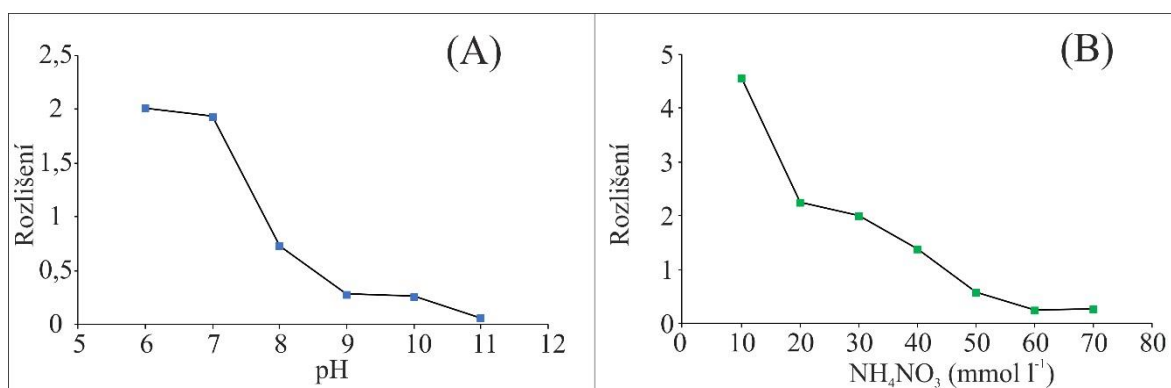
Obě validované metody (IE-HPLC-ICP-MS a ICP-MS) byly aplikovány na analýzu 2 CRM a reálných vzorků periprostetických tkání. Všechny získané výsledky jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka (SD) (v $\mu\text{g g}^{-1}$). Pro testování hypotéz byly aplikovány neparametrické testy Mann-Whitney test a Wilcoxonův pářový test za použití statistického software NCSS 2007 (NCSS, LLC, USA), za statisticky významnou byla považována p-hodnota $\leq 0,05$. Pro vyjádření vztahu mezi získanými výsledky a klinickými údaji o pacientech byla využita analýza hlavních komponent (PCA) v QC Expert verze 3.2

(TriloByte, Česká republika). Meze detekce a stanovitelnosti pro metodu ICP-MS byly vypočteny pomocí matematického modelu „meze: 3s-IUPAC“ ve validovaném programu EffiValidation 3.0 (Effichem, s.r.o., Česká republika).

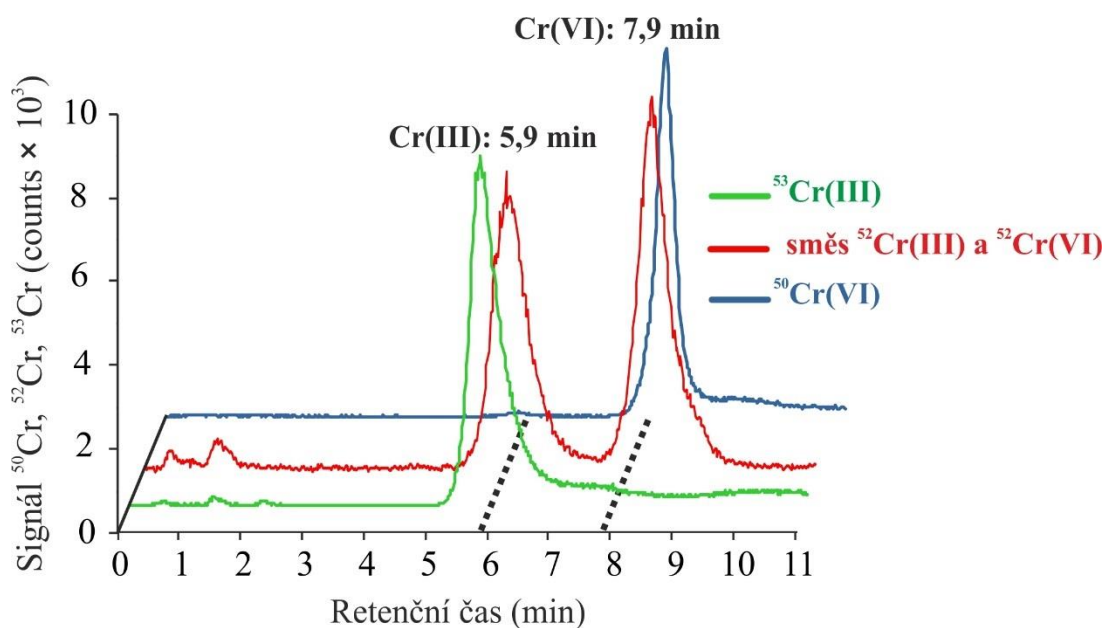
5.2 Výsledky a diskuse

5.2.1 Vývoj IE-HPLC-ICP-MS metody

K separaci Cr(III) a Cr(VI) byl vybrán mód iontově výměnné chromatografie s využitím kolony PRP-X100, která jakožto silný anex umožňuje separaci aniontů. Během vývoje IE-HPLC-ICP-MS metody bylo ale nutné provést několik optimalizací, mezi něž patřila i optimalizace chromatografické separace, kdy bylo studováno především složení mobilní fáze. Pro tyto účely byly použity vodné kalibrační standardy obsahující $2,5 \mu\text{g g}^{-1}$ $^{53}\text{Cr(III)}$ a $^{50}\text{Cr(VI)}$, kdy byl testován vliv různé koncentrace NH_4NO_3 ($10\text{--}70 \text{ mmol l}^{-1}$) a hodnot pH ($6\text{--}11$). Tyto dva parametry výrazně ovlivňovaly retenční čas Cr(III) a Cr(VI) a tím pádem i rozlišení obou specií. Zvyšující se koncentrace NH_4NO_3 a hodnota pH zkracovaly retenční časy obou specií, navíc i negativně ovlivňovaly tvar píků. Nejrychlejší chromatografické analýzy a zároveň dostatečné hodnoty rozlišení ($R \geq 1,5$) bylo dosaženo při použití mobilní fáze obsahující 30 mmol l^{-1} NH_4NO_3 a pH 6 (obr. 17). Výsledná analýza trvala méně než 8 min a hodnota rozlišení byla 2,1 (retenční čas Cr(III) odpovídal 5,9 min a Cr(VI) 7,9 min) (obr. 18).



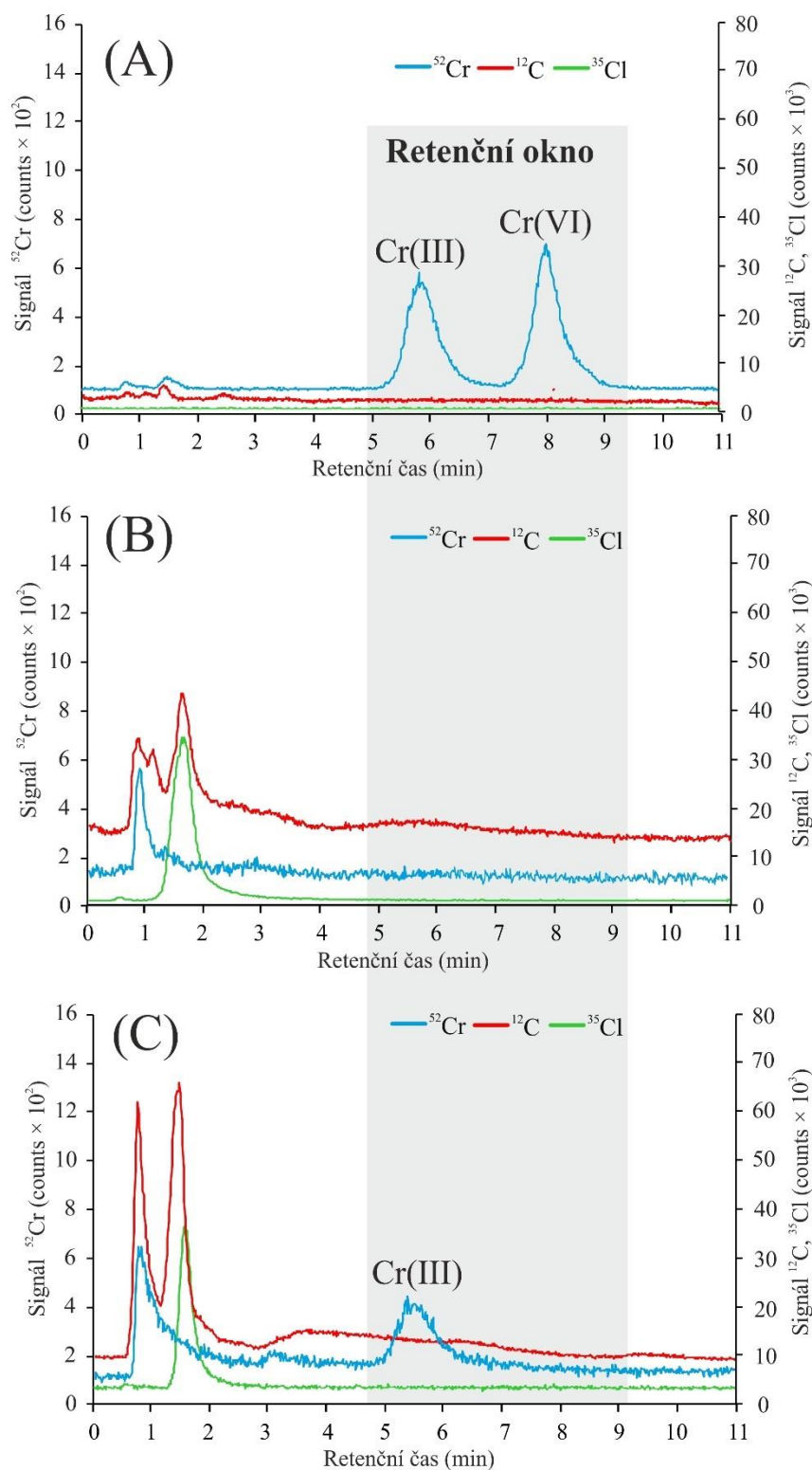
Obrázek 17 Rozlišení Cr(III) a Cr(VI) v závislosti na (A) hodnotě pH a (B) koncentraci NH_4NO_3 v mobilní fázi.



Obrázek 18 Chromatogramy vodných kalibračních standardů obsahujících 2,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ $^{53}\text{Cr(III)}$, $^{50}\text{Cr(VI)}$ a směs $^{52}\text{Cr(III)}$ a $^{52}\text{Cr(VI)}$ (čerchované čáry naznačují retenční časy Cr(III) a Cr(VI)).

Vzhledem k problému s polyatomickými interferencemi u speciální analýzy chromu v krvi a kloubních výpotcích byla další krokem optimalizace detekce pomocí ICP-MS, a právě studium možných polyatomických interferencí. Pozornost byla opět věnována nejčastěji se vyskytujícím interferencím tvořenými adukty s uhlíkem a chlorem. Tento typ interferencí nemusí pocházet pouze z vlastní matrice vzorků, ale je nutné si dávat pozor i na použité chemikálie (extrakční činidlo, mobilní fáze). Z tohoto důvodu byla zvolena mobilní fáze neobsahující organické ani anorganické sloučeniny uhlíku a chloru. Polyatomické interference byly studovány pomocí IE-HPLC-ICP-MS analýz reálných vzorků tkání, obohacených vzorků kuřecího masa, CRM i směsných vodných kalibračních roztoků. Kromě všech izotopů chromu byly monitorovány i izotopy ^{12}C , ^{13}C a ^{35}Cl , ^{37}Cl . Na základě výsledků testování různých průtoků He v předchozí studii byl i zde použit průtok 3,5 ml min^{-1} , který poskytoval nejvyšší hodnoty SNR pro obě specíe. Během chromatografické separace reálných vzorků, CRM i obohacených vzorků kuřecího masa byly pozorovány kromě píků Cr(III) a Cr(VI) ještě další neznámé píky v retenčním čase kolem 1. min a 3. min. Avšak u analýzy směsného vodného kalibračního roztoku se tyto neznámé píky neobjevovaly. Retenční časy obou píku se nejvíce shodovaly se signály pro

^{12}C a ^{13}C (obr. 19). Následně byly porovnány i experimentálně získané poměry izotopů $^{52}\text{Cr}/^{53}\text{Cr}$ pro oba neznámé píky. Výsledná hodnota pro pík v 1. min byla $3,90 \pm 0,41$ ($n = 30$), pík v 3. min byl pod stanoveným LOQ, což potvrdilo, že se jedná o polyatomické interference. Oba neznámé píky objevující se u analýz extraktů tkání i kuřecího masa tedy pocházely z polyatomické interference $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+ / ^{40}\text{Ar}^{13}\text{C}^+$ způsobené vysokým obsahem uhlíku v matrici vzorků. Nicméně retenční časy obou píků se výrazně lišily od retenčních časů specií chromu (Cr(III): 5,9 min a Cr(VI): 7,9 min), čímž nebylo ovlivněno jejich stanovení pomocí vyvinuté metody. Detekci pomocí ICP-MS tedy nebylo nutné dále optimalizovat.



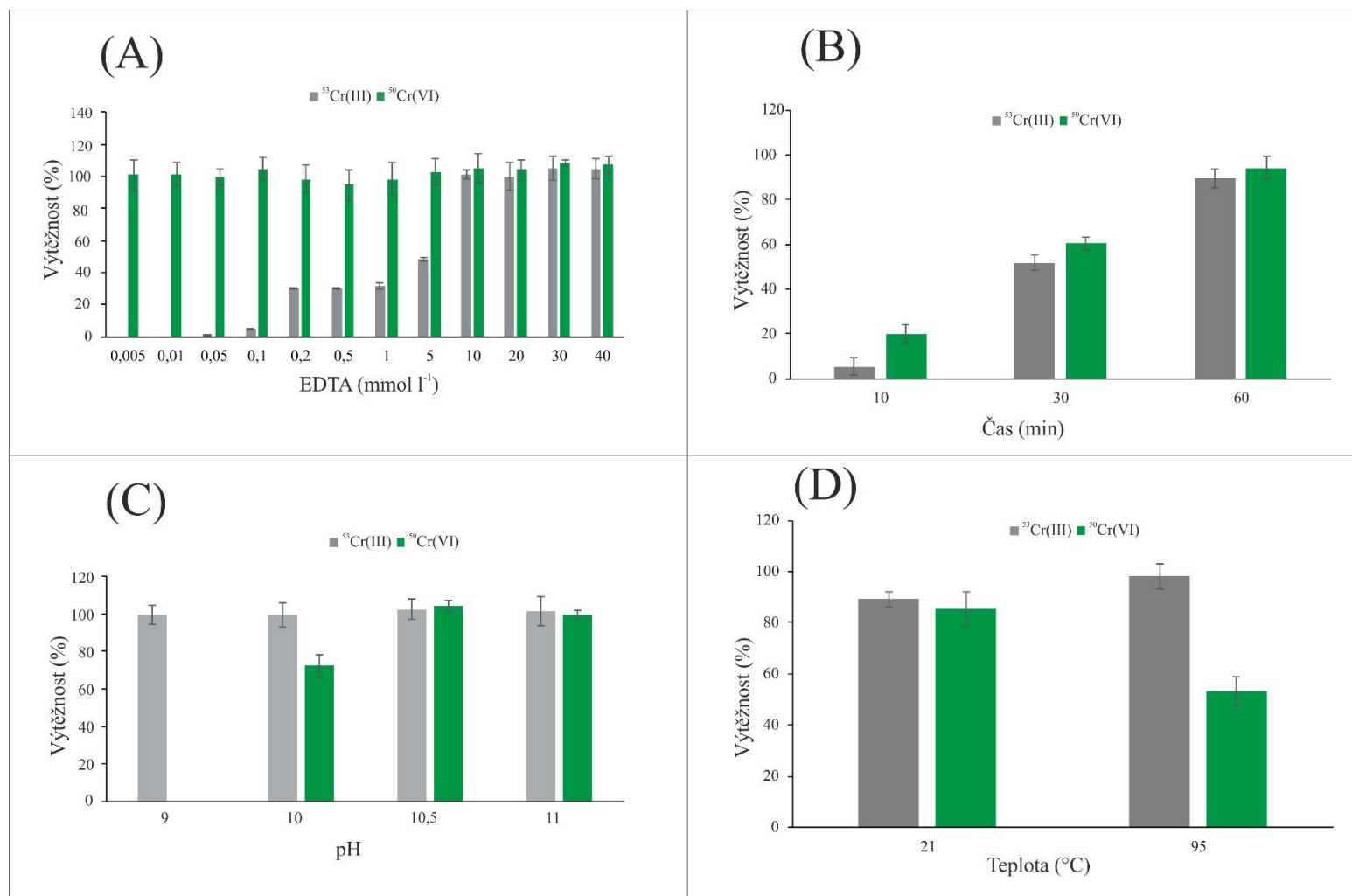
Obrázek 19 Studium polyatomických interferencí odvozených od aduktů s uhlíkem ovlivňující stanovení Cr na izotopu ^{52}Cr , (A) analýza vodného kalibračního standardu obsahujícího $0,25 \mu\text{g g}^{-1}$ $^{52}\text{Cr}(\text{III})$ a $^{52}\text{Cr}(\text{VI})$, (B) kontrolní vzorek tkáně a (C) vzorek tkáně pacienta s kloubní náhradou ze slitiny obsahující Cr (signály pro izotopy ^{50}Cr a ^{53}Cr vykazovaly stejný trend a proto nejsou zobrazeny).

5.2.2 Optimalizace extrakce Cr(III) a Cr(VI)

Další částí byla optimalizace extrakce obou specií a tvorby komplexu [Cr(III)-EDTA]⁻. Na extrakci Cr(III) a Cr(VI) z biologických tkání byl použit alkalický roztok EDTA, který se obecně používá na extrakci celkového Cr(VI) a rozpustných/volných forem Cr(III) [30, 123]. Tato látka zajišťuje tvorbu záporně nabitého komplexu [Cr(III)-EDTA]⁻, díky čemu lze i Cr(III) analyzovat pomocí vyvinuté IE-HPLC-ICP-MS metody. Kromě toho ale EDTA také stabilizuje Cr(III) ve vzorku, kde zabraňuje jeho interkonverzi (oxidaci) v alkalickém prostředí, případně hydrolyze za neutrálního pH.

Během vývoje extrakčního postupu bylo optimalizováno několik parametrů tak, aby zvolená extrakce byla co nejefektivnější a zároveň bylo dosaženo co nejvyšších výtěžností obou specií bez porušení jejich rovnováhy. Mezi testované parametry patřil vliv koncentrace EDTA (0,005-40 mmol l⁻¹), pH roztoku (9-11), teploty během extrakce (21 a 95 °C) a extrakčního času (10-60 min). Pro tyto experimenty byly opět použity vzorky kuřecího masa obohacené před extrakcí o 0,5 a 10 µg g⁻¹ ⁵³Cr(III) a ⁵⁰Cr(VI). Na základě získaných výsledků bylo zjištěno, že zvyšující se koncentrace EDTA ovlivňovala pouze výtěžnost Cr(III) (zřejmě konkurenční komplexace ostatních kationtů kovů obsažených ve vzorcích s EDTA) a zvolený extrakční čas silně ovlivňoval výtěžnost obou specií (obr. 20A a 20B). Naproti tomu, hodnota pH extrakčního činidla a teplota během extrakce byly klíčovými parametry pro stabilitu Cr(VI) a interkonverzi specií (obr. 20C a 20D). Nejvyšších hodnot výtěžností Cr(III) i Cr(VI) bez porušení rovnováhy mezi speciemi bylo pozorováno za následujících extrakčních podmínek: roztok obsahující 10 mmol l⁻¹ EDTA, pH 10,5 a extrakce za pokojové teploty po dobu 60 min. Tyto podmínky byly následně používány pro extrakci rozpustného/volného Cr(III) a celkového Cr(VI) ze všech analyzovaných vzorků.

Nicméně tvorba komplexu [Cr(III)-EDTA]⁻ je za laboratorní teploty velice pomalá, a tak bývá obvykle urychlena inkubací vzorku s EDTA při vyšší teplotě buď v sušárně nebo mikrovlnném mineralizátoru/laboratorní mikrovlnné troubě [103, 124]. V takových případech je navíc vhodné přidat ke vzorku 1 mol l⁻¹ NH₄NO₃ kvůli zabránění redukci Cr(VI) na Cr(III) vlivem zvýšené teploty [114, 121]. Po extrakci byl tedy ke všem vzorkům přidán 1 mol l⁻¹ NH₄NO₃ a vzorek byl inkubován 90 min v sušárně při teplotě 70 °C. Při nižší teplotě se ve zvolené době nepodařilo vytvořit komplex s celkovým množstvím Cr(III), výtěžnost Cr(VI) byla ale konstantní (téměř 100 %).



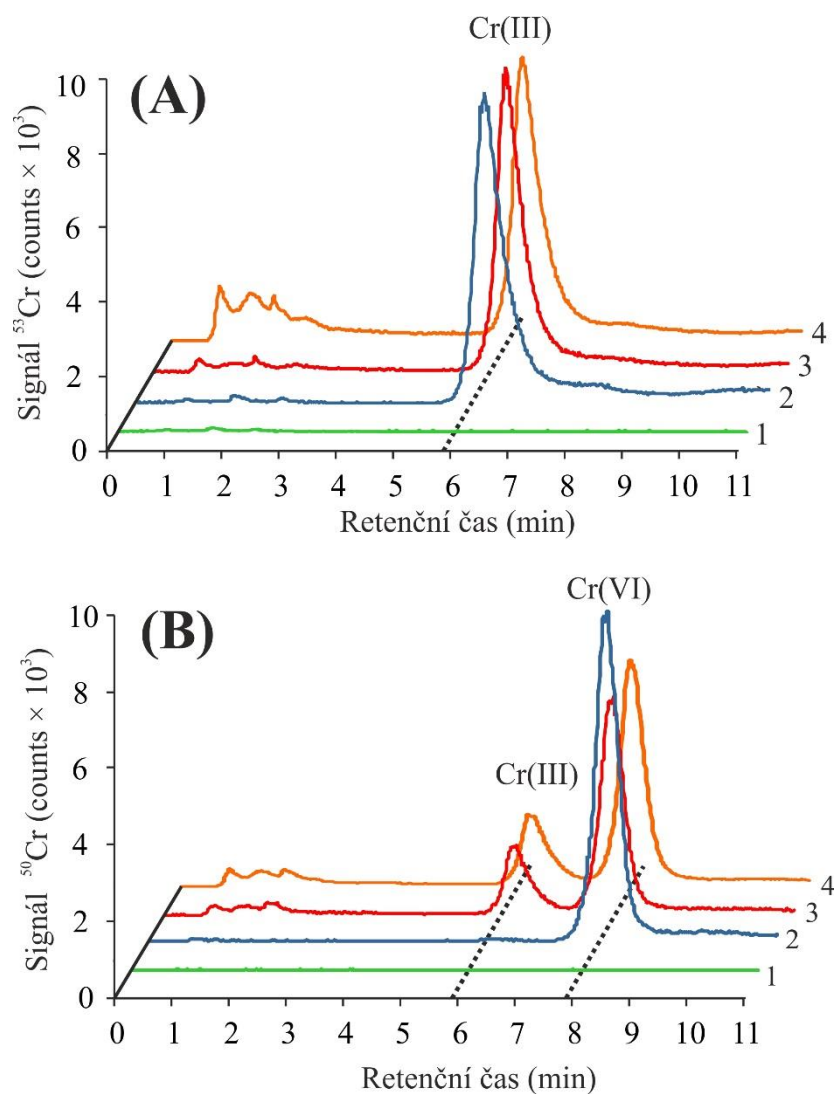
Obrázek 20 Vliv (A) koncentrace EDTA, (B) času, (C) pH a (D) teploty na výtěžnost Cr(III) a Cr(VI) v kuřecím masě obohaceném o 10 μg g⁻¹ ⁵³Cr(III) a ⁵⁰Cr(VI) (výsledky pro vzorky obohacené o 0,5 μg g⁻¹ ⁵³Cr(III) a ⁵⁰Cr(VI) mají stejný trend a nejsou zobrazeny).

5.2.3 Studium interkonverze

Během vývoje extrakčního postupu byla také sledována rovnováha mezi speciemi a jejich případná interkonverze. K experimentům byly využity izotopicky obohacené standardy $^{53}\text{Cr(III)}$ a $^{50}\text{Cr(VI)}$, které ve spojení HPLC s ICP-MS umožňují odhalit porušení rovnováhy mezi speciemi. Tyto standardy byly analyzovány ve směsi s extrakčním činidlem, dále pak byly využity i pro obohacení vzorků kuřecího masa před extrakcí i po extrakci. Jak bylo popsáno výše, významná interkonverze byla pozorována už během vývoje extrakční metody, kdy došlo k redukci Cr(VI) vlivem zvýšené teploty při inkubaci ($70\text{ }^\circ\text{C}$). Tato redukce byla potvrzena nejen u reálných vzorků, ale také u směsných vodných standardů. Nicméně přidavkem $1\text{ mol l}^{-1}\text{ NH}_4\text{NO}_3$ před inkubací byla tato interkonverze potlačena.

Dalším krokem bylo sledování vlivu vlastního extrakčního postupu a matrice vzorku. K experimentům byly využity směsné vodné standardy s obsahem $0,5; 2\text{ }\mu\text{g g}^{-1}; 10\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ $^{53}\text{Cr(III)}$ a $^{50}\text{Cr(VI)}$ a vzorky kuřecího masa obohacené o $0,5; 2\text{ }\mu\text{g g}^{-1}; 10\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ $^{53}\text{Cr(III)}$ a $^{50}\text{Cr(VI)}$ před extrakcí i po extrakci. Obrázek 21 porovnává chromatografické analýzy vodného kalibračního standardu a vzorků kuřecího masa obohacených o $2\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$. Jak je vidět z obrázku 21A, specie $^{53}\text{Cr(III)}$ byla díky komplexaci s EDTA během extrakce stabilní a nedocházelo tedy k oxidaci $^{53}\text{Cr(III)}$ na $^{53}\text{Cr(VI)}$ ($^{53}\text{Cr(VI)}$ nebyl detekován v žádném z analyzovaných vzorků). Oproti tomu v případě analýzy $^{50}\text{Cr(VI)}$ byla v obohacených vzorcích kuřecího masa pozorována redukce této specie (obr. 21B). Analýzou vzorků kuřecího masa obohacených před extrakcí byla prokázána téměř 30% redukce Cr(VI) , nově vytvořený komplex $^{50}\text{Cr(III)-EDTA}^-$ se eluoval ve stejném čase jako Cr(III) (5,9 min). Stejných výsledků bylo dosaženo i v případě analýzy vzorků obohacených až po extrakci specií (testování vlivu extrakční metody na rovnováhu). Tento trend byl navíc pozorován i u směsných kalibračních standardů s přizpůsobenou matricí, kdy průměrné množství zredukovaného $^{50}\text{Cr(VI)}$ odpovídalo $27 \pm 5\%$ ($n = 24$). Naopak u směsného vodného standardu signál $^{50}\text{Cr(VI)}$ odpovídal přidanému množství a k redukci na $^{50}\text{Cr(III)}$ tak nedocházelo. Z těchto výsledků vyplývá, že porušení rovnováhy s následnou redukcí Cr(VI) bylo pravděpodobně způsobeno charakterem matrice vzorku. Významná redukce Cr(VI) už byla dokonce popsána v několika publikacích zabývajících se specií Cr v potravinách [28, 48, 113], čímž byly potvrzeny získané výsledky. Tato redukce je pravděpodobně způsobena vysokým obsahem antioxidantů a redukujících složek v biologických vzorcích. Díky tomu

je tedy přítomnost Cr(VI) v tomto typu vzorků velmi nepravděpodobná. I přesto je ale vyvinutá metoda vhodná na analýzu Cr(VI) v biologických tkáních, protože umožňuje stanovit velmi nízké obsahy obou specií (ng g^{-1}), které byly potvrzeny například u pacientů s cukrovkou druhého typu [25].

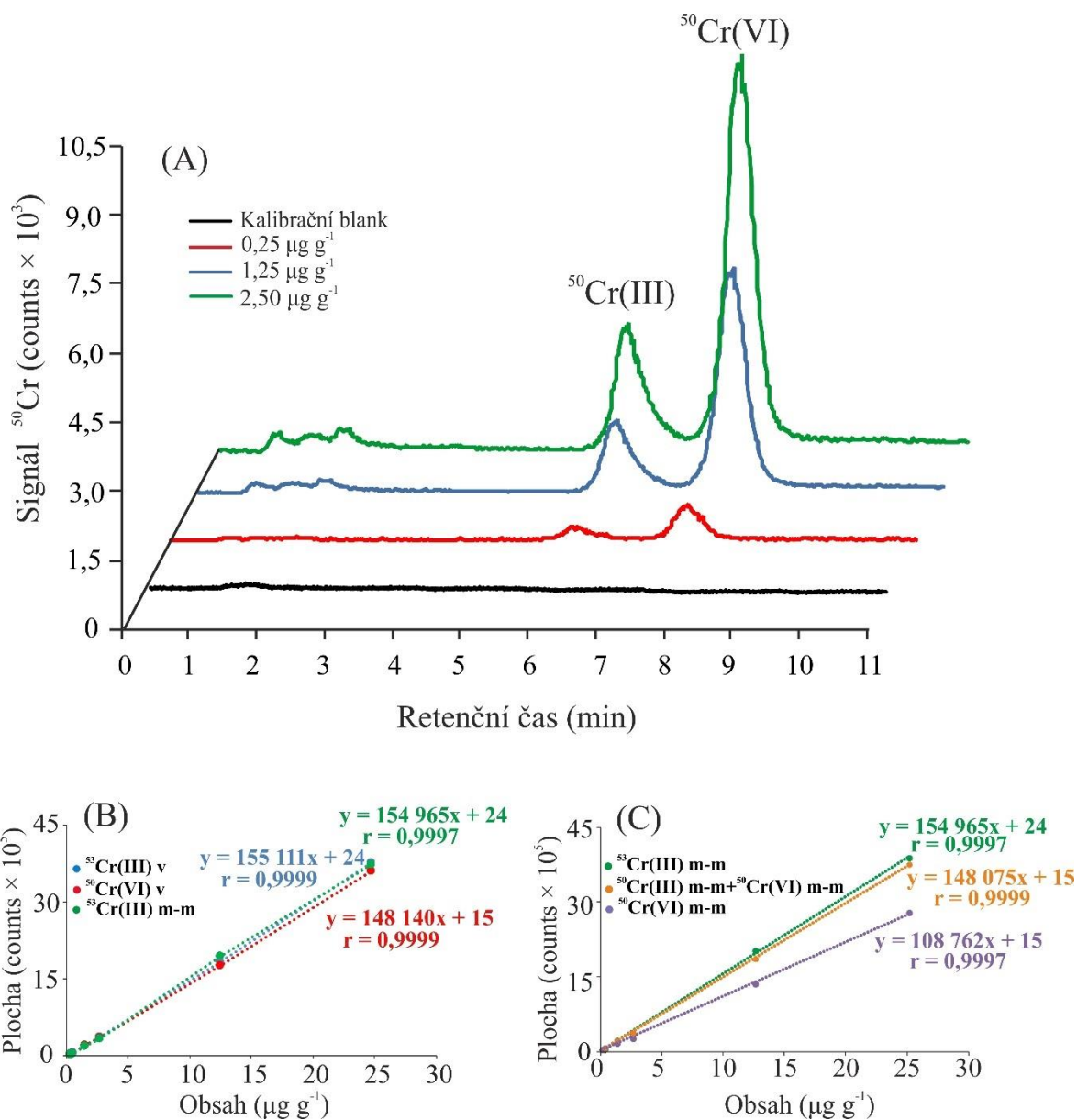


Obrázek 21 Chromatografická analýza (A) ^{53}Cr a (B) ^{50}Cr ve vzorcích neobohaceného kuřecího masa (zelená), vodného kalibračního standardu obsahujícího $2 \mu\text{g g}^{-1} \text{ }^{53}\text{Cr(III)}$ a $^{50}\text{Cr(VI)}$ (modrá), kuřecího masa obohaceného o $2 \mu\text{g g}^{-1} \text{ }^{53}\text{Cr(III)}$ a $^{50}\text{Cr(VI)}$ po extrakci (červená) a kuřecího masa obohaceného o $2 \mu\text{g g}^{-1} \text{ }^{53}\text{Cr(III)}$ a $^{50}\text{Cr(VI)}$ před extrakcí (oranžová) (čerchované čáry naznačují retenční časy Cr(III) a Cr(VI)).

5.2.4 Validace metod

Metoda IE-HPLC-ICP-MS i metoda ICP-MS pro stanovení celkového Cr byly po optimalizaci výše zmíněných parametrů validovány v rozsahu linearit, meze detekce (LOD), meze stanovitelnosti (LOQ), intra-/inter-day pravdivosti, intra-/inter-day preciznosti, výtěžnosti extrakce, paměťového („*carry-over*“) efektu, citlivosti a stability podle doporučení uvedeného v pokynech pro validaci bioanalytických metod z Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA) [107]. Výsledky validace obou metod jsou shrnuty v tabulce XVII.

Linearita IE-HPLC-ICP-MS pro všechny formy chromu ($^{50}\text{Cr(VI)}$, $^{52}\text{Cr(III)}$, $^{52}\text{Cr(VI)}$ a $^{53}\text{Cr(III)}$) byla stanovena pomocí analýz 8 kalibračních standardů v rozsahu 0,0125-25 $\mu\text{g g}^{-1}$ připravených zředěním zásobních standardních roztoků směsí extrakčního činidla a NH_4NO_3 stejně jako tomu bylo u přípravy reálných vzorků. Korelační koeficienty získané z kalibračních křivek byly větší než 0,9998. Na základě Chowova testu shodnosti dvou lineárních modelů [89] byla srovnána kalibrační křivka $^{53}\text{Cr(III)}$ a $^{50}\text{Cr(VI)}$, čímž bylo dokázáno, že modely jsou shodné a vyvinutá metoda je nezávislá na analyzované specii (obr. 22B). Následně byl studován vliv matrice na signál obou specií chromu, jelikož biologické tkáně mohou obsahovat řadu interferentů ovlivňujících jejich velikost a tvar. Z obohacených extraktů kuřecího masa byla vytvořena kalibrace s přizpůsobenou maticí o stejném rozsahu jako u testování linearit a stejným testem shodnosti byl porovnán signál $^{53}\text{Cr(III)}$ ve vodných standardech a $^{53}\text{Cr(III)}$ v standardech s přizpůsobenou maticí. Opět nebyl nalezen žádný rozdíl v linearitě, intenzitě signálů (píků) ani v rovnicích kalibračních křivek. Samotný signál $^{50}\text{Cr(VI)}$ porovnán nebyl, protože analýzou všech standardů s přizpůsobenou maticí byla znovu prokázána 30% redukce této specie (obr. 22A a 22C). Díky tomu byla pro kvantitativní analýzu specií v tkáních použita kalibrační křivka připravená z vodných kalibračních standardů. Všechny kalibrační standardy byly analyzovány metodou IE-HPLC-ICP-MS třikrát, relativní směrodatná odchylka byla nižší než 3 %.



Obrázek 22 (A) Chromatogramy ^{50}Cr v matricových kalibračních standardech a (B), (C) srovnání kalibračních křivek získaných analýzou vodných standardů (v) a standardů s přizpůsobenou maticí (matrix-matched, m-m).

LOD a LOQ byly získány z hodnot SNR, kdy LOD odpovídal hodnotě SNR rovné 3 a LOQ hodnotě SNR rovné 10. Výsledné hodnoty LOQ byly $0,03$ a $0,08 \mu\text{g g}^{-1}$, což jsou mnohem nižší hodnoty, než kterých bylo doposud dosaženo u jiných studií zabývajících se stanovením Cr(III) a Cr(VI) v tkáních [20-24]. Pravdivost a preciznost byly vzhledem k nedostupnosti vhodného matricového certifikovaného referenčního materiálu s certifikovanými hodnotami Cr(III) a Cr(VI) stanoveny pomocí 6 analýz 3 replik vzorků

kuřecího masa obohacených standardními roztoky $^{53}\text{Cr(III)}$ a $^{50}\text{Cr(VI)}$ před extrakcí na třech úrovních: $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ (nízká hladina NH), $2 \mu\text{g g}^{-1}$ (střední hladina SH) a $10 \mu\text{g g}^{-1}$ (vysoká hladina VH). Pravdivost a preciznost metody byly dále ještě stanoveny v rámci 1 dne (intra-day) a během 3 dnů (inter-day). Oproti tomu výtěžnost extrakce byla stanovena jako poměr (v %) výsledků získaných z analýz 6 nezávisle připravených vzorků kuřecího masa obohacených na hladině NH, SH a VH před extrakcí a po extrakci. Stabilita retenčního času byla ověřena opakovanou analýzou stejných matricových kalibračních standardů. Citlivost metody odpovídala hodnotě SNR rovné 5. Paměťový efekt byl stanoven pomocí analýzy slepého pokusu po nejvyšším kalibračním standardu.

Validována byla i metoda ICP-MS sloužící pro stanovení celkového množství ^{50}Cr , ^{52}Cr a ^{53}Cr . Korelační koeficienty získané z analýz 9 kalibračních standardů připravených ve vodě v rozsahu $0,0125\text{-}125 \mu\text{g g}^{-1}$ nebyly nižší než 0,9999. LOD a LOQ byly počítány jako $\bar{x} + 3\text{SD}$ a $\bar{x} + 10\text{SD}$, kde \bar{x} je průměrná hodnota naměřená z analýz 10 slepých pokusů, SD je směrodatná odchylka. Pravdivost, preciznost i výtěžnost extrakce byly počítány stejným způsobem jako u validace IE-HPLC-ICP-MS, každý vzorek byl pomocí ICP-MS analyzován šestkrát. Citlivost metody odpovídala hodnotě, jejíž signál byl 5krát vyšší než signál pozadí (signál kalibračního blanku). Paměťový efekt byl stanoven analýzou slepého pokusu po nejvyšším kalibračním standardu. Výsledky uvedené v tabulce XVII vyhovovaly daným kritériím, a tak mohly být obě metody aplikovány na analýzu reálných vzorků tkání.

U každé IE-HPLC-ICP-MS i ICP-MS analýzy byla navíc sledována stabilita signálu a kontrolována kvalita daného měření. K těmto účelům sloužil QC vzorek (vodný standard obsahující $0,25 \mu\text{g g}^{-1}$ $^{50}\text{Cr(VI)}$, $^{52}\text{Cr(III)}$, $^{52}\text{Cr(VI)}$, $^{53}\text{Cr(III)}$ (IE-HPLC-ICP-MS) nebo $6,25 \mu\text{g g}^{-1}$ ^{50}Cr , ^{52}Cr , ^{53}Cr (ICP-MS)), který byl analyzován na začátku, na konci a během měření (každý desátý vzorek). Následně byla vyhodnocena jeho výtěžnost (91-101 % (IE-HPLC-ICP-MS) a 90-105 % (ICP-MS)) a preciznost stanovení (3,2-5,7 % (IE-HPLC-ICP-MS) a 1,0-2,1 % (ICP-MS)). Ke sledování stability signálu (plazmového výboje) a eliminaci nespektrálních interferencí byl během každého měření do ICP-MS spektrometru současně přiváděn i roztok vnitřního standardu (^{45}Sc).

Tabulka XVII Validační parametry IE-HPLC-ICP-MS a ICP-MS metod (NH - nízká hladina 0,5 µg g⁻¹, SH - střední hladina 2 µg g⁻¹, VH - vysoká hladina 10 µg g⁻¹, LLOQ - „lower limit of quantification“, nejnižší nenulový kalibrační bod).

Parametr	IE-HPLC-ICP-MS				ICP-MS		
	⁵² Cr(III)	⁵³ Cr(III)	⁵² Cr(VI)	⁵⁰ Cr(VI)	⁵⁰ Cr	⁵² Cr	⁵³ Cr
Kalibrační rozsah (µg g⁻¹)	0,0125-25	0,0125-25	0,0125-25	0,0125-25	0,0125-125	0,0125-125	0,0125-125
Korelační koeficient r	0,9999	0,9999	0,9998	0,9999	1,0000	0,9999	1,0000
LOD (µg g⁻¹)	0,03	0,01	0,03	0,01	0,01	0,01	0,01
LOQ (µg g⁻¹)	0,08	0,03	0,08	0,03	0,02	0,03	0,02
Výtěžnost extrakce (%)	-	NH: 89 ± 5 SH: 92 ± 6 VH: 91 ± 5	-	NH: 90 ± 6 SH: 91 ± 3 VH: 89 ± 5	NH: 103 ± 2 SH: 110 ± 1 VH: 101 ± 1	-	NH: 100 ± 1 SH: 108 ± 2 VH: 106 ± 2
Pravdivost (výtěžnost, %)	-	NH: 88 ± 6 SH: 90 ± 6 VH: 89 ± 4	-	NH: 87 ± 9 SH: 90 ± 5 VH: 91 ± 4	NH: 103 ± 2 SH: 110 ± 3 VH: 101 ± 3	-	NH: 100 ± 2 SH: 108 ± 5 VH: 106 ± 5
	-	NH: 87 ± 5 SH: 89 ± 6 VH: 90 ± 3	-	NH: 86 ± 6 SH: 91 ± 5 VH: 90 ± 2	NH: 102 ± 2 SH: 99 ± 3 VH: 102 ± 1	-	NH: 99 ± 3 SH: 100 ± 2 VH: 104 ± 3
Preciznost (RSD, %)	-	NH: 7 SH: 7 VH: 4	-	NH: 10 SH: 5 VH: 5	NH: 2 SH: 3 VH: 3	-	NH: 2 SH: 5 VH: 5
	-	NH: 6 SH: 7 VH: 4	-	NH: 7 VH: 6 SH: 3	NH: 2 SH: 3 VH: 1	-	NH: 3 SH: 2 VH: 3
Opakovatelnost retenčního času (%)	0,01	0,01	0,01	0,01	1,0	1,5	2,1
Citlivost (µg g⁻¹)	0,05	0,02	0,05	0,02	0,002	0,03	0,003
Paměťový („carry-over“) efekt (µg g⁻¹)	< 20 % LLOQ	< 20 % LLOQ	< 20 % LLOQ	< 20 % LLOQ	< 20 % <LOQ	< 20 % <LOQ	< 20 % <LOQ

5.2.5 Speciační analýza Cr v biologických tkáních vrstvy 1

Obě validované metody byly nejdříve aplikovány na analýzu dvou certifikovaných referenčních materiálů tkání hepatopankreas humra s certifikovanou hodnotou celkového Cr (LUTS-1: $0,53 \pm 0,08 \mu\text{g g}^{-1}$, TORT-2: $0,77 \pm 0,15 \mu\text{g g}^{-1}$). V obou vzorcích nebyl metodou IE-HPLC-ICP-MS nalezen rozpustný/volný Cr(III) ani Cr(VI) (v případě LUTS-1 bylo nalezeno pouze stopové množství Cr(III) pod LOQ). Hlavní nalezenou specií byl vázaný Cr v pevném podílu (pravděpodobně Cr(III) navázaný na proteiny přítomné v matrici [4, 33, 38] nebo nerozpustné CrPO_4 a Cr_2O_3 [20-24]). Následně byly získané výsledky porovnány s certifikovanými hodnotami celkového Cr. Suma specií nalezených v supernatantu a vázaného Cr v pevném podílu byla $0,58 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ pro LUTS-1 a $0,70 \pm 0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ pro TORT-2, což bylo v souladu s certifikovanými hodnotami (výtěžnost 109 % a 91 %).

Po ověření na CRM byly obě metody použity na stanovení Cr(III), Cr(VI), celkového vázaného Cr a celkového Cr v reálných vzorcích periprostetických tkání vrstvy 1. K analýzám bylo vybráno 13 tkání získaných od pacientů s náhradou obsahující slitinu Co-Cr-Mo v místě odběru (skupina pacientů) a 10 vzorků tkání od pacientů, jejichž náhrada v místě odběru Cr neobsahovala (kontrolní skupina). Každý vzorek byl analyzován třikrát pomocí IE-HPLC-ICP-MS a šestkrát pomocí ICP-MS, výsledky uvedeny jako průměr \pm směrodatná odchylka jsou shrnuty v tabulce XVIII (kontrolní skupina) a tabulce XIX (skupina pacientů). IE-HPLC-ICP-MS analýza vybraných vzorků je zobrazena na obrázku 23. Ve všech analyzovaných vzorcích tkání byl nalezen pouze Cr(III), a to buď ve volné formě, nebo navázaný na pevný podíl. V pevném podílu se mohou vyskytovat komplexy Cr s organickými ligandy, proteiny nebo uvolněné částice Cr (fosforečnany, oxidy, hydroxidy) [125]. Celkový vázaný Cr v pevném podílu se pohyboval v rozmezí od 1,7 do $11 \mu\text{g g}^{-1}$ v kontrolní skupině a od 3,0 do $5119 \mu\text{g g}^{-1}$ ve skupině pacientů. Naopak rozpustný/volný Cr(III) byl ve všech vzorcích nalezen ve velmi nízkém množství, které odpovídalo pouze 1 % z celkového množství Cr v tkáních. Cr(VI) nebyl nalezen v žádném vzorku a to pravděpodobně kvůli prokázané redukci této specie. Naopak interkonverze Cr(III) pozorována nebyla. Všechny reálné vzorky byly před speciační analýzou obohaceny o $0,5 \mu\text{g g}^{-1} {}^{53}\text{Cr(III)}$, který sloužil jako vnitřní standard. Jeho průměrná výtěžnost byla $84 \pm 12 \%$ ($n = 23$), čímž bylo prokázáno, že během speciační analýzy nedocházelo k interkonverzi (oxidaci) této specie (${}^{53}\text{Cr(VI)}$ nebyl detekován ani v jednom případě).

Avšak porovnáním výsledků z IE-HPLC-ICP-MS analýzy a ICP-MS analýzy supernatantu byl ale u některých vzorků zjištěn rozdíl v naměřených množstvích (výtěžnost

vyjádřená jako poměr celkového Cr v supernatantu a sumy specií Cr z IE-HPLC-ICP-MS analýzy byla 368-558 %, tab. XIX). Tyto vzorky se od ostatních lišily zejména vzhledem (všechny měly šedou barvu indikující vysoký obsah uvolněných kovů a metalózu) a vysokým naměřeným obsahem vázaného Cr i celkového Cr ve vzorku. Tento rozdíl mohl být způsoben uvolňováním i elementárního Cr ve formě rozpustných částic či nanočástic nebo Cr navázaného na proteiny, které nelze pomocí IE-HPLC-ICP-MS stanovit (detailně je tento problém řešen v případové studii, kapitola 5.2.7) [125]. Na druhou stranu ale porovnáním sumy celkového Cr v supernatantu a pevném podílu s celkovým Cr ve vzorcích bylo dosaženo srovnatelných výsledků u všech vzorků (výťažnost se pohybovala v rozmezí 82-126 %, preciznost nebyla vyšší než 12 %).

Tabulka XVIII Nalezené obsahy analytů v kontrolních vzorcích (výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD).

Vzorek	IE-HPLC-ICP-MS		ICP-MS		
	Rozpustný Cr(III) ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Celkový Cr(VI) ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Celkový rozpustný Cr (supernatant) ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Celkový vázaný Cr (pevný podíl) ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Celkový Cr v celé tkáni ($\mu\text{g g}^{-1}$)
K1	< LOQ	n.d.	0,07 ± 0,01	4,1 ± 0,1	4,2 ± 0,3
K2	0,18 ± 0,02	n.d.	0,17 ± 0,02	4,3 ± 0,2	3,6 ± 0,1
K3	0,12 ± 0,01	n.d.	0,14 ± 0,01	4,6 ± 0,1	4,9 ± 0,8
K4	0,13 ± 0,01	n.d.	0,12 ± 0,01	4,7 ± 0,2	4,0 ± 0,8
K5	0,11 ± 0,01	n.d.	0,11 ± 0,01	1,7 ± 0,1	2,3 ± 0,8
K6	0,12 ± 0,01	n.d.	0,14 ± 0,02	11 ± 0,5	12 ± 0,6
K7	0,14 ± 0,01	n.d.	0,18 ± 0,01	3,8 ± 0,1	4,5 ± 0,2
K8	0,13 ± 0,01	n.d.	0,12 ± 0,01	3,1 ± 0,2	3,6 ± 0,3
K9	0,18 ± 0,02	n.d.	0,16 ± 0,02	5,7 ± 0,2	6,8 ± 0,4
K10	0,35 ± 0,04	n.d.	0,36 ± 0,04	3,9 ± 0,2	4,7 ± 0,3
Medián ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,13	-	0,14	4,1	4,2
Průměr ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,14	-	0,16	4,3	4,6
SEM ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,03	-	0,02	0,82	0,82
CV	0,54	-	0,50	0,55	0,52

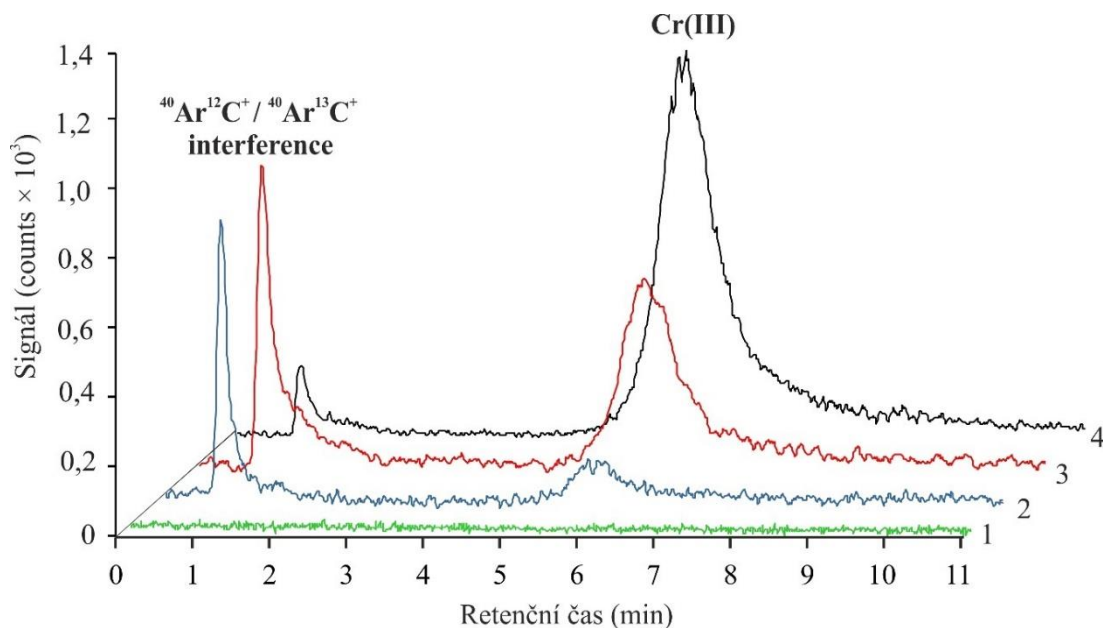
n.d.-nenalezen, SEM-střední chyba průměru ($\text{SEM} = \frac{s}{\sqrt{n}}$, kde s je směrodatná odchylka a n počet vzorků), CV-variační koeficient ($\text{CV} = \frac{s}{\bar{x}}$, kde s je směrodatná odchylka a \bar{x} aritmetický průměr)

Tabulka XIX Hodnoty naměřené v tkáních vrstvy 1 u pacientů s náhradou z Cr (výsledky jsou vyjádřeny jako průměr ± SD).

Vzorek	IE-HPLC-ICP-MS		ICP-MS		
	Rozpustný Cr(III) ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Celkový Cr(VI) ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Celkový rozpustný Cr (supernatant) ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Celkový vázaný Cr (pevný podíl) ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Celkový Cr v celé tkáni ($\mu\text{g g}^{-1}$)
P1*	2,3 ± 0,05	n.d.	10 ± 0,1 (2,46 ± 0,03)*	5119 ± 0,5	5129 ± 0,9
P2*	0,25 ± 0,03	n.d.	0,92 ± 0,04 (0,26 ± 0,01)*	381 ± 0,8	387 ± 0,7
P3*	< LOQ	n.d.	0,53 ± 0,03 (0,13 ± 0,01)*	28 ± 0,5	33 ± 0,6
P4	0,24 ± 0,02	n.d.	0,23 ± 0,01	18 ± 0,2	18 ± 0,3
P5*	2,6 ± 0,04	n.d.	14 ± 0,2 (2,8 ± 0,03)*	487 ± 0,9	516 ± 0,8
P6	0,16 ± 0,01	n.d.	0,20 ± 0,02	9,2 ± 0,4	8,3 ± 0,5
P7	0,22 ± 0,01	n.d.	0,22 ± 0,01	5,7 ± 0,2	6,5 ± 0,1
P8	0,26 ± 0,02	n.d.	0,21 ± 0,03	28 ± 0,4	35 ± 0,6
P9	0,87 ± 0,01	n.d.	1,1 ± 0,04	107 ± 0,8	86 ± 0,4
P10	0,29 ± 0,01	n.d.	0,31 ± 0,04	20 ± 0,2	22 ± 0,5
P11	0,39 ± 0,01	n.d.	0,40 ± 0,01	63 ± 0,5	65 ± 0,8
P12	< LOD	n.d.	0,32 ± 0,05	119 ± 0,5	118 ± 0,8
P13	< LOD	n.d.	0,20 ± 0,01	2,8 ± 0,01	3,7 ± 0,04
Medián ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,23	-	0,28	26	30
Průměr ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,44	-	0,69	279	284
SEM ($\mu\text{g g}^{-1}$)	0,12	-	0,17	182	183
CV	1,49	-	1,29	3,46	3,41

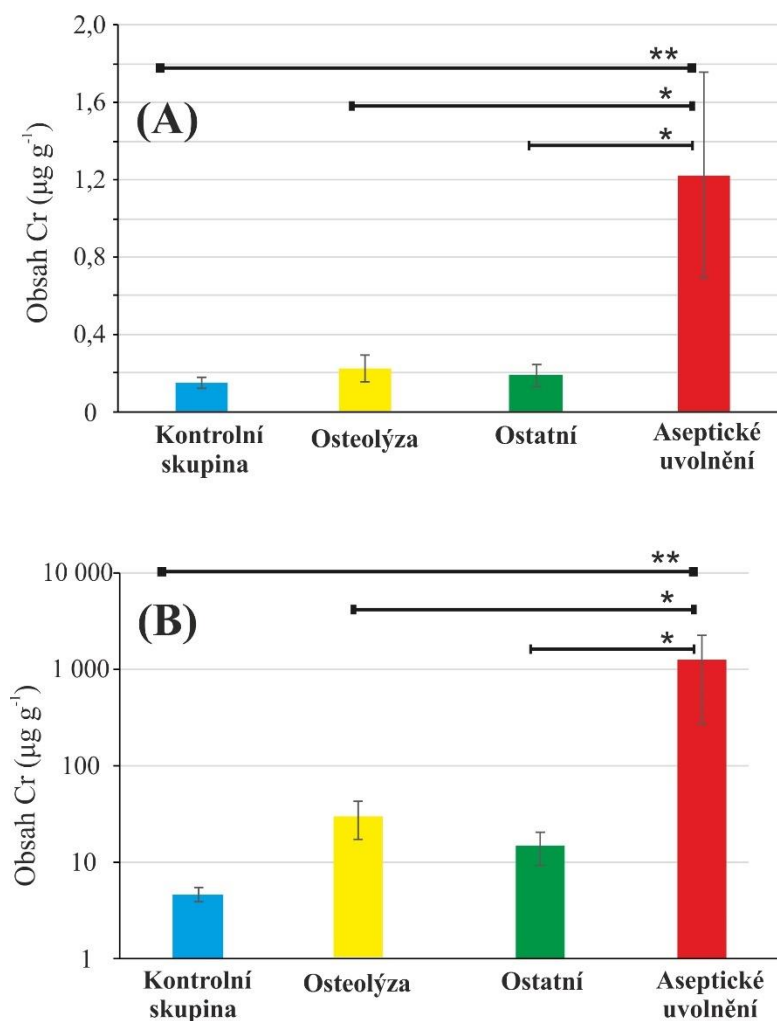
* výsledky z IE-HPLC-ICP-MS analýzy supernatantu neodpovídají stanovení celkového Cr v supernatantu pomocí ICP-MS (výtěžnost 368-558 %), hodnoty v závorkách představují výsledky po ultrafiltraci přes Amicon 3 kDa centrifugační filtry (výtěžnost 104-107 %)

n.d.-nenalezen, SEM-střední chyba průměru ($\text{SEM} = \frac{s}{\sqrt{n}}$, kde s je směrodatná odchylka a n počet vzorků), CV-variační koeficient ($\text{CV} = \frac{s}{\bar{x}}$, kde s je směrodatná odchylka a \bar{x} aritmetický průměr)



Obrázek 23 IE-HPLC-ICP-MS analýza 1 - slepého pokusu, 2 - kontrolního vzorku K5, 3 - vzorku pacienta P7, 4 - vzorku pacienta P7 obohaceného o $0,5 \mu\text{g g}^{-1} \text{}^{53}\text{Cr(III)}$ monitorující m/z 52 (1,2,3) a m/z 53 (4).

Následně byly výsledky porovnány s klinickými daty, kdy bylo zjištěno, že naměřené hodnoty volného Cr(III) i vázaného Cr v pevném podílu jsou silně ovlivněny důvodem pro revizní operaci totální endoprotézy. Nejvyšší hodnoty všech forem Cr byly nalezeny v případě aseptického uvolnění implantátu, kdy je porušena vazba mezi implantátem a kostí a je tak narušen jeho povrch. Naopak nejnižší uvolňování Cr bylo zaznamenáno v případě selhání z důvodu zánětu a bolesti kloubu nebo nestability kloubní náhrady. Detailní porovnání je zobrazeno na obrázku 24.



Obrázek 24 Srovnání průměrných množství (A) rozpustného Cr(III) a (B) vázaného Cr v tkáních pacientů vzhledem k důvodu revize, chybové úsečky vyjadřují SEM. Osy nad sloupci symbolizují výsledky Mann-Whitney testu kdy * značí $p < 0,05$ a ** $p < 0,01$ (ostatní - zánět, bolest kloubu a nestabilita).

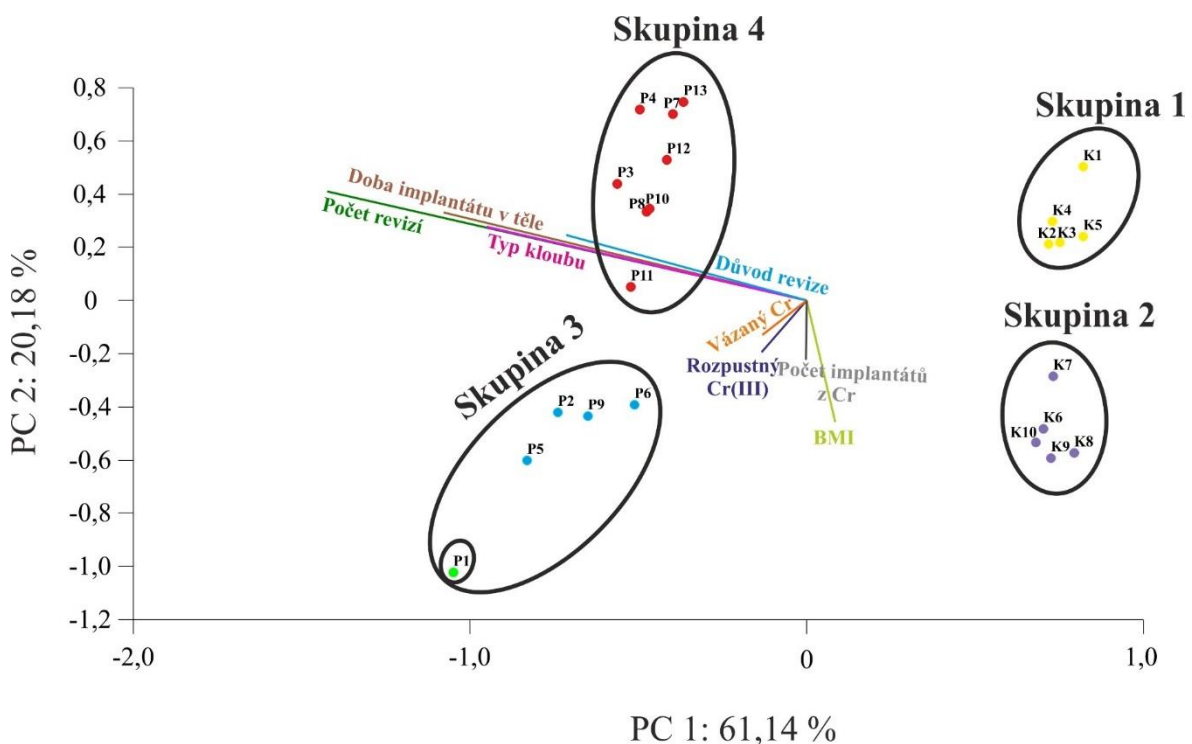
Získané výsledky tedy potvrzují závěry z mnoha studií zabývajících se speciální analýzou Cr v periprostetických tkáních pomocí solid-state technik [20-24]. Všechny identifikovaly jako hlavní formu Cr přítomnou v tomto typu vzorků zejména Cr(III) (ve formě CrPO_4 , Cr_2O_3 , popřípadě pak komplexy Cr(III) s organickými ligandy a proteiny). Nicméně, jediná studie stanovující množství uvolněného Cr do těchto tkání je práce Kuby a kol. [39], zaměřená pouze na stanovení celkového Cr v tomto typu tkání. Doposud tedy neexistuje žádná podobná práce stanovující množství uvolněných specií Cr do periprostetických tkání pacientů s kloubními náhradami.

5.2.6 Statistická analýza

Ve výsledcích získaných analýzou tkání vrstvy 1 získaných od pacientů s náhradou ze slitiny Co-Cr-Mo byla navíc pozorována velká variabilita. V tabulce XVIII a tabulce XIX je heterogenita biologických replikátů vyjádřena pomocí střední chyby průměru (SEM) a variačního koeficientu (CV), jsou zde uvedeny také průměry a mediány všech stanovovaných forem Cr v tkáních. Jak již bylo popsáno v předchozí studii zabývající se speciální analýzou v krvi a kloubních výpotcích, tento jev je u klinických/biologických vzorků běžný [119]. Jednotlivé vzorky byly totiž odebrány pacientům lišícím se v klinických datech. V případě tkání byl hlavním faktorem zejména důvod revizní operace totální endoprotézy. V dalším kroku byly výsledky obou skupin statisticky porovnány za využití Mann-Whitney testu. Byla potvrzena statisticky významně vyšší obsah rozpustného/volného Cr(III), vázaného Cr i celkového Cr ($p < 0,01$) ve vzorcích pacientů, čímž bylo prokázáno uvolňování Cr z kloubních náhrad do tkání. Ve skupině pacientů byly dále statisticky porovnány množství Cr vzhledem k důvodu provedené revize kloubu. Mann-Whitney test prokázal statisticky vyšší obsah všech forem Cr v tkáních pacientů trpících aseptickým uvolněním náhrady než bylo naměřeno v kontrolních tkáních i tkáních pacientů s osteolýzou a dalšími komplikacemi ($p < 0,05$) (obr. 24).

Na získaná data byla následně aplikována i metoda analýzy hlavních komponent (PCA). Tento nástroj vícerozměrné statistiky slouží k posouzení a prověření kvality naměřených dat a jejich zjednodušení bez velké ztráty informace. Za účelem potlačení kvantitativní a zvýšení kvalitativní funkce dat byla na data před aplikací PCA analýzy aplikována logaritmická transformace. K testování bylo vybráno 8 proměnných zahrnujících množství analyzovaných forem Cr (rozpustný/volný Cr(III), vázaný Cr), důvod revize, počet revizí (1-3), typ kloubu (kyčel/koleno), doba implantátu v těle, body mass index (BMI) a počet náhrad z Cr v těle. K výběru počtu hlavních komponent bylo využito Kaiserovo kritérium, kdy byly vybrány ty faktory, jejichž vlastní číslo bylo větší než 1. V tomto případě byly dostačující 2 hlavní komponenty popisující 81 % variability. Výsledky z PCA jsou zobrazeny na obrázku 25. Analýzou byla data rozdělena do 4 hlavních skupin na základě počtu náhrad ze slitiny Co-Cr-Mo v těle. Skupina 1 reprezentovala tkáň kontrolní skupiny získané od pacientů bez náhrady obsahující Cr. Skupina 2 zahrnovala zbytek vzorků tkání z kontrolní skupiny, tito pacienti měli v těle 1 náhradu ze slitiny Co-Cr-Mo avšak na jiném místě v těle než v místě odběru. Na základě PCA se kontrolní tkáň tedy lišily. Skupina 3 a skupina 4 obsahovaly vzorky pacientů. Pacienti ve skupině 3 měli v těle pouze 1 náhradu ze

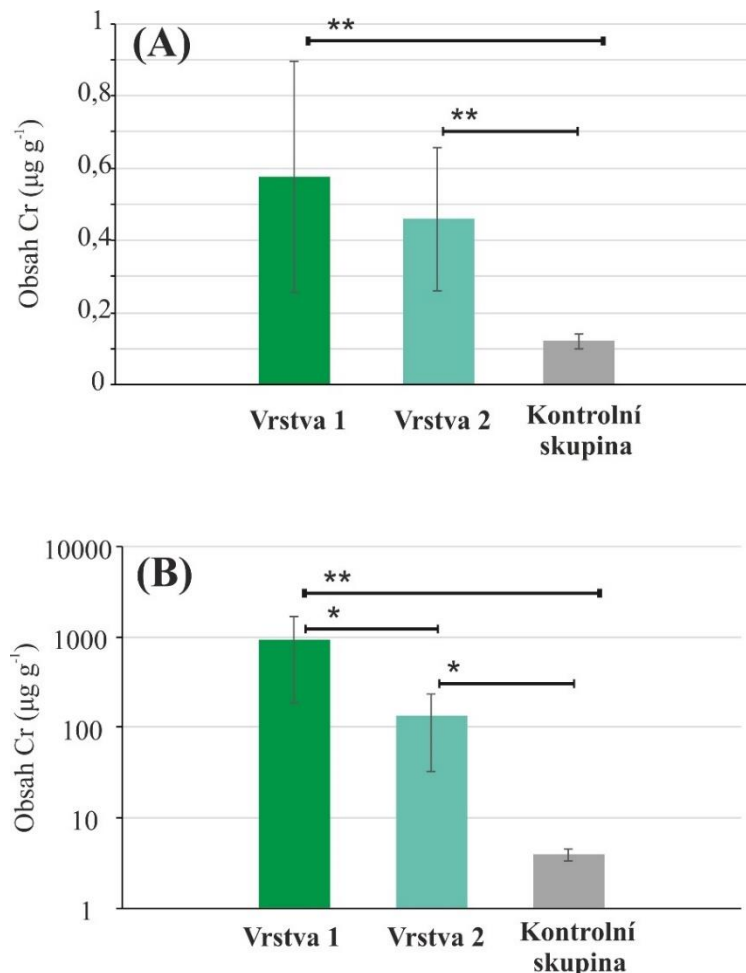
slitiny Co-Cr-Mo a to v místě odběru tkáně. Naopak skupina 4 zahrnovala pacienty se 2 náhradami ze slitiny Co-Cr-Mo. I když tedy tkáně nejsou odebírány z blízkosti náhrady obsahující Cr, stejně lze ve vzorcích tkání nelézt zvýšené hladiny všech forem Cr. Uvolněný Cr se pravděpodobně ihned dostává do krve (vazba na proteiny a jiné organické ligandy) a díky krevnímu oběhu se může snadno dostat do různých tkání (orgánů), kde se poté ukládá. Významným kritériem pro rozdělení do skupin byl také důvod revize/reoperace. Skupina 3 zahrnovala pouze pacienty s aseptickým uvolněním náhrady, naopak skupina 4 pacienty s ostatními komplikacemi. Tento výsledek tedy potvrdil závěry z předchozí kapitoly, tj. důvod reoperace má zásadní vliv na množství Cr uvolňovaného do tkání. Mimo to, PCA také odhalila jeden unikátní vzorek tkáně, který se od ostatních výrazně lišil. Pocházel od pacienta P1 trpícího metalózou, navíc jako jediný tento pacient podstoupil už 3. revizní operaci totální endoprotézy. Z tohoto důvodu byl tento pacient vybrán pro případovou studii (viz následující kapitola) zaměřenou na detailní stanovení všech forem Cr v tkáních.



Obrázek 25 Dvojný graf získaných dat z PCA, vektory symbolizují 8 vybraných parametrů.

Z důvodu studia uvolňování specií Cr i do vzdálenějších vrstev tkání od kloubního implantátu byly v dalším kroku podrobeny speciální analýze a frakcionaci i periprostetické tkáně vrstvy 2 a 3. Na získané výsledky bylo následně aplikováno několik statistických testů.

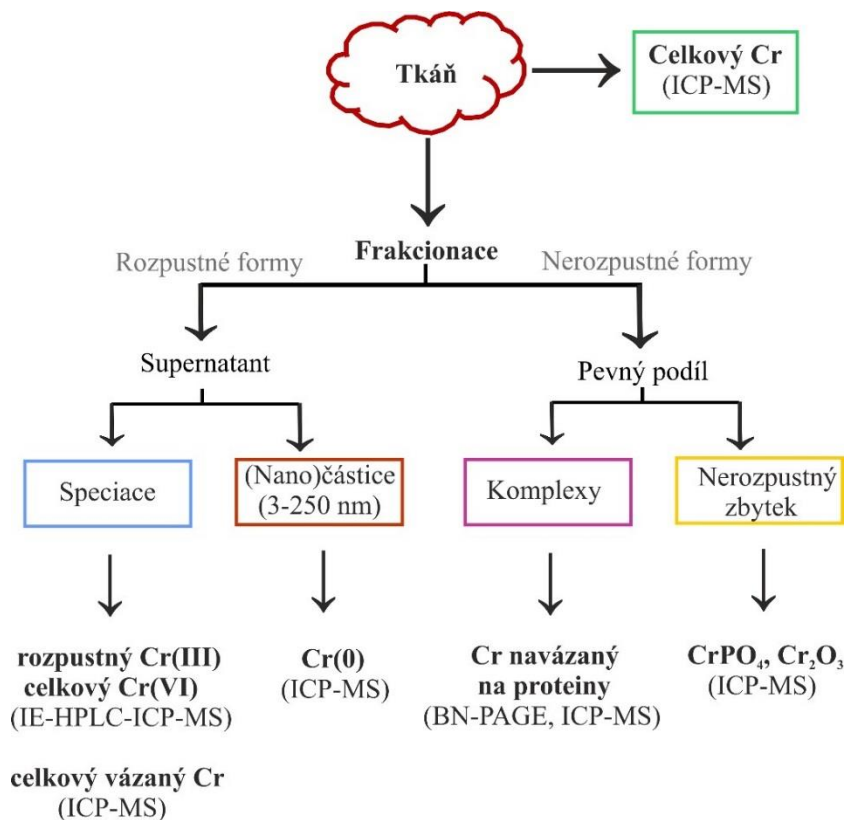
Mann-Whitney test byl použit pro srovnání výsledků tkání vrstvy 2 s výsledky kontrolní skupiny, kdy byly opět potvrzeny statisticky významné rozdíly v množství všech forem Cr. Pro srovnání množství všech forem Cr v tkáních vrstvy 1 a 2 od stejných pacientů ($n = 6$) byl použit Wilcoxonův párový test. Statisticky významné rozdíly byly nalezeny u vázaného Cr a celkového Cr, hodnoty rozpustného/volného Cr(III) se nelišily. Výsledky jsou shrnuty na obrázku 26. Data tkání vrstvy 3 nebyla vzhledem k nízkému počtu ($n = 1$) vzorků testována statistickými testy, množství Cr ale byla srovnána v kap. 5.2.7. Získané výsledky potvrzují významné uvolňování Cr z náhrad i do vzdálenějších vrstev periprostetických tkání, jeho množství závisí právě na blízkosti implantátu. To znamená, že čím dál od implantátu se tkáň nachází, tím jsou obsahy všech forem Cr nižší. Jednotlivé vrstvy periprostetických tkání tedy slouží jako ochranná bariéra bránící rozšíření uvolněných částic do celého těla.



Obrázek 26 Srovnání průměrných množství (A) rozpustného Cr(III) a (B) vázaného Cr v tkáních vrstvy 1, vrstvy 2 a kontrolní skupiny, chybové úsečky vyjadřují SEM. Osy nad sloupci symbolizují výsledky Mann-Whitney/Wilcoxonova párového testu kdy * značí $p < 0,05$ a ** $p < 0,01$.

5.2.7 Případová studie

V poslední části byla pozornost věnována případové studii zaměřené na pacienta P1. Tento pacient měl 78 let, jeho BMI bylo 27,8. Kvůli komplikacím způsobenými primární osteoartritidou byl nucen podstoupit výměnu kyčelního kloubu, kdy byl použit implantát typu Chirulen-Bicontact skládající se ze slitin Co-Cr-Mo a Ti-Al-V. Po 124 měsících ale musel být vyměněn z důvodu jeho aseptického uvolnění. Všechny získané vzorky periprostetických tkání (1., 2. a 3. vrstva) pocházely už z 3. revizní operace tohoto kloubu. Kromě výše popsané náhrady měl v těle ještě jednu kloubní náhradu, která byla vyrobena rovněž z Cr (typ Chirulen-Centrament, materiál: Co-Cr-Mo a Ti). Pacient P1 byl pro tuto studii vybrán na základě několika kritérií. Výsledky speciální analýzy jeho tkání se výrazně lišily od výsledků ostatních pacientů (naměřené obsahy všech forem Cr byly vyšší až o 3 řády), což bylo potvrzeno i pomocí PCA. Všechny periprostetické tkáně (tkáně všech vrstev) měly tmavě šedou barvu, což mohlo značit rozsáhlou metalózu. Navíc jako jediný podstoupil kvůli komplikacím způsobenými přítomností náhrady v těle 3 revizní operace kyčelního kloubu. Díky tomu byla periprostetická tkáň vrstvy 1 podrobena detailní studii zabývající se identifikací všech forem Cr v celé tkáni, ale i jejích frakcích získaných během speciální analýzy (supernatant, pevný podíl). Experimenty byly zaměřeny zejména na stanovení rozpustných částic a nanočástic Cr, Cr vázaného na proteiny a nerozpustných forem Cr (CrPO_4). Obrázek 27 popisuje strategii zvolenou pro identifikaci všech forem Cr ve vybraných tkáních. Tato studie výrazně přispívá k popisu distribuce různých forem Cr v periprostetických tkáních a mechanismu uvolňování Cr z kloubních náhrad do okolních tkání a následně do celého těla.

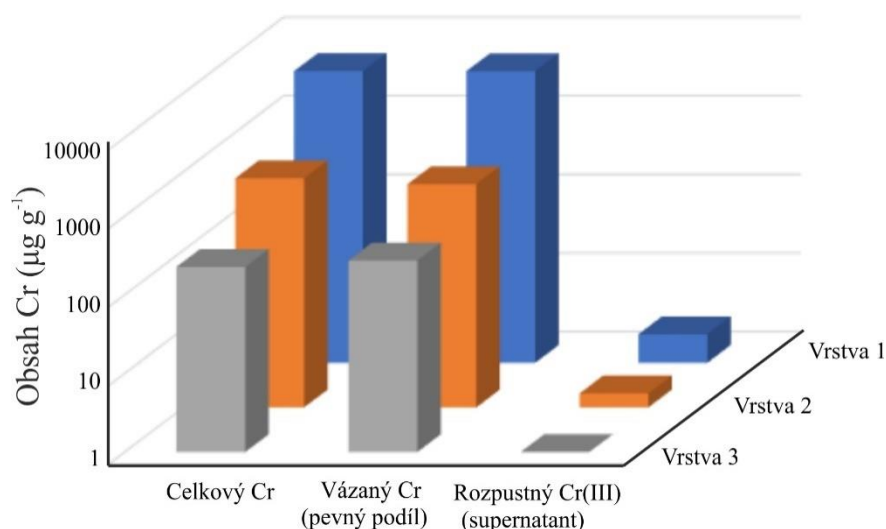


Obrázek 27 Schéma případové studie aplikované na vzorky tkáně vrstvy 1 pacienta P1. Kromě specií Cr(III), Cr(VI) a vázaného Cr byly ve frakcích tkání stanoveny i další rozpustné a nerozpustné formy Cr.

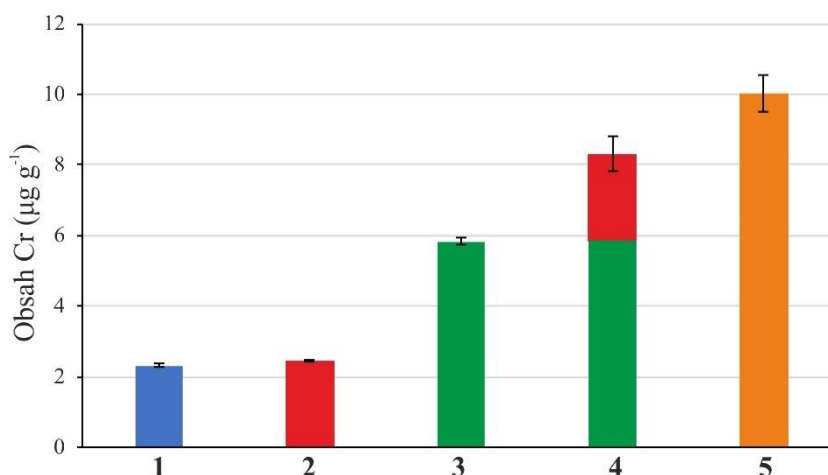
Speciační analýzou byly ve 3 různých vrstvách tkání tohoto pacienta stanoveny specie Cr(III) (volný i vázaný na pevný podíl), kdy nejvyšší hodnoty byly nalezeny v 1. vrstvě (pseudosynoviální membráně). Tato tkáň pravděpodobně slouží jako bariéra zachycující částice a nanočástice o velikosti 3-200 nm. Ve 2. a 3. vrstvě pak bylo nalezeno mnohonásobně nižší množství Cr (obr.28). Tímto byly potvrzeny výsledky porovnání 2 vrstev z předchozího odstavce a také závěry studie od Kuby a kol. [39].

Volné částice a nanočástice Cr, které negativně ovlivnily výsledky speciační analýzy, byly ve vzorcích supernatantu odděleny za využití Amicon 3kDa ultracentrifugačních filtrů (porozita těchto filtrů odpovídá 1,5-3 nm). Cr se totiž nemusí z náhrad uvolňovat pouze jako rozpustné/volné specie Cr(III) a Cr(VI), ale také jako elementární Cr(0) ve formě částic či nanočástic [125]. Tyto mají většinou průměr kolem 30 nm, tudíž běžné filtry mohly být pro jejich separaci nedostačující a způsobovat tak rozdíl v naměřených množství [126]. Získané výsledky z ICP-MS analýzy tkáně vrstvy 1 jsou uvedeny na obrázku 29. Ultrafiltrací přes Amicon 3kDa filtry došlo k výraznému snížení obsahu Cr v supernatantu (z 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ na 2,6

$\mu\text{g g}^{-1}$), jeho množství pak odpovídalo výsledkům z IE-HPLC-ICP-MS analýzy. Rozdíl byl nalezen v pevném podílu na filtru, čímž byla potvrzena hypotéza o částicích a nanočásticích Cr uvolňovaných z implantátů. Použití filtrů o porozitě $0,20 \mu\text{m}$ tedy nadhodnocuje získané výsledky a není dostačující pro stanovení pouze rozpustných/volných Cr(III) a Cr(VI) v tkáních. Aplikace ultrafiltrace s využitím centrifugačních filtrů jako jediná umožňuje odstranění nežádoucích částic i nanočástic.

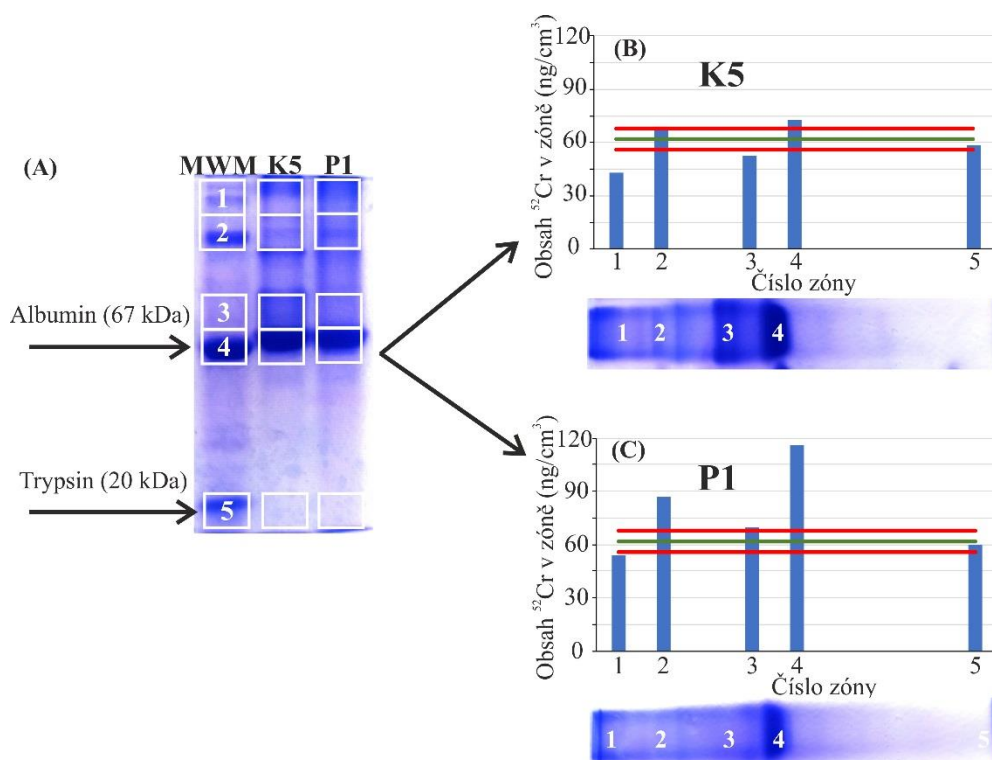


Obrázek 28 Srovnání množství volného Cr(III), vázaného Cr a celkového Cr ve 3 různých vrstvách periprostetické tkáně pacienta P1.



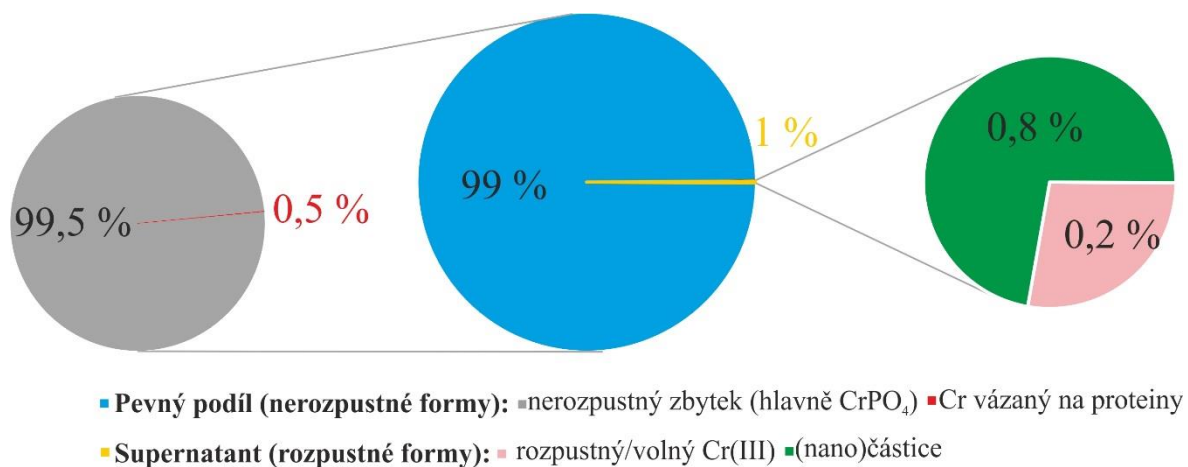
Obrázek 29 Detailní porovnání obsahu Cr v alkalickém extraktu tkáně vrstvy 1 pacienta P1 stanoveného jako (1) suma Cr(III) a Cr(VI) - *IE-HPLC-ICP-MS*, (2) celkový volný Cr v extraktu po ultrafiltraci - *ICP-MS* a v (3) pevném podílu na filtru - *ICP-MS*. (4) Suma množství Cr v extraktu po ultrafiltraci a v pevném podílu odpovídala (5) množství celkového Cr původně stanoveném pomocí ICP-MS po filtraci supernatantu za použití běžných filtrů s velikostí pórů $0,20 \mu\text{m}$ (5).

V dalším kroku byly analyzovány specíe Cr v pevném podílu. Ve vodě rozpustné komplexy proteinů s navázaným Cr byly stanoveny po extrakci octanem amonným pomocí BN-PAGE elektroforézy. Tento typ elektroforézy byl zvolen kvůli nedenaturujícím podmínkám, které by mohly mít vliv na vazbu Cr s proteiny. K analýzám byl vybrán směsný standard albuminu ($M_w = 67$ kDa), ke kterému se ochotně váže Cr(III), a trypsinu ($M_w = 20$ kDa). Dále byl analyzován extrakt kontrolního vzorku (K5) a tkáňe vrstvy 1 od pacienta P1. Záznam gelu se zónami obarvenými pomocí Coomassie Brilliant Blue je zobrazen na obrázku 30. Jak je vidět, v obou extraktech byl přítomen kromě ostatních proteinů hlavně albumin. Následně byly z druhé půlky gelu vyříznuty viditelné zóny ($n = 5$, obr.30A) podle rozmístění zón na první obarvené polovině gelu a po mikrovlnném rozkladu v nich byl stanoven celkový obsah Cr, Mo, Al, Co, Ti, pomocí ICP-MS (obr. 30B, 30C). V extraktech tkání K5 i P1 bylo nalezeno zvýšené množství Cr v oblasti zóny č. 2 a zejména pak v oblasti zóny č. 4, které se shodovaly se zónami pro albumin. Nicméně Cr byl v zónách pro albumin doprovázen i dalšími kovy jako Co a Al (data nejsou prezentována). Tímto experimentem tedy byla potvrzena afinita Cr, ale i dalších kovů k tomuto proteinu v biologických tkáních.



Obrázek 30 (A) Separace komplexů Cr s proteiny a množství celkového Cr nalezená ve vybraných zónách („bandech“) ((B) extrakt kontrolního vzorku K5, (C) extrakt tkáňe vrstvy 1 pacienta P1). Zelená čára představuje průměrné hodnoty pro marker molekulové hmotnosti, červené čáry odpovídají směrodatným odchylkám (\pm SD).

Nakonec byl zbytek pevného podílu analyzován pomocí validované ICP-MS metody z důvodu stanovení ostatních nerozpustných forem Cr. Na základě dostupné literatury se zde Cr může vyskytovat buď jako CrPO_4 nebo Cr_2O_3 , které jsou téměř nerozpustné, tudíž se je nepodařilo vyextrahovat žádnou použitou metodou [20-24, 127]. Po rozkladu pevného podílu bylo ICP-MS analýzou potvrzeno, že v případě pacienta P1 to bylo dokonce 99 % z celkového množství Cr ($4\,980\ \mu\text{g g}^{-1}$). Ze získaných výsledků vyplývá, že většina Cr se v periprostetických tkáních s největší pravděpodobností nachází hlavně jako CrPO_4 , kdy se volný Cr(III) ihned váže do komplexu s fosforečnanem. V menší míře pak může existovat i jako Cr_2O_3 . Okamžitě po uvolnění z implantátů se zde tedy Cr nevyskytuje převážně ve formě částic ale jako rozpustný/volný Cr(III) stejně jako je tomu u kontrolních vzorků [127]. Následně dochází díky vysoké afinitě Cr(III) k tvorbě komplexů s proteiny a dalšími ligandy. Vzhledem k nedostupnosti solid-state speciálních technik bohužel nemohl být tento závěr experimentálně potvrzen. Porovnání zastoupení všech forem Cr v periprostetické tkáni vrstvy 1 pacienta P1 je zobrazeno na obrázku 31.



Obrázek 31 Výsledky případové studie zabývající se stanovením všech forem Cr v tkáních pacienta P1.

5.3 Závěr

Prezentovaný analytický přístup využívající kombinaci metod IE-HPLC-ICP-MS a ICP-MS umožňuje provést jednak identifikaci volných specií Cr(III) a Cr(VI), ale dokonce i stanovení ostatních forem Cr v biologických tkáních. Jedná se tak o první aplikaci on-line speciální analýzy na tento typ biologických vzorků, do této doby byly tkáně analyzovány především solid-state speciálními technikami. Obě vyvinuté metody byly validovány a následně využity ke kvantitativnímu stanovení volných specií Cr, vázaného Cr i celkového Cr ve 2 CRM a 30 reálných vzorcích periprostetických tkání získaných od pacientů s kloubní náhradou. Ve všech vzorcích byl nalezen zejména vázaný Cr (Cr(III)), pouze asi 1 % z celkového Cr bylo v jeho volné formě. V žádném vzorku nebyl nalezen Cr(VI), a to pravděpodobně z důvodu interkonverze této specie způsobené charakterem matrice vzorků, jejíž studium bylo také součástí této práce. V porovnání s kontrolní skupinou byly u pacientů s kloubní náhradou ze slitiny Co-Cr-Mo nalezeny statisticky významně vyšší obsahy všech analyzovaných forem Cr. Prezentovaná studie také jako první systematicky zkoumá vztah mezi obsahem všech stanovovaných forem Cr a klinickými parametry jako například počet revizí, jejich důvod nebo doba implantátu v těle. Bylo zjištěno, že významnými faktory pro uvolňování Cr je počet implantátů z Cr v těle a důvod revize. Statistickými testy bylo dokázáno, že Cr se z implantátů uvolňuje i do vzdálenějších vrstev, jeho množství je výrazně ovlivněno právě vzdáleností tkáně od implantátu. Důležitou součástí byla i případová studie zabývající se stanovením všech rozpustných i nerozpustných forem Cr ve vybraných tkáních. Díky tomu bylo zjištěno, že většina navázaného Cr je ve formě nerozpustných sloučenin typu CrPO_4 nebo Cr_2O_3 , které je téměř nemožné vyextrahovat. Kromě toho byly ve vzorcích nalezeny i nízké obsahy částic, nanočástic a komplexů Cr s proteiny. Vyvinutá kombinace metod má značný potenciál stát se efektivnější a spolehlivější alternativou k doposud využívaným solid-state speciálním technikám (XAS, XRF atd.) používaných při studiu vlivu uvolňovaných specií Cr z kloubních náhrad na lidské zdraví. Velkou otázkou ale doposud zůstává identifikace nerozpustného zbytku v pevném podílu. Nejlepší volbou by v takovém případě byla aplikace XANES, která ale momentálně není v České republice dostupná. Další možnost nabízí spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií využívající měkké ionizační techniky umožňující identifikaci složitých struktur, což by bylo vhodné zejména pro komplexy s navázaným Cr. Analytický postup využívající spojení prvkově selektivního ICP-MS detektoru s organickou hmotnostní spektrometrií by tak v budoucnu mohl být dokonalý nástroj pro identifikaci všech možných specií chromu.

6. ZÁVĚR

V rámci této disertační práce bylo řešeno téma využití on-line speciálních technik vhodných pro stanovení specií Cr v biologických materiálech. Tyto techniky vynikají mnoha výhodami, a to především nízkými LOD a selektivou, rychlostí vlastní analýzy nebo spotřebou minimálního množství vzorku.

První část byla zaměřena na stanovení specií Cr(III) a Cr(VI) v krvi a kloubních výpotcích. Důraz byl kladen zejména na vývoj a optimalizaci efektivní a jednoduché přípravy reálných vzorků. Řadě optimalizací byla podrobena i separace využívající spojení IP-RP-HPLC a ICP-MS detekce. Vyvinutá metoda byla následně validována v rozsahu linearity, meze detekce, mez stanovitelnosti, pravdivosti a preciznosti. Společně se speciemi Cr byl také v každém vzorku stanoven celkový Cr pomocí validované metody využívající ICP-MS. Významnou součástí bylo i studium polyatomických interferencí negativně ovlivňujících stanovení Cr v tak složité matrici jakou představují krev a kloubní výpotek. Přítomné interference byly způsobeny vysokým obsahem C a Cl v matrici. Vyvinutá metoda byla následně aplikována na sadu reálných vzorků získaných od pacientů s kloubními náhradami, kde bylo studováno uvolňování specií Cr z náhrad různých materiálů. Ze získaných výsledků vyplývá, že hlavní specií uvolňovanou z náhrad obsahujících Cr je Cr(III), který se okamžitě váže na proteinovou část vzorku. Naopak Cr(VI) byl nalezen ve vzorcích pouze ve stopových koncentracích. Podle dostupné literatury je ale přítomnost této specie v reálných vzorcích velmi vzácná, protože velice rychle dochází k její okamžité redukci na Cr(III) vlivem redukčních vlastností organické matrice. Nicméně většina vybraných pacientů trpěla cukrovkou druhého typu, což mohlo mít vliv na zpětnou oxidaci Cr(III) na Cr(VI). Šestimocný chrom se zde pak může vyskytovat ve stopových koncentracích. Další možností mohla být existence záporně nabitého Cr(III), jehož retenční čas se shodoval s Cr(VI). V porovnání s kontrolní skupinou byly statisticky vyšší koncentrace všech forem Cr potvrzeny pouze v kloubních výpotcích. Tyto výsledky tedy poukazují na to, že krev není vhodným materiálem pro studium intoxikace Cr(VI) případně vlivu materiálů implantátů na lidské zdraví.

Druhá část disertační práce se věnovala vývoji nové strategie pro stanovení specií Cr v biologických tkáních. Pro tyto účely byla vyvinuta metoda IE-HPLC-ICP-MS vhodná pro analýzu Cr(III) a Cr(VI) najednou, pro jejich izolaci z tkání byla zvolena alkalická extrakce. Z důvodu stanovení hmotnostní bilance mezi speciemi Cr a celkovým Cr byla vyvinuta i metoda využívající ICP-MS. Obě metody byly optimalizovány v několika parametrech

(separace, příprava vzorku, detekce atd.) a validovány podle doporučení uvedeného v pokynech pro validaci bioanalytických metod z Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA). Po ověření na dvou certifikovaných referenčních materiálech byly následně obě metody aplikovány na sadu 20 vzorků periprostetických tkání různých vrstev pocházejících od pacientů s náhradou obsahující Cr a 10 kontrolních vzorků. I v této matici byl nalezen hlavně Cr(III) vázaný na pevný podíl, pouze 1 % z celkového obsahu Cr pak zaujímal volný Cr(III) stanovený speciální analýzou. Na rozdíl od krve a kloubního výpotku ale Cr(VI) nebyl nalezen v žádném vzorku. Detailně byly studovány opět polyatomické interference, kdy byly identifikovány interference pocházející z vysokého obsahu C v tkáních. Významnou součástí představovalo studium interkonverze obou specií využívající izotopicky obohacených standardů. Díky tomu byla zjištěna 30% redukce Cr(VI) na Cr(III) způsobená charakterem matrice tkání, což má zásadní vliv na výskyt této specie v reálných vzorcích. Dalším bodem bylo statistické vyhodnocení dat. Získané výsledky byly porovnány s kontrolní skupinou, kdy byl nalezen statisticky významný rozdíl v množství všech forem Cr. Dále byl zjištěn vliv počtu náhrad z Cr v těle a důvodu revize na naměřeném obsahu všech studovaných forem Cr v tkáních. Detailní studium vzorků od vybraného pacienta navíc umožnilo stanovit i další formy Cr (částice a nanočástice, Cr vázaný na proteiny atd.) v tkáních, které mohou zkreslovat vlastní speciální analýzu

Díky vyvinutým metodám využívajícím spojení HPLC-ICP-MS byly potvrzeny výhody této techniky jako je potřeba minimálního množství vzorku, nízké meze detekce, selektivita i rychlost speciální analýzy. Nespornou výhodou je také možnost identifikace interkonverze Cr(III) a Cr(VI) za využití izotopicky obohacených standardů, která může zkreslovat získané výsledky. U speciace Cr v biologických vzorcích se zde jedná o dokonce první aplikaci tohoto přístupu. Nicméně bylo nutné řešit i nevýhody tohoto spojení, které představují zejména polyatomické interference. V případě analýz všech biologických vzorků se je ale podařilo identifikovat a jejich signály také úspěšně odseparovat od signálů Cr(III) a Cr(VI). Díky tomu mohou všechny dosažené výsledky přispět k lepšímu porozumění chování náhrad v tělech pacientů a uvolňování různých forem Cr do biologických materiálů. Disertační práce tedy jednoznačně ukazuje, že on-line speciální techniky jsou výborným nástrojem pro charakterizaci Cr(III) a Cr(VI) i v tak složité matici jakou představují biologické vzorky. Stále velkou výzvou ale zůstávají další neznámé specie Cr (především v komplexech s různými složkami matrice), jejichž identifikaci a detailní popis struktur by v budoucnu mohlo usnadnit multimodální přístup zahrnující kombinaci HPLC-ICP-MS s molekulovou

hmotnostní spektrometrií založenou na využití měkkých ionizačních technik (HPLC-MS/MS, MALDI-MS apod.).

7. REFERENCE

- [1] R.C. Cornelis, J. A.; Crews, H.; Heumann, K. G., Handbook of Elemental Speciation II Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health, Chichester, 2004.
- [2] A. Pechova, L. Pavlata, Chromium as an essential nutrient: a review, *Vet. Med.* 52 (2007) 1-18.
- [3] D. Bagchi, S.J. Stohs, B.W. Downs, M. Bagchi, H.G. Preuss, Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium - Reply, *Toxicology* 186 (2003) 175-177.
- [4] R. Pechancova, T. Pluhacek, D. Milde, Recent advances in chromium speciation in biological samples, *Spectrochim. Acta Part B-At. Spectrosc.* 152 (2019) 109-122.
- [5] B. Markiewicz, I. Komorowicz, A. Sajnog, M. Belter, D. Baralkiewicz, Chromium and its speciation in water samples by HPLC/ICP-MS - technique establishing metrological traceability: A review since 2000, *Talanta* 132 (2015) 814-828.
- [6] L.S. McNeill, J.E. McLean, J.L. Parks, M. Edwards, Hexavalent chromium review, part 2: Chemistry, occurrence, and treatment, *Journal American Water Works Association* 104 (2012) 39-40.
- [7] D. Bagchi, S.J. Stohs, B.W. Downs, M. Bagchi, H.G. Preuss, Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium, *Toxicology* 186 (2003) 175-177.
- [8] J.B. Vincent, The biochemistry of chromium, *J. Nutr.* 130 (2000) 715-718.
- [9] S.A. Abbasi, R. Soni, TERATOGENIC EFFECTS OF CHROMIUM(VI) IN ENVIRONMENT AS EVIDENCED BY THE IMPACT ON LARVAE OF AMPHIBIAN RANA TIGRINA - IMPLICATIONS IN THE ENVIRONMENTAL-MANAGEMENT OF CHROMIUM, *International Journal of Environmental Studies* 23 (1984) 131-137.
- [10] A. Zhitkovich, Chromium in Drinking Water: Sources, Metabolism, and Cancer Risks, *Chem. Res. Toxicol.* 24 (2011) 1617-1629.
- [11] S. Langard, M. Costa, Chromium, 2007.
- [12] <https://arnika.org/chrom>, staženo 19.1.2020.
- [13] D.R. Bijukumar, A. Segu, J.C.M. Souza, X.J. Li, M. Barba, L.G. Mercuri, J.J. Jacobs, M.T. Mathew, Systemic and local toxicity of metal debris released from hip prostheses: A review of experimental approaches, *Nanomed. Nanotechnol.* 14 (2018) 951-963.
- [14] ÚZIS ČR, Národní registr kloubních náhrad 2018, staženo 20. 11. 2019, <https://www.uzis.cz/registry-nzis/nrkn>.
- [15] A. L., Polymerní kostní implantáty: Přehled trvalých a vstřebatelných náhrad a výplní, in, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Zlín, 2015.

- [16] G. Sagratini, G. Caprioli, G. Cristalli, D. Giardina, M. Ricciutelli, R. Volpini, Y.T. Zuo, S. Vittori, Determination of ink photoinitiators in packaged beverages by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1194 (2008) 213-220.
- [17] A.K. Madl, M. Kovochich, M. Liang, B.L. Finley, D.J. Paustenbach, G. Oberdorster, Toxicology of wear particles of cobalt-chromium alloy metal-on-metal hip implants Part II: Importance of physicochemical properties and dose in animal and in vitro studies as a basis for risk assessment, *Nanomedicine-Nanotechnology Biology and Medicine* 11 (2015) 1285-1298.
- [18] K. Řehák, Vývoj endoprotéz in: *Fakulta strojního inženýrství, Vysoké učení technické v Brně Brno, 2008.*
- [19] H. Matusiewicz, Potential release of in vivo trace metals from metallic medical implants in the human body: From ions to nanoparticles - A systematic analytical review, *Acta Biomater.* 10 (2014) 2379-2403.
- [20] A. Di Laura, P.D. Quinn, V.C. Panagiotopoulou, H.S. Hothi, J. Henckel, J.J. Powell, F. Berisha, F. Amary, J.F.W. Mosselmans, J.A. Skinner, A.J. Hart, The Chemical Form of Metal Species Released from Corroded Taper Junctions of Hip Implants: Synchrotron Analysis of Patient Tissue, *Sci. Rep.* 7 (2017).
- [21] A.E. Goode, J.M. Perkins, A. Sandison, C. Karunakaran, H.K. Cheng, D. Wall, J.A. Skinner, A.J. Hart, A.E. Porter, D.W. McComb, M.P. Ryan, Chemical speciation of nanoparticles surrounding metal-on-metal hips, *Chem. Commun.* 48 (2012) 8335-8337.
- [22] A.J. Hart, P.D. Quinn, B. Sampson, A. Sandison, K.D. Atkinson, J.A. Skinner, J.J. Powell, J.F.W. Mosselmans, The chemical form of metallic debris in tissues surrounding metal-on-metal hips with unexplained failure, *Acta Biomater.* 6 (2010) 4439-4446.
- [23] A.J. Hart, A. Sandison, P. Quinn, B. Sampson, K.D. Atkinson, J.A. Skinner, A. Goode, J.J. Powell, J.F.W. Mosselmans, Microfocus study of metal distribution and speciation in tissue extracted from revised metal on metal hip implants, 14th International Conference on X-Ray Absorption Fine Structure, *J. Phys. Conf. Ser.* 190 (2009).
- [24] I. Swiatkowska, J.F.W. Mosselmans, T. Geraki, C.C. Wyles, J.J. Maleszewski, J. Henckel, B. Sampson, D.B. Potter, I. Osman, R.T. Trousdale, A.J. Hart, Synchrotron analysis of human organ tissue exposed to implant material, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 46 (2018) 128-137.
- [25] Y.F. Wang, H. Su, Y.L. Gu, X. Song, J.S. Zhao, Carcinogenicity of chromium and chemoprevention: a brief update, *Onco Targets Ther.* 10 (2017) 4065-4079.

- [26] M.B. Arain, I. Ali, E. Yilmaz, M. Soylak, Nanomaterial's based chromium speciation in environmental samples: A review, *Trends Anal. Chem.* 103 (2018) 44-55.
- [27] L. Trzonkowska, B. Lesniewska, B. Godlewska-Zylkiewicz, Recent Advances in On-Line Methods Based on Extraction for Speciation Analysis of Chromium in Environmental Matrices, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 46 (2016) 305-322.
- [28] E.M. Hamilton, S.D. Young, E.H. Bailey, M.J. Watts, Chromium speciation in foodstuffs: A review, *Food Chem.* 250 (2018) 105-112.
- [29] A.K. Das, R. Chakraborty, M.L. Cervera, M. delaGuardia, Metal speciation in biological fluids - A review, *Mikrochim. Acta* 122 (1996) 209-246.
- [30] B. Michalke, *Metallomics: Analytical Techniques and Speciation Methods*, Weinheim, 2016.
- [31] A. Akhtar, T.G. Kazi, H.I. Afridi, M. Khan, M. Bilal, N. Khan, Application of modified cloud point extraction method for the chromium speciation in artificial saliva extracts of different snuff products, *J. Ind. Eng. Chem.* 59 (2018) 320-327.
- [32] D.L. Tsalev, *Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Practice*, Boca Raton 1995.
- [33] B. Finley, P.K. Scott, M.E. Glynn, D. Paustenbach, E. Donovan, K.A. Thuett, Chromium speciation in the blood of metal-on-metal hip implant patients, *Toxicol. Environ. Chem.* 99 (2017) 48-64.
- [34] J.M. Christensen, E. Holst, J.P. Bonde, L. Knudsen, Determination of chromium in blood and serum - evaluation of quality-control procedures and estimation of reference values in danish subjects, *Sci. Total Environ.* 132 (1993) 11-25.
- [35] R. Cornelis, Involvement of analytical chemistry in chemical speciation of metals in clinical samples, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 26 (1996) 252-263.
- [36] R. Cornelis, F. Borguet, S. Dyg, B. Griepink, Chromium speciation studies in human plasma and stability studies of Cr(III) and Cr(VI) species in a candidate water reference material, *Microchim. Acta* 109 (1992) 145-148.
- [37] A. Alimonti, F. Petrucci, B. Santucci, A. Cristaudo, S. Caroli, Determination of chromium and nickel in human blood by means of inductively-coupled plasma-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 306 (1995) 35-41.
- [38] Y.N. Ordonez, M. Montes-Bayon, E. Blanco-Gonzalez, J. Paz-Jimenez, J.M. Tejerina-Lobo, J.M. Pena-Lopez, A. Sanz-Medel, Metal release in patients with total hip arthroplasty by DF-ICP-MS and their association to serum proteins, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 1037-1043.

- [39] M. Kuba, T. Pluháček, M. Hobza, J. Gallo, D. Milde, Content of distinct metals in periprosthetic tissues and pseudosynovial joint fluid in patients with total hip arthroplasty *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 107 (2018) 454-462.
- [40] H.M. Perry, H.A. Schroeder, I.H. Tipton, M.J. Cook, Variability in metal content of human organs, *J. Lab. Clin. Med.* 60 (1962) 245-253.
- [41] H.A. Schroeder, J.J. Balassa, I.H. Tipton, Abnormal trace metals in man-chromium, *J. Chronic Dis.* 15 (1962) 941-964.
- [42] S.S. Jakobsen, G. Danscher, M. Stoltenberg, A. Larsen, J.M. Bruun, T. Mygind, K. Kemp, K. Soballe, Cobalt-chromium-molybdenum alloy causes metal accumulation and metallothionein up-regulation in rat liver and kidney, *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 101 (2007) 441-446.
- [43] S. Caroli, A. Alimonti, E. Coni, F. Petrucci, O. Senofonte, N. Violante, The assessment of reference values for elements in human biological tissues and fluids - A systematic review, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 24 (1994) 363-398.
- [44] E. Damastuti, N. Adventini, W.Y.N. Syahfitri, S. Kurniawati, D.D. Lestiani, M. Santoso, Assessment of Heavy Metals on Occupationally Exposed Workers from Hair Analysis, *Atom Indonesia* 43 (2017) 119-126.
- [45] D.M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.G. Danielsson, H. Muntau, H.P. Van Leeuwen, R. Lobinski, Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000), *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1453-1470.
- [46] R. Cornelis, *Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology*, John Wiley Sons Ltd., Chichester, 2003.
- [47] R. Lobinski, J. Szpunar, Biochemical speciation analysis by hyphenated techniques, *Analytica Chimica Acta* 400 (1999) 321-332.
- [48] B. Novotnik, T. Zuliani, J. Scancar, R. Milacic, Chromate in food samples: an artefact of wrongly applied analytical methodology?, *J. Anal. At. Spectrom.* 28 (2013) 558-566.
- [49] G.A. Afolaranmi, J.N.A. Tettey, H.M. Murray, R.M.D. Meek, M.H. Grant, The effect of anticoagulants on the distribution of chromium VI in blood fractions, *J. Arthro.* 25 (2010) 118-120.
- [50] K.M. Shah, P.D. Quinn, A. Gartland, J.M. Wilkinson, Understanding the tissue effects of tribo-corrosion: Uptake, distribution, and speciation of cobalt and chromium in human bone cells, *J. Orthop. Res* 33 (2015) 114-121.

- [51] C.F. Lee, B.H. Chen, Y.L. Huang, Determining Cr(III) and Cr(VI) in urine using a flow injection on-line sorption separation system coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry and a UV/nano-Au/TiO₂ photocatalysis reduction device, *Talanta* 77 (2008) 546-550.
- [52] H.J. Wang, X.M. Du, M. Wang, T.C. Wang, O.Y. Hong, B. Wang, M.T. Zhu, Y. Wang, G. Jia, W.Y. Feng, Using ion-pair reversed-phase HPLC ICP-MS to simultaneously determine Cr(III) and Cr(VI) in urine of chromate workers, *Talanta* 81 (2010) 1856-1860.
- [53] M. Rajabi, S. Arghavani-Beydokhti, B. Barfi, A. Asghari, Dissolvable layered double hydroxide as an efficient nanosorbent for centrifugeless air-agitated dispersive solid-phase extraction of potentially toxic metal ions from bio-fluid samples, *Anal. Chim. Acta* 957 (2017) 1-9.
- [54] V. Vacchina, I. de la Calle, F. Seby, Cr(VI) speciation in foods by HPLC-ICP-MS: investigation of Cr(VI)/food interactions by size exclusion and Cr(VI) determination and stability by ion-exchange on-line separations, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 3831-3839.
- [55] M. Bonta, S. Torok, B. Hegedus, B. Dome, A. Limbeck, A comparison of sample preparation strategies for biological tissues and subsequent trace element analysis using LA-ICP-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 1805-1814.
- [56] M. Montes-Bayon, M. Sharar, M. Corte-Rodriguez, Trends on (elemental and molecular) mass spectrometry based strategies for speciation and metallomics, *Trends Analyt. Chem.* 104 (2018) 4-10.
- [57] Y.W. Wu, J. Zhang, J.F. Liu, L. Chen, Z.L. Deng, M.X. Han, X.S. Wei, A.M. Yu, H.L. Zhang, Fe₃O₄@ZrO₂ nanoparticles magnetic solid phase extraction coupled with flame atomic absorption spectrometry for chromium(III) speciation in environmental and biological samples, *Appl. Surf. Sci.* 258 (2012) 6772-6776.
- [58] Y.W. Wu, J. Zhang, J.F. Liu, Z.L. Deng, M.X. Han, F. Jiang, D.Z. Wang, H.K. Wang, H.Z. Yuan, Determination of chromium species in environmental water and human serum samples by FAAS after magnetic solid phase extraction, *At. Spectrosc.* 32 (2011) 41-47.
- [59] M.S. Luz, A.L. Souza, A. Haddad, A. Tartomano, P.V. Oliveira, IN VITRO Cr(VI) SPECIATION IN SYNTHETIC SALIVA AFTER RELEASING FROM ORTHODONTIC BRACKETS USING SILICA-APTES SEPARATION AND GF AAS DETERMINATION, *Quim. Nova* 39 (2016) 951-955.
- [60] S. Sadeghi, A.Z. Moghaddam, Solid-phase extraction and HPLC-UV detection of Cr(III) and Cr(VI) using ionic liquid-functionalized silica as a hydrophobic sorbent, *Anal. Methods* 6 (2014) 4867-4877.

- [61] A. Akhtar, T.G. Kazi, H.I. Afridi, S.G. Musharraf, F.N. Talpur, N. Khan, M. Bilal, M. Khan, Vortex-assisted ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction for assessment of chromium species in artificial saliva extract of different chewing tobacco products, *Environ. Sci. Pollut. R.* 23 (2016) 25288-25298.
- [62] S. Sadeghi, A.Z. Moghaddam, Task-specific ionic liquid based in situ dispersive liquid-liquid microextraction for the sequential extraction and determination of chromium species: optimization by experimental design, *Rsc Advances* 5 (2015) 60621-60629.
- [63] H. Shirkhanloo, A.A.M. Beigi, M.M. Eskandari, B. Kalantari, Dispersive liquid-liquid microextraction based on task-specific ionic liquids for determination and speciation of chromium in human blood, *J. Anal. Chem.* 70 (2015) 1448-1455.
- [64] H. Shirkhanloo, M. Ghazaghi, H.Z. Mousavi, Chromium speciation in human blood samples based on acetyl cysteine by dispersive liquid-liquid biomicroextraction and in-vitro evaluation of acetyl cysteine/cysteine for decreasing of hexavalent chromium concentration, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 118 (2016) 1-8.
- [65] H. Shirkhanloo, M. Ghazaghi, M.M. Eskandari, Cloud point assisted dispersive ionic liquid-liquid microextraction for chromium speciation in human blood samples based on isopropyl 2-[(isopropoxycarbothioly)disulfanyl] ethane thioate, *Anal. Chem. Res.* 10 (2016) 18-27.
- [66] M. Sun, Q.H. Wu, Cloud point extraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry for speciation of Cr(III) in human serum samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 60 (2012) 14-18.
- [67] S. Sadeghi, A.Z. Moghaddam, Chromium speciation using task specific ionic liquid/aqueous phase biphasic system combined with flame atomic absorption spectrometry, *J. Mol. Liq.* 221 (2016) 798-804.
- [68] Z.H. Wang, M. Song, Q.L. Ma, H.M. Ma, S.C. Liang, Two-phase aqueous extraction of chromium and its application to speciation analysis of chromium in plasma, *Microchim. Acta* 134 (2000) 95-99.
- [69] M.R. Moghadam, S. Dadfarnia, A.M.H. Shabani, Speciation and determination of ultra trace amounts of chromium by solidified floating organic drop microextraction (SFODME) and graphite furnace atomic absorption spectrometry, *J. Hazard. Mater.* 186 (2011) 169-174.
- [70] Y.C. Sun, C.Y. Lin, S.F. Wu, Y.T. Chung, Evaluation of on-line desalter-inductively coupled plasma-mass spectrometry system for determination of Cr(III), Cr(VI), and total chromium concentrations in natural water and urine samples, *Spectrochim. Acta Part B-At. Spectrosc.* 61 (2006) 230-234.

- [71] S. Sadeghi, A.Z. Moghaddam, Preconcentration and speciation of trace amounts of chromium in saline samples using temperature-controlled microextraction based on ionic liquid as extraction solvent and determination by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 99 (2012) 758-766.
- [72] S. Doker, S. Mounicou, M. Dogan, R. Lobinski, Probing the metal-homeostatis effects of the administration of chromium(VI) to mice by ICP MS and size-exclusion chromatography-ICP MS, *Metallomics* 2 (2010) 549-555.
- [73] A. Safitri, A. Levina, P.A. Lay, Biospeciation of Cr(III) Nutritional Supplements in Biological Fluids, *Makara J. Sci.* 21 (2017) 83-90.
- [74] M.T.S. Cordero, E.I.V. Alonso, A.G. de Torres, J.M.C. Pavon, Development of a new system for the speciation of chromium in natural waters and human urine samples by combining ion exchange and ETA-AAS, *J. Anal. At. Spectrom.* 19 (2004) 398-403.
- [75] R. Thomas, *Practical guide to ICP-MS: a tutorial for beginners* 2nd ed. ed., CRC Press: Boca Raton, 2008.
- [76] A. Hachimi, L. Van Vaeck, K. Poels, F. Adams, J.F. Muller, Speciation of chromium, lead and nickel compounds by laser microprobe mass spectrometry and application to environmental and biological samples, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc* 53 (1998) 347-365.
- [77] M. Montes-Bayon, K. DeNicola, J.A. Caruso, Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr., A* 1000 (2003) 457-476.
- [78] F. Borguet, R. Cornelis, N. Lameire, Speciation of chromium in plasma and liver-tissue of end-stage renal-failure patients on continuous ambulatory peritoneal-dialysis, *Biol. Trace Elem. Res* 26-7 (1990) 449-460.
- [79] W.Y. Feng, Q.F. Qian, W.J. Ding, Z.F. Chai, Study of chromium speciation in normal and diabetic rats by activable enriched stable isotope technique, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 244 (2000) 321-325.
- [80] S.I. Kim, D.J. Woo, M.H. Lee, G.J. Woo, D.K. Kang, K.W. Cha, Determination of chromium(III) picolinate using high performance liquid chromatography-ultraviolet spectrophotometry, *Bull. Korean Chem. Soc.* 24 (2003) 1517-1520.
- [81] I.T. Urasa, S.H. Nam, Direct determination of chromium(III) and chromium(VI) with ion chromatography using direct-current plasma emission as element-selective detector, *J. Chromatogr. Sci.* 27 (1989) 30-37.
- [82] J.S. Hill, *Inductively coupled plasma spectrometry and its applications*, Blackwell Publishing Ltd.: Oxford, 2007.

- [83] J.S. Becker, *Inorganic mass spectrometry: principles and applications*, John Wiley & Sons Inc: Chichester, 2007.
- [84] M.S. Mihaljevic, L.; Sebek, O., Využití hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem v geochemii, *Chem. Listy* 98 (2004) 123-130.
- [85] S.M. Nelms, *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*, Blackwell Publishing Ltd., Cheshire, 2005.
- [86] J. Kunze, M.A. Wimmer, M. Reich, S. Koelling, J.J. Jacobs, The effects of residual carbon on the determination of chromium in blood and tissue sample, using quadrupole ICP-MS, *At. Spectrosc.* 26 (2005) 8-13.
- [87] M. Krachler, K.J. Irgolic, The potential of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for the simultaneous determination of trace elements in whale blood, plasma and serum, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 13 (1999) 157-169.
- [88] T.W. May, R.H. Wiedmeyer, A table of polyatomic interferences in ICP-MS, *Atomic Spectroscopy* 19 (1998) 150-155.
- [89] M. Meloun, J. Militký, *Statistical data Analysis A Practical Guide*, Woodhead Publishing India Pvt. Ltd., New Delhi, 2011.
- [90] B. Novotnik, T. Zuliani, A. Martincic, J. Scancar, R. Milacic, Effective reduction of polyatomic interferences produced by high chloride and carbon concentrations in determination of Cr(VI) by FPLC-ICP-MS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27 (2012) 488-495.
- [91] L. Yang, S. Willie, R.E. Sturgeon, Determination of total chromium in seawater with isotope dilution sector field ICP-MS following on-line matrix separation, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24 (2009) 958-963.
- [92] F. Laborda, M.P. Gorriz, E. Bolea, J.R. Castillo, Mathematical correction for polyatomic interferences in the speciation of chromium by liquid chromatography-inductively coupled plasma quadrupole mass spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 61 (2006) 433-437.
- [93] N. Violante, F. Petrucci, P. Delle Femmine, S. Caroli, Study of possible polyatomic interference in the determination of Cr in some environmental matrices by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Microchemical Journal* 59 (1998) 269-277.
- [94] A. Krushevska, S. Waheed, J. Nobrega, D. Amarisiriwardena, R.M. Barnes, Reducing polyatomic interferences in the ICP-MS determination of chromium and vanadium in biofluids and tissues, *Applied Spectroscopy* 52 (1998) 205-211.

- [95] F. Vanhaecke, S. Saverwyns, G. De Wannemacker, L. Moens, R. Dams, Comparison of the application of higher mass resolution and cool plasma conditions to avoid spectral interferences in Cr(III)/Cr(VI) speciation by means of high-performance liquid chromatography - inductively coupled plasma mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 419 (2000) 55-64.
- [96] N. Jakubowski, L. Moens, F. Vanhaecke, Sector field mass spectrometers in ICP-MS, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 53 (1998) 1739-1763.
- [97] S.H. Lee, J.A. Kim, S.H. Choi, Y.S. Kim, D.W. Choi, Accurate Analysis of Chromium in Foodstuffs by Using Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry with a Collision-Reaction Interface, *Bulletin of the Korean Chemical Society* 34 (2013) 1689-1692.
- [98] Z.L. Chen, M. Megharaj, R. Naidu, Removal of interferences in the speciation of chromium using an octopole reaction system in ion chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta* 73 (2007) 948-952.
- [99] I. Mazurova, A. Khvaschevskaya, N. Guseva, The choice of conditions for the determination of vanadium, chromium and arsenic concentration in waters by ICP-MS using collision mode, in: E. Korotkova (Ed.) 16th International Scientific Conference Chemistry and Chemical Engineering in Xxi Century Dedicated to Professor L.P. Kulyov, 2015, pp. 201-205.
- [100] S. D'Ilio, F. Petrucci, M. D'Amato, M. Di Gregorio, O. Senofonte, N. Violante, Method validation for determination of arsenic, cadmium, chromium and lead in milk by means of dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry, *Analytica Chimica Acta* 624 (2008) 59-67.
- [101] D.E. Nixon, K.R. Neubauer, S.J. Eckdahl, J.A. Butz, M.F. Burritt, Evaluation of a tunable bandpass reaction cell for an inductively coupled plasma mass spectrometer for the determination of chromium and vanadium in serum and urine, *Spectrochimica Acta Part B-Atomic Spectroscopy* 57 (2002) 951-966.
- [102] D. Pick, M. Leiterer, J.W. Einax, Reduction of polyatomic interferences in biological material using dynamic reaction cell ICP-MS, *Microchemical Journal* 95 (2010) 315-319.
- [103] A.J. Bednar, R.A. Kirgan, W.T. Jones, Comparison of standard and reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry in the determination of chromium and selenium species by HPLC-ICP-MS, *Anal. Chim. Acta* 632 (2009) 27-34.
- [104] L. Balcaen, E. Bolea-Fernandez, M. Resano, F. Vanhaecke, Inductively coupled plasma - Tandem mass spectrometry (ICP-MS/MS): A powerful and universal tool for the

interference-free determination of (ultra) trace elements - A tutorial review, *Analytica Chimica Acta* 894 (2015) 7-19.

[105] C.D.B. Amaral, R.S. Amais, L.L. Fialho, D. Schiavo, T. Amorim, A.R.A. Nogueira, F.R.P. Rocha, J.A. Nobrega, A novel strategy to determine As, Cr, Hg and V in drinking water by ICP-MS/MS, *Analytical Methods* 7 (2015) 1215-1220.

[106] B. Lesniewska, B. Godlewska-Zylkiewicz, Speciation of Chromium in Alkaline Soil Extracts by an Ion-Pair Reversed Phase HPLC-ICP MS Method, *Molecules* 24 (2019).

[107] *Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry*, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Rockville, 2018.

[108] R. Pechancová, T. Pluháček, J. Gallo, D. Milde, Study of chromium species release in blood and joint effusion utilizing HPLC-ICP-MS, *Talanta* 185 (2018) 370-375.

[109] D.W. Huo, H.M.S. Kingston, Correction of species transformations in the analysis of Cr(VI) in solid environmental samples using speciated isotope dilution mass spectrometry, *Anal. Chem.* 72 (2000) 5047-5054.

[110] N. Unceta, M. Astorkia, Z. Abrego, A. Gomez-Caballero, M.A. Goicolea, R.J. Barrio, A novel strategy for Cr(III) and Cr(VI) analysis in dietary supplements by speciated isotope dilution mass spectrometry, *Talanta* 154 (2016) 255-262.

[111] T. Zuliani, J. Scancar, R. Milacic, The use of stable isotopes for Cr(VI) determination in silty-clay soil solution, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 7231-7240.

[112] B. Novotnik, T. Zuliani, A. Martincic, J. Scancar, R. Milacic, Preparation of Cr(VI) and Cr(III) isotopic spike solutions from Cr-50 and Cr-53 enriched oxides without the use of oxidizing and/or reducing agents, *Talanta* 99 (2012) 83-90.

[113] B. Novotnik, T. Zuliani, J. Scancar, R. Milacic, Content of trace elements and chromium speciation in Neem powder and tea infusions, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 31 (2015) 98-106.

[114] B. Novotnik, T. Zuliani, J. Scancar, R. Milacic, Chromate in food samples: an artefact of wrongly applied analytical methodology?, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 28 (2013) 558-566.

[115] R. Pechancová, J. Gallo, D. Milde, T. Pluháček, Ion-exchange HPLC-ICP-MS: A new window to chromium speciation in biological tissues, *Talanta* 218 (2020) 121150.

[116] Y. Nuevo-Ordóñez, M. Montes-Bayon, E. Blanco-Gonzalez, J. Paz-Aparicio, J.D. Raimundez, J.M. Tejerina, M.A. Pena, A. Sanz-Medel, Titanium release in serum of patients with different bone fixation implants and its interaction with serum biomolecules at physiological levels, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 2747-2754.

- [117] Y.A. Lin, S.J. Jiang, A.C. Sahayam, Y.L. Huang, Speciation of chromium in edible animal oils after microwave extraction and liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry, *Microchem. J.* 128 (2016) 274-278.
- [118] J. Hendl, *Přehled statistických metod zpracování dat: Analýza a metaanalýza dat*, Portál, Praha, 2015.
- [119] S.K. Durrani, P.C. Noble, B. Sampson, T. Panetta, A.D. Liddle, S.A. Sabah, N.K. Chan, J.A. Skinner, A.J. Hart, Changes in blood ion levels after removal of metal-on-metal hip replacements 16 patients followed for 0-12 months, *Acta Orthop.* 85 (2014) 259-265.
- [120] R. Milacic, J. Scancar, Cr speciation in foodstuffs, biological and environmental samples: Methodological approaches and analytical challenges - A critical review, *Trends Analyt Chem* 127 (2020) 115888.
- [121] M.E. Soares, E. Vieira, M.D. Bastos, Chromium Speciation Analysis in Bread Samples, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 1366-1370.
- [122] E.P. Gray, J.G. Coleman, A.J. Bednar, A.J. Kennedy, J.F. Ranville, C.P. Higgins, Extraction and Analysis of Silver and Gold Nanoparticles from Biological Tissues Using Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Environmental Science & Technology* 47 (2013) 14315-14323.
- [123] F. Seby, V. Vacchina, Critical assessment of hexavalent chromium species from different solid environmental, industrial and food matrices, *Trends Analyt. Chem.* 104 (2018) 54-68.
- [124] H. Gurleyuk, D. Wallschlager, Determination of chromium(III) and chromium(VI) using suppressed ion chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 926-930.
- [125] T.A. Simoes, M.G. Bryant, A.P. Brown, S.J. Milne, M. Ryan, A. Neville, R. Brydson, Evidence for the dissolution of molybdenum during tribocorrosion of CoCrMo hip implants in the presence of serum protein, *Acta Biomaterialia* 45 (2016) 410-418.
- [126] M.S. Xu, J. Li, N. Hanagata, H.X. Su, H.Z. Chen, D. Fujita, Challenge to assess the toxic contribution of metal cation released from nanomaterials for nanotoxicology - the case of ZnO nanoparticles, *Nanoscale* 5 (2013) 4763-4769.
- [127] A.J. Hart, P.D. Quinn, F. Lali, B. Sampson, J.A. Skinner, J.J. Powell, J. Nolan, K. Tucker, S. Donell, A. Flanagan, J.F.W. Mosselmans, Cobalt from metal-on-metal hip replacements may be the clinically relevant active agent responsible for periprosthetic tissue reactions, *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 3865-3873.

8. Přílohy

- Příloha č.1: **Pechancová R.**, Pluháček T., Milde D.: Recent advances in chromium speciation in biological samples, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 152 (2019) 109-122.
- Příloha č.2: **Pechancová R.**, Pluháček T., Gallo J., Milde D.: Study of chromium species release from metal implants in blood and joint effusion: Utilization of HPLC-ICP-MS, *Talanta* 185 (2018) 370–377.
- Příloha č.3: **Pechancová R.**, Gallo J., Milde D., Pluháček T.: Ion-exchange HPLC-ICP-MS: A new window to chromium speciation in biological tissues, *Talanta* 218 (2020) 121150.
- Příloha č.4: Profesní životopis

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie

AUTOREFERÁT K DISERTAČNÍ PRÁCI

**Speciační analýza chromu v biologických
materiálech pomocí HPLC-ICP-MS**

Autor:	RNDr. Radka Pechancová
Studijní obor:	Analytická chemie
Vedoucí práce:	doc. Ing. David Milde, Ph.D.
Konzultant práce:	RNDr. Tomáš Pluháček, Ph.D.

2020 Olomouc

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	RNDr. Radka Pechancová
Název práce:	Speciační analýza chromu v biologických materiálech pomocí HPLC-ICP-MS
Typ práce:	Disertační
Pracoviště:	Katedra analytické chemie
Vedoucí práce:	doc. Ing. David Milde, Ph.D.
Konzultant:	RNDr. Tomáš Pluháček, Ph.D.
Rok odevzdání práce:	2020
Klíčová slova:	biologické vzorky, chrom, HPLC-ICP-MS, speciační analýza
Počet stran:	152
Počet příloh:	4
Jazyk:	čeština

Anotace:

Předložená disertační práce se zabývá vývojem a validací analytických metod vhodných pro speciační analýzu chromu v biologických vzorcích. Vzhledem k tomu, že doposud nebyly v této oblasti detailně popsány aplikace on-line speciačních technik, byla speciační analýza realizována s využitím dvou módů vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS).

Teoretická část se detailně věnuje chromu a zejména jeho speciím Cr(III) a Cr(VI) (je zde uvedena jejich toxikokinetika, metabolismus a výskyt v biologických vzorcích). Další část popisuje přístupy ke speciační analýze chromu, součástí je i rešerše zaměřená na aplikace na různé biologické materiály. Poslední část zmiňuje instrumentaci ICP-MS, riziko možných polyatomických interferencí spojené s použitím tohoto detektoru a také komplikace s validací speciačních analýz. Experimentální část je rozdělena do dvou hlavních okruhů. První je zaměřen na vývoj a validaci speciační analýzy využívající iontově-párovou HPLC na reverzních fázích ve spojení s ICP-MS detekcí a její aplikaci na analýzu reálných vzorků krve a kloubních výpotků. Celý analytický postup byl optimalizován a validován v rozsahu linearit, meze detekce, meze stanovitelnosti, preciznosti a pravdivosti. K analýzám byly vybrány vzorky krve a kloubních výpotků odebraných od pacientů s implantovanými kovovými kloubními náhradami obsahujícími chrom. Ze získaných výsledků vyplývá, že hlavní specií uvolňovanou

do krve i kloubního výpotku je Cr(III). Naopak Cr(VI) byl stanoven ve všech vzorcích pouze ve stopových koncentracích. Dále byla potvrzena vysoká afinita Cr(III) k proteinům v matrici, což značně ztěžuje jeho stanovení pomocí HPLC-ICP-MS. Všechny výsledky byly navíc statisticky porovnány s kontrolní skupinou, významně vyšší koncentrace všech forem chromu byly nalezeny pouze ve vzorcích kloubních výpotků. Podstatnou součástí bylo i studium polyatomických interferencí negativně ovlivňujících stanovení chromu pomocí ICP-MS.

Druhá část práce se věnuje vývoji a validaci analytického postupu využívajícího technik iontově-výměnné HPLC-ICP-MS a ICP-MS sloužících pro stanovení všech forem chromu v biologických tkáních. Po optimalizaci několika parametrů (příprava vzorku, separace, detekce) byly obě metody validovány podle postupu uvedeného v pokynech pro validaci bioanalytických metod z Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). Následně byly aplikovány na analýzu 2 certifikovaných referenčních materiálů a sady reálných vzorků periprostetických tkání odebraných od pacientů s kloubními náhradami. Stejně jako u předchozí studie byl ve vzorcích nalezen zejména Cr(III) ve volné formě nebo vázaný na pevný podíl. Naopak Cr(VI) nebyl detekován ani v jednom z vybraných vzorků. Avšak v tomto případě byla detailně studována i interkonverze obou specií za využití izotopicky obohacených standardů, kdy byla dokázána 30% redukce Cr(VI) způsobená charakterem matrice tkání. Vzhledem k vyššímu počtu vzorků bylo provedeno detailní statistické vyhodnocení všech dat. Významnou součástí byla i případová studie jednoho pacienta s kloubní náhradou obsahující Cr, jehož výsledky se významně lišily od ostatních. Kromě specií Cr(III) byly v jeho tkáních identifikovány i další formy chromu jako jsou částice a nanočástice nebo Cr vázaný na proteiny.

Bibliographical identification:

Author's first name and surname:	RNDr. Radka Pechancová
Title:	Chromium speciation analysis in biological materials by HPLC-ICP-MS
Type of thesis:	Dissertation
Department:	Department of Analytical Chemistry
Supervisor:	doc. Ing. David Milde, Ph.D.
Consultant:	RNDr. Tomáš Pluháček, Ph.D.
The year of submission:	2020
Keywords:	biological samples, chromium, HPLC-ICP-MS, speciation analysis
Number of pages:	152
Number of appendices:	4
Language:	Czech

Annotation:

The presented dissertation thesis is focused on development and validation of analytical methods suitable for the chromium speciation analysis in biological samples. Since the application of on-line speciation techniques to biological samples has not been described in detail yet, speciation analyses were performed using two modes of high-performance liquid chromatography (HPLC) in connection with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).

The theoretical part is dedicated to chromium and mainly its species Cr(III) and Cr(VI) (their toxicokinetics, metabolism and occurrence in biological samples are stated). The next part describes approaches to speciation analysis of chromium, the overview dealing with applications to various biological materials is mentioned as well. The last part deals with the ICP-MS instrumentation, the risk of possible polyatomic interferences associated with the use of this type of detector and with complications with speciation analyses validation. The experimental part is divided into two main areas. The first area is focused on development and validation of speciation analysis using ion-pair reverse phase HPLC in connection with ICP-MS detection and its application to analyses of real blood and joint effusion samples. The whole analytical approach was optimized and validated in terms of linearity, limit of detection, limit of quantification, precision, and trueness. Blood and joint effusion samples coming from patients with implanted chromium-based joint implants were selected for analyses. The

obtained results show that Cr(III) is the main specie released into blood as well as joint effusion. In contrast, Cr(VI) was determined in all samples only at trace concentrations. Besides that, the high affinity of Cr(III) to proteins in the sample matrix was confirmed which makes its determination by HPLC-ICP-MS more difficult. All results were statistically compared with control group and significantly higher concentrations of all analytes were found only in the case of joint effusion. Important part was the study of polyatomic interferences negatively affecting determination of chromium by ICP-MS.

The second part is devoted to the development and validation of analytical approach utilizing ion-exchange HPLC-ICP-MS and ICP-MS techniques serving for the determination of all chromium forms in biological tissues. After the optimization of several parameters (sample preparation, separation, detection), both methods were validated according to the procedure given in United States Food and Drug Administration (FDA) guideline on the validation of bioanalytical methods. Subsequently they were applied to the analyses of 2 certified reference materials and a set of real periprosthetic tissue samples collected from patients with joint implants. As well as in the previous study, mainly Cr(III) (as free or bound to solid residue) was found in all samples investigated. In contrast, Cr(VI) was not detected in any of selected tissues. However, the interconversion of both species was studied in detail using isotopically enriched standards and the 30% Cr(VI) reduction caused by the nature of sample matrix was proved. Due to the higher number of tissue samples, detailed statistical evaluation of all obtained data was performed. Significant part was the case study of one patient with Cr-based joint implant, whose results differed from the other patients. Besides Cr(III) species, another Cr forms as wear debris particles, nanoparticles, and Cr bound to proteins were identified in selected tissues.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. Speciační analýza chromu v biologických materiálech	3
2.1 Specie chromu	3
2.2 Kovové náhrady jako zdroj Cr(III) a Cr(VI)	3
2.3 Speciační analýza chromu	4
3. CÍLE PRÁCE.....	6
4. SPECIAČNÍ ANALÝZA CHROMU VE VZORCÍCH KRVE A KLOUBNÍCH VÝPOTKŮ.....	7
4.1 Experimentální část	7
4.1.1 Vzorky a referenční materiály.....	7
4.1.2 Příprava reálných vzorků	8
4.2 Výsledky a diskuze	9
4.2.1 Stanovení Cr(III), Cr(VI) a celkového Cr v reálných vzorcích krve a kloubních výpotků	9
4.3 Závěr.....	11
5. Speciační analýza chromu v biologických tkáních.....	13
5.1 Experimentální část	13
5.1.1 Vzorky a certifikované referenční materiály.....	13
5.1.2 Příprava vzorků tkání	14
5.2 Výsledky a diskuse	18
5.2.1 Studium interkonverze	18
5.2.2 Speciační analýza Cr v biologických tkáních vrstvy 1	19
5.2.3 Případová studie.....	23
5.3 Závěr.....	27
6. ZÁVĚR	29
7. REFERENCE.....	32

8. ŽIVOTOPIS	36
--------------------	----

1. ÚVOD

Chrom je kovový prvek přirozeně se vyskytující ve všech složkách životního prostředí (voda, půda, vzduch), ale také v rostlinných nebo živočišných tkáních. Jeho významným zdrojem je bezesporu také lidská činnost. Díky velmi zajímavým vlastnostem nalézá uplatnění v řadě průmyslových odvětví (metalurgický průmysl, výroba pigmentů, barviv, kožedělný průmysl atd.), odkud se může v různých podobách snadno dostat do životního prostředí, následně rostlin a přes potravní řetězec až do živočichů. Tato kontaminace představuje zásadní problém, protože chrom není biologicky odbouratelný, a dokonce negativně ovlivňuje lidské zdraví. Významné zdravotní riziko představují také kloubní náhrady vyrobené ze slitiny obsahující chrom. Je ale důležité si uvědomit, že toto nebezpečí se odvíjí od oxidačního stavu/formy chromu. Analyticky významné jsou především sloučeniny s oxidačním číslem +III a +VI, které jsou nejstabilnější a vyskytují se nejhojněji. Tyto formy (specie) se významně liší v toxicitě, mobilitě nebo biodostupnosti, tudíž je zásadní se v monitorování kontaminace chromem zabývat obsahem individuálních specií a nejenom celkového chromu. K takovým analýzám lze využít různých technik speciální analýzy založených na separaci/frakcionaci specií a jejich následném kvantitativním stanovení. V současné době je nejpopulárnější aplikace tzv. on-line speciálních technik spojujících vhodnou separační techniku a prvkově specifický detektor. U speciální analýzy chromu se většinou jedná o spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS). Tato kombinace výrazně zkracuje časovou náročnost celé speciální analýzy. Dalšími výhodami je vysoká selektivita a nízké meze detekce ICP-MS detektoru. Na základě dostupné literatury se toto spojení nejčastěji využívá na speciální analýzu chromu v potravinách a vzorcích životního prostředí. Významnou skupinou vzorků vhodnou pro monitorování zdravotních rizik chromu jsou ale biologické materiály, kde je aplikace HPLC-ICP-MS komplikovaná a doposud nebyla téměř popsána.

Z tohoto důvodu se předložená disertační práce zabývá spojením různých módů HPLC s ICP-MS detekcí pro účely speciální analýzy chromu v biologických materiálech. Experimenty byly rozděleny do dvou samostatných částí. První část je zaměřena na vývoj a validaci postupu využívajícího iontově-párovou HPLC na reverzních fázích s ICP-MS detekcí a následnou aplikaci na reálné vzorky krve a kloubního výpotku. Ve druhé části disertační práce je prezentována speciální analýza chromu ve složitější matrici, a to v periprostetických tkáních. Pro účely separace

a identifikace Cr(III) a Cr(VI) byla vyvinuta a validována metoda využívající spojení iontově-výměnné HPLC-ICP-MS současně s metodou ICP-MS stanovující celkový obsah Cr (frakcionace). Všechny analyzované vzorky v obou studiích byly odebírány pacientům se selhávající kloubní náhradou během revizních operací prováděných na Ortopedické klinice Fakultní nemocnice Olomouc. V obou pracích bylo studováno uvolňování specií chromu z náhrad do těchto biologických vzorků. Získané výsledky byly statisticky vyhodnoceny a porovnány s kontrolními skupinami. Významnou součástí obou studií byla identifikace polyatomických interferencí negativně ovlivňujících stanovení chromu pomocí ICP-MS. Pozornost byla věnována i studiu interkonverze Cr(III) a Cr(VI) v tkáních za využití izotopicky obohacených standardů.

2. Speciační analýza chromu v biologických materiálech

2.1 Specie chromu

Chrom se obecně může vyskytovat v různých oxidačních stavech od 0 až do +VI, avšak nejstabilnějšími a zároveň nejčastěji se vyskytujícími formami jsou pouze trojmocný (Cr(III)) a šestimocný (Cr(VI)) chrom [1]. Obě specie se liší v mnoha aspektech jako je například reaktivita, mobilita, a hlavně toxicita, jejich správná identifikace je tedy při studiu vlivu chromu na lidské zdraví zásadní. Nejzajímavější specií z hlediska toxicity je bezpochyby Cr(VI) [2]. Díky své velikosti a rozpustnosti jeho sloučenin se velice snadno dostává přes biologické membrány až k buňkám. I když má živý organismus efektivní detoxikační mechanismy, pomocí nichž je Cr(VI) redukován na Cr(III), může během této přeměny docházet ke vzniku nestabilních meziproductů (Cr(V), Cr(IV)), které reagují s H_2O_2 za vzniku reaktivních forem kyslíku (*reactive oxygen species*, ROS) indukujících oxidativní stres a následné změny samotných buněk a DNA. Intoxikace Cr(VI) se pak vyznačuje změnami na plicích, játrech a ledvinách. Může docházet k renálnímu selhání, nekróze jater a rakovině různých orgánů. Tyto karcinogenní a mutagenní vlastnosti přispěly k tomu, že je Cr(VI) označován jako karcinogen 1. typu [3]. V poslední době je poukazováno i na možnou teratogenitu solí Cr(VI) [4].

Naopak Cr(III) je esenciální formou hrající významnou roli v metabolismu tuků, bílkovin a hlavně cukrů (napomáhá působení inzulínu při eliminaci glukózy z krevního řečiště) [5]. Nicméně ve vysokých koncentracích může být i tato specie toxická. Cr(III) se totiž ve velkém množství může akumulovat v buňkách, kde dochází k jeho oxidaci na toxický Cr(VI), místně pak může vyvolávat křeče, změny na kůži, žaludeční vředy atd. Za určitých podmínek lze tedy i tuto specii považovat za potenciální genotoxickou látku.

2.2 Kovové náhrady jako zdroj Cr(III) a Cr(VI)

Veškerý chrom přírodního původu je ve stavu Cr(III), zatímco Cr(VI) se v životním prostředí nachází zejména v důsledku lidské činnosti. Jedním z aktuálně diskutovaných zdrojů kontaminace Cr(III) i Cr(VI) je bezpochyby používání kloubních implantátů [6]. V minulosti se nejvíce používali slitiny železa, chromu, niklu a kobaltu (316L ASTM F138; Rex 734 apod.), které

jsou sice vysoce odolné, ale při dlouhodobém použití náchylné ke korozi [6]. Nicméně díky rostoucím případům alergických reakcí na nikl se jako alternativa začala používat slitina Co-Cr-Mo (Co: 66-67 %, Cr: 26-30 %, Mo: 4-5 %) mající lepší vlastnosti než nerezová ocel.

Zásadním problémem všech kovových implantátů obecně je ale koroze, která je jedním z hlavních důvodů jejich selhání. I když je chrom za normálních okolností vůči korozi odolný (implantáty se pasivují tenkou vrstvičkou Cr_2O_3), v lidském těle se tato odolnost snižuje a nastává tzv. tribokoroze (poškození ochranné vrstvy vlivem mechanického opotřebení s následnou korozí způsobenou prostředím lidského těla – pH, oxidující/redukující komponenty) [7]. Následně dochází k nevratnému poškození implantátu a uvolňování poškozeného materiálu do lidského těla. V případě Co-Cr-Mo implantátů je největší hrozbou právě chrom. Do okolních tkání a dále do celého těla (krev, moč, kloubní výpotek, vlasy atd.) se tento kov může uvolňovat ve formě nanočástic nebo iontů v různých oxidačních stavech (hlavně Cr(III) a Cr(VI)) [1]. Vzhledem k tomu, že publikovaných studií zabývajících se touto problematikou je ale velmi málo, je žádoucí vyvíjet další metody speciální analýzy chromu v biologických vzorcích a aplikovat je na analýzu vzorků krve, moči, kloubních výpotků či tkání od pacientů s kloubními náhradami. Zásadní je také neopomenout studium interkonverze, ke které jsou obě specie velmi náchylné. Získané výsledky by pak umožnily potvrdit či vyvrátit negativní vliv těchto náhrad na zdraví pacientů, což je v současné době velmi aktuální téma.

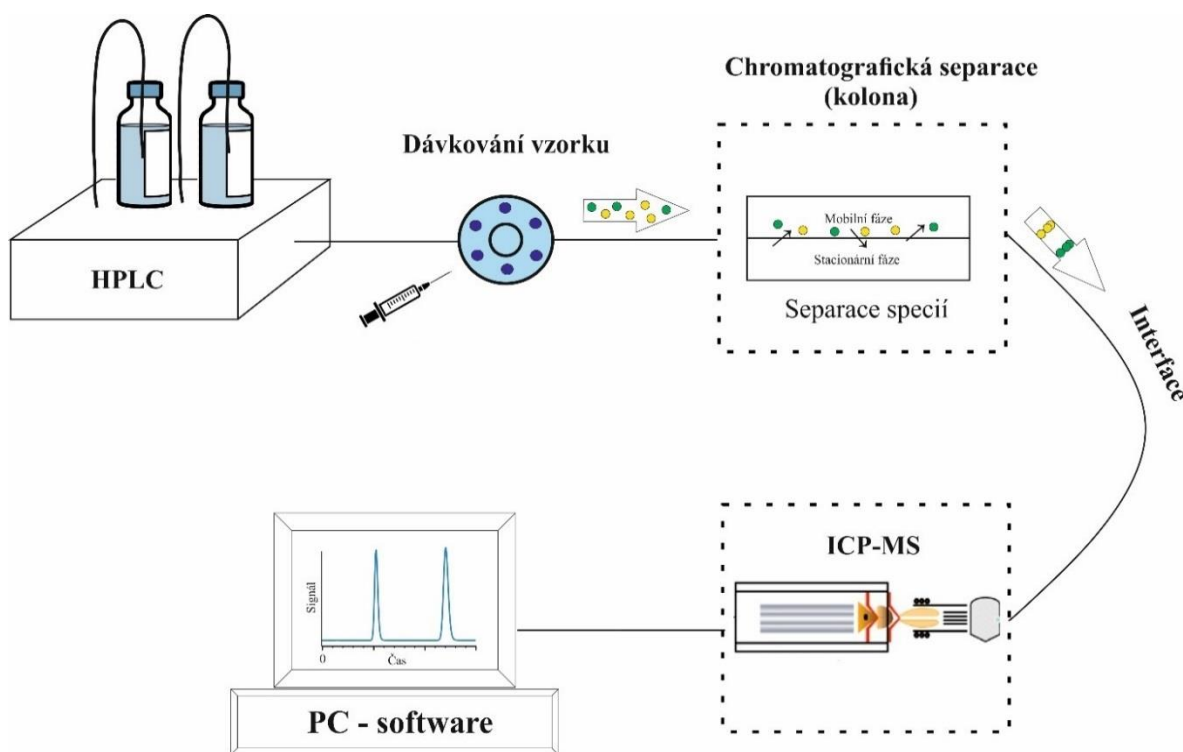
2.3 Speciální analýza chromu

Vzhledem k tomu, že stanovení celkového obsahu chromu je v současné době nedostačující a neposkytuje dostatečnou informaci k hodnocení rizik životního prostředí, toxicity, nebo biodostupnosti jeho forem, je nutné aplikovat metody schopné odlišit a identifikovat různé chemické formy [8]. Takovéto stanovení je označováno jako speciální analýza [9]. Celý proces speciální analýzy zahrnuje několik kroků od vzorkování, přes přípravu vzorku (filtrace, extrakce atd.), separaci a detekci jednotlivých specií až po identifikaci struktur analytů. U speciální analýzy chromu se lze obecně setkat se třemi přístupy:

- **tzv. solid-state speciace** analyzující přímo pevný vzorek bez žádné předchozí úpravy
- **off-line techniky** využívající izolaci specií ze vzorků s následnou detekcí celkového chromu

- **on-line techniky** (tzv. spojené/tandemové techniky) kombinující separaci specií s jejich následnou detekcí, nejčastěji se jedná o spojení vysoko-účinné kapalinové chromatografie s ICP-MS (HPLC-ICP-MS) (obr. 1)

Výběr techniky většinou závisí na časové náročnosti celé speciální analýzy, dostupném vybavení a v neposlední řadě také charakteru vzorku. Zlatým standardem je ale v současné době aplikace on-line technik *umožňující simultánní analýzu specií ve velmi krátkém čase*. Tento přístup našel uplatnění hlavně v analýze jednoduchých matic jako jsou například vzorky životního prostředí (voda, půda atd.) [10-12], aplikace na reálné biologické vzorky je ale značně komplikovaná. Z tohoto důvodu se pro speciaci chromu v biologických materiálech obvykle volí jednodušší metody.



Obrázek 1 Schéma speciální analýzy využívající HPLC-ICP-MS.

3. CÍLE PRÁCE

Cílem disertační práce byly vývoj, validace a aplikace HPLC-ICP-MS metod pro speciální analýzu chromu v biologických vzorcích.

Konkrétní cíle lze shrnout do následujících bodů:

- Speciální analýza chromu v krvi a kloubních výpotcích. Vývoj a validace metody stanovující specíe Cr(III) a Cr(VI) pomocí IP-RP-HPLC-ICP-MS. Využití ICP-MS analýzy pro získání informace o celkové koncentraci Cr v krvi a kloubních výpotcích za účelem studia hmotnostní bilance mezi speciemi a celkovým Cr. Aplikace na analýzu reálných vzorků odebraných kontrolním pacientům a pacientům s kloubní náhradou vyrobenou ze slitiny Co-Cr-Mo. Statistické vyhodnocení získaných výsledků. Studium polyatomických interferencí.
- Speciální analýza chromu v biologických tkáních. Vývoj inovativní IE-HPLC-ICP-MS metody pro stanovení Cr(III), Cr(VI) a metody ICP-MS sloužící pro stanovení celkového Cr v tkáních. Validace obou metod dle pokynů pro validaci bioanalytických metod z Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv. Statistické vyhodnocení získaných výsledků. Detailní studium interkonverze Cr(III) a Cr(VI) během celé speciální analýzy využívající izotopicky obohacených standardů. Případová studie jednoho pacienta zabývající se identifikací a stanovením všech forem Cr uvolňujících se z kloubních náhrad do periprostetických tkání.

Nejvýznamnější výsledky této disertační práce byly publikovány v několika impaktovaných publikacích [1, 13, 14], manuscript shrnující výsledky speciální analýzy chromu v periprostetických tkáních je v recenzním řízení.

4. SPECIAČNÍ ANALÝZA CHROMU VE VZORCÍCH KRVE A KLOUBNÍCH VÝPOTKŮ

Z odborné literatury vyplývá, že on-line techniky byly ve speciální analýze chromu v biologických vzorcích doposud opomíjeny. Známa je pouze jedna studie zabývající se stanovením Cr(III) a Cr(VI) v moči, kde byl k separaci využit mód iontově-párové chromatografie na reverzních fázích ve spojení s ICP-MS detekcí (IP-RP-HPLC-ICP-MS) [15]. Spojení HPLC s ICP-MS ale přitom přináší klíčové výhody jako je zkrácení doby analýzy, snížení mezí detekce a samozřejmě snížení rizika kontaminace nebo interkonverze. Nespornou výhodou je i možnost analýzy malých množství vzorků obsahujících stopové koncentrace Cr(III) a Cr(VI). Cílem první části disertační práce tedy bylo vyvinout metodu využívající spojení IP-RP-HPLC-ICP-MS a aplikovat ji na analýzu složitějších biologických vzorků jako jsou krev a kloubní výpotek. Významnou součástí byly i validace vyvinuté metody a studium interferencí, které ve většině prací zabývajících se touto problematikou úplně chybí.

4.1 Experimentální část

4.1.1 Vzorky a referenční materiály

Vzorky krve i kloubních výpotků byly získány od pacientů Ortopedické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc majících v těle kloubní náhradu kyčelního nebo kolenního kloubu typu MoP. Ke studii bylo vybráno 5 vzorků krve a 9 vzorků kloubních výpotků pocházejících od pacientů s kloubní náhradou vyrobenou ze slitiny chromu (Co-Cr-Mo). Dále bylo navíc studováno 5 vzorků krve a 5 vzorků kloubních výpotků od pacientů s náhradou neobsahující chrom, tyto vzorky sloužily jako kontrolní. Vzorky krve byly odebrány do 10 ml plastových zkumavek, z důvodu eliminace potenciální kontaminace pocházející z injekční jehly byl vždy odebírán až druhý alikvot. Vzhledem k vlivu antikoagulantů na distribuci Cr(III) a Cr(VI) v krvi nebyly vzorky dále nijak upravovány [16]. Vzorky kloubních výpotků byly odebrány před revizí kloubní náhrady do 5 ml plastových zkumavek.

Kvůli nedostupnosti CRM obsahujícího specíe Cr(III) a Cr(VI) ve vhodné matici byl pro validaci IP-RP-HPLC-ICP-MS metody vybrán CRM SeronormTM Trace Elements Whole Blood

L-3. K přípravě obohacených vzorků pro testování pravdivosti a preciznosti metody byly použity vzorky krevního séra a kloubního výpotku získané od pacientů bez kloubních náhrad, tyto vzorky opět pocházely z Ortopedické kliniky Fakultní nemocnice Olomouc. Všechny vzorky byly uchovávány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v mrazáku z důvodu potlačení biochemických procesů a tedy i interkonverze specií [17].

4.1.2 Příprava reálných vzorků

Před vlastní přípravou byl každý vzorek krve nebo kloubního výpotku rozmražen při laboratorní teplotě a následně homogenizován pomocí vortex mixéru po dobu 5 minut. Z takto upraveného vzorku byly odebrány alikvoty pro IP-RP-HPLC-ICP-MS analýzu a stanovení celkového chromu pomocí ICP-MS.

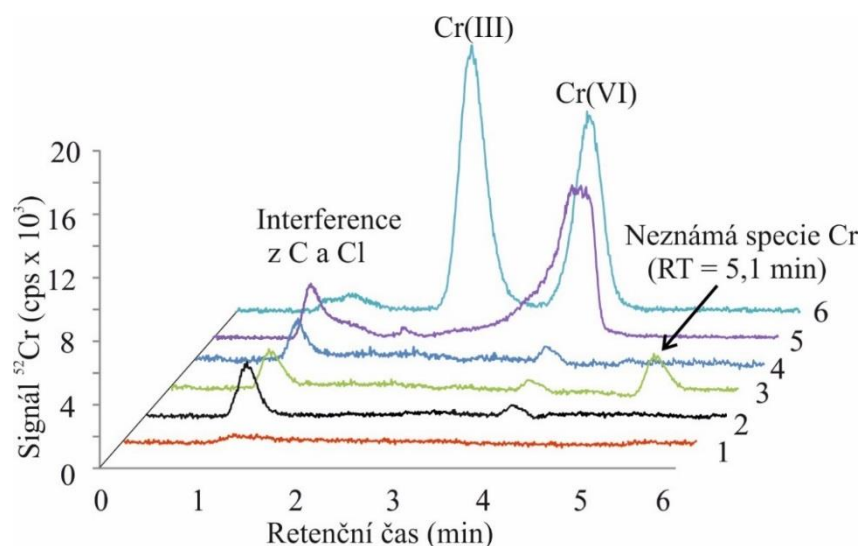
Pro speciální analýzu byl vzorek připraven následovně: 250 μl krve nebo kloubního výpotku bylo odpipetováno do polypropylenové eppendorfky a naředěno 250 μl deionizované vody. Vzniklý roztok byl homogenizován pomocí vortex mixéru 5 min, kvantitativně převeden na membránu Amicon 30 kDa centrifugačního filtru (Millipore Sigma, Německo) a centrifugován při 16 000 g a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 min. Díky tomu došlo k oddělení proteinů od nízkomolekulární části (supernatant) [18]. Následně byl aplikován modifikovaný postup dle Lin a kol. [19], kdy byl supernatant zředěn mobilní fází v poměru 1:9, vzorek byl poté inkubován při laboratorní teplotě 30 min a nakonec třikrát zanalyzován pomocí IP-RP-HPLC-ICP-MS. Slepé pokusy neobsahující matici byly připraveny stejným způsobem.

K získání informace o obsahu celkového Cr ve vzorcích byla využita validovaná ICP-MS metoda popsaná Kubou a kol. [20]. Vzorky krve nebo kloubních výpotků (1 ml), celá proteinová část získaná centrifugací a zbytek supernatantu po IP-RP-HPLC-ICP-MS analýze byly odpipetovány do teflonových mineralizačních kelímků, kde k nim byla přidána mineralizační směs složená z 2 ml HNO_3 a 1 ml H_2O_2 . Takto připravené vzorky byly rozloženy pomocí mikrovlnného rozkladného systému MLS 1200 Mega. Po rozkladu se vzorky nechaly zchladnout na laboratorní teplotu, kvantitativně se převedly do 10 ml odměrných baněk (v případě vzorků supernatantu do 5 ml odměrných baněk z důvodu nízké koncentrace Cr ve vzorcích) a doplnily po rysku deionizovanou vodou. Slepé pokusy byly připraveny stejným způsobem, avšak rozkladem pouze mineralizační směsi bez matrice. Před vlastní analýzou pomocí ICP-MS se vzorky převedly do 10 ml polypropylenových zkumavek, každý vzorek byl analyzován šestkrát.

4.2 Výsledky a diskuze

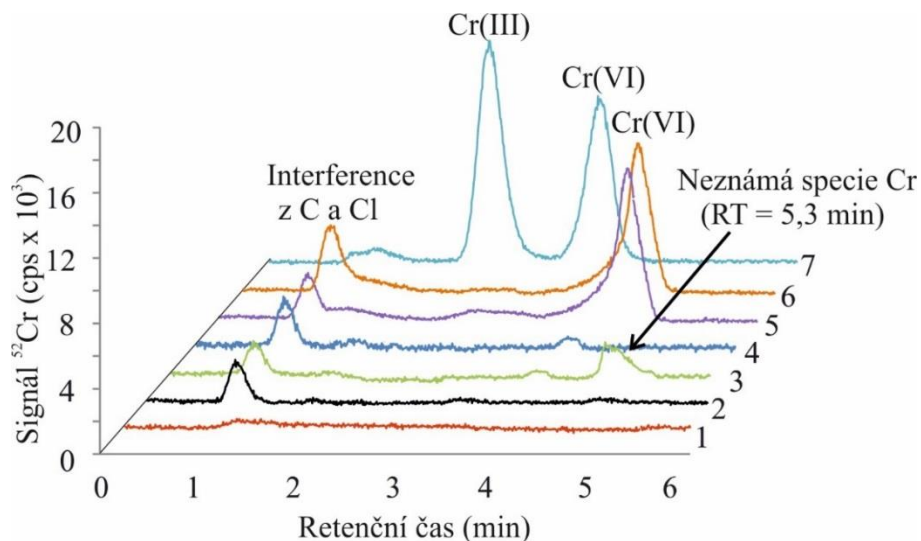
4.2.1 Stanovení Cr(III), Cr(VI) a celkového Cr v reálných vzorcích krve a kloubních výpotků

Vyvinutá IP-RP-HPLC-ICP-MS metoda byla validována v rozsahu meze detekce, meze stanovitelnosti, pravdivosti, preciznosti a následně byla použita pro stanovení Cr(III) a Cr(VI) ve vzorcích krve a kloubních výpotků odebraných od pacientů s kloubními náhradami. ICP-MS analýza pak sloužila k vyhodnocení hmotnostní bilance mezi Cr(III), Cr(VI) a celkovým Cr ve vzorcích. Ve vzorcích krve byl IP-RP-HPLC-ICP-MS analýzou nejčastěji stanoven pouze Cr(VI), jeho koncentrace se pohybovala v rozmezí 1,5-3,3 $\mu\text{g l}^{-1}$. Toto množství představovalo asi 20 % z celkového Cr ve vzorcích stanoveného pomocí ICP-MS. Stejně jako u analýz obohacených reálných vzorků nebo matricových kalibračních standardů nebyl Cr(III) detekován ani v jednom z vybraných vzorků, a to pravděpodobně z důvodu jeho silné vazby s proteiny. Naopak u jednoho vzorku krve (pacient P2) byla pomocí IP-RP-HPLC-ICP-MS stanovena ještě jedna specie v retenčním čase kolem 5,1 min. Tento signál nepocházel z polyatomických interferencí, protože se neshodoval se signálem izotopů C a Cl (^{12}C , ^{13}C , ^{35}Cl a ^{37}Cl), navíc poměr $^{52}\text{Cr}/^{53}\text{Cr}$ přibližně odpovídal teoretické hodnotě 8,77 ($8,25 \pm 0,38$, $n = 3$). Vzhledem k tomu, že se jeho retenční čas neshodoval s retenčním časem Cr(III) a Cr(VI), byl nakonec tento pík identifikován jako signál specie Cr navázané na ligandy nebo nízkomolekulární frakce přítomné v krvi [21-24]. Chromatogram tohoto vzorku je společně s chromatogramy kalibračního blanku, kontrolního vzorku krve, vzorku séra obohaceného o 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III) a Cr(VI) zobrazen na obrázku 2. ICP-MS analýzou byl následně stanoven celkový Cr v supernatantu, sedimentu i celých vzorcích krve. Všechny výsledky byly statisticky porovnány s těmi, které byly získány analýzou kontrolních vzorků (vzorků od pacientů s kloubní náhradou neobsahující Cr). K porovnání výsledků byl využit neparametrický Mann-Whitney test, který prokázal, že mezi naměřenými obsahy specií i celkového Cr není statisticky významný rozdíl. Tento závěr potvrzuje hypotézu, že krev není vhodným markerem sloužícím pro studium vlivu Cr na lidské zdraví [8].



Obrázek 2 Srovnání chromatogramů pocházejících ze speciální analýzy krve: 1 - kalibrační blank, 2 - kontrolní vzorek K3, 3 - vzorek od pacienta P2, 4 - vzorek od pacienta P1, 5 - sérum obohacené o $10 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III) a Cr(VI), 6-vodný kalibrační standard Cr(III) a Cr(VI) o koncentraci $10 \mu\text{g l}^{-1}$.

Naopak výsledky získané analýzou kloubních výpotků byly významnější. Jako hlavní specie byl opět nalezen Cr(III) vázaný na proteinovou část, avšak jeho koncentrace byla mnohem vyšší ($8,8\text{--}145,4 \mu\text{g l}^{-1}$). Výrazně vyšší koncentrace byly nalezeny i u celkového Cr ($9,3\text{--}295,1 \mu\text{g l}^{-1}$) a Cr(VI) stanoveného pomocí IP-RP-HPLC-ICP-MS ($1,1\text{--}19,0 \mu\text{g l}^{-1}$). Cr(III) v supernatantu nebyl pomocí IP-RP-HPLC-ICP-MS stanoven ani v jednom vzorku kloubního výpotku. Obrázek 3 ukazuje chromatogramy získané analýzou kloubních výpotků pacientů ve srovnání s chromatogramy vodného kalibračního standardu, matricového kalibračního standardu, kontrolního vzorku i obohaceného vzorku kloubního výpotku. Jak je vidět z tohoto porovnání, u této matrice byl pozorován významný posun retenčního času Cr(VI) ($0,86 \pm 0,06 \text{ min}$). Tento posun byl potvrzen analýzami obohacených vzorků kloubního výpotku i matricových kalibračních standardů. Stejně jako u krve byla i v této matrici u některých pacientů navíc pozorována neznámá specie (pacient P2, P7 a P9). Všechny naměřené koncentrace byly dále také srovnány s výsledky kontrolní skupiny, opět byl použit neparametrický Mann-Whitney test. V tomto případě ale byly potvrzeny statisticky vyšší koncentrace všech forem Cr ve skupině pacientů.



Obrázek 3 Srovnání chromatogramů pocházejících ze speciální analýzy kloubních výpotků: 1 - kalibrační blank, 2 - kontrolní vzorek K2, 3 - vzorek od pacienta P2, 4 - vzorek od pacienta P7, 5 - kloubní výpotek obohacený o $10 \mu\text{g l}^{-1}$ Cr(III) a Cr(VI), 6 - matricový kalibrační standard Cr(III) a Cr(VI) o koncentraci $10 \mu\text{g l}^{-1}$, 7 - vodný kalibrační standard Cr(III) a Cr(VI) o koncentraci $10 \mu\text{g l}^{-1}$.

Naměřené koncentrace celkového Cr v celých vzorcích krve a kloubních výpotků byly nakonec také srovnány se sumou specií z IP-RP-HPLC-ICP-MS analýzy a ICP-MS analýzy celkového vázaného Cr (vázaného Cr(III)) v pevném podílu. Hodnoty výtěžností se pohybovaly od 81 do 123 % (výsledky pro pacienta P2 nejsou zahrnuty). Relativní směrodatná odchylka vyjadřující preciznost stanovení pomocí obou metod byla v rozmezí 1-15 %. Použitý analytický postup kombinující validovanou IP-RP-HPLC-ICP-MS metodu s roztokovou ICP-MS analýzou je tedy vhodný pro stanovení vybraných forem Cr v biologických vzorcích daného typu.

4.3 Závěr

Do této doby byla on-line speciální analýza chromu aplikována zejména na vzorky životního prostředí, případně potravin. Tyto vzorky jsou ve srovnání s biologickými vzorky považovány za méně komplexní, a tak se autoři většinou nesetkávali s velkými potížemi při vývoji, optimalizaci analytických metod, ale i interpretaci získaných výsledků. Nicméně v případě

biologických vzorků je situace opačná. Tyto vzorky obsahují širokou škálu chemických sloučenin, které mohou značně komplikovat vlastní speciální analýzu a negativně ovlivnit spolehlivost získaných výsledků. Tato inovativní studie jako první popisuje aplikaci on-line spojení IP-RP-HPLC-ICP-MS na speciální analýzu chromu v krvi, současně se dokonce jedná o první studii zabývající se speciální analýzou chromu v kloubních výpotcích. Podařilo se vyvinout efektivní a spolehlivý analytický postup pro stanovení volného Cr(III), vázaného Cr(III), celkového Cr(VI) i celkového Cr ve vzorcích krve a kloubních výpotků. On-line IP-RP-HPLC-ICP-MS metoda sloužící pro identifikaci a kvantitativní stanovení volných specií byla navíc validována v několika parametrech.

Na základě získaných výsledků lze za hlavní specii uvolňovanou z kloubních náhrad do krve i kloubních výpotků označit Cr(III), která se ihned váže do komplexu s přítomnými proteiny. Tento závěr je v souladu s dalšími studiemi zabývajícími se touto problematikou. Vzhledem k této silné vazbě mohl být vyvinutou IP-RP-HPLC-ICP-MS metodou v reálných vzorcích stanoven pouze Cr(VI), jeho koncentrace ale byly v obou matricích velmi nízké (kolem 20 % celkového Cr). Výsledky speciální analýzy se shodovaly s výsledky stanovení celkového Cr ve všech vzorcích. ICP-MS analýza je tedy vhodný nástroj pro stanovení hmotnostní bilance mezi stanovovanými formami Cr a jeho celkovým obsahem ve vzorcích. V porovnání s kontrolní skupinou byly v kloubních výpotcích pacientů s náhradou ze slitiny Co-Cr-Mo nalezeny statisticky významně vyšší koncentrace všech forem chromu. Uvolňování specií Cr z kloubních náhrad do krve je tedy zanedbatelné a stanovení celkového Cr v krvi se nejeví jako vhodný marker kontroly stavu implantátů v tělech pacientů. Vyvinutá metoda kombinující speciální analýzu Cr(III) a Cr(VI) pomocí IP-RP-HPLC-ICP-MS a ICP-MS analýzu pro stanovení celkového obsahu Cr se jeví jako vhodný nástroj pro detailní studium uvolňování Cr a jeho specií z kloubních náhrad do tělních tekutin pacientů a s ním spojený monitoring intoxikace Cr(VI).

5. Speciační analýza chromu v biologických tkáních

Biologické tkáně se obvykle vyznačují komplexní maticí obsahující mnoho složek různého charakteru, což výrazně komplikuje jejich zpracování a úpravu vzorku pro speciační analýzu. Z tohoto důvodu byly doposud tkáně analyzovány především za využití solid-state speciačních technik. Díky minimálním nárokům na přípravu vzorků jsou to relativně rychlé techniky, značnou nevýhodou jsou ale vysoké meze detekce. U analýzy specií chromu v reálných vzorcích to může ale představovat zásadní problém. Díky stopovým koncentracím analytů často není možné jejich signál odlišit od signálu pozadí. Další komplikaci představují samotné signály specií, které jsou většinou velmi podobné, a tak jejich identifikace nemusí být vždy správná. V současné době je hodně diskutované téma uvolňování specií chromu z kloubních náhrad do blízkých tkání a dále do celého těla, a tak v této souvislosti bylo publikováno několik studií zabývajících se analýzou periprostetických tkání pacientů za využití XAS, XRF, XPS nebo XANES. Vzhledem k výše popsanému problému s mezemi detekce by ale bylo vhodné aplikovat techniky speciační analýzy odhalující i specie stopových koncentrací. Cílem další části disertační práce tak bylo vyvinout on-line HPLC-ICP-MS metodu vhodnou pro analýzu Cr(III) a Cr(VI) v biologických tkáních. Významnou součástí byla i validace vyvinuté metody a statistické vyhodnocení získaných výsledků. Značná pozornost byla věnována i studiu polyatomických interferencí a zejména interkonverze obou specií.

5.1 Experimentální část

5.1.1 Vzorky a certifikované referenční materiály

Vzorky periprostetických tkání byly získány od pacientů s totální endoprotézou kyčelního nebo kolenního kloubu. Všichni pacienti měli náhradu typu MoP, přičemž bylo odebráno 20 vzorků tkání od 13 pacientů s kloubní náhradou ze slitiny Co-Cr-Mo a 10 tkání od 10 pacientů, kteří v místě odběru měli náhradu z jiné slitiny (nejčastěji Ti-Al-V). Těchto 10 vzorků sloužilo jako kontrolní skupina. Všechny vzorky byly odebírány nerezovými chirurgickými nástroji během reoperací probíhajících na Ortopedické klinice Fakultní nemocnice Olomouc a uchovávány ve sterilních plastových nádobách při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Odběr probíhal z oblasti kloubního pouzdra v několika vrstvách. Vrstva 1 tvořící synoviální membránu byla v nejbližším kontaktu s náhradou a případnými uvolňovanými částicemi. Následně byly odebrány i další vrstvy tkání ze vzdálenějších vrstev (vrstva 2 a 3). Tloušťka odebraných tkání se pohybovala v rozmezí od 2 do 10 mm. Pacientům kontrolní skupiny byly odebrány pouze tkáně vrstvy 1, naopak od pacientů s náhradou ze slitiny Co-Cr-Mo byly z důvodu studia uvolňování specií chromu získány tkáně různých vrstev.

Pro přípravu reálných vzorků obohacených o $^{53}\text{Cr(III)}$ a $^{50}\text{Cr(VI)}$ bylo dále v experimentech využito kuřecí maso zakoupené v místním supermarketu (Olomouc, Česká republika). Vzhledem k nedostupnosti vhodného matricového certifikovaného referenčního materiálu byly obě metody ověřeny na analýze dvou CRM biologických tkání (LUTS-1, TORT-2). Oba materiály obsahovaly hepatopankreas humra s certifikovanou hodnotou celkového chromu (LUTS-1: $0,53 \pm 0,08 \mu\text{g g}^{-1}$ (průměr \pm rozšířená nejistota) a TORT-2: $0,77 \pm 0,15 \mu\text{g g}^{-1}$ (průměr \pm rozšířená nejistota)), zakoupeny byly u NRC-CNRC (Kanada).

5.1.2 Příprava vzorků tkání

Před vlastním analýzou byly vzorky periprostetických tkání a tkání kuřecího masa vysušeny v lyofilizátoru dosucha (48 h), rozemlety a homogenizovány pomocí keramického mlýnku a achátové třecí misky. CRM LUTS-1 byl připraven podle návodu uvedeného v certifikátu o analýze (vysušení při $105 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 2 h do konstantní hmotnosti v sušárně). CRM TORT-2 nevyžadoval žádnou speciální přípravu. Ve všech získaných periprostetických tkáních a CRM byly stanoveny specíe Cr(III), Cr(VI) a celkový Cr dle postupu zobrazeného na obrázku 4. Kromě toho byla provedena případová studie zaměřená i na další formy Cr v tkáních (komplexy proteinů s navázaným Cr, částice a nanočástice Cr atd.). V následující části jsou shrnuty všechny použité postupy pro přípravy vzorků.

C. Speciační analýza

Extrakce rozpustného/volného Cr(III) a celkového Cr(VI)

Zhomogenizované vzorky tkání (80 mg) byly naváženy do 10 ml polypropylenových zkumavek, kde k nim bylo přidáno 1,8 ml extrakčního roztoku (10 mmol l^{-1} EDTA, pH 10,5) a 40 μl standardního roztoku $^{53}\text{Cr(III)}$ o koncentraci $1\,000 \mu\text{g l}^{-1}$ sloužícího jako vnitřní standard pro

monitorování případné interkonverze Cr(III). Zkumavka byla následně uzavřena a třepána pomocí vortex mixéru za laboratorní teploty 60 minut. Poté bylo ke vzorku připipetováno 200 μl 1 mol l^{-1} NH_4NO_3 , aby se zabránilo porušení rovnováhy mezi speciemi vlivem vyšší teploty při inkubaci [25, 26]. Roztok byl promíchán a zcentrifugován (13 500 rpm, 4 °C, 30 min). Výsledný supernatant (1 ml) byl odebrán a inkubován při teplotě 70 °C v sušárně po dobu 90 minut. Nakonec byl vzorek přefiltrován přes 0,20 μm Millex Simplicity PTFE filtr a zanalyzován třikrát pomocí IE-HPLC-ICP-MS. Slepé pokusy neobsahující matici byly připraveny stejným způsobem.

Extrakce proteinů s navázaným Cr a stanovení pomocí BN-PAGE elektroforézy

Komplexy Cr s proteiny byly z tkání extrahovány podle modifikovaného postupu, který popsal Döcker a kol. [27]. 80 mg vzorku bylo smícháno s 0,8 ml 50 mmol l^{-1} octanu amonného (pH 7,4). K roztoku bylo přidáno takové množství 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$ PMSF, aby jeho koncentrace ve výsledném roztoku byla 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Ultrazvukově-asistovaná extrakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 1 h. Poté byl vzorek zcentrifugován (16 000 rpm, 30 min, 4 °C) a získaný supernatant byl smíchán se vzorkovým pufrem v poměru 2:1. Nakonec bylo nadávkováno 5 μl vzorku na připravený gel, přičemž každý vzorek byl nadávkován dvakrát, avšak na různou polovinu gelu. Následně byla spuštěna BN-PAGE analýza. Pro zakoncentrování vzorků bylo aplikováno napětí 30 V po dobu asi 1 h. Vlastní separace pak probíhala 2 h při 150 V. Každý gel byl poté rozpůlen, kdy jedna polovina gelu byla inkubována s barvivem Coomassie Brilliant Blue R-250 kvůli vizualizaci zón („bandů“) a z druhé poloviny gelu byly odebrány zóny, ve kterých byl stanoven celkový obsah Cr pomocí vyvinuté a validované ICP-MS metody. Použitý vybarvovací roztok obsahoval 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250 ve 40% methanolu a 10% kyselině octové. Po 30 minutách loužení gelu s barvicím roztokem se gel několikrát opláchl deionizovanou vodou a přebytečné barvivo bylo odstraněno loužením gelu s roztokem 40% methanolu a 10% kyseliny octové. Odbarvování trvalo asi 2 h, dokud nebyly zóny proteinů viditelné ve srovnání s pozadím gelu.

Druhá polovina nebyla nikterak upravena (barvení, oplach, tónování atd.) tak, aby se předešlo případné kontaminaci gelu z použitých chemikálií a/nebo uvolnění Cr z komplexů s organickými ligandy vlivem chemické reakce. Na základě pozic zón v první polovině gelu byly tyto zóny z druhé poloviny vyříznuty pomocí keramického nože, rozloženy v mikrovlnném mineralizátoru stejným způsobem jako v případě mineralizace tkání a v získaných vzorcích byl stanoven celkový obsah Cr pomocí vyvinuté ICP-MS metody.

D. Frakcionace

Stanovení celkového Cr pomocí ICP-MS

Z důvodu porovnání obsahu sumy specií s celkovým obsahem Cr byl ve všech vzorcích tkání i jednotlivých frakcích získaných extrakcí stanoven celkový obsah Cr pomocí ICP-MS. Jednotlivé frakce (zbytek supernatantu a pevný podíl z IE-HPLC-ICP-MS, gely z BN-PAGE elektroforézy, extrakty s rozpustnými a nerozpustnými formami Cr) nebo 80 mg každého vzorku tkáně byly převedeny/naváženy do křemenných mineralizačních zkumavek, kde k nim bylo přidáno 5 ml mineralizační směsi obsahující zředěnou HNO_3 v poměru 3:2 v/v. Mineralizační zkumavky byly uzavřeny teflonovými víčky a podrobeny dvou krokovému rozkladnému programu. Po rozkladu se vzorky převedly do 10 ml skleněných odměrných baněk, doplnily po rysku deionizovanou vodou a promíchaly. Nakonec byl každý vzorek pomocí ICP-MS změřen šestkrát. Vzorky slepých pokusů byly připraveny za stejných podmínek stejným způsobem ale bez matrice. Schéma celé přípravy vzorků tkání s následnou speciální analýzou a stanovením celkového Cr je uvedeno na obrázku 4.

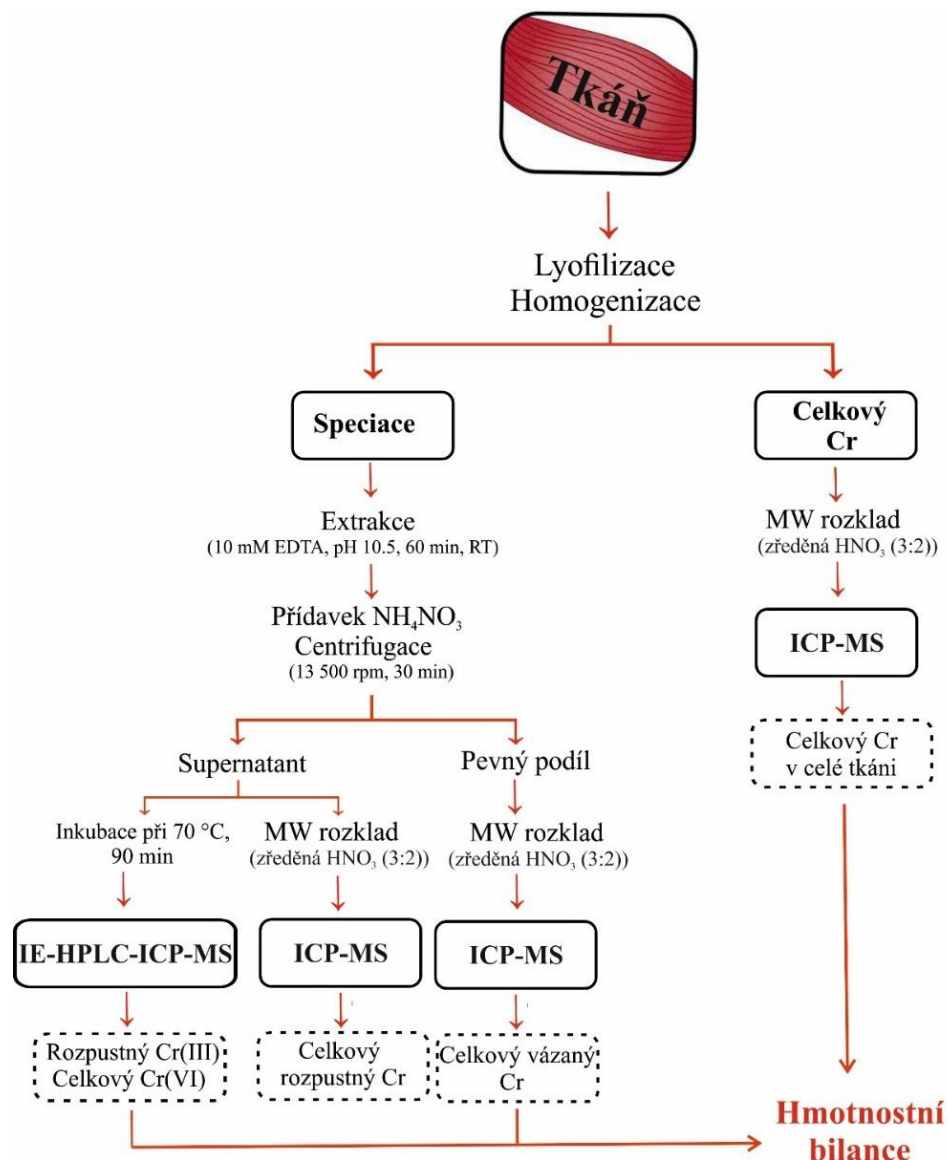
Extrakce rozpustných forem Cr

Na extrakci všech rozpustných/volných forem Cr (nejen Cr(III) a Cr(VI), ale i částic a nanočástic Cr) byl použit stejný extrakční roztok jako u speciální analýzy. Nicméně po filtraci pomocí 0,20 μm Millex Smplicity PTFE filtrů byly získané filtráty ještě zcentrifugovány při 16 000 rpm po dobu 10 min za využití Amicon 3 kDa ultra centrifugačních filtrů, které odpovídají velikosti pórů mezi 1,5-3 nm (Millipore Sigma, Německo). Obrácením filtru a zopakováním centrifugace (16 000 rpm, 5 min) byl pak získán pevný podíl zachycený na membráně filtru. Všechny tyto frakce (filtráty z ultrafiltrace přes Amicon 3 kDa ultra centrifugační filtry, pevné podíly zachycené na filtrech) byly následně rozloženy podle postupu popsaného pro stanovení celkového Cr v tkáních. Nakonec byl v získaných vzorcích stanoven celkový obsah Cr pomocí vyvinuté ICP-MS metody.

Stanovení nerozpustných forem Cr v pevném podílu

Za účelem získání pevného podílu obsahujícího pouze nerozpustné formy Cr byl na přípravu vzorku použit analytický postup využívající alkalického rozkladu biologické tkáně publikovaný Grayem a kol. [28]. Tímto způsobem lze ze vzorku vyextrahovat všechny rozpustné

formy, a dokonce i Cr navázaný na tkáních. Do polypropylenové zkušavky bylo opět naváženo 80 mg vzorku a následně bylo přidáno 0,8 ml 20% TMAH (w/w). Zkušavka byla uzavřena a třepána pomocí vortex mixéru za laboratorní teploty po dobu 24 h, přičemž první hodina extrakce probíhala v ultrazvuku. Poté byl vzorek zcentrifugován (16 000 rpm, 30 min, 4 °C), aby došlo k oddělení pevného podílu a supernatantu. Obě frakce byly nakonec rozloženy ve zředěné HNO₃ a analyzovány pomocí vyvinuté ICP-MS metody.

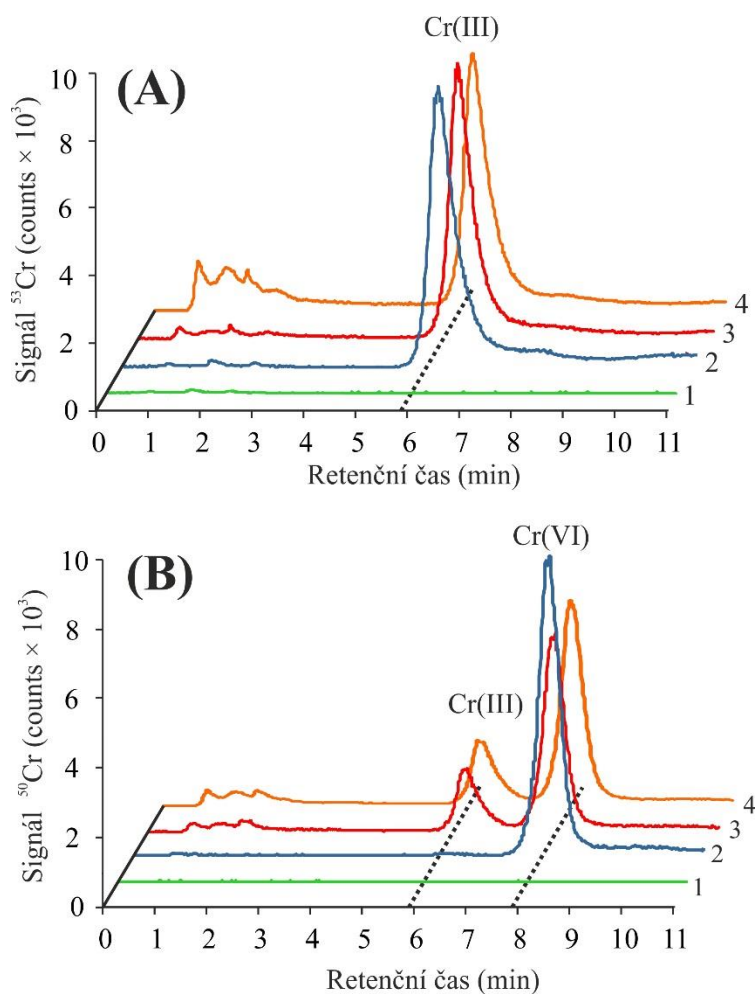


Obrázek 4 Schéma analytického postupu pro stanovení specií Cr(III), Cr(VI) a celkového Cr v tkáních (MW-mikrovlnný).

5.2 Výsledky a diskuse

5.2.1 Studium interkonverze

Během vývoje extrakčního postupu byla sledována rovnováha mezi speciemi a jejich případná interkonverze. K experimentům byly využity směsné vodné standardy s obsahem 0,5, 2 $\mu\text{g g}^{-1}$, 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ $^{53}\text{Cr(III)}$ a $^{50}\text{Cr(VI)}$ a vzorky kuřecího masa obohacené o 0,5, 2 $\mu\text{g g}^{-1}$ a 10 $\mu\text{g g}^{-1}$ $^{53}\text{Cr(III)}$ a $^{50}\text{Cr(VI)}$ před extrakcí i po extrakci. Obrázek 5 porovnává chromatografické analýzy vodného kalibračního standardu a vzorků kuřecího masa obohacených o 2 $\mu\text{g g}^{-1}$. Jak je vidět z obrázku 21A, specie $^{53}\text{Cr(III)}$ byla díky komplexaci s EDTA během extrakce stabilní a nedocházelo tedy k oxidaci $^{53}\text{Cr(III)}$ na $^{53}\text{Cr(VI)}$ ($^{53}\text{Cr(VI)}$ nebyl detekován v žádném z analyzovaných vzorků). Oproti tomu v případě analýzy $^{50}\text{Cr(VI)}$ byla v obohacených vzorcích kuřecího masa pozorována redukce této specie (obr. 21B). Analýzou vzorků kuřecího masa obohacených před extrakcí byla prokázána téměř 30% redukce Cr(VI), nově vytvořený komplex $[\text{}^{50}\text{Cr(III)-EDTA}]^-$ se eluoval ve stejném čase jako Cr(III) (5,9 min). Stejných výsledků bylo dosaženo i v případě analýzy vzorků obohacených až po extrakci specií (testování vlivu extrakční metody na rovnováhu). Tento trend byl navíc pozorován i u směsných kalibračních standardů s přizpůsobenou maticí, kdy průměrné množství zredukovaného $^{50}\text{Cr(VI)}$ odpovídalo $27 \pm 5 \%$ ($n = 24$). Naopak u směsného vodného standardu signál $^{50}\text{Cr(VI)}$ odpovídal přidanému množství a k redukci na $^{50}\text{Cr(III)}$ tak nedocházelo. Z těchto výsledků vyplývá, že porušení rovnováhy s následnou redukcí Cr(VI) bylo pravděpodobně způsobeno charakterem matrice vzorku. Významná redukce Cr(VI) už byla dokonce popsána v několika publikacích zabývajících se specií Cr v potravinách [26, 29, 30], čímž byly potvrzeny získané výsledky. Tato redukce je pravděpodobně způsobena vysokým obsahem antioxidantů a redukujících/oxidujících složek v biologických vzorcích. Díky tomu je tedy přítomnost Cr(VI) v tomto typu vzorků velmi nepravděpodobná. I přesto je ale vyvinutá metoda vhodná na analýzu Cr(VI) v biologických tkáních, protože umožňuje stanovit velmi nízké obsahy obou specií (ng g^{-1}), které byly nalezeny například u pacientů s cukrovkou 2. typu [31].



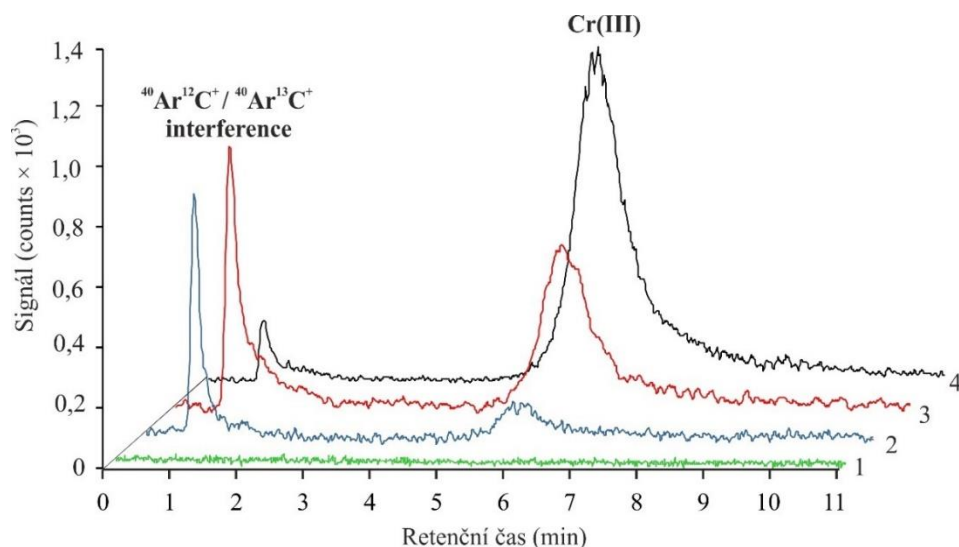
Obrázek 5 Chromatografická analýza (A) ^{53}Cr a (B) ^{50}Cr ve vzorcích neobohaceného kuřecího masa (zelená), vodného kalibračního standardu o koncentraci $2 \mu\text{g g}^{-1}$ (modrá), kuřecího masa obohaceného o $2 \mu\text{g g}^{-1}$ $^{53}\text{Cr(III)}$ a $^{50}\text{Cr(VI)}$ po extrakci (červená) a kuřecího masa obohaceného o $2 \mu\text{g g}^{-1}$ $^{53}\text{Cr(III)}$ a $^{50}\text{Cr(VI)}$ před extrakcí (oranžová) (čerchované čáry naznačují retenční časy Cr(III) a Cr(VI)).

5.2.2 Speciační analýza Cr v biologických tkáních vrstvy 1

Obě metody (IE-HPLC-ICP-MS a ICP-MS) byly validovány dle pokynů pro validaci bioanalytických metod z Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv a následně aplikovány na analýzu dvou certifikovaných referenčních materiálů tkání hepatopankreas humra s certifikovanou hodnotou celkového Cr. V obou vzorcích nebyl metodou IE-HPLC-ICP-MS nalezen rozpustný/volný Cr(III) ani Cr(VI) (v případě LUTS-1 bylo nalezeno pouze stopové množství Cr(III) pod LOQ). Hlavní nalezenou specií byl vázaný Cr v pevném podílu (pravděpodobně Cr(III))

navázaný na proteiny přítomné v matrici [1, 21, 24] nebo nerozpustné CrPO_4 a Cr_2O_3 [32-36]). Následně byly získané výsledky porovnány s certifikovanými hodnotami celkového Cr. Suma specií nalezených v supernatantu a vázaného Cr v pevném podílu byla $0,58 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ pro LUTS-1 a $0,70 \pm 0,05 \mu\text{g g}^{-1}$ pro TORT-2, což bylo v souladu s certifikovanými hodnotami (výťažnost 109 % a 91 %).

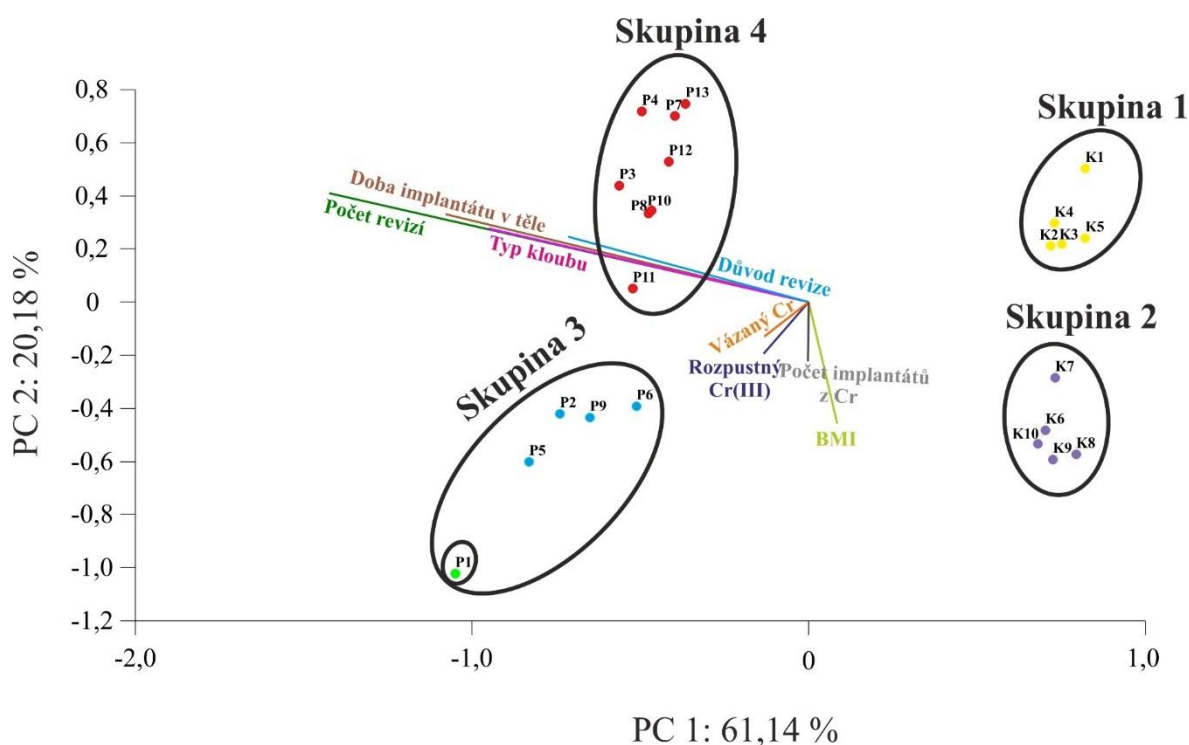
Po ověření na CRM byly obě metody použity na stanovení Cr(III), Cr(VI), celkového vázaného Cr a celkového Cr v reálných vzorcích periprostetických tkání vrstvy 1. K analýzám bylo vybráno 13 tkání získaných od pacientů s náhradou obsahující slitinu Co-Cr-Mo v místě odběru (skupina pacientů) a 10 vzorků tkání od pacientů, jejichž náhrada v místě odběru Cr neobsahovala (kontrolní skupina). Každý vzorek byl analyzován třikrát pomocí IE-HPLC-ICP-MS a šestkrát pomocí ICP-MS, IE-HPLC-ICP-MS analýza vybraných vzorků je zobrazena na obrázku 6. Ve všech analyzovaných vzorcích tkání byl nalezen pouze Cr(III), a to buď ve volné formě, nebo navázaný na pevný podíl. V pevném podílu se mohou vyskytovat komplexy Cr s organickými ligandy, proteiny nebo uvolněné částice Cr (fosforečnany, oxidy, hydroxidy) [37]. Celkový vázaný Cr v pevném podílu se pohyboval v rozmezí od 1,7 do 11,4 $\mu\text{g g}^{-1}$ v kontrolní skupině a od 3,0 do 5 119 $\mu\text{g g}^{-1}$ ve skupině pacientů. Naopak rozpustný/volný Cr(III) byl ve všech vzorcích nalezen ve velmi nízkém množství, které odpovídalo pouze 1 % z celkového množství Cr v tkáních. Cr(VI) nebyl nalezen v žádném vzorku a to pravděpodobně kvůli prokázané redukci této specie. Porovnáním výsledků z IE-HPLC-ICP-MS analýzy a ICP-MS analýzy supernatantu byl ale u některých vzorků zjištěn rozdíl v naměřených množství (výťažnost vyjádřená jako poměr celkového Cr v supernatantu a sumy specií Cr z IE-HPLC-ICP-MS analýzy byla 368-558 %. Tyto vzorky se od ostatních lišily zejména vzhledem (všechny měly šedou barvu indikující vysoký obsah uvolněných kovů a metalózu) a vysokým naměřeným obsahem vázaného Cr i celkového Cr ve vzorku. Tento rozdíl mohl být způsoben uvolňováním i elementárního Cr ve formě rozpustných částic či nanočástic nebo Cr navázaného na proteiny, které nelze pomocí IE-HPLC-ICP-MS stanovit (detailně je tento problém řešen v případové studii, kapitola 5.2.3) [37]. Na druhou stranu ale porovnáním sumy celkového Cr v supernatantu a pevném podílu s celkovým Cr ve vzorcích bylo dosaženo srovnatelných výsledků u všech vzorků (výťažnost se pohybovala v rozmezí 82-126 %, preciznost nebyla vyšší než 12 %).



Obrázek 6 IE-HPLC-ICP-MS analýza 1 - slepého pokusu, 2 - kontrolního vzorku K5, 3 - vzorku pacienta P7, 4 - vzorku pacienta P7 obohaceného o $0,5 \mu\text{g g}^{-1} {}^{53}\text{Cr(III)}$ monitorující m/z 52 (1,2,3) a m/z 53 (4).

Na získaná data byla následně aplikována i metoda analýzy hlavních komponent (PCA). Tento nástroj vícerozměrné statistiky slouží k posouzení a prověření kvality naměřených dat a jejich zjednodušení bez velké ztráty informace. K testování bylo vybráno 8 proměnných zahrnujících množství analyzovaných forem Cr (rozpuštěný/volný Cr(III), vázaný Cr), důvod revize, počet revizí (1-3), typ kloubu (kyčel/koleno), doba implantátu v těle, body mass index (BMI) a počet náhrad z Cr v těle. Výsledky z PCA jsou zobrazeny na obrázku 7. Analýzou byla data rozdělena do 4 hlavních skupin na základě počtu náhrad ze slitiny Co-Cr-Mo v těle. Skupina 1 reprezentovala tkáň kontrolní skupiny získané od pacientů bez náhrady obsahující Cr. Skupina 2 obsahovala zbytek vzorků tkání z kontrolní skupiny, tito pacienti měli v těle 1 náhradu ze slitiny Co-Cr-Mo avšak na jiném místě v těle než v místě odběru. Na základě PCA se kontrolní tkáň tedy lišily. Skupina 3 a skupina 4 obsahovaly vzorky pacientů. Pacienti ve skupině 3 měli v těle pouze 1 náhradu ze slitiny Co-Cr-Mo a to v místě odběru tkáně. Naopak skupina 4 zahrnovala pacienty se 2 náhradami ze slitiny Co-Cr-Mo. I když tedy tkáň nejsou odebírány z blízkosti náhrady obsahující Cr, stejně lze ve vzorcích tkání nelézt zvýšené hladiny všech forem Cr. Uvolněný Cr se pravděpodobně ihned dostává do krve (vazba na proteiny a jiné organické ligandy) a díky krevnímu oběhu se může snadno dostat do různých tkání (orgánů), kde se poté

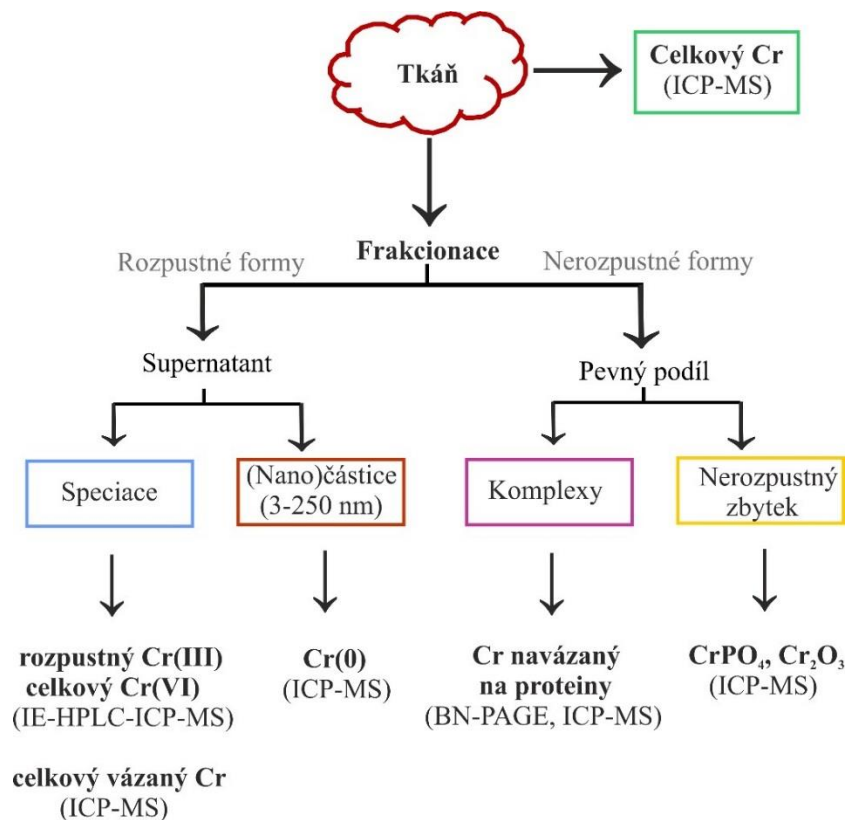
ukládá. Významným kritériem pro rozdělení do skupin byl také důvod revize/reoperace. Skupina 3 zahrnovala pouze pacienty s aseptickým uvolněním náhrady, naopak skupina 4 pacienty s ostatními komplikacemi. Tento výsledek tedy potvrdil závěry z předchozí kapitoly, tj. důvod reoperace má zásadní vliv na množství Cr uvolňovaného do tkání. Mimo to, PCA také odhalila jeden unikátní vzorek tkáně, který se od ostatních výrazně lišil. Pocházel od pacienta P1 trpícího metalózou, navíc jako jediný tento pacient podstoupil už 3. revizní operaci totální endoprotézy. Z tohoto důvodu byl tento pacient vybrán pro případovou studii (viz následující kapitola) zaměřenou na detailní stanovení všech forem Cr v tkáních.



Obrázek 7 Dvojný graf získaných dat z PCA, vektory symbolizují 8 vybraných parametrů.

5.2.3 Případová studie

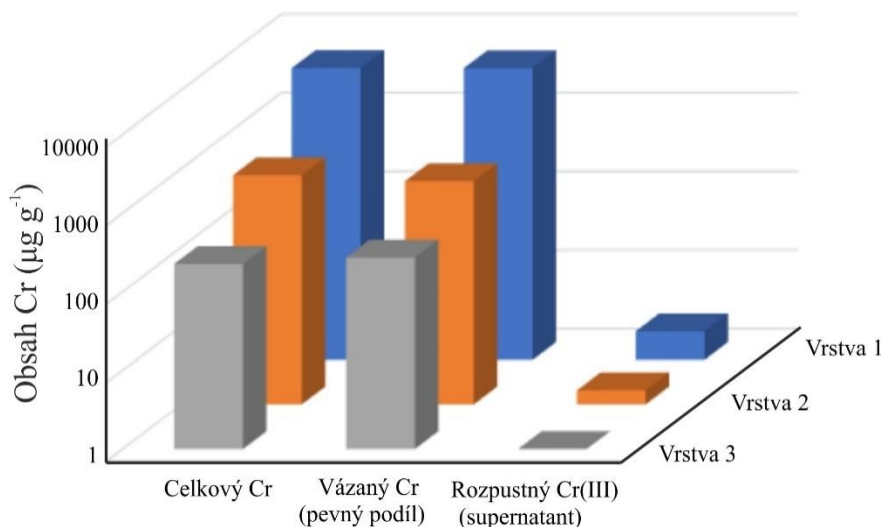
V poslední části byla pozornost věnována případové studii zaměřené na pacienta P1. Tento pacient měl 78 let, jeho BMI bylo 27,8. Kvůli komplikacím způsobenými primární osteoartritidou byl nucen podstoupit výměnu kyčelního kloubu, kdy byl použit implantát typu Chirulen-Bicontact skládající se ze slitin Co-Cr-Mo a Ti-Al-V. Po 124 měsících ale musel být vyměněn z důvodu jeho aseptického uvolnění. Všechny získané vzorky periprostetických tkání (1., 2. a 3. vrstva) pocházely z 3. revizní operace tohoto kloubu. Kromě výše popsané náhrady měl v těle ještě jednu kloubní náhradu, která byla vyrobena rovněž z Cr (typ Chirulen-Centrament, materiál: Co-Cr-Mo a Ti). Pacient P1 byl pro tuto studii vybrán na základě několika kritérií. Výsledky speciální analýzy jeho tkání se výrazně lišily od výsledků ostatních pacientů (naměřené obsahy všech forem Cr byly vyšší až o 3 řády), což bylo potvrzeno i pomocí PCA. Všechny periprostetické tkáně (tkáně všech vrstev) měly tmavě šedou barvu, což mohlo značit rozsáhlou metalózu. Navíc jako jediný podstoupil kvůli komplikacím způsobenými přítomností náhrady v těle 3 revizní operace kyčelního kloubu. Díky tomu byla periprostetická tkáň vrstvy 1 podrobena detailní studii zabývající se identifikací všech forem Cr v celé tkáni, ale i jejích frakcích získaných během speciální analýzy (supernatant, pevný podíl). Experimenty byly zaměřeny zejména na stanovení rozpustných částic a nanočástic Cr, Cr vázaného na proteiny a nerozpustných forem Cr (CrPO_4). Obrázek 8 popisuje strategii zvolenou pro identifikaci všech forem Cr ve vybraných tkáních. Tato studie výrazně přispívá k popisu distribuce různých forem Cr v periprostetických tkáních a mechanismu uvolňování Cr z kloubních náhrad do okolních tkání a následně do celého těla.



Obrázek 8 Schéma případové studie aplikované na vzorky tkáně vrstvy 1 pacienta P1. Kromě specií Cr(III), Cr(VI) a vázaného Cr byly ve frakcích tkání stanoveny i další rozpustné a nerozpustné formy Cr.

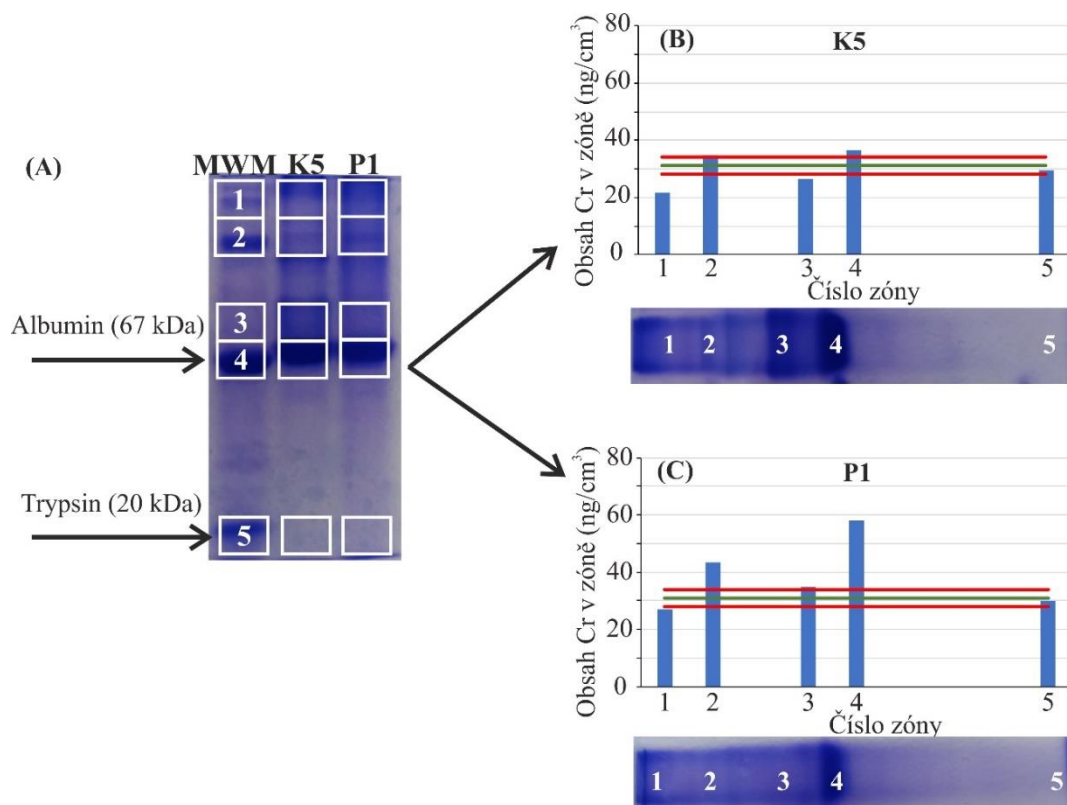
Speciační analýzou byly ve 3 různých vrstvách tkání tohoto pacienta stanoveny specie Cr(III) (volný i vázaný na pevný podíl), kdy nejvyšší hodnoty byly nalezeny v 1. vrstvě (pseudosynoviální membráně). Tato tkáň pravděpodobně slouží jako bariéra zachycující částice a nanočástice o velikosti 3-200 nm. Ve 2. a 3. vrstvě pak bylo nalezeno mnohonásobně nižší množství Cr (obr.9). Tímto byly potvrzeny výsledky porovnání 2 vrstev z předchozího odstavce a také závěry studie od Kuby a kol. [20].

Volné částice a nanočástice Cr, které negativně ovlivnily výsledky speciační analýzy, byly ve vzorcích supernatantu odděleny za využití Amicon 3kDa ultracentrifugačních filtrů (porozita těchto filtrů odpovídá 1,5-3 nm). Cr se totiž nemusí z náhrad uvolňovat pouze rozpustné/volné specie Cr(III) a Cr(VI), ale také elementární Cr(0) ve formě částic či nanočástic [37].



Obrázek 9 Srovnání množství volného Cr(III), vázaného Cr a celkového Cr ve 3 různých vrstvách periprostetické tkáně pacienta P1.

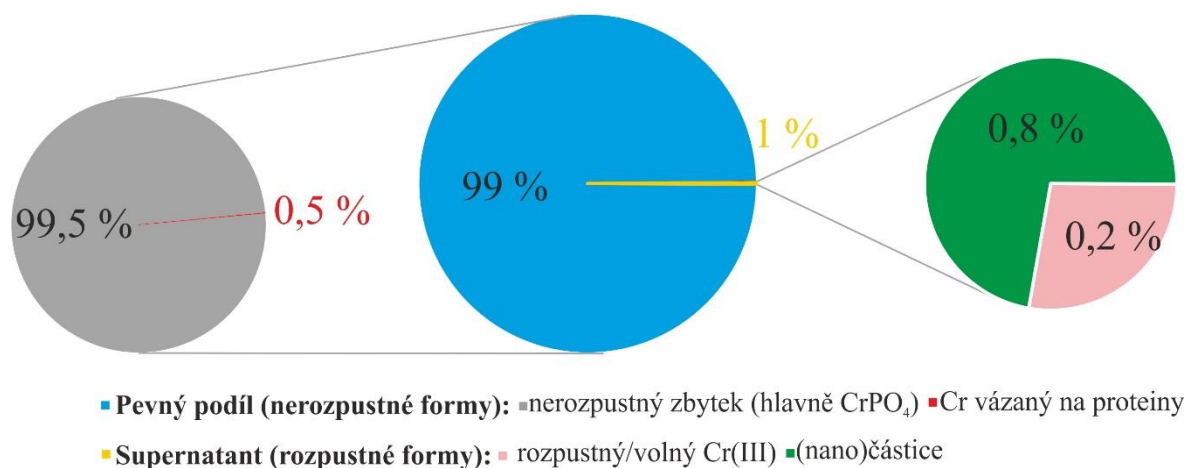
V dalším kroku byly analyzovány specíe Cr v pevném podílu. Ve vodě rozpustné komplexy proteinů s navázaným Cr byly analyzovány po extrakci octanem amonným pomocí BN-PAGE elektroforézy. Tento typ elektroforézy byl zvolen kvůli nedenedaturujícím podmínkám, které by mohly mít vliv na vazbu Cr s proteiny. K analýzám byl vybrán směsný standard albuminu ($M_w = 67$ kDa), ke kterému se ochotně váže Cr(III), a trypsinu ($M_w = 20$ kDa). Dále byl analyzován extrakt kontrolního vzorku (K5) a tkáně vrstvy 1 od pacienta P1. Záznam gelu se zónami obarvenými pomocí Coomassie Brilliant Blue je zobrazen na obrázku 10. Jak je vidět, v obou extraktech byl přítomen kromě ostatních proteinů hlavně albumin. Následně byly z druhé půlky gelu vyříznuty viditelné zóny ($n = 5$, obr.10A) podle rozmístění zón na první obarvené polovině gelu a po mikrovlnném rozkladu v nich byl stanoven celkový Cr, Mo, Al, Co, Ti, pomocí ICP-MS (obr. 10B, 10C). V extraktech tkání K5 i P1 bylo nalezeno zvýšené množství Cr v oblasti zóny č. 2 a zejména pak v oblasti zóny č. 4, které se shodovaly se zónami pro albumin. Nicméně Cr byl v zónách pro albumin doprovázen i dalšími kovy jako Co a Al (data nejsou prezentována). Tímto experimentem tedy byla potvrzena afinita Cr, ale dalších kovů k tomuto proteinu v biologických tkáních.



Obrázek 10 (A) Separace komplexů Cr s proteiny a množství celkového Cr nalezená ve vybraných zónách („bandech“) ((B) extrakt kontrolního vzorku K5, (C) extrakt tkáně vrstvy 1 pacienta P1). Zelená čára představuje průměrné hodnoty pro marker molekulové hmotnosti, červené čáry odpovídají směrodatným odchylkám (\pm SD).

Nakonec byl zbytek pevného podílu analyzován pomocí validované ICP-MS metody z důvodu stanovení ostatních nerozpustných forem Cr. Na základě dostupné literatury se zde Cr může vyskytovat buď jako CrPO_4 nebo Cr_2O_3 , které jsou téměř nerozpustné, tudíž se je nepodařilo vyextrahovat žádnou použitou metodou [32-36, 38]. Po rozkladu pevného podílu bylo ICP-MS analýzou potvrzeno, že v případě pacienta P1 to bylo dokonce 99 % z celkového množství Cr ($4\,980\ \mu\text{g g}^{-1}$). Ze získaných výsledků vyplývá, že většina Cr se v periprostetických tkáních s největší pravděpodobností nachází hlavně jako CrPO_4 , kdy se volný Cr(III) ihned váže do komplexu s fosforečnanem. V menší míře pak může existovat i jako Cr_2O_3 . Okamžitě po uvolnění z implantátů se zde tedy Cr nevyskytuje převážně ve formě částic ale jako rozpustný/volný Cr(III) stejně jako je tomu u kontrolních vzorků [38]. Následně dochází díky vysoké afinitě Cr(III)

k tvorbě komplexů s proteiny a dalšími ligandy. Vzhledem k nedostupnosti solid-state speciálních technik bohužel nemohl být tento závěr experimentálně potvrzen. Porovnání zastoupení všech forem Cr v periprostetická tkáni vrstvy 1 pacienta P1 je zobrazeno na obrázku 11.



Obrázek 11 Výsledky případové studie zabývající se stanovením všech forem Cr v tkáních pacienta P1.

5.3 Závěr

Prezentovaný analytický přístup využívající kombinaci metod IE-HPLC-ICP-MS a ICP-MS umožňuje provést jednak identifikaci volných specií Cr(III) a Cr(VI), ale dokonce i stanovení ostatních forem Cr v biologických tkáních. Jedná se tak o první aplikaci on-line speciální analýzy na analýzu tohoto typu biologických vzorků, do této doby byly tkáně analyzovány především solid-state speciálními technikami. Obě vyvinuté metody byly validovány a následně využity ke kvantitativnímu stanovení volných specií Cr, vázaného Cr i celkového Cr ve 2 CRM a 30 reálných vzorcích periprostetických tkání získaných od pacientů s kloubní náhradou. Ve všech vzorcích byl nalezen zejména vázaný Cr (Cr(III)), pouze asi 1 % z celkového Cr bylo v jeho volné formě. V žádném vzorku nebyl nalezen Cr(VI), a to pravděpodobně z důvodu interkonverze této specie způsobené charakterem matrice vzorků, jejíž studium bylo také součástí této práce. V porovnání s kontrolní skupinou byly u pacientů s kloubní náhradou ze slitiny Co-Cr-Mo nalezeny statisticky

významně vyšší obsahy všech analyzovaných forem Cr. Presentovaná studie také jako první systematicky zkoumá vztah mezi obsahem všech stanovovaných forem Cr a klinickými parametry jako například počet revizí, jejich důvod nebo doba implantátu v těle. Bylo zjištěno, že významnými faktory pro uvolňování Cr je počet implantátů z Cr v těle a důvod revize. Statistickými testy bylo dokázáno, že Cr se z implantátů uvolňuje i do vzdálenějších vrstev, jeho množství je výrazně ovlivněno právě vzdáleností tkáně od implantátu. Důležitou součástí byla i případová studie zabývající se stanovením všech rozpustných i nerozpustných forem Cr ve vybraných tkáních. Díky tomu bylo zjištěno, že většina navázaného Cr je ve formě nerozpustných sloučenin typu CrPO_4 nebo Cr_2O_3 , které je téměř nemožné vyextrahovat. Kromě toho byly ve vzorcích nalezeny i nízké obsahy částic, nanočástic a komplexů Cr s proteiny. Vyvinutá kombinace metod má značný potenciál stát se efektivnější a spolehlivější alternativou k doposud využívaným solid-state speciálním technikám (XAS, XRF atd.) používaných při studiu vlivu uvolňovaných specií Cr z kloubních náhrad na lidské zdraví. Velkou otázkou ale doposud zůstává identifikace nerozpustného zbytku v pevném podílu. Nejlepší volbou by v takovém případě byla aplikace XANES, které ale momentálně není v České republice dostupná. Další možnost nabízí spojení HPLC s hmotnostní spektrometrií využívající měkké ionizační techniky umožňující identifikaci složitých struktur, což by bylo vhodné zejména pro komplexy s navázaným Cr. Analytický postup využívající spojení prvkově selektivního ICP-MS detektoru s organickou hmotnostní spektrometrií by tak v budoucnu mohl být dokonalý nástroj pro identifikaci všech možných specií chromu.

6. ZÁVĚR

V rámci této disertační práce bylo řešeno téma využití on-line speciálních technik vhodných pro stanovení specií Cr v biologických materiálech. Tyto techniky vynikají mnoha výhodami, a to především nízkými LOD a selektivou, rychlostí vlastní analýzy nebo potřebou minimálního množství vzorku.

První část byla zaměřena na stanovení specií Cr(III) a Cr(VI) v krvi a kloubních výpotcích. Důraz byl kladen zejména na vývoj a optimalizaci efektivní a jednoduché přípravy reálných vzorků. Řadě optimalizací byla podrobena i separace využívající spojení IP-RP-HPLC a ICP-MS detekce. Vyvinutá metoda byla následně validována v rozsahu linearity, meze detekce, mez stanovitelnosti, pravdivosti a preciznosti. Společně se speciemi Cr byl také v každém vzorku stanoven celkový Cr pomocí validované metody využívající ICP-MS. Významnou součástí bylo i studium polyatomických interferencí negativně ovlivňujících stanovení Cr v tak složité matici jakou představují krev a kloubní výpotek. Přítomné interference byly způsobeny vysokým obsahem C a Cl v matici. Vyvinutá metoda byla následně aplikována na sadu reálných vzorků získaných od pacientů s kloubními náhradami, kde bylo studováno uvolňování specií Cr z náhrad různých materiálů. Ze získaných výsledků vyplývá, že hlavní specií uvolňovanou z náhrad obsahujících Cr do obou typů vzorků je Cr(III), který se okamžitě váže na proteinovou část vzorku. Naopak Cr(VI) byl nalezen ve vzorcích pouze ve stopových koncentracích. Podle dostupné literatury je ale přítomnost této specie v reálných vzorcích velmi vzácná, protože velice rychle dochází k její okamžité redukci na Cr(III) vlivem redukčních vlastností organické matrice. Nicméně většina vybraných pacientů trpěla cukrovkou druhého typu, což mohlo mít vliv na zpětnou oxidaci Cr(III) na Cr(VI). Šestimocný chrom se zde pak může vyskytovat ve stopových koncentracích. Další možností mohla být existence záporně nabitého Cr(III), jehož retenční čas se shodoval s Cr(VI). V porovnání s kontrolní skupinou byly statisticky vyšší koncentrace potvrzeny pouze v kloubních výpotcích. Tyto výsledky tedy poukazují na to, že krev není vhodným materiálem pro studium intoxikace Cr(VI) případně vlivu materiálů implantátů na lidské zdraví.

Druhá část disertační práce se věnovala vývoji nové strategie pro stanovení specií Cr v biologických tkáních. Pro tyto účely byla vyvinuta metoda IE-HPLC-ICP-MS vhodná pro analýzu Cr(III) a Cr(VI) najednou, pro jejich izolaci z tkání byla zvolena alkalická extrakce. Z důvodu stanovení hmotnostní bilance mezi speciemi Cr a celkovým Cr byla vyvinuta i metoda využívající ICP-MS. Obě metody byly optimalizovány v několika parametrech (separace, příprava

vzorku, detekce atd.) a validovány podle doporučení uvedeného v pokynech pro validaci bioanalytických metod z Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration, FDA). Po ověření na dvou certifikovaných referenčních materiálech byly následně obě metody aplikovány na sadu 20 vzorků periprostetických tkání různých vrstev pocházejících od pacientů s náhradou obsahující Cr a 10 kontrolních vzorků. I v této matici byl nalezen hlavně Cr(III) vázaný na pevný podíl, pouze 1 % z celkového obsahu Cr pak zaujímal volný Cr(III) stanovený speciální analýzou. Na rozdíl od krve a kloubního výpotku ale Cr(VI) nebyl nalezen v žádném vzorku. Detailně byly studovány opět polyatomické interference, kdy byly identifikovány interference pocházející z vysokého obsahu C v tkáních. Významnou součástí představovalo studium interkonverze obou specií využívající izotopicky obohacených standardů. Díky tomu byla zjištěna 30% redukce Cr(VI) na Cr(III) způsobená charakterem matrice tkání, což má zásadní vliv na výskyt této specie v reálných vzorcích. Dalším bodem bylo statistické vyhodnocení dat. Získané výsledky byly porovnány s kontrolní skupinou, kdy byl nalezen statisticky významný rozdíl v množství všech forem Cr. Dále byl zjištěn vliv počtu náhrad z Cr v těle a důvodu revize na naměřeném obsahu všech studovaných forem Cr v tkáních. Detailní studium vzorků od vybraného pacienta navíc umožnilo stanovit i další formy Cr (částice a nanočástice, Cr vázaný na proteiny atd.) v tkáních, které mohou zkreslovat vlastní speciální analýzu

Díky vyvinutým metodám využívajícím spojení HPLC-ICP-MS byly potvrzeny výhody této techniky jako je potřeba minimálního množství vzorku, nízké meze detekce, selektivita i rychlost speciální analýzy. Nespornou výhodou je také možnost identifikace interkonverze Cr(III) a Cr(VI) za využití izotopicky obohacených standardů, která může zkreslovat získané výsledky. U speciace Cr v biologických vzorcích se zde jedná o dokonce první aplikaci tohoto přístupu. Nicméně bylo nutné řešit i nevýhody tohoto spojení, které představují zejména polyatomické interference. V případě analýz všech biologických vzorků se je ale podařilo identifikovat a jejich signály také úspěšně odseparovat od signálů Cr(III) a Cr(VI). Díky tomu mohou všechny dosažené výsledky přispět k lepšímu porozumění chování náhrad v tělech pacientů a uvolňování různých forem Cr do biologických materiálů. Disertační práce tedy jednoznačně ukazuje, že on-line speciální techniky jsou výborným nástrojem pro charakterizaci Cr(III) a Cr(VI) i v tak složité matici jakou představují biologické vzorky. Stále velkou výzvou ale zůstávají další neznámé specie Cr (především v komplexech s různými složkami matrice), jejichž identifikaci a detailní popis struktur by v budoucnu mohlo usnadnit multimodální přístup zahrnující kombinaci HPLC-ICP-MS

s molekulovou hmotnostní spektrometrií založenou na využití měkkých ionizačních technik (HPLC-MS/MS, MALDI-MS apod.).

7. REFERENCE

- [1] R. Pechancova, T. Pluhacek, D. Milde, Recent advances in chromium speciation in biological samples, *Spectrochim. Acta Part B-At. Spectrosc.* 152 (2019) 109-122.
- [2] D. Bagchi, S.J. Stohs, B.W. Downs, M. Bagchi, H.G. Preuss, Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium, *Toxicology* 186 (2003) 175-177.
- [3] J.B. Vincent, The biochemistry of chromium, *J. Nutr.* 130 (2000) 715-718.
- [4] S.A. Abbasi, R. Soni, TERATOGENIC EFFECTS OF CHROMIUM(VI) IN ENVIRONMENT AS EVIDENCED BY THE IMPACT ON LARVAE OF AMPHIBIAN RANA TIGRINA - IMPLICATIONS IN THE ENVIRONMENTAL-MANAGEMENT OF CHROMIUM, *International Journal of Environmental Studies* 23 (1984) 131-137.
- [5] A. Zhitkovich, Chromium in Drinking Water: Sources, Metabolism, and Cancer Risks, *Chem. Res. Toxicol.* 24 (2011) 1617-1629.
- [6] D.R. Bijukumar, A. Segu, J.C.M. Souza, X.J. Li, M. Barba, L.G. Mercuri, J.J. Jacobs, M.T. Mathew, Systemic and local toxicity of metal debris released from hip prostheses: A review of experimental approaches, *Nanomed. Nanotechnol.* 14 (2018) 951-963.
- [7] H. Matusiewicz, Potential release of in vivo trace metals from metallic medical implants in the human body: From ions to nanoparticles - A systematic analytical review, *Acta Biomater.* 10 (2014) 2379-2403.
- [8] R.C. Cornelis, J. A.; Crews, H.; Heumann, K. G., *Handbook of Elemental Speciation II Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health*, Chichester, 2004.
- [9] D.M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.G. Danielsson, H. Muntau, H.P. Van Leeuwen, R. Lobinski, Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000), *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1453-1470.
- [10] M.B. Arain, I. Ali, E. Yilmaz, M. Soylak, Nanomaterial's based chromium speciation in environmental samples: A review, *Trends Anal. Chem.* 103 (2018) 44-55.
- [11] B. Markiewicz, I. Komorowicz, A. Sajnog, M. Belter, D. Baralkiewicz, Chromium and its speciation in water samples by HPLC/ICP-MS - technique establishing metrological traceability: A review since 2000, *Talanta* 132 (2015) 814-828.

- [12] L. Trzonkowska, B. Lesniewska, B. Godlewska-Zylkiewicz, Recent Advances in On-Line Methods Based on Extraction for Speciation Analysis of Chromium in Environmental Matrices, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 46 (2016) 305-322.
- [13] R. Pechancová, T. Pluháček, J. Gallo, D. Milde, Study of chromium species release in blood and joint effusion utilizing HPLC-ICP-MS, *Talanta* 185 (2018) 370-375.
- [14] R. Pechancová, J. Gallo, D. Milde, T. Pluháček, Ion-exchange HPLC-ICP-MS: A new window to chromium speciation in biological tissues, *Talanta* 218 (2020) 121150.
- [15] H.J. Wang, X.M. Du, M. Wang, T.C. Wang, O.Y. Hong, B. Wang, M.T. Zhu, Y. Wang, G. Jia, W.Y. Feng, Using ion-pair reversed-phase HPLC ICP-MS to simultaneously determine Cr(III) and Cr(VI) in urine of chromate workers, *Talanta* 81 (2010) 1856-1860.
- [16] G.A. Afolaranmi, J.N.A. Tettey, H.M. Murray, R.M.D. Meek, M.H. Grant, The effect of anticoagulants on the distribution of chromium VI in blood fractions, *J. Arthro.* 25 (2010) 118-120.
- [17] V. Vacchina, I. de la Calle, F. Seby, Cr(VI) speciation in foods by HPLC-ICP-MS: investigation of Cr(VI)/food interactions by size exclusion and Cr(VI) determination and stability by ion-exchange on-line separations, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 3831-3839.
- [18] Y. Nuevo-Ordonez, M. Montes-Bayon, E. Blanco-Gonzalez, J. Paz-Aparicio, J.D. Raimundez, J.M. Tejerina, M.A. Pena, A. Sanz-Medel, Titanium release in serum of patients with different bone fixation implants and its interaction with serum biomolecules at physiological levels, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 2747-2754.
- [19] Y.A. Lin, S.J. Jiang, A.C. Sahayam, Y.L. Huang, Speciation of chromium in edible animal oils after microwave extraction and liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry, *Microchem. J.* 128 (2016) 274-278.
- [20] M. Kuba, T. Pluháček, M. Hobza, J. Gallo, D. Milde, Content of distinct metals in periprosthetic tissues and pseudosynovial joint fluid in patients with total hip arthroplasty *J. Biomed. Mater. Res. B* 10.1002/jbm.b.34137 (2018).
- [21] Y.N. Ordonez, M. Montes-Bayon, E. Blanco-Gonzalez, J. Paz-Jimenez, J.M. Tejerina-Lobo, J.M. Pena-Lopez, A. Sanz-Medel, Metal release in patients with total hip arthroplasty by DF-ICP-MS and their association to serum proteins, *J. Anal. At. Spectrom.* 24 (2009) 1037-1043.
- [22] A.K. Das, R. Chakraborty, M.L. Cervera, M. delaGuardia, Metal speciation in biological fluids - A review, *Mikrochim. Acta* 122 (1996) 209-246.

- [23] R. Cornelis, F. Borguet, S. Dyg, B. Griepink, Chromium speciation studies in human plasma and stability studies of Cr(III) and Cr(VI) species in a candidate water reference material, *Microchim. Acta* 109 (1992) 145-148.
- [24] B. Finley, P.K. Scott, M.E. Glynn, D. Paustenbach, E. Donovan, K.A. Thuett, Chromium speciation in the blood of metal-on-metal hip implant patients, *Toxicol. Environ. Chem.* 99 (2017) 48-64.
- [25] M.E. Soares, E. Vieira, M.D. Bastos, Chromium Speciation Analysis in Bread Samples, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 1366-1370.
- [26] B. Novotnik, T. Zuliani, J. Scancar, R. Milacic, Chromate in food samples: an artefact of wrongly applied analytical methodology?, *J. Anal. At. Spectrom.* 28 (2013) 558-566.
- [27] S. Doker, S. Mounicou, M. Dogan, R. Lobinski, Probing the metal-homeostatis effects of the administration of chromium(VI) to mice by ICP MS and size-exclusion chromatography-ICP MS, *Metallomics* 2 (2010) 549-555.
- [28] E.P. Gray, J.G. Coleman, A.J. Bednar, A.J. Kennedy, J.F. Ranville, C.P. Higgins, Extraction and Analysis of Silver and Gold Nanoparticles from Biological Tissues Using Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Environmental Science & Technology* 47 (2013) 14315-14323.
- [29] B. Novotnik, T. Zuliani, J. Scancar, R. Milacic, Content of trace elements and chromium speciation in Neem powder and tea infusions, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 31 (2015) 98-106.
- [30] E.M. Hamilton, S.D. Young, E.H. Bailey, M.J. Watts, Chromium speciation in foodstuffs: A review, *Food Chem.* 250 (2018) 105-112.
- [31] Y.F. Wang, H. Su, Y.L. Gu, X. Song, J.S. Zhao, Carcinogenicity of chromium and chemoprevention: a brief update, *Onco Targets Ther.* 10 (2017) 4065-4079.
- [32] A. Di Laura, P.D. Quinn, V.C. Panagiotopoulou, H.S. Hothi, J. Henckel, J.J. Powell, F. Berisha, F. Amary, J.F.W. Mosselmans, J.A. Skinner, A.J. Hart, The Chemical Form of Metal Species Released from Corroded Taper Junctions of Hip Implants: Synchrotron Analysis of Patient Tissue, *Sci. Rep.* 7 (2017).
- [33] A.E. Goode, J.M. Perkins, A. Sandison, C. Karunakaran, H.K. Cheng, D. Wall, J.A. Skinner, A.J. Hart, A.E. Porter, D.W. McComb, M.P. Ryan, Chemical speciation of nanoparticles surrounding metal-on-metal hips, *Chem. Commun.* 48 (2012) 8335-8337.

- [34] A.J. Hart, P.D. Quinn, B. Sampson, A. Sandison, K.D. Atkinson, J.A. Skinner, J.J. Powell, J.F.W. Mosselmans, The chemical form of metallic debris in tissues surrounding metal-on-metal hips with unexplained failure, *Acta Biomater.* 6 (2010) 4439-4446.
- [35] A.J. Hart, A. Sandison, P. Quinn, B. Sampson, K.D. Atkinson, J.A. Skinner, A. Goode, J.J. Powell, J.F.W. Mosselmans, Microfocus study of metal distribution and speciation in tissue extracted from revised metal on metal hip implants, 14th International Conference on X-Ray Absorption Fine Structure, *J. Phys. Conf. Ser.* 190 (2009).
- [36] I. Swiatkowska, J.F.W. Mosselmans, T. Geraki, C.C. Wyles, J.J. Maleszewski, J. Henckel, B. Sampson, D.B. Potter, I. Osman, R.T. Trousdale, A.J. Hart, Synchrotron analysis of human organ tissue exposed to implant material, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 46 (2018) 128-137.
- [37] T.A. Simoes, M.G. Bryant, A.P. Brown, S.J. Milne, M. Ryan, A. Neville, R. Brydson, Evidence for the dissolution of molybdenum during tribocorrosion of CoCrMo hip implants in the presence of serum protein, *Acta Biomaterialia* 45 (2016) 410-418.
- [38] A.J. Hart, P.D. Quinn, F. Lali, B. Sampson, J.A. Skinner, J.J. Powell, J. Nolan, K. Tucker, S. Donell, A. Flanagan, J.F.W. Mosselmans, Cobalt from metal-on-metal hip replacements may be the clinically relevant active agent responsible for periprosthetic tissue reactions, *Acta Biomaterialia* 8 (2012) 3865-3873.

8. ŽIVOTOPIS

Curriculum vitae

RNDr. Radka Pechancová

Datum narození 1. ledna 1992 ve Svitavách, Česká republika
Bydliště: Na Zelince 1336, 751 31 Lipník nad Bečvou
Telefon: (+420) 736 726 368
E-mail: radka.pechancova@upol.cz
radka.pechancova@seznam.cz

Zaměstnání:

Prosinec 2016 – dosud Katedra analytické chemie, PřF UP v Olomouci, 17. listopadu 12,
771 46 Olomouc, Česká republika,
Pozice: vědecký pracovník

Vzdělání:

2013 – dosud postgraduální studium, obor analytická chemie, PřF UP v Olomouci

2019 státní rigorózní zkouška, obor analytická chemie, PřF UP
v Olomouci, rigorózní práce „Využití plynové chromatografie
v analýze fotoiniciátorů“

2014 – 2016 magisterské studium, obor analytická chemie, PřF UP v Olomouci,
diplomová práce „Optimalizace postupu pro stanovení stříbra
v obvazových materiálech pomocí ICP-MS“

2014 – 2016 souběžné doplňující studium učitelství chemie, PřF UP v Olomouci

2011 – 2014 bakalářské studium, obor bioorganická chemie, PřF UP v
Olomouci, bakalářská práce „Příprava derivátů Anagrelidu pomocí
syntézy na pevné fázi“

Vědecké zaměření:

Analytická chemie

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (roztoková analýza, HPLC-ICP-MS)

Analýza klinických a farmaceutických vzorků

Prezentace na odborných setkáních:

The 16th Symposium on the Latest Trends of Organic Synthesis LTOS 16, 13. – 16. srpna 2014, Ontario, Canada, poster: Lemrová B., Soural M., **Pechancová R.**, Zajdel P.: Directed Solid-Phase Synthesis of Trisubstituted Imidazo[4,5-b]pyridines.

European Winter Conference on Plasma Spectrochemistry, 19. – 24. února 2017, Sankt Anton am Arlberg, Austria, poster: **Pechancová R.**, Milde D., Hradilová Š.: DETERMINATION OF SILVER IN WOUND DRESSING MATERIALS BY ICP-MS.

European Symposium on Atomic Spectrometry & CANAS, 20. – 23. března 2018, Berlin, Germany, poster: **Pechancová R.**, Pluháček T., Gallo J., Milde D.: STUDY OF CHROMIUM SPECIES RELEASE FROM METAL IMPLANTS IN BLOOD AND JOINT EFFUSION USING HPLC-ICP-MS.

Advances in Chromatography and Electrophoresis & Chiranal 2018, 29. ledna – 1. února 2018, Olomouc, Czech Republic, poster: **Pechancová R.**, Qui Ch., Lemr K., Schug K.: COMPARATIVE ANALYSIS OF INK PHOTOINITIATORS IN FOOD PACKAGES BY GAS CHROMATOGRAPHY-VACUUM ULTRAVIOLET DETECTION AND GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY.

Kurz ICP-MS/OES 2019, 27. – 30. května 2019, Brno, Česká republika, poster: **Pechancová R.**, Gallo J., Milde D., Pluháček T.: SPECIÁLNÍ ANALÝZA CHROMU V BIOLOGICKÝCH TKÁNÍCH.

Publikační činnost:

Radka Pechancová, Tomáš Pluháček, Jiří Gallo, David Milde, Study of chromium species release from metal implants in blood and joint effusion: Utilization of HPLC-ICP-MS, Talanta 185 (2018) 370–377

Radka Pechancová, Changling Qiu, Jonathan Smuts, Karel Lemr, Kevin A. Schug, Comparative study of ink photoinitiators in food packages using gas chromatography with vacuum ultraviolet detection and gas chromatography with mass spectrometry, *J Sep Sci* 42 (2019) 556-565

Radka Pechancová, Tomáš Pluháček, David Milde, Recent advances in chromium speciation in biological samples, *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.* 152 (2019) 109-122

Andrea Šebestová, Daniel Baron, **Radka Pechancová**, Tomáš Pluháček, Jan Petr, Determination of oxaliplatin enantiomers at attomolar levels by capillary electrophoresis connected with inductively coupled plasma mass spectrometry, *Talanta* 205 (2019) 120-151

Radka Pechancová, Jiří Gallo, David Milde, Tomáš Pluháček, Ion-exchange HPLC-ICP-MS: A new window to chromium speciation in biological tissues, *Talanta* 218 (2020) 12150.

Pedagogická činnost:

Laboratorní cvičení (Chemická instrumentace)

Účast na výzkumných projektech:

Člen řešitelského týmu projektu GA ČR GAČR 19-203033S: Zlepšení citlivosti detekce v chirálních separacích pomocí kapilární elektroforézy ve spojení s ESI-MS nebo ICP-MS.

Člen řešitelského týmu projektu ARTECA: Pokročilé fyzikálně-chemické metody ve výzkumu a ochraně kulturního a uměleckého dědictví.

Člen řešitelského týmu projektů IGA_PrF_2018_027 a IGA_PrF_2019_028.

Odborná praxe:

Duben – červen 2017 3 měsíční stáž, Department of Chemistry and Biochemistry (prof. K. Schug), University of Arlington, Arlington, Texas, USA, výzkumné zaměření stáže: Analýza fotoiniciátorů pomocí GC-VUV a GC-MS

Únor 2016 průběžná pedagogická praxe, Gymnázium a jazyková škola s právem státní jazykové zkoušky Svitavy

Červenec 2015 stáž na oddělení výzkumu a vývoje a kontroly kvality v Synthonu, Blansko

Únor 2014 stáž na Jagellonské univerzitě v Krakově – příprava derivátů purinu pomocí syntézy na pevné fázi

Červenec 2013 Oddělení klinické biochemie, Nemocnice Svitavy

Červen 2013 Farmak a.s., Olomouc

Jazyky:

Čeština: rodilý mluvčí
Angličtina: Aktivní znalost, pokročilý B2
Němčina: Aktivní znalost, středně pokročilý B1
Ruština: Aktivní znalost, středně pokročilý B1

Dovednosti a znalosti:

Internet (www, e-mail) Windows XP/Vista/7/8/10, MS Office (Word, Excel, PowerPoint)
Grafický software - ChemDraw, CorelDRAW,

Ostatní:

Řídický průkaz skupiny B

V Olomouci dne 17.7.2020

.....
podpis